

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTBAH 27(2)  
(121-260) (1981)

1981

tom 27 nr 2  
PL ISSN 0032-5422



PW<sup>2</sup>

PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>



POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1981 TOM 27 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 27(2)  
(121-260) (1981)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

*Przewodniczący:* K. Zakrzewski (Warszawa)

*Sekretarz:* J. Szumieli (Warszawa),

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

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

## SEKRETARZ REDAKCJI

A. Wieraszko

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

## Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1980

Nakład 2390

Ark. wyd. 11,25, ark. druk 9,0

Pap. druk. offs. kl. V, 71 g, 70×100

Zam. 131/12/81

Oddano do składania 20.I.1981 r.

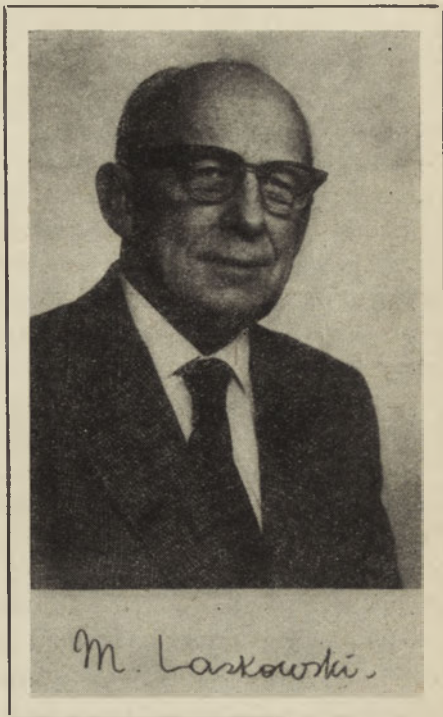
Podpisano do druku w listopadzie 1981 r.

Druk ukończono w grudniu 1981 r.

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

**Profesor**  
**Michał Laskowski, senior**  
**1905—1981**



Dnia 8 czerwca 1981 roku zmarł, pracujący przez czterdzieści lat w Stacjach Zjednoczonych A.P., wybitny polski biochemik — profesor Michał Laskowski, senior.

Urodzony 18 marca 1905 roku w Smoleńsku szkołę średnią i studia uniwersyteckie ukończył w Odrodzonej Polsce. Swą twórczą pracę naukową rozpoczął w Instytucie Biologii Doświadczalnej imienia M. Nenckiego w Warszawie jeszcze jako student; doktoryzował się w Uniwersytecie Warszawskim w 1929 roku. W latach 1929-35 pracował w Wyższej Szkole Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie jako starszy asystent, adiunkt i docent, habilitowany w roku 1935. Jako stypendysta Funduszu Kultury Narodowej a następnie jako stypendysta Fundacji Rockefellera odbył dwuletni staż naukowy w Zakładzie Fizjologii Uniwersytetu w Bazylei oraz Lister Institute for Preventive Medicine w Londynie. W latach 1937-39 kierował Zakładem Fizjologii Zwierząt w Wyższej Szkole Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Z dniem 31 sierpnia 1939 roku został powołany na profesora nadzwyczajnego. Jako oficer rezerwy Wojska Polskiego prof. Laskowski brał udział w kampanii wrześniowej w Polsce w roku 1939 i kampanii francuskiej w roku 1940. Od roku 1941 przebywał

w Stanach Zjednoczonych, gdzie pracował kolejno na kierowniczych stanowiskach w kilku znanych placówkach biochemicznych. W latach 1945-65 był profesorem biochemii w Marquette University w Milwaukee w stanie Wisconsin. W 1965 roku prof. Laskowski przeniósł się do Buffalo w stanie Nowy York, gdzie kierował Laboratorium Enzymologii w Instytucie im. Roswella Parka jako American Cancer Society Research Profesor, będąc równocześnie profesorem zwyczajnym Uniwersytetu stanu Nowy York w Buffalo.

Profesor Michał Laskowski, senior — pracował badawczo ponad pięćdziesiąt lat i jest autorem wielu wybitnych, wysoce cenionych prac eksperymentalnych oraz szeregu, wprowadzających nowe uogólnienia prac przeglądowych. Wczesne, szeroko cytowane prace badawcze, wykonane przez dr Laskowskiego w Polsce w latach trzydziestych dotyczyły przemian wapniowych a ich wynikiem było wykazanie, że wapń transportowany jest we krwi przez fosfoproteidy. Szczególnie ważnym osiągnięciem było pierwsze wyizolowanie z krwi fosfoproteidów, znanych wówczas wyłącznie w mleku.

Właściwe badania w zakresie enzymologii rozpoczął prof. Laskowski od razu po przyjeździe do Stanów Zjednoczonych a ich efektem m.in. było dokonanie pierwszej krystalizacji katalazy i gamma-karboksypeptydazy. Główne swe zainteresowania badawcze skoncentrował wkrótce prof. Laskowski na enzymach nukleolitycznych, a jak nieraz mówił sprawą przypadku było rozszerzenie zainteresowań na enzymy proteolityczne — gdy okazało się, że izolowana i oczyszczona dezoksyrybonukleaza I krystalizowała we wczesnych jego doświadczeniach razem z chymotrypsynogenem B. Ze spostrzeżenia tego rozwinęły się następnie badania nad inhibitorami trypsyny, których kilka — jako pierwszy — otrzymał w postaci krystalicznej. Szczególnie ważnym osiągnięciem było zbadanie — po raz pierwszy i poprawny — całkowitej struktury pierwszorzędowej inhibitora trypsyny z trzustki, określenie aminokwasów w jego centrum aktywnym oraz wyjaśnienia mechanizmu działania pozwalające na wprowadzenie do enzymologii nowych pojęć, takich na przykład jak inhibicja czasowa (*temporary inhibition*).

W zakresie badań enzymów nukleolitycznych podstawowe znaczenie miało wykrycie pierwszej bakteryjnej dezoksyrybonukleazy odszczepiającej fragmenty zakończone grupą fosforanową w pozycji 3', ustalenie, że nukleaza z jadu wężów jest egzonukleazą, wykrycie pierwszego inhibitora dezoksyrybonukleazy trzustkowej oraz propozycja pierwszej, racjonalnej klasyfikacji nukleaz. Trafne i owocne okazało się zastosowanie nukleaz do badania pierwszorzędowej struktury kwasów nukleinowych w połączeniu z dwukierunkową elektroforezą produktów. Badania te pozwoliły na wprowadzenie do kinetyki enzymatycznej nowych pojęć autoakceleracji i auto-retardacji. Przed kilkunastu laty Profesor Laskowski wraz ze swymi współpracownikami wykrył nową grupę enzymów nukleolitycznych, które

specyficznie atakują fragmenty DNA bogate w adeninę i tyminę, i nazwał te nukleazy enzymami odcinkowo specyficznymi, „*region specific nucleases*”. Badania enzymów nukleolitycznych prowadził Profesor Laskowski do ostatnich dni swego życia. Kilka Jego prac z tej dziedziny jest jeszcze w druku. Ogółem prof. M. Laskowski ogłosił ponad 200 oryginalnych prac doświadczalnych i wiele przeglądowych, w tym szereg drukowanych w wydawnictwach polskich.

Profesor Michał Laskowski, senior, wykształcił ponad dwudziestu biochemików polskich, którzy w Jego laboratorium uczyli się nowoczesnych metod badawczych i poznawali ostatnie osiągnięcia ówczesnej biochemii. W Laboratorium Profesora Laskowskiego panowała atmosfera naukowej dyskusji i życzliwości. Interesował się On nie tylko pracą naukową stypendystów ale również ich codziennymi kłopotami. Ze swymi stypendystami pozostawał Profesor Laskowski w kontakcie jeszcze wiele lat po ich powrocie do macierzystych placówek, a także odwiedzał ich podczas swych wielokrotnych pobytów w Polsce służąc radą i krytyką.

Profesor M. Laskowski, senior, członek założyciel Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego był Członkiem Rzeczywistym a później Honorowym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz Członkiem Zagranicznym Polskiej Akademii Nauk. Był On też członkiem British Biochemical Society, American Chemical Society, American Society of Biological Chemistry, Society for Experimental Biology and Medicine, American Association for Cancer Research a także członkiem American Association for the Advancement of Science.

Profesor M. Laskowski otrzymał wiele nagród naukowych, takich na przykład, jak nagroda imienia E. K. Freya za badania nad inhibitorami proteaz, jak medal imienia J. Schoellenkopfa nadany przez American Chemical Society za podstawowe badania w dziedzinie biochemii a w szczególności za badania enzymów nukleolitycznych, oraz nagroda imienia H. Wehra za badania podstawowe w dziedzinie biochemii nowotworów. Wspólnie ze swym synem M. Laskowskim, juniorem, profesor Laskowski, senior otrzymał też nagrodę imienia A. Jurzykowskiego za badania w dziedzinie enzymologii w Polskim Instytucie Sztuki i Nauk w Nowym Yorku.

Śmierć Profesora Michała Laskowskiego, seniora - spowodowała niepowetowaną stratę. Ubył spośród nas wielki biochemik. Brakować będzie Jego przyjacielskich i kompetentnych rad polskim biochemikom.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne





## NOWE W BIOCHEMII

### Nagroda Nobla w dziedzinie chemii 1980

W 1980 roku lauretami Nagrody Nobla z dziedziny chemii zostało trzech uczonych: prof. Paul Berg, Stanford University, USA; prof. Walter Gilbert z Harvard University, USA oraz prof. Frederick Sanger, Medical Research Council, Cambridge, Anglia. Nagroda ta została przyznana za prace dotyczące inżynierii genetycznej. W ciągu ostatnich 10-ciu lat, zastosowanie technik inżynierii genetycznej, umożliwiło uczynom wyodrębnienie szeregu genów zarówno z organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Opracowanie metod mapowania przy użyciu enzymów restrykcyjnych oraz ustalenie sekwencji zasad w DNA pozwoliło na dokładne określenie struktury wyodrębnianych genów. W pracowni prof. Berga po raz pierwszy dokonano połączenia DNA dwóch różnych organizmów — faga  $\lambda$  i wirusa SV40, zapoczątkowując w ten sposób prace z dziedziny inżynierii genetycznej. Prace Berga przyczyniły się do poznania genetyki wirusa SV40. Zespół pracowników kierowany przez prof. Berga wprowadził gen kodujący  $\beta$ —globinę królika do genomu SV40, a co więcej uzyskano ekspresję tego genu w komórkach małpy.

Drugą połowę nagrody uzyskali razem prof. W. Gilbert i prof. F. Sanger. Opracowali oni, niezależnie od siebie, dwie różne techniki pozwalające na łatwe i szybkie ustalenie sekwencji zasad w DNA. Metoda Gilberta polega na wprowadzeniu radioaktywnego fosforanu na jeden koniec fragmentu DNA otrzymanego w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi. Następnie przeprowadza się oddzielnie cztery reakcje, które umożliwiają rozpad cząsteczek DNA specyficznie przy określonej zasadzie. (A, C, T lub G). Reakcję przeprowadza się w takich warunkach, aby rozpad nastąpił średnio przy jednej zasadzie na cząsteczkę DNA.

W metodzie Sangera wykorzystuje się polimerazę, która dobudowuje radioaktywne komplementarne łańcuchy do danej nici DNA i której działanie może być przerwane przez zastosowanie czterech różnych inhibitorów. W obu metodach produkty reakcji, fragmenty DNA różnej długości, rozdziela się na żelach poliakrylamidowych, a następnie z autoradiogramu żelu można odczytać sekwencję zasad. Prof. Gilbert już siedem lat temu opublikował sekwencję 20-sto nukleotydowego operatora operonu laktozy, co wówczas było nie lada osiągnięciem. Obecnie, zastosowanie metody Gilberta umożliwia w pojedynczym doświadczeniu ustalenie sekwencji fragmentu DNA zawierającego kilkaset nukleotydów.

Profesor Sanger i jego współpracownicy określili sekwencje całego genomu faga  $\phi$ 174. W wyniku tych badań stwierdzono, między innymi, że dana sekwencja DNA może kodować dwa a nawet trzy różne geny zależnie od miejsca odczytu. Zespół prof. Sangera ustalił również sekwencje nukleotydów mitochondrium komórek Hela, co doprowadziło do stwierdzenia, że kod genetyczny nie jest w pełni uniwersalny. Na przykład trójka UGA, będąca normalnie kodonem „stop”, w mitochondriach wyznacza tryptofan. Prof. Sanger otrzymał już poprzednio Nagrodę Nobla w 1958 r. za ustalenie sekwencji aminokwasów insuliny. Komitet przyzna-

jący nagrody Nobla stwierdził, że badania tegorocznych laureatów w dużym stopniu „zwiększyły naszą wiedzę o tym, w jaki sposób DNA rządzi chemiczną maszyną komórki”.

*E. Bartnik*

RENATA DĄBROWSKA

## Fosforylacja białek aparatu kurczliwego mięśni

### Protein phosphorylation in the contractile apparatus of muscle

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Fosforylacja białek cienkiego filamentu
  - II-1. Charakterystyka miejsc fosforylacji białek cienkiego filamentu
  - II-2. Rola fosforylacji białek cienkiego filamentu
- III. Fosforylacja miozyny
  - III-1. Charakterystyka miejsca fosforylacji i enzymów biorących udział w fosforylacji miozyny
  - III-2. Rola fosforylacji miozyny
- IV. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Protein phosphorylation in the thin filament
  - II-1. Characterization of the sites of protein phosphorylation in the thin filament
  - II-2. Role of protein phosphorylation in the thin filament
- III. Phosphorylation of myosin
  - III-1. Characterization of the phosphorylation site and of the enzymes involved in the phosphorylation of myosin
  - III-2. Role of phosphorylation of myosin
- IV. Concluding remarks

#### I. Wstęp

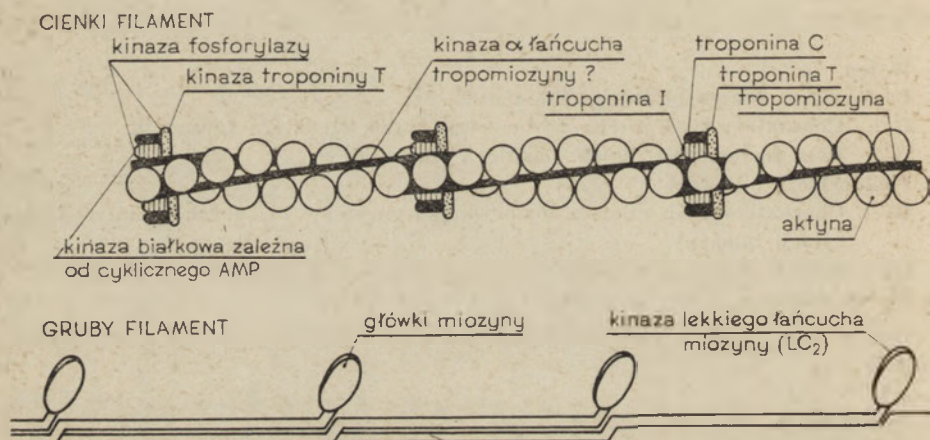
Odkąd po raz pierwszy zwrócono uwagę, że fosforylacja enzymów może mieć znaczny wpływ na ich aktywność (1), wykazano, że wiele z nich występuje bądź w formie ufosforylowanej bądź zdefosforylowanej

Doc. dr hab. Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: c-AMP-cykliczny 3'5'-adenozynomonofosforan, c-GMP-cykliczny 3'5'-guanozynomonofosforan. EDTA — sól sodowa kwasu etylenodwuaminocteroocowego.

(2, 3). Opisano też reakcje fosforylacji wielu białek, które nie mają enzymatycznych właściwości. Fosforylacja tych białek ma często związek z ich regulacyjną rolą (4).

Najlepiej poznany dziś układ fosforylacja-defosforylacja białek biorących udział w regulacji metabolizmu glikogenu (5), został wykryty w mięśniach już ponad dwadzieścia lat temu. Badania ostatnich lat wskazują, że również białka związane z procesem skurczu mięśni ulegają reakcjom fosforylacji i defosforylacji (6, 7). Dotyczy to przede wszystkim głównego białka grubego filamentu aparatu kurczliwego mięśni, miozyny oraz białek biorących udział w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni poprzecznie prążkowanych, tj. składników troponiny — troponiny I i troponiny T oraz tropomiozyny, zlokalizowanych w cienkim filamencie (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat budowy cienkiego i grubego filamentu mięśni poprzecznie prążkowanych z zaznaczeniem miejsc fosforylacji oraz enzymów katalizujących fosforylację poszczególnych białek (wg 7).

Niniejszy artykuł poświęcony jest charakterystyce enzymów biorących udział w procesie fosforylacji i defosforylacji białek aparatu kurczliwego mięśni oraz roli tych procesów w mechanizmie skurczu mięśni.

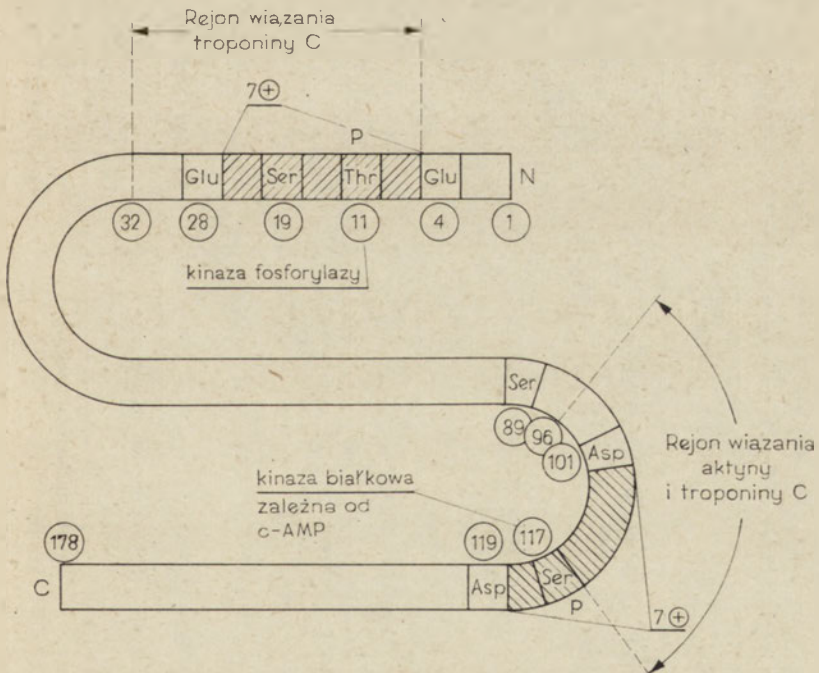
## II. Fosforylacja białek cienkiego filamentu

### II-1. Charakterystyka miejsc fosforylacji białek cienkiego filamentu

Kompleks troponiny wraz z tropomiozyna reguluje w mięśniach poprzecznie prążkowanych interakcję aktyny z miozyna (8). Według obecnie panujących koncepcji regulacji, wiązanie jonów  $Ca^{2+}$  z troponina C i zmiana jej konformacji przenoszona na pozostałe składniki troponiny (troponina I i troponina T) i tropomiozyna powoduje odsłanianie miejsc

w cząsteczce aktyny, które reagują z miozyna, a w konsekwencji następuje skurcz mięśni. W nieobecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , w stanie rozkurczu, tropomiozyna zasłania miejsca interakcji aktyny z miozyna (8). Obecnie znana jest sekwencja aminokwasów wszystkich komponent kompleksu białek regulujących mięśni poprzecznie prążkowanych, a określenie miejsc ich interakcji oraz miejsc odpowiedzialnych za funkcję poszczególnych białek filamentu cienkiego zmierza do zrozumienia mechanizmu regulacji. Szczególne zasługi w tych badaniach ma zespół prof. Perry'ego.

Spośród składników troponiny specyficznej fosforylacji ulegają dwa zasadowe białka kompleksu: troponina I i troponina T (9-13). Troponina I izolowana z mięśni szkieletowych królika przy pomocy chromatografii powinowactwa zawiera około 0.4-0.5 mola  $\text{P}_n$ /mol białka. Kowalencyjnie związany fosforan jest naogół uwalniany w czasie otrzymywania tego białka przy użyciu konwencjonalnych metod (14). W badaniach nad sekwencją aminokwasów troponiny I z mięśni szkieletowych wykazano, że w jej cząsteczce są dwa rejony naładowane dodatnio (15). Jeden rejon obejmuje reszty 5-27, pozycję 11 zajmuje w nim treonina fosforylowana przy udziale kinazy fosforylazy. Drugi rejon obejmujący reszty 98-116 sąsiaduje z miejscem fosforylacji (seryna 117), katalizowanej przez kinazę białkową zależną od c-AMP (Ryc. 2) (15-17). Sekwencja aminokwasów w pobliżu miejsc fosforylacji podana jest w tabeli 1. Dzięki zastosowaniu



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie sekwencji aminokwasów biologicznie aktywnych rejonów cząsteczki troponiny I, ze szczególnym uwzględnieniem miejsc fosforylacji (7).

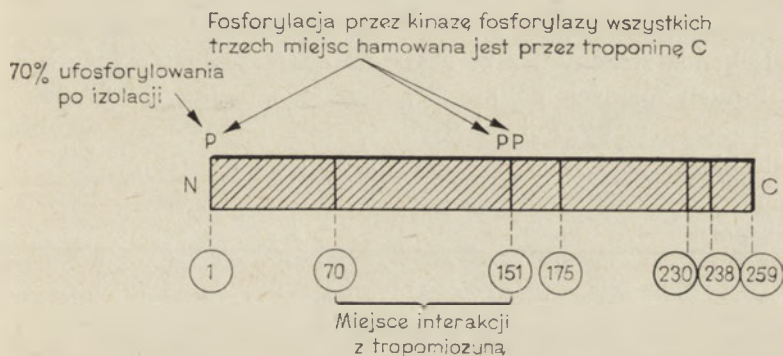
Tabela 1.

Miejsca fosforylacji białek aparatu kurczliwego mięśni szkieletowych

Białko	Rodzaj mięśnia	Sekwencja aminokwasów w pobliżu miejsca fosforylacji	Enzym katalizujący fosforylację	Pismienictwo
Troponina I	Szybki mięsień szkieletowy królika	117 Arg-Met-SerP-Ala-Asp-Ala-Met	Kinaza białkowa zależna od c-AMP	(16,17)
	Mięsień serca królika	11 Ala-Ile-ThrP-Ala-Arg-Arg-Gln	Kinaza fosforylazy	(16,17)
		20 Arg-Arg-SerP-Asp-Arg-Ala-Tyr	Kinaza białkowa zależna od c-AMP	(24,25)
		146 Arg-Ile-SerP-Ala-Asp-Ala-Met	„ „	(24,25)
		72 Arg-Leu-SerP-Thr-Arg-Cys-Gln	Kinaza fosforylazy	(24,25)
Troponina T	Szybki mięsień szkieletowy królika	1 SerP-Asn-Glu-Glu-Val-Glu	Kinaza troponiny T	(22,23)
		149 Ala-Leu(SerP, Ser) Met-Gly-Ala	Kinaza fosforylazy	(16,20)
		156 Asn-Tyr (SerP, Ser) Tyr	Kinaza fosforylazy	(16,20)
		283 Leu-Asn-Asp-Met-Thr-SerP-Ile-CooH	Kinaza $\alpha$ łańcucha tropomiozyny?	(29)
Miozyna LC <sub>2</sub>	Szybki mięsień szkieletowy królika	14 Gly-Gly-(SerP, Ser) Asn-Val-Phe	Kinaza LC <sub>2</sub> miozyny	(42,44)

selektywnej fragmentacji troponiny I otrzymano a następnie rozdzielono szereg peptydów. Badanie ich przy zastosowaniu elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w obecności troponiny C oraz chromatografii powinowactwa (*Sepharose* sprzężona z troponiną C) wykazały, że rejon od N-końca (reszty 1-47) i rejon zawierający reszty 97-117, a więc miejsca cząsteczki troponiny I obejmujące obydwie fosforylowane aminokwasy tworzą kompleks z troponiną C (18). Poza tym wykazano, że rejon zawierający reszty 96-117 tworzy kompleks z aktyną. Wyizolowany peptyd obejmujący te reszty wykazywał zdolność hamowania aktywności ATPazy aktomiozynowej w obecności tropomiozyny, co wskazywało, że blokuje on te miejsca aktyny, które reagują z miozyną (18).

Troponina T wyizolowana z mięśni szkieletowych zawiera około 0.7 mola  $P_n$ /mol białka (19). Badania sekwencji aminokwasów tego białka wykazały, że trzy miejsca cząsteczki są fosforylowane przy udziale kinazy fosforylasy. Są to reszty seryny: N-końca, 149 i 156 (Ryc. 3, Tabela 1)



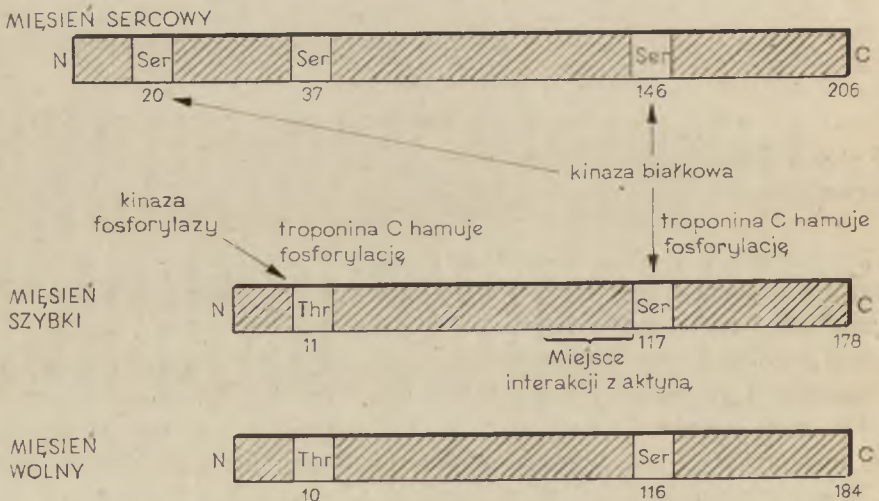
Ryc. 3. Biologicznie aktywne rejony cząsteczki troponiny T z zaznaczeniem miejsc fosforylacji (6).

(19, 20). Żadna z tych reszt nie ulega fosforylacji przy udziale kinazy białkowej zależnej od c-AMP (19). Fragmentacja białka przy pomocy bromocyjanu prowadząca do otrzymania sześciu peptydów i badania interakcji tych peptydów z troponiną C sugerują, że interakcja troponiny C z troponiną T powoduje blokowanie wszystkich trzech miejsc fosforylacji (19). Może to być spowodowane blokowaniem sterycznym, bądź zmianami konformacyjnymi białka, które uniemożliwiają dostęp kinazy. Peptyd, w którym znajduje się reszta fosforylowanej seryny 149 bierze udział w interakcji białka z tropomiozyną, która może mieć fundamentalne znaczenie w mechanizmie regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni (19, 20).

Już wcześniej wykazano, że ekstrakt z mięśni myszy, który nie zawiera kinazy fosforylasy może katalizować fosforylację troponiny T, co sugerowało obecność w nim kinazy troponiny T, różnej od kinazy fosforylasy (21). Ostatnio przy zastosowaniu chromatografii na DEAE celulo-

zie, hydroksyapatycie i *Sepharose* 6B oczyszczono enzym specyficznie katalizujący fosforylację seryny N-końca troponiny T (22, 23), który nie fosforyluje fosforylasy b.

Większość badań nad fosforylacją komponent troponiny była prowadzona przy użyciu białek izolowanych z szybkich mięśni szkieletowych (9-13). Porównując sekwencję troponiny I izolowanej z wolnych mięśni szkieletowych i mięśni serca wykazano, że wszystkie formy polimorficzne tego białka wykazują znaczną homologię sekwencji aminokwasów (Ryc. 4), szczególnie w rejonie miejsc wiązania aktyny (24, 25). We wszystkich tych formach polimorficznych troponiny I występują reszty aminokwasowe, które są fosforylowane przy udziale kinazy fosforylasy i kinazy białkowej zależnej od c-AMP (16, 17, 24, 25). W przypadku troponiny I z mięśni serca seryna 146, która odpowiada serynie 117 w mięśniu szkieletowym, jest fosforylowana przy udziale kinazy białkowej zależnej od c-AMP z podobną szybkością (14). W cząsteczce troponiny I z mięśni serca występuje poza tym dodatkowe miejsce fosforylacji, katalizowanej przez kinazę białkową zależną od c-AMP i c-GMP (26) w dodatkowym peptydzie od N-końca złożonym z 26 reszt aminokwasowych, który nie występuje w innych formach polimorficznych tego białka (14, 27, 28). Jest to reszta serynowa w pozycji 20 (Ryc. 4). Rejon cząsteczki w obrębie tej reszty nie bierze udziału w interakcji z troponiną C (14).



Ryc. 4. Porównanie miejsc fosforylacji polimorficznych form troponiny I (wg 6).

Fosforylację tropomiozyny z mięśni szkieletowych zaobserwowano po domięśniowej iniekcji znakowanego fosforanu i autoradiografii wydzielonej frakcji miofibrylarnej (29). Ilość wbudowanego do tropomiozyny fosforanu w obecności inhibitora fosfatazy, wynosiła 0.5 mola  $P_n$ /mol białka (29). Następnie wykazano, że estryfikacji ulega reszta serynowa



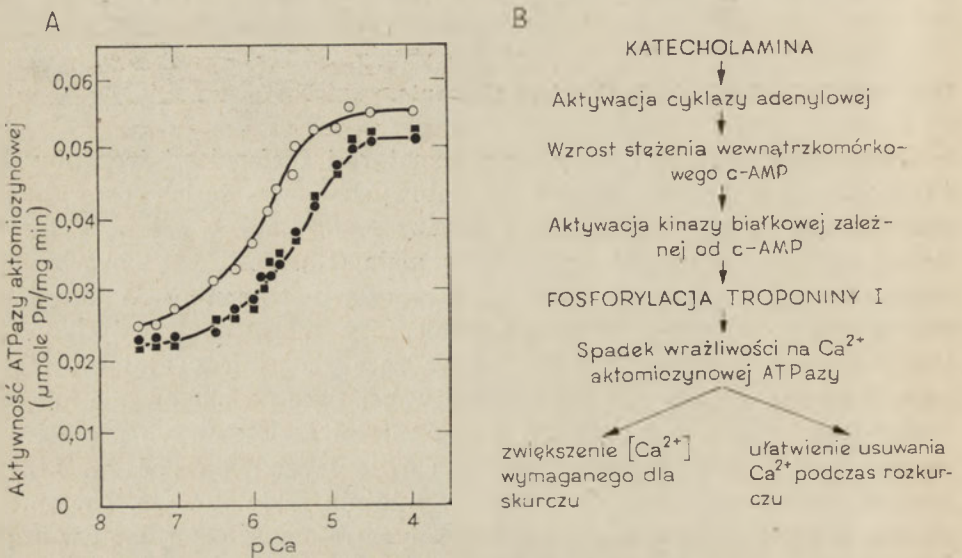
283 (przedostatni aminokwas od C-końca) w łańcuchu  $\alpha$  (Tabela 1). Dalsze dowody fosforylacji  $\alpha$  łańcucha tropomiozyny z mięśni szkieletowych żaby, królika i z mięśni serca królika uzyskano techniką magnetycznego rezonansu jądrowego  $^{31}\text{P}$  (29). Sekwencja aminokwasów wokół miejsca fosforylacji  $\alpha$  łańcucha tropomiozyny jest bardzo podobna do odpowiedniej sekwencji  $\beta$  łańcucha (tylko trzy zastąpienia aminokwasów). Świadczy to, że musi istnieć kinaza o dużej specyficzności działania, która różni obydwie łańcuchy. Autorzy (29) wysunęli przypuszczenie, że fosforylacja tropomiozyny może stabilizować strukturę białka przez wytworzenie mostków pomiędzy resztą fosforanową i grupami  $\epsilon\text{NH}_2$  lizyny.

## II-2. Rola fosforylacji białek cienkiego filamentu.

Dotychczas brak jest danych na temat roli fosforylacji troponiny I i troponiny T w skurczu mięśni szkieletowych. Szybkość ich fosforylacji przy udziale czystych preparatów kinazy fosforylasy czy kinazy białkowej zależnej od c-AMP jest bardzo mała (13). Jeśli więc byłyby to jedyne kinazy dostępne *in vivo* dla fosforylacji troponiny w mięśniu szkieletowym, to powstawałoby pytanie, czy mogą one modyfikować lub regulować szybkie procesy prowadzące do skurczu mięśni tego typu. Z drugiej strony badania *in vitro* wskazujące na blokowanie miejsc fosforylacji troponiny I i troponiny T z mięśni szkieletowych przez troponinę C (13) stawiają pod znakiem zapytania fizjologiczne znaczenie procesu fosforylacji obu tych białek w mięśniu szkieletowym. Niemniej jednak obecność dobrze scharakteryzowanych rejonów fosforylacji w cząsteczce troponiny I i troponiny T umożliwiła uzyskanie cennych informacji na temat interakcji tych białek z innymi składnikami cienkiego filamentu i w konsekwencji rozszerzyła wiedzę na temat sekwencji procesów prowadzących do skurczu mięśni szkieletowych.

Fosforylacja seryny 20 w dodatkowym peptydzie troponiny I z mięśni serca, katalizowana przez kinazę białkową zależną od c-AMP, zachodzi znacznie szybciej niż fosforylacja seryny 146. Stąd też *in vitro* fosforylacja troponiny I z mięśni serca jest procesem około 30 razy szybszym niż fosforylacja troponiny I z mięśni szkieletowych. Obecność troponiny C nie hamuje fosforylacji seryny 20 troponiny I z mięśni serca (13, 14). Cechy te czynią, że proces fosforylacji troponiny I w mięśniu serca ma szczególne znaczenie w jego metabolizmie. Badania nad izolowaną z mięśni serca troponiną I wskazują, że fosforylacja seryny 20, związana jest z inotropową odpowiedzią mięśni serca na adrenalinę (27, 30). Zauważono, że w perfundowanym sercu, po 20 min. od podania adrenaliny lub innych amin katecholowych ponad 80% znakowanego  $^{32}\text{P}$  fosforanu stanowi fosforan estryfikujący serynę 20 (27). Nie obserwuje się inotropowego działania adrenaliny oraz wbudowywania fosforanu do troponiny I

w obecności czynników blokujących adrenoreceptory. Z drugiej strony wykazano, że fosforylacja troponiny I z mięśni serca w odróżnieniu od fosforylacji troponiny I z mięśni szkieletowych powoduje zmniejszenie wrażliwości aktywności ATPazy aktomiozynowej na jony  $\text{Ca}^{2+}$  (6, 27, 31, 32) (Ryc. 5A). Tak więc, wynikiem działania hormonu może być fosforylacja troponiny I, która prowadzi do spadku wrażliwości na  $\text{Ca}^{2+}$  interakcji aktyny z miozyna, a co za tym idzie wzrost szybkości rozkurczu — zjawiska charakterystycznego dla inotropowego działania katecholamin (Ryc. 5B) (33).



**Ryc. 5.** Rola fosforylacji troponiny I w działaniu mięśnia serca (33).

- A) Wpływ fosforylacji troponiny I na wrażliwość na  $\text{Ca}^{2+}$  aktywności ATPazy aktomiozyny z mięśni serca.  
Symbole puste — białko nieufosforylowane, symbole pełne — białko ufosforylowane.
- B) Schemat przedstawiający modyfikację białek aparatu kurczliwego serca pod wpływem amin katecholowych.

### III. Fosforylacja miozyny

#### III-1. Charakterystyka miejsca fosforylacji i enzymów biorących udział w fosforylacji miozyny

Struktura i funkcja miozyny oraz jej formy polimorficzne były ostatnio opisane na łamach Postępów Biochemii (34).

Spośród niskocząsteczkowych subfragmentów miozyny interesujące z punktu widzenia regulacji interakcji tego białka z aktyną są lekkie łańcuchy  $\text{LC}_2$ , występujące we wszystkich jej formach polimorficznych w ilości 2 mole/mol miozyny (8). Łańcuchy te zostały nazwane przez

Kendricka - Jonesa (35, 36) „regulującymi” ponieważ mogą zastępować lekki łańcuch miozyny mięczaków  $LC_{EDTA}$ , w jego funkcji regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni tych zwierząt. Usuwanie  $LC_2$  z miozyny mięśni szkieletowych wpływa nie tylko na interakcję tego białka z aktyną (37-39, 41), ale zmienia również wrażliwość ATPazy kompleksu aktomiozynowego na działanie jonów  $Ca^{2+}$  (40, 41). Wiadomo, że łańcuchy  $LC_2$  wiążą  $Ca^{2+}$ , a ich struktura I-rzędowa wykazuje duży stopień homologii z innymi białkami wiążącymi jony  $Ca^{2+}$  jak parwalbuminy czy troponina C (42).

Perrie i Perry (43) po raz pierwszy zwrócili uwagę na to, że łańcuchy  $LC_2$  z mięśni szkieletowych migrują w warunkach elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności 6M mocznika przy pH 8,6 w postaci dwóch prążków, których proporcje zmieniają się w zależności od sposobu otrzymywania miozyny z mięśni. Analiza obydwu łańcuchów rozdzielonych metodą chromatografii wykazała, że mają one identyczny skład aminokwasowy, ale różnią się zawartością fosforu. Szybciej migrujący w czasie elektroforezy łańcuch zawierał 1 mol  $P_n$ /mol białka. Zanik prążka odpowiadającego temu łańcuchowi pod wpływem fosfatazy alkalicznej z *E. coli* ostatecznie potwierdził, że jest to forma ufosforylowana tego samego białka (44). Równocześnie wykazano, że po wprowadzeniu ( $\gamma$ - $^{32}P$ ) ATP do homogenatu mięśni i następnej ekstrakcji miozyny, jej łańcuchy  $LC_2$  zawierały związany  $^{32}P$ . Świadczy to, że w homogenacie mięśni znajduje się enzym katalizujący fosforylację  $LC_2$  miozyny (45). Wkrótce przy zastosowaniu chromatografii na DEAE celulozie i hydroksypatycie, frakcjonowania siarczanem amonu i wytrącania izoelektrycznego wydzielono kinazę lekkiego łańcucha  $LC_2$  miozyny (fosfotransferaza ATP-lekki łańcuch  $LC_2$ ) zarówno z zamrożonych preparatów surowej miozyny jak i z sarkoplazmy szybkich mięśni szkieletowych (46). Kinaza ta ma masę cząsteczkową 77 000 i różni się strukturą i właściwościami od kinaz białkowych izolowanych dotąd z mięśni (46). Katalizuje reakcje estryfikacji reszt serynowych  $LC_2$  miozyny w pozycji 14 lub 15 (Tabela 1) (42, 43). Najlepszym donorem reszt fosforanowych dla kinazy  $LC_2$  miozyny okazał się ATP, inne nukleotydy jak ITP, GTP i UTP posiadają tylko 5% efektywności ATP. Cechą charakterystyczną jest zależność jej działania od stężenia jonów  $Ca^{2+}$  (46).

Kinaza  $LC_2$  miozyny izolowana z szybkich mięśni szkieletowych ma wysoką specyficzność substratową, oprócz  $LC_2$  miozyny z tego samego typu mięśni, katalizuje wyłącznie fosforylację  $LC_2$  miozyny z wolnych mięśni szkieletowych, mięśni serca i mięśni gładkich (arterii szyjnej i żołądka krowy oraz macicy szczura), ale nie katalizuje fosforylacji  $LC_2$  ( $LC_{EDTA}$ ) miozyny z mięśni bezkręgowców (mięczaki) (46). Szybkość fosforylacji poszczególnych łańcuchów  $LC_2$  jest różna.

Z szybkich mięśni szkieletowych królika wydzielono też przy pomocy chromatografii powinowactwa (*Sepharose* sprzężona z ufosforylowanym

Tabela 2

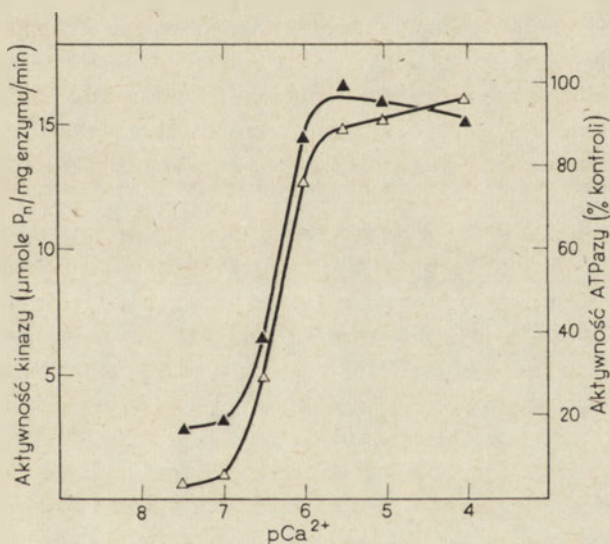
Charakterystyka form polimorficznych kinazy LC<sub>2</sub> miozyny

Rodzaj tkanki	Aktywność nmole/g tkanki, min.	Ciężar cząsteczkowy podjednostki katalitycznej kinazy	K <sub>m</sub>		V <sub>max</sub> mole P <sub>n</sub> /mg min.	Piśmiennictwo
			ATP μmole	LC <sub>2</sub> μmole		
Szybki mięsień szkieletowy ? a) królika b) psa	4,56 ± 28 - -	77 000 80 000 155 000	200-400 280 -	40-50 24 -	15-30 4,3 3	(46,49,64) (56) (79)
Mięsień serca a) królika b) psa	16 ± 3,5 - -	- 85 000 155 000	- 175 -	- 21 -	- 0,03 -	(49) (34,65) (45,79)
Mięsień gładki a) macicy b) żołądka kureczaka c) żołądka indyka d) arterii szyjnej gołębia e) aorty wołu	38 ± 3,6 - - - -	- 105 000 125 000 105 000* 100 000*	- 65 - - -	- - - - -	- 5-13 4,3 - -	(49,60,74)  (69) (87,88) (89)
Płytki krwi	- -	105 000 105 000	- 121	- 18	- 3,1	(68) (69,76)

\* białko ulegające fosforylacji przy udziale kinazy białkowej zależnej od e-AMP

LC<sub>2</sub>) specyficzny enzym katalizujący defosforylację LC<sub>2</sub> miozyny (47). Fosfataza ta (fosfohydrolaza ufosforylowanego łańcucha LC<sub>2</sub> miozyny) posiada masę cząsteczkową 70 000 i nie jest hamowana jak inne fosfatazy przez NaF. Jej działanie nie zależy od stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> ani Mg<sup>2+</sup>, chociaż ten ostatni kation stabilizuje enzym (47). Obecność podobnego systemu enzymów biorących udział w fosforylacji i defosforylacji LC<sub>2</sub> miozyny wykazano również w wolnych mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym, mięśniach gładkich oraz w mioblastach, fibroblastach i płytkach krwi (48-53). Lekkie łańcuchy LC<sub>2</sub> miozyny izolowanej z różnych źródeł nie są identyczne (54), podobnie też kinazy LC<sub>2</sub> miozyny występują w postaci różnych form polimorficznych (Tabela 2). Wykazano, że jakkolwiek aktywność fosfatazy LC<sub>2</sub> miozyny w sarkoplazmie różnych typów mięśni jest zbliżona i wynosi około 50 nmoli/g tkanki/min., to aktywność kinazy znacznie się różni np. w szybkim mięśniu szkieletowym jest ona 12 razy bardziej aktywna niż w mięśniu gładkim (49) (Tabela 2).

Aktywacja kinazy w tym samym zakresie stężeń jonów Ca<sup>2+</sup> co aktywacja ATPazy aktomiozynowej (Ryc. 6) (46) sugeruje, że enzym ten może być „uruchamiany” na skutek stymulacji mięśni w wyniku której następuje uwalnianie jonów wapnia z sarkoplazmatycznego retikulum do sarkoplazmy (Ryc. 6). Hipoteza ta stała się bardziej atrakcyjna kiedy wy-



Ryc. 6. Aktywacja kinazy LC<sub>2</sub> miozyny z mięśni szkieletowych (symbole puste) i ATPazy aktomiozynowej (symbole pełne) pod wpływem jonów Ca<sup>2+</sup> (16).

kazano, że zarówno kinaza LC<sub>2</sub> miozyny z mięśni szkieletowych (55-58) jak i też z mięśni gładkich (59, 60) wymagają dla działania oprócz jonów Ca<sup>2+</sup> obecności niskocząsteczkowego białka zwanego kalmoduliną. Białko to znane jest obecnie z wielofunkcyjności i powszechności występowania

(61-63), wówczas znane było jako aktywator dwóch enzymów: fosfodwuesterazy i cykazy adenylowej. Kalmodulina podobnie jak troponina C wiąże  $\text{Ca}^{2+}$  i tylko w obecności tego kationu, który powoduje zmiany jej konformacji, tworzy aktywny kompleks z kinazą  $\text{LC}_2$  miozyny (56, 60, 64). Uważa się, że jest ona regulatorką podjednostką kinazy (60, 64). W początkowych badaniach kinazy z mięśni szkieletowych (46) zanieczyszczenia substratu kalmoduliną wynoszące często mniej niż 0.1% ilości substratu, wystarczające do pełnej aktywacji enzymu, nie były zauważone.

Podobną zależność aktywności kinazy od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny wykazano następnie w mięśniach serca (65). Jej aktywność jest dużo niższa niż aktywność kinazy z mięśni szkieletowych.

Początkowo sądzono, że kinazy obecne w niemięśniowych komórkach i katalizujące fosforylację  $\text{LC}_2$  miozyny różnią się od kinazy  $\text{LC}_2$  z mięśni, niezależnością ich działania od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (66, 67). Z czasem jednak wykazano, że enzym izolowany z płytek krwi, jest zależny od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny (68, 69), a poprzednio izolowana forma enzymu niezależnego od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , mogła być produktem jego degradacji proteolitycznej. Zauważono np., że pod wpływem działania trypsyny i chymotrypsyny kinaza  $\text{LC}_2$  miozyny z mięśni gładkich traci wrażliwość na jony  $\text{Ca}^{2+}$  (70, 71). Kinazę  $\text{LC}_2$  miozyny zależną od kalmoduliny i jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wyizolowano również z fibroblastów i wykazano, że jest ona bardzo podobna pod względem właściwości i ciężaru cząsteczkowego do kinazy z mięśni gładkich (72). Kinazę o takiej samej masie cząsteczkowej jak kinazy z mięśni gładkich żołądka kurczaka oraz płytek krwi i fibroblastów wykryto w ekstrakcie mózgu, jakkolwiek dotąd nie stwierdzono ani w warunkach *in vivo* ani *in vitro* fosforylacji  $\text{LC}_2$  miozyny z mózgu (73).

Ostatnio wykazano, że kinaza izolowana z mięśni gładkich różnego typu (z żołądka indyka, arterii szyjnej gołębia i aorty wołu) sama ulega fosforylacji przy udziale kinazy zależnej od c-AMP (75, 77, 78). Stopień fosforylacji  $\text{LC}_2$  miozyny z mięśni gładkich jest odwrotnie proporcjonalny do stopnia fosforylacji kinazy  $\text{LC}_2$  miozyny; wprowadzenie do kinazy jednej reszty fosforanowej na mol białka powoduje spadek fosforylacji  $\text{LC}_2$  miozyny do połowy. Początkowo wydawało się, że proces regulacji aktywności kinazy  $\text{LC}_2$  miozyny poprzez jej fosforylację występuje wyłącznie w mięśniach gładkich, gdyż zarówno kinaza o ciężarze cząsteczkowym 77 000, izolowana z mięśni szkieletowych, jak też kinaza o ciężarze cząsteczkowym 85 000 izolowana z mięśni serca, nie ulegały reakcji fosforylacji (65, 79). Ostatnio jednakże w pracowni Demaille'a przy zastosowaniu preparatyki ograniczającej do minimum aktywność endogennych proteaz z obu typów mięśni wyizolowano kinazę  $\text{LC}_2$  miozyny o ciężarze cząsteczkowym 155 000 (79). Kinaza ta związana z miofibrilami zależna jest od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny i ulega fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową zależną od c-AMP. Przypuszcza się, że roz-

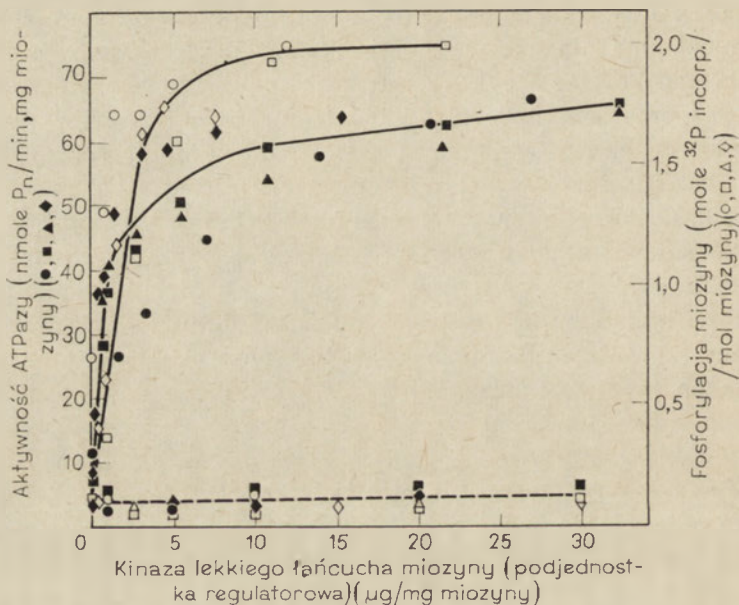
puszczalne enzymy o niższej masie cząsteczkowej mogą być aktywnymi produktami degradacji kinazy  $LC_2$  miozyny o masie cząsteczkowej 155 000 (79).

### III-2. Rola fosforylacji $LC_2$ miozyny.

Rola procesu fosforylacji i defosforylacji  $LC_2$  miozyny w mięśniach poprzecznie prążkowanych (szkieletowych i serca) nie jest jeszcze wyjaśniona. Wpływ fosforylacji  $LC_2$  miozyny na aktywność ATPazy aktomiozynowej jest niewielki: wg Perry'ego (6) w przypadku mięśni szkieletowych wzrost aktywności wynosi 10-15%, zaś mięśni serca około 30%. Ten wzrost aktywności może być jednak spowodowany działaniem tzw. pseudo-ATPazy będącej skutkiem działania kinazy i fosfatazy  $LC_2$  miozyny (47). Fosforylacja miozyny z mięśni poprzecznie prążkowanych nie jest niezbędna dla aktywacji jej ATPazy przez aktynę. Interesujące są badania nad korelacją cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych oraz procesem fosforylacji i defosforylacji  $LC_2$  miozyny (80, 81). W wyniku tych badań ustalono, że w mięśniu w stanie spoczynku około 50%  $LC_2$  jest ufosforylowane; po stymulacji mięśni stopień fosforylacji wzrasta (80). Oznaczenia aktywności kinazy  $LC_2$  miozyny oraz jej zawartości w mięśniach szkieletowych wykazują, że szybkość hydrolizy ATP w wyniku działania kinazy w przeliczeniu na 1 g tkanki stanowi zaledwie  $\frac{1}{50}$  szybkości hydrolizy tego nukleotydu w wyniku działania miofibrylarnej ATPazy (7). Jeśli to porównanie efektywności działania obu enzymów w warunkach *in vitro* odniesiono by do warunków panujących *in vivo*, to nie można spodziewać się synchronizacji procesu fosforylacji i defosforylacji z cyklem skurczowo-rozkurczowym mięśni szkieletowych. Zatem fosforylacja miozyny tych mięśni nie reprezentuje reakcji inicjującej skurcz, ale raczej modyfikuje cykl skurczowo-rozkurczowy, np. przez spowodowanie kooperatywności działania między dwoma główkami tej samej cząsteczki miozyny. Można sobie wyobrazić, że w stanie rozkurczu mięśni tylko jeden  $LC_2$  (w jednej główce miozyny) jest ufosforylowany. W wyniku stymulacji mięśni następuje fosforylacja drugiego  $LC_2$ , zmiana symetrii układu i oddziaływania między główkami (81). Takie zmiany w cząsteczce miozyny mogłyby przygotowywać ją do interakcji z aktyną. Poparciem tej hipotezy mogą być zmiany w przestrzennym ułożeniu główek miozyny pod wpływem stymulacji mięśni szkieletowych żaby (w warunkach kiedy nie dochodzi do interakcji aktyny z miozyną), obserwowane przy zastosowaniu niskokątowej dyfrakcji promieni X (82).

Fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny wydaje się mieć fundamentalne znaczenie dla działania systemów kurczliwych, których cykl skurczowo-rozkurczowy jest dużo dłuższy, niż w przypadku mięśni poprzecznie prążkowanych. Sobieszek i Small (83, 84) pierwsi zauważyli,

że modyfikacja miozyny z mięśni gładkich żołądków świni, poprzez fosforylację jej lekkich łańcuchów jest niezbędna do interakcji tego białka z aktyną. Spostrzeżenie to zostało następnie potwierdzone w szeregu pracowni przy użyciu miozyny mięśni gładkich różnych typów (żołądki ptaków, jajowody świnki morskiej, aorta wołu, arteria szyjna gołębia) (85-89). Ryc. 7 wskazuje, że w nieobecności kinazy LC<sub>2</sub> miozyny, aktywność ATPazy rekonstruowanej z miozyny mięśni żołądków kurczaka i aktyny z mięśni szkieletowych królika, jest bardzo niska. Wraz ze wzrostem ilości kinazy następuje gwałtowny wzrost aktywności ATPazy, ściśle skorelowany ze stopniem fosforylacji LC<sub>2</sub> miozyny. Maksymalną aktywność ATPazy aktomiozynowej uzyskuje się, kiedy ilość zestryfikowanego fosforanu wynosi 1 mol/mol LC<sub>2</sub> (Ryc. 7) (68). Aktywność ATPazy aktomiozynowej, podobnie jak reakcja fosforylacji zależna jest od jonów Ca<sup>2+</sup> i kalmoduliny (68).



**Ryc. 7.** Wpływ kinazy LC<sub>2</sub> miozyny z mięśni gładkich na aktywność ATPazy aktomiozyny rekonstruowanej z miozyny z mięśni gładkich i aktyny z mięśni szkieletowych (symbole pełne) oraz fosforylację miozyny z mięśni gładkich (symbole puste) w obecności tropomiozyny i 2,4 µg/ml kalmoduliny. Linia przerywana reprezentuje pomiary wykonane w nieobecności jonów Ca<sup>2+</sup> (wg 68). Różne symbole oznaczają różne preparaty podjednostki katalitycznej kinazy.

Wykazano też korelację między stężeniem wewnątrzkomórkowego Ca<sup>2+</sup>, stopniem fosforylacji LC<sub>2</sub> miozyny i napięciem włókien mięśniowych izolowanych z żołądka kurczaka i jelita królika (90-92). Przy użyciu pochodnej ATP, ATP<sub>γ</sub>S (<sup>35</sup>S), która jest doskonałym substratem dla kinazy LC<sub>2</sub> miozyny i pozwala na „utrwalenie” LC<sub>2</sub> w stanie ufosforylowanym, gdyż tiofosforylowany produkt jest odporny na działanie fosfa-



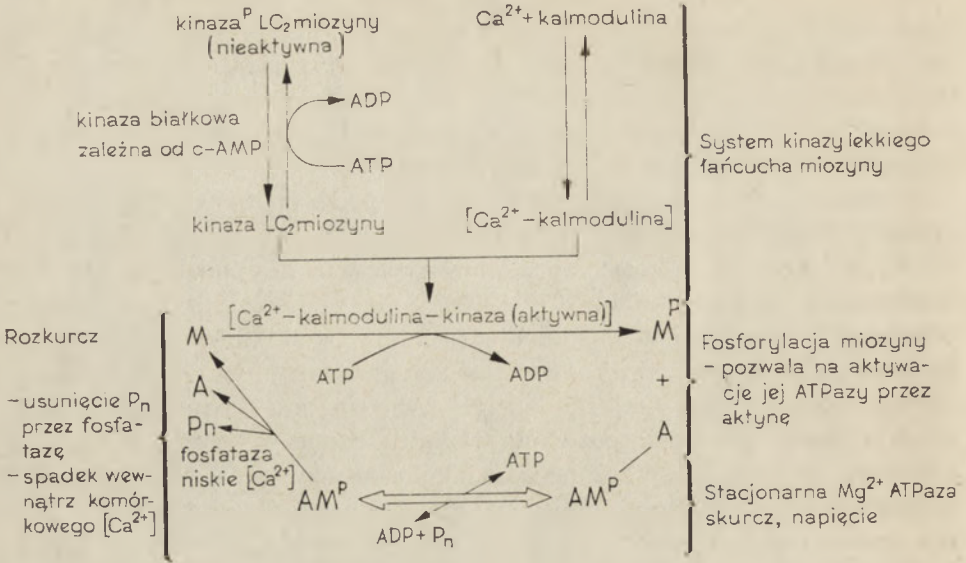
tazy, wykazano, że usunięcie jonów wapnia po fosforylacji  $LC_2$  miozyny nie prowadzi do spadku napięcia mięśni. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że rozkurcz mięśni gładkich nie zachodzi pod wpływem usuwania jonów  $Ca^{2+}$  związanych z cząsteczką miozyny jak to ma miejsce w przypadku miozyny z mięśni mięczaków (36).

Podobne rezultaty uzyskano wcześniej podczas badania aktywności ATPazy aktomiozynowej w miarę fosforylacji miozyny przy pomocy ATP  $\gamma$  S. Wraz ze wzrostem stopnia fosforylacji spadała wrażliwość ATPazy na działanie jonów  $Ca^{2+}$  (93). Z porównania kinetyki procesu usuwania jonów wapnia i działania fosfatazy wynikało ponadto, że aktywność ATPazy aktomiozynowej jest hamowana na skutek defosforylacji  $LC_2$  miozyny (93). Określenie szybkości działania fosfatazy  $LC_2$  miozyny z mięśni gładkich pozwoliło również oznaczyć ilość uwalnianego fosforanu w wyniku sprzężonego działania kinazy i fosfatazy  $LC_2$ , czyli pseudo-ATPazy. Wartości obliczone dla kilku preparatów aktomiozyny nie przewyższały 1 nmola  $P_n$ /mg aktomiozyny/min. Tak więc ilość reszt fosforanowych uwalnianych przez pseudo-ATPazę jest znikoma w stosunku do całkowitej ilości reszt fosforanowych uwalnianych na skutek działania ATPazy aktomiozynowej (93). Jest to ważne spostrzeżenie z punktu widzenia mechanizmu hydrolizy ATP w mięśniu gładkim. Ponieważ rozkład ATP przez centrum aktywne fosforylowanej miozyny w połączeniu z aktywną jest znacznie szybszy niż rozpad ATP spowodowany współdziałaniem kinazy i fosfatazy  $LC_2$ , fosforylowana miozyna musi zhydrolizować wiele cząsteczek ATP zanim fosfataza usunie reszty fosforanowe z  $LC_2$ . Jeśli fosforylacja i defosforylacja  $LC_2$  miozyny byłaby konieczna dla rozkładu każdej cząsteczki ATP, wówczas efektywność działania ATPazy aktomiozynowej (przy założeniu występowania jednego centrum aktywnego) i pseudo-ATPazy byłaby jednakowa.

Rozkurcz mięśni gładkich wydaje się być spowodowany na skutek działania fosfatazy  $LC_2$  miozyny, w warunkach kiedy aktywność kinazy jest zahamowana, tj. na skutek usunięcia jonów  $Ca^{2+}$ . Ostatnio niektórzy autorzy (74, 76, 77) postulują, że inhibicja aktywności kinazy  $LC_2$  miozyny może też następować na skutek jej fosforylacji przy udziale kinazy białkowej, zależnej od c-AMP. Ten typ regulacji interakcji aktywny z miozyną może reprezentować mechanizm dzięki któremu obserwuje się adrenergiczny rozkurcz mięśni naczyń krwionośnych (33). Adrenalina jak wiadomo powoduje aktywację cyklazy adenylowej i co za tym idzie wzrost stężenia c-AMP (83).

Wszystkie te obserwacje pozwalają na przedstawienie schematu reakcji prowadzących do skurczu i rozkurczu mięśni gładkich (Ryc. 8). Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego tych mięśni zależna jest od procesu fosforylacji i defosforylacji miozyny.

Równoległe prowadzone badania wydają się sugerować, że fosforylacja miozyny odgrywać może również kluczową rolę w wielu procesach



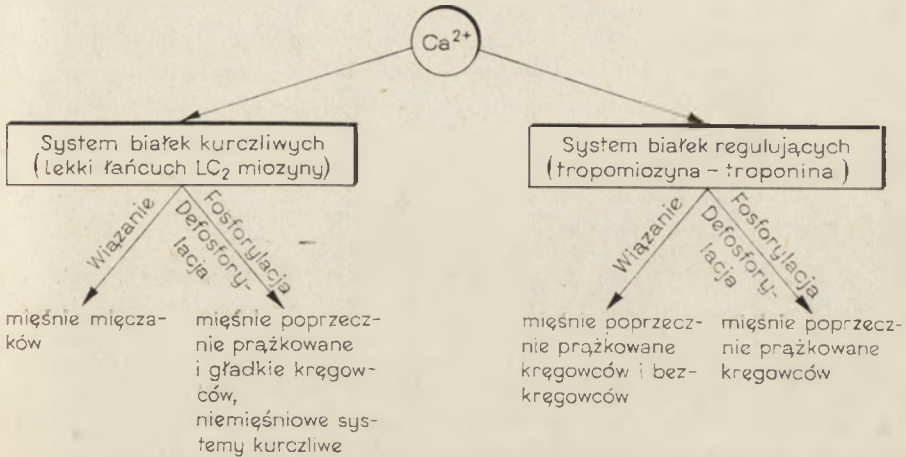
**Ryc. 8.** Schemat obrazujący rolę fosforylacji LC<sub>2</sub> miozyny w skurczu mięśni gładkich (modyfikacja schematu wg 93).

komórkowych — związanych z sekrecją, ruchem komórkowym czy podziałami komórkowymi. Miozyna izolowana z niemięśniowych systemów kurczliwych jest bardzo podobna pod względem struktury IV rządowej oraz właściwości enzymatycznych do miozyny izolowanej z mięśni gładkich (94). Jej aktywność ATPazy aktywowanej aktyną jest bardzo niska. A delstein i Conti (95) wykazali, że wzrost aktywności ATPazy aktomiozynowej z płytek krwi można uzyskać przez fosforylującą LC<sub>2</sub> miozyny. Następnie udowodniono, że kinaza katalizująca fosforylację LC<sub>2</sub> miozyny z płytek krwi, tak samo jak kinaza z mięśni gładkich zależna jest od jonów Ca<sup>2+</sup> i kalmoduliny (68, 69). Wykrycie podobnego systemu enzymatycznego katalizującego fosforylację LC<sub>2</sub> miozyny w fibroblastach (72), mikrofach (96) i komórkach grasicy (97) oraz wykazanie, że w tym przypadku fosforylacja LC<sub>2</sub> miozyny jest niezbędnym warunkiem jej aktywacji przez aktynę, wydaje się potwierdzać pogląd, że mechanizm regulacji działania niemięśniowych systemów kurczliwych i mięśni gładkich jest zbliżony.

#### IV. Uwagi końcowe

Cechą wspólną wszystkich badanych dotąd systemów kurczliwych jest zależność ich działania od stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> (8). Działanie jonów Ca<sup>2+</sup> na system kurczliwy może być bezpośrednie, kiedy wiązanie tego kationu z białkami regulującymi zapoczątkowuje szereg zmian prowadzących do interakcji aktyny z miozyną i skurczu mięśni, lub pośrednie, kiedy jony

$\text{Ca}^{2+}$  biorą udział w reakcjach modyfikacji białek aparatu kurczliwego (np. reakcja fosforylacji miozyny), które również prowadzą do skurczu mięśni (Ryc. 9). Procesy regulacji poprzez modyfikację białek miofibrilarnych są zwykle dużo wolniejsze, niż te które są wynikiem bezpośredniego wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z białkami regulującymi skurcz.



Ryc. 9. Schemat przedstawiający rolę jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego różnych typów mięśni (wg 7).

Obecnie znane są przynajmniej cztery różne mechanizmy kontroli systemów kurczliwych przez jony  $\text{Ca}^{2+}$ . W mięśniach szkieletowych wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z troponiną C zapoczątkowuje szereg opisanych w rozdz. II-1 reakcji, które prowadzą do ich skurczu (8). W mięśniach poprzecznie prążkowanych mięczaków, gdzie troponina występuje tylko w śladowych ilościach, główną reakcją prowadzącą do skurczu jest wiązanie  $\text{Ca}^{2+}$  z  $\text{LC}_2$  miozyny (35). W mięśniach gładkich kręgowców udział wapnia w skurczu polega na aktywacji kinazy  $\text{LC}_2$  miozyny, która katalizuje fosforylację miozyny i powoduje, że białko to może reagować z aktyną (rozdz. II-2.) (68). Jakkolwiek ten pogląd na mechanizm regulacji skurczu mięśni gładkich jest obecnie dominujący, są też hipotezy na temat udziału w skurczu tych mięśni kompleksu białek związanych z cienkim filamentem odpowiadających składnikom troponiny (98) lub różnego od troponiny białka nazwanego przez Ebashi'ego leiotoniną (złożonego z dwóch podjednostek o ciężarach cząsteczkowych 80 000 i 20 000) (99, 100). Być może współdziałanie obu tych systemów regulacji jest konieczne dla pracy mięśni gładkich.

Wymagania dotyczące sposobu działania systemu regulacji mięśni gładkich i szkieletowych są różne. Aktyna i miozyna mięśni szkieletowych reagują ze sobą niezależnie od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , poziom ATPazy aktomiozynowej jest wysoki (101). Zadaniem kompleksu białek regulujących (troponina+tropomiozyna) jest spowodowanie dysocjacji aktomiozyny

w nieobecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , zahamowanie ATPazy aktomiozynowej i w konsekwencji rozkurcz mięśni. W mięśniach gładkich, mięśniach mięczaków i niemięśniowych systemach kurczliwych czysta aktyna i miozyna nie reagują ze sobą, poziom aktywności ATPazy aktomiozynowej jest bardzo niski (35, 67, 68, 102). Głównym zadaniem systemu regulującego jest więc aktywacja interakcji aktyny z miozyną w obecności  $\text{Ca}^{2+}$ , która doprowadza do skurczu. To zadanie może być spełnione, bądź przez bezpośrednie wiązanie  $\text{Ca}^{2+}$  z miozyną (mięśnie mięczaków) lub przez fosforylację tego białka (mięśnie gładkie, niemięśniowe systemy kurczliwe).

#### PIŚMIENNICTWO

1. Fischer E. H., Krebs E. G., (1955), *J. Biol. Chem.* **216**, 121—128.
2. Holzer H., (1973), *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**, 319—322.
3. Krebs E. G., Beavo J. A., (1979), *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 923—959.
4. Rubin C. S., Rosen O. M., (1975), *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 831—887.
5. Cohen P., (1979), *Biochem. Soc. Trans.* **7**, 459—480.
6. Perry S. V., Cole H. A., Frearson N., Moir A. J. G., Nairn A. C., Solaro R., (1978), *Proc. XII FEBS Meeting. Dresden*, **54**, 147—159.
7. Perry S. V., (1978), *Biochem. Soc. Trans.* **7**, 593—617.
8. Dąbrowska R., (1976), *Post. Biochem.* **22**, 467—481.
9. Bailey C., Villar-Palasi C., (1971), *Fed. Proc.* **30**, 1147.
10. Stull J. T., Brostrom C. O., Krebs E. G., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 5272—5274.
11. Pratie E., Heilmeyer L. M. G. Jr., (1972), *FEBS Lett.* **27**, 89—93.
12. Perry S. V., Cole H. A., (1973), *Biochem. J.* **131**, 425—428.
13. Perry S. V., Cole H. A., (1974), *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 89—90.
14. Cole H. A., Perry S. V., (1975), *Biochem. J.* **149**, 525—533.
15. Wilkinson J. M., Grand R. J. A., (1975), *Biochem. J.* **173**, 449—457.
16. Moir A. J. G., Wilkinson J. M., Perry S. V., (1974), *FEBS Lett.* **42**, 253—256.
17. Huang T. S., Bylund D. B., Stull J. T., Krebs E. G., (1974), *FEBS Lett.* **42**, 249—252.
18. Syska H., Wilkinson J. M., Grand R. J. A., (1975), *Biochem. J.* **173**, 449—457.
19. Moir A. G. J., Cole H. A., Perry S. V., (1977), *Biochem. J.* **161**, 371—382.
20. Jackson P., Amphlett G. W., Perry S. V., (1975), *Biochem. J.* **151**, 85—97.
21. Gross S. R., Mayer S. E., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 823—829.
22. Gusev N. B., Dobrowolski A. B., Sewierin S. E., (1978), *Biochimia* **43**, 365—372.
23. Kumon A., Villar-Palasi C., (1979), *Biochim. Biophys. Acta* **566**, 305—320,
24. Syska H., Perry S. V., Trayer I. P., (1974), *FEBS Lett.* **40**, 253—257.
25. Wilkinson J. M., Grand R. J. A., (1978), *Nature* **271**, 31—35.
26. Blumenthal D. K., Stull J. T., Gill G. N., (1978), *J. Biol. Chem.* **161**, 371—382.
27. Solaro R. J., Moir A. J. G., Perry S. V., (1976), *Nature* **262**, 615—617.
28. Grand R. J. A., Wilkinson J. M., Mole L. E., (1976), *Biochem. J.* **159**, 633—641.

29. Mak A., Smillie L. B., Bărányi M., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3588—3592.
30. England P., (1975), *FEBS Lett.* **50**, 57—60.
31. Perry S. V., Cole H. A., Dhoot G. K., (1978), w *Motility in Cell Function*, red. Pepe F. A., Sanger J. W., Nachmias V. T., str. 129—143, Academic Press, N. York.
32. Mope L., McClellan G. B., Winegrad S., (1980), *J. Gen. Physiol.* **75**, 271—282.
33. Katz A., (1979), *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **11**, 303—343.
34. Strzelecka-Golaszewska H., Piwowar U., (1980), *Post. Biochem.* **26**, 517—557.
35. Kendrick-Jones J., (1974), *Nature* **240**, 631—634.
36. Kendrick-Jones J., Szentkiralyi E., Szent-Györgyi A. G., (1976), *J. Mol. Biol.* **104**, 745—775.
37. Werber M. M., Oplatka A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 823—830.
38. Kaszan K., Kąkol I., (1977), *Biochim. Biophys. Acta* **491**, 509—514.
39. Huzumi T., Hotta K., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)* **83**, 671—676.
40. Pemrick S. M., (1977), *Biochemistry* **16**, 4047—4054.
41. Margossian S. S., Lowey S., Barshop B., (1974), *Nature* **258**, 163—166.
42. Collins J. H., (1976), *Nature* **259**, 699—700.
43. Berrie W. T., Perry S. V., (1970), *Biochem. J.* **119**, 31—38.
44. Perrie W. T., Smillie L. B., Perry S. V., (1973), *Biochem. J.* **135**, 151—164.
45. Pires E. M. V., Perry S. V., Tomas M. A. W., (1974), *FEBS Lett.* **41**, 292—296.
46. Pires E. M. V., Perry S. V., (1977) *Biochem. J.* **167**, 137—146.
47. Morgan M., Perry S. V., Ottaway J., (1976), *Biochem. J.* **151**, 99—107.
48. Frearson N., Perry S. V., (1975), *Biochem. J.*, **151**, 99—107.
49. Frearson N., Focant B. W., Perry S. V., (1976), *FEBS Lett.* **63**, 27—32.
50. Adelstein R. S., Conti M. A., (1976), w *Cell Motility*, red. Goldman R. D., Pollard T., Rosenbaum J., str. 725—738, Cold Spring Harbor Laboratory.
51. Baryłko B., Conti M. A., Adelstein R. S., (1977), *Biophys. J.* **17**, 270a.
52. Muhrad A., (1977), *FEBS Lett.*, **71**, 37—40.
53. Scordilis S. P., Adelstein R. S., (1978), *J. Biol. Chem.* **253**, 9041—9048.
54. Jakes R., Northrop F., Kendrick-Jones J., (1976), *FEBS Lett.* **70**, 229—234.
55. Yazawa M., Yagi K., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)* **82**, 287—289.
56. Yagi K., Yazawa M., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)* **84**, 1259—1265.
57. Yazawa M., Kuwayama H., Yagi K., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)* **84**, 1253—1258.
58. Baryłko B., Kuźnicki J., Drabikowski W., (1978), *FEBS Lett.* **90**, 301—304.
59. Dąbrowska R., Aromatorio D. K., Sherry J. M. F. Hartshorne D. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 1263—1272.
60. Dąbrowska R., Sherry J. M. F., Aromatorio D. K., Hartshorne D. J. (1978), *Biochemistry* **17**, 253—258.
61. Kuźnicki J., Drabikowski W., *Post. Biochem.* **26**, 265—290.
62. Cheung W. Y., (1980), *Science* **207**, 19—27.
63. Wang J. H., Waisman D. M., (1980), w *Current Topics in Cellular Regulation*, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., t. 15, str. 47—102, Academic Press, N. York.
64. Nairn A. C., Perry S. V., (1979), *Biochem. J.* **179**, 89—97.

65. Walsh M. P., Vallet B., Autric F., Demaille J. G., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 12136—12144.
66. Daniel J. L., Adelstein R. S., (1976), *Biochemistry* **15**, 2370—2375.
67. Adelstein R. S., Chacko S., Baryłko B., Scordilis S. P., Conti M. A., (1976), w *Contractile Systems in Non-muscle Tissues*, red. Perry S. V., Margreth A., Adelstein R. S., str. 153—163, North-Holland, Amsterdam.
68. Dąbrowska R., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J., (1979), w *Motility in Cell Function*, red. Pepe F. A., Sanger J. W., Nachmias V. T., str. 147—161, Academic Press, N. York.
69. Hathway D. R., Adelstein R. S., (1978), *J. Biol. Chem.* **253**, 9041—9048.
70. Hartshorne D. J., Górecka A., Aksoy M. O., (1977), w *Excitation Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. Casteels R., Godfraind T., Ruegg J. C., str. 377—382, Amsterdam Elsevier/North Holland.
71. Tanaka T., Naka M., Hidaka H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 313—318.
72. Yerna M. J., Dąbrowska R., Hartshorne D. J., Goldman R. D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 184—188.
73. Dąbrowska R., Hartshorne D. J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 1352—1359.
74. Hartshorne D. J., (1980), Intern. Symp. on  $Ca^{2+}$  Binding Proteins and  $Ca^{2+}$  Function in Health and Disease, Wisconsin, Abstr. of Commun.
75. Adelstein R. S., Conti M. A., Hathway D. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8347—8350.
76. Adelstein R. S., Conti M. A., Pato M. D., Rappaport L., Eaton C. R., (1980), Conference on Calmodulin and Cell Function, New York, Abstr. of Commun. str. 10.
77. Mrwa U., Troschka M., Ruegg J. C., (1979), *FEBS Lett.* **107**, 371—374.
78. Silver P. J., DiSalvo J., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 9951—9954.
79. Calvadore J. C., Walsh M. P., Demaille J. G., (1980), w *Proteins Contractiles et Motilité Cellulaire*, red. CNRS, str. 19, Montpellier.
80. Bárány K., Bárány M., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 4752—4754.
81. Bárány K., Bárány M., Gillis J. M., Kushmerick M. J., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 3617—3623.
82. Haselgrove J. C., (1972), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **37**, 341—352.
83. Sobieszek A., Small J. V., (1976), *J. Mol. Biol.* **102**, 75—92.
84. Sobieszek A., (1977), *Eur. J. Biochem.* **73**, 477—483.
85. Górecka A., Aksoy M. O., Hartshorne D. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 325—331.
86. Chacko S., Conti M. A., Adelstein R. S., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 129—133.
87. Mrwa U., Troschka M., Gross C., Katzinski L., (1980), *Eur. J. Biochem.* **103**, 415—419.
88. Katzinski L., Mrwa U., (1980), *Experientia* **36**, 282—283.
89. DiSalvo J., Gruenstein E., Schmidt C., (1979), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **162**, 337—341.
90. Cassidy P., Hoar P. E., Kerrick W. G. L., (1978), *Biophys. J.* **21**, 44a.
91. Hoar P. E., Kerrick W. G. L., Cassidy P., (1979), *Science* **204**, 503—506.
92. Cassidy P., Hoar P. E., Kerrick W. G. L., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 11148—11153.
93. Sherry J. M. F., Górecka A., Aksoy M. D., Dąbrowska R., Hartshorne D. J., (1978), *Biochemistry* **17**, 4411—4418.

94. Burridge K., (1976) w Cell Motility, red. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J. str. 739—747, Cold Spring Harbor Laboratory.
95. Adelstein R. S., Conti M. A., (1975), *Nature* **256**, 597—598.
96. Trotter J. A., Adelstein R. S., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 8781—8785.
97. Scholey J. M., Kendrick-Jones J., (1979), Proc. VIIIth European Conference on Muscle and Motility, Heidelberg, Abst. str. 60—61.
98. Marston S. B., Trevett R. M., Walters M., (1980), *Biochem. J.* **185**, 355—365.
99. Mikawa T., Toyo-oka T., Nonomura T., Ebashi S., (1977), *J. Biochem.* (Tokyo), **81**, 273—275.
100. Mikawa T., Nonomura Y., Hirata M., Ebashi S., Kakiuchi S., (1978), *J. Biochem.* **84**, 1633—1636.
101. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.* **16**, 405—420.
102. Ebashi S., Nonomura Y., Mikawa T., Hirata M., Saida K., (1979) w Cell Motility: Molecules and Organization, red. Hatano S., Ishikawa H., Sato H., str. 225—237, University of Tokyo Press.

## KOMUNIKAT

XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w Szczecinie w dniach 8—10 września 1982 r. Przewiduje się zorganizowanie sympozjów nt. Bioenergetyka, Biochemia Miażdżycy, Kwasy nukleinowe, Związki fluoru: terapia i toksykologia oraz sesji plakatowej.

Komunikat Organizacyjny: doc. dr Zygmunt Machoy, Zakład Chemii Ogólnej PAM, ul. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin.



PIOTR MASŁOWSKI \*), STANISŁAW KOWALCZYK \*\*)

## Rola nieorganicznego pirofosforanu w bioenergetyce komórki

### Role of inorganic pyrophosphate in the cell bioenergetics

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Udział pirofosforanu w magazynowaniu energii
- III. Udział pirofosforanu w przenoszeniu energii
- IV. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. The participation of inorganic pyrophosphate in energy accumulation
- III. Inorganic pyrophosphate as energy donor
- IV. Concluding remarks

#### I. Wstęp

ATP uważany jest nadal za główny przenośnik energii w komórce. Ostatnio podobną funkcję przypisuje się również nieorganicznemu pirofosforanowi, który wg Millera i Parrisa (1) oraz Lipmanna (2) był ewolucyjnym prekursorem ATP. Nieorganiczny pirofosforan (PPi) jest jednym z głównych produktów wielu anabolicznych reakcji, jak biosynteza białek na poziomie aktywacji aminokwasów, kwasów tłuszczowych, kwasów nukleinowych, polisacharydów itp. (3, 4). Ilość PPi produkowana tą drogą u bakterii jest rzeczywiście wysoka i wynosi ok. 10  $\mu$ moli PPi na 1 mg syntetyzowanej biomasy (5).

\*) Prof. dr hab., Instytut Biologii, Zakład UMK, Toruń

\*\*\*) Mgr, Instytut Biologii, Zakład Biochemii UMK, Toruń

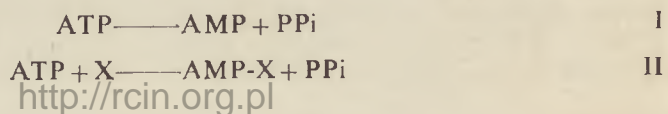
Wykaz stosowanych skrótów; PPi — nieorganiczny pirofosforan; Pi ortofosforan; PPaza — nieorganiczna alkaliczna pirofosfataza; ANS — 8-anilino-1-naftalenosulfonian

Do niedawna przyjmowano powszechnie, że uwalniany pirofosforan ulega natychmiastowej hydrolizie przez pirofosfatazę (PPazę) (6). Wiąże się to jednak z utratą energii wiązania bezwodnikowego, która wynosi ok. 8 kcal (7). Wprowadzenie ostatnio doskonalszych metod oznaczania pirofosforanu wykazało, że w wielu organizmach stężenie jego przewyższa wartości wynikające ze stałej równowagi hydrolizy (8, 9, 10), przy czym nie wszystkie organizmy zawierają pirofosfatazę (7), a zatem degradacja do ortofosforanu nie musi być jedyną drogą metabolizmu PPI w komórce. Z sugestią tą wystąpił już ponad 20 lat temu Arthur Kornberg (11), jednakże dopiero ostatnie dziesięciolecie przyniosło wiele interesujących danych eksperymentalnych potwierdzających powyższą hipotezę.

## II. Udział pirofosforanu w magazynowaniu energii

Badania na układach modelowych wykazały możliwość syntezy PPI z ortofosforanu, sprzężonej z reakcjami oksydoredukcyjnymi (12, 13). Dane te pozwoliły przypuszczać, że podobny mechanizm może mieć również miejsce w układach biologicznych. Po raz pierwszy syntezę PPI u *Acetobacter suboxidans* i *Escherichia coli*, zaobserwował Klunsgöyr i wsp. (14, 15). Bezpośrednich jednak dowodów dostarczyły badania ostatniego dziesięciolecia, które wzięły swój początek z poszukiwań mechanizmów fosforylacji u bakterii *Rhodospirillum rubrum*. Bakterie te należą do grupy beziarkowych bakterii purpurowych, odżywiających się autotroficznie gdy znajdują się na świetle w warunkach beztlenowych, lub heterotroficznie gdy rozwijają się w obecności tlenu. W warunkach autotrofii bakterie te posiadają bakteriochlorofil oraz barwniki karotenoidowe wbudowane w błoniaste twory tzw. ciała chromatoforowe. Są one centrami fotosyntezy i zawierają układ transportu elektronów, fosforylacji i ściśle związaną z błonami transhydrogenazę nikotynoamidoadeninową. Układ cyklicznej fosforylacji w chromatoforach wykazuje wiele podobieństw do fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach i dlatego inhibitory łańcucha oddechowego, jak też związki rozprzegające mogą być użyte w badaniach fosforylacji fotosyntetycznej.

W 1966 r. Horio i wsp. (16) wykazali, że w chromatoforach tych bakterii, w braku egzogenego ADP, znakowany  $^{32}\text{P}$  ulegał wbudowywaniu w niezidentyfikowany wówczas produkt, który później rozpoznano jako nieorganiczny pirofosforan (17, 18, 19, 20). Wyniki tych badań można by interpretować dwojako. Pirofosforan powstaje z fosforanu dzięki energii transportu elektronów, bądź też bezpośrednio z ATP zgodnie z reakcją:



Zakładając tę drugą możliwość, wzrostowi stężenia PPI winien towarzyszyć spadek stężenia ATP. Inkubując chromatofory na świetle, przy udziale Pi i ADP (akceptora Pi), obserwowano silny wzrost syntezy ATP. Wprowadzenie do środowiska reakcyjnego oligomycyny—inhibitora fosforylacji ADP (19, 20), stymulowało wyraźnie syntezę pirofosforanu. Podobny efekt uzyskano również, gdy usunięto ze środowiska reakcyjnego endogenny ATP za pomocą glukozy i heksokinazy, oraz gdy hamowano fosforylację ADP oligomycyną (19). Dane te stały się podstawą twierdzenia, że zależna od światła synteza pirofosforanu w chromatoforach *R. rubrum* przebiega niezależnie od syntezy ATP (19, 20). Świadczy o tym również fakt, że synteza pirofosforanu wymaga jonów  $Mg^{2+}$ , podczas gdy syntezę ATP stymulują jony  $Mg^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ , będące równocześnie inhibitorami syntezy PPI (20). Synteza tego związku przebiega najintensywniej w pH 7,8—8 i przy stężeniu  $Mg^{2+}$  równym 3,8 mM a hamuje ją nadmiar ATP.

Dla potwierdzenia przypuszczeń, że biosynteza pirofosforanu związana jest z funkcjonowaniem łańcucha transportu elektronów, badano wpływ właściwych rozprzegaczy i inhibitorów. Wykazano, że synteza PPI z ortofosforanu jest całkowicie zależna od światła (17, 18). Połowę szybkości maksymalnej  $\left(\frac{V_{max}}{2}\right)$  osiąga reakcja syntezy PPI przy natężeniu światła równym  $2,5 \cdot 10^{-4} \cdot J \cdot S^{-1} \cdot cm^{-2}$ , a wartość ta jest o połowę mniejsza od natężenia światła wymaganego do uzyskania  $\frac{V_{max}}{2}$  reakcji syntezy ATP (20). Antymycyna A, inhibitor transportu elektronów, oraz związki rozprzegające fosforylację, jak 2,4 DNP i inne, w pełni hamują syntezę PPI, podobnie jak i ATP (18, 19). Co więcej, chromatofory po naświetleniu, w braku Pi i ADP w środowisku mogą gromadzić energię, która może następnie w ciemności umożliwić syntezę PPI lub ATP, po dodaniu Pi lub Pi i ADP. Dane te stały się podstawą dla sformułowania przez Baltscheffskiego i Stedingka (16) hipotezy przyjmującej, że synteza ATP i PPI nie ma bezpośredniego związku z transportem elektronów, lecz że bierze w niej udział wysokoenergetyczny pośrednik  $\sim x$ , dostarczający energii do syntezy tych związków. Obecnie zgodnie z teorią „chemiosmotyczną”, źródłem energii do syntezy ATP lub PPI nie jest hipotetyczny pośrednik wysokoenergetyczny  $\sim x$ , lecz potencjał błonowy, wyrażony jako siła protonomotoryczna ( $\Delta P$ ) zależna od elektrycznego potencjału transmembranowego ( $\Delta \Psi$ ) i różnicy pH ( $\Delta pH$ ) po obu stronach błony chromatoforowej zgodnie z równaniem (21)

$$\Delta P = \Delta \Psi + 2,3 \frac{RT}{F} \Delta pH$$

Na proces ten poważny wpływ wywierają zmiany wewnątrzkomórkowe, jak i czynniki zewnętrzne. Wykazano, że zmiany potencjału oksydoreduk-

cyjnego w komórce, mogą regulować szybkość syntezy powyższych związków, podobnie jak i intensywność światła. Przy silnym oświetleniu szybkość syntezy PPI, stanowi ok. 25% szybkości syntezy ATP, natomiast przy oświetleniu słabszym, zbliżonym do naturalnego, jakie ma miejsce w przyrodzie obie te reakcje przebiegają z jednakową szybkością (19).

Błony chromatoforowe po ekstrakcji LiCl, tracą aktywność ATPazy i zdolność do syntezy ATP. Pozostaje natomiast pełna aktywność pirofosfatazy i zdolność do syntezy PPI, która ustaje po wprowadzeniu do środowiska reakcyjnego NaF — silnego inhibitora pirofosfatazy. Świadczy to, że w procesie syntezy ATP i PPI, uczestniczą dwa niezależnie działające układy enzymatyczne, a mianowicie: ATPaza i PPaza (19).

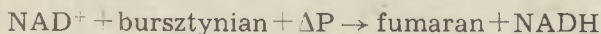
Koncepcja mówiąca, że związana z błonami pirofosfataza działa jako pompa protonowa podobnie jak odwracalna ATPaza, potwierdzona została przez M o y l e i wsp. (22). Wykazano mianowicie, że hydroliza dodanego do zawiesiny chromatoforów PPI indukuje zmiany pH po obu stronach błony. Wyrównywanie się transmembranowego gradientu pH stanowi źródło energii do syntezy pirofosforanu. Dalszym dowodem jest również zmiana fluorescencji barwnika ANS dodanego do zawiesiny chromatoforów. Zmiana fluorescencji jest większa w przypadku wprowadzenia do zawiesiny pirofosforanu niż ATP i jest niwelowana przez rozprzęgacze (23, 24), podobnie jak przy użyciu barwnika OX — VI (oxonol), gdy hydroliza PPI wywołuje zmianę jego widma zaledwie o 20% mniejszą od zmian wywołanych światłem (25).

Wyniki powyższe uzyskane w przypadku chromatoforów *R. rubrum* potwierdzono badając biosyntezę pirofosforanu w chloroplastach grochu (26), w mitochondriach wątroby szczura (27, 28) oraz w mitochondriach roślin (29).

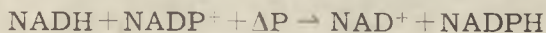
### III. Pirofosforan jako dawca energii

Początkowo badając pirofosforan jako przenośnik energii wykazano jego udział w odwróceniu transportu elektronów w łańcuchu oksydoredukcyjnym błon chromatoforowych, obserwując jedynie zależną od energii zmianę widma egzogennych cytochromów b i c (30, 31). Aby wyeliminować maskujący widmo cytochromów wpływ karotenoidów, doświadczenie prowadzono stosując chromatofory z mutantą *R. rubrum*, niezawierającego tych barwników. Okazało się, że zarówno ATP jak i PPI mogą być źródłem umożliwiającej w ciemności redukcję cytochromu b i utlenianie cytochromu c, przy czym zmiany wywołane przez PPI są szybsze i większe niż zmiany wywołane przez ATP. Na tej podstawie B a l t s c h e f f s k y (30) wysunęła przypuszczenie, że PPI jest silniej sprzężony z łańcuchem transportu elektronów aniżeli ATP. Dzięki czemu wymaga

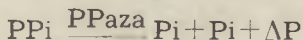
mniej etapów pośrednich do przeniesienia energii na cytochrom aniżeli ATP. W reakcjach tych niezbędne są jony  $Mg^{2+}$  lub inne jony dwuwartościowe, takie jak  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ . W przypadku jednak gdy źródłem energii jest PPI, jony  $Ca^{2+}$  wywierają wpływ hamujący (31). Potwierdzono to również badając mitochondria z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, z wątroby szczura i z *Neurospora crassa* (30). Udział PPI w wymagającej energii redukcji  $NAD^+$  przez bursztynian zgodnie z poniższą reakcją wykazali Keister i Yike (32)



Reakcja ta może zachodzić również na koszt energii świetlnej lub ATP. W chromatoforach *R. rubrum* wykazano ponadto występowanie transhydrogenazy nikotynoamidoadeninowej, katalizującej związaną z energią redukcję  $NADP^+$  przez NADH (33)



Źródłem energii do redukcji  $NADP^+$  może być światło, a w ciemności ATP lub PPI. Dowodem tego jest fakt, że antymycyna, inhibitor transportu elektronów, hamowała redukcję  $NADP^+$ , gdy źródłem energii było światło, oligomycyna — tylko w przypadku ATP, natomiast rozpręgacze fosforylacji hamowały reakcję przy użyciu wszystkich donorów energii (światło, ATP i PPI). Wykazano także, że chromatofory inkubowane w ciemności w środowisku zawierającym  $^{32}P$  i PPI katalizowały wymianę  $PPi \rightleftharpoons Pi$  (33). Reakcję hamowały rozpręgacze fosforylacji, ADP i NaF — specyficzny inhibitor PPazy. Antymycyna nie miała wpływu, podczas gdy oligomycyna stymulowała reakcję. Dane te, oraz porównanie szybkości wymiany  $PPi \rightleftharpoons Pi$  z szybkością hydrolizy PPI pozwoliły na sformułowanie tezy, że reakcja wymiany  $PPi \rightleftharpoons Pi$  przebiega kosztem energii hydrolizy PPI, katalizowanej przez pirofosfatazę zgodnie z reakcją

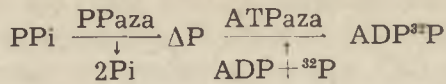


gdzie  $\Delta P$  — potencjał elektrochemiczny błony.

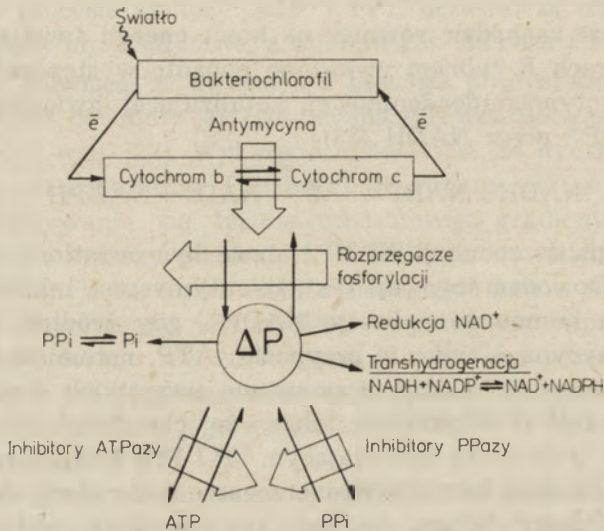
Rozpręgacze hamują przebieg powyższej reakcji dzięki rozproszeniu  $\Delta P$ , ADP — wykorzystuje  $\Delta P$  do syntezy ATP, natomiast oligomycyna hamuje syntezę ATP, a tym samym stymuluje reakcję wymiany  $PPi \rightleftharpoons Pi$ .

Energia hydrolizy PPI może być również zużytkowana do syntezy ATP z ADP i PPI. Chromatofory inkubowane w środowisku reakcyjnym zawierającym ADP,  $^{32}P$ , glukozę i heksokinazę, oraz odpowiednie stężenie PPI syntetyzują ATP z pirofosforanu (34, 35). Zostało to również stwierdzone w mitochondriach wątroby szczura (36) i grzyba *Endomyces magnusii* (37).

Proponuje się następujący mechanizm tych reakcji:

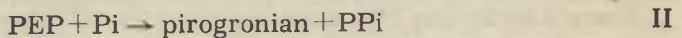
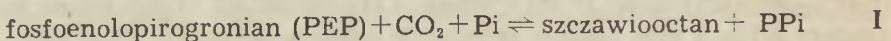


Wyniki powyższych badań sugerują odrębność odwracalnych układów fosforylacji i pirofosforylacji sprzężonych poprzez potencjał błonowy ( $\Delta P$ ) z układem transportu elektronów. Hipotetyczny mechanizm tych reakcji przedstawia poniższy schemat.

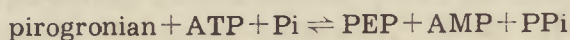


Ryc. 1. Schemat udziału PPI w akumulacji i przetwarzaniu energii w chromatoforach *R. rubrum*.

Pirofosforan, jako źródło energii, może zastąpić ATP; stwierdzono to również badając wiele różnych organizmów, a w szczególności *Lat. amoeba histolytica* i *Propionibacterium shermanii*. W organizmach tych odkryto pięć enzymów katalizujących zależne od PPI reakcje fosforylacji. Są to: 1. Karboksytansfosforylaza fosfoenolpirogrotonianowa — odkryta w *P. shermanii* (38), oraz w *E. histolytica* (39), katalizująca odwracalną reakcję karboksytansfosforylacji (I), lub w braku  $\text{CO}_2$  nieodwracalną reakcję fosforylacji (II)



2. Dwukinaza fosfopirogromianowa (transferaza ATP: pirogromian) — katalizująca odwracalną reakcję fosforylacji pirogromianu przy udziale  $\beta$  i  $\gamma$  reszt fosforanowych ATP.

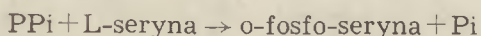


Od 1968 r. badano dwukinazę z trzciny cukrowej (40), z *E. histolytica* i *Bacteriodes symbiosus* (41) oraz z *P. shermanii* (42). Jednakże tylko w przypadku *B. symbiosus* i *E. histolytica* wykazano udział tego enzymu w przekształcaniu fosfoenolopirogronianu w pirogronian.

3. PP-acetokinaza (transferaza : P<sub>Pi</sub> : octan) stwierdzona u *E. histolytica* (43), katalizująca anologiczną reakcję kinazy octanowej zależnej od ATP.

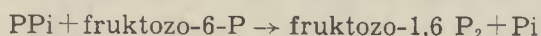


4. Transferaza PP : L-seryna katalizująca fosforylację L-seryny zgodnie z reakcją:



Enzym ten wyizolowany i częściowo oczyszczony z bakterii kwasu propionowego (44) charakteryzuje się wysoką specyficznością względem P<sub>Pi</sub> i trójfosforanu, a całkowitym brakiem powinowactwa do ATP.

5. PP-fosfofruktokinaza (transferaza PP : fruktozo-6-P)-oczyszczona do stopnia homogenności z *P. shermanii* (45) wykazuje wysoką specyficzność substratową. Pirofosforanu nie można zastąpić polifosforanami, ani nukleotydem trójfosforanowym. Enzym ten katalizuje reakcję:

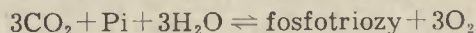


Fosfofruktokinazę znaleziono ostatnio u kilku innych bakterii (46, 47), a co bardziej interesujące w liściach ananasa (48).

#### IV. Uwagi końcowe

Omówione powyżej wyniki dotychczasowych badań nad udziałem nieorganicznego pirofosforanu w magazynowaniu i przekazywaniu energii w komórce dowodzą, że potencjał elektrochemiczny błon może być wykorzystany nie tylko do syntezy ATP, czy czynnego transportu, ale również do syntezy pirofosforanu. Przy czym enzymem odpowiedzialnym za reakcję pirofosforylacji jest odwracalny układ nieorganicznej pirofosfatazy. Powstały tą drogą P<sub>Pi</sub> może być bezpośrednim źródłem energii do odwrócenia transportu elektronów, transhydrogenacji, redukcji NAD<sup>+</sup> przez bursztynian, do syntezy ATP z ADP i P<sub>Pi</sub>, jak też innych reakcji anabolicznych. P<sub>Pi</sub> może też pełnić rolę „buforu protonowego” (49). Stosunkowo bowiem niska pojemność elektryczna błony sprawia, że nie jest ona w stanie magazynować większej ilości energii w postaci różnicy potencjału elektrochemicznego. Odwracalny układ P<sub>Pi</sub> może zatem, jak się wydaje, funkcjonować jako mechanizm stabilizujący gradient protonowy. Wielu autorów sugeruje udział P<sub>Pi</sub> w regulacji stężenia ortofosforanu w chloroplastach roślin. Utrzymywanie bowiem stężenia P<sub>i</sub> na stałym optymalnym poziomie, jest niezwykle ważne, jeśli się zważy, że

reakcja asymilacji CO<sub>2</sub> w chloroplastach przebiega według równania, które nie stanowi jedynie zapisu reakcji, ale wskazuje, jakie związki transportowane są do wewnątrz i jakie na zewnątrz chloroplastów.



Tak więc ciągłość asymilacji CO<sub>2</sub> uzależniona jest od wymiany Pi  $\rightleftharpoons$  fosfotriozy za pośrednictwem odpowiedniej translokazy, a PPi może pełnić rolę efektora modulującego aktywność translokazy, lub przy niższym od optymalnego stężeniu Pi, może stanowić jego źródło (50, 51, 52, 53). Sugeruje się także udział PPi w regulacji czynnika sprzęgającego CF<sub>1</sub> (54, 55). Ostatnio wykazano, że PPi *in vitro* nie wpływa na transport elektronów w mitochondriach roślin wyższych, lecz kompetycyjnie hamuje fosforylację oksydacyjną i jest transportowany przez błonę wewnętrzną drogą wymiany z ADP, przy udziale specyficznej translokazy nukleotydowej (56).

Biorąc pod uwagę fakt, że ilość syntetyzowanego PPi w komórce w znacznym stopniu przewyższa udział jego w dotychczas poznanych reakcjach, zagadnienie roli PPi w metabolizmie jest nadal otwarte i wielce interesujące.

#### PISMIENICTWO

1. Miller S. L., Parris M., (1964), *Nature*, **204**, 1248—1250.
2. Lipmann F., (1965), *The Origins of Prebiological Systems*, red. Fox S. W., str. 259—265; Academic Press N. Y.
3. Kornberg A., (1962), *Horizons in Biochemistry*, red. Kasha M., Pullman B., str. 251—264, Academic Press. N. Y.
4. Stetten D., (1960), *Am. J. Med.* **28**, 867—870.
5. Klemme J. H., (1976), *Z. Naturforsch.* **31c**, 544—550.
6. Josse J., Wong S. C. K., (1971), *The Enzymes*, red. Boyer P. D., t. 4. str. 499—527, Academic Press, N. Y. London.
7. Wood H. G., (1977), *Fed. Proc.* **36**, 2197—2205.
8. Heinonnen J., (1974), *Anal. Biochem.* **59**, 366—374.
9. Flodgaard H., (1970), *Eur. J. Biochem.* **15**, 273—279.
10. Pina M. B., Brunner A., Chagoya V., Pina E., (1972), *Eur. J. Biochem.* **30**, 463—468.
11. Kornberg A., (1957), *Adv. Enzymol.* **18**, 191—210.
12. Clark V. M., Kirby G. W., Todd A., (1958), *Nature* **181**, 1650—1653.
13. Bartrop J. A., Grubb P. W., Hesp B., (1963), *Nature*, **199**, 759—761.
14. Klungsöyr L., King T., Cheldelin V., (1957), *J. Biol. Chem.* **135**, 227—232.
15. Klungsöyr L., (1959), *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 586—587.
16. Horio T., von Stedingk L. V., Baltscheffsky H., (1966), *Acta Chem. Scand.* **20**, 1—10.
17. Baltscheffsky H., von Stedingk L. V., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 722—728.
18. Baltscheffsky H., (1966), *Science*, **153**, 1120—1122.
19. Guillory R. J., Fisher R. R., (1972), *Biochem. J.* **129**, 471—481.



20. Nishikawa K., Hosoi K., Suzuki J., Yoshimura S., Horio T., (1973), *J. Biochem.* **73**, 537—553.
21. Mitchell P., (1977), *FEBS Lett.* **78**, 1—20.
22. Moyle J., Mitchell R., Mitchell P., (1972), *FEBS Letters*, **23**, 233—236.
23. Azzi A., Baltscheffsky M., Baltscheffsky H., Vainio H., (1971), *FEBS Letters*, **17**, 49—52.
24. Vainio H., Baltscheffsky M., Baltscheffsky H., Azzi A., (1972), *Eur. J. Biochem.* **30**, 301—306.
25. Boshford C. L., Baltscheffsky M., Prince R. C., (1979), *FEBS Lett.* **97**, 55—59.
26. Rubcov P. M., Efremowicz H. W., Kulaev I. S., (1976), *Dokł. Acad. Nauk SSSR* **230**, 1236—1237.
27. Mansurova S. E., Shakhov Yu. A., Belyakova T. N., Kulaev I. S. (1975), *FEBS Lett.* **55**, 94—98.
28. Mansurova S. E., Shakhov Yu. A., Kulaev I. S., (1977), *FEBS Lett.* **74**, 31—34.
29. Masłowski P., Kowalczyk S., Kazubska E., (1978), *Acta Biochim. Polon.* **25**, 175—183.
30. Baltscheffsky M., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 270—276.
31. Baltscheffsky M., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 46—53.
32. Keister D. L., Yike N. J., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 415—422.
33. Keister D. L., Yike N. J., (1967), *Biochem.* **6**, 3847—3857.
34. Keister D. L., Raveed N. J., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 6454—6458.
35. Keister D. L., Minton N. J., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 932—939.
36. Mansurova S. E., Belyakova T. N., Kulaev I. S., (1972), *Biochimia* **15**, 223—225.
37. Mansurova S. E., Ermakova S. A., Zviagilskaya R. A., Kulaev I. S., (1975), *Mikrobiologia* **44**, 874—879.
38. Siu P. M. L., Wood H. G., (1962), *J. Biol. Chem.* **237**, 3044—3051.
39. Reeves R. E., (1970), *Biochem. Biophys. Acta* **220**, 346—349.
40. Hatch M. D., Slack C. R., (1968), *Biochem. J.* **106**, 141—149.
41. Reeves R. E., Munzies R. A., Hsu D. S., (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 5468—5472.
42. Evans H. J., Wood H. G., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **61**, 1448—1453.
43. Reeves R. E., Guthrie J. D., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 1389—1395.
44. Cagen L. L., Friedmann H. C., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 3382—3392.
45. O'Brien W. E., Bowien S., Wood H. G., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 8690—8695.
46. Sawyer M. H., Baumann P., Baumann L., (1977), *Arch. Microbiol.* **112**, 169—172.
47. Macy J. M., Ljungdahl Z. G., Gottschalk G., (1978), *J. Bacteriol.* **134**, 84—91.
48. Carnal N. W., Black C. C., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **86**, 20—26.
49. Skulachev V. P., (1977), *FEBS Lett.* **74**, 1—9.
50. Coöburn W., Baldry C. W., Walker D. A., (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 614—624.
51. Jensen R. G., Bassham J. A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 219—226.
52. Fliege R., Flugge I., Werden K., Heldt H. W., (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **502**, 232—247.

53. Herold A., Walker D. A., (1979), w *Membrane Transport in Biology* red. Giebisch G., Tosteson D. C. Ussing H. H., T. 2. str. 411—439. Springer — Verlag Berlin.
54. Girault G., Galmiche J. M., Villae M. M., Thierry J., (1973), *Eur. J. Biochem.* **38**, 473—478.
55. Tiefert M. A., Roy H., Moundrianakis E. N., (1977), *Biochem.* **16**, 2396—2403.
56. Kowalczyk S., Masłowski P., (1980), *Phytochem.* (w druku).

TERESA SAWICKA \*)

## Biosynteza glikokoniugatów plazmolemy komórek ssaków

### Glycoconjugates biosynthesis of plasma membranes of mammalian cells

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Związki cukrowe plazmolemy komórek ssaków
- III. Prekursory glikokoniugatów plazmolemy
- IV. Miejsce biosyntezy glikokoniugatów plazmolemy
- V. Regulacja biosyntezy glikokoniugatów plazmolemy
  - V-1. Specyficzność glikozylotransferaz i współzawodnictwo o substraty
  - V-2. Biosynteza glikolipidów powierzchniowych
  - V-3. Biosynteza glikokoniugatów serologicznie czynnych
- VI. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Carbohydrate compounds of mammalian cells plasma membranes
- III. Precursors of glycoconjugates of plasma membranes
- IV. Location of glycoconjugates biosynthesis
- V. Regulation of plasma membrane glycoconjugates biosynthesis
  - V-1. Glycosyltransferases specificity and competition for substrates
  - V-2. Cell surface glycolipids biosynthesis
  - V-3. Biosynthesis of glycoconjugates blood-group active
- VI. Concluding remarks

#### I. Wstęp

W ciągu ostatnich dziesięciu lat, glikokoniugaty plazmolemy (zewnątrznej błony komórkowej) są przedmiotem intensywnych badań

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

Wykaz stosowanych skrótów: Gal—galaktoza, Man—mannoza, Glc—glukoza, Fuk—fukoza, GlcNAc—N—acetyloglukozoamina, GalNAc—N—acetylogalaktozoamina, NeuNAc—kwas N—acetylneuraminowy, UDP—urydynodwufosforan Ser—seryna, Tre—treonina, Glu—glutamina, gli—glicyna, Val—walina Ala—alanina, Met—metionina, Asp—asparagina, Cer—ceramid.

a więc i licznych artykułów przeglądowych oraz opracowań monograficznych (1—7). Hydrofilowe łańcuchy cukrowe, przyłączone do niektórych białek i lipidów plazmolemy i umiejscowione po zewnętrznej stronie powierzchni komórki mogą oddziaływać z otaczającym komórkę środowiskiem (Rycina 1). Taki układ glikokoniugatów w plazmolemie warunkuje ich rolę biologiczną. Glikokoniugaty plazmolemy są receptorami wirusów i receptorami hormonów (5, 6). Glikoproteiny powierzchniowe biorą udział w procesach takich jak rozpoznawanie się komórek (3) i przyleganie komórek do siebie (8—11). Glikolipidy i glikoproteiny membran erytrocytów wykazują swoistość antygenową grup krwi (5.).

Występowanie związków cukrowych na powierzchni komórek ssaków udowodniono stosując metody histochemiczne (12) i biochemiczne (13, 14). Leblond i wsp. (12) opracowali metodę obserwacji powierzchni komórek pod mikroskopem elektronowym, po zabarwieniu związków cukrowych odczynnikiem Schiffa z nadjodanem. Zastosowanie rozpuszczalników organicznych (15) i detergentów (16) umożliwiło rozpuszczenie składników błony a następnie ich izolację. Szerokie zastosowanie znalazły też lektyny roślinne — ich zdolność wiązania mono i oligosacharydów wykorzystano przy izolowaniu i oczyszczaniu glikoprotein plazmolemy (17). Często stosuje się znakowanie glikoprotein plazmolemy związkami radioaktywnymi (18, 19), a następnie charakteryzuje się znakowany materiał przy użyciu elektroforezy na żelu poliakryloamidowym oraz autoradiografii. Zastosowanie zaś chromatografii gazowej i metody oznaczania rezonansu paramagnetycznego przy 360 MHz, pozwala na przeprowadzenie analizy składu oraz sekwencji cukrów w łańcuchu oligosacharydowym (20).

Biogeneza składników plazmolemy komórek zwierzęcych przebiega w organellach wewnątrz komórkowych (5, 6, 21). Białkowe składniki plazmolemy są syntetyzowane na rybosomach. W procesie przeniesienia oligosacharydu z nośnika fosfolipidowego na polipeptyd powstaje wiązanie N-glikozydowe pomiędzy asparaginą a N-acetyloglukozoaminą (21—24). Proces ten zachodzi po przemieszczeniu się białka na błonę szorstką siateczki endoplazmatycznej (21). Modyfikacja nowo zsyntetyzowanych glikopeptydów odbywa się w błonach gładkich siateczki endoplazmatycznej i aparacie Golgiego (23, 24). Pęcherzyki transportowe aparatu Golgiego przenoszą materiał błonowy z błon gładkich siateczki endoplazmatycznej do plazmolemy. Natomiast wiązanie O-glikozydowe powstaje na drodze bezpośredniego przeniesienia cząsteczki cukru na akceptor białkowy (25). Biogeneza glikopeptydów plazmolemy, w których występują wiązania O-glikozydowe jest jak dotychczas mało zbadana. Prawdopodobnie rozpoczęcie glikozylacji ma miejsce wtedy, gdy nowo zsyntetyzowany peptyd jest jeszcze związany z rybosomami (25). Miejscem biosyntezy glikolipidów są błony aparatu Golgiego (26).

Podczas przemieszczania się glikokoniugatów o niekompletnej struk-

turze z błon wewnętrznych do plazmolemy (27, 28) przyłączane są końcowe reszty cukrowe (28, 29). Odbywa się to na drodze enzymatycznego przenoszenia reszt cukrowych z nukleozydodwufosfo cukrów na nieredukujący koniec rosnącego łańcucha cukrowego. Niniejszy artykuł omawia niektóre zagadnienia związane z enzymatycznym przenoszeniem reszt cukrowych z nukleozydodwufosfo cukrów na oligosacharydy połączone z białkiem lub lipidem plazmolemy.

## II. Związki cukrowe plazmolemy komórek ssaków

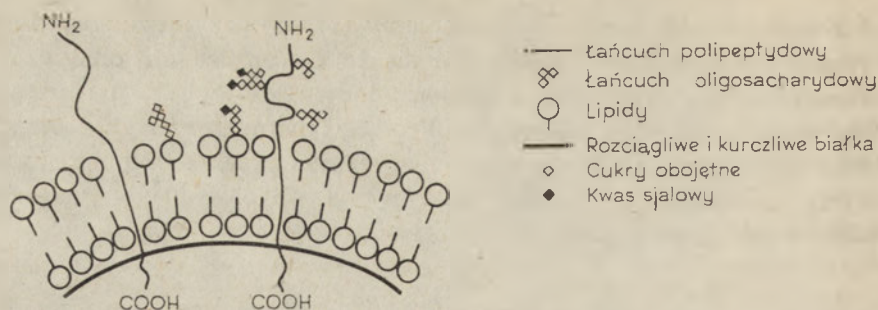
W podwójnej warstwie lipidowej plazmolemy (30, 31) hydrofilowe grupy lipidów skierowane są na zewnątrz a hydrofobowe do wewnątrz warstwy (Rycina 1). Cząsteczki glikolipidów, białek i glikoprotein są rozmieszczone niesymetrycznie, w poprzek warstw lipidowych (7). Na ogół hydrofobowa część łańcucha polipeptydowego znajduje się wewnątrz warstwy lipidowej natomiast hydrofilowy komponent cukrowy połączony z peptydem jest wysunięty poza błonę (Rycina 1). Najczęściej w glikoproteinach występują galaktoza, fukoza, N-acetylogalaktozamina i kwas sialowy. Tablica 1 przedstawia cukry wyizolowane z plazmolemy erytrocytów ludzkich (32).

Tablica 1.

Cukry występujące w plazmolemie erytrocytów (32)

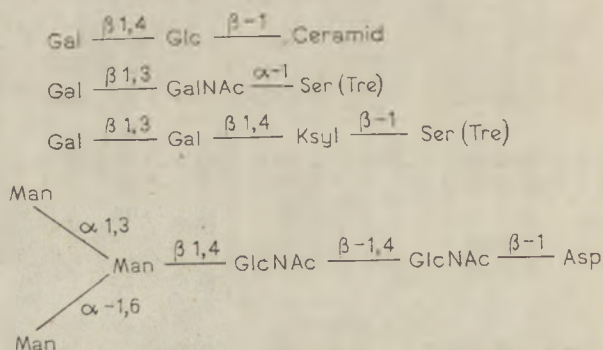
Cukier	Glikoproteiny	Glikolipidy
	μmole/100 mg stromy	
Galaktoza	4,4	1,8
Mannoza	0,6	0,1
Fukoza	1,0	0,7
Glukoza	0,3	0,4
GlcNAc	2,0	0,2
GalNAc	2,2	0,3
NeuNAc	4,4	0,2

W glikoproteinach spotyka się zarówno wiązanie O jak N-glikozydowe. Wiązanie O-glikozydowe występuje między wodorotlenową grupą seryny lub treoniny i redukującym końcem jednego z następujących cukrów: a) ksylozy, b) N-acetylogalaktozaminy, c) mannozy, d) galaktozy, e) fukozy. Takie wiązania występują również między hydroksylizyną i galaktozą. Wiązanie N-glikozydowe znajduje się między redukującym końcem N-acetyloglukozaminy i β-amidową grupą asparaginy. W plazmolemie komórek ssaków spotyka się glikoproteiny zarówno z wiązaniem O- jak i N-glikozydowym, zawierające rdzeniowe struktury oligosacharydowe



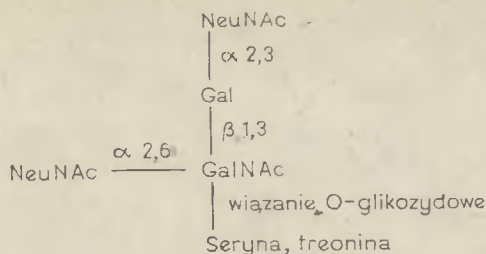
**Rycina 1.** Hipotetyczny schemat połączenia glikoprotein i glikolipidów z plazmolemą (na podstawie 7).

oraz boczne odgałęzienia o zmiennej strukturze (20). Rycina 2 przedstawia struktury rdzeniowe spotykane w glikokoniugatach. Oligosacharydowe odgałęzienia mogą różnić się zarówno składem cukrów jak i rodzajem wiązań między nimi. W zależności od przewagi występowania określonych cukrów, glikoproteiny zawierające wiązanie N- glikozydowe dzieli się na związki o strukturze oligomannozylowej, N-acetylolaktozoaminowej oraz oligomannozylo-N-acetylolaktozoaminowej (20). Łańcuchy oligosacharydowe w glikopeptydach o strukturze N-acetylolaktozoaminy mogą zawierać kilka odgałęzień, w których kwas sjałowy i fukoza występują w różnych ilościach i różnym rozmieszczeniu. Kwas sjałowy może być połączony z oligosacharydem wiązaniem  $\alpha$  2,3 lub  $\alpha$  2,6 a fukoza wiązaniem  $\alpha$  1,3 lub  $\alpha$  1,6.



**Rycina 2.** Struktury rdzeniowe w glikokoniugatach (20).

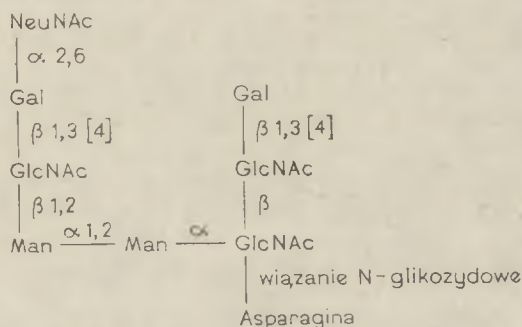
Glikoproteiny wyizolowane z plazmolemy erytrocytów ludzkich tworzą wysokocząsteczkowe agregaty, które pod działaniem detergentów i enzymów proteolitycznych rozpadają się na formy monomeryczne (33, 34). Stosując redukcję borowodorkiem sodu i hydrolizę, od glikoprotein o aktywności MN z erytrocytów ludzkich odszczepiono glikopeptyd o strukturze przedstawionej na Rycinie 3 (35, 36). Oligosacharyd o podobnej



**Rycina 3.** Oligosacharydowa grupa prostetyczna glikoforyny typ I (35, 36)

strukturze wyizolowano z normalnego moczu ludzkiego (37); jest to prawdopodobnie produkt katabolizmu błon erytrocytarnych.

Kornfeld i Kornfeld (38, 39) poddając trawieniu pronazą glikoproteiny z plazmoemy erytrocytów, wyizolowali glikopeptyd o strukturze przedstawionej na Rycinie 4 i stwierdzili, że związek ten jest receptorem

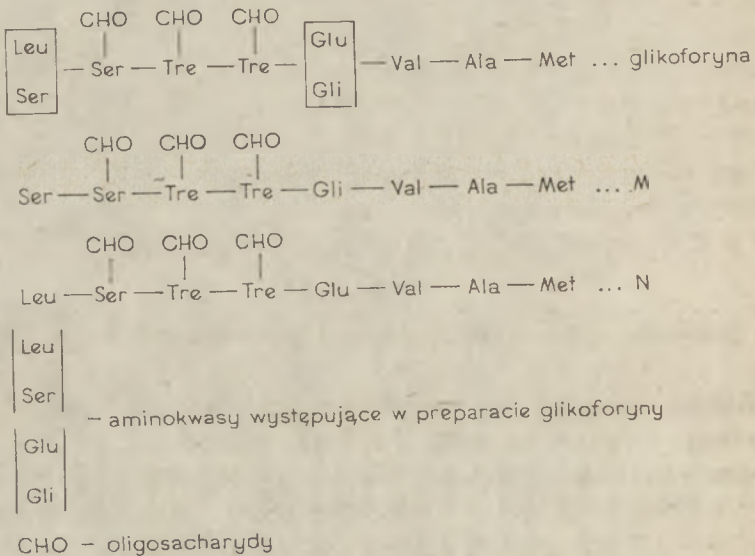


**Rycina 4.** Oligosacharydowa grupa prostetyczna glikoforyny typ II (38, 39)

lektyn. Autorzy wykazali, że galaktoza występująca na nieredukującym końcu jednego z dwu rozgałęzień łańcucha oligosacharydowego uczestniczy w hamowaniu aglutynacji erytrocytów wywołanej przez fitohemoaglutyninę z *Phaseolus vulgaris*. Glikopeptydy przedstawione na Rycinie 3 i 4 są produktami chemicznej i enzymatycznej hydrolizy glikoforyny. Glikoforyna — ilościowo dominująca sjaloglikoproteina ludzkich erytrocytów, jest jak dotychczas najlepiej poznaną glikoproteiną plazmoemy komórek eukariotycznych. Na podstawie wyników badania glikoforyny, Morawiecki przedstawił hipotetyczny model struktury glikoprotein w plazmoemie erytrocytów (33). Szczegółowe badania dotyczące glikoforyny doprowadziły do ustalenia sekwencji aminokwasów oraz miejsca przyłączenia oligosacharydowych łańcuchów bocznych (40—42). Z badań tych wynika, że polipeptydowy łańcuch glikoforyny składa się ze 131 aminokwasów i zawiera około 16-stu oligosacharydowych łańcuchów bocznych. W glikoforynie wyróżnia się trzy strefy: zewnętrzną hydrofilową, zbudowaną z 70-ciu aminokwasów zawierających 22 reszty seryny lub

treoniny, z których 15 służy jako miejsce przyłączenia oligosacharydowych łańcuchów bocznych (wiązaniem O-glikozydowym). Do asparaginy dołączony jest jeden łańcuch oligosacharydowy poprzez wiązanie N-glikozydowe. Strefa środkowa glikoforyny zbudowana jest z hydrofobowych aminokwasów, które oddziałują z warstwą lipidową błony. Wreszcie strefa trzecia, cytoplazmatyczna, złożona jest z aminokwasów hydrofilowych.

W stanie natywnym, glikoforyna tworzy oligomer, w wyniku agregacji z innymi sjałoglikoproteinami membran erytrocytarnych. Natomiast oczyszczona glikoforyna jest dimerem. Jest to związek dobrze rozpuszczalny w wodzie. Wykazuje aktywność biologiczną substancji grupowej MN oraz zdolność wiązania wirusa grypy (17). Niektóre oligosacharydy występujące w glikoforynie posiadają zdolność wiązania fitohemoaglutyniny z fasoli (38). Końcowe sekwencje aminokwasowe w polipeptydowym łańcuchu glikoforyny oraz w odszczepionych od glikoforyny glikopeptydach o aktywności grupowej MN, przedstawia Rycina 5.



**Rycina 5.** Struktury końcowych fragmentów glikoforyny i odszczepionych od niej cjonobromem peptydów o aktywności grupowej MN (43)

Występowanie innych niż glikoforyna glikoprotein wykazano zarówno w plazmolemie erytrocytów ludzkich i zwierzęcych jak i w plazmolemie innych komórek. Szerokie omówienie struktur łańcuchów oligosacharydowych występujących w glikoproteinach plazmolemy komórek ssaków jak również metod ich izolacji i oczyszczania może czytelnik znaleźć w artykule przeglądowym Lotana i Nicolsona (17).

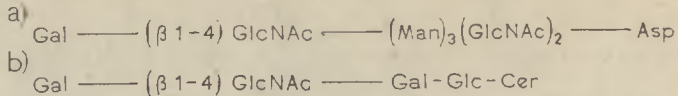
Tutaj przytoczyć można także niektóre badania nad glikoproteinami występującymi w plazmolemie limfocytów ludzkich i zwierzęcych. Gliko-



proteiny plazmolemy limfocytów wykazują zdolność wiązania lektyn roślinnych, które zostały wykorzystane do ich izolowania i oczyszczania. (44).

W celu wyizolowania glikoprotein z plazmolemy limfocytów świni, H a y m a n i C r u m p t o n (45) zastosowali chromatografię powinowactwa na kolumnach zawierających *Sepharose* związaną kowalencyjnie z lektyną z *Lens culinaris*. Wyizolowaną w ten sposób frakcję, zawierającą związki cukrowe, poddano następnie elektroforezie na żelu poliakrylamidowym. W wyniku rozdziału uzyskano 10 frakcji glikoproteinowych, co jest wyrazem dużej ich różnorodności w plazmolemie limfocytów (45). Oczyszczone glikoproteiny hamowały transformację limfocytów lektyną z *Lens culinaris*. M a r c h a l o n i s i w s p. (46) wyizolowali z plazmolemy limfocytów śledziona i grascicy myszy oraz z limfocytów grascicy ludzkiej, immunoglobulinę M, o własnościach receptorowych wobec określonych antygenów. Na przykład miejsca receptorowe limfocytów ze śledziona myszy mogą wiązać syntetyczny polipeptyd zbudowany z następujących aminokwasów: Tyr, Glu, Ala, Liz. (47). W immunoglobulinie M występują łańcuchy oligosacharydowe zawierające mannozę i N-acetyloglukozoaminę oraz łańcuchy oligosacharydowe zawierające mannozę, N-acetyloglukozoaminę, fukozę, galaktozę i kwas sjałowy (48).

W glikosfingolipidach, które stanowią większość opisanych glikolipidów plazmolemy komórek zwierzęcych, sfingozyna połączona jest z kwasem tłuszczowym poprzez grupą aminową a z resztą cząsteczki cukru wiązaniem O-glikozydowym. Liczba, rodzaj i sekwencja reszt cukrowych przyłączonych do sfingozyny jest różna, co powoduje dużą różnorodność glikosfingolipidów. Szczegółowe omówienie klasyfikacji i nazewnictwa glikolipidów może czytelnik znaleźć w artykułach przeglądowych C z a r t o r y s k i e j (49) i G a r d a s a (50). Dane dotyczące występowania glikosfingolipidów w plazmolemie różnych komórek zwierzęcych pochodzą głównie z badań nad stransformowanymi nowotworowo błonami (51). Natomiast dane dotyczące struktury glikosfingolipidów, które występują w plazmolemie erytrocytów ludzkich, pochodzą z badań nad antygenową specyficznością tych związków (52). Z plazmolemy erytrocytów ludzkich otrzymano poliglikozyloceramidy o aktywności grupowej A, H i J, które zawierały 25 do 59 reszt cukrowych na mol związku (52). Rozgałęzione łańcuchy cukrowe w poliglikozyloceramidach zawierają powtarzające się sekwencje typu laktozoaminy: Gal(1→4)GlcNAc. Taka struktura łańcuchów oligosacharydowych występująca w substancjach grupowych krwi określana jest jako typ II (53). Z plazmolemy erytrocytów ludzkich wyizolowano również wysokocząsteczkowe glikopeptydy, zawierające 20 do 70-ciu reszt cukrowych na cząsteczkę (54). Galaktoza i N-acetyloglukozamina stanowiły 80% wszystkich reszt cukrowych w tym związku. Ryцина 6 ilustruje podobieństwo struktur części rdzeniowej w poliglikozyloceramidach i poliglikozylopeptydach wyizolowanych z plazmolemy erytro-



**Rycina 6.** Część rdzeniowa w poliglikozylopeptydach a) i poliglikozyloceramidach b) wyizolowanych z membran erytrocytów ludzkich (52, 54)

cytów ludzkich. Odmienność związków przedstawionych na rycinie 6 polega na braku sfingozyny, kwasów tłuszczowych i glukozy w glikoproteinach, które z kolei zawierają mannozę i aminokwasy. Podobieństwo struktury niektórych łańcuchów cukrowych połączonych z białkiem lub lipidem zaobserwowano również w innych glikolipidach i glikoproteinach (54). Prawdopodobnie związki te są syntetyzowane i katabolizowane w zbliżony sposób (55).

### III. Prekursory glikokoniugatów plazmolemy

Wolne nukleozydodwufosfo cukry występujące w formie rozpuszczalnej w cytoplazmie (56) stanowią pulę substratów komórki, niezbędną do syntezy oligosacharydów (57). Czynniki mające wpływ na przebieg biosyntezy nukleozydodwufosfocukrów są różnorodne, jak np.: miejsce syntezy tych związków, stan fizjologiczny komórki, specyficzność pyrofosforylaz i obecność odpowiedniego akceptora reszt cukrowych, poziom hydrolaz oraz niektóre reakcje poprzedzające połączenie cukru z nukleotydem.

Pirofosforylazy, które katalizują biosyntezę nukleozydodwufosfocukrów z nukleozydotrójfosforanów i heksozo-1-fosforanów (57, 58) występują w formie rozpuszczalnej w cytoplazmie (59). Wyjątek stanowi syntetaza CMP-kwasu sjałowego, która występuje w formie rozpuszczalnej w jądrze komórkowym (60). Każde zaburzenie metaboliczne obniżające poziom nukleozydodwufosfocukrów w komórce, może wpływać na przebieg metabolizmu oligosacharydów. Obniżenie aktywności lub brak odpowiednich pirofosforylaz spowodowany stanem fizjologicznym komórki wywołanym np. przez głodzenie może wpływać na przebieg biosyntezy nukleozydodwufosfocukrów (61).

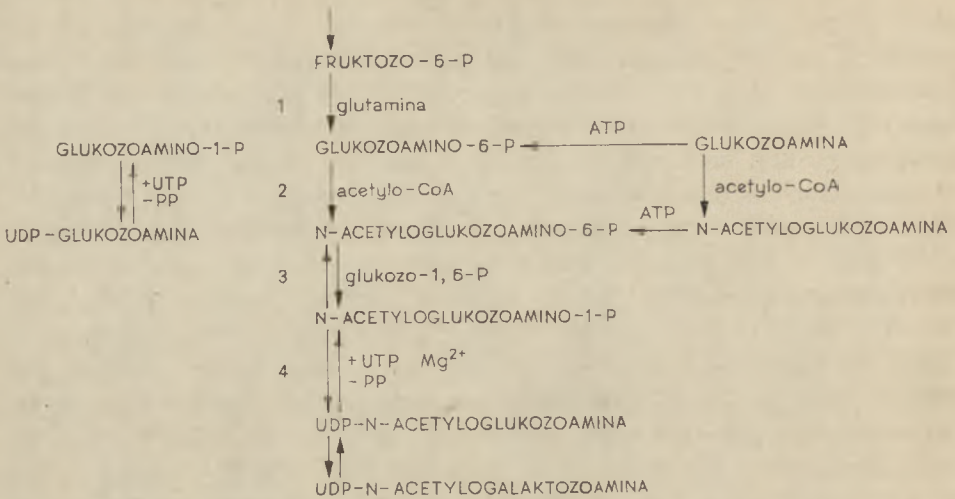
U eukariontów dominuje droga przenoszenia reszt cukrowych przez koenzyny urydynowe, mimo występowania dużej różnorodności połączeń heksoz z nukleotydami (59). Reakcje prowadzące do biosyntezy nukleozydodwufosfocukrów są na ogół specyficzne zarówno w stosunku do komponentu nukleozydowego, jak też cukrowego (59). Badania nad specyficznością pirofosforylaz wskazują (58), że różne połączenia cukrów z nukleotydami są katalizowane przez odrębne białka enzymatyczne.

Jednym z czynników, który zapobiega nagromadzeniu się nukleozydodwufosfocukrów, jest obecność w komórce odpowiedniego akceptora, na

który mogą być przenoszone reszty cukrowe. We wczesnym stadium regeneracji wątroby szczura następuje nagromadzenie się UDP-N-acetyloheksozamin, przy równoczesnym przyspieszeniu wbudowywania znakowanej glukozyaminy do UDP-N-acetyloheksozamin (62, 63, 64). Badając przebieg reakcji katalizowanej przez transferazę N-acetyloglukozoaminy w ekstraktach z regenerującej wątroby stwierdzono, że obniżenie szybkości tej reakcji w ciągu pierwszych 48-miu godzin wynika ze zmian w strukturze endogennego akceptora. Wewnątrz komórkowy poziom nukleozydodwufosfocukrów zależy również od występowania pirofosfataz (65—75). Pirofosfatazy nukleotydo- we hydrolizują nukleozydodwufosfocukry do heksozo-1-fosforanów od których fosfohydrolazy odcinają następnie fosforan (65, 67, 74). Pirofosfatazy występują zarówno w formie rozpuszczalnej w cytoplazmie, (65, 67) jak też w formie związanej z plazmolemą komórek ludzkich i zwierzęcych (66, 68, 74). Ponieważ enzymy te współzawodniczą z glikozylotransferazami o substrat, w doświadczeniach, w których bada się przyłączanie radioaktywnych heksoz do glikoproteinowych akceptorów powierzchniowych, pirofosfatazy nukleotydo- we maskują przebieg reakcji i utrudniają właściwą ich ocenę (72). Wykazano, że istnieją różnice w specyficzności pirofosfataz, uzależnione od typu komórek w których występują (73, 74) oraz między gatunkowe różnice w aktywności fosfohydrolaz fosforanów heksoz plazmolemy komórek zwierzęcych (75). Wygaszenie aktywności pirofosfatazy nukleotydo- wej w plazmolemie komórek chomika, Sela i Sachs (73) wiązało z transformacją nowotworową. Komórki pochodzące jednak od innych gatunków ssaków, po transformacji nowotworowej, nie tracą aktywności enzymu w plazmolemie (74).

Biosynteza nukleozydodwufosfocukrów jest uzależniona od wcześniejszych reakcji w metabolizmie heksozamin. Przykładowo można przytoczyć znaczenie acetylacji glukozyamino-6-fosforanu w biosyntezie UDP-N-acetyloglukozoaminy (76).

Współzależność biosyntezy glikoprotein powierzchniowych od metabolizmu heksozamin badano w fibroblastach mysich szczepu Balbc 3T3 (77). Mutant AD-6 wyizolowany z tych fibroblastów, charakteryzował się słabą zdolnością do przylegania międzykomórkowego i pewnymi zmianami morfologicznymi charakterystycznymi dla komórek stransformowanych wirusem onkogennym (78, 79). Zmiany struktury glikoprotein powierzchniowych komórek mutantu AD-6 były następstwem obniżenia poziomu wolnych N-acetyloheksozamin (77). Wykazano (77), że w błonie komórkowej mutantu AD-6 nie ma acetylotransferazy katalizującej acetylację glukozyamino-6-fosforanu do N-acetyloglukozoamino-6-fosforanu, co przedstawia reakcja 2 na Rycinie 7. Dodanie do pożywki wzrostowej N-acetyloglukozoaminy, usuwało w komórkach mutantu skutki bloku metabolicznego, ale nie przywracało brakującej aktywności enzymatycznej (77). Współzależność między metabolizmem heksoz i nukleotydów cukro-



**Rycina 7.** Schemat biosyntezy UDP-N-acetyloglukozoaminy i UDP-N-acetylogalaktozaminy (na podstawie 77).

wych a budową ściany komórkowej badano również u prokariotów (80—84). Zmiany struktury ściany komórkowej mutantu *Neurospora crassa* wynikały z mutacji w genach kodujących pewne enzymy metabolizmu węglowodanowego (80, 81). Omówione tutaj dane doświadczalne wskazują na różnorodność mechanizmów regulujących biosyntezę nukleozyddwufocukrów. Jest to częściowo wynikiem różnic w drogach metabolicznych różnych związków cukrowych tworzących połączenia z nukleotydami jak również różnic metabolizmu różnych typów komórek.

#### IV. Miejsce biosyntezy glikokoniugatów plazmolemy

Plazmolema komórek ssaków uczestniczy w metabolizmie wewnątrzkomórkowym oraz utrzymuje łączność z otaczającym komórkę środowiskiem, ale nie bierze udziału w procesie swojej biogenezy. Biosynteza białek, lipidów i związków cukrowych, które tworzą strukturę plazmolemy, odbywa się w organelach wewnątrzkomórkowych (29). Biosynteza glikoprotein przebiega w kilku następujących po sobie etapach. Syntezę heterogennego łańcucha cukrowego, zapoczątkowuje glikozylacja białka.

Badania nad przebiegiem glikozylacji białek dotyczyły przede wszystkim biosyntezy glikoprotein z wiązaniem N-glikozydowym między GlcNAc a asparaginą (21, 22). Przeniesienie oligosacharydu z nośnika lipidowego na nowo zsyntetyzowany peptyd (85—89) odbywa się w błonach szorstkich siateczki endoplazmatycznej (21). Oligosacharyd ulega następnie przekształceniu, które ma miejsce w błonach gładkich siateczki endoplazmatycznej i aparacie Golgiego (23, 24). Dołączenie następnych reszt gliko-

zylowych do łańcucha cukrowego odbywa się przez przeniesienie reszt cukrowych z nukleozydodwufosfo cukrów bez udziału nośnika lipidowego.

Glikozylacja białka, w wyniku której powstaje wiązanie O-glikozydowe między N-acetylogalaktozaminą a seryną lub treoniną jest zapoczątkowana w momencie, gdy nowo zsyntetyzowany peptyd związany jest jeszcze z rybosomami (25). Reszta cukrowa jest przenoszona na białko bezpośrednio z nukleozydodwufosfo cukru. Następnie częściowo glikozylowany peptyd przechodzi do kanalików endoplazmatycznego reticulum i jest transportowany do aparatu Golgiego (90, 91). W aparacie Golgiego, przyłączane są dalsze, kolejne reszty cukrowe do rosnącego łańcucha oligosacharydowego. Pęcherzyki aparatu Golgiego ulegają fuzji z plazmolemą, w wyniku czego powstają nowe struktury glikoproteinowe w błonach.

Glikozylotransferazy biorące udział w biosyntezie glikolipidów występują w błonach aparatu Golgiego oraz częściowo w błonach siateczki endoplazmatycznej. Zsyntetyzowane w aparacie Golgiego glikolipidy podobnie jak glikoproteiny, dostają się do plazmolemy drogą fuzji pęcherzyków transportowych z błoną (92—94). W aparacie Golgiego komórek wątroby (95) jak również innych tkanek zwierzęcych takich jak trzustka (96) tarczycy (97) czy jądra (98—100), występują liczne glikozylotransferazy. Stanowią one znaczny odsetek aktywności enzymatycznej w stosunku do aktywności glikozylotransferaz w homogenatach z całej tkanki. Niewielki odsetek aktywności komórkowych glikozylotransferaz występuje w formie związanej z innymi błonami komórkowymi w tym z plazmolemą (101—113). Występowanie glikozylotransferaz w plazmolemie komórek ssaków było przedmiotem szeregu kontrowersyjnych hipotez (110, 111). Najmniej wątpliwości dotyczy występowania glikozylotransferaz w plazmolemie roślin (114, 115) i bakterii (116). Roślinne glikozylotransferazy powierzchniowe współuczestniczą w biosyntezie celulozy. Podobnie enzymy związane z biosyntezą chityny w *Mucor rouxii* działają na powierzchni lub blisko powierzchni komórki (117). D-glukozylotransferaza, która katalizuje przyłączanie końcowej reszty glukozy kollagenu występuje również w błonie komórkowej (118). W pęcherzykach wydzielniczych aparatu Golgiego komórek zwierzęcych i roślinnych stwierdzono obecność glikozylotransferaz (119—125). U roślin glikozylotransferazy wędrują z pęcherzykami aparatu Golgiego do plazmolemy, gdzie następuje fuzja błon pęcherzyków z plazmolemą. W komórkach zwierzęcych, glikozylotransferazy, wchodzące do plazmolemy taką drogą, mogą teoretycznie katalizować wbudowywanie węglowodanowej reszty z egzogennych nukleozydodwufosfo cukrów do odpowiednich akceptorów powierzchniowych (126), ale nie mogą uczestniczyć w biogenezie plazmolemy.

Badania nad kinetyką wbudowywania związków cukrowych (28, 29) fosfolipidów (127) i białek (128, 129) do plazmolemy, wskazują biogenetyczną drogę tych związków, prowadzącą stopniowo z błon wewnątrz

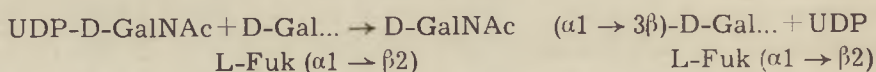
komórkowych do powierzchni komórki. Kinetyka ruchu białek błonowych do powierzchni komórki jest podobna do kinetyki ruchu białek sekrecyjnych, takich jak albumina i pewne frakcje globulin (129). Wykazano, że w tkankach szczura znakowane cukry i aminokwasy wbudowują się najpierw do frakcji mikrosomalnej a następnie do plazmolemy, co potwierdza wewnątrzkomórkową biogenezę glikoprotein membranowych (130, 131). Badania dotyczące okresu półtrwania znakowanych cukrów i aminokwasów w plazmolemie komórek wątroby szczura wskazują, że białka tyczną regulację biosyntezy serologicznie czynnych oligosacharydów.

## V. Regulacja biosyntezy glikokoniugatów plazmolemy

Artykuł omawia czynniki regulujące biosyntezą glikokoniugatów takie jak: specyficzność glikozylotransferaz i ich współzawodnictwo o substraty, niektóre aspekty biosyntezy glikolipidów powierzchniowych oraz genetyczną regulację biosyntezy serologicznie czynnych oligosacharydów.

### V-1. Specyficzność glikozylotransferaz i współzawodnictwo o substraty.

Spośród czynników determinujących kolejność przyłączania monocukrów do heterogennego łańcucha oligosacharydowego połączonego z białkiem lub lipidem, poznano tylko niektóre jak np. wpływ struktury akceptora na przyłączanie kolejnej reszty cukrowej w łańcuchu oligosacharydowym. Glikozylotransferazy charakteryzuje specyficzność w stosunku do akceptora, na który jest przenoszona reszta cukrowa z nukleozydodwufosfo cukrów. W niektórych przypadkach specyficzność ta zależy nie tylko od końcowej, lecz również od przedostatniej reszty cukrowej znajdującej się na końcu nieredukującym łańcucha oligosacharydowego (133). Przykładowo można przytoczyć końcową reakcję w biosyntezie oligosacharydu o aktywności grupowej A krwi ludzkiej:

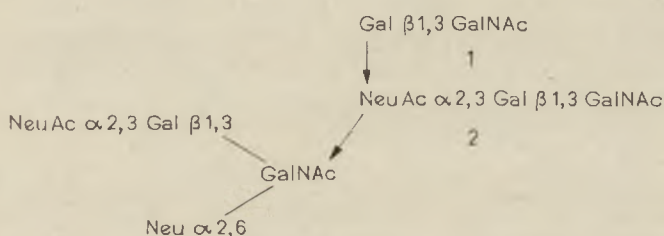


Enzymatyczne przeniesienie cząsteczki GalNAc na galaktozę jest warunkowane obecnością fukozy, połączonej wiązaniem  $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$  z galaktozą.

Specyficzność glikozylotransferaz dotyczy zarówno cząsteczki rozpoznawanego akceptora jak również cząsteczki cukru i nukleotydu. Według niektórych autorów (5) glikozylotransferazy charakteryzuje większa specyficzność w stosunku do nukleozydodwufosfo cukrów niż w stosunku do akceptora. Zaobserwowano, że w pewnych wypadkach struktura akcepto-

ra może być rozpoznawana przez więcej niż jedną glikozylotransferazę (5). Bogaty materiał doświadczalny wskazuje że procesy elongacyjne łańcuchów oligosacharydowych zależą od kolejnego działania specyficznych glikozylotransferaz. Syntezę łańcucha cukrowego kończy przyłączenie fukozy lub kwasu sjałowego.

Swoistość reakcji przyłączania końcowych reszt kwasu sjałowego do glikopeptydów z wiązaniem O- i N- glikozydowym między częścią węglowodanową a białkiem (Rycina 3, 4) wykazano badając plazmolemę erytrocytów ludzkich (134—140). Do badań zastosowano wyizolowane z kolostrum krowy trzy transferazy kwasu sjałowego o różnej specyficzności zarówno w stosunku do struktury akceptora jak i do rodzaju wiązania glikozydowego powstającego między kwasem sjałowym a akceptorem (134, 135). Enzymy te katalizowały przyłączenie cząsteczki kwasu sjałowego do akceptorów o następującej strukturze: Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Tre/Ser oraz Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-N-Asp. W wyniku przyłączenia kwasu sjałowego mogły powstawać następujące wiązania glikozydowe: 1. NeuAc $\alpha$ 2-3Gal, 2. NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc, 3. NeuNAc $\alpha$ 2-6Gal. Dwie cząsteczki kwasu sjałowego zostają przyłączone do akceptora w określonej kolejności. Rycina 8 ilustruje ten proces.



**Rycina 8.** Kolejność przyłączania kwasu sjałowego do komponentu oligosacharydowego glikoforyny (140)

Najpierw przyłączany jest kwas sjałowy do galaktozy wiązaniem  $\alpha$ 2-3 a następnie druga cząsteczka kwasu sjałowego przyłączona jest do GalNAc wiązaniem  $\alpha$ 2-6. Taki przebieg reakcji jest podyktowany preferencją danego enzymu w stosunku do określonej struktury akceptora (140). Dane te wskazują, że biosynteza oligosacharydów może zależeć nie tylko od występowania odpowiednich glikozylotransferaz ale również od kolejności ich działania. Trzecia transferaza kwasu sjałowego wyizolowana z kolostrum krowy katalizowała syntezę wiązania glikozydowego ( $\alpha$ 2-6) między kwasem sjałowym a galaktozą, występującą w sekwencji Gal $\beta$ 1-4GlcNAc na końcu oligosacharydowego akceptora połączonego z asparaginą wiązaniem N-glikozydowym (137). Enzym ten nie katalizował przyłączenia kwasu sjałowego do następujących akceptorów: GalNAc $\alpha$ Tre/Ser oraz Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Tre/Ser. Dane powyższe wskazują, że transferazy kwasu sjałowego charakteryzuje specyficzność w stosunku do konfiguracji two-

zonego wiązania, jak również do rodzaju wiązania między częścią węglowodanową a peptydem.

Regulacja procesów elongacyjnych łańcuchów cukrowych opiera się w pewnych wypadkach na współgraniu enzymów syntetyzujących z enzymami hydrolizującymi. Podczas tzw. obróbki (ang. *processing*) oligosacharydów, która ma miejsce po przyłączeniu w całości kilkunastu reszt cukrowych do białka w błonie szorstkiej siateczki endoplazmatycznej, jedne reszty cukrowe zostają zastąpione innymi poprzez działanie specyficznych w stosunku do określonych akceptorów i substratów, glikozylotransferaz i glikozydaz (23, 24, 85—87).

Podczas gdy inhibitory i aktywatory omawianych procesów elongacyjnych są mało znane, wiadomo, że glikozylacja peptydów, przy współudziale nośnika fosfolipidowego może być hamowana przez tunikamycynę (141) i 2-dezoksyglukozę (142).

W regulacji biosyntezy wielocukrów uczestniczą pirofosfatazy nukleotydowe, na drodze współzawodnictwa z glikozylotransferazami o substraty. Z mikrosomów wątroby szczura, wyizolowano wybitnie aktywną pirofosfatazę nukleotydową UDP-galaktozy, której inhibitorami były następujące nukleotydy: CTP, ATP, GTP, CDP, CDP-glukoza i GDP-glukoza (143). CDP-cholina słabo hamowała działanie pirofosfatazy. Wymienione powyżej nukleotydy były równocześnie aktywatorami galaktozylotransferazy wyizolowanej z mikrosomów. Podobnie, kwas foliowy i 5'AMP, które są inhibitorami pirofosfatazy, aktywowały biosyntezę glikoprotein. (144).

Ważnym elementem regulacyjnym w metabolizmie heteropolisacharydów jest ich prawidłowy katabolizm uzależniony od glikozydaz lizosomalnych (145). Problem ten jednak wykracza poza ramy niniejszego artykułu.

## V-2. Regulacja biosyntezy glikolipidów powierzchniowych

W ciągu ostatnich lat wykazano współzależność między syntezą glikolipidów powierzchniowych a stanem komórek znajdujących się w cyklu podziałowym lub też w fazie spoczynkowej  $G_0$ . Zauważono również, że w wyniku bezpośredniego kontaktowania się powierzchni komórek następuje podwyższenie intensywności procesów glikozylacji glikolipidów powierzchniowych. W 1975 roku, Hakomori (51), opracował hipotetyczny model transglikozylacji glikolipidów powierzchniowych komórek kontaktujących się ze sobą. Takiej transglikozylacji, uzależnionej od kontaktowania się powierzchni sąsiadujących ze sobą komórek, nie stwierdzono w wypadku komórek transformowanych nowotworowo i to nie zależnie od rodzaju czynnika powodującego transformację. Hakomori sugeruje, że nagromadzanie się glikolipidów powierzchniowych w wyniku kontaktu



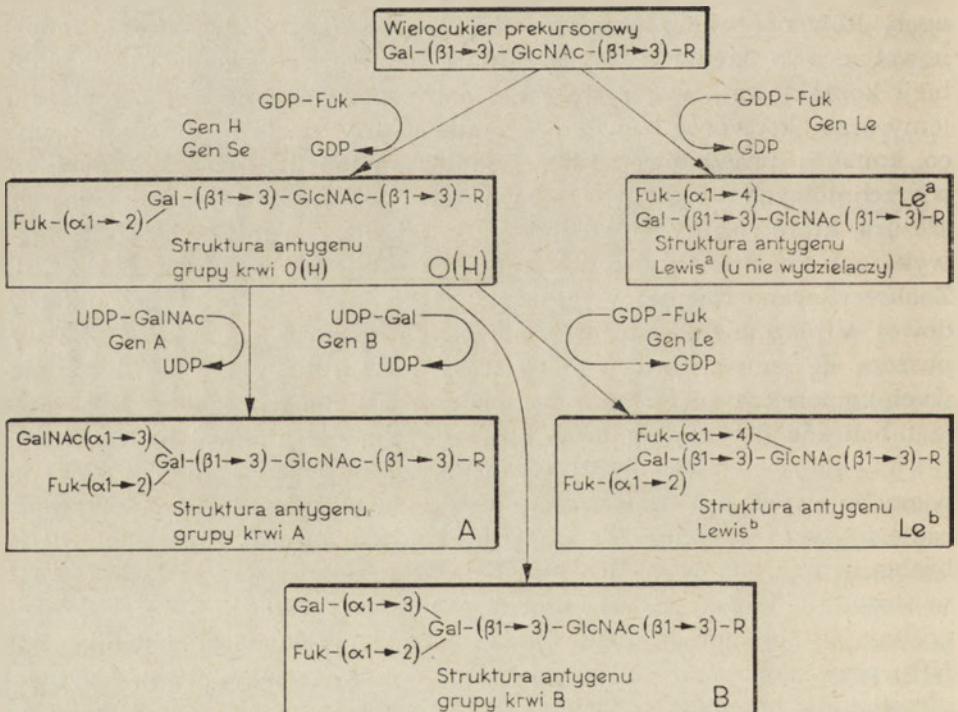
między prawidłowymi komórkami, prowadzi do zmian konformacji i płynności dwuwarstwowej, lipidowej struktury plazmolemy. Zmiany te mogą być sygnałem regulującym metabolizm wewnątrzkomórkowy i podziały komórkowe. W komórkach transformowanych nowotworowo oprócz utraty zdolności plazmolemy do oddziaływania z powierzchniami sąsiadujących komórek, obserwuje się zmiany struktury glikolipidów powierzchniowych, wynikające z zaburzeń w ich syntezie. Wykazano, że obserwowane zmiany strukturalne glikolipidów powierzchniowych w komórkach transformowanych polegające na skróceniu łańcuchów oligosacharydowych (146, 147), są wynikiem obniżenia aktywności odpowiednich glikozylotransferaz. Na przykład w transformowanych wirusami DNA lub RNA komórkach myszy, brakuje specyficznej transferazy aminocukrów, niezbędnej w biosyntezie gangliozydów powierzchniowych (147). W wyniku utraty aktywności galaktozylo transferazy UDP-Gal: GM<sub>2</sub> w transformowanych wirusem Kirstena komórkach myszy, następowało nagromadzenie się gangliozydu GM<sub>2</sub> (148—150). W transformowanych wirusem SV 40 komórkach chomika, następowało wygaszanie aktywności transferazy N-acetylogalaktozoaminy, która katalizuje przeniesienie N-acetylogalaktozoaminy na gangliozyd GM<sub>3</sub> (148). We wszystkich opisanych przypadkach nie znaleziono aktywatorów i inhibitorów glikozylotransferaz, ani w komórkach prawidłowych ani w komórkach transformowanych. Równocześnie zaobserwowano, że rewertanty transformowanych nowotworowo komórek myszy, które odzyskiwały zdolność do inibicji kontaktowej, wykazywały normalny poziom gangliozydów plazmolemy oraz aktywność transferazy aminocukrów na tym samym poziomie co komórki prawidłowe (148). Badając metabolizm gangliozydów powierzchniowych w dwu szczepach nowotworowych komórek wątroby szczura, które różniły się zdolnością do przylegania międzykomórkowego, wykazano różnice aktywności pewnych glikozylotransferaz (141—151). Zaobserwowano również wygaszanie aktywności pirofosfatazy nukleotydowej w plazmolemie transformowanych komórek chomika (73). Przypuszcza się jednak, że za zmiany w syntezie glikolipidów powierzchniowych komórek transformowanych, odpowiedzialne są bloki enzymatyczno-metaboliczne dotyczące glikozylotransferaz a nie glikozylohydrolaz (51). Chatterjee i wsp. (152) wykazali, że biosynteza glikolipidów powierzchniowych jest uzależniona od cyklu komórkowego. Wbudowywanie radioaktywnej galaktozy do glikolipidów zsynchronizowanej hodowli fibroblastów zarodków mysich linii KB, była podwyższona w fazie M i G<sub>1</sub>, w stosunku do fazy S. Gamberg i Hakomori (153) stwierdzili posługując się metodą znakowania plazmolemy komórek chomika linii NIL, przy pomocy trytowanego borowodorku, że podwyższenie syntezy glikolipidów przebiega w fazie G<sub>1</sub>, a obniżenie w fazie S. Zaobserwowano również (154) aktywujące działanie c-AMP na przebieg biosyntezy glikolipidów w komórkach nowotworowych nerek myszy. Omówione powyżej

dane wskazują na współzależności zmian zachodzących w plazmolemie komórek a podziałem komórkowym.

### V-3. Biosynteza glikokoniugatów serologicznie czynnych

Oligosacharydy o strukturze odpowiadającej antygenom grup krwi ABO(H) występują zarówno w glikolipidach (50—52) jak i w glikoproteinach (53, 155—162) błon erytrocytarnych. Funkcja biologiczna antygenów heteropolisacharydowych systemu ABO(H) jest jak dotychczas nieznaną. Antygeny heteropolisacharydowe stanowią dogodny model do badań, zarówno dotyczących ich struktury jak też genetyki enzymów biorących udział w ich syntezie.

Badania nad dziedziczeniem grup krwi u ludzi wykazały, że w regulacji dziedziczenia grup krwi uczestniczą geny, występujące w czterech niezależnych loci: ABO Lele, Hh, i Sese (163). Specyficzna struktura łańcucha węglowodanowego od której zależy grupa krwi, jest wynikiem występowania lub braku u ludzi enzymów odpowiedzialnych za przyłączenie ostatniej, immunologicznie czynnej reszty cukrowej do oligosacharydowego łańcucha prekursorowego o strukturze wspólnej dla wszystkich



Rycina 9. Schemat biosyntezy oligosacharydów serologicznie czynnych (na podstawie (133)).

grup (Rycina 9). W badaniach biosyntezy oligosacharydów serologicznie czynnych zastosowano zarówno niskocząsteczkowe akceptory oligosacharydowe, jak też powierzchniowe akceptory erytrocytów grup 0. Badania ostatnich dziesięciu lat wyjaśniły, w jaki sposób przebiega synteza oligosacharydów aktywnych grupowo (Rycina 9) Locus ABO warunkuje występowanie dwu enzymów: N-acetylogalaktozyloamina transferzy uzależnionej od genu A (164—168) i galaktozylo transferazy uzależnionej od genu B (169—172). Oba enzymy przenoszą odpowiedni monocukier na galaktozę tworząc wiązanie  $\alpha 1 \rightarrow 3$ . Trzeci gen w locus ABO, gen 0 jest nieaktywny i nie determinuje występowania glikozylotransferazy. Locus Le warunkuje występowanie fukozylotransferazy, uzależnionej od genu Le, która przenosi fukozę na N-acetyloglukozoaminę tworząc wiązanie  $\alpha 1 \rightarrow 4$  (173—174). Gen le jest nieaktywny. Locus Hh odpowiada za występowanie drugiej fukozylotransferazy, która katalizuje przeniesienie fukozy na galaktozę tworząc wiązanie  $\alpha 1 \rightarrow 2$  (173—179). Allel genu H, gen ha jest nieaktywny. Locus Sese nie determinuje występowania glikozylotransferaz, ale jest niezbędny (na nieznaną dotychczas drodze) do wyrażenia się genu H poprzez występowanie odpowiedniej fukozylotransferazy. Występowanie lub brak fukozylotransferazy uzależnionej od genu H, uzależnia syntezę glikoprotein o aktywności A, B lub H, w gruczołach wydzielniczych. 80% populacji ludzkiej posiada gen Se i należy tym samym do wydzielaczy. Pozostałe 20% populacji to niewydzielacze posiadający gen sese. Glikozylotransferazy, których występowanie zależy od genów determinujących grupy krwi, biorą udział w syntezie łańcuchów oligosacharydowych zarówno w glikolipidach jak i glikoproteinach (133). Jako przykład można wymienić N-acetylogalaktozyloamino transferazę, która katalizuje syntezę wiązania GalNAc $\alpha 1 \rightarrow 3$  Gal. U ludzi z grupą krwi A, taka sekwencja cukrów występuje w glikolipidach, w glikoproteinach i w wolnych oligosacharydach występujących w mleku i moczu (133). Cukry o takiej strukturze nie występują u ludzi z grupą krwi O lub B. Ponieważ od genu A zależy występowanie jednej glikozylotransferazy wobec tego, enzym ten bierze udział w syntezie wiązania GalNAc $\alpha 1 \rightarrow 3$  Gal zarówno w glikolipidach, glikoproteinach jak i w wolnych oligosacharydach.

## VI. Uwagi końcowe

Wzrost zainteresowania glikokoniugatami powierzchniowymi datuje się od momentu, gdy zauważono, że w skład plazmolemy komórek nowotworowych wchodzi glikolipidy i glikoproteiny o innej strukturze, niż plazmolema komórek prawidłowych. Udoskonalone w ostatnich latach techniki badawcze pozwoliły na identyfikację wielu nowych struktur związków cukrowych. Coraz częściej spotyka się sugestie (180), że związki

cukrowe mogą być nośnikami biologicznej specyficzności w sensie ogólnym, podobnie jak to ma miejsce w wypadku kwasów nukleinowych. Wynika to między innymi z obserwacji, że oligosacharydy o analogicznej strukturze występują zarówno u zwierząt, roślin, mikroorganizmów i wirusów. Biologiczna specyficzność glikokoniugatów zależy prawdopodobnie od czynników takich jak: liczba bocznych łańcuchów cukrowych przyłączonych do części rdzeniowej oligosacharydu oraz liczba, rodzaj wiązania i położenie cząsteczek kwasu sjałowego i fukozy (180). Związki cukrowe plazmolemy, które są połączone z białkami wiązaniem O-glikozydowym, prawdopodobnie ochraniają białka przed działaniem enzymów proteolitycznych. Natomiast glikokoniugaty o typie budowy N-acetylolaktozamininy mają być może zdolność rozpoznawania sygnałów ze środowiska (180). Nie jest jednak jasne, czy glikokoniugaty plazmolemy uczestniczą w systemie informacyjnym, przenoszącym do wewnątrz komórki sygnały z otoczenia.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Sawicka T., Piasek A., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 275—289.
2. Shur B. D., Roth S., (1975) *Biochem. Biophys. Acta*, **415**, 475—512.
3. Edelman G. M., (1970), *Science*, **192**, 218—226.
4. Jamieson G. S., Greenwalt T. J., red., (1971), *Glycoproteins of blood cells and plasma*, Lippincott J. B., Co.
5. Hughes R. C., (1976), *Membrane Glycoproteins*, Butterworth & Co Publishers LTD.,
6. Harmon R. E., red., (1978), *Cell Surface Carbohydrate Chemistry*. Acad. Press., New York San Francisco London.
7. Stoddart R. W., (1979), *Biol. Rev.*, **54**, 199—234.
8. Bosmann H. B., (1972), *Int. Rev. Cytol.*, **50**, 1—23.
9. Maslow D. E., (1976), w: *The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development.*, red.: Poste C., Nicolson G. L., North-Holland Pub., Co., 667—734.
10. Roseman S., (1974), w: *The Cell Surface in Development.*, red.: Moscona A. A., str. 255—271.
11. Roseman S., (1970), *Chem. Physiol. Lipids.*, **5**, 270—297.
12. Leblond C. P., Clegg R. E., Eidinger D., (1957), *J. Histochem. Cytochem.*, **5**, 445—458.
13. Emmelot P., Bos C. J., Benedetti E. L., Rumke P., (1964), *Biochim. Biophys. Acta.*, **90**, 126—145.
14. Gurd J. W., Evans W. H., (1976), *Can J. Biochem.*, **54**, 477—480.
15. Zvilichovsky B., Gallop P. M., Blumenfeld O., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1234—1243.
16. Marchesi V. T., Andrews E. P., (1971), *Science*, **174**, 1247—1248.
17. Lotan R., Nicolson G. L., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 328—373.
18. Hubbard A. L., Cohn Z. A., (1972), *J. Cell. Biol.*, **55**, 390—405.
19. Bretscher M. S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 775—781.
20. Strecker G., Montreuil J., (1979), *Biochimie*, **61**, 1199—1246.
21. Leloir L., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 1—37.
22. Palamarczyk G., (1978), *Post. Biochem.* **24**, 443—460.
23. Li E., Tabas I., Kernfeld S., (1978). *J. Biol. Chem.* **253**, 7762—7770.

24. Kornfeld S., Li E., Tabas J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7771—7778.
25. Strous G.J.A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2694—2698.
26. Bennett G., Leblond C. P., Haddad A., (1974), *J. Cell Biol.*, **60**, 258—284.
27. Merritt W. M., Morre D. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 397—407.
28. Baumann H., (1979), *J. Supramol. Structure*, **12**, 151—164.
29. Evans W. H., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 27—64.
30. Singar S. J., Nicolson G. L., (1972) *Science*, **175**, 720—731.
31. Danielli J. F., Davson H., (1934), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **5**, 495—508.
32. Winzler R. J., (1970), *Int. Rev. Cytol.*, **23**, 77—126.
33. Morawiecki A., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 339—347.
34. Morawiecki A., Wnuk W., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 680—683.
35. Lisowska E., (1969), *Eur. J. Biochem*, **10**, 574—579.
36. Thomas D. B., Winzler R. J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5943—5946.
37. Huttunen J. K., (1966), *Ann. Med. exp. Fenn.*, **44**, Suppl, 12, 5—55.
38. Kornfeld R., Kornfeld R., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2536—2545.
39. Kornfeld R., Kornfeld S., (1976). *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 217—237.
40. Marchesi V. T., Furthmayer H., Temita M., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 667—668.
41. Marchesi V. T., Tillack T. W., Jackson R. L., Segrest J. P., Scott R. E., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 1445—1449.
42. Temita M., Marchesi V. T., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2964—2968.
43. Lisowska E., Waśniowska K, (1978), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 247—252.
44. Allan D., Auger J., Crumpton M. J., (1972) *Nature Lond.*, **236**, 23—25.
45. Hayman M. J., Crumpton M. J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 923—971.
46. Marchalonis J. J., Cone R. E., Atwell J. L., (1972), *J. exp. Med.* **135**, 956—971.
47. Roelants G. E., Ryden A., (1974), *Nature*, **247**, 104—106.
48. Johnson I., Clamp J. R., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 739—745.
49. Czartoryska B., (1971) *Post. Biochem.*, **17**, 3—25.
50. Gardas A., (1978) *Post. Biochem.*, **24**, 309—331.
51. Hakomori S. I., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **417**, 55—89.
52. Kościelak J., Miller-Podraza H., Krauze R., Piasek AK, (1976), *Eur J. Biochem.*, **71**, 9—18.
53. Watkins W. M., (1972), w: *Glycoproteins*, 830—886. wyd.: Gettschalk, Elsevier, Amsterdam, London, New York.,
54. Krusius T., Finne J., Rauvala H., (1978), *Eur J. Biochem.*, **92**, 289—300.
55. Beyert T. A., Hill L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5373—5379.
56. Jeżewska M., Sawicka T., (1966), *Post. Biochem.*, **12**, 113—126.
57. Munch-Petersen A., Kalckar H. M., Cutolo E., Smith E. B., (1953), *Nature*, **172**, 1037—1040.
58. Sawicka T., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 37—47.
59. Van Dijk W., Ferwerda W., Van Den Eijnden D. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 162—175.
60. Sawicka T., Chojnacki T., (1969), *Clin. Chim. Acta*, **23**, 463—468.
61. Kalckar H. M., Ulrey D., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2502—2508.
62. Okamoto Y., Akamatsu N., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **498**, 272—281.

63. Akamatsu N., Okamoto Y., Hasagawa T., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **542**, 21—27.
64. Akamatsu N., Okamoto Y., Hasagawa T., (1979), Proc. Fifth Intern. Symp. on Glycoconjugates., Kiel, FRG, Georg Thieme Pub. Stuttgart 252—253.
65. Spik G., Si P., Bouquelet S., Sawicka T., Montreuil J., (1979) Glycoconjugates Research, red.: J. D. Gregory, R. W. Jeanloz., 1, str. 933—936, Acad. Press., New York.
66. Decker K., Bischoff E., (1972), *FEBS Letters*, **21**, 95—98.
67. Spik G., Six P., Montreuil J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **584**, 203—215.
68. Abaey E. R., Evans W. H., Parkhaus R. M. E., (1978), *Biochem. J.*, **153**—159.
69. Evans W. H., (1974), *Nature*, **250**, 391—396.
70. Touster O., Aronson N. N., Dulaney. J. T., Hendrickson H., (1970) *J. Cell. Biol.*, **47**, 604—697.
71. Sawicka T., (1980), *Post. Biol. Kom.*, **7**, 1—18.
72. Cacan R., Verbert A., Montreuil J., (1976), *FEBS Letters*, **63**, 102—106.
73. Sela B., Sachs L., (1973), *FEBS Letters*, **30**, 100—106.
74. Sawicka T., Grzelak-Puczyńska I., Sawicki W., Bagdasarian M., (1979), *Folia Histochem. Cytochem.*, **17**, 327—334.
75. Chow Y. M., Gutman H. R., Potter A. H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **585**, 154—263.
76. Sawicka T., (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, **30**, 561—567.
77. Neufeld E., Pastan I., (1978), *Arch. Biochem., Biophys.*, **188**, 323—327
78. Pouysegur J. M., Pastan J., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, **73**, 544—548.
79. Poussegur J. M., Pastan J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1639—1646.
80. Brady S., Tatum E. L., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 926—929.
81. Scott W. A., Tatum E. L., (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 515—518.
82. Chojnacki T., Paszewski A., Sawicka T., (1969), *Acta Biochim. Pol. Polon.* **16**, 185—192.
83. Chojnacki T., Sawicka T., Korzybski T., (1968), *Acta Biochim. Polon.*, **15**, 293—298.
84. Sawicka T., Bagdasarian M., (1976), *Bull. Acad. Polon., Sci. Ser. Biol.*, **24**, 441—444.
85. Chapman A., Trowbridge I., Hyman R., Kornfeld S., (1979), *Cell*, **17**, 502—515.
86. Kornfeld S., Tabas I., Michael M., Chapman A., (1979), Proc. Fifth Inter. Symp. on Glycoconjugates., Kiel, FRG, 309—310.
87. Schachter H., Harpez N., Narasihman S., Williams D., Longmore G., (1979), Pro. Fifth Inter. Symp. on Glycoconjugates, Kiel. FRG, 305—306, Georg Thieme Pub. Stuttgart.
88. Schachter H., McGuire E. J., Roseman S., (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 5321—5328.
89. Harpez N., Schachter H., (1979), Proc. Fifth Inter. Symp. on Glycoconjugates, Kiel. FRG, 307—311, Georg Thieme Pub. Stuttgart.
90. Klenk H. D., Lohmayer J., (1979), Proc. Fifth Inter. Symp. on Glycoconjugates, Kiel. FRG, 310—311, Georg Thieme Pub. Stuttgart.
91. Edwards E., Fleischer B., Dryburgh H., Fleischer S., Schreiber I (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 310—314.

92. Bergeron J. J., Ehrenreich J. H., Dsiekievith P., Palade G., (1973), *J. Cell. Biol.*, **59**, 73—88.
93. Ehrenreich J. H., Bergeron J. J. M., Siekevitz P., Palade G. E., (1973), *J. Cell Biol.*, **59**, 45—72.
94. Coleman R., Bell R. M., (1978), *J. Cell. Biol.*, **76**, 245—253.
95. Bretz R., Staubl W., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **77**, 181—192.
96. Ronzio R. A., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 777—784.
97. Chaboud O., Bouchilloux S., Ronin C., Ferrand M., (1974), *Biochimie* **56**, 119—130.
98. Cunningham W. P., Mollenhauer H. H., Nyquist S. R., (1971), *J. Cell Biol.*, **51**, 273—285.
99. Letts P. J., Hunt R. C., Shirley M. A., Pinteric L., Schachter H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **641**, 59—75.
100. Letts P. J., Pinteric L., Schachter H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **372**, 304—320.
101. Roth S., McGuire E. J., Roseman S., (1971), *J. Cell Biol.*, **51**, 536—547.
102. Roth S., White D., (1952), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **69**, 485—489.
103. Bosmann H. B., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 523—529.
104. Bosmann H. B., Lockwood T., Meyer H. R., (1974), *Exp. Cell. Res.*, **83**, 25—30.
105. Bosmann H. B., Bieber G. F., Brown A. E., Case K. R., Gersten D. M., Kimmerer T. W., Lione A., (1973) *Nature*, **246**, 487—489.
106. Fleischer B., Fleischer S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 301—308.
107. Bosmann H. B., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **339**, 438—441.
108. Lamont J. T., Perrotto J. L., Weiser M., Isselbacher K. J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1086—1090.
109. Olsson I., Gardell S., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 203—213.
110. Keenan T. W., Morre D. J., (1975), *FEBS Letters*, **55**, 8—13.
111. Deppert W., Walter G., (1978), *J. Supramol. Structure*, **8**, 19—36.
112. Anderson G. N., Erichson L. C., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **670**, 239—248.
113. Appelkvist E., Bergan A., Dahlner G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **512**, 11—222.
114. Van Der Wonde W. J., Morre D. J., Bracker C. E., (1971), *J. Cell. Sci.* **8**, 331—351.
115. Van Der Wonde W. J., Lambi C. A., Morre D. J., Kindinger J. I., Ordin L., (1974), *Plant. Physiol.*, **64**, 333—340.
116. Schauer M. G., Lenarz W. J., Sweely C., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **59**, 1313—1320.
117. Ruiz-Herrera J., Bartnicki-Garcia S., (1974), *Science* **186**, 357—359.
118. Hagopian A., Bosmann H. B., Weylar E. H., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 337—396.
119. Brophy P. J., Burbach P., Al Nelemens S., Westerman J., Writz K., Van Deenen L. L. M., (1978) *Biochem. J.*, **147**, 413—420.
120. De Pierre J. W., Ernster L., (1977), *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 201—202.
121. Keenan T. W., Morre D. J., Basu S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 310—315.
122. Jelsema C. L., Morre J. D., (1978), *J. Biol. Chem*, **253**, 7960—7971.
123. Waechter C. J., Lennarz W. J., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 95—112.
124. Spiro M. J., Spiro R. G., Bhojroo V. D., (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 6400—6408.

125. Robbins P. W., Hubbard S. C., Turco S. J., Wirth D. F., (1977), *Cell*, 889—900.
126. Patt L. M., Grimes W. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4157—4165.
127. Pascaud A., Auliac P., Pascaud P., (1980), *Biochimie*, **61**, 1065—1071.
128. Chan K. M., Neuhaus O. W., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 333—341.
129. Merre D. J., (1977), w: *Cell Surface Reviews*, red.: Poste G., Nicolson G. L., 4, 1—83, Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
130. Evans W. H., Gurd J. W., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 615—624.
131. Strous G. J. A., Kramer M. F., (1979), *Proc. Fifth. Intern. Symp. on Glycoconjugates*, Kiel. FRG., 324—325, Georg Thieme pub. Stuttgart.
132. Kreisel W., Volk B. A., Buchsel R., Reutter W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1828—1831.
133. Ginsburg V., Hickey C., Kobata A., Sawicka T., (1971), *Biochemical basis for blood types in man*, w: *Glycoproteins of Blood Cells and plasma*, red.: G. A. Jamieson, T. J. Greenwalt., wyd.: B. Lippincott Co., Philadelphia, 114—126.
134. Paulson J. C., Beranek W. E., Hill R. L., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 235—2362.
135. Paulson J. C., Bearick J. I., Hill R. L., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 2363—2371.
136. Beyer T. A., Pricels J. F., Hill R. L., (1979), *Glycoconjugates Res.*, wyd.: Jeanloz R. W., Academic Press, New York.
137. Paulson J. C., Prieals J. F., Glasgow L. R., Hill R. L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5617—5624.
138. Sadler J. E., Paulson J. C., Hill R. L., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 2112—2119.
139. Paulson J. C., Sadler E. J., Hill R. L., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 2120—2124.
140. Beyer T. A., Rearick J. J., Paulson J. C., Prieels J. P., Sadler J. E., Hill R. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 12531—12541.
141. Longmore C., (1979), *Proc. Fifth Intern. Symp. on Glycoconjugates*, Kiel. FRG, 305—306, Georg Thieme Pub., Stuttgart.
142. Datema R., Schwartz T. R., (1978), *Eur. J. Biochem*, **90**, 505—516.
143. Mookerjea S., Young J. W. M., (1975), *Arch. Biochem, Biophys.*, **166**, 223—236.
144. Geran L. M., Ebner K. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 14—21.
145. Czartoryska B., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 22—36.
146. Grzelakowska-Sztabert B., (1973), *Post. Biochem.*, **20**, 3—22.
147. Cumar F. A., Brady R. O., Kolodny E. H., McFarland Y. W., Mora P. T., (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 757—764.
148. Nigram V. N., Lallier R., Brailowski C., (1973), *J. Cell. Biol.*, **58**, 307—316.
149. Taki T., Hirabayashi Y., Suzuki Y., Matsumoto M., Kojima K., (1978), *J. Biochem.*, **250**, 55—60.
150. Taki T., Hirabayashi Y., Matsumoto M., Kojima K., (1979), *Biochim. Biophys. Acta.*, **572**, 105—112.
151. Taki T., Hirabayashi Y., Ishiwita Y., Matsumoto M., Kojima K., (1979) *Biochim. Biophys. Acta.*, **572**, 1113—120.
152. Chatterjee S., Sweeley C. C., Velicour L. F. (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 585—590.



153. Gammberg C. G., Hakomori S. I., (1974), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 283—291.
154. Watannabe K., Laine R. A., Hakomori S., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2725—2732.
155. Dejter-Juszyński M., Harpaz N., Flowers H. M., Sharon N., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **83**, 363—373.
156. Akiyama Y., Osawa T., (1972), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 323—331.
157. Hamaguchi H., Cleve H., (1972), *Biochim. Biophys. Acta.*, **275**, 271—280.
158. Finne J., Krusius T., Rauvala H., Kekomaki R., Myllyla G., (1978) *FEBS Letters*, **89**, 111—115.
159. Jarnefelt J., Ruch J., Li Y-T., Laine R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8006—8009.
160. Takasaki S., Kobata A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3610—3615.
161. Takasaki S., Yamashita K., Kobata A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6086—6091.
162. Finne J., (1980), *Eur. J. Biochem.* **104**, 181—189.
163. Watkins W. M., Morgan W. T. J., (1959), *Vox Sanguinis*, **4**, 97—106.
164. Kobata A., Grellman E. F., Ginsburg V., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 609—612.
165. Sawicka T., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 346—348.
166. Kim Y. S., Perdomo J., Bella A., Nordberg J., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1753—1756.
167. Schachter H., Michaelis M. A., Tilley C. A., Crookston M. C., Crookston J. H., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 220—224.
168. Greenwell P., Yates A. D., Watking W. M., (1979), Proc. Fifth Intern. Symp. on Glycoconjugates, Kiel. FRG, 268—269, Georg Thieme Pub., Stuttgart.
169. Kobata A., Grollman E. F., Ginsburg V., (1968), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 272—277.
170. Race C., Ziderman D., Watkins W. M., (1968), *Biochem. J.*, **107**, 778—786.
171. Carne L. R., Watkins W. M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 700—707.
172. Nagai M., Dave V., Muensh H., Yoshida A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 386—391.
173. Grollman E. F., Kobata A., Ginsburg V., (1969), *J. Clin. Invest.* **48**, 348—351.
174. Jarkowsky M., Marcus D. M., Grollman A. P., (1970), *Biochemistry* **9**, 1123—1125.
175. Munro J. R., Schachter H., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 534—537.
176. Ahen L., Grollman E. F., Ginsburg V., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 224—227.
177. Schenkel-Brunner H., Chester M. A., Watkins W. M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 269—277.
178. Chester M. A., Yates A. D., Watkins W. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 583—592.
179. Pacuszka T., Kościelak J., (1974), *FEBS Letters*, **41**, 348—351.
180. Montreuil J., (1979), Proc. Fifth. Intern. Symp. on Glycoconjugates, Kiel, FRG, 716—717, Georg Thieme pub. Stuttgart.

**Tertius Decimus Congressus  
Societatis Polonicae Historiae Artis Medicae  
Katowice MCMLXXXII**

Uprzejmie informujemy, że w dniach 17—18 września 1982 r. odbędzie się w Katowicach XIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Historii Medycyny. Zjazd stanowić ma przegląd działalności historyków medycyny, farmacji i dyscyplin pokrewnych oraz stać się ma spotkaniem miłośników dziejów służby zdrowia.

Tematy zjazdu:

1. Polska myśl medyczna w organizacji i ochronie zdrowia w środowisku przemysłowym (w tym sesje: a) Bionegatywne warunki środowiska pracy w XIX i XX w.; b) Rozwój organizacji ochrony zdrowia; c) Instytucje opieki zdrowotnej w przemyśle — inspekcja lekarska, ubezpieczenia; d) Naukowa, społeczna i polityczna rola środowiska medycznego w miastach i okręgach przemysłowych).
2. Varia

Szczegółowe informacje o programie i warunkach uczestnictwa zostaną rozesłane do wszystkich zainteresowanych, którzy do dnia 31 grudnia 1981 r. nadesłają zgłoszenie udziału. Zgłoszenia oraz streszczenia komunikatów (o objętości 1 strony maszynopisu) a także wszelką korespondencję prosimy kierować na adres komitetu organizacyjnego: XIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Historii Medycyny, Komitet Organizacyjny, Apteka Nr 1 „Pod Orłem”, ul. Warszawska 6, 40-006 Katowice.

Przewodniczący Komitetu  
Organizacyjnego  
E. Kucharz

JANINA ANDRZEJCZUK-HYBEL \*)

## Roślinne i bakteryjne inhibitory enzymów amylolitycznych

### Plant and Microbial Inhibitors of Amylolytic Enzymes

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Występowanie, sposoby izolowania, budowa chemiczna i właściwości inhibitorów amylaz
  - II-1. Inhibitory wyizolowane z pszenicy
    - II-1.1. Inhibitory o charakterze albumin
    - II-1.2. Inhibitor o charakterze gliadyny
    - II-1.3. Swoistość i mechanizm działania
    - II-1.4. Rola fizjologiczna inhibitorów albuminowych
  - II-2. Inhibitor z nasion fasoli
  - II-3. Inhibitory z mikroorganizmów
  - II-4. Kwas mezoinozytolo-sześciofosforowy (MHP)
- III. Fizjologiczne i żywieniowe znaczenie inhibitorów enzymów amylolitycznych
- IV. Zastosowania

#### Contents

- I. Introduction
- II. Occurrence, isolation, chemical structure and properties of inhibitors of amylolytic enzymes
  - II-1. Inhibitors from wheat
    - II-1.1. Albumin type inhibitors
    - II-1.2. Gliadyn type inhibitor
    - II-1.3. Specificity and mechanism of action
    - II-1.4. Physiological role of albumin type inhibitor
  - II-2. Bean inhibitor
  - II-3. Microbial inhibitors
  - II-4. Myoinositol hexaphosphate (MHP)
- III. Physiological and nutritional significance of amylolytic enzyme inhibitors
- IV. Applications

\*) Dr, Zakład Biochemii SGGW-AR, 02-528 Warszawa ul. Rakowiecka 26/30

## I. Wprowadzenie

Początek badań nad naturalnymi czynnikami antyamylolytycznymi datuje się od 1933 r., kiedy to Chrzęszcz i Janicki stwierdzili w nasionach gryki i słodzie obecność termolabilnych, nierozpuszczalnych w wodzie związków hamujących działanie niektórych  $\alpha$ -amylaz (E.C. 3.2.1.1.) (1-2). Obecnie wiadomo, że związki te występują powszechnie w świecie roślin (3-7) a także w drobnoustrojach (8-13). Rola fizjologiczna inhibitorów enzymów amylolytycznych nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Przypuszcza się, że niektóre z nich mają duże znaczenie w procesie kiełkowania i dojrzewania nasion, w których występują (6, 14, 15). Wydaje się jednak, że główna rola biologiczna inhibitorów polega na ochronie nasion rośliny przed szkodnikami takimi jak gryzonie i owady (3, 4). Szkodniki bowiem nie trawią ziarna o wysokim poziomie inhibitorów (16-18).

Inhibitorom enzymów amylolytycznych poświęca się ostatnio dużo uwagi, ze względu na możliwość ich wpływu na wartość żywieniową (19-22) i strawność pokarmów skrobiowych (23-25).

## II. Występowanie, sposoby izolowania, budowa chemiczna i właściwości inhibitorów amylaz

Inhibitory enzymów amylolytycznych występują w wielu roślinach, głównie w nasionach lub w innych organach zapasowych (3, 26-27). Drobnoustroje, w których stwierdzono zdolność wytwarzania inhibitorów amylaz, wydzielają te substancje do podłoża hodowlanego (10.) Materiały z których wyizolowano przebadane substancje hamujące aktywność amylaz wliczono w Tabeli 1.

Inhibitory amylaz stanowią substancje zróżnicowane pod względem natury chemicznej. Są to związki niskocząsteczkowe lub białka.

Do niskocząsteczkowych inhibitorów amylaz zaliczamy kwas salicylowy (26), kwas abscyzynowy (28-29), kwas mezoinozytolo-sześcioletowy (MHP) (6), 5-amino-5-dezoksy glukopiranozę (ang. „Nojirimycin”) (30), peptydy (8) i oligocukry (9), oraz niektóre pochodne oligocukrów (31).

Inhibitory białkowe amylaz występują w pszenicy i w innych blisko spokrewnionych roślinach, takich jak żyto (16) i owies (32), a także w niektórych innych roślinach takich na przykład jak fasola (33), *Colocasia esculenta* z rodziny obrazkowatych (34) czy mango (27).

Najdokładniej poznano i przebadano dotychczas inhibitory wyizolowane z nasion pszenicy (35-42) i fasoli (43-45); dość dokładnie, choć stosunkowo niedawno, poznano inhibitory amylaz pochodzące z mikroorganizmów (10-13).

Tabela I

Występowanie naturalnych inhibitorów amylaz

Źródło inhibitora	Charakter chemiczny	Piśmiennictwo
Nasiona gryki, słód	białko	1,2
Nasiona owsa	białko	32
Bulwy ziemniaka	substancja niebiałkowa	26
Nasiona dębu	substancja niezidentyfikowana	3
Ziarno pszenicy	białko	4-6, 17, 21, 35
Nasiona fasoli	białko	7, 43, 33
Nasiona sorgo	substancja typu taniny	58
Ziarno żyta	białko	3, 16
Owoce mango	białko	27
<i>Colocasia esculenta</i> (roślina z rodziny obrazkowatych)	białko	34
<i>Streptomyces diastaticus</i> (bakteria)	N-pochodna oligocukru	8-11, 13
<i>Actinoplanes</i> (bakteria)	pochodne oligocukrów	12, 31
<i>Ampullariella</i> (bakteria)		
<i>Streptosporangium</i> (bakteria)		

## II-1. Inhibitory wyizolowane z pszenicy

Kneen i Sandstedt w 1943 roku (35) pierwsi stwierdzili obecność inhibitora amylazy w ziarnie pszenicy i zaobserwowali, że występuje on przede wszystkim w endospermie. Dotychczas nie znaleziono inhibitorów amylaz w innych organach tej rośliny. Obserwacje Kneena i Sandstedta zostały potwierdzone w pracach mikroskopowych (46), oraz oznaczeniami zawartości inhibitora w różnych częściach ziarna (47). Z badań tych wynika, że występowanie inhibitora jest ściśle związane z miejscem występowania skrobi.

Synteza inhibitorów zaczyna się równocześnie z rozwojem ziarna, około 8-go dnia po zapyleniu, a jej intensywność szybko wzrasta wraz z dojrzewaniem; maksymalna zawartość cechuje ziarno dojrzałe (46-47). Zawartość inhibitorów szybko spada po skielkowaniu ziarna (47).

### II-1.1. Inhibitory o charakterze albumin

Już w pierwszych pracach Kneena i wsp. (35, 48-50) ustalono, że inhibitor  $\alpha$ -amylazy wyizolowany z mąki pszennej jest białkiem. Inhibitor uzyskany przez ekstrakcję mąki pszennej wodą lub rozcieńczonym etanolem, a następnie wytrącony siarczanem amonowym lub etanolem szybko inaktywował się po potraktowaniu ficyną i pepsyną. Ponadto nie diali-

zował oraz był wrażliwy na działanie czynników utleniających i redukujących. Już w tych wczesnych pracach stwierdzono, że preparaty inhibitorów nie są jednorodne.

Dwa białkowe inhibitory nazwane  $Aml_1$  i  $Aml_2$  otrzymano przez ekstrakcję wodą zmielonych ziarn pszenicy, następnie frakcjonowanie siarczanem amonowym i rozdział metodą chromatografii jonowymiennej na kolumnie z DEAE-celulozy (21). Białka  $Aml_1$  i  $Aml_2$  okazały się elektroforetycznie jednorodne, ale różniły się swoistością w stosunku do  $\alpha$ -amylazy z różnych źródeł (Tabela 2), oraz ciężarem cząsteczkowym i składem aminokwasowym (Tabela 3).

Tabela 2

Hamowanie  $\alpha$ -amylazy różnego pochodzenia przez inhibitory z pszenicy

Źródło $\alpha$ -amylazy	Rodzaj inhibitora					
	$Aml_1$ (21)	$Aml_2$ (21)	Inhibitor I (36)	Inhibitor II (36)	0,19 (37)	0,28 (37)
Ślina ludzka	—	+	+	nb	+	—
Trzustka kurcząt	nb	nb	+	+	+	—
Owady	+	+	nb	nb	+	+
Ziarno pszenicy	—	—	nb	nb	—	—
<i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	nb	nb	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—	nb	nb	—	—

w nawiasach podano piśmiennictwo

+ — hamowanie wykazano

— — hamowania nie stwierdzano

nb — hamowania nie badano

Z wodnego ekstraktu z mąki pszennej po rozdziale na kolumnie z DEAE-Sephadex otrzymano dwa inhibitory  $\alpha$ -amylazy nazwane inhibitorem I i II (36). Białka I i II miały identyczne ciężary cząsteczkowe i aktywność inhibitorową, lecz różniły się ruchliwością elektroforetyczną.

Z typowych albumin mąki pszennej przez rozdział na kolumnie z DEAE-celulozy, oraz metodą preparatywnej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym wyizolowano grupę inhibitorów, oznaczoną symbolem 0,19 od ruchliwości elektroforetycznej głównego składnika (37, 42, 51). Białko o charakterze inhibitora  $\alpha$ -amylazy prawie identyczne z inhibitorem 0,19 wyizolowano także ze zmielonych ziarn pszenicy (52).

Białka  $Aml_2$ , I i 0,19 wykazywały podobną swoistość inhibitorową (Tabela 2), prawie identyczny skład aminokwasowy oraz zbliżone ciężary cząsteczkowe (Tabela 3). Inhibitory I, 0,19 i II różniły się między sobą ruchliwością elektroforetyczną, a inhibitor  $Aml_2$  wykazywał znacznie wyższy  $pI$  niż to ustalono dla inhibitora 0,19 (36). Wyżej omówione dane, a także wcześniejsze (38, 53) pozwalają wnioskować, że ziarno pszenicy

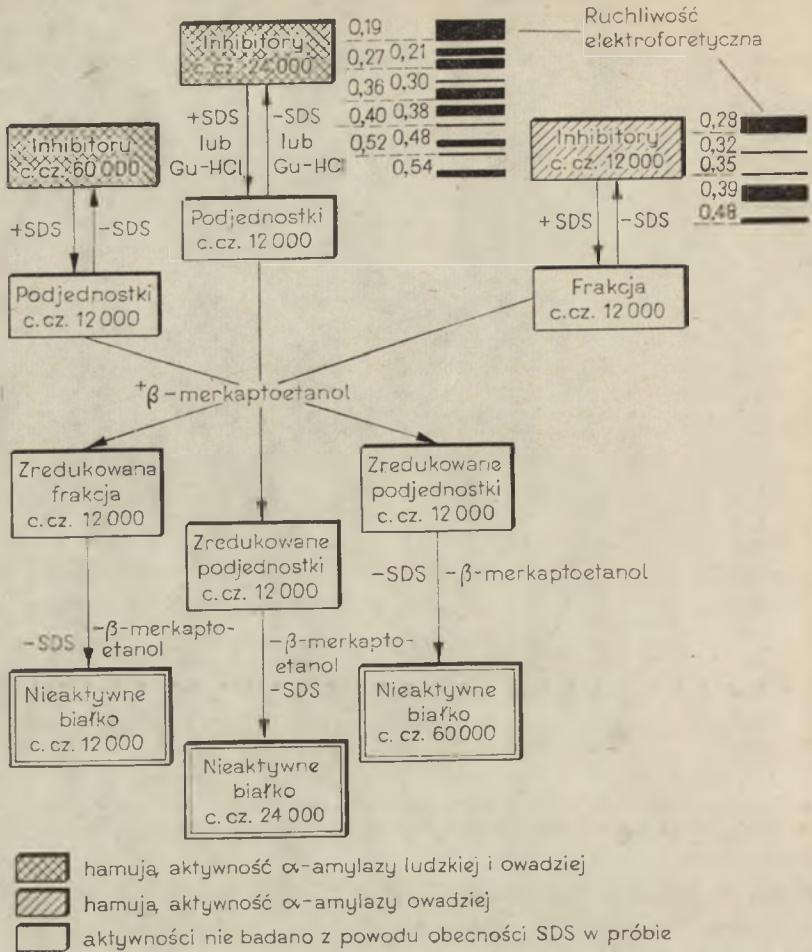
Tabela 3

Skład aminokwasowy i ciężary cząsteczkowe niektórych inhibitorów wyizolowanych z pszenicy

Nazwa inhibitora	AmI <sub>1</sub>	0,28	0,19	AmI <sub>2</sub>	Inhibitor I
Ciężar cząsteczkowy	18 000	12 000	24 000	26 000	25 000
Pišmiennictwo	(21)	(37)	(51)	(21)	(36)
Aminokwasy w %/mol					
Lys	5,2	5,0	2,6	2,5	2,8
His	ślady	ślady	1,6	1,4	1,4
Arg	6,5	6,4	5,6	6,6	5,4
Asp	7,8	7,5	5,9	6,1	6,4
Thr	1,9	2,7	2,9	2,7	2,8
Ser	7,2	7,3	6,3	5,4	6,7
Glu	8,5	11,4	12,8	10,7	11,6
Pro	9,0	7,6	7,3	8,2	7,7
Gly	9,1	7,8	8,4	8,4	10,4
Ala	9,1	7,8	13,4	13,4	14,9
1/2 Cys	5,7	8,2	6,1	6,9	3,3
Val	12,2	10,8	7,4	7,2	8,4
Met	2,7	2,6	2,0	2,3	2,5
Ile	2,2	1,6	2,4	2,3	2,5
Leu	8,0	8,2	8,3	8,2	8,4
Tyr	3,6	3,3	3,3	4,2	3,6
Phe	ślady	ślady	1,6	1,8	1,6

zawiera cały szereg zbliżonych form białka zdolnych hamować działanie  $\alpha$ -amylazy różnego pochodzenia.

Sugestię o heterogenności inhibitorów z pszenicy potwierdzili De p o n t e i wsp. (5), którzy frakcję albuminową z mąki pszennej uzyskaną po ekstrakcji 0,15 M NaCl oczyścili przez wysalanie siarczanem amonowym w granicach stężeń 0,4-1,8 M. Uzyskali w ten sposób trzy frakcje o ciężarach cząsteczkowych 60 000, 24 000 i 12 000; stanowiły one odpowiednio 51, 40 i 9% całej frakcji albuminowej (Ryc. 1). Frakcja o ciężarze cząsteczkowym 24 000 okazała się wysoce heterogenna, gdyż w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym przy pH 8,5 uległa rozdziałowi na 10 składników (Ryc. 1), wśród których przeważającą większość stanowił inhibitor 0,19. Każdy z wymienionych 10 składników otrzymany metodą elektroforezy preparatywnej aktywnie hamował  $\alpha$ -amylazę śliny ludzkiej i  $\alpha$ -amylazę z mącznika młynarka. Wszystkie składniki inhibitora 0,19 wykazywały podobny skład aminokwasowy oraz podobne przebiegięcia w widmie dichroizmu kołowego badanym w dalekim i bliskim ultrafiolecie (5). Na podstawie analizy widma dichroizmu kołowego w dalekim ultrafiolecie stwierdzono, że białko 0,19 zawiera około 50% struktury uporządkowanej; w tym około 1/3 stanowi  $\alpha$ -struktura i około 1/6  $\beta$ -struktura (42). Jak to już wcześniej wykazano (37), wszystkie składniki inhibitora 0,19 dysocjowały odwracalnie w obecności Gu-HCl lub SDS do dwu



**Rycina 1.** Inhibitory  $\alpha$ -amylazy wyizolowane z ziarna heksaploidalnych pszenic (wg (5) zmodyfikowane).

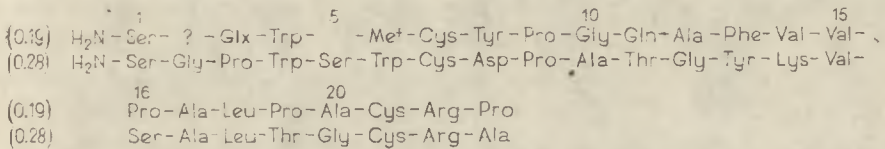
podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 12 000 (Ryc. 1). Po usunięciu czynnika dysocjującego następowała asocjacja i w ultrawirowaniu uzyskiwano pojedynczy szczyt białkowy. Składniki albuminy o ciężarze cząsteczkowym 24 000 stanowią grupę ściśle podobnych izoinhibitorów nazwanych rodziną 0,19 (5) od ruchliwości elektroforetycznej głównego składnika. Wydaje się, że AmI<sub>2</sub> (Shainkin i Birk (21), oraz inhibitor I i II (Saunders i Lang (36)) mogą być składnikami rodziny 0,19. Podobnie na podstawie właściwości fizykochemicznych wnioskuje się, że białko rozpuszczalne w wodzie, wyizolowane przez Fish i Abbot (54) jest zbliżone do rodziny 0,19.

Drugą rodzinę izoinhibitorów występujących w ziarnie pszenicy stanowi frakcja albumin o ciężarze cząsteczkowym 12 000 złożona z pięciu składników (Ryc. 1). Frakcję tę wyizolowano z ziarna pszenic heksaploidalnych (37, 55) i nazwano ją rodziną 0,28 od ruchliwości elektroforetycz-



nej głównego składnika. Na podstawie składu aminokwasowego, ciężaru cząsteczkowego oraz analizy widma dichroizmu kołowego i swoistości inhibitorowej w stosunku do amylaz z różnych źródeł składniki te okazały się grupą bardzo podobnych białek (5, 37, 55-57). Składniki rodziny 0,28 nie są produktami dezamidacji formy 0,28 (21). Jak pokazano w Tabeli 2 i 3 inhibitor 0,28 różni się znacznie od inhibitora 0,19, ale podobny jest do AmI<sub>1</sub> (Shainkin i Birk (21)). Wydaje się, że jeśli AmI<sub>1</sub> nie jest identyczny z 0,28, to jednak należy do tej samej rodziny. W obecności SDS i Gu-HCl ciężar cząsteczkowy inhibitora 0,28 nie ulegał zmianie. Natomiast w obecności SDS lub Gu-HCl i β-merkaptioetanolu wszystkie inhibitorowe białka ulegały redukcji (Ryc. 1) a po usunięciu tych czynników następowała asocjacja, powiązana jednak z utratą zdolności hamowania. Fakt ten potwierdza wcześniej poczynione obserwacje (3, 4), o konieczności występowania w określonym położeniu wiązań S-S dla zachowania właściwości inhibitorowych białek. Utratę tej właściwości, obserwowaną po usunięciu beta merkaptioetanolu, tłumaczy się przypadkowym rozmieszczaniem odtwarzanych wiązań S-S.

Ustalono sekwencję N-końcowego łańcucha peptydowego inhibitorów z pszenicy o symbolach 0,19 (41) i 0,28 (57). N-kończącą resztę w obu białkach stanowi seryna (Ryc. 2). Nie zaobserwowano zasadniczych różnic



**Rycina 2.** N-końcowa sekwencja inhibitorów: 0,19 o ciężarze cząsteczkowym 24 000 i 0,28 o ciężarze cząsteczkowym 12 000 (wg (34) i (57) zmodyfikowane).

w składzie aminokwasowym fragmentu N-końcowego obu białek. W inhibitorze 0,19 stwierdzono obecność 1,7 mola kowalencyjnie związanych cukrów redukujących na 1 mol białka inhibitora, a w inhibitorze 0,28 obecność 0,55 mola cukrów redukujących na 1 mol białka (41). Inhibitory amylaz występujące w ziarnie pszenicy są więc glikoproteinami. Dotychczas najmniej poznano frakcję o ciężarze cząsteczkowym 60 000 (53), zaś zebrane wyniki wskazują, że 80% tej frakcji dysocjuje do podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 12 000 (5). Podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat inhibitorów albuminowych występujących w ziarnie pszenicy stanowi Ryc. 1.

#### II-1.2. Inhibitor o charakterze gliadyny

Inhibitor typu gliadyny wyizolowano z handlowych preparatów gliadyn mąki pszennej (58). Ciężar cząsteczkowy tego białka oznaczony za pomocą chromatografii molekularno-sitowej wynosi 55 000. W elektro-

forezie krążkowej inhibitor wykazywał 2 pasma odpowiadające ruchliwości elektroforetycznej  $\alpha$ -gliadyn. Analiza składu aminokwasowego wykazała wysoką zawartość glutaminy i proliny (około 30<sup>0/0</sup>), a bardzo niską zawartość lizyny (1<sup>0/0</sup>). Dane o występowaniu w ziarnie pszenicy inhibitora typu gliadyny budzą zastrzeżenia (59, 60).

Wielu autorów (38, 42, 63) jest zdania, że białkowe inhibitory  $\alpha$ -amylazy występujące w pszenicy, bardzo liczne, a jednocześnie podobnie zbudowane kodowane są przez geny struktury, pochodzące od wspólnego genu, który uległ mutacjom. Badaniom filogenezy inhibitorów z ziarna pszenicy poświęcono liczne prace (61-63).

#### II-1.3. Swoistość i mechanizm działania

Albuminowe inhibitory z pszenicy hamują działanie amylaz pochodzenia zwierzęcego, w tym także amylazy ludzkiej, oraz amylaz owadzych (5, 21, 36). Nie działają one natomiast na aktywność amylaz z mikroorganizmów i roślin (5, 38, 53); nie hamują także aktywności amylaz wytwarzanych przez organizmy, dla których ziarna pszenicy lub produkty wytwarzane z mąki pszennej nie stanowią pożywienia (40). W obrębie trzech frakcji albuminowych inhibitorów (ciężary cząsteczkowe 60 000, 24 000 i 12 000) obserwowano zróżnicowanie swoistości inhibitorowej. Inhibitory rodziny 0,28 (c. cz. 12 000) hamują tylko działanie amylaz owadzych, nie hamują zaś ani działania  $\alpha$ -amylazy śliny ani trzustki człowieka, oraz wielu innych amylaz pochodzenia zwierzęcego (Tabela 2). Natomiast inhibitory rodziny 0,19 mają znacznie niższą swoistość hamowania, z pośród amylaz wrażliwych na działanie inhibitorów najskuteczniej hamują aktywność amylaz ssaków i ptaków (Tabela 2).

Dla ujawnienia się pełnej zdolności hamowania inhibitorów albuminowych z pszenicy konieczna jest preinkubacja enzymu z inhibitorem w ściśle określonych warunkach, właściwie dobranych zależnie od pochodzenia enzymu i badanego inhibitora (36, 38, 40, 52).

Wykazano, że inhibitory z pszenicy tworzą z amylazami trwale kompleksy, które można wyodrębnić. Inhibitory z grupy 0,19 tworząc kompleks wiążą się z enzymem w stosunku 1:1, a inhibitory z rodziny 0,28 wiążą enzym w stosunku 2:1 (35).

Dotychczas nie wiadomo jaki jest mechanizm wiązania się enzymu z inhibitorem. Wszystkie dotychczas poznane inhibitory hamują amylazy w sposób niewspółzawodniczy (21, 50, 52), co wykazano stosując klasyczne metody badania kinetyki hamowania.

#### II-1.4. Rola fizjologiczna inhibitorów albuminowych

Albuminowe inhibitory amylaz występują w endospermie ziarna pszenicy i wydają się być ściśle zasocjowane z gromadzoną tu skrobią (46-48, 60). Wiadomo (64, 65), że ziarenka skrobi w endospermie otoczone są biał-

kami typu albuminy, które to stanowią substancję cementującą skrobię z białkami zapasowymi typu gliadyny. Jednakże pojedyncze białka otaczające ziarenka skrobi nie zostały dotychczas przebadane na aktywność inhibitorową przeciw  $\alpha$ -amylazie, a o ich identyczności z albuminowymi inhibitorami tego enzymu wnioskuje się na podstawie ruchliwości elektroforetycznej, oraz barwienia z błękitem aniliny (66). Także obserwacja iż oczyszczone inhibitory albuminowe wykazują *in vitro* tendencję do asocjacji z wielocukrami (21, 52) pozwala wnioskować o identyczności białek inhibitorowych z białkami otaczającymi ziarenka skrobi w ziarnie (40).

Na podstawie tych obserwacji przypuszcza się (44, 64), że nieaktywne *in vitro* w stosunku do endogennych amylaz inhibitory z pszenicy, mogą mieć znaczenie podczas dojrzewania ziarna, stanowiąc osłonę przed nadmiernym napływem amylaz do ziarenek skrobi. Ponadto inhibitory albuminowe amylaz są uważane za jeden z czynników odpowiedzialnych za odporność ziarna na działanie gryzoni i owadów (3, 4, 16-17) i mogły mieć swój udział w naturalnej selekcji pszenic (40).

## II-2. Inhibitor z nasion fasoli

Obecność inhibitora  $\alpha$ -amylazy w nasionach fasoli stwierdzono już w 1945 roku (43), ale dopiero Jaffe i wsp. w 1968 oczyścili go częściowo i wstępnie scharakteryzowali (20, 40, 45). Ostatnio oczyszczono inhibitor z nasion fasoli do stanu jednorodności i bliżej zbadano właściwości tego związku (7, 33). Wykazano, że inhibitor z nasion fasoli ma charakter białkowy, a jego ciężar cząsteczkowy ustalono na 43 000 (7, 33, 44). Marshall i wsp. (33) otrzymali z nasion fasoli 32-krotnie oczyszczony inhibitor; jednorodność preparatu wykazano elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym w pH 4, 3. Podobnie zdołano oczyścić inhibitor z nasion fasoli przez zastosowanie frakcjonowanego wytrącania siarczanem amonowym, a następnie dwukrotny rozdział na DEAE-celulozie i sączenie na biożelu P-100 (7). Uzyskany preparat był elektroforetycznie i immunoelektroforetycznie jednorodny (67). Inhibitor z nasion fasoli nazwano faseolaminą (ang. *Phaseolamin*). Wyniki oczyszczania wskazują, że zawartość inhibitora w nasionach fasoli jest wysoka i wynosi 4-5 g/kg ziarna (7, 33). Inhibitor z nasion fasoli w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS ulega dysocjacji na podjednostki o ciężarze cząsteczkowym 15 000, a w obecności Gu-HCl dysocjuje na podjednostki o ciężarze cząsteczkowym 11 000 (7).

Inhibitor z nasion fasoli jest glikoproteiną podobnie jak inhibitory z pszenicy (41); zawiera on około 15% cukrowca (7, 33). Hamuje on swoiście tylko amylazy pochodzenia zwierzęcego, nie działa na aktywność amylazy endogennej ani na inne pochodzenia roślinnego lub z drobno-

ustrojów (tabela 4). Dla ujawnienia się zdolności hamowania niezbędna jest preinkubacja enzymu z inhibitorem. W temperaturze 37°C optymalne pH aktywności inhibitora z fasoli wynosi 5,5 a optymalny czas preinkubacji 30 minut.

Tabela 4

Hamowanie  $\alpha$ -amylaz różnego pochodzenia przez inhibitor z fasoli (33)

Źródło $\alpha$ -amylazy	Hamowanie w %
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0
<i>Aspergillus oryzae</i>	3
Słód	0
Żyto	0
Ślimak	97
Trzustka wieprza	97
Ślina ludzka	94
Trzustka ludzka	100

Na przykładzie  $\alpha$ -amylazy ze śliny ludzkiej i z trzustki wieprza ustalono, że hamowanie przez inhibitor z nasion fasoli jest typu niewspółzawodniczego. Wartość  $K_m$  wyznaczona metodą Lineweaver-Burka (67a) w przypadku  $\alpha$ -amylazy śliny ludzkiej równa się wartości  $K_i$  i wynosi  $6,67 \times 10^{-4}$  M (7,33). Wiadomo, że inhibitor łączy się z enzymem z wytworzeniem trwałego kompleksu, jednak dotychczas nie udało się ustalić jednoznacznie, czy składniki kompleksu łączą się w stosunku 1:1 (33) czy 2:1 (7); nic nie wiadomo na temat grup reaktywnych biorących udział w tworzeniu się takiego kompleksu. Nieznana jest też rola *in vivo* inhibitora w nasionach fasoli. Przypuszcza się, że nie bierze on udziału w regulacji poziomu amylazy w nasionach, ponieważ nie działa na  $\alpha$ -amylazę endogenną. Prawdopodobnie rola inhibitora w nasionach fasoli polega na ich osłonięciu przed rozkładem przez enzymy zwierzęce.

### II-3. Inhibitory z mikroorganizmów

Pierwsze doniesienia o wytwarzaniu przez drobnoustroje substancji hamujących aktywność amylolityczną pochodzą z lat 1970-1973 (8, 30, 31). W 1975 roku Ohyama, Murao i Ogura (9) wyizolowali szczep bakterii *Streptomyces diastaticus subspecies amylostaticus* N° 2476 zdolny do syntezy i wydzielania do środowiska substancji, która hamowała aktywność wielu amylaz (Tabela 5). Substancję tę po wstępnym oczyszczeniu oznaczono symbolem S-AI (9, 13). Przez zastosowanie wielostopniowego

Tabela 5

Oddziaływanie inhibitora S-AI z hydrolazami glikozydowymi  
(wg 11)

Rodzaj i źródło enzymu	pH	Hamowanie
$\alpha$ -amylaza		
bakteryjna upłynniająca	5,5	+
bakteryjna scukrzająca	5,5	+
Taka — amylaza A	5,5	+
<i>Aspergillus niger</i> kwasostabilna	5,5	+
<i>Aspergillus niger</i> kwasolabilna	5,5	+
słodowa	5,5	+
śliny	7,0	+
trzuskowa	7,0	+
$\beta$ -amylaza		
pszenicy	5,5	—
sojowa	5,5	—
ziemniaka	5,5	—
Glukoamylaza		
<i>Rhizopus niveus</i>	5,5	+
$\alpha$ -glukozydaza		
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	7,0	—
Celulaza		
<i>Trichoderma sp.</i>	4,5	—

(+) — hamowanie było rzędu 80 — 100%

(-) — nie stwierdzano hamowania reakcji

sposobu oczyszczania (Tabela 6) uzyskano substancję S-AI oczyszczoną 25-krotnie (11).

Jednorodność inhibitora S-AI potwierdzono metodą chromatografii cienkowarstwowej. Ciężar cząsteczkowy S-AI wynosi około 15 000, wyznaczono go metodą *Andrewa* (68) stosując Sephadex G-15 oraz jako markery — maltozę, maltotetraozę, maltoheksaozę i maltooktaozę. W cząsteczce inhibitora S-AI występuje 8 reszt glukozy; stanowią one 85% jego ciężaru, resztę zaś substancja niezidentyfikowana zawierająca 1 atom azotu, oznaczono ją symbolem S-AI-X. Reszty glukozy połączone są wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi. Inhibitor S-AI swoiście hamuje glukomylazę (E.C. 3.2.1.3) i  $\alpha$ -amylazę różnego pochodzenia, ale nie hamuje działania  $\beta$ -amylazy (E.C. 3.2.1.2) i innych hydrolaz glikozydowych (Tabela 5). S-AI okazał się odporny na działanie temperatury 100°C w zakresie pH od 3 do 11, ale szybko traci aktywność po podziałaniu  $\beta$ -amylazą. Ciężar cząsteczkowy substancji S-AI-X wynosi około 400. Na podstawie przeprowadzonych badań *Murao* i *Ohyama* proponują dla S-AI strukturę podaną na Ryc. 3.

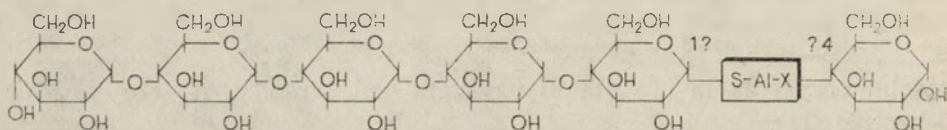
Również z bakterii rodzaju *Actinoplanes* wyizolowano kilka szczepów zdolnych do syntezy i wydzielania do podłoża substancji hamujących aktywność  $\alpha$ -amylazy i innych glikozydaz. Substancje te oczyszczono

Tabela 6

Kolejne etapy oczyszczania inhibitora S-AI (wg 11)

Etapy oczyszczania	Aktywność inhibitora $\times 10^4$ j	Całkowita ilość cukrów w mg	Aktywność właściwa j/mg cukru	Wydajność w %
Płyn wyjściowy	560,0	65 000	86,2	100,0
Adsorpcja na węglu aktywowanym i ekstrakcja etanolem	481,0	35 000	136,4	85,9
Dowex 50 W $\times 2$ (forma $H^+$ )	372,0	10 230	363,6	66,4
Dowex 50 W $\times 2$ (forma $NH_4^+$ )				
F-1	180,0	5 910	304,6	32,1
F-2	173,5	4 536	382,5	30,5
S-AI (F-1)				
Sephadex G-25	175,0	5 250	334,7	31,4
Traktowanie kwasem kompleksu F-1	51,0	278,7	1830,0	9,1
Dowex 50 W $\times 2$ (forma $NH_4^+$ )	40,8	199,0	2050,0	7,3
Sephadex G-25	32,6	148,2	2200,0	5,8

F-1 i F-2 — dwie frakcje inhibitora S-AI



Rycina 3. Hipotetyczna struktura inhibitora S-AI (wg (13) zmodyfikowane).

przez stopniowane wytrącanie etanolem oraz chromatografię na biożelu P-6, stwierdzając, że są to oligocukry o zróżnicowanym ciężarze cząsteczkowym od 1 500 do 5 000 złożone z glukozy i związku zawierającego azot (69).

#### II-4. Kwas mezoinozytolo-sześcioposforowy (MHP)

Kwas mezoinozytolo-sześcioposforowy (MHP) występuje w nasionach wielu roślin i znany jest jako związek gromadzący fosfor w roślinie (15, 70-71). Aktywność antyamylolyczną MHP stwierdzono stosunkowo niedawno (6, 14). Początkowo (14) hamowanie  $\alpha$ -amylazy przez MHP tłumaczono wiązaniem przez ten związek jonów  $Ca^{++}$  niezbędnych do działania tych enzymów (72). Jednakże wykazano ostatnio (6), że MHP bezpośrednio oddziałuje z białkiem enzymu, w sposób podobny do działania albuminowych inhibitorów z pszenicy, a nie na zasadzie wiązania jonów

wapniowych. Za poglądem o bezpośredniej interakcji MHP z białkiem  $\alpha$ -amylazy, przemawiają także wcześniejsze spostrzeżenia o zdolności MHP do tworzenia kompleksów z białkami roślinnymi i zwierzęcymi (73). MHP swoiście hamuje  $\alpha$ -amylazy różnego pochodzenia (Tabela 8), nie hamuje zaś działania  $\beta$ -amylazy. Stopień zahamowania zależy od pH oraz od czasu preinkubacji enzymu z inhibitorem. Optimum pH MHP wynosi 3,5-4,0. Znaczny wpływ pH na interakcję MHP- $\alpha$ -amylaza pozwala wnioskować, że stan jonowy MHP decyduje o tworzeniu nieaktywnego kompleksu E-I lub E-I-S. Mechanizm oddziaływania MHP z  $\alpha$ -amylazą nie jest nadal wystarczająco poznany, ale słabe hamowanie przy pH alkalicznym wskazuje na istotną rolę dodatniego ładunku grupy imidazolowej w wiązaniu inhibitora przez enzym (74). Wykazano ponadto, podobnie jak w przypadku inhibitorów z pszenicy (36-39), fasoli (43-44), czy inhibitorów pochodzących z drobnoustrojów (11-12), że dla ujawnienia się pełnej zdolności hamowania MHP niezbędna jest preinkubacja enzymu z inhibitorem. Nie stwierdzono wpływu preinkubacji MHP ze skrobią na stopień hamującego działania tego związku na  $\alpha$ -amylazę. Nie ma zatem interakcji MHP-skrobia. Hamowanie jest typu niewspółzawodniczego. Wartość stałej  $K_i$   $\alpha$ -amylazy z pszenicy wyznaczona metodą *Lineweaver-Burka* (67a) przy trzech różnych poziomach MHP była stała i wynosiła 1,0 mM (6). Wydaje się, że MHP jako inhibitor  $\alpha$ -amylazy może spełniać istotną rolę w procesie kiełkowania i dojrzwiania nasion.

### III. Fizjologiczne i żywieniowe znaczenie inhibitorów enzymów amylolitycznych

Wysoka zawartość inhibitorów amylaz w roślinach, a szczególnie w tych, które stanowią pasze i pożywienie — w ziarnie pszenicy około 1% ciężaru ziarna (5, 53), w nasionach fasoli 1,5-5g/kg (33, 67) — skłoniły do podjęcia badań nad wpływem tych związków na strawność i wykorzystanie pokarmów skrobiowych. Wydawałoby się, że inhibitor  $\alpha$ -amylazy z pszenicy powinien mieć tylko niewielkie znaczenie fizjologiczne, ponieważ w żołądku ulega łatwo strawieniu przez pepsynę (E.C. 3.4.4.1) (21, 39). Jednakże okazało się, że wprowadzenie zawierającego inhibitor wyciągu z mąki pszennej do diety larw mącznika młynarka oraz trojszyka gryzącego, powodowało zahamowanie rozwoju oraz wzrost śmiertelności larw tych owadów (75, 76). W dalszych badaniach wykazano, że dodatek inhibitora do diety szczurów powodował zahamowanie ich wzrostu o 15-20% oraz wzrost zawartości niestrawionej skrobi w odchodach proporcjonalny do ilości dodanego inhibitora (25). Inhibitor z pszenicy nie miał żadnego wpływu na wzrost zwierząt, jeżeli w diecie skrobię zastąpiono sacharozą lub jeśli do diety dodano  $\beta$ -amylazy, której nie hamuje inhibitor z pszenicy. Przypuszcza się, że inhibitory amylaz mogą powodować zmia-

ny chorobowe przewodu pokarmowego, szczególnie w przypadku, gdy organizm ma obniżoną zdolność wydzielania  $\alpha$ -amylazy trzustkowej (16, 57, 77-79). Poglądy zakładające, iż inhibitory amylaz mogą stanowić czynnik chorobotwórczy budzą jeszcze zastrzeżenia (80). Badania przeprowadzone nad wpływem inhibitorów z pszenicy na poziom glukozy i insuliny we krwi zdrowych osobników ludzkich oraz szczurów i psów (24), wykazały, że dodanie inhibitorów amylaz do pożywienia obniża hiperglikemię i hiperinsulinemię. Podobny efekt zaobserwowano u pacjentów diabetyków i otyłych (24).

#### IV. Zastosowanie

Sugeruje się, że inhibitory amylaz mogą mieć zastosowanie w terapii, zwłaszcza w leczeniu otyłości (24), przez wyeliminowanie skrobi z diety poprzez spowodowanie jej niestrawności, oraz w leczeniu cukrzycy (25) przez zahamowanie przemiany skrobi i obniżenie poziomu cukru we krwi. Schmidt i wsp. (81) opatentowali sposób przygotowania inhibitora  $\alpha$ -amylazy z pszenicy i proponują jego użycie jako czynnika antyhiperglikemicznego.

Ponadto inhibitor S-AI ze *Streptomyces* zastosowano do wydajnego izolowania szczepu *Bacillus polymyxa* o znacznej zdolności do syntezy egzogennej  $\beta$ -amylazy (82). W metodzie tej wykorzystano zdolność S-AI do hamowania  $\alpha$ -amylazy i glukoamylazy i w ten sposób wyodrębniano kolonie o największej zdolności do syntezy  $\beta$ -amylazy. Niektóre inhibitory można zastosować w chromatografii powinowactwa do oczyszczania enzymów amylolytycznych (83).

#### PISMIENNICTWO

1. Chrzęszcz T., Janicki J., (1933), *Biochem. Z.*, **260**, 354—368.
2. Chrzęszcz T., Janicki J., (1933), *Biochem. Z.*, **264**, 192—208.
3. Marshall J. J., (1975), ACS Symposium Series Nr 15, „Physiological Effects of Food Carbohydrates”, 244—266.
4. Silano V., Furia M., Gianfreda L., Macri A., Palescandalo R., Rab A., Scardi V., Stella E., Valfre F., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 170—178.
5. Deponte R., Parlamenti R., Petrucci T., Silano V., Tomasi M. (1976), *Cereal Chem.*, **53**, 805—819.
6. Sharma Ch. B., Goel M., Irshad M., (1978), *Phytochemistry*, **17**, 201—204.
7. Pick K. H., Heinz P. K., Wöber G., (1978), *Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1371—1382.
8. Uead S., Koba Y., (1973), *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2025—2031.
9. Murao S., Ohyama K., (1975), *Agric. Biol. Chem.* **39**, 2271.
10. Murao S., Ohyama K., Ogura S., (1977), *Agric. Biol. Chem.* **41**, 919—924.
11. Ohyama K., Murao S., (1977), *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2221—2228.
12. Schmidt D. D., Frommer W., Junge B., Muller L., Wingender



- W., Truscheit E., (1977), *Naturwissenschaften* **64**, 535—536.
13. Murao S., Ohyama K., (1979), *Agric. Biol. Chem.* **43**, 679—681.
  14. Cawley R. W., Mitchell T. A., (1968), *J. Sci. Fd. Agric.* **19**, 106—110.
  15. Sharma C. B., Dieckert J. W., (1975), *Physiol. Plantarum* **33**, 1—8.
  16. Strumeyer D. H., (1972), *Nutr. Rep. Inter.* **5**, 45—52.
  17. Silano V., Minuti M., Petrucci T., Tomasi M., Pocchiari F., (1978), Abstr. 9-th Inter. Congr. Biochem. Stockholm. Abs. 2, 18—20.
  18. Applebaum S. W., Jankovic M., Birk J., (1961), *J. Insect Physiol.*
  19. Maxon E. D., Rooney L. W., (1972), *Cer. Sci. Today* **17**, 262—271.
  20. Jaffe W. G., Lette C. L. V., (1968), *J. Nutr.* **94**, 203—210.
  21. Shainkin R., Birk Y., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 502—513.
  22. Evans R. J., Pusztai A., Waff W. B., Bauer D. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **303**, 175—184.
  23. Lang J. A., Chang-Chum L. E., Reyes P. S., Briggs G. M., (1974), *Fed. Proc.* **33**, 718—721.
  24. Puls W., Keup H. P., (1973), *Diabetologia* **9**, 97—101.
  25. Puls W., Keup H. P., Krause G., Hoffmeister F., (1977), *Naturwissenschaften* **64**, 536—537.
  26. Hemberg T., Larrson I., (1961), *Physiol. Plant.* **14**, 861—867.
  27. Mattoc A. K., Modi V. V., (1970), *Enzymologia* **39**, 237—247.
  28. Hemberg T., (1967), *Acta Chem. Scand.* **21**, 1665—1669.
  29. Hemberg T., (1975), *Physiol. Plantarum* **31**, 11—18.
  30. Niwa T., Inonye S., Tsuruoka T., Koaze T., Niida T., (1970), *Agric. Biol. Chem.* **34**, 966—970.
  31. Frommer W., Puls W., Schafer D., Schmidt D., (1970), *German. Offen.* 2.064092.
  32. Elliot B. B., Leopold A. C., (1953), *Physiol. Plantarum* **6**, 65—70.
  33. Marshall J. J., Lauda C. M., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 8030—8037.
  34. Rao M. N., Shurpalekar K. S., Sundaravalli E. O., (1970), *Ind. J. Biochem.* **7**, 241—249.
  35. Kneen E., Sandstedt R. M., (1943), *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 1247—1251.
  36. Saunders R. M., Lang J. A., (1973), *Phytochemistry* **12**, 1237—1241.
  37. Silano V., Kasarda D. D., Pocchiari F., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **317**, 139—148.
  38. Bedetti C., Bozzini A., Silano V., Vittozi L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **362**, 299—307.
  39. Deponte R., Parlamenti R., Petrucci T., Silano V., Tomasi T. (1976), *Cereal Chem.*, **53**, 805—819.
  40. Buonocore V., Petrucci T., Silano V., (1977), *Phytochemistry* **16**, 811—820.
  41. Petrucci T., Sannia G., Parlamenti R., Silano V., (1978), *Biochem. J.* **173**, 229—235.
  42. Petrucci T., Raab A., Tomasi M., Silano V., (1976), *Biochim. Biophys. Acta* **420**, 288—297.
  43. Bowman D. E., (1945), *Science* **102**, 358—359.
  44. Hernandez A., Jaffe W. G., (1968), *Acta Gent. Venezuelana* **19**, 183—185.
  45. Jaffe W. G., Moreno R., Wallis V., (1973), *Nutr. Rep. Intern.* **7**, 169—174.
  46. Sandstedt R. M., Beckord O. C., (1964), *Cereal Chem.* **23**, 548—552.
  47. Saunders R. M., (1975), *Cereal Fd World* **20**, 282—290.
  48. Kneen E., Sandstedt R. M., (1964), *Arch. Biochem.* **9**, 235—249.
  49. Militzer W., Ikeda C., Kueen E., (1964), *Arch. Biochem.* **15**, 309—320.
  50. Militzer W., Ikeda C., Kueen E., (1964), *Arch. Biochem.* **15**, 321—329.

51. Sodini G., Silano V., De Agazio M., Pocchiari F., Tentori K., Vivaldi G., (1970), *Phytochemistry* **9**, 1167—1172.
52. O'Donnel M. D., Mc Geney K. F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta* **422**, 159—165.
53. Petrucci T., Tomasi M., Cantagalli P., Silano V., (1974), *Phytochemistry* **13**, 2487—2491.
54. Fish W. W., Abbot D. C., (1969), *J. Sci. Fd Agric.* **20**, 723—732.
55. Cantagalli P., Di Giorgio G., Morisi G., Pocchiari F., Silano V., (1971), *J. Sci. Fd Agric.* **22**, 256—261.
56. Redman D. G., (1975), *Biochem. J.* **149**, 725—732.
57. Redman D. G., (1976), *Biochem. J.* **155**, 193—201.
58. Strumeyer D. H., Fischer B. R., (1973), *Fd. Proc.* **32**, 624—628.
59. Gertzman G. B. R., (1975), *Diss. Abs. Int.* **36**, 2058—2063.
60. Pace W., Parlamenti R., Rab A., Silano V., Vittozi L., (1977), *Cereal Chem.* **54**, 153—159.
61. Wrigley C. W., Shephard K. W., (1973), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **209**, 154—161.
62. Aragoncillo C., Rodriguez Lapperene M. A., Corboners P., Garcia Olmedo F., (1975), *Theoret. Appl. Genetics* **45**, 322—331.
63. Vittozzi L., Silano V., (1976), *Theoret. Appl. Genetic.* **48**, 279—288.
64. Barlow K. K., Buttrose M. S., Simmonds D. H., Vesk M., (1973), *Cereal Chem.* **50**, 443—452.
65. Simmonds D. H., Barlow K. K., Wrigley C. W., (1973), *Cereal Chem.* **50**, 553—560.
66. Minetti M., Petrucci T., Cattaneo S., Pocchiari F., Silano V., (1973), *Cereal Chem.* **50**, 198—201.
67. Pick K. H., Wober G., (1978), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **359**, 1379—1384.
- 67a. Lineweaver H., Burk D. J., (1934), *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658—660.
68. Andrew P., (1964), *Biochem. J.* **91**, 224—228.
69. Frommer i wsp. Bayer A. G., (1973), *Ger. Offen.* **2**, 347—782, 22.
70. Asada K., Kasai Z., (1962), *Plant Cell Physiol.* **3**, 397—401.
71. Dieckert J. W., Snowden J. E., Moore A. T., Heinzehman D. C., Altschul A. M., (1962), *J. Food Sci.* **27**, 321—329.
72. Andrzejczuk-Hybel J., (1969), *Post. Biochem.* **15**, 49—63.
73. Bourdillon J., (1951), *J. Biol. Chem.* **189**, 65—70.
74. Taketa K., Pogell B. M., (1965), *J. Biol. Chem.* **240**, 651—659.
75. Applebaum S. W., (1964), *J. Insect Physiol.* **10**, 897—901.
76. Applebaum S. W., Koniju A. M., (1967), *J. Stored. Prod. Res.* **2**, 323—329.
77. Kasarda D. D., (1975), *w Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds* (Friedman M., ed.) vol. 2, Dekker New York.
78. Hekkens W. Th., J. M., Halx A. J., Willinghagen R. G. J., (1970), *w Coeliac Disease Booth red., C. C., Dowling R. H., str. 11—19 Churchill Livingstone Edinburgh.*
79. Kendall M. J., Schneider R., Cox D. S., Hawkins C. F., (1972), *Lancet* **11**, 1065—1069.
80. Auricchio S., De Vizia B., Carta De Angelis L., Silano V., (1974), *Lancet* **1**, 98—102.
81. Schmidt D., Puls W., (1971), *German Patent* **2. 003930**, Ang. 5, Via Chem. Abstr. **75**, 91296.
82. Murao S., Ohyama K., Arai M., (1979), *Agric. Biol. Chem.* **43**, 719—728.
83. Buonocore V., Poirio E., Gramenzi F., Silano V., (1975), *J. Chromatog.* **114**, 109—114.

EWA MARIA RAKOWICZ-SZULCZYŃSKA \*)

## Rola sekwencji sygnałowych w białkach

### Signal sequences in proteins

#### Spis treści

##### Wstęp

- I. Geneza teorii sygnałów
- II. Sekwencje sygnałowe N-terminalne
  - II-1. Białka sekrecyjne eukariontów
  - II-2. Białka organelli komórkowych eukariontów
  - II-3. Białka prokariontów
  - II-4. Białka wirusów
- III. Sekwencje sygnałowe C-terminalne
- IV. Sekwencje sygnałowe wewnątrz cząsteczki
  - IV-1. Sekwencje sygnałowe w środku cząsteczki
  - IV-2. Sekwencje sygnałowe blisko C-końca
- V. Mechanizm translokacji i odcinania pre-sekwencji
  - V-1. Translokacja przez błony
    - V-1.1. Translokacja przez błony retikularne
  - V-2. Odcinanie sekwencji sygnałowych
- VI. Uwagi końcowe

#### Contents

##### Introduction

- I. Origin of signal sequences
- II. N-terminal signal sequences
  - II-1. Secretory proteins of *Eucaryota*
  - II-2. Proteins of cell organelles of *Eucaryota*
  - II-3. Proteins of *Procaryota*
  - II-4. Viral proteins
- III. C-terminal signal sequences
- IV. Internal signal sequences
  - IV-1. Intramolecular position of signal sequences
  - IV-2. Signal sequences proximal (C-terminal)
- V. Mechanism of translocation and cleaving of pre-sequences
  - V-1. Translocation across the membranes

\*) dr, Zakład Genetyki Człowieka PAN, 60-781 Poznań, ul. Święcickiego 6

**V-1.1. Translocation across the reticulum membranes****V-2. Cleaving of pre-sequences****VI. Concluding remarks****Wstęp**

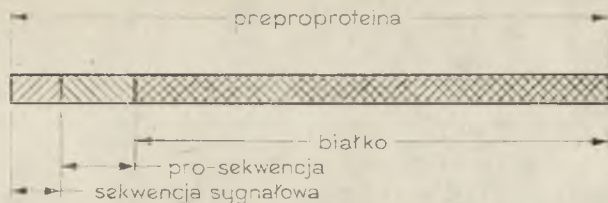
Białka naogół syntetyzowane są w cytoplazmie. Po syntezie, białka przechodzą do właściwych kompartmentów komórkowych, warunkując ich określoną funkcję. Tak np. enzymy glikolityczne pozostają w cytoplazmie, podczas gdy enzymy cyklu Krebsa lokują się w *matrix* mitochondrialnej, histony wędrują do jądra komórkowego, gdzie tworzą kompleks z DNA, enzymy hydrolityczne przechodzą do lizosomów.

Periplazma bakterii wykazuje odmienny skład białkowy od *matrix* endoplazmatycznej. Specyficzną frakcją białek syntetyzowanych w cytoplazmie stanowią białka sekrecyjne, które są z komórki wydalane i wędrują do narządów docelowych. Od dawna obserwowano w mikroskopie, że komórki produkujące znaczne ilości białek sekrecyjnych zawierają dobrze rozwinięte szorstkie retikulum endoplazmatyczne, podczas gdy komórki produkujące małe ilości białek, zawierają głównie retikulum gładkie. Badając syntezę białek sekrecyjnych z zastosowaniem radioaktywnych aminokwasów stwierdzono, że pojawiają one się najpierw w cysternach retikulum, potem w strukturach Golgiego, skąd, jak sugerowano, w postaci pęcherzyków sekrecyjnych są wydalane na zewnątrz komórki (1). Dopiero izolacja czystych mRNA różnych białek i zastosowanie układu translacji *in vitro* dały po części odpowiedź na pytanie, w jaki sposób komórka „odróżnia” białka wewnątrzkomórkowe od białek sekrecyjnych, a wśród wewnątrzkomórkowych, białka cytoplazmatyczne i białka organeli.

**I. Geneza teorii sygnałów \***

W roku 1970 zaobserwowano po raz pierwszy, że łańcuch lekki immunoglobuliny zsyntetyzowanej *in vitro* na matrycy immunoglobulinowego mRNA jest dłuższy od cząsteczki syntetyzowanej *in vivo* (2). Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku innych białek sekrecyjnych — hormonów, i białek enzymatycznych (1, 3). Analiza aminokwasów produktów translacji wykazała, że białka sekrecyjne syntetyzowane w układzie translacji *in vitro* występują jako cząsteczki prekursorowe, tzw. pre-proteiny, które są dłuższe od syntetyzowanych *in vivo* o N-terminalny peptyd, obejmujący od kilkunastu do kilkudziesięciu aminokwasów o charakterze hydrofobowym (3). Sekwencję tę określono jako sekwencję sy-

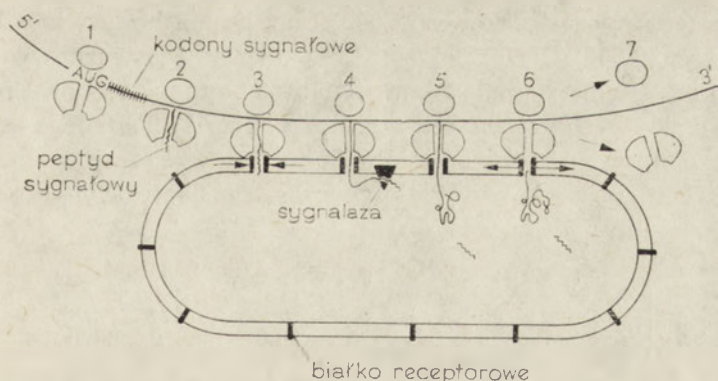
\*) por. artykuł Grankowskiego: Post. Biochem.



Ryc. 1. Schemat pre-pro-teiny z lokalizacją sekwencji sygnałowej oraz pro-sekwencji

gnałową, pre-segment, pre-sekwencję lub pre-peptyd, w odróżnieniu od pro-peptydu, który występuje w wielu biologicznie nieaktywnych białkach blokując centra aktywne (ryc. 1).

Wykrycie pre-sekwencji w białkach doprowadziło do sformułowania przez Blobela teorii sygnałów (3, 4) (ryc. 2). Teoria ta zakłada, że białka sekrecyjne syntetyzowane są w postaci cząsteczek prekursorowych (preprotein lub pre-pro-protein), posiadających N-terminalną, krótką sygnałową sekwencję aminokwasów hydrofobowych. Podczas translacji, zsyntetyzowany pre-segment stanowi sygnał odpowiedzialny za interakcję z apolarnym rdzeniem błony i translokację pozostałej części cząsteczki białka poprzez błonę retikulum. Według koncepcji Blobela, interakcja peptydu sygnałowego z błoną retikulum powoduje asocjację większej podjednostki rybosomów z białkami receptorowymi błony retikularnej, co prowadzi do powstania w błonie „tunelu” stanowiącego przedłużenie „kanału” większej podjednostki rybosomalnej (ryc. 2). Ścisła asocjacja kanału rybosomu z tunelem błony umożliwia translokację pozostałej części cząsteczki syntetyzowanego białka przez błonę do cystyny retikulum. Według pierwotnej koncepcji, peptyd sygnałowy na pewnym etapie trans-



Ryc. 2. Schemat translacji mRNA białek sekrecyjnych na rybosomach związanych z błonami retikularnymi oraz translokacji syntetyzowanego białka przez „tunel” w błonie, powstały przez przedłużenie „kanału” podjednostki większej rybosomu. Według Blobela w rybosomie istnieje hipotetyczny kanał, przez który nowo zsyntetyzowany N-terminalny fragment białka opuszcza rybosom (teoria sygnałów sformułowana przez Blobela (3)).

lokacji jest usuwany przez występującą wewnątrz błony hipotetyczną „sygnalizację”.

Po zakończeniu translacji, odcepiający czynnik białkowy (angl. *detachment factor*) powoduje odłączenie monosomów od retikulum (5). Czynnik ten wyizolowany, z organizmów różnych gatunków i różnych tkanek, wpływa na odłączenie rybosomów zarówno w układzie homologicznym jak i heterologicznym, co świadczy o jego niespecyficzności (5).

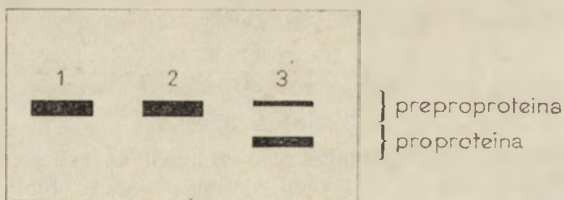
Teorię sygnałów potwierdziły dane eksperymentalne uzyskane w pracowni Blobel'a (6). Wykazano, że mRNA wyizolowany z trzustki psa w układzie translacji *in vitro*, w nieobecności błon, warunkuje syntezę prekursorowych form sekrecyjnych białek trzustki, które są dłuższe o peptyd o ciężarze cząsteczkowym 1000-2000 od izolowanych z organizmu. Stwierdzono znaczne podobieństwo sekwencji 16 hydrofobowych aminokwasów sygnałowego peptydu pretrypsynogenu z innymi białkami sekrecyjnymi trzustki psa. Jeżeli translację wymienionych białek prowadzono w obecności błon, uzyskiwano białka krótsze o odciętą sekwencję sygnałową.

## II. Sekwencje sygnałowe N-terminalne

### II-1. Białka sekrecyjne eukariontów

Sformułowanie przez Blobel'a (4) teorii sygnałów dało początek intensywnym badaniom nad prekursorowymi formami różnych białek sekrecyjnych. W szczególności zwrócono uwagę na białka wydzielane przez układ endokrynologiczny (3).

Wśród hormonów przysadki mózgowej wykazano prekursorową formę prolaktyny (ciężar cząsteczkowy 22 000) oraz prehormonu wzrostu (ciężar cząsteczkowy 20 000). Preprolaktyna ma ciężar cząsteczkowy 24 000—28 000 i jej sekwencja sygnałowa odpowiada 30 aminokwasom. Preprohormon wzrostu wykazuje ciężar cząsteczkowy około 24 000 i jego sekwencja sygnałowa obejmuje 26-27 aminokwasów (7-11). Formy prekursorowe tych białek obserwowano wyłącznie podczas translacji *in vitro* prowadzo-



Ryc. 3. Ogólny schemat elektroforetycznej analizy produktów translacji mRNA białek sekrecyjnych: 1) w nieobecności błon, 2) błony dodane po translacji, 3) błony dodane podczas translacji

nej w nieobecności błon mikrosomalnych. Dodanie błon mikrosomalnych po translacji nie powodowało odcinania presekwencji, podczas gdy dodanie błon przed translacją powodowało powstanie również form prekursorowych jak i form natywnych (10) (Ryc. 3).

Wraz ze wzrostem stężenia błon w układzie translacji obserwowano powstawanie proporcjonalnie większych ilości form natywnych tych białek (12). Po dodaniu do układu translacji enzymów proteolitycznych następowało trawienie wyłącznie form prekursorowych przy braku trawienia form natywnych (10). Eksperyment ten dowodzi, że zgodnie z teorią sygnałów, odcinanie segmentów sygnałowych zachodzi tylko podczas translacji, a natywne białka pojawiają się dopiero w cysternach retikulum (już niewrażliwe na działanie proteaz).

Podobnie zidentyfikowano prelaktogen łożyskowy o ciężarze cząsteczkowym o około 2000 większym od właściwego hormonu (13-15).

Izolacja mRNA insuliny (16) i przeprowadzenie jej syntezy *in vitro* (17) pozwoliły na wykrycie prekursorowej formy insuliny — preproinsuliny, posiadającej na N-końcu hydrofobowy prepeptyd o ciężarze cząsteczkowym 2000-3000, obejmujący 23 aminokwasy. Prepeptyd insuliny jest bogaty w leucynę, której lokalizacja w cząsteczkach preproinsuliny wołu i szczura jest podobna. Późniejsze badania wykazały również u ryb istnienie prekursorowej formy insuliny, której presekwencja wykazuje znaczne podobieństwo do sekwencji sygnałowej insuliny ssaków (18).

Formy prekursorowe, zawierające fragmenty sygnałowe, zidentyfikowano również w przypadku tyreoglobuliny (hormon tarczycy) oraz parathormonu (hormon przytarczyc). W przypadku parathormonu określono ilość aminokwasów sygnałowych (25 aminokwasów) (19, 20).

Oprócz białek sekrecyjnych układu endokrynologicznego, wielu badaczy wykryło również prekursorowe formy białek układu egzokrynologicznego. Wśród tych białek, jako jedno z pierwszych, scharakteryzowano białka mleka. I tak wykazano, że  $\alpha$ -laktoglobulina jest syntetyzowana w formie prekursorowej, zawierającej 7-19 aminokwasów sygnałowych (21). Ponadto wykazano, że glikozylacja  $\alpha$ -laktoglobuliny *in vitro* zachodzi tylko w przypadku obecności błon podczas translacji. W nieobecności błon, lub w przypadku dodania ich do układu dopiero po translacji — glikozylacja nie następuje (22). Obecność sekwencji sygnałowej stwierdzono również w przypadku  $\beta$ -laktoglobuliny (23).

Według Campbella i Blobela (3) za obecnością fragmentu sygnałowego w syntetyzowanej cząsteczce białka przemawia obecność kodującego je mRNA na polisomach związanych z błonami retikularnymi, podczas gdy białka nie mające fragmentu sygnałowego są syntetyzowane na wolnych polisomach, jak to wykazano w przypadku globinowego mRNA, nie posiadającego kodonów sygnałowych (24). Harrison i wsp. (26) zidentyfikowali mRNA kazeiny zarówno we frakcji wolnych polisomów, jak i związanych z retikulum, co zdaniem autorów może sugerować,

że inicjacja translacji białek sekrecyjnych zachodzi na wolnych polisomach, a związanie z retikulum następuje później, już po zsyntetyzowaniu fragmentu sygnałowego.

Interesujące badania przeprowadzono w przypadku białek jaja kręgowców — lipovitelliny i fosfityny. Obydwa białka są syntetyzowane w wątrobie, na polisomach związanych z retikulum, w postaci jednej dużej cząsteczki prekursorowej, obejmującej 1 500 aminokwasów, a która zawiera krótki N-terminalny fragment sygnałowy (3).

Szczegółowe badania form prekursorowych lekkich łańcuchów immunoglobulin ( $\kappa$  i  $\lambda$ ) wykazały obecność sekwencji sygnałowych położonych przed obszarem zmiennym tych białek (26-31). Fragmenty sygnałowe łańcuchów lekkich różnych przeciwciał różnią się strukturą I-rzędową (26-27). Ponadto, na izolowanym mRNA łańcuchów lekkich, są syntetyzowane 2-3 różne formy prekursorowe pojedynczych łańcuchów, które się różnią długością sekwencji sygnałowych (27-28). Burstein i wsp. (27) wykazali, że po odcięciu fragmentu sygnałowego, N-terminalna glutamina lub kwas glutaminowy łańcucha  $\lambda$ , syntetyzowanego przez komórki mysiego szpiczaka, ulegają cyklizacji do kwasu piroglutaminowego, podczas gdy N-koniec w natywnym łańcuchu  $\kappa$  jest wolny. Fragment sygnałowy w łańcuchu  $\kappa$  wykazuje dużą zmienność, podobną do zmienności obszaru zmiennego dojrzałego łańcucha (29-31).

Na podstawie analizy hydrofobowych sekwencji sygnałowych łańcuchów  $\lambda$  przypuszcza się, że prekursorowe formy immunoglobulin wydzielanych jak i receptorów błon komórkowych limfocytów, rozpoznających antygen, są identyczne. W komórkach plazmatycznych produkujących bardzo duże ilości immunoglobulin, fragment sygnałowy jest prawdopodobnie odcinany podczas interakcji z błoną retikulum. W limfocytach, produkujących małe ilości immunoglobulin powierzchniowych, fragment sygnałowy nie jest odcinany i właśnie jego oddziaływanie z limfocytarną błoną powierzchniową umożliwia lokalizację receptorów (32).

mRNA interferonu, syntetyzowanego w ludzkich fibroblastach inkubowanych z dwuniciowym RNA, wyizolowano z frakcji polisomów związanych z błonami retikulárnymi (33). Można przypuszczać, że interferon ma typową N-terminalną sekwencję sygnałową.

## II-2. Białka organelli komórkowych eukariontów

Teoria sygnałów Blobela zapoczątkowała badania nad mechanizmami segregacji białek wewnątrzkomórkowych. Stwierdzono, że zsyntetyzowane *in vitro* białka różnych kompartmentów komórkowych, wstrzyknięte do oocyty żaby, zajmują właściwe dla siebie miejsce w komórce (1). Tak np. białka jądrowe wędrują do jądra, a cytoplazmatyczne pozostają w cytoplazmie. Szczególnie interesujące badania przeprowadzono nad cytoplazmatyczną karboksylazą rybulozofosforanową, katalizującą pierwszy



etap fotosyntezy. Enzym ten jest zbudowany z dwóch podjednostek — większej (ciężar cząsteczkowy 55 000) syntetyzowanej w chloroplastach i mniejszej (ciężar cząsteczkowy 14 000) syntetyzowanej w cytoplazmie i migrującej do chloroplastów. Po izolacji mRNA obydwu podjednostek i przeprowadzeniu translacji *in vitro* wykazano, że podjednostka większa syntetyzowana *in vitro* ma taki sam ciężar cząsteczkowy jak natywna występująca w chloroplastach, podczas gdy podjednostka mniejsza tworzy *in vitro* formę prekursorową o ciężarze cząsteczkowym 20 000, a inkubowana z chloroplastami ulega konwersji do cząsteczki o ciężarze cząsteczkowych 14 000 (34, 35). Część odcinana podczas translokacji do chloroplastów ma prawdopodobnie charakter fragmentu sygnałowego odcinanego po-translacyjnie (35).

Potranslacyjne odcinanie sekwencji sygnałowej zaobserwowano również w przypadku syntetyzowanych w cytoplazmie podjednostek ATPazy, zlokalizowanych w błonie wewnętrznej mitochondriów, od strony *matrix* (36), oraz dehydrogenazy glutaminowej (enzym *matrix* mitochondrialnej). (1).

Wszystkie białka organelli, których sekwencja sygnałowa odcinana jest potranslacyjnie, są syntetyzowane na wolnych rybosomach i ich formy prekursorowe znaleziono również w cytoplazmie (34, 35, 36).

Przykładem potranslacyjnej translokacji, przy braku odcinania sekwencji sygnałowej, są dwa enzymy peroksysomów — urykaza i katalaza, syntetyzowane na wolnych rybosomach, których ciężar cząsteczkowy po translokacji do peroksysomów nie ulega zmianie (37).

Interesujące badania przeprowadzono w przypadku białek wewnątrzmitochondrialnych, syntetyzowanych przez izolowane mitochondria. Stwierdzono, że produkowane przez mitochondria *Neurospora crassa* białko o ciężarze cząsteczkowym 11 000, podczas wbudowywania do błon, przechodzi w białka o ciężarze cząsteczkowym 20 000 i 40 000 (38). Podobnie, w mitochondriach wątroby szczura zaobserwowano syntezę dwóch niskociężarkowych białek (ciężary cząsteczkowe 14 000 — 10 000), które po wbudowaniu do błon tworzyły kompleksy o ciężarze cząsteczkowym 40 000 (39).

Nie rozstrzygnięte pozostaje pytanie, czy produkowane przez mitochondria białka powstają przez agregację, czy na drodze reakcji chemicznej (38). Silnie hydrofobowy charakter pierwotnych produktów translacji w mitochondriach sugeruje ich potencjalną możliwość wbudowania się w błony (40), na zasadzie mechanizmu proponowanego przez teorię sygnałów.

### II-3. Białka prokariotów

Porównanie białek cytoplazmatycznych, periplazmatycznych oraz błony zewnętrznej bakterii *Escherichia coli*, dostarczyło nowych argumentów potwierdzających funkcję sekwencji sygnałowych. Wykazano, że za-

również zlokalizowana w periplazmie fosfataza zasadowa (41), białko wiążące maltozę (42), jak i występujący w błonie zewnętrznej receptor faga  $\lambda$  (43), są syntetyzowane wraz z sekwencją sygnałową, odcinaną podczas translacji (kontraslacyjnie), w trakcie przechodzenia przez błonę wewnętrzną. Mutacje sekwencji sygnałowych, prowadzące do podstawienia aminokwasów hydrofilowych w miejsce hydrofobowych, powodowały zatrzymanie tych białek w cytoplazmie, co wskazuje, że tylko prawidłowa, hydrofobowa sekwencja sygnałowa warunkuje określoną translokację syntetyzowanych białek (42, 43). Stosując fuzję genów, uzyskiwano komórki syntetyzujące białko hybrydowe: galaktozydazę (enzym cytoplazmatyczny) z fragmentem N-terminalnym (większym od sekwencji sygnałowej) białka wiążącego maltozę lub receptora faga  $\lambda$ . Tak zmodyfikowany enzym ulegał wbudowaniu do błony zewnętrznej lub znajdował się w periplazmie (44). W badaniach późniejszych uzyskano komórki produkujące galaktozydazę z samym fragmentem receptora faga  $\lambda$ . Ponieważ białko to pozostawało w cytoplazmie, wnioskowano, że sama sekwencja sygnałowa nie wystarcza, aby translokacja syntetyzowanego białka przez błonę mogła nastąpić (45).

Omówione powyżej komórki białka bakteryjne ulegają kotranslacyjnej translokacji przez błonę wewnętrzną. W przypadku białek wydzielanych przez bakterie na zewnątrz komórki uważa się, że ich sekwencje sygnałowe oddziałują z zewnętrzną częścią błony, ponieważ sekrecja zachodzi kotranslacyjnie (43).

#### II-4. Białka wirusów

Uniwersalność teorii sygnałów została potwierdzona przez badania syntezy glikoprotein wirusowych. Stwierdzono, że w przypadku dwóch glikoprotein wirusa VS (pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej) translacji ulega mRNA na rybosomach związanych z błonami (46). Jak wykazało później (47), glikoproteina wirusa VS posiada na N-końcu 16 aminokwasów hydrofobowych. Sekwencje te, podczas wbudowywania do błon mikrosomalnych są proteolitycznie odcinane. Białka wirusowe ulegają następnie glikozylacji (48, 49). Syntetyzowana glikoproteina wirusa powoduje hamowanie kompetycyjne translokacji preprolaktyny (47), co świadczy o identycznym mechanizmie przechodzenia przez błonę obydwu białek oraz wskazuje na podobny mechanizm biogenezy białek sekrecyjnych i błonowych (47). Podobnie wykazano, że sekwencje sygnałowe dwóch glikoproteidów wirusa *Sindbis* są katalitycznie odcinane przed wbudowaniem do kapsydu wirusa (cyt. za 50).

### III. Sekwencje sygnałowe C-terminalne

Analiza sekwencji mRNA białek sekrecyjnych oraz analiza sekwencji aminokwasowych produktów translacji tych messengerów doprowadziła do odkrycia innego rodzaju zmian niektórych białek sekrecyjnych, związanych z odcinaniem sekwencji C-terminalnych. Jako przykład może służyć melityna (ang. *melittine*) pszczoł. Melityna jest głównym składnikiem jadu pszczelego i powoduje rozpad obcych komórek poprzez dezintegrację błony komórkowej (51). Wykazano, że właściwości detergentowe melityny są uwarunkowane obecnością 20 aminokwasów hydrofobowych, występujących na końcu aminowym, za którymi występuje 6 aminokwasów hydrofilowych (52). Melityna tworzy tetramer rozpuszczalny w wodzie. Pod wpływem detergentów, butanolu lub podczas insercji do błon komórkowych, ulega ona dysocjacji do monomerów, czemu towarzyszy ekspozycja reszt hydrofobowych (52). Melityna w gruczole jadowym produkowana jest w postaci promelityny, w której właściwości detergentowe melityny nie ujawniają się, wskutek obecności polarnego propeptydu, liczącego 8 aminokwasów. Na końcu karboksylowym w melitynie i promelitynie występuje dwuamid kwasu glutaminowego (53). Produkt translacji mRNA melityny *in vitro* ma jednak większy ciężar cząsteczkowy od promelityny (54). Pierwotny produkt translacji określony jako prepromelityna ma na końcu aminowym typową dla białek sekrecyjnych hydrofobową sekwencję sygnałową, a na końcu karboksylowym, zamiast typowego dla promelityny i melityny ugrupowania-GlnCONH<sub>2</sub>, sekwencję Gln-GlyCOOH (55, 56). Uważa się, że przekształcenie prepromelityny w aktywną melitynę wymaga przynajmniej trzech etapów (56, 57): 1) odcięcia N-terminalnej sekwencji sygnałowej, 2) substytucji terminalnej glicyny przez amid, 3) odcięcia prosekwencji. Po wstrzyknięciu mRNA melityny do oocytu żaby *Xenopus laevis* obserwowano powstawanie w oocycie promelityny typowej dla pszczoł, ale z terminalną glicyną zamiast amidu (57). Eksperyment ten wskazuje, że odcinanie sekwencji sygnałowej stanowi trwałą ewolucyjnie, niespecyficzną reakcję, wspólną dla wszystkich białek sygnałowych, podczas gdy odcinanie prosekwencji (melityny) i substytucja glicyny przez amid są reakcjami charakterystycznymi wyłącznie dla pszczoł. Odcinanie prosekwencji w różnych białkach jest od dawna znane. Natomiast biologiczne znaczenie zastąpienia glicyny przez amid nie zostało dotychczas wyjaśnione.

Odkrycie modyfikacji końca karboksylowego w prekursorowej cząsteczce melityny pozwalało przypuszczać, że podobna modyfikacja może występować również w innych peptydach posiadających terminalny amid. Wiadomo, że terminalny amid zawierają peptydy, jak: kalcytonina, gastryna, oksytocyna, sekretyna oraz czynnik wywołujący degranulację komórek tucznych. Szlaki metaboliczne, wiodące do powstania terminalnego amidu w tych peptydach były dotychczas zupełnie nieznanymi.

kowa sekwencja C-terminalna została wykryta także w prekursorowej cząsteczce gastryny (58). Gastryna jest syntetyzowana w postaci progastryny, zbudowanej z 34 reszt aminokwasowych, z czego 7 od N-końca przypada na pro-sekwencję. W celu izolacji mRNA gastryny występującego w tkankach w minimalnej ilości, zsyntetyzowano dezoksyoligonukleotyd, komplementarny do krótkiego fragmentu RNA, kodującego 6 aminokwasów unikalnej sekwencji progastryny. Uzyskany dezoksyoligonukleotyd hybrydyzował z mRNA o długości 620 nukleotydów. Sugeruje to, że prekursorowa cząsteczka gastryny powinna być zbudowana z około 210-240 reszt aminokwasowych, z czego tylko 102 przypadają na progastrynę (58). Dalsze badania wskazują, że około 200 nukleotydów koduje 50 aminokwasów od końca N, a pozostałe nukleotydy (250-300) kodują aminokwasy od końca C (58). Podobnie, jak w melitynie (57), przemiana cząsteczki preprogastryny polega prawdopodobnie na odcinaniu zarówno N-terminalnej sekwencji sygnałowej, jak i C-terminalnej, przy równoczesnym utworzeniu terminalnego amidu.

W układzie *in vitro* również kalcytonina powstaje w postaci prekursorowej (59). W obecności błon retikularnych forma prekursorowa o ciężarze cząsteczkowym 15 000 przechodzi w cząsteczkę mniejszą, o ciężarze cząsteczkowym 12 000. Na jakiej drodze z prekursora o ciężarze cząsteczkowym 12 000 powstaje kalcytonina o ciężarze 3 000 dotąd nie wiadomo. Biorąc jednak pod uwagę obecność terminalnego amidu można przypuszczać, że konwersja cząsteczki prekursorowej kalcytoniny, analogicznie jak melityny i gastryny zachodzi również od końca C.

#### IV. Sekwencje sygnałowe wewnątrz cząsteczki

##### IV-1. Sekwencje sygnałowe w środku cząsteczki

Owoalbumina przechodzi do światła cystern retikulum co wskazuje na obecność w cząsteczce fragmentu sygnałowego (60), ponieważ białka nie posiadające takiego fragmentu nie ulegają translokacji (50). W celu wykazania obecności fragmentu sygnałowego owoalbuminy badano hamowanie kompetycyjne translokacji preprolaktyny i tworzenie prolaktyny w obecności owoalbuminy natywnej, zdenaturowanej i trawionej trypsyną (61). Owoalbumina natywna nie miała wpływu na translokację, zdenaturowana powodowała częściowe hamowanie translokacji preprolaktyny, a trawiona trypsyną powodowała prawie 100-procentowe hamowanie translokacji. Podawana natomiast w eksperymencie kontrolnym natywna, zdenaturowana i trawiona trypsyną albumina nie hamowała translacji preprolaktyny. Wynik ten sugeruje, że zawiera w cząsteczce sekwencję sygnałową, maskowaną konformacyjnie, która staje się dostępna i może wchodzić w interakcję z błoną dopiero po denaturacji, a w szczególności

po trawieniu. Efekt ten jest specyficzny dla owoalbuminy, ponieważ inne białka sekrecyjne, jak albumina wołu, nie wpływają na hamowanie translokacji. Sekwencja sygnałowa została wyizolowana i scharakteryzowana (61). Wykazano, że jest to peptyd o ciężarze cząsteczkowym 8 000, złożony z 47 reszt aminokwasowych, rozpoczynający się od izoleucyny w pozycji 229, a kończący na argininie w pozycji 276. Struktura I-rzędowa tego peptydu jest bardzo podobna do struktury N-terminalnych sekwencji sygnałowych dwóch innych białek sekrecyjnych jajowodu, tj. owomukoidu i lizozymu. Wyizolowany fragment sygnałowy owoalbuminy wykazuje zdolność kompetycyjnego hamowania translokacji preprolaktyny. Ponieważ preprolaktyna ulega trawieniu przez enzymy proteolityczne można wnioskować, że hamowanie translokacji zachodzi na etapie wejścia w błonę.

#### IV-2. Sekwencje sygnałowe blisko końca C

Niektóre toksyny roślinne jak rycyna, abryna i modekcyna oraz toksyna błonicza są zbudowane z podjednostek A i B. Podjednostka B po wnikięciu do komórki docelowej łączy się z podjednostką 60 S rybosomu i hamuje translację poprzez unieczynnienie czynnika elongacyjnego EF-2. Podjednostka A tych toksyn jest natomiast odpowiedzialna za związanie się toksyny z galaktozowym receptorem błony komórkowej (62). W przypadku toksyny błoniczej wykazano, że przejście przez błonę uwarunkowane jest obecnością hydrofobowej sekwencji, położonej blisko końca C podjednostki B (63). Ta hydrofobowa sekwencja po związaniu cząsteczki z receptorem komórkowym oddziałuje prawdopodobnie z fosfolipidami błony, wymuszając konformację umożliwiającą translokację do wnętrza komórki. Sugeruje się, że fragment C-terminalny cząsteczki ulega jednocześnie odcięciu. Zmutowana cząsteczka toksyny błoniczej, w której aminokwasy hydrofobowe zastąpione są hydrofilowymi, wykazuje 100-krotne zmniejszenie toksyczności prawdopodobnie wskutek niemożności wnikięcia do komórki. Podobny mechanizm sugeruje się w przypadku innych toksyn, zbudowanych z dwóch różnych podjednostek.

### V. Mechanizm translokacji białek i odcinania pre-sekwencji

#### V-1. Translokacja przez błony

Wyróżnia się dwa typy translokacji: 1. Translokację kotranslacyjną opisaną głównie w przypadku białek sekrecyjnych (1-32) bakteryjnych (41-45) oraz wirusowych (46-50). 2. Translokację potranslacyjną, opisaną w przypadku syntetyzowanych w cytoplazmie białek *matrix* mitochondrialnej (1, 36), białek peroksysomów (37) i białka strömy chloroplastów

(34, 35). Translokacja kotranslacyjna zachodzi tylko przez błony pojedyncze, a potranslacyjna zarówno przez pojedyncze, jak i podwójne (tabela 1) (ryc. 4). W obydwu typach translokacji Blobel (64) zakłada, że dwuwartościowe ligandy rozpoznają i przyłączają się do miejsc akceptorowych błony. W modelu kotranslacyjnym (ryc. 4a), za dwuwartościowy ligand uznano sekwencję sygnałową, wiążącą się z receptorem sygnałowym błony oraz miejsce na podjednostce większej rybosomu, wiążące się z rybosomalnym receptorem błony. W modelu potranslacyjnym (ryc. 4b, c), za dwuwartościowy ligand uznano dwa odrębne regiony sekwencji sygnałowej, wiążące się z dwoma błonowymi receptorami sygnałowymi. Związanie sekwencji sygnałowej z tymi receptorami może powodować sprzężoną translokację przez błonę wewnętrzną, co ma miejsce przy przechodzeniu białka przez błonę podwójną (ryc. 4c). Rozpatruje się także możliwość istnienia dwóch odrębnych sygnałów, z których pierwszy może być kierowany do receptora błony wewnętrznej.

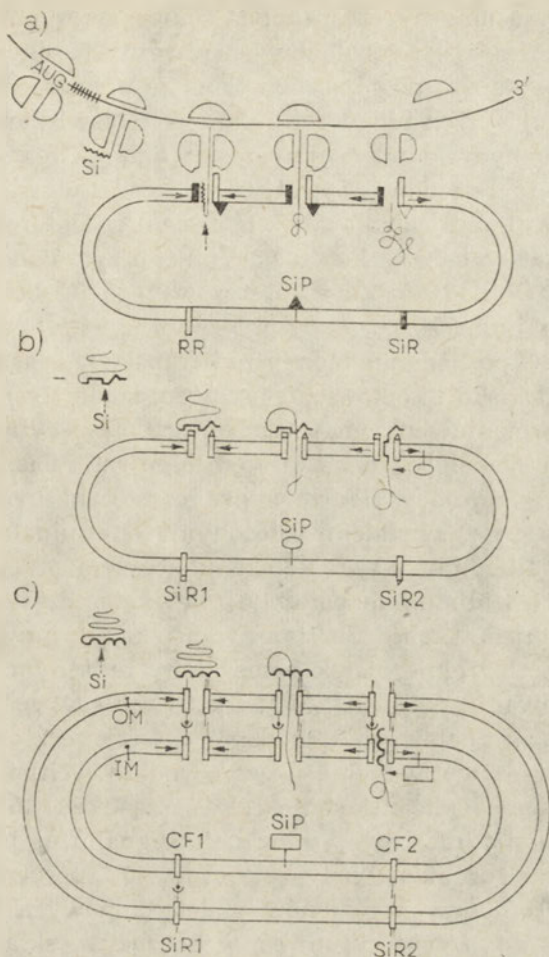
Tabela 1

Podział błon pod względem typu translokacji — według Blobela (64).

Typ translokacji	Błona
Kotranslacyjny	1. Plazmatyczna błona prokariotów 2. Wewnętrzna błona mitochondrialna 3. Błona tylakoidów mitochondriów 4. Szorstkie retikulum endoplazmatyczne
Potranslacyjny przez błonę pojedynczą	5. Zewnętrzna błona mitochondrialna 6. Zewnętrzna błona chloroplastów 7. Błona peroksysomów
Potranslacyjny przez błonę podwójną	8. Powłoka mitochondriów 9. Powłoka chloroplastów

Miejsca akceptorowe błony, wraz z sprzężoną peptydazą sygnałową tworzą tzw. „translokator”. Według Blobela (64) istnieją trzy rodzaje „translokatorów”, warunkujące translokację kotranslacyjną, potranslacyjną przez błonę pojedynczą i potranslacyjną przez błonę podwójną. Wyróżnia się 3 rodzaje błon, z których każda wykazuje tylko jeden rodzaj „translokatora” (Tabela 1).

Istnienie trzech rodzajów „translokatorów” pozwala przypuszczać, że istnieją trzy typy sekwencji sygnałowych, wykazujących powinowactwo tylko do jednego z trzech „translokatorów”. Dotychczas poznano strukturę pierwszorzędową tylko sekwencji sygnałowych kierowanych do szorstkiego retikulum endoplazmatycznego (1-32, 46-50), kilku sygnałów kierowanych do błony plazmatycznej prokariotów (42, 43) oraz jednego sygnału białka mitochondrialnego (36). Struktura pozostałych sygnałów jest nieznana (66).



**Ryc. 4.** Model trzech typów translokacji: kotranslacyjnej (a), potranslacyjnej przez błonę pojedynczą (b) i potranslacyjnej przez błonę podwójną (c) według Blobel'a (64). Si — sekwencja sygnałowa (*signal sequences*): RR — receptor dla rybosomu (*ribosome receptor*): SiR — receptor sygnałowy (*signal receptor*): SiP — peptydaza sygnałowa (*signal peptidase*) SP 1,2 — receptor sygnałowy 1,2 (*signal receptor 1,2*): CF 1,2 — czynnik sprzęgający translokację przez obie błony (*coupling factor 1,2*): OM — błona zewnętrzna (*outer membrane*): IM — błona wewnętrzna (*inner membrane*)

#### V-1.1. Translokacja przez błony retikularne

Wykrycie fragmentów sygnałowych w białkach sekrecyjnych nasunęło przypuszczenie, że unikalne pre-sekwencje oddziałują ze specyficznymi receptorami błon retikulum. Szczegółowa analiza aminokwasów pre-sekwencji tę możliwość wykluczyła. Wykazano, że sekwencje sygnałowe różnych białek sekrecyjnych, różnią się strukturą I-rzędową, jednak nie są to sekwencje unikalne (50). Różne białka sekrecyjne produkowane

przez jedną tkankę mają często podobną sekwencję sygnałową (61). Dominująca zawartość reszt hydrofobowych w różnych sekwencjach sygnałowych powoduje bardzo podobną konformację przestrzenną, stąd uważa się, że translokacja przez błony retikulum jest zjawiskiem niespecyficznym, uwarunkowanym konformacją przestrzenną sekwencji sygnałowych, a nie ich strukturą I-rzędową (50, 61, 65).

Związanie sekwencji sygnałowej z miejscem receptorowym błony retikulum następuje wyłącznie kotranslacyjnie, przy równoczesnym związaniu rybosomu. Po dodaniu do zsyntetyzowanego *in vitro* białka sekrecyjnego błon retikulum, rozpoznanie pre-sekwencji i jej odcinanie nie następuje, natomiast po podaniu błon przed translacją, następuje jej odcinanie (65, 66) (zjawisko to omówiono już w rozdziale II-1).

Dalszych argumentów przemawiających za niespecyficznym i wspólnym dla różnych sygnałów translokatorem błon retikularnych przemawia fakt, że sygnał znajdujący się wewnątrz cząsteczki może konkurować podczas translokacji z sygnałem położonym N-terminalnie (np. sygnał wewnętrzny owoalbuminy z sygnałem N-końcowym preprolaktyny) (61).

Wykrycie w owoalbuminie położonej wewnątrz cząsteczki sekwencji sygnałowej, hamującej kompetycyjnie translokację innych pre-protein wskazuje, że przechodzenie białek przez błony retikulum może odbywać się dzięki powstawaniu pętli (61). Model pętli zakłada, że 9-10 reszt lipofilnych sekwencji sygnałowych wchodzi w interakcję z apolarnym rdzeniem błony (poprzez wytworzenie wiązań wodorowych) i tworząc w ten sposób pętlę, umożliwia translokację reszty cząsteczki (67).

Oddziaływanie hydrofobowej sekwencji sygnałowej białek sekrecyjnych z apolarnym rdzeniem błony retikulum jest porównywane do oddziaływania hydrofobowych regionów białek błonowych z fosfolipidami błony. Wykazano np., że cytochrom b5, wchodzący w skład błony mikrosomów wątroby zawiera na końcu aminowym sekwencję hydrofobową, obejmującą 40 aminokwasów, odpowiedzialną prawdopodobnie za integrację tego cytochromu z błoną (68). Sekwencja hydrofobowa (23 aminokwasy) sialoglikoproteiny błony erytrocytów znajduje się wewnątrz błony erytrocytów, podczas gdy hydrofilowy N-terminalny fragment cząsteczki związany jest z glikoproteinową, zewnętrzną powierzchnią błony erytrocytów, a hydrofilowy fragment C-terminalny znajduje się po cytoplazmatycznej stronie błony (69-71).

## V-2. Odcinanie sekwencji sygnałowych

Mechanizm odcinania sekwencji sygnałowych został poznany tylko w przypadku białek z pre-sekwencją kierowaną do błony retikularnej. W jaki sposób następuje odcinanie pre-sekwencji białek bakteryjnych, a w szczególności ulegających potranslacyjnej translokacji białek organeli komórkowych, dotychczas nie wiadomo.



Odcinanie sekwencji sygnałowej podczas translokacji przez błony retikulum zachodzi przy udziale obojętnej endopeptydazy, występującej prawdopodobnie w ścianie wewnętrznej błony retikulum (64). Jest to enzym niespecyficzny gatunkowo i tkankowo, o czym świadczy fakt prawidłowego odcinania pre-sekwencji prelaktozenu łożyskowego zarówno w obecności błon retikulum trzustki psa, jak i wątroby szczura (65). O wybitnej niespecyficzności tej aminopeptydazy świadczy fakt, że różne białka sekrecyjne eukariontów oraz glikoproteiny wirusów ją kompetycyjnie hamują (47). Wskazuje to, że endopeptydaza ta nie rozpoznaje sekwencji aminokwasowej, lecz strukturę przestrzenną pre-sekwencji. Fakt, że promelityna przechodzi w promelitynę zarówno w oocycie żaby, jak i gruczole jadowym pszczoły (57) pozwala wnioskować, że endopeptydaza odcinająca sekwencje sygnałowe jest enzymem stabilnym ewolucyjnie.

Celem lokalizacji endopeptydazy w błonie retikularnej, do układu syntetyzującego *in vitro* preprolaktynę, prelaktozogen lub prehormon wzrostu, dodawano retikulum gładkie lub szorstkie (61, 66). Odcinanie presekwencji zachodziło wyłącznie w obecności retikulum szorstkiego, co dowodzi, że w retikulum gładkim endopeptydaza nie występuje. Ponadto, odcinanie presekwencji następowało wyłącznie przy kotranslacyjnej obecności błon, podczas gdy dodawanie błon potranslacyjnie nie powodowało usuwania pre-sekwencji (65, 66). Błony retikularne pozostałe po ekstrakcji dezoksychohanem i dodane do układu translacji również nie powodowały odcinania pre-sekwencji (65). Natomiast inkubacja dezoksychohanowych ekstraktów błon retikularnych z uprzednio zsyntetyzowaną preprolaktyną, preprolaktogenem łożyskowym lub prehormonem wzrostu, powodowała prawidłową konwersję tych białek (65, 66). Potranslacyjna aktywność wyizolowanej peptydazy błonowej, przy wyłącznie kotranslacyjnej aktywności peptydazy zasocjowanej z błonami świadczy, że peptydaza występuje w błonie w formie utajonej i nie występuje w zewnętrznej ścianie retikulum, ale albo w wewnętrznej ścianie, albo w cysternie retikulum (66).

Po translokacji preprolaktyny i prehormonu wzrostu do cystern retikulum obserwowano pojawianie się w nich dwóch małych peptydów, odpowiadających fragmentom sygnałowym tych białek (66), co dowodzi, że białka oraz ich odcięte sekwencje sygnałowe wspólnie przechodzą do cystern retikulum.

Celem określenia właściwości peptydazy retikularnej, badano aktywność proteolityczną ekstraktów dezoksychohanowych otrzymanych z błon mikrosomalnych, wobec syntetycznych peptydów, będących substratami trypsyny, chymotrypsyny i elastazy. Wykazano brak aktywności enzymatycznej tych ekstraktów wobec substratów enzymów o centrach aktywnych podobnych do trypsyny i elastazy, przy dużej aktywności enzymatycznej wobec substratów chymotrypsyny. Ekstrakty dezoksychohanowe wykazywały przy tym aktywność zarówno aminopeptydazy (odcinającej

po jednym aminokwasie od końca aminowego substratów z wolną terminalną grupą  $\text{NH}_2$ , jak i endopeptydazy tnącej substraty z zablokowaną terminalną grupą  $\text{NH}_2$ ). Przypuszcza się, że ekstrakty błonowe zawierają dwie endopeptydazy — jedną hamowaną w wysokich stężeniach chymostatyny oraz drugą, podobną do trypsyny, hamowaną w niskich stężeniach chymostatyny (65). Endopeptydaza wykazywała ponadto zdolność cięcia od końca karboksylowego (65).

Badania aktywności enzymatycznej surowych ekstraktów błon retikularnych pozwalają więc przypuszczać, że odcinanie pre-sekwencji sygnałowych nie zachodzi pod wpływem jednego enzymu, ale prawdopodobnie pod wpływem kompleksu peptydaz. Szczególnie wykrycie aktywności proteolitycznej względem sekwencji położonych przy końcu C pozwala zrozumieć mechanizm konwersji cząsteczek białek sekrecyjnych, posiadających dodatkowe sekwencje również na końcu karboksylowym.

## VI. Uwagi końcowe

Teoria sygnałów sformułowana początkowo dla objaśnienia translokacji białek sekrecyjnych została obecnie znacznie rozbudowana. Wykazano, że hydrofobowe fragmenty cząsteczek białkowych, położone na końcu aminowym, karboksylowym lub wewnątrz cząsteczki, wchodzi w interakcję z błonami, co stanowi uniwersalny mechanizm odróżnienia wewnątrz komórki białek sekrecyjnych, białek błonowych i białek organelli, od białek matrix cytoplazmatycznej.

Za sekwencję sygnałową, (pre-sekwencję lub sekwencję liderową) uznano każdą sekwencję hydrofobową, położoną na końcu cząsteczki lub wewnątrz cząsteczki białka, odcinaną lub nieodcinaną, odpowiedzialną za interakcję z błoną i umożliwiającą translokację cząsteczki białka (61). Mechanizm translokacji białek poprzez błony okazał się być wspólny u eukariontów, prokariontów i wirusów, co sugeruje, że powstał w ewolucji bardzo wcześnie.

Odkrycie sekwencji sygnałowych oraz zjawiska translokacji przez błony, pozwoliło na wyjaśnienie segregacji białek wewnątrzkomórkowych na białka cytoplazmatyczne i pozostałe, które są wydzielane z cytoplazmy na zewnątrz komórki lub do organelli komórkowych. Prace doświadczalne potwierdziły jednak dotychczas tylko mechanizm kotranslacyjnej translokacji białek sekrecyjnych przez błony retikulum.

Uważa się obecnie, że być może drugim rodzajem sygnałów są ugrupowania oligosacharydowe, włączane do białek w cysternach retikularnych (48, 49, 72). Funkcja tych ugrupowań została bliżej poznana wyłącznie w przypadku białek lizosomalnych (67). Wiadomo, że w cysternach retikulum do enzymów hydrolitycznych lizosomów dołączany jest mannozo-6-fosforan. Sugeruje się, że oligosacharyd jest ligandem rozpo-

znawanym przez receptory błonowe lizosomów. Dzięki temu rozpoznaniu, zachodzi ukierunkowane wydzielanie tych białek do wnętrza lizosomu (73). Ze względu na powszechność glikozylacji białek sekrecyjnych istnieje przypuszczenie, że podobny mechanizm sekrecji za pośrednictwem oligosacharydów jako sygnału, może występować w przypadku innych białek. Jednakże wobec stwierdzenia, że łańcuchy lekkie immunoglobulin, zarówno z ugrupowaniem sacharydowym, jak i bez tego ugrupowania, wykazują prawidłowe wbudowywanie do błon limfocytów. Funkcja ugrupowań cukrowych i mechanizm ukierunkowanej sekrecji pozostają jednak nadal niewyjaśnione (74).

Sugeruje się, że po dokonanej translokacji białek sekrecyjnych przez błonę retikulum, od cystern retikulum oddzielają się pęcherzyki mikrosomalne wraz z białkami sekrecyjnymi, wchodząc w skład struktur Golgiego, z których oddzielają się kolejne sekrecyjne pęcherzyki i poprzez stadium skondensowanej wakuoli wychodzą na zewnątrz komórki (72). Uważa się, że podczas wędrówki białek sekrecyjnych przez retikulum gładkie, ulegają one fosforylacji oraz tracą pro-sekwencję (19, 72, 75, 76). Proponowana droga wydzielania białek pozostaje nadal nie udowodniona.

Nie wyjaśniona pozostaje również funkcja C-terminalnej sekwencji hydrofobowej, opisanej w przypadku melityny i gastryny (53-58) oraz mechanizm zastąpienia tych sekwencji terminalnym amidem. Wydaje się, że poznanie mechanizmu translokacji toksyn przez błonę komórkową, przy udziale hydrofobowej sekwencji położonej blisko końca karboksylowego, pozwala przypuszczać, że również C-terminalne sekwencje hydrofobowe gastryny i melityny mogą pełnić jakąś funkcję w rozpoznawaniu komórek docelowych.

Doświadczalnie wyjaśniony został więc tylko etap syntezy białek sekrecyjnych na polisomach związanych z retikulum szorstkim wraz z translokacją tych białek do cystern. Wszystkie pozostałe etapy sekrecji białek oraz mechanizm segregacji białek organelli, pozostają nadal niewyjaśnione.

## PIŚMIENNICTWO

1. Freedman R., (1979), *New Scientist*, February, 376—378
2. Milstein C., Brownlee G. G., Harrison T. M. and Mathews M. B., (1972), *Nature New Biol.*, **239**, 117—120
3. Campbell P. N., Blobel G., (1976), *FEBS Lett.*, **72**, 215—226
4. Blobel G., Dobberstein B., (1975), *J. Cell Biol.* **67**, 835—851
5. Blobel G., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **68**, 1—7
6. Devillers-Thiery A., Kindt T., Scheeke G., Blobel G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 5016—5020
7. Maurer R. A., Stone R., Gorski J., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 2801—2807
8. Dannies P., Taskjian A. H. (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 1180—1189

9. Evans G. A., Rosenfeld M. G., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 2842—2847
10. Lingappa V. R., Devillers-Thierry A., Blobel G., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 2432—2436
11. Sussman P. M., Tushinski R. J., Bansroft F. C., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 29—33
12. Shields D., Blobel G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3753—3756
13. Boime I., Bogusławski S., Caine J. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **62**, 103—109
14. Cox G. J., Weintraub B. D., Rosen S. W., Maxwell E. S. (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1723—1730
15. Szczesna E., Boime I., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 1179—1183
16. Duguid J. R., Steiner D. F., Chick W. L. (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 3539—3543
17. Chang S. J., Keim P., Steiner D. F. (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 1964—1968
18. Shields D., Blobel G., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 2059—2063
19. Kemper B., Habener J. F., Ernst M. D., Potts J. T., Rich A., (1976), *Biochemistry* **15**, 15—19
20. Habener J. F., Rosenblatt M., Dee Ph., Potts J. T., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 10600—10603
21. Craig R. K., Brown P., Harrison O. S., McIlreavy D., Campbell P. N., (1976), *Biochem. J.*, **160**, 57—74
22. Lingappa V. R., Lingappa J. R., Prasad R., Ebner K. E., Blobel G., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 2338—2343.
23. Gay P., Denamur R., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **41**, 266—272
24. Blobel G., Dobberstein B., (1975), *J. Cell. Biol.*, **767**, 852—862
25. Harrison O. S., Craig R. K., Campbell P. N., (1976), *Bioch. Soc. Trans.* **4**, 340—341
26. Burstein Y., Schechter I., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 145—151
27. Burstein Y., Kantor F., Schechter I., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 2604—2608
28. Schechter I., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **8**, 2256—2260.
29. Schechter I., McKean D. J., Guyer R. Terry W., (1975), *Science* **188**, 160—162.
30. Schechter I., Burstein Y., (1976), *Biochem. J.*, **153**, 543—550.
31. Schechter I., Burstein Y., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **68**, 489—496.
32. Burstein Y., Schechter I., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 716—720.
33. Abreu S. L., Bancroft F. C., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **82**, 1300—1305.
34. Highfield P. E., Ellis J., (1978), *Nature* **271**, 420—424.
35. Dobberstein B., Blobel G., Chua N. H. (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 1082—1085.
36. Maccacchini M., Rudin Y., Blobel G., Schatz G., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci.* **76**, 343—347.
37. Goldman B. M., Blobel G., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 5066—5070.
38. Michael R., Neupert W., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 53—67.
39. Burke J., P., Beattie D. S. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 1—11.
40. Dianoux A. Chl., Bof M., Cesarini R., Reboul A., Vignais P. V. (1976), *Eur. J. Biochem.* **67**, 61—66.
41. Smith W. P., Tsai P. C., Thompson R. C., Davis B. D. (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 2830—2834.

42. Bedouelle H., Bassford Ph. J., Fowler A. V., Zabin I., Beckwith J., Hofning M., (1980), *Nature* **285**, 78—81.
43. Emr S. D., Hedgpeth J., Clement J. M., Silhavy J., Houfning M., (1980), *Nature*, **285**, 82—85.
44. Silhavy T. J., Shuman H. A., Beckwith J., Schwartz M., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 5411—5415.
45. Moreno F., Fowler A. V., Hall M., Silhavy T. J., Zabin I., Schwartz M., (1980), *Nature*, **286**, 356—359.
46. Morrison T. G., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6955—6962.
47. Lingappa Y. R., Katz F. N., Lodish H. F., Blobel G., (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8667—8670.
48. Toneguzzo F., Ghosh H. P., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 1516—1520.
49. Toneguzzo E., Chosh H. P., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 715—719.
50. Steiner D. E., (1979), *Nature*, **279**, 674—675.
51. Sessa G., Freer J. H., Colacicco G., Weismann G., (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 3575—3581.
52. Knöpel E., Eisenberg D., Wickner W., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4177—4181.
53. Kreil G., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 558—566.
54. Kindäs-Mügge I., Frasel L., (1976), *J. Mol. Biol.*, **105**, 1777—1781.
55. Suchanek G., Kreill B. G., (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 975—978.
56. Suchanek G., Kindäs-Mügge I., Kreil G. (1975), *Eur. J. Biochem.*, **60**, 309—315.
57. Kindäs-Mügge I., Lane C. D., Kreil G. (1974), *J. Mol. Biol.*, **87**, 461—462.
58. Noyes B. E., Mevarech M., Stein R., Agarwal K. L., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**, 1770—1774.
59. Jacobs J. W., Poots J. T., Norman H. B., Habener J. F., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 10600—10603.
60. Lingappa V. R., Shields D., Woo S. L., Blobel G., (1978), *J. Cell Biol.*, **79**, 567—572.
61. Lingappa V. R., Lingappa J. R., Nlobel G. (1979) *Nature*, **281**, 117—121.
62. Hughes R. C., (1979), *Nature*, **281**, 526—527.
63. Boquet P., Silvermann M. S., Pappenheimer A. M., Vernon W. B., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 976—985.
64. Blobel G. P., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 1496—1500.
65. Strauss A. W., Zimmerman M., Boime I., Ashe B., Mumford R. A., Alberts A. W., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**, 4225—4229.
66. Jackson R. C., Blobel G., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 5598—5602.
67. Newmark P., (1979), *Nature* **271**, 420—424.
68. Spatz L., Strittmater P., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 1042—1046.
69. Segrest J. P., Jackson R. L., Marchesi V. P., Guyer R. B., Terry W., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 964—969.
70. Bretscher M. S. (1973), *Science*, **181**, 622—629.
71. Bretscher M. S., (1975), *J. Mol. Biol.*, **198**, 831—833.
72. Palade G., (1975), *Science*, **189**, 347—358.
73. Marx J. L. (1980) *Nature*, 164—167.
74. Melchers F., Anderson J., (1974), *Adv. Cytopharmacol.*, **2**, 225—235.
75. Habener J. F., Kemper B., Potts J. T. Jr., Rich A., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **67**, 1114—1121.
76. Habener J. F., Potts J. T. Jr., Rich A., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 3893—3899.



DANUTA KIEREK-JASZCZUK

## Heterogenność fosfatazy alkalicznej ssaków

## Heterogeneity of mammalian alkaline phosphatase

### *Spis treści*

- I. Wstęp
- II. Występowanie enzymu i jego funkcja
  - II-1. Rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe
  - II-2. Miejsce syntezy
  - II-3. Funkcja
- III. Alkaliczna fosfataza surowicy krwi jako kompleks izoenzymów o różnym pochodzeniu tkankowym
  - III-1. Kompleks izoenzymów wątrobowo-kostnych
  - III-2. Izoenzym jelitowy
  - III-3. Izoenzym łożyskowy
- IV. Skład i proporcje izoenzymów alkalicznej fosfatazy surowicy człowieka
  - IV-1. Profil izoenzymatyczny zdrowych, dorosłych osobników
  - IV-2. Profil izoenzymatyczny w różnych stanach fizjologicznych
  - IV-3. Profil izoenzymatyczny w różnych stanach patologicznych
- V. Polimorfizm elektroforetyczny fosfatazy alkalicznej tkanek i narządów
  - V-1. Polimorfizm genetyczny fosfatazy alkalicznej łożyska ludzi — sugestia odnośnie genetycznej kontroli fosfatazy innych tkanek
- VI. Polimorfizm genetyczny fosfatazy alkalicznej surowicy krwi zwierząt wybranych gatunków
- VII. Uwagi końcowe

### *Contents*

- I. Introduction
- II. Enzyme location and function
  - II-1. Intracellular location
  - II-2. Site of synthesis
  - II-3. Function
- III. Serum alkaline phosphatase as a complex of isoenzymes of different tissue origin
  - III-1. Liver- and bone isoenzyme complex
  - III-2. Intestinal isoenzyme
  - III-3. Placental isoenzyme

- IV. Composition and ratio of alkaline phosphatase isoenzymes in man's serum
  - IV-1. Isoenzyme profile of healthy adult individuals
  - IV-2. Isoenzyme profile under various physiological conditions
  - IV-3. Isoenzyme profile under various pathological conditions
- V. Polymorphism of alkaline phosphatase in tissues and organs
  - V-1. Genetic polymorphism of alkaline phosphatase in human placenta — suggestions with regard to genetic control of phosphatase in other tissues
- VI. Genetic polymorphism of serum alkaline phosphatase in some animal species
- VII. Concluding remarks

## I. Wstęp

Fosfataza alkaliczna (fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych — 3.1.3.1.) jest mało swoistym enzymem hydrolizującym w alkalicznym środowisku szereg monofosforanów organicznych, z których takie jak: fenylfosforan, p-nitrofenylfosforan, beta-glicerofosforan, czy też monofosforan fenoloftaleiny znalazły pospolite zastosowanie jako substraty oznaczania aktywności tego enzymu przy użyciu standardowych metod (1). Wykazano jednakże, że oprócz głównej zdolności do hydrolizowania monofosforanów enzym ma także zdolność hydrolizowania organicznych (2, 3, 4) i nieorganicznych (5, 6) pirofosforanów. Stwierdzono, że w pH obojętnym, a więc „fizjologicznym”, nieorganiczny pirofosforan jest hydrolizowany z podobną szybkością jak monofosforan (4), chociaż w pH 10 enzym oczyszczony z ludzkiej wątroby rozkładał p-nitrofenolan sodu 7 razy efektywniej niż nieorganiczny pirofosforan (7).

Na przestrzeni ostatnich kilkadziesiąt lat zgromadzono wiele informacji o fosfatazie alkalicznej i przedstawiono je nie tylko w setkach prac źródłowych, ale także w szeregu opracowaniach monograficznych (8, 9, 10, 11, 12). Również w polskim piśmiennictwie znajdują się prace omawiające pewne aspekty tego enzymu, m.in. publikacje w *Postęпах Biochemii* (13, 14).

## II. Występowanie enzymu i jego funkcja

Fosfataza alkaliczna jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w świecie zwierzęcym. Jej obecność odnotowano u człowieka i zwierząt wyższych wielu gatunków, w tym także hodowlanych takich jak: kozy (15, 16, 17), owce (18, 19, 20), świnię (21, 22) czy bydło (23, 24, 25).

Fosfataza alkaliczna występuje w wielu tkankach i płynach ustrojowych, jednakże w obrębie tkanek rozmieszczenie tego enzymu nie jest równomierne. Najwyższą aktywność enzymatyczną wykazują komórki nabłonkowe (rąbek szczoteczkowy) mikrokosmków jelita cienkiego (26, 27) i bliższych kanalików nerki (28, 29, 30), komórki nabłonka kanalików



zółciowych (31), trofoblasty zespólni łożyska (32), osteoblasty (33), osteocyty i hypertroficzne komórki chrząstki (34). Enzym znaleziono także w niektórych płynach ustrojowych. Oprócz surowicy występuje on w mleku (35), siarze (36), zółci (37), limfie jelita (38, 39, 40), a także w moczu (41, 42) i kale (43).

### II-1. Rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe

Badania przeprowadzone z zastosowaniem frakcjonowanego wirowania dowiodły, że fosfataza alkaliczna jest związana z frakcją mikrosomów (44, 45). Obserwacje z mikroskopu elektronowego wykazały, że enzym znajduje się w błonach komórkowych (26, 27) i stanowi integralną część zewnętrznego listka podwójnej ściany komórki (31). Za ścisłym związaniem enzymu z błoną komórkową przemawia też konieczność użycia w celu uwolnienia go do roztworu takich metod jak: ekstrakcja butanolem (44, 46, 47, 48), ultrasonifikacja (49) czy stosowanie detergentów (SDS, Triton X-100) (50).

Fosfataza jelita ludzkiego stanowi jednakże rozpuszczalny składnik komórek śluzówki, podczas gdy fosfataza ludzkiej wątroby występuje we frakcji struktur komórkowych takich jak jądra, mitochondria czy lizosomy (51). Wydaje się zatem, że rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe alkalicznej fosfatazy zależy od rodzaju tkanki w której enzym ten występuje.

### II-2. Miejsce syntezy

Miejscem syntezy fosfatazy alkalicznej w komórce mogą być, tak jak w przypadku wielu innych białek enzymatycznych — rybosomy szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, a miejscem składowania — wakuole. Nie można jednak wykluczyć, że miejscem syntezy enzymu jest aparat Golgiego w którym zachodzi synteza wielu składników błon komórkowych. Fosfataza alkaliczna może być w nim syntetyzowana jako białko strukturalne błony, nie mające aktywności enzymatycznej i nabierające jej dopiero wtedy, gdy w alkalicznym środowisku stanie się ona częścią zewnętrznymi powierzchni błon (8).

### II-3. Funkcja

Już od dawna rolę fosfatazy kostnej łączono z procesem osteogenezy (52). Z kolei obecność enzymu na powierzchniach tkanek związanych z transportem składników odżywczych sugerowała, że jego rolę można by wiązać z aktywnym transportem i absorpcją cukrów (53), czy też

tluszczów (54). Rozważano też możliwość, że fosfataza alkaliczna może brać udział w regulowaniu poziomu NADP w tkankach, jak też w regulowaniu stosunku NADP do NAD (55). Na jeszcze inną funkcję enzymu wskazały badania Fishmana i Lin (31), którzy przypisują fosfatazie alkalicznej udział w regulowaniu wymiarów błon komórkowych.

Mimo, że wyniki jeszcze wielu innych prac są spójne z niektórymi z przytoczonych powyżej hipotez, nadal brak precyzyjnego określenia roli i stopnia zaangażowania enzymu w poszczególne procesy fizjologiczne. Jakakolwiek jednak jest rola enzymu występującego w tkankach i narządach, wydaje się, że fosfataza alkaliczna krążąca w strumieniu krwi pozostaje metabolicznie nieczynna (9), chociażby dlatego, że w surowicy brak odpowiednich substratów rozkładanych zarówno przez fosfatazę jak i przez inne niespecyficzne enzymy (56). Także funkcja fosfatazy innych płynów ustrojowych nie jest bliżej sprecyzowana i wydaje się, że obecność w nich enzymu nie ma metabolicznego znaczenia, a jest następstwem dostawania się do tych płynów błon komórek obumierających bogatych w fosfatazę alkaliczną (9).

### III. Alkaliczna fosfataza surowicy krwi jako kompleks izoenzymów o różnym pochodzeniu tkankowym

Autorzy pierwszych prac traktujących o fosfatazie alkalicznej surowicy krwi domniemywali jej kostne (57) lub też leukocytarne (58) pochodzenie. Bodansky (53, 59) pierwszy wystąpił przeciwko traktowaniu alkalicznej fosfatazy surowicy jako enzymu o jednorodnym pochodzeniu. Hipoteza jego znalazła potwierdzenie dzięki rozwojowi nowoczesnych metod frakcjonowania mieszanin białkowych, na drodze zastosowania których można było wykazać liczne różnice we właściwościach fosfataz pochodzących z różnych tkanek. Pomimo, że swoiste dla danej tkanki izoenzymy<sup>1)</sup> fosfatazy nie wykazują zbyt drastycznych różnic w takich właściwościach jak: optimum pH (8), stała Michaelisa (60) czy też współczynnik sedymentacji (8, 61), to jednak różnią się w dużo większym stopniu swoistością substratową (62), wrażliwością na czynniki chemiczne (63, 64, 65), reakcjami immunologicznymi (66, 67), podatnością na inaktywację cieplną (68) czy też na denaturujące działanie mocznika (69) i ruchliwością elektroforetyczną na takich podłożach jak: żel agarowy (70, 71), agarozowy (72), skrobiowy (60, 66, 73, 74), poliakryloamidowy (75, 76) i octan celulozy (77, 78, 79).

---

<sup>1)</sup> użyty w pracy termin „izoenzym” odnosi się do białek posiadających aktywność fosfatazową, które różnią się miejscem występowania, ruchliwością elektroforetyczną, a także właściwościami biochemicznymi i immunologicznymi.

Tabela 1.

Charakterystyka ludzkiej fosfatazy alkalicznej (wg pozycji 85).

	Alkaliczna fosfataza łożyska	Alkaliczna fosfataza jelita	Alkaliczne fosfatazy niełożyskowe, nie-jelitowe (z wątroby, kości itd.)
<b>I. Właściwości katalityczne</b>			
(i) swoistość substratowa	Hydrolizuje beta-glicerofosforan i fenylfosforan z podobną szybkością (inne bardziej aktywne w stosunku do fenylfosforanu)	Hydrolizuje AMP i PP <sub>1</sub> szybciej w stosunku do p-nitrofenylfosforanu niż enzymy nie-jelitowe	Enzymy tej grupy mają podobne względne szybkości hydrolizowania różnych substratów
(ii) inhibicja			
(a) przez kwasy żółciowe	Nie badano	Nie hamowana	Hamowana
(b) przez L-fenylalaninę	Hamowana	Hamowana	Nie hamowana
<b>II. Właściwości molekularne</b>			
(i) odporność na denaturację	Zupełnie odporna	60 min.	Kostna — 5-10, wątrobowa 30-40 min.
(a) półokres inaktywacji w 55°C	8 M	6-7 M	Wątrobowa — 3 M, kostna i nerkowa — mniej niż 3 M
(b) stężenie mocznika dla nieodwracalnej inaktywacji			Wątrobowa bardziej odporna niż kostna
(c) niskie pH	Nie badano	Bardziej odporna niż enzymy nie-jelitowe	Opóźnia
(ii) wpływ neuraminidazy na ruchliwość elektrofretyczna	Opóźnia	Nie opóźnia	
(iii) charakterystyki immunochemiczne	Antygenowo odrębna, wykazuje częściowo reakcje krzyżowe z enzymem jelitowym	Antygenowo odrębna, wykazuje częściowo reakcje krzyżowe z enzymem łożyskowym	Antygenowo odrębna od enzymów łożyska i jelita. Przeciw-surowica uzyskana przeciw fosfatazie wątroby nie wykazuje reakcji krzyżowej ani z fosfatazą kości ani z fosfatazą nerki

Ponieważ izoenzymy fosfatazy uwolnione z poszczególnych tkanek do krwi zachowują tam w pełni swoje odrębne właściwości (12), istnieje możliwość określenia składu izoenzymatycznego fosfatazy surowicy, co wykorzystuje się w badaniach podstawowych i w diagnostyce klinicznej. Dużo bardziej zaawansowane badania fosfatazy człowieka w porównaniu z fosfatazą zwierzęcą, wykazały, że w surowicy zdrowych, dorosłych osób z łatwością można zidentyfikować izoenzymy z wątroby (68, 75), kości (43, 68), jelita (80), a u ciężarnych także z łożyska (67, 81, 82).

Uwzględniając katalityczne (szybkość hydrolizowania substratów czy też odpowiedź na pewne inhibitory) i molekularne (stabilność w różnych warunkach czy też ruchliwość elektroforetyczna) właściwości poszczególnych izoenzymów, a przede wszystkim ich wzajemne pokrewieństwo immunologiczne, izoenzymy alkalicznej fosfatazy pochodzące z różnych źródeł podzielono na 3 klasy antygenowe (83), (Tabela 1).

Największe różnice zaznaczają się pomiędzy izoenzymami zaliczanymi do różnych klas antygenowych. Pomiedzy izoenzymami pochodzącymi z kości, wątroby, śledziony i częściowo z nerki, różnice już nie są tak wyraźne, dlatego też zaliczane są do wspólnej klasy. Chociaż są one niewątpliwie najbardziej sobie pokrewne, można wykazać, że antysurowica uzyskana przeciw fosfatazie wątroby nie reaguje z fosfatazami z kości czy nerki (82), a reakcje krzyżowe obserwowane wcześniej mogły wynikać z heterogenności immunogenu używanego do produkcji surowicy odpornościowej. Kolejne dwie klasy stanowią częściowo ze sobą spokrewnione izoenzymy pochodzące z jelita i łożyska. Wykazane bliskie podobieństwo alkalicznej fosfatazy łożyskowej i jelitowej ludzi (84), wskazuje zdaniem autorów na podobną sekwencję aminokwasową i wspólną strukturę przynajmniej części molekuł obu enzymów. Mimo immunologicznego pokrewieństwa enzymów obu tych klas, różnice pomiędzy fosfatazą łożyskową i fosfatazami nie-łożyskowego pochodzenia, a także pomiędzy fosfatazą jelitową i fosfatazami niejelitowymi są bardzo wyraźne. Moss (85) stwierdza nawet, że fosfatazy jelitowe zwierząt różnych gatunków są do siebie bardziej podobne niż fosfatazy różnych tkanek w obrębie tego samego gatunku.

### III-1. Kompleks izoenzymów wątrobowo-kostnych

Izoenzym wątrobowy ma wiele cech wspólnych z izoenzymem kostnym, dlatego często operuje się pojęciem kompleksu wątrobowo-kostnego. Oba izoenzymy wykazują bardzo subtelne różnice w ruchliwości elektroforetycznej, przez co na żelu skrobiowym, zwłaszcza gdy ich aktywność jest zbliżona, są trudne do odróżnienia (73). Łatwo można je natomiast rozdzielić w żelu agarowym (71), poliakrylamidowym (75, 76, 86), czy też na octanie celulozy (79). Oba izoenzymy są mało odporne na ogrzewanie (60) i oba są denaturowane przez mocznik zastosowany w wysokich

stężeniach (87, 88); izoenzym kostny jest jednak od wątrobowego bardziej termolabilny (68) i jest w nieco większym stopniu denaturowany przez mocznik (69, 89). Jest on także bardziej niż wątrobowy wrażliwy na denaturujące działanie kwaśnego pH (89). Oba izoenzymy są nieznacznie tylko hamowane przez L-fenylalaninę (54, 89), ale w dużym stopniu przez L-homoargininę (90, 91, 92) i imidazol (93). Oba zawierają w położeniu końcowym dostępne dla działania neuraminidazy reszty kwasu sjałowego (N-acetyloneuraminowego), po odłączeniu których obniżają swą ruchliwość elektroforetyczną (4, 71).

### III-2. Izoenzym jelitowy

W porównaniu z ruchliwością elektroforetyczną izoenzymów: wątrobowego, kostnego czy łożyskowego, ruchliwość elektroforetyczna izoenzymu jelitowego jest najmniejsza (39, 71). Tak jak i fosfataza wyizolowana z jelita (94) izoenzym ten jest całkowicie odporny na działanie neuraminidazy, pod wpływem której nie zmienia się jego ruchliwość elektroforetyczna (71, 95, 96). Enzym ten nie zawiera więc kwasu sjałowego, chociaż zawiera go fosfataza jelitowa zarodków ludzkich (97). Izoenzym jelitowy jest w dużym stopniu hamowany przez L-fenylalaninę (64, 89, 98, 99) i inaktywowany przez przeciwciało wytworzone przeciwko fosfatazie jelita (80). Na inaktywację cieplną, podobnie jak i na denaturujące działanie mocznika (100, 101) jest bardziej odporny niż kompleks wątrobowo-kostny, ale mniej niż izoenzym łożyskowy. Optimum działania tego enzymu przypada na pH 9,8 (96). Wydaje się, że izoenzym jelitowy jest niejednorodny. W oczyszczonym preparacie fosfatazy alkalicznej wyizolowanej z jelita szczura zidentyfikowano trzy główne formy, które różniły się swoistością substratową i składem glikoproteidowym (97). Zaobserwowano również, że L-fenylalanina hamuje fosfatazę rąbka szczoteczkowego kosmków jelita, natomiast nie działa na fosfatazę z rdzenia kosmków (54). Na tej podstawie wysunięto hipotezę o przemianach metabolicznych jakim podlega izoenzym jelitowy przechodząc do światła jelita (patrz także rozdział IV-1). Wydaje się, że uzyskano dalsze dowody popierające tę hipotezę (102). Z dwunastnicy ludzi wyodrębniono także dwa izoenzymy o różnej termostabilności, z których termostabilny po znalezieniu się we krwi krążącej obwodowo staje się nie do odróżnienia od izoenzymu kostnego (103).

### III-3. Izoenzym łożyskowy

Izoenzym ten podczas elektroforezy migruje w pobliżu kompleksu wątrobowo-kostnego, z ruchliwością elektroforetyczną mniejszą niż izoenzym kostny, ale znacznie większą niż izoenzym jelitowy (104). Ze wszyst-

kich znanych izoenzymów fosfatazy alkalicznej ten jest najbardziej odporny na ogrzewanie (71, 105) i na denaturujące działanie stężonych roztworów mocznika (88, 100), a także na działanie EDTA (106). Jest natomiast wrażliwy na działanie neuraminidazy (95, 107). Jest także hamowany przez L-fenylalaninę i L-tryptofan (8, 108) i strącany przez przeciwciasto przygotowane przeciwko alkalicznej fosfatazie łożyska (67). Izoenzym łożyska ludzkiego wykazuje optimum działania w pH 10,6 (109).

#### **IV. Skład i proporcje izoenzymów alkalicznej fosfatazy surowicy człowieka**

##### **IV-1. Profil izoenzymatyczny zdrowych, dorosłych osobników**

Pomimo istnienia kilku źródeł pochodzenia alkalicznej fosfatazy surowicy, homeostaza tego enzymu jest tak duża, że całkowita aktywność enzymu zdrowych, dorosłych osób mieści się w wąskim przedziale (110). O ile, jak już wspomniano, na profil izoenzymatyczny alkalicznej fosfatazy surowicy mogą składać się izoenzymy z wątroby, kości czy jelita, to w literaturze znajdują się sprzeczne dane odnośnie ich wzajemnej proporcji. Na podstawie badań elektroforetycznych sugeruje się, że w surowicy dorosłych osób przeważa izoenzym wątrobowy (70, 73, 75, 111), co zostało częściowo poparte badaniami immunologicznymi (82). Natomiast wyniki badań przeprowadzone z zastosowaniem testu hamowania ciepłego, czy też oszacowujące wpływ mocznika, wskazują na takie same proporcje izoenzymu wątrobowego, jak i kostnego (68), lub nawet przewagę izoenzymu kostnego (112). Fishman i Ghosh (8) stwierdzają natomiast, że głównym źródłem alkalicznej fosfatazy surowicy zdrowych, dorosłych osób jest śluzówka jelita. O ile jednak u niektórych osób może przeważać forma typowego izoenzymu jelitowego, a więc odpornego na ogrzewanie i wrażliwego na L-fenylalaninę (wtedy w surowicy można zidentyfikować wolno migrujący prążek izoenzymu jelitowego), to pozostali osobnicy, mają zapewne tylko więcej metabolicznie zmodyfikowanej formy izoenzymu jelitowego i w ich surowicy nie stwierdza się obecności wolno migrującego prążka tego enzymu. Ta forma enzymu będąca odporna na ogrzewanie i niewrażliwa na L-fenylalaninę jest zdaniem autorów nieodróżnialna od fosfatazy pochodzenia wątrobowego, co zgadza się z wynikami cytowanych powyżej prac, wskazujących na wątrobę jako główne źródło fosfatazy surowicy.

##### **IV-2. Profil izoenzymatyczny w różnych stanach fizjologicznych**

Skład i proporcje poszczególnych izoenzymów fosfatazy alkalicznej obecnej w surowicy podlegają na ogół tylko niewielkim, genetycznie zakodowanym fluktuacjom (77, 110), jednak w pewnych stanach fizjologicz-

nych stosunki te zostają naruszone i odbiegają od normy charakteryzującej, zdrowych, dorosłych osobników.

W surowicy noworodków (113), dzieci i młodzieży (114) oraz po raz drugi w starszym wieku (89, 115) można stwierdzić podwyższenie całkowitej aktywności enzymu. Zmniejszona ruchliwość szybkiego prążka w surowicy noworodków i dzieci w stosunku do tempa migracji tego prążka u osobników dorosłych (116), a także inne jeszcze jego właściwości wskazują, że u noworodków i dzieci dominujący udział ma izoenzym kostny (68, 87), a także, choć w mniejszym stopniu, izoenzym jelitowy (87).

W surowicy osób będących w starszym wieku zidentyfikowano obecność izoenzymu wątrobowego (71), bądź wątrobowego i kostnego (118). Większość badaczy stoi jednak na stanowisku, że podwyższona aktywność enzymu w surowicy ludzi starych jest spowodowana zwiększonym udziałem izoenzymu wątrobowego (89, 117, 118).

Także w surowicy kobiet będących w zaawansowanej ciąży stwierdzono znacznie podwyższoną całkowitą aktywność alkalicznej fosfatazy (79, 118, 119). Aczkolwiek w literaturze znajdują się sugestie o kostnym pochodzeniu fosfatazy surowicy ciężarnych (74), to jednak dokładne badania pozwoliły wykazać, że zwiększona aktywność enzymu surowicy jest spowodowana obecnością w niej dodatkowego komponentu jakim jest izoenzym łożyskowy (67, 81, 82, 104). Cechuje go odporność na ogrzewanie (81, 105, 113), na różne czynniki chemiczne (87, 113), neuraminidazę (120), a także odrębne w stosunku do innych izoenzymów właściwości immunologiczne (67). Oprócz izoenzymu łożyskowego w surowicy krwi ciężarnych występuje izoenzym wątrobowy, czasami także jelitowy, ale niekiedy można zidentyfikować tylko izoenzym łożyskowy (79). Syntetyzowany przez łożysko, ale pod genetyczną kontrolą zarodka (121), izoenzym ten przenika do krwi matki i w krwi zarodka nie ma go w ogóle. Określając w stosunku do fosfatazy surowicy krwi zarodka efekty ogrzewania (68), działania mocznika (87) czy też EDTA (106), a także oceniając szybkość migracji (113) i reakcję immunologiczną z przeciwciałem wytworzonym przeciwko fosfatazie łożyska (67) wykazano, że fosfataza ta ma inne właściwości niż izoenzym łożyskowy (Tabela 2).

Wykazano, że aczkolwiek jelito wszystkich ludzi zawiera fosfatazę, do surowicy poszczególnych osób izoenzym jelitowy przenika w różnej ilości (122), tak że rejestruje się go tylko u 20-60% ludzi (123). Wykazano, że wolno migrujący prążek izoenzymu jelitowego występuje przede wszystkim w surowicy krwi ludzi z grupą krwi B i O (124, 125), których ślina zawiera substancję antygenową ABH (122, 125). Osobnicy ci posiadają fizjologicznie zwiększone o 25% wartości całkowitej aktywności enzymu surowicy (80, 122). Wykazano także wpływ czynników pozagenetycznych na obecność tego izoenzymu. Szczególnie dobrze jest on widoczny w surowicy ludzi pozostających na diecie wysokotłuszczowej (126, 127) i wysokobiałkowej (128). Za związkiem pomiędzy jego obecnością i stanem

Tabela 2

Właściwości fosfatazy alkalicznej łożyska ludzkiego, a także enzymu obecnego w surowicy ciężarnej matki i w surowicy zarodka (wg pozycji 103).

Cecha charakterystyczna	Pochodzenie enzymu		
	Łožysko	Surowica matki	Surowica zarodka
Odporność na ogrzewanie	+	+	—
Odporność na mocznik	+	+	—
Odporność na EDTA	+	+	—
Hamowanie L-fenylalaniną	+	+	—
Reakcja z przeciwciałem uzyskanym przeciw fosfatazie łożyska	+	+	—
Półokres biologicznego trwania	7 dni	7 dni	Nieznany
Wpływ $Mg^{++}$ przy niskich stężeniach substratu	Bez efektu	Bez efektu	Zwiększona aktywność

odżywiania przemawiają także obserwacje, że brak go w surowicy ludzi gorzej odżywiających się, a więc u pacjentów hospitalizowanych, kobiet rodzących czy też noworodków (61).

#### IV-3. Profil izoenzymatyczny w różnych stanach patologicznych

Na ogół zwiększoną całkowitą aktywność alkalicznej fosfatazy surowicy obserwuje się równolegle ze zwiększeniem aktywności albo izoenzymu kostnego, albo izoenzymu wątrobowego (76, 126).

Tak na przykład w surowicy osób obarczonych chorobami kośćca zwiększonej całkowitej aktywności enzymu towarzyszy zwiększona aktywność izoenzymu kostnego. Zjawisko to zaobserwowano też wielokrotnie w przypadkach przebiegających ze zwiększoną aktywnością osteoblastów, np. w zniekształcającym zapaleniu kości (choroba Pageta) (129), ale też obserwowano je w przypadkach nadczynności przytarczyc (110) i chronicznego uszkodzenia nerek (130).

Z kolei w surowicy osób z chorobami wątroby (68, 72, 76, 111, 131) znajduje się stosunkowo więcej fosfatazy pochodzenia wątrobowego (68, 111). Rhone i Mizuno (132) byli w stanie wykazać pewne różnice we właściwościach izoenzymu wątrobowego surowicy krwi pacjentów z marskością wątroby bądź żółtaczką zaporową, a izoenzymem wątrobowym występującym u zdrowych osób.

W surowicy osób z chorobami jelita nigdy nie obserwuje się zwiększonego udziału izoenzymu jelitowego, aczkolwiek więcej tego enzymu znaleziono w surowicy osób z łojotokiemi (133), chorych na marskość wątroby (61) i z chroniczną niewydolnością nerek (130, 134). W surowicy osób dotkniętych hipofosfatacją stwierdzono wyłącznie obecność izoenzy-



mu jelitowego (135, 136), także aktywność fosfatyz wszystkich oprócz jelita tkanek była mocno zredukowana (137, 138).

Z kolei w surowicy osób z odrzutami przeszczepu nerki wykazano obecność izoenzymu nerkowego, który normalnie w surowicy nie występuje (139, 140).

W hyperfosfatazemicznych surowicach pacjentów dotkniętych nowotworami wykryto łożyskopodobną fosfatazę produkowaną przez komórki nowotworowe guza (141, 142). W surowicy niektórych chorych na nowotwór płuc można zidentyfikować immunologicznie pokrewny izoenzymowi łożyskowemu, termostabilny izoenzym Regana (143, 144, 145). Podobnie jak izoenzym łożyskowy izoenzym Regana jest hamowany przez L-fenylalaninę. Oba izoenzymy mają podobną szybkość migracji, którą obniża trawienie neuraminidazy (143, 144, 146, 147). Porównując N-końcową sekwencję aminokwasów, mapę peptydów, ciężar cząsteczkowy i punkt izoelektryczny wykazano jednakże różnice w budowie fosfatazy łożyska i guza. Źródłem izoenzymu Regana w surowicy są zapewne subkomórkowe struktury tkanki nowotworowej. Histochemiczne badania nowotworowej tkanki jajników wykazały, że ten hamowany przez L-fenylalaninę izoenzym występuje przede wszystkim w przestrzeniach pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną ścianą komórkową mitochondriów, rzadziej w aparacie Golgiego, retikulum endoplazmatycznym, czy też błonach jądra komórkowego, podczas gdy drugi, hamowany przez L-homoargininę, ale nie hamowany przez L-fenylalaninę izoenzym jest związany z błonami komórkowymi (149). Trzeba jednakże zauważyć, że izoenzym Regana zidentyfikowano też w surowicy pacjentów dotkniętych chorobami innymi niż o etiologii nowotworowej (145, 150, 151). Daje to podstawę do przypuszczeń, że nie jest to izoenzym swoisty dla tkanki nowotworowej (151), aczkolwiek jego obecność może mieć związek z predyspozycją do rozwoju choroby nowotworowej (150).

Z kolei w surowicy pacjentów z rakowatością opłucnej (152), gruczolako-rakiem ogona trzustki (153), a także z przerzutowym gruczolako-rakiem przewodów żółciowych (154) znaleziono izoenzym Nagao'y. Ze względu na swą termostabilność jest on pokrewny izoenzymowi Regana. Jest też hamowany przez L-fenylalaninę. W odróżnieniu od innych izoenzymów jest on także hamowany przez L-leucynę, L-izoleucynę, L-walinę i EDTA.

W surowicy osób chorych na raka wątrobowo-komórkowego odkryto jeszcze inną łożyskopodobną formę alkalicznej fosfatazy — wariant hepatoma (155). Pod względem właściwości fosfataza ta jest także częściowo podobna do izoenzymu wątrobowego i częściowo do izoenzymu Nagao'y (156).

## V. Polimorfizm elektroforetyczny fosfatazy alkalicznej tkanek i narządów

Szczególnie w przypadku jelita i nerki, ale także w mniejszym stopniu w przypadku kości i wątroby (157), można wykazać elektroforetycznie heterogenność fosfatazy alkalicznej (85, 158).

Najszybciej migrującej głównej frakcji ekstraktów tkanek bogatych w fosfatazę alkaliczną towarzyszy zazwyczaj kilka wolniej migrujących frakcji pobocznych. Najprawdopodobniej ta obserwowana heterogenność jest wynikiem modyfikacji pojedynczego rodzaju cząsteczek a powstałe formy potomne różnią się ładunkiem, a nie wielkością cząsteczek (159, 160) czy też ich aktywnością (85). Przyczynę tej heterogenności upatruje się częściowo w metodach uwalniania enzymu (161), a częściowo w różnej zawartości kwasu sjałowego (158). Różną zawartość tego kwasu stwierdzono w głównej frakcji fosfatazy nerki, która po potraktowaniu neuraminidazą migrowała jako pojedyncza, zwarta frakcja (162), a także w stosunku do fosfatazy wątroby (163). Jednakże jedna z najbardziej heterogennych fosfataz — fosfataza jelita (159), w ogóle nie zawiera w położeniu końcowym kwasu sjałowego (94, 163). Wykazano, że wolniej migrujące frakcje alkalicznej fosfatazy jelitowej zawierają enzym, który pod względem rozmiarów cząsteczek (163), właściwości katalitycznych (164) i odporności na ogrzewanie (60, 164, 165) jest podobny do enzymu frakcji głównej.

Ostatnio wysoko oczyszczony preparat alkalicznej fosfatazy ludzkiego jelita otrzymali Komoda i Sakagishi (97). Zastosowane przez autorów techniki elektroforetyczne pozwoliły w nim stwierdzić obecność jednego prążka głównego i jednego towarzyszącego. Oba prążki wykazywały takie same właściwości antygenowe i aczkolwiek autorzy podejrzewali, że różnią się one zawartością cukrów, różnic tych nie udało im się wykazać.

Stąd też przyjmuje się powszechnie, że w pojedynczej tkance czy też narządzie jest tylko jeden rodzaj cząsteczek fosfatazy alkalicznej. Obserwowana heterogenność może więc wynikać z faktu, że niektóre frakcje zawierają enzym odznaczający się większym ciężarem cząsteczkowym, będący agregatami pojedynczych cząsteczek (48). Inne frakcje mogą z kolei powstawać wskutek degradacji lub też niekompletnej dysocjacji kompleksów jakie cząsteczki fosfatazy alkalicznej tworzą z białkami katalitycznie nieaktywnymi np. lipoproteinami (60, 85).

Odmienne poglądy na powstawanie różnych form enzymu przyjmuje Fernley (10), który uważa, że heterogenność fosfatazy danej tkanki może wynikać bądź ze zwielokrotnienia genów kontrolujących jej syntezę, bądź z ich modyfikacji. Pogląd ten wydaje się godny przytoczenia z uwagi na odnotowany w literaturze fakt istnienia form izoenzymu jelitowego (54, 68) czy też wątrobowego (132, 166).

Także przeprowadzone ostatnio badania nad fosfatazą alkaliczną wyodrębnioną z tkankowej hodowli komórek wątroby ujawniły, że pojedyncze komórki tej tkanki syntetyzują trzy immunochemicznie odrębne formy. Różnice w składzie izoenzymatycznym komórek kilku badanych klonów otrzymanych z tej samej komórki macierzystej autorzy wiążą ze zróżnicowaną ekspresją genów odpowiedzialnych za syntezę fosfatazy alkalicznej w poszczególnych klonach (167).

#### **V-1. Polimorfizm genetyczny alkalicznej fosfatazy łożyska ludzi — sugestia odnośnie genetycznej kontroli fosfatazy innych tkanek.**

Synteza fosfatazy łożyska ludzi, która najbardziej różni się od fosfataz innych tkanek znajduje się pod oddzielną kontrolą genetyczną. B a d g e r i S u s s m a n (168) porównując N-końcową sekwencję aminokwasów, mapę peptydów i skład aminokwasowy oczyszczonej fosfatazy wątroby i łożyska stwierdzili różnicę w budowie enzymów obu tkanek, co pozwoliło im wskazać na odrębną kontrolę genetyczną dla fosfatazy wątroby i fosfatazy łożyska. Fosfataza łożyska występuje w postaci sześciu fenotypowo różnych form (66, 121), których syntezę kontrolują 3 geny alleliczne pojedynczego locus autosomalnego. Fenotypy te można zidentyfikować dopiero na drodze elektroforezy prowadzonej w żelu o wartościach pH 8,6 i 6,0 (121). Zróżnicowane fenotypowo enzymy mają takie same właściwości antygenowe (84).

Także w przypadku fosfatazy jelitowej sugerowano odrębną kontrolę genetyczną, aczkolwiek do tej pory nie doniesiono o zróżnicowaniu fenotypowym, które miałyby swoje źródło w genetycznej kontroli poprzez allele wielokrotne.

Podobne sugestie o oddzielnej kontroli genetycznej wysuwano też w odniesieniu do izoenzymów trzeciej klasy antygenowej, jednakże nie znamy do tej pory liczby genów strukturalnych określających izoenzymy tej klasy (12), (Tabela 3).

Trudno jest stwierdzić czy różnice pomiędzy fosfatazą kostną i wątrobową są uwarunkowane na poziomie genetycznym, czy też wynikają całkowicie bądź częściowo z modyfikacji II-o rzędowej struktury pojedynczego typu cząsteczki (169).

#### **VI. Polimorfizm genetyczny fosfatazy alkalicznej surowicy krwi zwierząt wybranych gatunków**

U bydła opisano genetyczne odmiany alkalicznej fosfatazy surowicy będące pod kontrolą 2 genów allelicznych, z których jeden jest odpowiedzialny za obecność szybkiej frakcji enzymu (gen dominujący), a drugi, recesywny — za jej brak (23, 24, 25).

Tabela 3

Klasyfikacja ludzkich fosfataz alkalicznych (wg pozycji 12)

Źródło	Hipoteza genetycznej kontroli
Fosfataza łożyskowa	Kontrolowana przez oddzielny, alleliczny locus genu strukturalnego
Fosfataza jelitowa	Prawdopodobnie kontrolowana przez oddzielny locus genu strukturalnego
Fosfatazy nie-łożyskowe, nie-jelitowe (z kości, wątroby, nerki itd.)	Liczba strukturalnych loci genowych zaangażowanych w syntezę jest nieznaną. Enzymy te wykazują liczne podobieństwa, ale też różnią się pod pewnymi względami

Opisano również polimorfizm fosfatazy alkalicznej z surowicy krwi owiec (18, 19, 20). Udowodniono, że obecność frakcji o pośredniej ruchliwości elektroforetycznej (frakcji B) ma ścisły związek z obecnością rozpuszczalnej substancji grupowej O, recesywnej w stosunku do substancji grupowej R (18, 19). Tylko u młodzieży charakteryzującej się wyższą aktywnością enzymu związek ten nie jest tak wyraźnie zaznaczony. Stąd u owiec w wieku 2,5-4 miesięcy posiadających grupę krwi R (bądź należących do klasy serologicznej i) można było, w przeciwieństwie do zwierząt dorosłych, zidentyfikować frakcję B. Dla frakcji tej udowodniono genetyczną kontrolę poprzez 2 geny alleliczne pojedynczego locus autosomalnego (20).

Genetyczne warianty szybko migrującej frakcji fosfatazy alkalicznej z surowicy krwi kóz zostały także rozpoznane (17). Na podstawie fenotypów zidentyfikowanych u potomstwa pochodzącego z celowo zaplanowanych kojarzeń ustalono, że kontrola genetyczna dla fosfatazy tego szybko migrującego rejonu jest sprawowana przez 2 geny, dominujący i recesywny, które są allelami pojedynczego autosomalnego locus.

Także u świń prześledzono korelację między alkaliczną fosfatazą surowicy krwi i grupą krwi układu A-O. Jednakże monomorficzna pod względem fosfatazy populacja badanych świń, nie wykazała żadnego sprzężenia z tym układem (19). Nieco później zaobserwowano polimorfizm alkalicznej fosfatazy surowicy krwi tych zwierząt, jednakże miał on charakter ontogenetyczny (21, 22). Genetyczny polimorfizm fosfatazy surowicy świń został opisany przez Dinklage'a (170), który na podstawie badań nad rodzinami postulował istnienie 5 genów allelicznych. Dalsze badania (171, 172) wskazały tylko na istnienie 3 alleli. Trzeba jednakże zaznaczyć, że przyjmując ten model dziedziczenia, w odniesieniu do fenotypów potomstwa pochodzącego z pewnych typów kojarzeń, zaobserwowano duże odchylenia od prawa Hardy'ego-Weinberga (172). Wyniki dalszych badań, gdzie w stosunku do frakcji A, B i C identyfikowanych elektroforetycznie w surowicy krwi świń wykazano różnicujący wpływ ogrzewania (173), a także L-feniloalaniny, L-tryptofanu i L-homoargininy (174) wskazały, że enzymy zlokalizowane w poszczególnych frakcjach różnią się swoim pochodzeniem tkankowym. Przez analogię do wyników dyskutowanych w odniesieniu do fosfatazy ludzkiej należało by więc domniemywać, że zróżnicowane elektroforetycznie izoenzymy poszczególnych frakcji mogą posiadać odrębną kontrolę genetyczną, a nie reprezentować warianty alleliczne, jak to było dotychczas przyjmowane.

## VII. Uwagi końcowe

Omówione w pracy różnorodne źródła pochodzenia fosfatazy alkalicznej, możliwość syntezy pod genetyczną kontrolą genów będących allelami tego samego locus, a także duży rozmiar cząsteczki (94, 157, 175) razem

z jej glikoproteidową naturą (46, 94, 95, 96, 98, 107) wskazują na wiele źródeł heterogenności enzymu. Konieczność stosowania dość drastycznych metod w celu uwolnienia do roztworu ściśle związanego z błonami enzymu stwarza możliwość pojawienia się izoenzymów — artefaktów. Aby uniknąć ich rejestrowania zachodzi potrzeba używania precyzyjnych metod i kompleksowego interpretowania wyników. Być może, że enzym już w błonach komórkowych jest związany z różną liczbą reszt węglowodanowych (176) ale jest także możliwe (11), że właśnie podczas samej ekstrakcji czy też podczas oczyszczania pewna liczba tych reszt może odysocjowywać. Wyniki niektórych prac wydają się popierać takie przypuszczenie (45, 46, 48, 177). Ponadto w przypadku fosfatyzacji składających się z podjednostek (177, 178, 179, 180, 181) odmiana o dużym ciężarze cząsteczkowym może łatwo przechodzić w niskocząsteczkową, chociażby podczas składowania materiału (11, 182). Zaobserwowane zmiany właściwości fizycznych enzymu w zamrażanych i wtórnie odmrażanych preparatach butanolowych (60), czy też zmiany jakie zarejestrowano po składowaniu materiału (159, 182), wydają się dokumentować dość łatwe powstawanie heterogenności *in vitro*. Stąd też w rozpatrywaniu źródeł heterogenności fosfatazy alkalicznej nie można pominąć możliwości powstawania podczas preparatyki cząsteczek pozbawionych kwasu sjałowego, agregatów form monomerycznych, konformerów bądź też innych modyfikacji natywnego enzymu, które dodatkowo powiększają źródła jego heterogenności.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Krawczyński J., (1970), Diagnostyka enzymologiczna w medycynie praktycznej, rek. Krawczyński J., str. 372, wyd. 2 — PZWL, Warszawa.
2. Fernley H. N., Walker P. G., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 1011—1018.
3. Eaton R. H., Moss D. W., (1967), *Biochem. J.*, **105**, 1307—1312.
4. Eaton R. H., Moss D. W., (1968), *Enzymologia*, **35**, 168—178.
5. Cox R. P., Griffin M. J., (1965), *Lancet*, ii, 1018—1019.
6. Moss D. W., Eaton R. H., Smith J. H., Whitby L. G., (1967), *Biochem. J.*, **102**, 53—57.
7. Komoda T., Sakagishi Y., (1976), *Biochem. Biophys. Acta*, **438**, 138—152.
8. Fishman W. H., Ghosh N. K., (1967), *Adv. Clin. Chem.*, **10**, 255—370.
9. Posen S., (1967), *Ann. Intern. Med.*, **67**, 183—203.
10. Fernley H. N., (1971), *The Enzymes*, wyd. Boyer P., New York Academic Press, **4**, 417—447.
11. Fishman W. H., (1974), *Am. J. Med.*, **56**, 617—650.
12. Moss D. W., (1975), *Enzyme*, **20**, 20—34.
13. Dziembor E., (1970), *Post. Bioch.*, **16**, 89—99.
14. Stankiewicz A., (1978), *Post. Bioch.*, **24**, 461—479.
15. Lode T., (1970), *Acta vet. Scand.*, **14**, 181—185.
16. Bhat P. P., Baruah P., (1980), *Indian. J. Anim. Sci.*, **50**, 290—293.
17. Tsunoda K., Watanabe S., Suzuki S., (1976), *Jap. J. Zootech. Sci.*, **47**, 665—671.

18. Rendel J., Stormont C., (1964), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **115**, 853—856.
19. Rasmusen B. A., (1965), *Genetics, Princeton*, **51**, 767—770.
20. Akagi S., Watanabe S., Suzuki S., (1971), *Proc. Japan. Acad.*, **47**, 751—756.
21. Imlah P., (1970), *Proc. 11th Eur. Conf. Anim. Blood Grps biochem. Polymorphism, Warszawa*, 331—339.
22. Saison R., (1970), *Proc. 11th Eur. Conf. Anim. Blood Grps biochem. Polymorphism, Warszawa*, 321—328.
23. Gahne B., (1963), *Nature*, **199**, 305—306.
24. Amano T., Tsunoda K., Abe T., Suzuki S., (1970), *J. Agric. Sci., Tokyo University of Agriculture*, **15**, 116—121.
25. Walawski K., Kaczmarczyk E., Kolman G., Głogowska B., (1977), *Genet. Pol.*, **18**, 261—265.
26. Chase W. H., (1963), *J. Histochem. Cytochem.*, **11**, 96—101.
27. Ito S., (1969), *Federation. Proc.*, **28**, 12—15.
28. Kinne R., Kinne-Saffran E., (1969), *Pflügers Arch.*, **308**, 1—15.
29. Schmidt U., Dubach U. C., (1972), *Experientia*, **28**, 385—386.
30. Wilfong R. E., Neville D. M., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6106—6112.
31. Fishman W. H., Lin C. W., (1973), *Membrane phosphohydrolases, Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*, str. 387, New York Academic Press.
32. Wachstein M., Meagher J. G., Ortiz J., (1963), *J. Obstet. Gynec.*, **87**, 13—29.
33. Jeffree G. M., (1962), *J. Clin. Path.*, **15**, 99—111.
34. Borghese E., (1957), *Intern. Rev. Cytol.*, wyd. Bourne G. H., Danielli J. F., Academic Press Inc., Publishers, New York, **6**, 289—341.
35. Morton R. K., (1954), *Biochem. J.*, **57**, 231—237.
36. Haendriex G. V., (1962), *Ann. Pædiat.*, (Basel), **198**, 356—362.
37. Polonovsky M., Bourrillon R., (1952), *Enzymologia*, **15**, 239—245.
38. Blomstrand R., Werner B., (1965), *Acta Chir. Scand.*, **129**, 177—191.
39. Keiding N. R., (1966), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **18**, 134—140.
40. Reynoso G., Elias E. G., Mittelman A., (1971), *Am. J. Clin. Pathol.*, **56**, 707—712.
41. Butterworth P. J., Moss D. W., Pitkanen E., Pringle A., (1965), *Clin. Chim. Acta*, **11**, 220—226.
42. Hodson A. W., Latner A. L., (1975), *Clin. Chim. Acta*, **61**, 53—62.
43. Posen S., (1966), M. D. thesis, *Studies on Human Alkaline Phosphatases*, University of Adelaide, cyt. wg poz. 9.
44. Morton R. K., (1954), *Biochem. J.*, **57**, 595—603.
45. Lustig V., Kellen J. A., (1971), *Enzyme*, **12**, 76—87.
46. Wachsmuth E. D., Hiwada K., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 273—282.
47. Trepanier J. M., Seargeant L. E., Stinson R. A., (1976), *Biochem. J.*, **155**, 653—660.
48. Ghosh N. K., Fishman W. H., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 779—792.
49. Holt J. H., Miller D., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 239—243.
50. Mather J. H., Keenan T. W., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 79—82.
51. Ghosh N. K., Kotowitz L., (1969), *Enzymologia*, **36**, 54—58.
52. Robison R., Soames K. M., (1924), *Biochem. J.*, **18**, 740—754.
53. Bodansky A., (1934), *J. Biol. Chem.*, **104**, 473—482.
54. Watanabe K., Fishman W. H., (1964), *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 252—260.
55. Massarrat S., Massarrat Sch., (1971), *Enzyme*, **12**, 593—605.

56. Hess B., (1963), *Enzymes in Blood Plasma*, tłum. Henley K. S., str. 167, Academic Press Inc. New. York and London.
57. Marthand M., Robison R., (1926), *Biochem. J.*, **20**, 847—855.
58. Roche J., (1931), *Biochem. J.*, **25**, 1724—1733.
59. Bodansky A., (1939), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **42**, 800—804.
60. Moss D. W., King E. J., (1962), *Biochem. J.*, **84**, 192—195.
61. Fishman W., Inglis N. I., Krant M. J., (1965), *Clin. Chim. Acta*, **12**, 298—303.
62. Landau W., Schlamowitz M., (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 474—482.
63. Fishman W. H., Kreisher J. H., (1963), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, 951—955.
64. Fishman W. H., Green S., Inglis N. J., (1963), *Nature*, **198**, 685—686.
65. Peacock A. C., Reed R. A., Highsmith E., (1963), *Clin. Chim. Acta* **8**, 914—917.
66. Boyer S. H., (1961), *Science*, **134**, 1002—1004.
67. Birkett D. J., Done J., Neale F. C., Posen (1966), *Brit. Med. J.*, **1**, 1210—1212.
68. Posen S., Neale F. C., Clubb J. S., (1965), *Ann. Intern. Med.* **62**, 1234—1243.
69. Bahr M., Wilkinson J. H., (1967), *Clin. Chim. Acta*, **17**, 367—370.
70. Haije W. G., de Jong M., (1963), *Clin. Chim. Acta*, **8**, 620—623.
71. Yong J. M., (1967), *J. Clin. Path.*, **20**, 647—653.
72. Dymling J. F., (1966), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **18**, 130—133.
73. Chiandussi L., Greene S. F., Sherlock S., (1962), *Clin. Sci.*, **22**, 425—434.
74. Meade B. W., Rosalki S. B., (1963), *J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm.*, **70**, 862—868.
75. Smith J., Ligstone P. J., Perry J. D., (1968), *Clin. Chim. Acta*, **19**, 499—505.
76. Kaplan M. M., Rogers L., (1969), *Lancet*, **2**, 1029—1031.
77. Nordentoft-Jensen B., (1964), *Clin. Sci.*, **26**, 299—305.
78. Rhone D. P., Mizuno F. M., (1972), *Clin. Chem.*, **18**, 662—666
79. Rhone D. P., White F. M., Gidaspow H., (1974), *Obst. Gynec.* **43**, 31—40.
80. Posen S., Neale F. C., Birkett D. J., Brudenell-Woods J., (1967), *Amer. J. Clin. Path.*, **48**, 81—86.
81. McMaster Y., Teunant R., Clubb J. S., Neale F. C., Posen S., (1964), *J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm.*, **71**, 735—739.
82. Sussman H., Bowman M., (1968), *Nature*, **218**, 359—360.
83. Boyer S. H., (1963), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, 938—951.
84. Lehman F. G., (1975), *Clin. Chim. Acta*, **65**, 257—269.
85. Moss D. W., (1970), *Fed. Europ. Biochem. Soc. Symp.*, **18**, 227—239.
86. Green S., Cantor F., Inglis N. R., Fishman W. H., (1972), *Am. J. Clin. Path.*, **57**, 52—64.
87. Birkett D. J., Conyers R. A. J., Neale F. C., Posen S., Brudenell-Woods J., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 470—479.
88. Horne M., Cornish C. J., Posen S., (1968), *J. Lab. Clin. Med.*, **72**, 905—915.
89. O'Carroll D., Statland B. E., Steele D. W., Burke M. D., (1975), *Am. J. Clin. Path.*, **63**, 564—572.
90. Fishman W. H., Sie H. G., (1970), *Clin. Chim. Acta*, **29**, 339—341.
91. Kellen J. A., Lustig V., (1971), *Oncology*, **25**, 239—248.
92. Lin C. W., Fishman W. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3082—3087.



93. Brunel C., Cathala G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 415—421.
94. Engstrom L., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 36—48.
95. Robinson J. C., Pierce J. E., (1964), *Nature*, **204**, 472—473.
96. Ghosh N. K., (1969), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **166**, 604—640.
97. Komoda T., Sakagishi Y., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 645—660.
98. Ghosh N. K., Fishman W. H., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 700—707.
99. Fernley H. N., Walker P. G., (1970), *Biochem. J.*, **116**, 543—544.
100. Birkett D. J., Conyers R. A. J., Neale F. C., Posen S., Brudenell-Woods J., (1965), *Proc. Austral. Assoc. Clin. Biochem.*, **1**, 175.
101. Butterworth P. J., Moss D. W., (1967), *Enzymologia*, **32**, 269—277.
102. Rufo M. D., Malagelada J. R., Linscheer W. G., Fishman W. H., (1973), *Histochemie*, **33**, 313—322.
103. Clerc C. P., (1976), *Clin. Chem.*, **22**, 42—48.
104. Posen S., Cornish J., Horne M., (1969), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **116**, 733—744.
105. Neale F. C., Clubb J. S., Hotchkis D., Posen S., (1965), *J. Clin. Pathol.*, **18**, 359—363.
106. Conyers R. A. J., Birkett D. J., Neale F. C., Posen S., Brudenell-Woods J., (1967), *Biochem. Biophys. Acta*, **139**, 363—371.
107. Ghosh N. K., Goldman S. S., Fishman W. H., (1967), *Enzymologia*, **33**, 113—124.
108. Lin C. W., Sie H. G., Fishman W. H., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 509—516.
109. Usategui-Gomez M., Yeager F. M., Torbutton P., (1974), *Clin. Chim. Acta*, **50**, 405—412.
110. Dent C. E., Harper C. M., (1962), *Lancet*, **1**, 559.
111. Hodson A. W., Latner A. L., Reine L., (1962), *Clin. Chim. Acta*, **7**, 255—261.
112. Fitzgerald M. X. M., Fennelly J. J., McGeeney K., (1969), *Ann. J. Clin. Path.*, **51**, 194—201.
113. Kitchener P. N., Neale F. C., Posen S., Brudenell-Woods J. B., (1965), *Amer. J. Clin. Path.*, **44**, 654—661.
114. Taswell H. F., Jeffers D. M., (1963), *Am. J. Clin. Path.*, **40**, 349—356.
115. Heino A. E., Jokipii S. G., (1962), *Ann. Med. Intern. Fenn.*, **51**, 105—109.
116. Cao A., Coppa G., Trabalza N., Marcucci F., de Virgilius S., Lungarotti S., Furbetta M., (1972), *Z. Kinderheilkd.*, **113**, 289—296.
117. Sharland D. E., (1974), *Clin. Chim. Acta*, **56**, 187—198.
118. Canapa-Anson R., Powe D. J. F., (1970), *J. Clin. Path.*, **23**, 499—508.
119. Cornell A. E., Hodson A. W., Latner A. L., (1979), *Clin. Chim. Acta*, **97**, 217—223.
120. Robinson J. C., Pierce J. E., Blumberg B. S., (1966), *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **94**, 559—565.
121. Robson E. B., Harris H., (1965), *Nature*, **207**, 1257—1259.
122. Bamford K. F., Harris H., Luffman J. E., Robson E. B., Cleg-horn T. E., (1965), *Lancet*, **1**, 530—531.
123. Cunningham V. R., Rimer J. G., (1963), *Biochem. J.*, **89**, 50 P-51 P.
124. Arfors K. E., Beckman L., Lundin L. G., (1963), *Acta genet. Statist. Med.*, **13**, 89—94.
125. Shreffler D. C., (1965), *Amer. hum. Genet.*, **17**, 71—86.
126. Langman M. J. S., Lenthold E., Robson E. B., Harris J., Luffman J. E., Harris H., (1966), *Nature*, **212**, 41—43.
127. Inglis N. R., Krant M. J., Fishman W. H., (1967), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **124**, 699—702.

128. Stepan J., Graubbaum H. J., Meurer W., Wegenknecht C., (1976), *Experientia*, **32**, 832—834.
129. Nagant de Deuxchaisnes C., Krane S. M., (1964), *Medicine (Balat.)*, **43**, 233—266.
130. Skillen A. W., Pierides A. M., (1977), *Clin. Chim. Acta*, **80**, 339—346.
131. Newton N. A., (1967), *Q. J. Med.*, **36**, 17—28.
132. Rhone D. P., Mizuno F. M., (1973), *Am. J. Clin. Path.*, **59**, 531—541.
133. Dent C. E., Norris T. St. M., Schmith R., Sutton R. A. L., Temperley J. M., (1968), *Lancet*, **1**, 1333—1336.
134. Skillen A. W., Fiefield R. D., Sheraidek G. S., (1972), *Clin. Chim. Acta*, **40**, 21—25.
135. Warshaw J. B., Littlefield J. W., Fishman W. H., Inglis N. R., Stolbach L. L., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 2137—2142.
136. Inglis N. R., Fishman L., Stolbach L. L., Warshaw J. B., Fishman W. H., (1972), *Clin. Chim. Acta*, **38**, 67—73.
137. Danovitch S. H., Baer P. N., Lasrer L., (1968), *N. Engl. J. Med.* **278**, 1253—1260.
138. Davidson R. G., (Gorodischer R., Davidson R. G., Mosovich L. L., Yaffe S. J.), (1969), 3rd International Conference on Congenital Malformations, The Hague, The Netherlands, *Excerpta Medica International Congress Series*, **191**, 35—36.
139. Latner A. L., (1965), Phosphatase isoenzymes. *Enzymes in Clinical Chemistry*, wyd. Ruyssen R., Amsterdam Elsevier., 110—119.
140. Latner A. L., Skillen A. W., Simey J., (1966), *Proc. Europ. Dialysis and Transplant Assoc., Excerpta Medica Foundation*, **2**, 117.
141. Stolbach L. L., Krant M. J., Fishman W. H., (1969), *N. Engl. J. Med.*, **281**, 757—762.
142. Fishman W. H., (1969), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **116**, 745—759.
143. Fishman W. H., Inglis N. R., Green S., Austiss G. L., Ghosh N. K., Reif A. E., Rustigian K., Krant M. J., Stolbach L. L., (1968), *Nature*, **219**, 267—299.
144. Fishman W. H., Inglis N. R., Stolbach L. L., Krant M. J., (1968), *Cancer Res.*, **28**, 150—156.
145. Austiss C. L., Green S., Fishman W. H., (1971), *Clin. Chim. Acta*, **33**, 279—286.
146. Fishman W. H., Inglis N. R., Green S., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1054—1057.
147. Fishman W. H., (1973), *Advances in Enzyme Regulation*, wyd. Weber G., Oxford and New York Pergamon Press, **11**, 293—321.
148. Green P. J., Sussman H. H., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**, 2936—2940.
149. Sasaki M., Fishman W. H., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 3008—3018.
150. Nathanson L., Fishman W. H., (1971), *Cancer*, **27**, 1388—1397.
151. Usategui-Gomez M., Yeager F. M., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 2544—2545.
152. Nakayama T., Yoshida N., Kitamura M., (1970), *Clin. Chim. Acta*, **30**, 546—548.
153. Nakayama T., Yoshida N., Kitamura M., Saitok S., (1971), *Rynshokagaku*, **11**, 80, cyt. wg poz. 11.
154. Jacoby B., Bagshawe H. D., (1971), *Clin. Chim. Acta*, **35**, 473—481.
155. Warnock M. L., Raisman R., (1969), *Clin. Chim. Acta*, **24**, 5—11.
156. Higashino K., Hashinotsūme M., Kang K. Y., Takahashi Y., Yamamura Y., (1972), *Clin. Chim. Acta*, **40**, 67—81.
157. Kaplan M. M., (1972), *Gastroenterology*, **62**, 452—468.

158. Moss D. W., (1969), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **166**, 641—652.
159. Moss D. W., (1963), *Nature*, **200**, 1206—1207.
160. Smith J. K., Eaton R. H., Whitby L. G., Moss D. W., (1968), *Analyt. Biochem.*, 84—96.
161. Moss D. W., (1962), *Nature*, **193**, 981—982.
162. Butterworth P. J., Moss D. W., (1966), *Nature*, **209**, 805—806.
163. Moss D. W., Eaton R. H., Smith J. K., Whitby L. G., (1966), *Biochem. J.*, **98**, 32 C-33 C.
164. Moss D. W., (1965), *Biochem. J.*, **94**, 458—462.
165. Butterworth P. J., (1965), *Biochem. J.*, **96**, 74 P.
166. Otani R., Higashino K., Yamamura Y., (1975), *Clin. Chim. Acta*, **60**, 113—150.
167. Hamilton T. A., Tin A. W., Sussman H. H., (1979), *Exp. Cell Res.*, **122**, 31—38.
168. Badger K. S., Sussman H. H., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **73**, 2201—2205.
169. Moss D. W., (1974), *Histochem. J.*, **6**, 353—360.
170. Dinklaga H., (1970), Proc. 11th Eur. Conf. Anim. Blood Grps biochem. Polymorphism, Warszawa, 329—330.
171. Verhorst D., (1973), Dissertation, Enzym- und Serumproteinpolymorphismen in Schweinezuchtlinien, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Georg-August Universität Göttingen.
172. Kierek-Jaszczuk D., Żurkowski M., Składanowska-Krzyżanowska E., Tomaszewska-Guszkiewicz K., (1979), *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **10**, 15—18.
173. Kierek-Jaszczuk D., Grzybowski G., (1979), VII Zjazd PTG, Poznań, Streszczenia Referatów, 70.
174. Kierek-Jaszczuk D., Żurkowski M., (1980), *Acta Physiol. Pol.*, (skierowane do druku).
175. Engstrom L., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 71—78.
176. Hiwada K., Wachsmuth E. D., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 293—298.
177. Cathala G., Brunnel C., Chappellet-Tordo D., Lazdunski M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6040—6045.
178. Sussman H. H., Gottlieb A. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 170—179.
179. Fosset M., Chappalet-Tordo P., Lazdunski M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 1783—1787.
180. Okhubo A., Longerman W., Kaplan M. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7174—7180.
181. Lindau G., Alais C., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 205—213.
182. Latner A. L., Parsons M. E., Skillen A. W., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 299—302.



## SPRAWOZDANIA

### VIII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny w Strasbourgu, Francja, 20-25 lipca 1980

Na sesji inauguracyjnej wygłoszono referaty, których tytuły określają główne tematy kongresu:

1. Biokonwersja energii słonecznej — Melvin Calvin (USA)
2. Skóra: struktura a działanie naturalne i terapeutyczne energii słonecznej — Klaus Wolff (Austria)
3. Fotosynteza roślin zielonych: światło jako źródło oraz jako sonda badawcza — Wolfgang Junge (RFN).

W niniejszym sprawozdaniu z kongresu ograniczam się do szczegółowego omówienia sympozjów poświęconych fotobiologii furokumaryn, fotochemoterapii chorób skórnych oraz reperacji fotouszkodzonego DNA. Inne sympozja obejmowały następujące tematy: I. Nowe metody spektroskopowe, II. Fotoregulacja, fotorecepcja, rytmy fotosyntezy, IV. Pierwotne procesy w fotosyntezie, V. Reakcje fotochemiczne w białkach oraz w kompleksach z kwasami nukleinowymi, VI. Biokonwersja energii słonecznej, VII. Fotobiologia rodopsyny, X. Fotomorfogeneza. Sympozjum VI było raczej zdawkowe ze względu na konkurencyjną konferencję organizowaną w Brighton (Anglia) w listopadzie br. pod nazwą „Energia z biomasy”. W tymże Brighton na sierpień przyszłego roku zapowiedziano Światowe Forum Słoneczne (*Solar World Forum*), gdzie będzie rozpatrzone bardzo wiele zagadnień praktycznych wykorzystania energii słonecznej do ogrzewania pomieszczeń na drodze bezpośredniej oraz pośredniej z wykorzystaniem energii z biomasy. Z programów obydwu konferencji wynika że fermentacja etanolowa i metanolowa z biomasy rolnej i leśnej może stać się niedługo opłacalnym ekonomicznie źródłem paliw napędowych. Podczas sesji zamykającej obrady kongresu, Franz Greiter (Austria) wygłosił socjologicznie zabarwiony referat pt. Wpływ sztucznego i naturalnego światła na fizjologię i psychologię ludzką.

Prócz 10 sympozjów omówionych wyżej, łącznie z odpowiadającymi im komunikatami w postaci plakatów, odbyły się 3 sympozja w formie obrad okrągłego stołu:

- Inżynieria genetyczna a reperacja DNA
- Zastosowanie i testowanie osłon przeciwsłonecznych
- Endogenne i egzogenne inhibitory i sensybilizatory (a) Badania podstawowe (b) Implikacje terapeutyczne.

W kongresie brało udział ok. 400 uczestników a towarzyszyło im ponad 100 osób, w tym sporo dzieci w wieku 15—18 lat; ekspozycja 358 plakatów dopełniła całości jako coś w rodzaju wystawy, którą się zwiedzało sporadycznie w dogodnym dla siebie czasie. Zasadnicze rozmowy i dyskusje odbywały się nie przy plakatach a w dyskusjach okrągłego stołu lub w przerwach obrad.

W plenarnym referacie Klausu Wolffa (PL2) \*) rozpatrzono poznane reakcje skóry ludzkiej na działanie znacznych dawek promieniowania ultrafioletowego. Wy-sunięto postulat, że komórki Langerhansa są komórkami ulegającymi najszybszym zmianom po napromienieniu, są czulsze niż np. keratynocyty i melanocyty warstwy podstawnej naskórka. Stwierdzono doświadczalnie że działanie UV-B (290-320 nm) niweluje część markerów immunologicznych, co powoduje obniżenie zdolności stymulowania proliferacji limfocytów T *in vitro* (P133, P134). Zmiany w funkcji immunologicznej komórek Langerhansa zauważa się przy niskich dawkach, już przy 10 mJ/cm<sup>2</sup>, przy których nie obserwuje się zahamowanie syntezy DNA lub białek w komórkach warstwy podstawnej naskórka.

Badano zmiany w skórze i w naskórku pacjentów poddanych leczeniu PUVA w okresie ponad 3-miesięcznym. Metodą mikroskopu elektronowego stwierdzono powstawanie anomalnych typów komórek, dwukrotnie częściej w skórze niż w naskórku. Podkreślono ochronną rolę melanocytów, pigment umniejsza szkodliwość działania promieniowania ultrafioletowego poprzez absorpcję lub rozproszenie światła, ponadto jest pułapką dla wolnych rodników.

M. L. Kripke (USA, S18) przedstawiła nowe obserwacje co do udziału systemu immunologicznego w ochronie przed rakiem skóry. Wielokrotne naświetlanie UV254 myszy bezwłosych wywołują raka skóry. Powstałe guzy są wysoce antygenowe i są odrzucane po przeszczepieniu na myszy zdrowe. Jeśli natomiast, przed transplantacją myszy zdrowe potraktowano jednorazową dawką UV-B z tzw. „sunlamp” (jak również promieniami X), przeszczep się przyjmował i pozornie zanikała antygenowość guzu. Kripke tłumaczy to zjawisko mechanizmem immunosupresji. Według jej hipotezy, wstępna dawka UV-B wywołuje w skórze powstanie antygenów uruchamiających immunosupresory limfocytów T; w następstwie tego, implantowany przeszczep nie napotyka na silną reakcję immunologiczną, gdyż immunosupresory są zaabsorbowane przez UV-B wywołane antygeny. Hipotezę tę wspiera faktem, że wstępna ekspozycja myszy na UV-B niweluje reakcję uczuleniową na antygeny kontaktowe (typu dwunitrochlorobenzenu).

Obserwacje podane przez M. L. Kripke oraz przez W. Morison et al. są w zgodności z obrazem nakreślonym przez K. Wolffa, dotyczącym wrażliwości komórek Langerhansa na niskie dawki UV-B, komórki te bowiem biorą udział w regulacji reakcji immunologicznych. Ponadto w dyskusji poruszono zjawisko ruchliwości komórek Langerhansa w skórze.

E. Moustacchi (Francja, S17) przedstawiła poglądy nt. zależności pomiędzy częstością występowania mutacji a częstością występowania nowotworów. Najbardziej przekonujące były dowody doświadczalne z porcjowanymi dawkami UV w krótkich odstępach czasu, potęgujące ilość komórek transformowanych w stosunku do dawek jednorazowych. Obserwowane zwiększenie częstości transformacji przy dawkach UV rozłożonych w czasie może pośrednio wskazywać na niewydolność procesów reperyacyjnych w usuwaniu nowopowstałych uszkodzeń. A. Han (USA) w dyskusji postulował konieczność uwzględnienia wieku komórek w badaniach porównawczych nad mutagennością, gdyż sprzężenie mutacji z transformacją następuje w różnym stopniu nasilenia zależnie od fazy cyklu komórkowego.

W fototerapii łuszczyca za pomocą furokumaryn, w skrócie oznaczonej PUVA (PSORALEN+UV-A, pasmo promieniowania 320-400 nm), można wyróżnić dwa kierunki poszukiwań. Pierwszy zamierza w terapii PUVA stosować nowe pochodne psoralenowe, o zmniejszonym działaniu ubocznym, drugi natomiast proponuje zaniechanie stosowania jakichkolwiek związków uczulających, wprowadzając zamiast nich do terapii specyficznie wybrane pasma promieniowania UV.

\*) (PL — plenary lecture, P — poster, S — symposium lecture — oznakowania referatów lub doniesień w streszczeniach kongresu).

Nowe związki, to pochodne metylowe i aminowe izopsoralenu (angelicyny), zaproponowane przez Rodighiero, Dall'Acqua i in. (Włochy, P162-168, P173, P174) a także pochodne 3-karbetoksypsoralenu wprowadzone przez Averbeck i in. (Francja, S37, P179). Są to związki ulegające wyłącznie monofotoaddycji do DNA a nie tworzące bis-fotoadduktów zw. cross-linkami. Wprowadzenie tych związków do fototerapii ma na celu zmniejszenie efektów opóźnionego działania, głównie efektów kancerogennych związanych z powstawaniem cross-linków. Monofotoaddukty powodują zahamowanie syntezy DNA, a ich usuwanie z łańcucha DNA odbywa się w podobny sposób jak wycinanie dimerów pirymidynowych (P182 oraz por. Kaye et al., *Cancer Res.* **40**, 696—702, 1980).

Argumenty za stosowaniem „dimerotwórczego” promieniowania UV, bez związków fotoczułających przedstawił J. A. Parrish (USA, S42), reprezentując wiodący ośrodek fototerapii w Bostonie. Promieniowanie UV wywołujące powstawanie dimerów w DNA może, podobnie jak utworzenie fotoadduktów psoralenu, wywołać zahamowanie proliferacji komórek naskórka. Natomiast procesy reperacyjne usuwania dimerów nie prowadzą do kancerogenezy w takim stopniu jak procesy wycinania cross-linków psoralenowych. Ośrodek w Bostonie zbadał ponownie rumieńcotwórcze (erytemalne) widmo działania ultrafioletu zarówno u ludzi zdrowych jak i chorych na łuszczycę. Zastosowano 500 W źródło światła, 10-krotnie silniejsze od powszechnie stosowanych oraz monochromator selekcjonujący wąskie 4 nm pasma UV w zakresie 250-315 nm. Potwierdzono że szerokie pasmo widma działania na skórę ludzi zdrowych ma rozmyty szczyt ok. 305 nm, natomiast na skórę chorych na łuszczycę działa wybitnie erytemalnie wąskie pasmo promieniowania 295-300 nm, ponadto to promieniowanie wykazuje najlepsze działanie dobroczynne przy leczeniu łuszczycy, nawet w terapii dawkami suberytemalnymi. Powyższe wyniki potwierdza doniesienie grupy niemieckiej z Jeny (P151), którzy z powodzeniem zastosowali terapeutyczne źródło o dużej mocy, z filtrami przepuszczającymi wąskie pasmo promieniowania 295-305 nm. A. Wiskeman z RFN podsumował całą dyskusję lapidarnym zdaniem: każde erytemogenne pasmo UV jest dobroczynne w leczeniu łuszczycy. Niektóre wyniki wskazują na dobroczynne współdziałanie pasma UV-B (290-320) z pasmem UV-A (320-400 nm), niewielka domieszka promieniowania UV-B (poniżej 1 MED), które zaledwie w 10% dociera do komórek warstwy podstawnej, wydatnie polepsza skutki fototerapii PUVA (PL2, P153, Wiskemann).

Grupa Parrisha zaproponowała pewne modyfikacje w terapii PUVA wspomaganą przez mazie węglowe (P152, S42). Zamiast mazi węglowych (*crude coal tar*) wprowadzono oleje naftowe (*petrolatum*), które zwiększają przepuszczalność naskórka łuszczycowego dla promieniowania ultrafioletowego. Modyfikacje te mają na celu zmniejszenie jednorazowych dawek promieniowania poniżej dawek erytemalnych. Przedstawiono udoskonalone metody wykrywania poziomu stężenia psoralenu w surowicy i w skórze w trakcie terapii PUVA, określając na 150 i 80 ng/ml, odpowiednio (P201, 202).

Stosowanie terapii PUVA jest obecnie objęte długotrwałą kontrolą, celem ustalenia ewentualnych ubocznych skutków jej działania (Stern—USA, Christophers—dane z 11 krajów Europy). Wprawdzie stwierdzono, w niewielkim procencie, występowanie raka skóry u ludzi leczonych terapią PUVA, szczególnie warstwy kolczystej naskórka, ale niestety brak odpowiedniej kontroli tej terapii, gdyż jak zauważył R. B. Setlow (USA)—niewiadomo jaki procent chorych na łuszczycę a nie leczonych metodą PUVA zapada na raka skóry. Obecnie podjęto taki projekt badawczy w Europie, obejmujący 600 pacjentów.

Postęp w badaniach nad mechanizmem reperacji UV-uszkodzonego DNA. Stwierdzono (P318, P313), że pierwszym enzymem rozpoznającym dimery pirymidynowe w DNA jest glikozylaza, specyficznie hydrolizująca jedno z dwóch wiązań

glikozydowych dimeru. Dopiero potem, na skutek powstania zakłócenia w łańcuchu DNA, następuje nacięcie łańcucha przez UV-endonukleazę i dalszy ciąg reakcji prowadzący do wycinania i lutowania nowymi nukleozydami fotouszkodzonego odcinka DNA (porównaj także fundamentalną pracę z grupy Grossmana: Haseltine et al., *Nature*, (26 June 1980), 285, 634—641.). A więc glikozylazy okazały się pierwszymi w zespole enzymów biorących udział w łańcuchu reakcji naprawy nie tylko pojedynczych fotouszkodzonych zasad pirymidynowych ale także dimerów tyminy.

Bardzo ciekawy referat nt. zastosowania związków psoralenowych, jako sondy określającej strukturę przestrzenną kwasów nukleinowych, wygłosił J.E. Hearst (S38). W rybozomalnych 16S i 5S RNA wykryto preferencyjne przyłączanie się psoralenu w miejscach załamania się regularnej struktury dwupasmowej przy przejściu od odcinków helikalnych do struktury bezładnej. Z wirusowego fd DNA wyizolowano i scharakteryzowano mono-fotoaddukt psoralenowy na drodze trawienia enzymatycznego, kolejno przez: DNAazę I, P1 endonukleazę, fosfodwuesterazę i fosfatazę. Być może, również na tej drodze, uda się wyizolować bis-fotoaddukty (cross-linki) psoralenowe, co dotychczas było nieosiągalne.

Istotną sprawą w badaniu reakcji fotobiologicznych jest możliwość wykrywania fotoadduktów *in situ*, w nieuszkodzonej histologicznie tkance naskórka. Taką możliwość stwarza metoda immunofluorescencji pośredniej z użyciem specyficznych przeciwciał, np. przeciw DNA-dimery. Dwa doniesienia (P269, P285) dotyczyły ulepszeń metodycznych w zakresie otrzymywania i charakterystyki przeciwciał przeciw DNA-dimery-tyminowe. Zastosowano bardzo nowoczesną metodę fuzji komórek w celu otrzymania monoklonalnego przeciwciała przeciw dimerom pirymidynowym w jednopasmowym DNA (anti-UVssDNA). Nasze doniesienie nt. otrzymania immunosurowicy specyficznie skierowanej przeciw DNA-fotoaddukty-psoralenu wzbudziło duże zainteresowanie. W dyskusji, dwie pracownice zadeklarowały zamiar powtórzenia oraz rozszerzenia naszych doświadczeń (Oak Ridge National Labs. w USA oraz Paterson Labs., Manchester w Anglii).

W trakcie uroczystego bankietu kongresowego, Profesorowi R.B. Setlow z USA wręczono złoty medal Finsena, za fundamentalne prace w zakresie poznania ciągu reakcji enzymatycznych naprawy fotouszkodzonego DNA. Na zakończenie Kongresu wybrano nowe władze Międzynarodowego Towarzystwa Fotobiologicznego (*L'Association Internationale de Photobiologie*) w skład których m.in. wszedł Prof. dr K.L. Wierzchowski z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Z. Zarębska

#### **IV Krajowe Konwersatorium — Analiza Biopolimerów nt.: „Nowe metody analityczne i usprawnienia pracy automatycznych analizatorów aminokwasów”**

W dniach 25 i 26 września 1980 roku odbyło się w Instytucie Żywności Człowieka Akademii Rolniczej w Poznaniu IV Krajowe Konwersatorium — Analiza Biopolimerów n.t. „Nowe metody analityczne i usprawnienia pracy automatycznych analizatorów aminokwasów”. Spotkanie zorganizowane zostało przez Sekcję Analizy Biopolimerów Komitetu Chemii Analitycznej PAN, Instytut Żywności Człowieka A.R. w Poznaniu (dr Krzysztof Waliszewski) oraz Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (dr Piotr Mendelewski). Miało ono typowy charakter szkoleniowo-dyskusyjny.



Program pierwszego dnia obejmował zapoznanie się z produkcją analizatorów na świecie. W spotkaniu udział wzięli przedstawiciele firmy Beckman, Biotronik, Labor-Mim, LKB oraz Rank-Hilger. Ponadto organizatorzy przekazali uczestnikom spotkania katalogi firmy Pierce Chem. Co., specjalizującej się w produkcji odczynników wysokiej czystości m.in. do automatycznej analizy aminokwasów.

Przedstawione przez producentów analizatory różniły się technikami oznaczeń oraz stopniami automatyzacji i komputeryzacji. Godnym podkreślenia jest fakt, że dla tych samych klas analizatorów produkowanych przez różne firmy, różnice w cenie wahały się w granicach 100 i więcej procent! Uczestnicy mogli się zapoznać z różnymi technikami analiz aminokwasów oraz dodatkowymi możliwościami analitycznymi aparatów w oznaczaniu np. cukrów i kwasów nukleinowych.

Drugi dzień spotkania poświęcony był doniesieniom naukowym. Następnie odbyła się dyskusja koncentrująca się na sprawach usprawnienia działalności aparatów, nowych metod analitycznych oraz obsługi i naprawy aparatów. Wiele krytycznych uwag padło pod adresem firmy Microtechna z Czechosłowacji, dotyczyły one nie realizowania zamówień na części zamienne oraz działalności serwisu.

W Instytucie Genetyki Roślin PAN, Poznań, ul. Strzeszyńska 30/36 tel. 203741 (dr Piotr Mendelewski) istnieje punkt wymiany informacji na tematy interesujące użytkowników analizatorów aminokwasów. Zorganizowania kolejnego konwersatorium w 1981 roku podjął się dr M. Stencel ze stacji Hodowli Roślin Wiatrowo, 62-100 Wągrowiec, woj. pilskie.

K. Waliszewski

### **Skrót sprawozdania z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za okres od 23 września 1977 r. do 11 września 1980 r., przedstawionego na Walnym Zebraniu Towarzystwa w dniu 12 września 1980 r.**

Polskie Towarzystwo Biochemiczne liczy 1152 członków (w tym 9 członków honorowych) zrzeszonych w 12 oddziałach terenowych, a mianowicie:

Oddział Białostocki	39 osób
„ Gdański	49 „
„ Krakowski	79 „
„ Lubelski	68 „
„ Łódzki	137 „
„ Olsztyński	41 „
„ Poznański	134 „
„ Szczeciński	43 „
„ Śląski	64 „
„ Toruński	22 „
„ Warszawski	378 „
„ Wrocławski	93 „

członkowie Towarzystwa zamieszkujący za granicą . . . . . 5 osób .

W ramach Towarzystwa działają dwie sekcje: fotobiologii i bioenergetyki.

Główną formą działalności Towarzystwa były sympozja, zjazdy i konferencje naukowe. W okresie sprawozdawczym odbyły się następujące imprezy o zasięgu krajowym:

XVI Zjazd (Łódź, 1978)

XVII Zjazd (Warszawa, 1980)

Symposium „Metabolizm fluoru” (Szczecin, 1979)

Konferencja na temat polimeraz RNA (Łódź, 1979)

Konferencja „Regulacyjna funkcja procesów fosforylacji białek” Lublin, 1980)

Symposium „*Chemical Cancerogenesis and Mutagenesis*” (Warszawa, 1980, wspólnie z Polskim Towarzystwem Onkologicznym, Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN i Instytutem Onkologii)

Ponadto w Oddziałach Towarzystwa odbywało się corocznie ogółem około 50 zebrań naukowych z udziałem prelegentów krajowych oraz goszczących w Polsce naukowców zagranicznych.

Pod protektorem Towarzystwa i przy częściowym jego współudziale odbyły się w Polsce dwa kursy Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, a mianowicie:

w Instytucie Onkologii w Gliwicach 64. kurs FEBS „*Modern Methods of DNA Sequencing*” (1979)

w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie 59. kurs FEBS „*Bioenergetics and Transport at Mitochondrial and Cellular Levels*” (1980)

Polskie Towarzystwo Biochemiczne przyznaje corocznie nagrodę im. Jakuba Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w Polsce i nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w „Postęпах Biochemii”. Ponadto za najlepsze prezentacje przez młodych biochemików doniesień na zjazdach Towarzystwa przyznawane są nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego.

Przeglądowy kwartalnik Towarzystwa, „Postępy Biochemii”, zamieścił w okresie sprawozdawczym około 70 artykułów. Nakład pisma wynosi obecnie 2.330 egzemplarzy. Ponadto Towarzystwo wydaje Monografie Biochemiczne, których w okresie 1977—1980 ukazały się dwie.

Na arenie międzynarodowej Polskie Towarzystwo Biochemiczne jest członkiem Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, a obie sekcje Towarzystwa należą do odpowiednich międzynarodowych stowarzyszeń specjalistycznych. Jednocześnie członków Towarzystwa uzyskuje w okresie 1979—1980 stypendia FEBS na krótkoterminowe staże badawcze w laboratoriach zagranicznych (stypendia te zostały wprowadzone przez FEBS z początkiem 1979 r.) a 15 osób z Polski subwencje FEBS na udział w kursach Federacji organizowanych poza granicami naszego kraju (dane za okres od lutego 1977 do września 1980).

Na środki finansowe Towarzystwa składają się składki członkowskie (około 40 tys. zł rocznie), wpisowe na zjazdy (około 50 tys. zł na zjazd) i dotacja Polskiej Akademii Nauk (211 tys. zł rocznie). Po stronie wydatków główną pozycję stanowią doroczne zjazdy (około 150 tys. zł na zjazd) i sympozja. Fundusz płac etatowych pracowników Biura Zarządu Głównego (3 osoby na cząstkowych etatach) wynosi (wraz ze świadczeniami socjalnymi) 67 tys. zł rocznie. Sumę 50—65 tys. zł wydaje Towarzystwo rocznie na podróże. Pozycja ta obejmuje przede wszystkim zwrot kosztów uczestnictwa w zjazdach i sympozjach Towarzystwa tych jego członków, którzy nie mogli uzyskać delegacji ze swych instytucji macierzystych, oraz przejazdy prelegentów na zebrania odczytowe w oddziałach Towarzystwa.

Lech Wojtczak

## RECENZJE

### Adam Kołataj Genetyka fizjologiczna zwierząt

PWN, Warszawa, 1980, str. 629, nakład 5000+250 egz.

Ocenianą książkę autor przeznaczona dla hodowców zwierząt, gdyż „Współczesna genetyka zwierząt nie może rozwijać się już bez znajomości ich fizjologii” (str. 7). Słusznie, od wielu, wielu lat na studiach rolniczych wykładana jest fizjologia zwierząt.

Pierwsza część książki, łącznie 374 strony, jest poświęcona problemom, w których się orientuję, toteż uważam za swój obowiązek wypowiedzieć się na ten temat.

Wprawdzie wiem, o czym Kołataj pisze, ale nie podjąłbym się streścić ocenianego tekstu. Jest to wynikiem paru uzupełniających się metod stosowanych przez autora. Po pierwsze, tekst jest zupełnie chaotyczny i nawet poszczególne zdania w obrębie jednego akapitu na ogół nie stanowią ciągu logicznego. Po drugie, tekst roi się od sformułowań bądź nieścisłych, bądź wręcz błędnych. Po trzecie, autor jest niezwykle wydajny w zakresie pisania zdań bez treści.

Dla udokumentowania tych stwierdzeń najprościej by było zacytować książkę w całości. Uniknęłabym wtedy posądzeń o brak obiektywizmu czy przesadę. Ale kto mi nie wierzy, niech poczyta ocenianą książkę.

Ulubionym słówkiem Kołataja jest fizjologia. W rozdziale 1 autor pisze: „...każda cecha organizmu... jest cechą fizjologiczną, nie wyłączając długości rogów...” (str. 7). Słusznie, nikt przecież zwierzęciu rogów nie dosztukowuje. Drugi rozdział nosi tytuł „Fizjologia komórki”. Dobrze. Dalej jednak autor pisze: „Fizjologia rybosomów jest oczywiście najbardziej związana z procesem biosyntezy białka, a szczególnie z działalnością translacji jako ciągu produkcyjnego białek w komórce” (str. 56). Mamy więc tu i dowolność w używaniu terminu fizjologia i nieścisłość i pustosłowie. Tytuły dwu następnych rozdziałów, „Fizjologia chromosomów” i „Fizjologia genów” ewidentnie nie mają sensu. Nie lepiej jest też z ich treścią.

Dla przykładu trochę szerzej omówię rozdział „Fizjologia genu”. Pierwszy jego podrozdział jest zatytułowany „Biologiczna rola DNA”. Jest tu mowa o budowie DNA w ogóle, o komplementarności zasad, regułach Chargaffa, znowu o budowie DNA: „...jak udowodnił Watson — **skład i kolejność**, z jaką **ustawione** czy **wbudowane** są zasady w jednym łańcuchu, determinują całkowicie **skład i kolejność** zasad w drugim łańcuchu” (str. 145; podkreślenia moje, A.P.). Dalej autor stwierdza, że „Kwas dezoksyrybonukleinowy ma szereg właściwości chemicznych i fizycznych” (str. 146), z czym trudno się nie zgodzić. Mówi następnie o wielkości cząsteczek, denaturacji termicznej („Wartość  $T_m$  określa się i oblicza...”, str. 148), jeszcze o regułach Chargaffa, o doświadczeniach Messelona i Stahla, o rozwijaniu nici DNA z powołaniem się na artykuł opublikowany we *Wszechświecie* w 1971 r., o replikacji DNA: „...niskocząsteczkowe fragmenty DNA **wytwarzane** i **syntetyzowane**...” (str. 154; podkreślenia moje, A.P.). Dalej autor stwierdza, że „Drugą funkcją genu jest...

<http://rcin.org.pl>

jego ekspresja fenotypowa" (str. 155) i powraca do omawiania wielkości cząsteczek DNA, pisząc m.in.: „...elementami łączącymi podjednostki DNA w jedną długą cząsteczkę są lipoproteidy, białka, kwasy rybonukleinowe czy tylko rybonukleozydy...” (str. 158). Później wraca do replikacji DNA i stwierdza, „...że informacja genetyczna zlokalizowana jest w DNA, bowiem podczas omawianej syntezy w układzie bezkomórkowym nie zachodziła ani synteza białka ani synteza cząsteczek innych substancji, co wyklucza całkowicie możliwość istnienia innych niż DNA związków stanowiących pośrednio przekąźniki informacji genetycznej” (str. 159). Następnie autor wraca do dwuniciowej struktury DNA, kończy zaś podrozdział powrotem do replikacji.

Kolejny podrozdział rozdziału „Fizjologia genu” nosi tytuł „Histony”. Bardzo trafny jest punkt 7 na str. 163: „histony pod względem swych funkcji biochemicznych są bardzo niepodobne do wielu pozostałych białek”. — Możliwość tę myśl rozszerzyć: w ogóle niektóre białka są niewątpliwie bardzo niepodobne do wielu innych.

W następnym podrozdziale pt. „Niehistonowe białka chromatyny (NHP)” autor pisze o „fizjologii i biochemii NHP” (str. 172).

W podrozdziale „Obraz DNA w chromosomach” Kołataj wraca do denaturacji cieplnej DNA, a przynajmniej tak by można przypuszczać. Nie jestem pewna, bo autor pisze: „Jeśli ten zdenaturowany materiał jest potem przetrzymywany w temperaturze niewiele niższej niż tzw. omówiona wcześniej (na str. 147) temperatura mieszania...” (str. 177). Ale na str. 147 była mowa o temperaturze topnienia, więc skąd ta temperatura mieszania i co ona oznacza? Nieco dalej Kołataj stwierdza, że „...DNA ssaków będzie denaturowany tysiąc razy wolniej mimo, że są i takie odcinki, które denaturują tak szybko jak DNA bakteryjny” (str. 178).

Pozostały tekst książki jest na takim samym poziomie.

A oto przykład zdań bez treści: „Komórka organizmów wyższych więc to pewna niepowtarzalna struktura. Ta jej struktura ma skomplikowaną architekturę. Architektura ta związana jest ściśle z funkcjami, a typowymi przykładami takich współzależności są mitochondria i lizosomy. Można dać je nawet za przykład typowo biologicznej dialektyki w filozofii przyrody” (str. 69).

Kołataj ma ciągotki do filozoficznych refleksji i dowcipów. „Wydaje się, iż taki „płynny” model komórki bardzo blisko nawiązuje do 2500 lat temu wypowiedzianych ustami Heraklita słów „panta rei”” (str. 19). „„Mogę rządzić i z namiotu” powiedział po bitwie pod Garnikiem Aleksander Wielki, „byłem miał tylko dobrą łączność niezależnie od wielkości mojego imperium...” Analogia cząsteczki DNA dającej impulsową informację z młodym Aleksandrem nie byłaby chyba taka odległa... Nomen omen, podobnego zdania był jeszcze przed Aleksandrem Dariusz I perski...” (str. 72).

Druga część książki dotyczy problemów hodowlanych. Są tam zawarte m.in. streszczenia wielu prac z dziedziny „genetyki fizjologicznej” zwierząt. Być może takie streszczenia byłyby przydatne, gdyby nie element niepewności: co Kołataj przekreślił przy streszczaniu.

W sumie książka nadaje się wyłącznie na makulaturę. Można by jeden egzemplarz zostawić jako kuriozum.

Jak wiadomo, przed oddaniem do druku książki są oddawane do recenzji. Warto by było podać do publicznej wiadomości nazwiska recenzentów książki Kołataja. Niech przynajmniej wiemy, kto aprobuje drukowanie książek, które przynoszą wstyd naszemu środowisku naukowemu.

## Recenzja książki pt. „Genetyka fizjologiczna zwierząt”

Autor: Adam Kołłątaj, Wydawca: Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1980, Wydanie pierwsze.

Książka obejmuje 39 arkuszy drukarskich (629 stron), a nakład wynosi 5000+ +250 egz. Na treść książki składa się dziewięć rozdziałów. Przedmiotem mojej recenzji będzie głównie rozdział czwarty pt. „Fizjologia genów”. Inne rozdziały oceniam tylko fragmentarycznie a z recenzji wyłączam cztery ostatnie rozdziały, ponieważ nie czuję się kompetentnym do ich oceny. W recenzji przytaczam liczne cytaty, gdyż ilustrują one najlepiej zawile wywody Autora, które niekiedy po prostu trudno zrozumieć.

W rozdziale „Fizjologia komórki” zwróciłem uwagę na podrozdział zatytułowany „Jądro” (str. 33), obejmujący 4 strony oraz 3 ryciny, z których jedna jest rysunkiem ilustrującym komórki bez jądra (erytrocyty). Nie bardzo wiadomo po co Autor ten rysunek zamieścił (podobnie podrozdział o aparacie Golgiego nie wiadomo dlaczego ilustrowany jest dwiema rycinami przedstawiającymi budowę plemnika). Źródła skąd pochodzą ryciny nie podano. Z lektury tego skromnego podrozdziału dowiadujemy się, że: „Morfologia jądra jest raczej słabo zróżnicowana, a najważniejsze jego elementy budowlane to błona jądrowa, jąderka i sok jądrowy”. Z tych „elementów budowlanych” wyeksponowana jest błona jądrowa, która ma „budowę dość skomplikowaną” bowiem musi „przepuszczać” cząsteczki mRNA z jądra do cytoplazmy i liczne białka z cytoplazmy do „kariolimy”. Nieco dalej czytamy jeszcze, że mimo obecności „tubul” błona jądrowa musi być „ścisła i szczelna, by zabezpieczyć swoją wewnętrzną strukturę”. Tyle na temat struktury błony jądrowej. Autor stara się zainteresować czytelnika procesem transportu przez błonę jądrową. Czytamy zatem dalej (str. 35): „Te nadzwyczaj ciekawe procesy transportowe są jeszcze w dużej mierze zupełnie nie opracowane, prawie nie znane od strony molekularnej. W tubusach, czyli jakby kanalikach błony jądrowej, może odbywać się ruch cząsteczek w obie strony dosłownie jak na głównej ulicy miasta, gdyż o ile wielkość, a przede wszystkim długość cząsteczek wychodzącego mRNA jest możliwa do określenia, to długość cząsteczek białek histonowych, kwaśnych i resztkowych, związanych i nie związanych z chromatyną, fosfoproteidów, białek enzymatycznych, np. polimerazy czy transkryptazy jest prawie nie znana, choć znajduje się w centrum uwagi biologów molekularnych szukających chytrych metod, by wielkości te oznaczyć”. Informacja zawarta w tym cytacie jest pozbawiona sensu. Trudno doprawdy zrozumieć na czym mają polegać procesy transportowe w „tubusach, czyli jakby kanalikach błony jądrowej”. Czyżby autor nigdy nie słyszał o strukturach porów błony jądrowej ich budowie i funkcji? Jaki związek ma wywód o wysiłkach zmierzających do oznaczenia „długości” cząsteczek białkowych i mRNA z ruchem (transportem) cząsteczek?

„W jądrze — czytamy dalej na str. 37 — widać jąderko (lub jąderka, które mają dużą gęstość elektronową i strukturę włóknisto-ziarnistą”, a w jąderkach „zaobserwowano rybosomy”. Wiadomości o budowie jądra i jąderka uzupełnione są jeszcze informacjami w innych rozdziałach. Dla przykładu podaję fragment na str. 121: „Można wysnuć wniosek, że materiał jąderkowy, który „otwiera” (podkreślenie moje — M. Ch.) się po lizie błony jąderkowej, dla komórki jest potrzebny do tego, aby zanikła błona jądrowa w ogóle, a nawet do tego, by nastąpiła spiralizacja „wyciągniętych” dotychczas chromosomów, by zgrubiały one w prawidłowym rozdziale do komórek potomnych”. Tak mniej więcej przedstawia się według Autora fizjologia i budowa jądra i jąderka.

Sześć stron poświęconych jest „fizjologii rybosomów”. „Historia rybosomów” — jak pisze Autor — jest tym ciekawsza, że są one „najbardziej stałymi elementami komórki pod względem budowy morfologicznej”. Z następnego zdania (str. 53) do-

wiadujemy się, że rybosomy znajdują się w komórce „bądź jako swobodne pęcherzyki, bądź też związane po kilka lub kilkadziesiąt tworząc nawet tzw. polisomy, mogą się wiązać z innymi organellami komórki, np. z jądrem czy mitochondriami...”. Sądziłem, że to pomyłka ale na następnej stronie (str. 54) Autor utwierdza czytelnika nadal w przekonaniu, że rybosomy są „pęcherzykami”, i że produkty asocjacji rybosomów nazywamy polisomami. „O ile produkty asocjacji rybosomów nazywamy polisomami lub ciężkimi rybosomami, to cząsteczki powstałe w wyniku dysocjacji rybosomów po prostu podjednostkami” — uczy Autor, podpierając się cytatem pracy Watsona z 1964 r., która figuruje w spisie piśmiennictwa jako praca z r. 1965. Następujące dalej informacje o strukturze rybosomów są chaotyczne i niezborne. Wątpię, czy czytelnik nie znający przedmiotu po przestudiowaniu tego podrozdziału będzie miał prawidłowy obraz struktury i „fizjologii” rybosomów.

Niezwykle są poglądy Autora na proces mutacji; na str. 112 czytamy: „O ile gen zmutował, oznacza to, że komórka go nie ma...” Opis metod stosowanych w procesie hybrydyzacji komórek zawiera mało rzeczowych informacji, niedobór ten rekompensuje bogata oprawa językowa. (str. 111): „...niektóre wirusy rozwijają na tym polu szczególnie atrakcyjną działalność...” i dalej: „Aby nie dać wirusowi zbyt dużych możliwości „rozpędu” w obszarze błon komórkowych często inaktywuje się go poprzez promienie ultrafioletowe”.

Obszerny rozdział pt. „Fizjologia genów” jest zlepkiem informacji, z których raczej nie wyłania się jasny opis ani budowy DNA ani struktury genów ani ich ekspresji. Przytaczam próbkę akapitu omawiającego strukturę DNA (str. 143): „Jak wiadomo DNA jest siedliskiem informacji genetycznej. Jego cząsteczki są zbudowane z długiej, podwójnej wstęgi śrubowo zwiniętej, zwanej bihelisą. Każda ze wstęg składa się z łańcuchów wielu drobin cukru dezoksyrybozy — pentozy a więc o 5 atomach węgla, połączonych ze sobą za pośrednictwem cząsteczek kwasu fosforowego  $H_3PO_4$ . Są to więc łańcuchy fosforanowo-pentozowe. Dezoksyryboza jednego łańcucha łączy się z cząsteczką tego cukru drugiego, równoległego łańcucha parami zasad azotowych: adeniny i tyminy oraz cytozyny i guaniny... Oba te łańcuchy tworząc przestrzennienie ową bihelisę są splecione wzdłuż swej osi prawoskrętnie, zgodnie więc z ruchem wskazówek zegara. ...Cząsteczki zasad azotowych przyłączone są do molekuly dezoksyrybozy przy 1' atomie węgla cukru D-rybozy. Takie połączenie zasady i cukru ma charakter glikozydowy, a cząsteczka powstała z tego połączenia nazywa się dezoksyrybonukleozydem. Ponieważ do takich cząsteczek przyłącza się jeszcze kwas fosforowy — łącząc je ze sobą w polimerową nić — powstaje molekula złożona z zasady organicznej, kwasu fosforowego i D-rybozy”.

Na podstawie powyższego opisu trudno wyobrazić sobie budowę cząsteczki DNA i te połączenia dezoksyrybozy (czy może D-rybozy?) poprzez kwas fosforowy i to łączenie się z równoległych łańcuchów parami zasad.

Opisy podstawowych fizycznych właściwości cząsteczki DNA zawierają wiele niejasnych i niezręcznych sformułowań. Temperaturę topnienia DNA koreśla się jako temperaturę „stapiania się w roztworze” (str. 146), w innym miejscu (str. 177) jako temperaturę „mieszania” (?). Opis zjawiska denaturacji termicznej DNA (str. 148) jest nieudany. Rozważania nad mechanizmem rozdzielania obu nici DNA i procesem replikacji są — mówiąc delikatnie — naiwne. Oto przykład, (str. 152): „Gdyby jeden łańcuch odwijał się w bihelisie względem drugiego, musiałyby się one obracać dookoła długiej osi, lecz we wzajemnie przeciwnych kierunkach. Doprowadziłoby to szybko do „zahaczenia się” jednej zasady organicznej o drugą i do niemożliwienia (zapewne błąd zecerski — MCh.) dalszego odwijania w ogóle. Gdyby więc obie wstęgi odwijały się, musiałyby się od siebie oddalać w kierunku przeciwnym do osi”. Albo dalej, na str. 154: „Werner (1971) ogłosił przed kilku laty propozycję nowego modelu replikacji chromosomowego bakteryjnego DNA sugerując, że łańcuch chromosomal-

nego DNA bakterii rozplata się pod działaniem specyficznej nukleazy „rozpoznającej” krótki stosunkowo odcinek polinukleotydowy o długości mniej więcej 3000 nukleotydów. Synteza jednego lub dwóch fragmentów DNA miałyby zachodzić na takim specyficznym odcinku. Ma to być według Wenera proces różny od procesu syntezy reparatywnej a więc takiej, podczas której reperowane są po prostu uszkodzone odcinki DNA nazywane „odcinkami Okazaki” (od nazwiska jego odkrywcy). Okazaki i wsp. (1970) opisali zjawisko częściowej denaturacji bihelisy DNA zachodzącej w czasie replikacji”. Oprócz niejasnej i błędnej interpretacji danych z piśmiennictwa, Autor nie daje czytelnikowi możliwości poznania prac oryginalnych, gdyż obie cytowane prace nie figurują w spisie.

Pobieżne sprawdzenie kilku innych fragmentów książki wskazuje, że ominięcie w spisie piśmiennictwa prac cytowanych w tekście jest dość częstym przeoczeniem Autora. Na str. 282 są cytowane prace Bendich i McCarthy (1970), Perry (1967), oraz Kumar i Warner (1972) — żadna z nich nie figuruje w spisie piśmiennictwa.

Opis budowy chromosomu jest chaotyczny, niespójny, pełen barokowych ozdób zaciemniających treść. Pełno tu ogólnikowych terminów pozostających bez objaśnień, ujętych w nieco napsuzoną formę. Na przykład na str. 179 czytamy: „Wyniki wszystkich tych obserwacji ujawniły, że cząsteczki kwasów nukleinowych mają określoną strukturę pierwszorzędową, zależną od chemicznej budowy łańcuchów, strukturę drugorzędową rozumianą jako konformację i również trzeciorzędową w postaci specyficznej organizacji przestrzennej helikalnych łańcuchów”.

W tym i w innych rozdziałach rażąca wadą jest brak logicznego powiązania poszczególnych akapitów. Tuż za powyższym cytatem jest mały akapit o powtarzalnych sekwencjach DNA, a zaraz za nim autor opisuje proces kondensacji i dekondensacji chromatyny, następnie wspomina o heterochromatynie, powraca do problemu sekwencji powtarzających, by za chwilę mówić o budowie włókna chromatynowego. Wzmianki o „preparatyce genów” są wymieszane z informacjami o satelitarnym DNA i degradacji DNA.

Podrozdział zatytułowany „Obraz DNA w chromosomach” jest niestrawnym koktajlem. Czytelnik po przeczytaniu tego podrozdziału nie wyrabia sobie żadnego pojęcia o organizacji chromosomu interfazowego i metafazowego. Brak tu klarownego opisu włókna chromatynowego, nukleosomu, pominięto zupełnie nowe poglądy na organizację struktury chromosomu.

Podrozdział „Gen jako jednostka informacji” nie odbiega poziomem od poprzednich. Znowu nie jest to jasny i prosty wykład lecz chaotyczny zbiór danych z piśmiennictwa, ubarwiony nieporadnymi objaśnieniami. Na str. 197 czytamy oto jak Nirenberg i Matthaer złamali kod genetyczny: „Uzyskali oni monourydynowy polinukleotyd, tj. nić RNA zbudowaną poza kwasem fosforowym i pentozą rybozą wyłącznie z uracylu jako zasady organicznej zastępującej tyminę w DNA. Nić ta miała więc wzór... U U U U U..., była wobec tego kwasem poliurydynowym i kierowała bardzo charakterystycznie w budowywaniu w rosnący łańcuch peptydowy fenyloalaniny. Powstające białko było zbudowane więc tylko z jednego aminokwasu, a właściwie trudno tu mówić o białku, lepiej o peptydzie. Taki wynik doświadczenia przeszedł wszelkie oczekiwania i stał się — jak już dzisiaj wiemy — epokowym. Wskazywał, że wyznacznikiem miejsca fenyloalaniny w łańcuchu polipeptydowym jest nukleotyd urydynowy. Dalsze doświadczenia wskazywały, że dla wbudowania jednej cząsteczki fenyloalaniny trzeba trzech, a nie dwóch czy czterech nukleotydów syntetycznego RNA. Był to po prostu klucz do rozszyfrowania kodu genetycznego. Prace szybko potoczyły się naprzód i już w kilka lat potem wyjaśniono w całości to zagadnienie. Odkrycie to było fantastyczne jeszcze i dlatego, że w 1961 roku Nirenberg, Ochoa i inni badacze z laboratoriów USA nie wiedzieli specjalnie wiele

o mRNA, który to związek odkryli i wprowadzili dla niego nazwę do literatury Jacob i Monod, także w tym roku". Cytat pozostawiam bez komentarza.

Zajrzyjmy jeszcze do podrozdziału pt. „Transkrypcja”. Na str. 247 dowiadujemy się, że: „O ile gen jest odcinkiem DNA, jakkolwiek by go nie interpretować, to między tym fragmentem DNA w chromosomie a cechą obwodową, czyli fenotypową musi być jakaś droga przepływu informacji, tak by zawarta w zespole kodonów mogła ujawnić się w postaci specyficznego białka, od białka zależą bowiem cechy”. „Gdzie są ośrodki syntezy białek i jak daleko leżą od centrów informacyjnych...?” zapytuje autor (str. 248) i w następnym zdaniu wyjaśnia: „Wydaje się, że pewną inspiracją w tym kierunku badawczym było najpierw wykazanie, jeszcze w 1948 r. przez Boivina i Vendrelich (1948), że ilość DNA w normalnych diploidalnych komórkach somatycznych organizmów tego samego gatunku jest zawsze ta sama”. Doprawdy trudno doszukać się logicznego związku między obiema kwestiami. Ponadto cytowanej pracy nie znalazłem w wykazie piśmiennictwa.

Dalsze rozważania nad procesem transkrypcji są znowu potokiem informacji wymieszanych bez ładu i logicznego porządku, których trudno zrozumieć. Jest tu mowa o tym, że rybosomy mają mało „specyficzny” prawie „jednostajny” RNA, a najważniejszym elementem budowy mRNA jest to, „... że cząsteczka mRNA nie jest podwójną tylko pojedynczą nicią”..., że „... messenger RNA jest więc normalną cząsteczką o prostym łańcuchu ogniwi...”, że polimeraza RNA podejmuje „decyzję” itd. Fakt, że w mRNA stosunek par zasad AU/GC jest podobny do stosunku par zasad AT/GC w DNA pozwala Autorowi wysunąć wniosek, że „transkrypcja RNA na DNA jest tak samo dokładna jak proces samoreplikacji DNA” (str. 253). Na niektórych stronach trudno znaleźć nawet kilka zdań napisanych poprawnie, mających znaczenie, bogatych w treść.

Na str. 254 czytamy: „Do rzadkości rzeczywiście należeć będzie jak mówi Watson (1970) — znalezienie jednoniciowych cząsteczek RNA, w których ilość adeniny równa się ilości uracylu, a ilość guaniny ilości cytozyny”. Przepuszczalnie miało to być podparcie stwierdzenia, że „Każdy gen kontroluje wytwarzanie tylko jednej nici komplementarnej RNA, a nie dwóch” (str. 253). Chciałem sprawdzić to w pracy Watsona, ale znowu nie znalazłem jej w zamieszczonej na końcu książki „Bibliografii ważniejszych pozycji cytowanych i omówionych w tekście”.

Odnosnik na str. 378 informuje, że dla hnRNA „obecnie używa się już nazwy pre-mRNA”. Jest to informacja błędna, gdyż nie ma znaku równości pomiędzy hnRNA i pre-mRNA. Niezrozumiałe jest zdanie na str. 378: „... HnRNA ma swoiste miejsca aktywacji z DNA, dając tzw. strefy akceptorowe, co w następstwie doprowadza do współdziałania z białkami regulującymi”, a wywód o relacji hnRNA do „aktywatorów RNA” i mechanizmie aktywacji genów jest zupełnie niejasny.

Inne podrozdziały traktujące o strukturze rybosomalnego RNA i tRNA, o regulacji syntezy białka, regulacji aktywności genów, organizacji operonu itd. pełne są również informacji wyjaśnionych w sposób daleki od poprawności, często błędnych nie układających się w przejrzysty obraz. „Udowodniono w żmudnych doświadczeniach — pisze autor na str. 254 — że proces (chodzi o syntezę RNA — MCh.) przebiega jednak od atomu 5' do atomu 3'...”

Terminologia i pisownia jest w wielu przypadkach niepoprawna. Obecne wyrazy odmienia się często według gramatyki polskiej, np. transfer-RNA w dopełniaczu przybiera formę „transfera-RNA” (str. 22), na str. 58 czytamy, że „rybosom jest organellum komórkowym”, w wielu miejscach występuje „kwas DNA” itp. tak wiele usterek i nieściśłych informacji w dodatku podanych w dziwnym języku, którego miejscami nie sposób zrozumieć. Można podać wiele przykładów zdań-dziwolągów; np. str. 32: „Kontakt komórek ze sobą był też tematyką badawczą wielu procesów



regeneracyjnych”, str. 84: „Nie wiadomo czy powstawanie wrzeciona, czy spirali-  
zacja i rozkręcanie się chromosomów też mają swe geny, są warunkowane gene-  
tycznie czy też to tylko okoliczność, jedna i druga wynikająca z samej techniki  
podziału, z technologicznej konieczności ruchliwości”, str. 380: „W odniesieniu do  
NHP np. można mówić o regulacyjnej roli genu bardzo szeroko, ale dyskusyjny  
jest tu moment ich wielkiego zróżnicowania...” str. 136 — „W obserwacjach uzu-  
pełniających potwierdzono wcześniejsze domysły — był to czy jest to RNA infor-  
macyjny”.

Na str. 377 Autor wspomina, że Bonner i Huang”... uzyskali frakcję chromoso-  
malnego RNA tzw. cRNA, który charakteryzuje się tym, że ma dużą zawartość kwa-  
su dihydrourydynowego, wykazującego swoistość tkankową oraz zwiększającego się  
w czasie regeneracji wątroby”. Jest to ewidentny błąd stylistyczny zmieniający zu-  
pełnie sens omawianego zjawiska.

Ornamentacja połączona z brakiem treści i złą polszczyzną daje niepowtarzalny  
efekt. Oto na str. 69 czytamy: „Komórka organizmów wyższych więc to pewna  
niepowtarzalna struktura. Ta jej struktura ma skomplikowaną architekturę. Archi-  
tektura ta związana jest ściśle z funkcjami, a typowymi przykładami takich współ-  
zależności są mitochondria i lizosomy. Można dać je nawet za przykład typowo  
biologicznej dialektyki w filozofii przyrody”. Poprzestają na tych uwagach po od-  
kryciu, że podobnie jak u innych eukariotycznych istot zapewne i we mnie tkwią  
i funkcjonują geny „czułości” (str. 311, str. 378).

Podsumowując, należy stwierdzić, że książka Adama Kołłątaja nosząca tytuł  
„Genetyka fizjologiczna zwierząt” nie powinna była ujrzeć półek księgarskich.  
Książka nie tylko nie uczy, ale w wielu przypadkach wypacza obraz dawno już  
poznanych i udokumentowanych zjawisk z zakresu biologii. Autor podjął się zadania  
które przekracza Jego znajomość przedmiotu i naukową kompetencję, przynajmniej  
w części dotyczącej biologii molekularnej genów. Chaotycznie zebrane dane doświad-  
czalne są mało użyteczne, raczej wprowadzają bezład niż porządkują naszą wiedzę  
z zakresu biologii genów. Zrozumienie treści utrudniają w wielu miejscach nie-  
prawidłowości języka i stylu. Niektóre informacje mają już tylko historyczne zna-  
czenie; brak dyskusji czy choćby wzmianek o nowych odkryciach. Nie można też  
wybaczyć Autorowi niesumiennego zebrania bibliografii.

W równej mierze wina za tę nieudaną pozycję spada na Państwowe Wydaw-  
nictwo Naukowe, którego decyzje wydawnicze powinny być oparte na rzeczowych  
ocenach maszynopisów prezentowanych do druku. Czyżby w tym przypadku odstą-  
piono od obowiązku recenzji? Jeśli jednak recenzje były i były pozytywne, to jej  
autorzy muszą również czuć się obciążonymi odpowiedzialnością.

*Mieczysław Chorąży*

### **Recenzja książki „Genome Organization and Expression in Plants”, Ed. C. J. Leaver, Plenum Press, New York, London, 1980, str. 607**

Treścią książki są materiały 10-dniowej Konferencji (11—21 lipca 1979), od-  
bytej w Uniwersytecie w Edynburgu i dotyczącej wymiany doświadczeń i postępu  
w dotychczas pozostającej w tyle dziedzinie organizacji i ekspresji genomów roślin-  
nych. Zawarty jest w niej ok. 45 referatów wygłoszonych przez zaproszonych  
specjalistów, omawiających ostatnie osiągnięcia w prawie wszystkich dziedzinach  
wynikających z tytułu, stan obecny wiedzy, prace własne autorów i ewentualne  
przyszłe kierunki badań.

Poszczególne referaty zostały podzielone na grupy tematyczne dotyczące: organizacji genomu jądrowego, klonowania i analizy DNA roślinnego, transkrypcji, ekspresji genomu jądrowego i jej regulacji, właściwości, biosyntezy i regulacji genetycznej białek zapasowych zbóż oraz białek roślin motylkowych, organizacji i ekspresji genomu chloroplastów, syntezy, transportu i zestawu białek tych organów, organizacji genomu w mitochondriach, biologii wiązania azotu, plazmidu Ti z *Agrobacterium tumefaciens*, organizacji i ekspresji genomu wirusów oraz wiroidów, jako czynników kontrolnych. Jak widać z tego przeglądu zagadnień, referaty dotyczyły podstaw teoretycznych i aspektów metodycznych szybko rozwijającej się wiedzy o genetyce molekularnej roślin, bardziej użytkarnych aspektów dotyczących genetycznej regulacji syntezy białek zapasowych zbóż i roślin motylkowych, molekularnych mechanizmów regulacji wiązania azotu przez bakterie i udziału genomu rośliny — gospodarza i wreszcie bardzo nowych zagadnień dotyczących roli wiroidów w regulacji metabolizmu roślin.

Wygłoszone na wspomnianej konferencji referaty, a więc i treść książki mają dwojaki charakter: część z nich to przeglądy prac ostatnich kilku lat (w zasadzie od 1976 r. tzn. od poprzedniej Konferencji na ten temat w Strasburgu), a część to prace oryginalne dotyczące wymienionych zagadnień. Materiał zawarty w książce nie stanowi więc zwartej całości wiedzy określonej w tytule, daje natomiast bardzo wiele opisów metodyki oraz bogatą literaturę, co stanowi o dużej wartości książki. Charakterystyczne jest przy tym, że kolejno omawiane zagadnienia, zarówno w pracach przeglądowych, jak i oryginalnych, dotyczą w większości roślin użytkowanych rolniczo (zbóż krajowych, kukurydzy soi oraz niektórych innych motylkowych), co przedstawia istotną wartość dla genetyków — praktyków i może mieć istotne znaczenie dla unowocześnienia prac genetyczno-hodowlanych.

W bardziej szczegółowym omówieniu treści książki należy wskazać na przedstawienie w niej wielu szczegółów o organizacji genomów jądrowych, chloroplastów i mitochondriów, a także plazmidów Ti *Agrobacterium tumefaciens*. Daje to zarówno pogląd na różnice w stosunku do znacznie lepiej poznanych genomów zwierzęcych i drobnoustrojów, a także możliwość porównania ich organizacji w poszczególnych organellach komórek roślinnych. Szczególnie interesujące są badania genomów w roślinach zbożowych, struktur powtarzalnych i niepowtarzalnych oraz stref odpowiedzialnych za syntezę białek zapasowych. Tu szczególnie interesujące są dane o występowaniu prekursorów białkowych o wyższych masach cząsteczkowych, co powoduje wtórne różnicowanie się białek; wykazano to np. u kukurydzy i grochu. Wiele miejsca poświęcono również pracom nad regulacją ekspresji na poziomie genomu, syntezy mRNA oraz zmian posttranskrypcyjnych (np. przy syntezie prolamin zbóż), a także zmian posttranslacyjnych w obrębie białek. Nieco uwagi poświęcono też współdziałaniu roślinnych regulatorów wzrostu w ekspresji genomów roślinnych. Sporo prac dotyczyło organizacji genomów w chloroplastach, udziału i lokalizacji genów kodujących poszczególne frakcje rRNA (wspólna transkrypcja i powstawanie wtórne poszczególnych frakcji w trakcie dojrzewania) oraz zależności genetycznej kompleksowych białek chloroplastów (niektóre podjednostki mogą być kontrolowane przez DNA jądrowy). Podobnie rozpatrywano przykłady współzależności między genomem mitochondriów i fragmentami DNA jądrowego, organizację genomu mtDNA i regulowaną syntezę białek mitochondrialnych.

Końcowe referaty poświęcono udziałowi DNA drobnoustrojów i wirusów w regulacji procesów metabolicznych u roślin, poświęcając sporo uwagi udziałowi genomu roślinnego i bakterii *Klebsjella pneumoniae* w regulacji biosyntezy białek nitrogenazy oraz procesów towarzyszących w wiązaniu azotu. Wnioskuje się, że łatwiejsze będzie przeniesienie do roślin (np. zbożowych) genów kontrolujących tworzenie brodawek korzeniowych, niż genów odpowiedzialnych za wykształcenie

samego procesu wiązania  $N_2$ . Inne zagadnienie dotyczy współdziałania genów roślinnych z plazmidami Ti *Agrobacterium tumefaciens* w tworzeniu na roślinach tkanek tumorowych. W tym zakresie badano mechanizmy transformacji DNA w komórce roślinnej pod wpływem DNA plazmidowego oraz organizację plazmidów, co może stanowić interesujący model badawczy. Wreszcie ostatnie referaty dotyczyły organizacji genomów kilku wybranych wirusów roślinnych, z próbami ich wykorzystania jako nośników obcego DNA, który mógłby być wbudowany do genomów roślinnych. W końcu ostatni, długi referat przeglądowy poświęcono wiroidom, czyli niskocząsteczkowym patogenom roślinnym (do 360 par zasad) zbudowanym z RNA bez otoczki, wywołującym niekonwencjonalne choroby roślin. Ze względu na poznana strukturę i małe rozmiary mogą one stanowić dogodny model do badań funkcjonalnych określonych struktur.

W zakończeniu należy stwierdzić, że opiniowana książka zawiera bardzo wiele najnowszego i różnorodnego materiału dotyczącego molekularnych podstaw genetyki roślin, a więc z dziedziny znacznie dotychczas zaniedbanej. Dlatego poszczególne jej części warto są polecenia tym wszystkim, którzy zajmują się, lub interesują genetyką roślin.

Jerzy Kączkowski

## GABA- Biochemistry and CNS Functions

Red. P. Mandel i P. V. DeFeudis

Plenum Press, 1979, New York, London, str. 505, cena

Recenzowana książka stanowi 123 tom z serii *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Zawiera ona zbiór materiałów na temat biochemii i roli kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego w ośrodkowym układzie nerwowym prezentowanych na międzynarodowym sympozjum (Strasbourg, lipiec 1979).

Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, który w układzie nerwowym kręgowców pełni rolę neurotransmitera hamulcowego, cieszy się coraz większym zainteresowaniem ze strony neurobiologów. Nic też dziwnego, że w omawianym tomie obok artykułów poświęconych biochemii GABA są prace farmakologiczne i prace o implikacjach klinicznych. Artykuły, zarówno o charakterze przeglądowym jak i szczegółowe doniesienia, zgrupowano w czterech działach: 1) Enzymologia układu GABA, 2) Metabolizm GABA, pobieranie i wydzielanie, 3) Receptor GABA, 4) Korelaty behawioralne. Stosunkowo wiele miejsca poświęcono badaniom enzymów-transferazy GABA (GABA-T) i dekarboksylazy glutaminianowej (GAD), aktywność tych enzymów bowiem reguluje poziom GABA w mózgu. Przedstawione prace dotyczą w znacznej mierze metod oczyszczania GABA-T i GAD z różnych źródeł oraz właściwości uzyskanych preparatów enzymatycznych. Artykuły metodyczne przeważają również w dziale pt. Receptor GABA.

A oto kilka, według mnie najciekawszych, informacji zawartych w monografii: 1) Z badań nad rozmieszczeniem poszczególnych składników układu GABAergicznego w różnych częściach mózgu wynika, że nie ma ścisłej zależności pomiędzy aktywnością presynaptycznych wskaźników układu GABAergicznego takich jak GAD czy pobieranie GABA a postsynaptycznym receptorem GABA (Enna). Zatem dla określenia roli GABA w danym obszarze mózgu konieczne jest kompleksowe badanie składników układu GABAergicznego. 2) Komórkowa lokalizacja pobierania

GABA, badana metodami autoradiograficznymi, w hodowli tkankowej wskazuje na udział komórek glejowych w inaktywacji tego neurotransmitera (Hösli i Hösli). 3) Podjęto też próby powiązania zmian w układzie GABAergicznym a zachowaniem się zwierząt (Blindelmanni *wsp.*). Obserwowano, że u myszy hodowanych w izolacji (w następstwie czego stają się one agresywne) aktywność GAD jest znacznie obniżona w porównaniu ze zwierzętami trzymanymi w klatkach grupowych. Należy zaznaczyć, że u myszy hodowanych w izolacji stwierdzono równocześnie obniżenie poziomu GABA. Obserwacje te implikują udział układu GABAergicznego w regulacji agresywnego zachowania się zwierząt oraz wskazują na możliwość zmian adaptacyjnych w metabolizmie tego neurotransmitera.

Książka zyskałaby niewątpliwie na wartości, gdyby zawierała uwagi końcowe. Szkoda więc, że redaktorzy nie podjęli próby podsumowania treści obrad. Reasumując wydaje mi się, że ta, aczkolwiek ciekawa monografia, poruszająca zagadnienia o znaczeniu ogólnobiologicznym, znajdzie odbiorców jedynie w wąskim gronie znawców zagadnienia.

*Jolanta Skangiel-Kramska*

## **A. Ben-Naim** **Hydrophobic Interactions**

**Plenum Press, New York, London, 1980, str. 7+311, cena US \$ 32.50**

Współczesna biochemia przyjmuje, że oddziaływania hydrofobowe odgrywają istotną rolę w takich zjawiskach jak formowanie struktury trzeciorzędowej makrocząsteczek, powinowactwo enzymu do substratu i in. Charakterystyczne jest jednak, iż autorzy tłumaczący istotę oddziaływań hydrofobowych odwołują się w większym stopniu do intuicji czytelnika niż do opisującej je definicji fizykochemicznej. Definicji takiej brak ze względu na niedostateczny stopień poznania samego zjawiska.

Arieh Ben-Naim w książce swojej zawarł pełny przegląd posiadanej dziś wiedzy na temat chemii fizycznej oddziaływań hydrofobowych. Przegląd ma charakter syntetyczny. Książka składa się z pięciu rozdziałów i dziesięciu uzupełnień. Rozdziały to: 1. Wstęp i podstawowe równania, 2. Bardzo rozcieńczone roztwory i oddziaływania hydrofobowe, 3. Oddziaływania hydrofobowe w dimerach, 4. Oddziaływania hydrofobowe między wieloma cząsteczkami substancji rozpuszczonej, 5. Zależność oddziaływań hydrofobowych od temperatury i ciśnienia. Wiadomości zawarte w tej części dyskutowane są głównie z zastosowaniem pojęć termodynamiki klasycznej, a sposób przedstawienia czyni je w pełni zrozumiałymi nawet dla czytelnika nie dysponującego zbyt bogatym aparatem matematycznym. Wywody wymagające zastosowania w większym stopniu matematyki, głównie mechaniki statystycznej, zawarte są w uzupełnieniach.

Książka napisana jest stylem jasnym, a wydana bardzo starannie. Zainteresuje oczywiście fizykochemików zajmujących się poruszaną w niej problematyką. Pragnę jednak tę książkę polecić także biochemikom, zwłaszcza tym, których interesuje rola oddziaływań hydrofobowych w zjawiskach biologicznych. Wobec coraz powszechniejszego przekonania o wadze tych oddziaływań warto sobie zdawać sprawę z tego, jak mało wiemy o ich mechanizmie.

*W. Rode*

## Ankieta Redakcji Acta Biochimica Polonica

Redakcja Acta wysłała ankietę do wszystkich biochemików zrzeszonych w Polskim Towarzystwie Biochemicznym celem uzyskania informacji o poczytności pisma i jego dostępności w bibliotekach oraz zasięgnięcia opinii o piśmie i środkach, jakie należy podjąć dla podnoszenia jego poziomu i znaczenia.

Rozesłano 1200 ankiet uzyskując 171 odpowiedzi (15%). Wśród respondentów Acta regularnie czyta 76 osób, sporadycznie 85 osób. Dziewięciu respondentów nie czyta pisma wcale. 38 osób (ok. 20%) prenumeruje pismo, ale u 80% respondentów Acta znajdują się w miejscu pracy. 75 osób (45%) publikuje prace w Acta.

Większość respondentów uważa, że skrócenie czasu publikacji jest najważniejszym środkiem podniesienia rangi i znaczenia pisma, na drugim miejscu stawiając dobór odpowiednich kryteriów oceny prac, na trzecim równocześnie zwiększenie objętości pisma, rozszerzenie Komitetu Redakcyjnego o zagranicznych recenzentów i zapewnienie szerszej informacji o piśmie. Za mniej istotne uznano zmiany w dotychczasowym sposobie i formie redagowania pisma.

Respondenci poruszali także sprawę charakteru pisma, zarzucając rozproszenie tematyczne prac, mały udział prac z biochemii klinicznej, biochemii roślin i biochemii stosowanej. Zwracano również uwagę, na niewielki udział prac z najlepszych ośrodków biochemicznych w kraju, jakkolwiek były również głosy, że w ośrodkach tzw. prowincjonalnych panuje przekonanie o preferencji ośrodków warszawskich i elitarności pisma. W wypowiedziach poruszano również niesłuszne umniejszanie wartości prac publikowanych w Acta a przecenianie znaczenia faktu publikacji w czasopiśmie zagranicznych, nawet w pismach o takim samym lub niższym poziomie od Acta.

Respondenci rozważali także możliwość uatrakcyjnienia pisma przez jego „umiędzynarodowienie” (usunięcie wyrazu „polonica” z nazwy pisma, zdobywanie zagranicznych autorów, recenzentów, a być może stworzenie pisma biochemicznego wspólnego dla krajów demokracji ludowej. Zastanawiano się nad możliwością publikowania zeszytów tematycznych poświęconych wspólnemu problemowi. Szereg respondentów postulowało wprowadzenie działu krótkich doniesień (*short communications*). Podkreślano znaczenie doboru odpowiednich recenzentów i zachęcanie ich do wyczerpujących, rzeczowych ocen niezależnie czy ocena pracy jest negatywna czy pozytywna.

Redakcja dziękuje wszystkim respondentom za nadesłanie odpowiedzi na pytania zawarte w ankiecie i ogólne własne uwagi. Ze swej strony informujemy, że przyspieszenie czasu wydawania prac jest i będzie główną troską Redakcji, a opóźnienia są spowodowane przetrzymywaniem numerów w drukarni od 6 do 9 miesięcy. Redakcja ma nadzieję, że obecnie po zastosowaniu przez drukarnię techniki mono-foto terminy będą krótsze. Jedynie w nielicznych przypadkach opóźnienia są spowodowane przez recenzentów. Po oddaniu numeru do druku w tecze redakcyjnej nie pozostaje żadna gotowa praca. Opracowania redakcyjne są robione bieżąco. Stąd publikacja krótkiego doniesienia nie jest nigdy szybsza niż przeciętnie długiej pracy. Krótkie prace są zawsze przyjmowane, o ile zawierają element nowości naukowej. W konsekwencji bezcelowe jest stwarzanie działu krótkich komunikatów.

Redakcja zabiega o kompetentnych, starannych recenzentów w tym także chemików, fizyków, matematyków. Redakcja wysoko ceni sobie współpracę recenzentów, która wielokrotnie prowadzi do bezpośrednich rozmów z autorami prac, a nawet kierowania pewnymi doświadczeniami. Redakcja podjęła próbę wysyłania prac do recenzentów zagranicznych. Rodzaj przyjmowanych kryteriów oceny sprawia wrażenie pozornej preferencji czy elitarności pisma. Redakcja zawsze dokłada wiele

pracy, aby pomóc autorom mniejszych ośrodków w opracowaniu merytorycznym i redakcyjnym ich prac. Nie mamy natomiast żadnego wpływu na tematykę i pochodzenie przysyłanych do Redakcji prac. Każda jest poddawana tej samej ocenie. Stosując przyjęte przez recenzentów i Redakcję kryteria liczba drukowanych arkuszy *Acta* nie przekracza 40. Dlatego wydaje się obecnie bezcelowe staranie o przekształcenie *Acta* z kwartalnika w dwumiesięcznik.

Rozważając uwagi i opinie zawarte w odpowiedziach ankiety, Redakcja podziela zdanie jednego z respondentów, że „żyjemy w erze dużych czasopism biochemicznych o profilu międzynarodowym i szereg czasopism lokalnych, jeszcze o wysokiej randze 20-30 lat temu obecnie bądź całkowicie zniknęło, (np. *Biochemische Zeitschrift*) bądź bardzo straciło na znaczeniu (np. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie, Biochemical Journal*). Tak, jak w Polsce prawie nieznaną jest np. włoskie czasopismo biochemiczne (drukowane po angielsku), tak też *Acta* są też w niewielkim stopniu znane poza granicami kraju”. Redakcji nie wydaje się słuszne „umiędzynarodowianie” pisma, a przeciwnie, uważa za celowe podkreślenie jego lokalnego, narodowego charakteru. Zdaniem członków Redakcji *Acta* reprezentowały dawniej w większym stopniu polską biochemię niż obecnie i należy dołożyć wszelkich starań, by przywrócić im tę rolę. W tym celu Redakcja zachęca polskich biochemików do zgłaszania materiałów do tzw. „numerów specjalnych” zawierających szereg prac z określonego ośrodka, lub numerów poświęconych biochemikom-członkom honorowym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego lub innym zasłużonym dla polskiej biochemii osobom. Wydawanie takich numerów np. jednego rocznie dostarczałoby szerszej informacji o zakresie prac biochemicznych prowadzonych przez różne ośrodki w kraju, o co również upominali się niektórzy respondenci. W ten sposób przywrócona byłaby w pewnym stopniu rola pisma w historii polskiej biochemii.

Redakcja

SPIS TREŚCI

Michał Laskowski — (1905—1981)	I
E. Bartnik — Nowe w biochemii . . . . .	123
R. Dąbrowska — Fosforylacja białek aparatu kurczliwego mięśni . . . . .	125
P. Masłowski, S. Kowalczyk — Rola nieorganicznego pirofosforanu w bioenergetyce komórki . . . . .	147
T. Sawicka — Biosynteza glikokoniugatów plazmolemy komórek ssaków . . . . .	157
J. Andrzejczuk - Hybel — Roślinne i bakteryjne inhibitory enzymów amylolytycznych . . . . .	181
E. M. Rakowicz - Szulczyńska — Sekwencje sygnałowe w białkach . . . . .	197
D. Kierek - Jaszczuk — Heterogenność fosfatazy alkalicznej ssaków . . . . .	217

Sprawozdania:

VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, Strasbourg, Francja (Z. Zarębska)	
IV Krajowe Konserwatorium nt. „Nowe metody analityczne i usprawnienia pracy automatycznych analizatorów aminokwasów” (K. Waliszewski) . . . . .	239
Skrót sprawozdania z działalności P.T.Bioch. za okres od 23 IX 1977—11 IX 1980	243

Recenzje książek:

Genetyka fizjologiczna zwierząt . . . . .	245
Genome Organization and Expression in Plants . . . . .	251
GABA — Biochemistry and CNS Functions . . . . .	253
Hydrophobic Interactions . . . . .	254
Ankieta Redakcji Acta Biochimica Polonica . . . . .	255

POSTĘPY BIOCHEMII

June 1981

ARTICLES IN POLISH

Volume 27

Number 2

Michał Laskowski — (1905—1981) — Obituary note	I
Biochemical news . . . . .	123
R. Dąbrowska — Protein phosphorylation in the contractile apparatus (Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa) . . . . .	125
P. Masłowski, S. Kowalczyk — Role of inorganic pyrophosphate in the cell bioenergetics (Institute of Biology, Toruń) . . . . .	147
T. Sawicka — Glyconjugates biosynthesis of plasma membrane of mammalian cells (Institute of Biochemistry and Biophysics, Warszawa) . . . . .	157
J. Andrzejczuk-Hybel — Plant and Microbial Inhibitors of Amyolytic Enzymes (Warsaw Agriculture University, Warszawa) . . . . .	181
E. M. Rakowicz-Szulczyńska — Signal sequences in proteins (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sci., Poznań) . . . . .	197
D. Kierek-Jaszczuk — Heterogenity of mammalian alkaline phosphatase (Institute of Genetics, and Animal Breeding, Polish Academy of Sci., Jastrzębiec) . . . . .	217
Meetings Reports . . . . .	239
Book Reviews . . . . .	245



## 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 winny rzeczowo 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.

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

**Piśmiennictwo:** w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 276, (1) np.:

Pipa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stroną cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

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

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

**Załączniki:** każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwisko 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) pracy(y) pochodzi informacja 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

Michał Laskowski — (1905—1981)	I
E. Bartnik Nowe w biochemii	123
R. Dąbrowska — Fosforylacja białek aparatu kurczliwego mięśni	125
P. Masłowski, S. Kowalczyk — Rola nieorganicznego pirofosforanu w bioenergetyce komórki	147
T. Sawicka — Biosynteza glikokoniugatów plazmolemy komórek ssaków	157
J. Andrzejczuk-Hybel — Roślinne i bakteryjne inhibitory enzymów amylolytycznych	181
E.M. Rakowicz-Szulczyńska — Sekwencje sygnałowe w białkach	197
D. Kierek-Jaszczuk — Heterogenność fosfatazy alkalicznej ssaków	217
Sprawozdania:	
VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, Strasbourg, Francja (Z. Zarębska)	239
IV Krajowe Konserwatorium nt. „Nowe metody analityczne i usprawnienia pracy automatycznych analizatorów aminokwasów” (K. Waliszewski)	242
Skrót sprawozdania z działalności P.T. Bioch. za okres od 23 IX 1977—11 IX 1980	243
Recenzje książek:	
Genetyka fizjologiczna zwierząt	245
Genome Organization and Expression in Plants	251
GABA — Biochemistry and CNS Functions	253
Hydrophobic Interactions	254
Ankieta Redakcji Acta Biochimica Polonica	255