

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTBAH 28 (1-2)  
(1-172) (1982)

1982

tom 28 nr 1-2

PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>



POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1982 TOM 28 ZESZYT 1-2

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 28 (1-2)  
(1-172)(1982)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: prof. dr Andrzej Legocki (Poznań)  
V-ceprzewodniczący: doc. dr hab. Irena Szumiel (Warszawa)  
Sekretarz: dr hab. Barbara Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)  
Członkowie: prof. dr Stefan Angielski (Gdańsk), prof. dr Mieczysław Choraży (Gliwice), dr hab. Edward Czuryło (Warszawa), prof. dr Witold Drabikowski (Warszawa), doc. dr hab. Magdalena Fikus (Warszawa), prof. dr Eugeniusz Gąsior (Lublin), doc. dr hab. Janusz Gregorczyk (Szczecin), prof. dr Maria Gumińska (Kraków), doc. dr hab. Danuta Hulanicka (Warszawa), doc. dr hab. Witold Jachymczyk (Warszawa), prof. dr Janina Kwiatkowska (Wrocław), prof. dr Stanisław Lewak (Warszawa), prof. dr Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), prof. dr Andrzej Morawiecki (Wrocław), prof. dr Jan Pawełekiewicz (Poznań), prof. dr Konstancja Racyńska-Bojanowska (Warszawa), prof. dr Lech Wojtczak (Warszawa), prof. dr Zofia Zielińska (Warszawa)

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

## SEKRETARZ REDAKCJI

A. Wieraszko

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

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

Nakład 2300	Oddano do składania 22.IV.1982 r.
Ark. wyd. 13,5; ark. druk. 10,75	Podpisano do druku w lutym 1983 r.
Papier druk. b. sat. imp. kl. III, 70 g, 70×100	Druk ukończono w lutym 1983 r.
2416/12/82	Cena zł 120.—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



JAN FRONK \*)

## **Geny mozaikowe — struktura, ekspresja, ewolucja**

### **Split Genes — Structure, Expression, Evolution**

*Spis treści:*

- I. Wykrycie genów mozaikowych**
- II. Występowanie i budowa genów mozaikowych**
- III. Ekspresja genów mozaikowych**
- III-1. Obróbka pierwotnego transkryptu genów mozaikowych**
- IV. Ewolucyjne pochodzenie genów mozaikowych i rola intronów**

*Contents:*

- I. Discovery of split genes**
- II. Occurrence and structure of split genes**
- III. Expression of split genes**
- III-1. Processing of the primary transcript of split genes**
- IV. Evolutionary origin of split genes and possible roles of introns**

#### **I. Wykrycie genów mozaikowych**

Poznanie struktury kodu genetycznego i liczne dane genetyczne doprowadziły w latach sześćdziesiątych do wniosku, że sekwencja aminokwasów w białkach jest jednoznacznie określona, zgodnie z kodem genetycznym, przez kolejność nukleotydów genu; każda kolejna trójka nukleotydów koduje jeden aminokwas. Stwierdzenie takie zawiera przekonanie o kolinearności sekwencji nukleotydów ciągłego odcinka DNA i aminokwasów białka.

Rozwój technik badawczych, zwłaszcza związanych z „inżynierią genetyczną”\*\*), umożliwił bezpośrednie badanie organizacji genów i se-

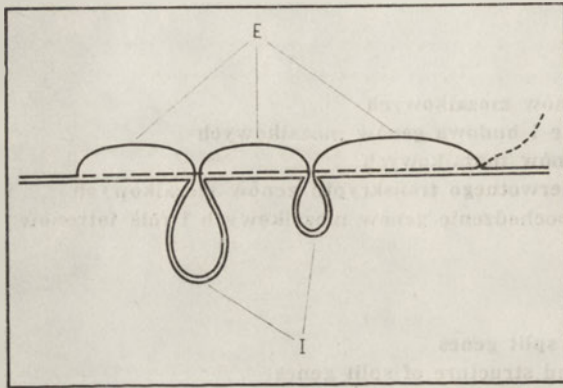
---

\*) Mgr, Zakład Biochemii Ogólnej, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.

\*\*) Znakomity przegląd technik „inżynierii genetycznej” daje monografia Węgleńskiego i Gajewskiego (1).

kwencji nukleotydów DNA organizmów wyższych. W konsekwencji takich badań doszło w roku 1977 do odkrycia zjawiska „genów mozaikowych”<sup>\*)</sup>.

Obserwując w mikroskopie elektronowym hybrydy mRNA·DNA adenowirusa 2 (2, 3) i SV 40 (4, 5) stwierdzono, że odcinki DNA genomu komplementarne z cząsteczką mRNA są poprzedzielane odcinkami nie mającymi w mRNA odpowiednika. Odcinki, leżące w mRNA tuż obok siebie, stanowią transkrypt sekwencji odległych w DNA o setki czy tysiące nukleotydów. Tak więc geny tych wirusów stanowią mozaikę sekwencji komplementarnych z mRNA i odcinków, których transkryptów w cząsteczce mRNA brak.



**Ryc. 1.** Schemat przedstawiający wygląd w mikroskopie elektronowym hybrydy mRNA·DNA genu mozaikowego

==== dwuniciowy DNA, — pojedyncza nić DNA, — mRNA, - - - - - odcinek poliadenylowy na końcu 3' mRNA, E — odcinki DNA wyparte przez mRNA (tzw. R-loops) — eksony, I — odcinki DNA genu, nie hybrydujące z mRNA — introny

W tym samym czasie, stosując inną technikę, analogiczne zjawisko wykryto w genomie organizmów wyższych. Porównanie mapy restrykcyjnej cDNA uzyskanego w wyniku odwrotnej transkrypcji mRNA z mapą odpowiedniego odcinka genomu pozwala na wykrycie ewentualnych różnic sekwencji nukleotydów mRNA i genu. Taką metodą Jeffreys i Flavell zbadali strukturę genu i mRNA  $\beta$ -globiny królika (6), Leder i wsp. —  $\beta$ -globiny myszy (7, 8), Doel i wsp. (9) i Breathnach i wsp. (10) — owoalbuminy kury. Okazało się, że te geny zawierają jeden lub kilka odcinków, których kopii brak w mRNA.

Powyższe fakty dowodziły, że w niektórych przynajmniej genach

<sup>\*)</sup> Brak powszechnie przyjętego polskiego określenia dla oddania sensu angielskiego „split genes”. Wydaje się, że termin „geny mozaikowe” dobrze oddaje istotę zjawiska.

*Eukaryota* i ich wirusów odcinki komplementarne z mRNA leżą na przemian z odcinkami niekomplementarnymi.

Zgodnie z propozycją Gilberta (11) przyjęło się nazywać odcinki genów komplementarne z mRNA eksonami (ulegającymi ekspresji), a rozdzielające je, niekomplementarne z mRNA „wstawki” — intronami (*intervening sequences*).

Doniesienia o wykryciu genów mozaikowych wywołały natychmiast wiele pytań (przeglądowy artykuł Cricka (12) zawiera ich obszerną listę):

- czy geny mozaikowe występują powszechnie?
- jaki jest mechanizm ekspresji genów mozaikowych? Czy obecność intronów jest skorelowana z ekspresją genu?
- jak i kiedy powstały geny mozaikowe?
- jaka — i czy w ogóle — jest funkcja intronów?

## II. Występowanie i budowa genów mozaikowych

W latach 1977-81 ukazało się bardzo wiele prac donoszących o wykryciu i zbadaniu kolejnych genów mozaikowych w organizmach eukariotycznych i ich wirusach.

Geny mozaikowe wykryto w wirusach polioma, SV 40, adenowirusie 2 (13), VSV (14), MVM (15), licznych retrowirusach (16-18). Stwierdzono, że niektóre geny kodujące tRNA drożdży (19-21), *Neurospora crassa* (22), *Drosophila melanogaster* (23), rRNA wielu organizmów (Tab. 1), a przede wszystkim liczne geny kodujące białka *Eukaryota* (Tab. 2) zawierają introny. Wśród tych ostatnich badano początkowo geny ulegające ekspresji w wyspecjalizowanych komórkach (geny globin, hormonów, białek jaj, immunoglobulin\*). Wynika to z przyczyn metodycznych, gdyż do badania struktury genu niezbędne jest najczęściej wyizolowanie specyficznego mRNA, co jest najłatwiejsze, gdy komórka produkuje jeden rodzaj białka w bardzo dużych ilościach.

Ostatnio opublikowano prace dowodzące, że także geny ulegające ekspresji w niezróżnicowanych komórkach mają budowę mozaikową. Taką strukturę ma gen aktywny drożdży (38, 39), gen o nieznannej funkcji *Dictyostellium discoideum* (56) (są to organizmy jednokomórkowe), gen oksydoreduktazy dihydrofolianowej myszy (55), dehydrogenazy alkoholowej *Drosophila melanogaster* (58). Zbadanie struktury hybrydów utworzonych pomiędzy DNA genomu a cDNA zsyntetyzowanym na matrycy całkowitego preparatu mRNA z mózgu myszy pozwoliło na stwierdzenie, że w genomie myszy dziesiątki tysięcy genów mają strukturę mozaikową (59).

\* Omówione w odrębnym artykule (Kwiatowski, w przygotowaniu).



Tabela 1.

## Mozaikowe geny rRNA

Organizm	Organelum	rRNA	Długość intronu (par zasad)	Uwagi dotyczące intronów	Piśmiennictwo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	mitochondrium	21 S	1160	w niektórych szczepach	(24, 25)
<i>Neurospora crassa</i>	mitochondrium	24 S	2300	—	(26)
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	chloroplast	23 S	8700	—	(27)
<i>Physarum polycephalum</i>	jądro	26 S	500 i 1000	zawsze dwa introny	(28)
<i>Tetrahymena pigmentosa</i>	jądro	25 S	400	w niektórych szczepach	(29)
<i>Drosophila melanogaster</i>	jądro	28 S	500—6500	tylko w niektórych genach; w różnych genach intron różnej długości; sekwencje nukleotydowe intronów występują w innych miejscach genomu	(30—35)
<i>Drosophila virilis</i>	jądro	28 S	9600	tylko w niektórych genach; sekwencje nukleotydowe intronów występują w innych miejscach genomu	(36)
<i>Drosophila hydei</i>	jądro	28 S	5000	tylko w nieczynnych genach?	(37)

Wśród przebadanych organizmów tylko *Prokaryota* wydają się nie mieć genów mozaikowych. Wykryto je natomiast u wszystkich *Eukaryota*, poczynając od drożdży (24, 25, 38, 39) i śluzowców (28, 56), przez szkarłupnie (57), owady (30-37, 40, 41, 58, 60), płazy (54), na ptakach (44, 45-50, 52, 53) i ssakach (42, 43, 51, 55) kończąc. Także w stosunkowo słabo poznanych i trudnym do badania genomie jądrowym roślin wykryto geny mozaikowe (62, 62a). Również niektóre geny chloroplastów (rRNA *Chlamydomonas reinhardii* (27)) i mitochondriów (rRNA drożdży, 24, 25) i *Neurospora crassa* (26), cytochromu b i oksydazy cytochromowej drożdży (omówione w (61)) mają budowę mozaikową.

Do nielicznych, dobrze poznanych, genów *Eukaryota*, nie zawierających intronów, należą geny histonów (63) i interferonów (64-66).

Liczba i rozmiary intronów mogą być bardzo różne. Najkrótsze introny w genach tRNA mają 14 nukleotydów (20), w genach kodujących białka około 50 nukleotydów (48, 54). Jest prawdopodobne, że krótsze introny mogą pozostać niezauważone, jeśli analizuje się strukturę genu



Tabela 2.

Niektóre mozaikowe geny jądrowe kodujące białka

Organizm	Białko	LI*	Długość (par zasad)			%I**	Piśmien- nictwo
			Intronów	Eksonów	genu		
<i>S. cerevisiae</i>	aktyna	1	304	?	1 500	20	(38, 39)
<i>D. melanogaster</i>	aktyna	1	1650	100, 1550	3 300	50	(40, 41)
Królik	$\beta$ -globina	2	126, 573	146-222	1 288	54	(42)
Człowiek	preproinsulina	2	179, 786	42-210	1 429	67	(43)
Kura	preproinsulina	2	119, 3500	37-221	4 080	89	(44)
Kura	lizozym	3	76-1870	94-211	3 900	83	(45)
Kura	owomukoid	7	220-1050	20-130	5 600	85	(46)
Kura	owoalbumina	7	220-1600	49-1030	7 600	75	(47, 48)
Kura	$\delta$ -krystalina	14	130-1300	70-240	10 000	80	(49)
Kura	konalbumina	16	99-1306	64-203	10 300	77	(50)
Szczur	albumina	13	297-1458	94-245	14 500	85	(51)
<i>X. laevis</i>	witellogenina	33	50-1900	30-225	21 000	72	(54)
Kura	prokolagen	50	80-2200	31-327	37 000	85	(52, 53)
Mysz	reduktaza DHF ***	5	?	?	42 000	96	(55)

\* LI — liczba intronów w genie

\*\* %I — stosunek długości sumy intronów do długości całego genu, w procentach.

\*\*\* reduktaza DHF — oksydoreduktaza 7, 8-dihydrofolianu, E.C. 1. 5. 1. 4

przy pomocy mikroskopii elektronowej. Najdłuższe introny mają kilka tysięcy nukleotydów długości — 2200 w genie prokolagenu kury (52, 53) 3500 w genie preproinsuliny kury (44), 9600 w genie rRNA 28 S *Drosophila virilis* (36). W genie oksydoreduktazy dihydrofolianowej myszy cztery introny mają łączną długość około 38000 nukleotydów (55).

Nie wydaje się, by długości intronów stanowiły wielokrotność jakiejś podstawowej wielkości, lub też tworzyły wyodrębnione klasy.

Liczba intronów może wynosić od jednego (geny aktyny, 38-41, 57, fibroiny (60)) do kilkudziesięciu (33 w genach witellogenin *X. laevis* (54), 50 w genie prokolagenu kury (52, 53)). Introny mogą leżeć w obrębie części genu kodującej łańcuch polipeptydowy, a także w odcinkach nie kodujących białka na końcu 5' genu (w odcinkach liderowych) 40, 43-45, 48, 55, 67).

Sekwencje intronowe stanowią od około 20 do ponad 90% długości całego genu, najczęściej 50—80%. Fakt ten może częściowo tłumaczyć występowanie w genomach wyższych *Eukaryota* znacznych ilości sekwencji nukleotydowych, których kopie nie są odnajdywane w postaci mRNA.

Długości eksonów są mniej zróżnicowane, niż intronów. Najkrótszy ekson — 20 nukleotydów — zaobserwowano w genie owomukoidu (46), najdłuższy — 1550 nukleotydów — w genie aktyny *D. melanogaster* (40). W genach zawierających wiele intronów długości poszczególnych eksonów są zwykle podobne i wynoszą od około 50 do około 250 nukleotydów.

### III. Ekspresja genów mozaikowych

Poza niektórymi genami rRNA owadów (37), we wszystkich pozostałych przypadkach nie ulega wątpliwości, że struktura genów w komórkach aktywnie je transkrybujących jest taka sama, jak w komórkach, w których gen nie ulega ekspresji (6, 48, 68) (wyjątek stanowią oczywiście geny immunoglobulin). W większości przebadanych sytuacji geny mozaikowe występują w jednej kopii w haploidalnym genomie; wynika z tego, że geny te ulegają ekspresji bez usunięcia sekwencji intronowych z DNA. Można sobie wyobrazić kilka mechanizmów mogących zapewnić powstanie mRNA na matrycy genu mozaikowego:

1. Wypętlenie sekwencji intronu w aktualnie transkrybowanym genie, tak, że polimeraza RNA transkrybuje tylko sekwencje eksonów.
2. Polimeraza RNA przeskakuje wraz z syntetyzowanym łańcuchem RNA z końca jednego eksonu na początek następnego.
3. Poszczególne eksony transkrybowane są oddzielnie, a następnie łączone we właściwej kolejności w funkcjonalny mRNA.
4. Transkrybowana jest całkowita sekwencja nukleotydów genu (eksony i introny); pierwotny produkt transkrypcji podlega obróbce polegającej na wycięciu sekwencji intronowych i połączeniu sąsiednich eksonów.

Dane doświadczalne wskazują, że tylko ostatni z wymienionych mechanizmów funkcjonuje w rzeczywistości. Analiza krótkożyciowych, wielkocząsteczkowych pierwotnych produktów transkrypcji genów *Eukaryota* i ich wirusów, tzw. hnRNA, wykazała, iż ich długość odpowiada dokładnie długości całego genu (69, 70); hnRNA hybryduje z całym odcinkiem genu mozaikowego (67, 71), co oznacza, iż jest pełną kopią zarówno sekwencji eksonowych, jak i intronowych. Wobec powyższego, gen *Eukaryota* należy zdefiniować jako odcinek DNA, który stanowi matrycę do syntezy ciągłego łańcucha RNA.

#### III-1. Obróbka pierwotnego transkryptu genów mozaikowych

W zachodzącym w jądrze procesie obróbki (dojrzewania) hnRNA transkrypty sekwencji intronowych są usuwane i powstaje w końcu znacznie skrócony, mogący podlegać translacji w cytoplazmie, mRNA. Udało się wyizolować produkty pośrednie obróbki hnRNA, o długościach mniejszych niż pierwotny transkrypt, zawierające sekwencje tylko niektórych intronów (72, 73). Pierwotny transkrypt, zawierający sekwencję nukleotydów całego genu, najpierw podlega modyfikacjom na końcach (przyłączenie czapeczki na końcu 5' i poliadenylacja na 3'), przy czym obydwa końce wraz z dodanymi nukleotydami są odnajdywane w mRNA (74—76).

Tak więc przekształcanie hnRNA w mRNA polega na wycinaniu sekwencji intronowych, a nie, jak sądzono dawniej, przycinaniu końców hnRNA.

Przekształcanie hnRNA, stanowiącego pełny transkrypt genu, w mRNA „zlepiony” tylko z sekwencji eksonowych, wywołuje pytanie, jaki jest mechanizm rozpoznawania w pierwotnym transkrypcie granic pomiędzy intronami a eksonami (77—79). Mechanizm taki musi być bardzo precyzyjny, gdyż każde niedokładne wycięcie intronu \*) prowadziłoby w konsekwencji do powstania mRNA o nieprawidłowej strukturze pierwszorzędowej.

Mechanizm ten mógłby opierać się na zasadzie rozpoznawania sekwencji nukleotydów na granicach intronów i eksonów przez specyficzne rybonukleazy (analogiczne do nukleaz restrykcyjnych). Po wycięciu intronu ten sam enzym, lub odrębna ligaza, łączyłyby powstałe wolne końce sąsiednich eksonów. Jest nieprawdopodobne, by dla każdej pary ekson-intron istniał swoisty enzym rozpoznający sekwencję nukleotydów na ich granicy, toteż należałoby oczekiwać, iż wszystkie sekwencje nukleotydów na granicach eksonów i intronów są jednakowe, lub co najwyżej, że jest kilka typów takich sekwencji, a co za tym idzie, kilka enzymów je rozpoznających.

Możliwe jest także powstawanie specyficznych struktur drugo- lub trzeciorzędowych w obrębie hnRNA. Struktury takie byłyby rozpoznawane przez specyficzną rybonukleazę, natomiast dokładne miejsce jej działania byłoby określone przez szczególną konformację łańcucha hnRNA lub sekwencję kilku nukleotydów w obrębie struktury wyższego rzędu (taki mechanizm funkcjonuje zapewne przy obróbce pierwotnych transkryptów genów rRNA *E. coli* (80)). W myśl podobnej zasady w rozpoznawaniu granic intronów mogłyby uczestniczyć tworzone z innymi cząsteczkami RNA struktury czwartorzędowe.

Ustalenie, jaki jest rzeczywisty mechanizm rozpoznawania granic ekson-intron w hnRNA wymaga poznania sekwencji nukleotydów genów mozaikowych. Za pomocą prostych i szybkich technik (81, 82) ustalono sekwencje nukleotydów kilku genów w całości (38, 39, 42-44, 60, 67, 83, 85), a także wielu obszarów na granicach intron-ekson. Zestawienie uzyskanych danych dostarczyło szeregu istotnych informacji \*\*):

1. Sekwencje nukleotydowe intronów są unikalne, tzn. występują w genomie najwyżej w kilku kopiach (86, 87) (wyjątek stanowią introny genów rRNA *D. virilis* i *D. melanogaster* (30-36)).

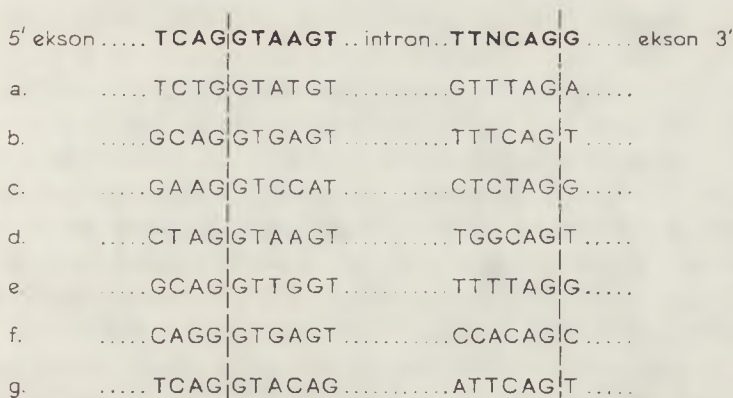
\*) Określenia intron i ekson stosowane są do odpowiednich odcinków DNA, jak też ich kopii w RNA.

\*\*) Przedstawione w dalszej części artykułu dane i przypuszczenia dotyczą głównie jądrowych genów kodujących białka.









**Ryc. 3.** Sekwencja największej zgodności

„Sekwencję największej zgodności” opracowano na podstawie zestawienia ponad 50 sekwencji nukleotydowych na granicach intronów z eksonami (60, 79, 88-92). Dla porównania pokazano kilka, przypadkowo wybranych, sekwencji nukleotydowych granic eksonów z intronami różnych genów: a. gen aktywny drożdży (38), b. gen fibroiny jedwabnika (60), c. gen preproinsuliny kury, I intron (44), d. gen preproinsuliny kury, II intron (44), e. gen  $\beta$ -globiny myszy, I intron (132), f. gen  $\beta$ -globiny myszy, II intron (132), g. gen owoalbuminy kury, intron C (88)

Stosunkowo duża dowolność sekwencji nukleotydów przy końcach różnych intronów i tylko bardzo krótkie obszary silnie konserwatywne oznaczają, iż sygnałem określającym miejsce działania nukleazy nie może być sama struktura pierwszorzędowa hnRNA, tym bardziej, że w kilku przypadkach wykazano, iż sekwencje nukleotydów końców intronu występują także w innych miejscach genu (42, 89). W licznych wirusach (97), a także w niektórych genach *Eukaryota* (98, 99) te same obszary genu raz ulegają wycięciu z pierwotnych transkryptów, a więc są intronami, kiedy indziej zostają zachowane w mRNA, pełniąc funkcję eksonów. Tego rodzaju zróżnicowana obróbka świadczy o istnieniu innych czynników poza samą sekwencją nukleotydów, decydujących o usuwaniu fragmentów pierwotnego transkryptu.

Sekwencja największej zgodności jest w dużym stopniu komplementarna z końcem 5' snRNA U1 \*) (91, 92). Aż 13 nukleotydów sekwencji największej zgodności może tworzyć wiązania wodorowe z nukleotydami snRNA U1. Powstająca dwuniciowa struktura jest stabilna, a jej utworzenie prowadzi do zbliżenia końców sąsiednich eksonów. Z poznanych sekwencji na granicach intronów i eksonów wszystkie mogą tworzyć odcinki dwuniciowe z snRNA U1, przy czym komplementarne są co najmniej 4 nukleotydy końca 5' intronu i 3 końca 3'.

Analiza sekwencji nukleotydów jednego z intronów genu prokolage-

\*) Małe jądrowe RNA (snRNA), wśród nich U1, stanowią klasę konserwatywnych ewolucyjnie, stabilnych metabolicznie cząsteczek (100-102). W kompleksach rybonukleoproteinowych (hnRNP) występują związane niekowalencyjnie z hnRNA (103-106).

nu kury wykazała, iż obok obszarów na końcach intronu istnieją także trzy rejony wewnątrz intronu komplementarne z końcem 5' U1 (73). Gdyby tworzenie struktur dwuniciowych pomiędzy hnRNA a snRNA U1 stanowiło sygnał kierujący wycinaniem intronów, to powinny występować produkty pośrednie obróbki, powstające w wyniku wycinania fragmentów intronu, leżących pomiędzy odcinkami komplementarnymi z U1. Tego rodzaju prekursorzy mRNA zostały przez autorów wykryte, a rozmiary wyciętych odcinków intronu są zgodne z przewidzianymi na podstawie analizy sekwencji nukleotydów (73). Powyższe fakty świadczą o tym, że udział snRNA w procesie obróbki hnRNA jest bardzo prawdopodobny. Analogiczny mechanizm obróbki pierwotnych transkryptów zaproponowano dla adenowirusa 2 (107, 108). W tym wypadku struktury dwuniciowe tworzone byłyby z tzw. VA RNA 1, pojawiającym się w późnej fazie infekcji komórki przez adenowirusa 2. Rejon końca 5' VA RNA 1 może tworzyć układ dwuniciowy z obszarem 19 nukleotydów końców intronu pre-mRNA heksonu (108).

Regulacja dostępności małego RNA (sn lub VA), poprzez regulację jego syntezy lub modulowanie oddziaływań z białkami, mogłaby stanowić jeden z mechanizmów regulujących obróbkę hnRNA, a w konsekwencji ekspresję informacji genetycznej (taką hipotezę zaproponowali w 1979 roku Davidson i Britten (109)).

Możliwość tworzenia układów dwuniciowych przez odcinki hnRNA w okolicach końców intronów stanowi podstawę hipotezy mówiącej o udziale takich struktur w obróbce hnRNA (93-96). Na podstawie analizy sekwencji nukleotydów obszarów na granicach intronów z eksonami wyliczono, że mogące się tworzyć struktury dwuniciowe są stabilne i zapewniają takie położenie końców eksonów, które umożliwia wycięcie intronu i następnie połączenie eksonów. Z proponowaną hipotezą zgodny jest fakt, że w hnRNA występują wewnątrzcząsteczkowe układy dwuniciowe, których ilość w czasie dojrzewania RNA silnie maleje (110, 111). Przy takim modelu związanie snRNA z hnRNA uniemożliwiłoby tworzenie wewnątrzcząsteczkowych układów dwuniciowych i hamowałoby obróbkę hnRNA (94). Eksperymenty z zastosowaniem proflawiny (barwnika interkalującego pomiędzy płaszczyzny zasad azotowych w dwuniciowych kwasach nukleinowych) wykazały, że istnienie niezaburzonych struktur dwuniciowych jest istotne dla obróbki pierwotnych transkryptów genomu SV 40 (112).

Kolejna hipoteza zakłada powstawanie struktur trójniciowych z udziałem bogatych w nukleotydy pirymidynowe końców intronu i odcinka poliadenylowego końca 3' hnRNA (113). Struktura taka ma wiązać enzymy dokonujące wycięcia intronu, a miejsce ich działania może określać krótka sekwencja nukleotydów (np. GU i AG na końcach intronu). Jest także prawdopodobne, że obróbkę hnRNA regulują białka występujące w kompleksach hnRNP, lub też bardzo złożone i dlatego trudne do zi-

dentyfikowania sekwencje nukleotydów<sup>\*)</sup>. Bez względu na to, jaki jest rzeczywiście mechanizm rozpoznawania granic między eksonami a intronami, wiele eksperymentów wskazuje, że jest on uniwersalny u wszystkich badanych organizmów.

Stwierdzono, że odcinki DNA zawierające geny mozaikowe po wprowadzeniu do komórek obcych gatunków mogą ulegać ekspresji, dając w efekcie produkty białkowe identyczne, lub bardzo podobne do normalnych. Oznacza to, że pierwotne transkrypty tych genów, zawierające introny, ulegają prawidłowej obróbce, polegającej na dokładnym wycięciu intronów i połączeniu eksonów. Sprawdzono, że struktura genu wprowadzonego do obcej komórki nie ulega zmianom (114, 115) i że istotnie transkrybowane są także sekwencje intronowe (116). Doświadczenia tego rodzaju wykonano wprowadzając geny owoalbuminy kury (114, 115),  $\beta$ -globiny królika (116, 117),  $\beta$ -globiny człowieka (118) do komórek mysich, geny SV 40 (119-121) i owoalbuminy kury (122) do oocytów *X. laevis*, gen  $\beta$ -globiny myszy za pośrednictwem SV 40 do komórek małpy (123).

We wszystkich przypadkach wprowadzone obce geny kierowały syntezą hnRNA, który ulegał normalnej obróbce (koniec 5' powstającego w fibroblastach myszy mRNA  $\beta$ -globiny królika nie zawierał 48 nukleotydów (117), mRNA owoalbuminy syntetyzowany w mysich komórkach L miał dłuższy odcinek liderowy, niż normalny (115)). Normalne produkty translacji wykryto we wszystkich przypadkach, w których je badano (114, 119-121).

Uniwersalny charakter mechanizmu obróbki hnRNA potwierdził wynik eksperymentu, w którym w miejsce intronu w genie białek wiriona SV 40 (VP 1, VP 2, VP 3) wprowadzono intron wraz z krótkimi odcinkami eksonów genu  $\beta$ -globiny myszy (124). Tak skonstruowany gen ulegał transkrypcji i sekwencja intronu była wycinana z hnRNA. W efekcie gromadził się stabilny mRNA stanowiący hybrydę sekwencji eksonów genu SV 40 i  $\beta$ -globiny myszy. Stosując tego rodzaju eksperymenty wykazano, że uniwersalny sygnał kierujący wycinaniem intronów nie jest symetryczny. Intron genu  $\beta$ -globiny wstawiony w gen SV 40 w kierunku takim, jak w genie  $\beta$ -globiny ulegał prawidłowemu wycięciu z pierwotnego transkryptu, wstawiony natomiast w kierunku przeciwnym — nie, mimo, że kierunek wstawienia intronu nie wpływał na wydajność transkrypcji hybrydowego genu (124, 125). Stwierdzono także, że do prawidłowego wycinania intronu z hnRNA wystarcza odcinek 18 nukleotydów eksonu po stronie 5' intronu (125).

Gen  $\beta$ -globiny królika wprowadzony do komórek drożdży ulega trans-

<sup>\*)</sup> Danych o ewentualnych mechanizmach rozpoznawania intronów w prekursorach tRNA i rRNA jest znacznie mniej; w każdym razie sekwencje nukleotydów końców intronów tych RNA nie wykazują homologii z sekwencją największej zgodności.



krypcji, jednakże nie następuje wycięcie intronów ani translacja (126), mimo, że w genomie jądrowym drożdży występuje co najmniej jeden gen mozaikowy (38, 39), którego intron ma na końcach sekwencje nukleotydów podobne, jak u wyższych *Eukaryota*. Jest jednakże możliwe, że użyty do transformacji drożdży plazmid nie wnika do jądra komórki, co mogłoby tłumaczyć brak właściwej obróbki pierwotnego transkryptu.

Geny mozaikowe wprowadzone do komórek *E. coli* nie prowadzą do syntezy odpowiednich białek, natomiast po wprowadzeniu cDNA będącego kopią mRNA owoalbuminy kury komórki *E. coli* syntetyzują owoalbuminę (127). Fragmenty genomu drożdży mogą znosić efekty mutacji auktotrofowych w *E. coli*, co oznacza, iż odpowiednie geny drożdży nie mają struktury mozaikowej (128). Bezpośrednie sprawdzenie sekwencji nukleotydów hybrydowych plazmidów użytych w tych doświadczeniach potwierdza ten wniosek.

Nie stwierdzono, by *in vivo* dochodziło do omyłkowego wycinania odcinka intron-ekson-intron zamiast jednego intronu i w konsekwencji tworzenia zaburzonych mRNA, pozbawionych sekwencji całych eksonów. Żaden z proponowanych mechanizmów obróbki hnRNA nie tłumaczy zasady, pozwalającej unikać takich błędów. Możliwe, że środkowe odcinki intronów zawierają jakiś sygnał, uniemożliwiający omyłkowe wycięcie zbyt dużego odcinka hnRNA. Możliwe jest także, iż kompleksy enzymatyczny lub małe cząsteczki RNA, uczestniczące w wycinaniu intronów, przemieszczają się wzdłuż cząsteczki hnRNA poczynając od końca 5' lub 3' i prowadzą do usunięcia fragmentów hnRNA leżących między dwoma sąsiednimi sygnałami, nie pomijając żadnego z nich (79). Fakt, że sygnały kierujące wycinaniem intronów nie są symetryczne, umożliwia precyzyjne funkcjonowanie tego hipotetycznego mechanizmu. Nie wydaje się, by określona długość intronu mogła uniemożliwiać wycinanie zbyt długiego odcinka.

#### IV. Ewolucyjne pochodzenie genów mozaikowych i rola intronów

Zarówno powszechne występowanie genów mozaikowych u *Eukaryota*, jak i prawdopodobnie uniwersalny mechanizm obróbki mozaikowych hnRNA wskazują na to, że geny mozaikowe są ewolucyjnie bardzo stare. Porównanie struktury genów kodujących homologiczne białka różnych gatunków, lub białka pokrewne w obrębie jednego gatunku, daje wiele interesujących informacji o prawdopodobnej historii ewolucyjnej genów mozaikowych, a także o ewentualnym znaczeniu intronów.

Wszystkie zbadane geny globin zawierają dwa introny, których położenie jest we wszystkich przypadkach bardzo zbliżone (zwięźle omówienie struktury genów globin dają Leder i wsp. (129) i Proudfoot i wsp. (130)). Oznacza to, że gen pra-globiny (przed pojawieniem się w wy-



niku duplikacji i niezależnej ewolucji genów kodujących różne typy globin) także zawierał dwa introny. Moment pojawienia się odrębnych  $\alpha$ - i  $\beta$ -globin ocenia się na około  $5 \times 10^8$  lat temu. Porównanie długości i sekwencji nukleotydów odpowiednich intronów genów  $\alpha$ - i  $\beta$ -globin myszy (131),  $\beta$ -globin myszy i królika (42, 132),  $\beta^{\text{maj}}$  i  $\beta^{\text{min}}$ -globin myszy (133) wskazuje, że tempo zmian ewolucyjnych jest w tych obszarach genów bardzo nierównomierne. Sekwencja nukleotydów w pobliżu końców intronów jest niemal niezmienna (dotyczy to nie tylko omówionego wcześniej obszaru największej zgodności), natomiast im bliżej środka intronu, tym większe tempo zmian ewolucyjnych sekwencji nukleotydów. Dotyczy to szczególnie drugiego intronu, położonego w miejscu kodującym aminokwasy 104—105, którego długość wynosi od 128 (w genie  $\alpha$ -globiny człowieka (134)) do 904 nukleotydów (w genie  $\gamma$ -globiny człowieka (135)). Ewolucja tych fragmentów intronów zachodzi w wyniku licznych duplikacji, delecji i insercji. Wydaje się, że sekwencja nukleotydów w tym obszarze genu może być dowolna, a długość intronu jest wypadkową procesów delecji i insercji.

Sekwencja nukleotydów pierwszego intronu genów globin wykazuje bardzo małą zmienność ewolucyjną, zbliżoną do zmienności obszarów kodujących sekwencje aminokwasów globin. W genach  $\beta^{\text{min}}$ - i  $\beta^{\text{maj}}$ -globin myszy, których powstanie ocenia się na około  $5 \times 10^7$  lat temu, sekwencje nukleotydów tego intronu różnią się pomiędzy sobą tylko trzema na 116 nukleotydami (133). Fakt, że wszystkie ulegające ekspresji geny globin zawierają taką samą liczbę intronów wskazuje, że pojawianie się i delecje całych intronów nie są w funkcjonujących genach zjawiskiem częstym. Także w genach witellogenin *X. laevis* liczba i położenie intronów są stałe, natomiast ich długości i sekwencje nukleotydowe — bardzo różne (54).

Geny preproinsuliny człowieka i kury zawierają dwa introny w identycznym położeniu (43, 44). Szczur ma dwa geny preproinsulin — jeden z nich ma strukturę taką, jak geny człowieka i kury, natomiast drugi zawiera tylko jeden intron, w położeniu takim, jak w innych genach (67). Można przypuszczać, że pierwotny gen preproinsuliny, przed rozejściem się przodków ptaków i ssaków, zawierał dwa introny. U przodka szczura nastąpiła duplikacja genu i jedna z kopii utraciła intron. Utrata intronu nie zaburzyła ekspresji genu (136, 137).

Także geny pokrewnych białek jednego gatunku (owoalbuminy i owoalbumoidu kury (46-48),  $\alpha$ -fetoproteiny i albuminy szczura (51, 138)) zawierają zbliżoną liczbę intronów w podobnym położeniu.

Fakt ewolucyjnej stałości liczby i położenia intronów może świadczyć o roli, jaką odgrywają w ekspresji genów. Możliwe jest też, iż nie istnieje wydajny mechanizm wstawiający i usuwający introny na poziomie genomu. Mechanizm taki musiałby działać bardzo precyzyjnie, gdyż każda niedokładność przy wycinaniu intronu z DNA prowadziłaby do powstania genu o zaburzonej sekwencji nukleotydów kodujących białko.

Dane uzyskane w badaniach ekspresji genów pozbawionych intronów *in vitro* świadczą o tym, że przynajmniej jeden intron w genie potrzebny jest do utworzenia mogącego podlegać translacji, stabilnego, mRNA \*) (nie dotyczy to oczywiście genów, które normalnie nie zawierają intronów).

Mutant SV 40, pozbawiony *in vitro* intronu w genie kodującym białka otoczki wirionu nie syntetyzuje tych białek i nie gromadzi odpowiedniego mRNA, mimo, że transkrypcja sekwencji eksonowych tak spreparowanego genu nie jest zaburzona (139, 140). Podobnie, hybrydowy gen SV 40, zawierający sekwencję cDNA  $\beta$ -globiny królika kieruje syntezą stabilnego, podlegającego translacji, hybrydowego mRNA tylko wtedy, gdy zachowany jest intron w obszarze genu SV 40. Gdy intronu tego brak, pomimo wydajnej transkrypcji, nie gromadzi się mRNA (141).

Jeśli do takiego genu wprowadzić fragment genu  $\beta$ -globiny królika, zawierający mały intron wraz z krótkimi odcinkami eksonów, to pierwotny, hybrydowy transkrypt ulega obróbce i gromadzi się stabilny mRNA (124). Co ciekawe, miejsce wstawienia fragmentu globinowego było w tym eksperymencie odległe od położenia naturalnego intronu SV 40 o 221 nukleotydów. Dla obróbki hybrydowego transkryptu istotny jest kierunek wbudowania fragmentu zawierającego intron — musi on być zgodny z naturalnym kierunkiem transkrypcji.

Zarówno duża zmienność sekwencji nukleotydów intronów, jak i bezpośrednia analiza tych sekwencji wskazują, iż żadne białka nie są przez introny kodowane. Poza tym, sekwencje intronowe nie są odnajdywane w cytoplazmatycznym RNA, a synteza białek w jądrze wydaje się nie zachodzić.

Być może odmienne pod tym względem są geny w mitochondriach drożdży. Jeden z intronów genu cytochromu b koduje białko, nazwane przez Słonińskiego maturazą, biorące udział w wycinaniu z pierwotnego transkryptu tego właśnie intronu, a także zapewne intronów genu oksydazy cytochromowej (142). Również intron w genie rRNA 21 S mógłby kodować polipeptyd o długości 235 aminokwasów (25). Ta zapewne wyjątkowa sytuacja ma miejsce w mitochondriach, gdzie nie ma przestrzennego rozdzielenia procesów transkrypcji (i obróbki transkryptu) i translacji.

Powszechne występowanie genów mozaikowych i dane o znaczeniu intronów w ich ekspresji prowokują pytanie o moment i przyczyny pojawienia się dwóch typów organizacji genów — mozaikowej i ciągłej. Ponieważ w bardzo dobrze poznanych genomach *Prokaryota* nie wykryto

\*) Wyniki eksperymentu przeprowadzonego przez grupę O'Malley'a (114) wydają się świadczyć przeciw pogładowi o konieczności intronu dla utworzenia stabilnego transkryptu. cDNA owoalbuminy wprowadzony w postaci zrekombinowanego plazmidu do oocytów *X. laevis* ulega transkrypcji, a transkrypt jest stabilny; jednakże nie ulega on translacji.



genów mozaikowych, można przyjąć, że występowanie intronów jest charakterystyczne tylko dla genomu jądrowego i organellarnego *Eukaryota*. Organizację genomów *Prokaryota* i *Eukaryota* różni wyraźnie jeszcze jedno. Nawet u niższych *Eukaryota* nie ma operonów, tzn. wspólnie transkrybowanych ciągów genów kodujących enzymy jednego szlaku metabolicznego, podczas gdy taka organizacja i wspólna regulacja ekspresji genów ciągów metabolicznych jest regułą u *Prokaryota*.

Przyjęcie klasycznego schematu powstawania organizmów (przekształcenie pra-*Prokaryota* w *Eukaryota* i prokariotyczne pochodzenie organelli) oznaczałoby przejście od oszczędnie wykorzystywanego, upakowanego genomu typu prokariotycznego, do genomu typu eukariotycznego. Wspólnie transkrybowane i regulowane geny operonów uległyby rozsiaśniu po całym genomie — co trudno uznać za zjawisko mogące dawać organizmowi przewagę selekcyjną. Podobnie, introny musiałyby zostać „wstawione” w ciągłe geny. Sytuacja taka wydaje się mało prawdopodobna — wstawienie obcej sekwencji nukleotydowej w obszar funkcjonującego genu powinno raczej zaburzyć jego działanie, niż być dla organizmu korzystne. Poza tym musiałyby najpierw istnieć mechanizm pozwalający na wycinanie intronów z RNA, którego funkcja w organizmie zawierającym początkowo wyłącznie geny ciągłe byłaby niewytłumaczona. Co więcej, obecność genów mozaikowych w organellach, których wiele właściwości sugeruje, że ich ewolucja była bardzo powolna (dzięki bardzo małej zmienności ich środowiska) wskazuje, że ich przodkowie, będący zapewne jednymi z pierwszych organizmów na Ziemi, również mieli geny mozaikowe.

Można zatem przypuszczać, że mozaikowa organizacja genów była pierwotną, a ciągłe, bezintronowe geny (jak u współczesnych *Prokaryota*) są zjawiskiem wtórnym (143).

Gilbert (11), Doolittle (144), Blake (145), Darnell Jr. (146) przedstawili szereg wzajemnie uzupełniających się koncepcji, tłumaczących przyczyny bardzo wczesnego pojawienia się genów mozaikowych.

Większość białek o ciężarze cząsteczkowym ponad 20.000 zbudowanych jest z wyraźnie wyodrębnionych globularnych jednostek, zwanych domenami, połączonych odcinkami łańcucha polipeptydowego o ubogiej strukturze trzeciorzędowej. W wielu różnych enzymach występują domeny o podobnej strukturze i funkcji (147, 148). Zestawienie domenowej budowy białek z mozaikową budową kodujących je genów prowadzi do logicznego przypuszczenia, że być może poszczególne eksony kodują odcinki łańcucha polipeptydowego odpowiadające poszczególnym domenom (11, 145). Gdyby tak było, to tworzenie białek o nowych właściwościach w wyniku połączenia w jeden łańcuch polipeptydowy kilku już funkcjonujących w innych białkach domen wymagałoby na poziomie genu prostego przeniesienia jednego eksonu w sąsiedztwo drugiego tak, by współ-

nie tworzyły jednostkę transkrypcyjną. Oddzielający je odcinek intro-  
nowy, o niemal dowolnej długości, ulegałby wycięciu z pierwotnego trans-  
kryptu. Operacja taka byłaby znacznie trudniejsza, gdyby geny były  
ciągłe i nie istniał mechanizm usuwający introny z RNA; wówczas prze-  
niesienie odcinka DNA kodującego jedną domenę na koniec innego od-  
cinka DNA musiałyby odbyć się z dokładnością do jednego nukleotydu,  
tzn. „na styk”.

Możliwość tworzenia enzymów o nowych właściwościach dzięki wy-  
korzystaniu już działających i sprawdzonych fragmentów białek (domen)  
pozwalałaby na znacznie szybszą ewolucję, niż przy konieczności two-  
rzenia oryginalnych rozwiązań dla każdej nowej funkcji metodą pojedy-  
nczych mutacji i długotrwałej selekcji powstających przypadkowych  
produktów. (Podobnie w elektronice zastosowanie układów scalonych w  
miejscu pojedynczych tranzystorów, diod, oporników niesłychanie przy-  
spieszyło rozwój tej dziedziny.) Szczególne znaczenie miałyby przenosze-  
nie odcinków regulujących ekspresję genów (np. odcinków liderowych),  
kodujących polipeptydy sygnałowe, czy też domeny wiążące grupy pro-  
stetyczne.

W wielu przypadkach udało się wykazać, że istotnie eksony kodują  
pojedyncze domeny białek. W genach globin środkowy ekson koduje  
odcinek białka zdolny do wiązania hemu z powinowactwem niemal iden-  
tycznym, jak kompletne białko (149). Podobnie, związek między eksona-  
mi a domenami białek wykazano dla lizozymu (150) i owomukoidu (151).

Introny mogłyby mieć jeszcze inne znaczenie. Szybka ewolucja sek-  
wencji nukleotydów intronów może prowadzić do zmniejszenia homologii  
sekwencji nukleotydów duplikowanych genów, co obniżałoby prawdopo-  
dobieństwo ich niewzajemnej rekombinacji i delecji jednego z nich (131).

Jest bardzo prawdopodobne, że we wczesnych etapach ewolucji ge-  
nów możliwości różnej obróbki pierwotnych transkryptów genu mo-  
zaikowego pozwalały na uzyskanie większej różnorodności produktów  
białkowych, niż byłoby to możliwe, gdyby jeden gen (jednostka trans-  
krypcji) kodował tylko jeden rodzaj łańcucha polipeptydowego. Takie  
„wieloznaczne” wykorzystanie genów mozaikowych dzięki zróżnicowanej  
obróbce hnRNA jest charakterystyczne dla wirusów, gdzie prawdopodobnie  
wielkość genomu jest bardzo ograniczona (97).

W organizmach prostych, w których replikacja i transkrypcja genu-  
mu są istotnym wydatkiem energetycznym, występowanie stosunkowo  
długich sekwencji nukleotydowych pozbawionych bezpośredniej funkcji  
stanowi duże obciążenie; toteż usunięcie „zbędnych” odcinków intro-  
nowych pozwoliłoby na znaczne oszczędności w wydatkowaniu energii,  
umożliwiając np. częstsze podziały komórek. Z drugiej strony perspekty-  
wy ewolucyjne takiego organizmu byłyby znacznie ograniczone z po-  
wodu utracenia możliwości łatwego i szybkiego tworzenia białek o no-  
wych właściwościach i nowych sposobów regulacji ekspresji genów. Jest



prawdopodobne, że przodkowie obecnych *Prokaryota* utracili introny, co umożliwiło im bardzo szybki, ale krótkotrwały rozwój. Powstał szereg wyspecjalizowanych gatunków niezdolnych jednakże do tworzenia złożonych organizmów. Organizmy, które zachowały mozaikową budowę genów mogły ustępować w bezpośrednim współzawodnictwie organizmom prokariotycznym, natomiast dzięki zdolności do szybkiego tworzenia nowych funkcji enzymatycznych i systemów regulacyjnych dały początek złożonym *Eukaryota*.

Tak więc, być może, ogromną różnorodność świata żywego i istnienie nas samych zawdzięczamy mozaikowemu genom.

Zaakceptowano do druku 30.10.1981

#### PIŚMIENNICTWO

1. Gajewski W., Węgleński P., (1980) *Inżynieria genetyczna*, PWN, Warszawa.
2. Klessig D. S., (1977), *Cell*, **12**, 9—18.
3. Berget S. M., Moore C., Sharp P. A., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3171—3175.
4. Chow L. T., Gelinas R. E., Broker T. R., Roberts R. J., (1977), *Cell*, **12**, 1—8.
5. Aloni Y., Dhar R., Laub O., Horowitz M., Khoury G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3686—3690.
6. Jeffreys J. A., Flavell R. A., (1977), *Cell*, **12**, 1097—1108.
7. Tilghman S. M., Tiemeier D. C., Polsky F., Edgell M. H., Seidmen J. G., Leder A., Enquist L. W., Norman B., Leder P., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4406—4410.
8. Tilghman S. M., Tiemeier D. C., Seidmen J. G., Peterlin B. M., Sullivan M., Maizel J. V., Leder P., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 725—729.
9. Doel M. T., Houghton M., Cook E. A., Carey N. H., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3701—3703.
10. Breathnach R., Mandel J. L., Chambon P., (1977), *Nature*, **270**, 314—319.
11. Gilbert W., (1978), *Nature*, **271**, 501.
12. Crick F., (1979), *Science*, **204**, 264—271.
13. Ziff E. B., (1980), *Nature*, **287**, 491—498.
14. Rose J. K., (1980), *Cell*, **19**, 415—422.
15. Tal J., Ron D., Tattersall P., Bratosin S., Aloni Y., (1979), *Nature*, **279**, 649—651.
16. Rothenberg E., Donoughe D. J., Baltimore D., (1978), *Cell*, **13**, 435—451.
17. Cordell B., Weiss S. R., Varmus H. E., Bishop J. M., (1978), *Cell*, **15**, 79—91.
18. Krzyzek R. A., Callett M. S., Lau A. F., Perdue M. L., Leis J. P., Faras A. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1284—1288.
19. Valenzuela P., Venegas A., Weinberg F., Bishop R., Rutter W. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 190—194.

20. Goodman H. M., Olson M. V., Hall B. D., (1977), *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5453—5457.
21. Johnson J. D., Ogden R., Johnson P., Abelson J., Dembeck P., Itakura K., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2564—2568.
22. Selker E., Yanofsky C., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 1033—1042.
23. Robinson R. R., Davidson N., (1981), *Cell*, **23**, 251—259.
24. Bos J. L., Heyting C., Borst P., Arnberg A. C., Van Bruggen E. F. J., (1978), *Nature*, **275**, 336—338.
25. Dujon B., (1980), *Cell*, **20**, 185—197.
26. Hahn U., Lazarus C. M., Lunsdorf H., Kuntzel H., (1979), *Cell*, **17**, 191—200.
27. Rochaix J. D., Malnoe P., (1978), *Cell*, **15**, 661—670.
28. Gubler U., Wyler T., Braun R., (1979), *FEBS Letters*, **100**, 347—350.
29. Wild M. A., Gall J. G., (1979), *Cell*, **16**, 565—573.
30. Glover D. M., Hogness D. S., (1977), *Cell*, **10**, 167—176.
31. White R. L., Hogness D. S., (1977), *Cell*, **10**, 177—192.
32. Wellauer P. K., Dawid I. B., (1977), *Cell*, **10**, 193—212.
33. Pellegrini M., Manning J., Davidson N., (1977), *Cell*, **10**, 213—224.
34. Dawid I. B., Botchan P., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4233—4237.
35. Glover D. M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4932—4936.
36. Barnett T., Rae P. M. M., (1979), *Cell*, **16**, 763—775.
37. Glätzer K. H., (1979), *Chromosoma*, **75**, 161—175.
38. Gallwitz D., Sures I., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2546—2550.
39. Ng R., Abelson J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3912—3916.
40. Fyrberg E. A., Kindle K. L., Davidson N., Sodja A., (1980), *Cell*, **19**, 365—378.
41. Fyrberg E. A., Bond B. J., Hershey N. D., Mixter K. S., Davidson N., (1981), *Cell*, **24**, 107—116.
42. Van Ooyen A., vanden Berg J., Mantei N., Weissmann C., (1979), *Science*, **206**, 337—344.
43. Bell G. J., Pictet R. L., Rutter W. J., Cordell B., Tischer E., Goodman H. M., (1980), *Nature*, **284**, 26—32.
44. Perler F., Efstratiadis A., Lomedico P., Gilbert W., Kolodner R., Dodgson J., (1980), *Cell*, **20**, 555—566.
45. Lindenmaier W., Nguyen-Huu M. C., Lurz R., Stratmann M., Blin N., Wurtz T., Hauser H. J., Sippel A. E., Schütz G., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6196—6200.
46. Lai E. C., Stein J. P., Catterall J. F., Woo S. L. C., Mace M. L., Means A. R., O'Malley B. W., (1979), *Cell*, **18**, 829—842.
47. Kourilsky P., Chambon P., (1978), *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 244—247.
48. Royal A., Garapin A., Cami B., Perrin F., Mandel J. L., Le Menz M., Brêgègère F., Gannon F., LePennec J. P., Chambon P., Kourilsky P., (1979), *Nature*, **279**, 125—132.
49. Bhat S. P., Joner R. E., Sullivan M. A., Piatigorsky J., (1980), *Nature*, **284**, 234—238.
50. Cochet M., Gannon F., Hen R., Maroteaux L., Perrin F., Chambon P., (1979), *Nature*, **282**, 567—574.
51. Sargent T. D., Wu J. R., Sala-Trepat J. M., Wallace R. B., Reyes A. A., Bonner J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3256—3260.
52. Vogeli G., Avvedimento V. E., Sullivan M., Maizel J. V., Jr., Lozano G., Adams S. L., Pastan J., de Crombrughe B., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 1823—1837.

53. Okhubo H., Vogeli G., Mudryj M., Avvedimento V. E., Sullivan M., Pastan J., de Crombrughe B., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7059—7063.
54. Wahli W., Dawid I. B., Wyler T., Weber R., Ryffel G. U., (1980), *Cell*, **20**, 107—117.
55. Nunberg J. H., Kaufman R. J., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Schimke R. T., (1980), *Cell*, **19**, 355—364.
56. Kimmel A. R., Firtel R. A., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 5599—5622.
57. Durica S., Schloss J. A., Crain W. R., Jr., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5683—5687.
58. Goldberg D., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5794—5798.
59. Maxwell I. H., Maxwell F., Hahn W. E., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 5875—5894.
60. Tsujimoto Y., Suzuki Y., (1979), *Cell*, **18**, 591—600.
61. Steinkeler J. A., Mahler H. R., (1980), *Plasmid*, **4**, 17—33.
62. Sun S. M., Slightom J. L., Hall T. C., (1981), *Nature*, **289**, 37—42.
- 62a. Sullivan D., Brisson N., Goodchild B., Verma D. P. S., Thomas D. Y., (1981), *Nature*, **289**, 516—518.
63. Kedes L. H., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 837—870.
64. Derynck R., Content J., DeClercq E., Volkaert G., Traver-nier J., Devos R., Fiers W., (1980), *Nature*, **285**, 542—547.
65. Nagata S., Mantei N., Weissmann C., (1980), *Nature*, **287**, 401—407.
66. Tavernier J., Derynck R., Fiers W., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 461—472.
67. Lomedico P., Rosenthal N., Efstratiadis A., Gilbert W., Kolodner R., Tizard R., (1979), *Cell*, **18**, 545—558.
68. Lee D. C., McKnight G. S., Palmiter R. D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1442—1450.
69. Roop D. R., Tsai M. J., O'Malley B. W., (1980), *Cell*, **19**, 63—68.
70. Knöchel W., Grundman U., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **563**, 143—149.
71. Tilghman S. M., Curtis P., Tiemeier D. C., Leder P., Weissmann C., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1309—1313.
72. Kinniburgh A. J., Ross J., (1979), *Cell*, **17**, 915—921.
73. Avvedimento V. E., Vogeli G., Yamada Y., Maizel J. V., Jr., Pastan I., de Crombrughe B., (1980), *Cell*, **21**, 689—696.
74. Curtis P. J., Mantei N., Weissmann C., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 971—980.
75. Ross J., Knecht D. A., (1978), *J. Molec. Biol.*, **119**, 1—20.
76. Salditt-Georgieff M., Harpold M., Chen-Kiang S., Darnell J. E., Jr., (1980), *Cell*, **19**, 69—78.
77. Lewin B., (1980), *Cell*, **22**, 324—327.
78. Lewin B., (1980), *Cell*, **22**, 645—646.
79. Sharp P. A., (1981), *Cell*, **23**, 643—646.
80. Young R. A., Steitz J. A., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3593—3597.
81. Maxam A. M., Gilbert W., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560—564.
82. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463—5467.
83. Konkkel D. A., Maizel J. V., Jr., Leder P., (1979), *Cell*, **18**, 865—873.
84. Konkkel D. A., Tilghman S. M., Leder P., (1978), *Cell*, **15**, 1125—1132.



85. Liebhaber S. A., Goosens M. J., Kan Y. W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7054—7058.
86. Garapin A. C., LePennec J. P., Roskam W., Perrin F., Cami B., Krust A., Breathnach R., Chambon P., Kourilsky P., (1978), *Nature*, **273**, 349—358.
87. Hoeijmakers-Van Dommelen H. A. M., Grosveld G. C., de-Boer E., Flavell R. A., Varley J. M., Jeffreys A. J., (1980), *J. Molec. Biol.*, **140**, 531—547.
88. Breathnach R., Benoist C., O'Hare K., Gannon F., Chambon P., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4853—4857.
89. Catterall J. F., O'Malley B. W., Robertson M. A., Staden R., Tanaka Y., Brownlee G. G., (1978), *Nature* **275**, 510—515.
90. Seif I., Khoury G., Dhar R., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 3387—3398.
91. Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L., Steitz J. A., (1980), *Nature*, **283**, 220—224.
92. Rogers J., Wall R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1877—1879.
93. Naora H., Deacon N. J., Fry K. E., (1979), *J. Theor. Biol.*, **80**, 205—221.
94. Naora H., Deacon N. J., Buckle D., (1980), *J. Theor. Biol.*, **85**, 83—97.
95. Nussinov R., (1980), *J. Theor. Biol.*, **83**, 647—662.
96. Trapnell B. C., Tolstoshev P., Crystal R. G., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 3659—3672.
97. Aloni Y., (1980), w *Progr. Nucl. Acid Res. Molec. Biol.*, wyd. Cohen W. E., t. **25**, str. 1—32, Academic Press, New York.
98. Young R. A., Hagenbückle O., Schibler U., (1981), *Cell*, **23**, 451—458.
99. Early P., Rogers J., Davis M., Calame K., Band M., Wall R., Hood L., (1980), *Cell*, **20**, 313—319.
100. Ro-Choi T. S., Bush H., (1974), w *The Cell Nucleus*, wyd. Bush H., t. **3**, str. 151—208, Academic Press, New York.
101. Wise J. A., Weiner A. M., (1980), *Cell*, **22**, 109—118.
102. Brantant C., Krol A., Ebel J. P., Lazar E., Gallinaro H., Jacob M., Sri-Widad J., Jeanteur P., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4143—4154.
103. Flytzanis C., Alonso A., Louis C., Krieg L., Sekeris C. E., (1978), *FEBS Letters*, **96**, 201—206.
104. Deimel B., Louis C., Sekeris C. E., (1977), *FEBS Letters*, **73**, 80—84.
105. Jelinek W., Leinwand L., (1978), *Cell*, **15**, 205—214.
106. Gallinaro H., Jacob M., (1979), *FEBS Letters*, **104**, 176—182.
107. Murray V., Holliday R., (1979), *Genet. Res.*, **34**, 173—188.
108. Murray V., Holliday R., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 5—7.
109. Davidson E. H., Britten R. J., (1979), *Science*, **204**, 1052—1059.
110. Jelinek W., Darnell J. E., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2537—2541.
111. Jelinek W., Evans R., Wilson M., Salditt-Georgieff M., Darnell J. E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2776—2783.
112. Chiu N. H., Bruszewski W. B., Salzman N. P., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 153—168.
113. Bina M., Feldman R. J., Deeley R. G., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1278—1282.
114. Lai E. C., Woo S. L. C., Bordelon-Riser M. E., Fraser T. H., O'Malley B. W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 244—248.
115. Breathnach R., Mantei N., Chambon P., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 740—744.
116. Mantei N., Boll W., Weissmann C., (1979), *Nature*, **281**, 40—46.

117. Wold B., Wigler M., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5684—5688.
118. Anderson W. F., Killos L., Sanders-Haigh L., Kretschmer P. J., Diacumakos E. G., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5399—5403.
119. Mertz J. E., Gurdon J. B., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1502—1506.
120. De Robertis E. M., Mertz J. E., (1977), *Cell*, **12**, 175—182.
121. Rungger D., Türler H., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6073—6077.
122. Wickens M. P., Woo S., O'Malley B. W., Gurdon J. B., (1980), *Nature*, **285**, 628—634.
123. Hamer D. H., Leder P., (1979), *Nature*, **281**, 35—40.
124. Gruss P., Khoury G., (1980), *Nature*, **286**, 634—637.
125. Hamer D. H., Leder P., (1979), *Cell*, **17**, 737—747.
126. Beggs J. D., van den Berg J., van Ooyen A., Weissmann C., (1980), *Nature*, **283**, 835—840.
127. Mercereau-Puijalon O., Kourilsky P., (1979), *Nature*, **279**, 647—649.
128. Petes T. D., (1980), *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 845—876.
129. Leder P., Hansen J. N., Konkel D., Leder A., Nishioka Y., Talkington C., (1980), *Science*, **209**, 1336—1342.
130. Proudfoot N. J., Shander M. H. M., Manley J. L., Geffer M. L., Maniatis T., (1980), *Science*, **209**, 1329—1336.
131. Nishioka Y., Leder P., (1979), *Cell*, **18**, 875—882.
132. van den Berg J., van Ooyen A., Mantei N., Schamböck A., Grosveld G., Flavell R. A., Weissmann C., (1978), *Nature*, **276**, 37—44.
133. Konkel D. A., Maizel J. V., Jr., Leder P., (1979), *Cell*, **18**, 865—873.
134. Lauer J., Shen C. K. J., Maniatis T., (1980), *Cell*, **20**, 119—130.
135. Slightom J. L., Blechl A. E., Smithies O., (1980), *Cell*, **21**, 627—639.
136. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tisher E., Rutter W. J., Goodman H. M., (1977), *Science*, **196**, 1313—1319.
137. Villa-Komaroff L., Efstratiadis A., Broome S., Lomedico P., Tizard R., Naber S. P., Chick W. L., Gilbert W., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3727—3731.
138. Gorin M. B., Tilghman S. M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1351—1355.
139. Gross P., Lai C. J., Dhar R., Khoury G., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4317—4321.
140. Lai C. J., Khoury G., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 71—75.
141. Hamer D. H., Smith K. D., Boyer S. H., Leder P., (1979), *Cell*, **17**, 725—735.
142. Lazowska J., Jacq C., Slonimski P. P., (1980), *Cell*, **22**, 333—348.
143. Reanney D., (1979), *Nature*, **277**, 598—600.
144. Doolittle W. F., (1978), *Nature*, **272**, 581—582.
145. Blake C. C. F., (1978), *Nature*, **273**, 267.
146. Darnell J. E., Jr., (1978), *Science*, **202**, 1257—1260.
147. Levine M., Muirhead H., Stammers D. K., Stuart D. J., (1978), *Nature*, **271**, 626—630.
148. Rossmann M. G., Moras D., Olsen K. W., (1974), *Nature*, **250**, 194—199.
149. Craik C. S., Buchman S. R., Beychok S., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1384—1388.

150. Jung A., Sippel A. E., Grez M., Schütz G., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5759—5763.
151. Stein J. P., Catterall J. F., Kristo P., Means A. R., O'Malley B. W., (1980), *Cell* **21**, 681—687.



JADWIGA JARUZELSKA \*), RYSZARD SŁOMSKI \*\*)

## **Metabolizm i funkcja biologiczna niskocząsteczkowych jądrowych RNA**

## **Metabolism and Biological Function of Small Nuclear RNA**

### *Spis treści:*

- I. Wprowadzenie**
- II. Charakterystyka niskocząsteczkowych jądrowych RNA**
  - II-1. Klasyfikacja i nomenklatura snRNA**
  - II-2. Występowanie snRNA w komórce**
  - II-3. Występowanie snRNA w komórkach różnych typów**
  - II-4. Asocjacja snRNA z białkami i chromatyną**
  - II-5. Synteza i dojrzewanie snRNA**
  - II-6. Trwałość snRNA w komórkach**
  - II-7. Synteza snRNA a cykl życiowy komórki**
  - II-8. Organizacja genów snRNA**
  - II-9. Sekwencje snRNA**
  - II-10. Struktura przestrzenna snRNA**
- III. Rola snRNA**
- IV. Uwagi końcowe**

### *Contents:*

- I. Introduction**
- II. Characterization of small nuclear RNA**
  - II-1. Classification and nomenclature of snRNA**
  - II-2. Cellular localization of snRNA**
  - II-3. Distribution of snRNA in cells of different types**
  - II-4. Association of snRNA with proteins and chromatin**
  - II-5. Synthesis of snRNA and maturation**
  - II-6. Metabolic stability of snRNA**
  - II-7. Relation of snRNA to the cell cycle**
  - II-8. Organization of snRNA genes**
  - II-9. Sequences of snRNA**
  - II-10. Three-dimensional structure of snRNA**
- III. The role of snRNA**
- IV. Final remarks**

\*) Mgr, \*\*) Dr, Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 30/36, 60-479 Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów: snRNA — niskocząsteczkowe jądrowe RNA; snRNP — cząstki rybonukleoproteinowe zawierające snRNA; NHP — białka nie-histonowe; LE — *Lupus Erythematosus*; pre-mRNP — cząstki rybonukleoproteinowe zawierające pre-mRNA; hnRNA — heterogeny jądrowy RNA; hnRNP — cząstki rybonukleoproteinowe zawierające hnRNA.

## I. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój technik elektroforetycznego frakcjonowania kwasów nukleinowych w latach 60-tych przyczynił się w znacznej mierze do wykrycia nieznanych dotąd typów RNA o niskim ciężarze cząsteczkowym, (4,5-8S), występujących powszechnie w jądrach komórkowych (1, 2). Są one różne od dotychczas poznanych mRNA, tRNA i rRNA, i ze względu na unikalne występowanie w jądrze komórkowym zostały umownie nazwane niskocząsteczkowymi jądrowymi RNA (snRNA). Wykazano, że są one natywnymi cząsteczkami, a nie produktami degradacji RNA o większej masie (3). Wykryto również nieznanne dotąd RNA o podobnej wielkości w bakteriach (4) i wirusach (5, 6, 7). Zidentyfikowano kilka do kilkunastu frakcji snRNA w zależności od pochodzenia komórek. Charakterystycznymi cechami tej grupy kwasów rybonukleinowych jest wysoka trwałość metaboliczna oraz występowanie struktury Cap na końcu 5' cząsteczki, różniącej się istotnie od struktury Cap, występującej w mRNA (8).

Mimo, że wiele grup badawczych na świecie prowadzi od kilku lat intensywne badania biochemiczne tych RNA, nie wyjaśniono dotąd ich funkcji w komórce. Zainteresowanie niskocząsteczkowymi jądrowymi RNA wzrosło w ostatnim czasie dzięki stwierdzeniu ich bliskiego związku z metabolizmem mRNA. Wiele danych doświadczalnych przemawia za ich udziałem w wycinaniu sekwencji intronowych z pierwotnych transkryptów mRNA (9, 10).

## II. Charakterystyka niskocząsteczkowych, jądrowych RNA

### II-1. Klasyfikacja i nomenklatura snRNA

Jednym z podstawowych kryteriów klasyfikacji snRNA jest ich wielkość oznaczana na podstawie migracji w żelu poliakryloamidowym. Najczęściej stosowany jest do tego celu 10% żel. Elektroforetyczne frakcjonowanie snRNA jest również przeprowadzane w warunkach denaturujących w obecności 7M mocznika. Na podstawie elektroforezy w 10% żelu poliakryloamidowym wyróżniono od kilku do kilkunastu frakcji snRNA w zależności od ich pochodzenia i warunków rozdziału. Powstało kilka niezależnych nomenklatur snRNA. Do najczęściej stosowanych w piśmien-

nictwie należą nomenklatura Weinberga i Penmana (1, 2) oraz nomenklatura Buscha i współpracowników (3). Wyróżniono następujące frakcje według rosnącej ruchliwości elektroforetycznej: K, 8S(L), U<sub>3</sub>(A), B, U<sub>2</sub>(C), U<sub>1</sub>(D), F, 5SIII(G'), 4,5S(H) (W nawiasach nazewnictwo Weinberga i Penmana). Najłatwiej identyfikowanymi snRNA w komórkach eukariotycznych są: U<sub>3</sub>(A), U<sub>2</sub>(C), U<sub>1</sub>(D), 5SIII(G'), 4,5S(H) (2).

## II-2. Występowanie snRNA w komórce

Niskocząsteczkowe jądrowe RNA występują unikalnie w jądrze komórkowym (3) i są ściśle związane z jego metabolizmem. Z danych z piśmiennictwa wynika, że niektóre snRNA są przejściowo obecne w cytoplazmie w formie prekursorów (2, 11). Stwierdzono, np. że frakcje U<sub>2</sub>(C) i U<sub>1</sub>(D) znajdują się w cytoplazmie przez kilka minut po ich syntezie, po czym przechodzą do potomnych jąder (12, 13, 14, 15). Dojrzałe cząsteczki występują w cytoplazmie jedynie po zaniku błony jądrowej podczas podziału komórki, a po zakończeniu kariokinezy znajdują się w potomnych jądrach (16, 17). Frakcja U<sub>3</sub>(A) jest specyficznie związana z jąderkiem (1, 2) podobnie jak frakcja 8S(L) (1, 18, 19, 20). Frakcje U<sub>2</sub>(C) i U<sub>1</sub>(D) oraz 4,5S(H) występują w regionie pozajądrowym (3).

## II-3. Występowanie snRNA w komórkach różnych rodzajów

snRNA zidentyfikowano zarówno w wyższych *Eukaryota* jak i w niższych np.: w *Neurospora crassa* (21), *Amoeba proteus* (16, 22, 23) i *Dictyostelium discoideum* (24). W obrazie elektroforetycznym snRNA pochodzących z różnych komórek istnieje pewne zróżnicowanie. W komórkach szpiczakowych myszy pierwotnie nie zidentyfikowano frakcji U<sub>3</sub>(A) która, jak ostatecznie ustalono, migruje w tym wypadku razem z frakcją U<sub>2</sub>(C) (25). Frakcja U<sub>1</sub>(D) jest homogenna w komórkach HeLa, natomiast w innych ludzkich komórkach zawiera co najmniej dwie komponenty (9). Frakcja 4,5S(H) zawiera trzy komponenty — 4,5SI, 4,5SII, 4,5SIII w komórkach wątrobiaka Novikoffa i w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha, będąc homogeną w komórkach HeLa (3). Dzięki precyzyjnym metodom frakcjonowania ustalono, że snRNA stanowią około 10% całkowitego jądrowego RNA (2, 18). Najliczniej występuje U<sub>1</sub>(D) RNA, przeciętnie w liczbie  $1 \times 10^6$  cząsteczek na komórkę, U<sub>3</sub>(A)RNA i 5SIII(G')RNA występuje w liczbie po około  $2 \times 10^5$  cząsteczek na komórkę, a U<sub>2</sub>(C) i 4,5S(H) w liczbie po około  $1 \times 10^5$  cząsteczek na komórkę (1, 26).

## II-4. Asocjacja snRNA z białkami i chromatyną

Z dotychczasowych badań wynika, że snRNA występują w jądrze komórkowym w formie kompleksów z białkami (1, 11, 27). Lerner, oraz inni autorzy wykazali obecność snRNA w postaci cząstek rybonu-



kleoproteinowych 10S w obrębie hnRNP (9, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 51, 52), przy czym snRNA stanowią 10-20% RNA występującego w hnRNP 40S (36). Stosując frakcjonowanie solne wykazano, że przeciętnie około 65-75% snRNA jest związane z chromatyną (37). Stopień związania z chromatyną zależy od stanu funkcjonalnego komórki. Frakcja  $U_3(A)$  w warunkach wysokiej aktywności transkrypcyjnej jąderka jest silnie związana z chromatyną jąderkową i nie ulega oddzieleniu w stężeniu 0,5M NaCl, jak również po trawieniu DNazą trzustkową. W obecności aktynowycyny D w stężeniu 0,04  $\mu\text{g/ml}$   $U_3(A)$ RNA ulega oddzieleniu od jąderka w znacznie niższym stężeniu soli — 0,2M NaCl.

Doniesienia dotyczące stopnia związania z chromatyną innych snRNA są sprzeczne (1, 11). Stwierdzono wysokie powinowactwo snRNA do częściowo zespiralizowanej chromatyny (profazalnej i anafazalnej) (23).

## II-5. Synteza i dojrzewanie snRNA

Do najważniejszego stwierdzenia należało, że niskocząsteczkowe jądrowe RNA nie są produktami degradacji innych RNA (3, 38). Badania mające na celu stwierdzenie, która z trzech podstawowych polimeraz RNA jest odpowiedzialna za syntezę snRNA dały sprzeczne wyniki.

Według ostatnich badań synteza  $U_3(A)$ ,  $U_2(C)$  i  $U_1(D)$  RNA odbywa się przy udziale polimerazy II, biorącej udział w syntezie mRNA (39, 40). Powyższy fakt może dowodzić bliskiego współdziałania tych RNA.

Niskocząsteczkowe jądrowe RNA są syntetyzowane w formie prekursorów (13, 41, 42), a ich dojrzewanie polega na odcięciu 5-10 nukleotydów (42) oraz modyfikacji niektórych nukleotydów. Proces dojrzewania trwa około 15 minut (1). Niektóre snRNA są przejściowo obecne w cytoplazmie w formie prekursorów niezwiązanych z białkami (13, 42, 61).

Proces metylacji snRNA jest złożony. Sugerowano, iż pewne jego etapy zachodzą w cytoplazmie, czego dowodem jest fakt, że kilka snRNA ma na końcu 5' charakterystyczną strukturę CapII, której powstanie warunkują enzymy cytoplazmatyczne. W przeciwieństwie do tego struktura CapI powstaje w jądrze komórkowym (41). Proces odcinania nadmiernych nukleotydów zachodzi w cytoplazmie i w jądrze, po czym snRNA dopiero w postaci dojrzałych cząsteczek wiążą się z białkami (13).

## II-6. Trwałość snRNA w komórkach

Jedną z charakterystycznych cech niskocząsteczkowych jądrowych RNA jest ich wysoka trwałość metaboliczna (3, 11, 19, 43). Półokres trwania niektórych snRNA jest dłuższy od pojedynczego cyklu komórkowego (1, 44). Stwierdzono, że półokres trwania frakcji L,  $U_3(A)$ ,  $U_2(C)$ ,  $U_1(D)$  pochodzących z komórek chomika (BHK-21) wynosi 5-7 dni (44). Według Weinberga, półokres trwania frakcji  $U_3(A)$ ,  $U_1(D)$  i 5SIII(G') z ko-

mórek HeLa jest równy półokresowi trwania cytoplazmatycznego rRNA, natomiast półokresy trwania frakcji  $U_2(C)$  i  $4,5S(H)$  są odpowiednio krótsze: 25 godz., 30 godz. Po 24 godz. od odmycia radioaktywnego izotopu po pulsowym znakowaniu komórek HeLa, snRNA stanowią główny znakowany jądrowy RNA (1). Podobne zjawisko stwierdzano w odniesieniu do *Amoeba proteus* (23, 45). Trwałość metaboliczna wielu snRNA jest uwarunkowana obecnością modyfikowanych nukleotydów szczególnie przy końcu 5', oraz odpowiednią drugorzędową strukturą i trzeciorzędowymi oddziaływaniami fragmentów cząsteczki przy końcu 3' (3, 46).

## II-7. Synteza snRNA a cykl życiowy komórki

Powiązanie syntezy snRNA z fazami cyklu komórkowego nie jest wyjaśnione, a doniesienia na ten temat nie są jednoznaczne. Stwierdzono, że synteza snRNA w komórkach HeLa zsynchronizowanych przez podwójny blok tymidynowy przebiega niezależnie od faz cyklu komórkowego (1). Ponadto nie wykazano żadnych różnic jakościowych w syntezie snRNA w komórkach stymulowanych *in vitro* (47, 48, 49, 50). Doniesiono też jednak o specyfice syntezy niektórych snRNA w poszczególnych fazach cyklu życiowego komórki. Wykazano, że w zsynchronizowanych komórkach nerki chomika pewne snRNA są syntetyzowane szczególnie aktywnie przed lub po syntezie DNA, inne natomiast nie wykazują zróżnicowania syntezy w cyklu komórkowym. Stąd sugerowano, że niektóre snRNA są czynnikami regulacji podziału komórki (51). Stwierdzono również, że synteza snRNA ulega 5-10 krotnej supresji w komórkach 3T3, których wzrost został zahamowany przez inhibicję kontaktową (2). Są dane wskazujące, że synteza  $U_2(C)$ ,  $U_1(D)$  i  $4,5S(H)$  RNA występuje tylko jeden raz w cyklu życiowym komórki, podobnie jak synteza DNA i histonów (52). Ciekawe zmiany jakościowe w syntezie powyższych frakcji zaobserwowano również w rozwoju embrionalnym jeżowca. We wczesnym okresie rozwoju embrionalnego jeżowca — intensywnej syntezie tRNA i mRNA oraz dojrzewaniu mRNA towarzyszy synteza  $U_2(C)$  i  $U_1(D)$  DNA. W fazie wylęgu jeżowca synteza  $U_3(A)$  towarzyszy procesowi formowania jąderki i syntezie rRNA (53). Zaobserwowano również zmiany ilościowe i jakościowe w syntezie snRNA podczas metamorfozy kijanek w osobniki dorosłe (54).

## II-8. Organizacja genów snRNA

Na podstawie hybrydyzacji snRNA-DNA w roztworze stwierdzono, że geny niskocząsteczkowych jądrowych RNA należą do grupy genów średniopowtarzających się w genomie ssaków (55), są równomiernie rozmieszczone w nim a nie występują w zespołach. Każda frakcja snRNA jest ko-



dowana przeciętnie przez około 2000 genów. W tych samych warunkach doświadczenia ustalono, że rRNA jest kodowany przez około 200 genów. Wykazano, że liczba genów kodujących  $U_3(A)$ , 8S(L) i  $U_1(D)$  RNA jest zbliżona do liczby genów kodujących 5S i tRNA (38). Liczba genów snRNA jest zaskakująco duża w zestawieniu z ich niewielką ilością w komórce gdyż stanowi tylko 2-3% komórkowego RNA (26). Na podstawie ostatnich badań jednak można sądzić, że nie wszystkie geny snRNA ulegają ekspresji. Termiczna stabilność hybrydów snRNA-DNA jest niższa niż należałoby oczekiwać w przypadku wysokiego stopnia komplementarności zasad w dupleksie RNA-DNA. Jest wysoce prawdopodobne, że wiele genów snRNA uległo mutacjom, które uniemożliwiły ich ekspresję oraz spowodowały obniżenie stopnia komplementarności między snRNA występującymi aktualnie w komórce a ich genami (38). Weiner i współpracownicy analizowali strukturę genów snRNA komórek ludzkiego łożyska wbudowanych w genom faga  $\lambda$ . Każdy z 24-ech w ten sposób uzyskanych rekombinantów faga  $\lambda$  zawierał fragment restrykcyjny DNA ludzkiego łożyska o wielkości 15 kilobaz, zawierający sekwencję komplementarną do  $U_3(A)$ ,  $U_2(C)$  lub  $U_1(D)$  RNA. Badania sekwencyjne dwóch z powyższych rekombinantów faga  $\lambda$  zawierających ludzki DNA wykazały obecność genów  $U_2(C)$  i  $U_1(D)$  RNA o nieco zmienionej sekwencji; są to tzw. pseudogeny tych RNA. Pseudogeny odpowiadają genom zmienionym na skutek mutacji zaistniałych w rozwoju filogenetycznym, tak dalece, że ich ekspresja została zahamowana. Hybrydyzacja snRNA-DNA na filtrze nitrocelulozowym z pozostałymi 22-oma rekombinantami faga  $\lambda$  wykazała w 20-tu przypadkach również występowanie pseudogenów wyżej wymienionych trzech frakcji snRNA. Nie wykazano w tych przypadkach obecności dupleksów snRNA-DNA odpornych na działanie RNazy T1. Na podstawie profilu topnienia hybrydów snRNA-DNA stwierdzono dość znaczną jednorodność (56). Mutacje niektórych genów snRNA nie doprowadziły do zahamowania ich ekspresji. Świadczy o tym pewne zróżnicowanie sekwencji cząsteczek należących do tej samej frakcji snRNA. W komórkach HeLa oraz w komórkach mózgu szczura zidentyfikowano kilka rodzajów  $U_5(G')$ RNA. Oznacza to, że jest on syntetyzowany na podstawie większej liczby genów podobnie jak np. 5S rRNA. Oznacza to również, że mutacje, które wpłynęły na zmienność tych genów, nie zahamowały ich ekspresji. Stało się to możliwe, ponieważ nie wywołały zmian struktury przestrzennej i rozmieszczenia modyfikowanych nukleotydów, co jest niezwykle istotne dla funkcji dojrzałej cząsteczki snRNA. Również w przypadku  $U_3(A)$ RNA z komórek hepatoma Novikoffa (57) i *Dictyostelium discoideum* (24) wykazano obecność kilku typów cząsteczek pod względem sekwencji nukleotydów. Mimo, że niektóre pseudogeny mogą ulegać transkrypcji *in vivo* nie prowadzi to do powstania dojrzałej cząsteczki snRNA, o czym świadczy wysoka konserwatywność sekwencji tych RNA w różnych gatunkach ssaków. Istnieje alternatywna



interpretacja, według której, niektóre pseudogeny są aktywne transkrypcyjnie i produkują niewielkie ilości cząsteczek danego typu snRNA o nieco zmienionej sekwencji, ale niezmienionej ruchliwości elektroforetycznej. Pseudogeny wykryto również w odniesieniu do innych dobrze zidentyfikowanych rodzin genów, jak geny  $\alpha$  i  $\beta$  globin różnych ssaków, geny aktywne w *Dictyostelium discoideum*. Z dotychczasowych badań wynika, że z wyjątkiem genów aktywne w *Dictyostelium discoideum* i genów  $\alpha$ -globiny myszy, pseudogeny są wykrywane w sąsiedztwie rodzin genów występujących w zespołach. Tymczasem pseudogeny snRNA są rozproszone w genomie. Wskazuje na to między innymi fakt, że każdy z 24-ech fragmentów restrykcyjnych ludzkiego DNA w rekombinantach faga zawierał tylko jedną sekwencję komplementarną do  $U_3(A)$ ,  $U_2(C)$  lub  $U_1(D)$  RNA. Istnieje przypuszczenie, że pseudogeny powstają przez duplikację genów i na skutek działającego w konsekwencji dryftu genetycznego (56). Podobny mechanizm mógł doprowadzić również do powstania pseudogenów snRNA. Jest godnym podkreślenia, że rozproszenie, wysoka powtarzalność w genomie i różnorodność sekwencji pseudogenów snRNA mogą mieć istotne znaczenie funkcjonalne. Mogą mieć mianowicie znaczenie regulacyjne dzięki zdolności hybrydyzacji z odpowiadającymi im snRNA. Wykazano obecność średniopowtarzających się sekwencji należących do rodziny sekwencji Alu, w sąsiedztwie pseudogenów snRNA (56). Sekwencje Alu zostały zidentyfikowane w genomie *Eukaryota*. Posiadają długość około 300 nukleotydów i są powtórzone około 300 000 razy w genomie ludzkim. Nazwa Alu pochodzi stąd, że wszystkie te sekwencje posiadają specyficzne miejsca cięcia dla enzymu restrykcyjnego AluI (59). Sekwencje Alu występują między innymi w pobliżu pseudogenów  $U_2(C)$  i  $U_1(D)$  RNA od strony końca 5'. Stwierdzono ponadto, że sekwencje Alu występują w tej samej orientacji, co pseudogeny tych snRNA. Wykryto ich obecność również w sąsiedztwie zespołów genów  $\alpha$  i  $\beta$  globiny ludzkiej i zespołu genów  $\beta$ -globiny królika. Dotychczas stwierdzono, że sekwencje Alu występują w sąsiedztwie końca 5' i w tej samej orientacji, co jednostki transkrypcyjne przepisane przy udziale polimerazy II. Funkcja sekwencji Alu w genomie nie jest dotychczas wyjaśniona. Dalsze badania pseudogenów snRNA mogą doprowadzić do wyjaśnienia ich pochodzenia i roli (12).

## II-9. Sekwencje snRNA

Wielkość snRNA waha się w granicach 100-300 nukleotydów (3). Charakterystyczna jest obecność zmodyfikowanych nukleozydów (60, 61) i wysoka zawartość urydyny (8, 62, 63). W przeciwieństwie do tRNA, snRNA nie wykazują między sobą bliskiej homologii sekwencji (3). Niektóre frakcje są spolaryzowane pod względem rozmieszczenia zasad purynowych i pirymidynowych w cząsteczce. Stwierdzono, że 4,5S(H)RNA

chomika i myszy zawiera dużo reszt purynowych w centralnej części cząsteczki (64), natomiast 4,5S(H)RNA komórek hepatoma Novikoffa wykazuje obecność wielu reszt purynowych od połowy cząsteczki do końca 5' i wiele reszt pirymidynowych w drugiej połowie cząsteczki (61). snRNA zawierają przeciętnie 2-3 razy mniej grup metylowych niż tRNA. Grupy metylowe występują częściej w pozycji 2'-O-rybozy, niż w pierścieniach zasad (2, 65, 66). Frakcje K 8S(L) i 4,5S(H)RNA są nielicznymi snRNA nie zawierającymi zmodyfikowanych nukleozydów (61, 64). W przypadku 5SIII(G')RNA wykazano obecność kilku zmodyfikowanych nukleozydów w odróżnieniu od 5S<sub>I</sub> i 5S<sub>II</sub> (5S rRNA), które nie ulegają modyfikacjom (3). U<sub>1</sub>(D) i U<sub>3</sub>(A) RNA należą również do snRNA słabiej zmodyfikowanych (2, 3, 48). Jeden z ostatnio wykrytych snRNA — U<sub>6</sub>(4,7S)RNA migrujący między 5S a 4,5S(H)RNA zawiera aż 13 zmodyfikowanych nukleozydów i w tym trzy reszty pseudourydyny występujące w centralnej części cząsteczki (62). Jedną z najsilniej zmodyfikowanych frakcji snRNA jest U<sub>2</sub>(C)RNA — zawierająca 10 metylowanych nukleozydów i 10 reszt pseudourydyny. Przy czym prawie wszystkie zmodyfikowane nukleozydy znajdują się w jednej trzeciej cząsteczki przy końcu 5' (3, 52, 67). Bardzo charakterystyczną cechą snRNA jest występowanie w nich struktury 5'Cap. Głównym elementem struktury Cap w snRNA jest 2,2,7 trójmetyloguanina bardzo rzadko występująca u innych RNA. 2,2,7 trójmetyloguanozyna jest połączona z następnym nukleozydem wiązaniem 5'-5'fosforanowym. Sugerowano, że zmodyfikowane nukleozydy stanowią miejsca wiązania określonych białek i w tym również polimeraz RNA (67). Wykazano wysoką homologię sekwencji poszczególnych snRNA pochodzących z różnych organizmów (3, 24, 64). U<sub>1</sub>(D)RNA mózgu szczura, wątroby kurczęcia i komórek HeLa różnią się tylko 6-oma nukleotydami (68). Dzięki zastosowaniu metod sekwencjonowania stało się możliwe stwierdzenie komplementarności fragmentów sekwencji niektórych snRNA do sekwencji występujących na granicy intron/egzon wielu pre-mRNA. Dotyczy to 4,5S(H) i U<sub>1a</sub>(D) RNA. Jest to jedna z przesłanek przemawiających za hipotezą dotyczącą udziału snRNA w wycinaniu intronowych sekwencji z pre-mRNA (9, 64).

## II-10. Struktura przestrzenna snRNA

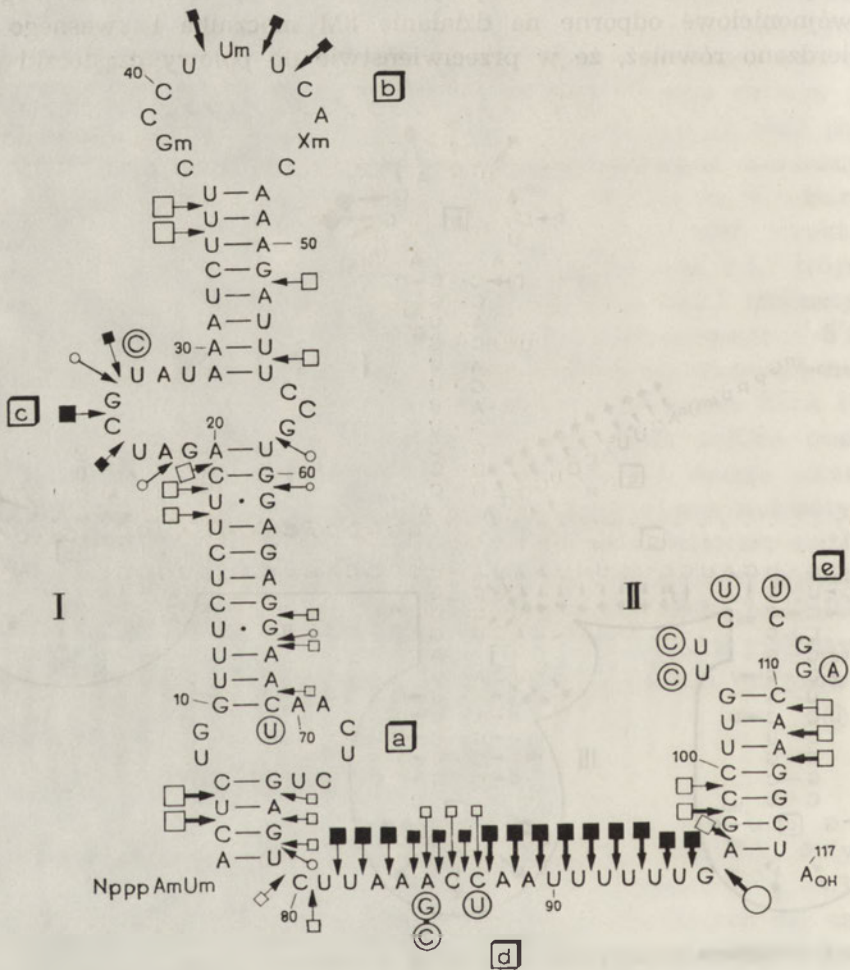
Dotychczasowe badania struktury przestrzennej snRNA dotyczą U<sub>1a</sub>(D), U<sub>5</sub>(G') i 4,5S(H) RNA. Modele struktury przestrzennej snRNA powstały w oparciu o założenie maksymalnej ilości możliwych par zasad w cząsteczce. Pojedynczo- i podwójnoniciowe regiony cząsteczki zidentyfikowano przy użyciu takich metod jak: hydroliza przy pomocy różnych nukleaz — nukleazy T1, S1 i nukleazy z *Naja oxiana*; hybrydyzacja RNA do oligomerów DNA i badanie wrażliwości hybrydów na działanie RNazy H; analiza interakcji fragmentów cząsteczki. Badania struktury







końcu 5', połowa cząsteczki przy końcu 3' ma bardzo zwartą strukturę stabilizowaną przez oddziaływania trzeciorzędowe. Jest to skuteczna ochrona przed działaniem nukleaz. Zwartość struktury przestrzennej przy końcu 3' cząsteczki U<sub>5</sub>A(D)RNA jest powodem obniżonej wydajności znakowania końca 3' w porównaniu z wydajnością znakowania końca 3' 5S i tRNA. Koniec 5' cząsteczki nie ma struktury podwójnoniciowej na przestrzeni pierwszych kilkunastu nukleotydów (e) (Ryc. 1). Jego dostępność umożliwia hybrydyzację z innymi RNA. Jeśli wziąć pod uwagę sekwencje często występujące na granicy intron/egzon w różnych pre-mRNA (U-G, G-A), to odcinki U<sub>5</sub>A(D) RNA komplementarne do tych



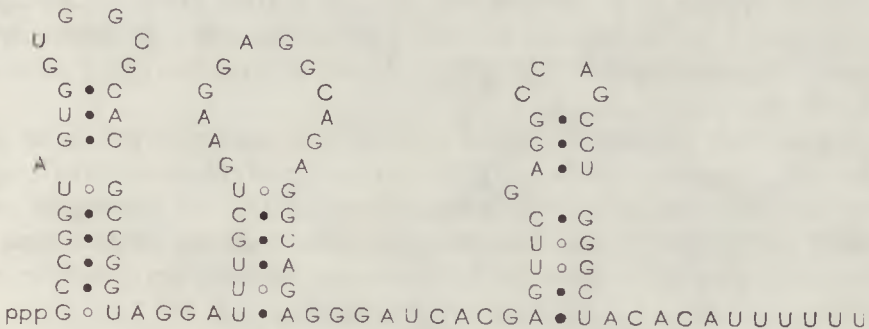
**Ryc. 2.** Struktura drugorzędowa U<sub>5</sub>A(5SIII)RNA w roztworze

Przedstawiona sekwencja nukleotydów odpowiada U<sub>5</sub>A(5SIII)RNA mózgu kurcząt. Zaznaczono różnice w sekwencji nukleotydów w stosunku do innych rodzajów U<sub>5</sub>(5SIII)RNA, oraz specyficzne miejsca cięcia przez odpowiednie enzymy hydrolytyczne: ○ RNaza T1, ■ nukleaza S1, □ RNaza z *Naja oriana* (46).

granicznych sekwencji mieszczą się między 8 a 11 nukleotydem (A-C-C-U<sub>p</sub>). Z wykonanych badań struktury U<sub>1a</sub>(D)RNA w roztworze wynika, że segment 8-11 znajduje się w centrum jednoniciowego odcinka cząsteczki (e) przy końcu 5' dostępnego na działania enzymów. Jeżeli nawet konformacja U<sub>1a</sub>(D)RNA jest inna *in vivo* i odpowiada innemu z 4-ech modeli, to segment 8-11 pozostaje zawsze jednoniciowy i dostępny (69).

Na podstawie wyników uzyskanych dzięki zastosowaniu wyżej wspomnianych metod, zaproponowano model struktury przestrzennej U<sub>5</sub>(G') RNA. Ma on strukturę dwóch „szpilek do włosów” I i II przedzielonych jednoniciowym fragmentem (d) (Ryc. 2).

Mimo różnic w składzie nukleotydowym wykazano istotne podobieństwa struktury przestrzennej U<sub>5</sub>(G') i U<sub>1a</sub>(D)RNA. Podobieństwa dotyczą w szczególności regionu 3' cząsteczki: 1) oba RNA posiadają bardzo trwałą strukturę „szpilki do włosów” przy końcu 3' z bardzo podobną sekwencją w obrębie pętli (Py-Py-Py-G); 2) w przypadku obu RNA 3' końcowe „szpilki do włosów” są poprzedzone kilkunastonukleotydowymi sekwencjami jednoniciowymi zawierającymi dużą ilość A i U; 3) istnieje duża homologia sekwencji w obrębie „szpilki do włosów” występującej przy końcu 5' cząsteczki; 4) stwierdzono oddziaływania trzeciorzędowe w regionach cząsteczek przy końcu 3'. W tych oddziaływaniach biorą udział m.in. jednoniciowe fragmenty „szpilki do włosów” występującej przy końcu 3'. Podobieństwa w strukturze przestrzennej obu snRNA zdają się świadczyć o ich podobnej funkcji w komórce, np. jeśli chodzi o udział w wycinaniu sekwencji intronowych z pre-mRNA. Dotychczas nie stwierdzono jednak komplementarności U<sub>5</sub>(G')RNA wobec sekwencji granicznych intron/egzon w pre-mRNA (46). Występuje natomiast podobieństwo funkcji U<sub>1a</sub>(D) a 4,5S(H) RNA w wycinaniu sekwencji intronowych z pre-mRNA. Struktura przestrzenna 4,5S(H)RNA składa się z trzech „szpilek do włosów” przedzielonych jednoniciowymi fragmentami. Rycina 3 przedstawia wstępny model struktury przestrzennej 4,5S(H)RNA. Sekwencje bezpośrednio zaangażowane w tym oddziaływaniu znajdują się w środko-



Ryc. 3. Prawdopodobna struktura drugorzędowa 4,5S(H)RNA komórek nerki myszy i chomika (64)

wej części cząsteczki bogatej w puryny, oraz w „szpilce do włosów” sąsiadującej z końcem 3' cząsteczki (64).

Ze względu na to, że niektóre snRNA są najprawdopodobniej zaangażowane w wycinaniu sekwencji intronowych z pre-mRNA i łączeniu odpowiednich egzonów, bliższe zbadanie struktury przestrzennej tych snRNA powinno przyczynić się w znaczny sposób do wyjaśnienia mechanizmu dojrzewania mRNA.

### III. Rola snRNA

Pomimo bardzo wnikliwej analizy biochemicznej snRNA, ich rola w komórce jest dotąd mało poznana. Wiele doniesień literaturowych przemawia za ich udziałem w regulacji ekspresji genu. Ekspresja genu jest skomplikowanym procesem biochemicznym, podlegającym złożonej regulacji począwszy od poziomu transkrypcji a skończywszy na translacji. Rola snRNA jako aktywatorów transkrypcji została zasugerowana po raz pierwszy przez Brittena i Davidsona w modelu regulacji ekspresji genu u *Eukaryota* (70). O bliskim związku snRNA z procesem transkrypcji świadczy również bliskie powinowactwo snRNA do częściowo zespiralizowanej chromatyny (profazalnej i anafazalnej). W anafazie i profazie transkrypcja jest szczególnie intensywna. Na tej podstawie powstała koncepcja o współdziałaniu snRNA i niehistonowych białek chromatyny (NHP) w „programowaniu” pomiototycznych chromosomów (22). Wysłunięto alternatywną koncepcję, według której powinowactwo snRNA do częściowo zespiralizowanej chromatyny jest odzwierciedleniem ich roli w spiralizacji chromosomów, analogicznie do pewnych RNA w *Prokaryota* (71, 72).

Bardziej szczegółowe badania oddziaływań snRNA z chromatyną przeprowadzone w układzie homologicznym *in vitro* potwierdziły rolę 4,5S(H) i 5SIII(G')RNA jako aktywatorów transkrypcji (73, 74). Istnieje przypuszczenie, że funkcja 4,5S(H)RNA polega na zwiększeniu liczby inicjujących kompleksów w chromatynie (75), a 5SIII(G')RNA na elongacji transkryptu przez odsłanianie kolejnych sekwencji genu. Zaobserwowano bliskie oddziaływanie 5SIII(G')RNA z białkami histonowymi i niehistonowymi chromatyny (63, 76).

Sugerowano również, że udział snRNA w transkrypcji polega na specyficznym wiązaniu polimeraz RNA poprzez modyfikowane nukleozydy (67). Tym niemniej nie stwierdzono wpływu snRNA na aktywność polimeraz I i II (77, 78). Biorąc pod uwagę wysoką trwałość metaboliczną niskocząsteczkowych jądrowych RNA niektórzy badacze przypisali im rolę czynników stabilizujących strukturę chromatyny (11, 79).

Poznanie pierwszorzędowej struktury wielu mRNA i snRNA, dzięki dynamicznemu rozwojowi technik sekwencjonowania kwasów nukleino-



wych, przyczyniło się w ostatnich latach do sformułowania hipotezy uzasadniającej udział niskocząsteczkowych jądrowych RNA w dojrzewaniu mRNA (9, 10, 33).

Dotychczasowe badania pośrednio przemawiały za udziałem jedynie jąderkowej frakcji  $U_3(A)$  w dojrzewaniu rRNA o czym świadczą następujące fakty: a) przejściowa asocjacja  $U_3(A)$ RNA z pierwotnymi transkryptami rRNA — stosunek ilościowy  $U_3(A) : (32S-28S)rRNA$  wynosi 1:2 (3), b) frakcja  $U_3(A)$  jest ściśle związana z jąderką tylko podczas intensywnej syntezy 45S rRNA, c)  $U_3(A)$ RNA jest połączony wiązaniami wodorowymi z (32S-28S) rRNA (11).

Kilka grup badaczy wykazało obecność pozajądrowych snRNA w cząstkach rybonukleoproteinowych zawierających pre-mRNA (pre-mRNP) przypisując im początkowo rolę w stabilizacji struktury pre-mRNP (80, 81).

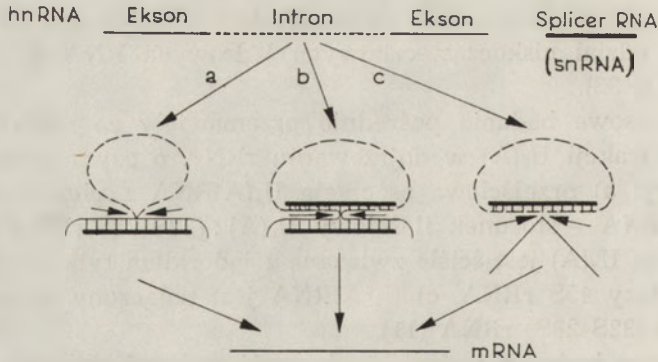
Nowsze prace wskazują, że obecność snRNA w pre-mRNP ma bardziej złożone znaczenie. Szereg danych świadczy obecnie o bardzo bliskim powiązaniu metabolizmu niskocząsteczkowych jądrowych RNA z informacyjnym RNA czego dowodzą następujące dane: a) antybiotyki wywołujące przedwczesną terminację transkrypcji pre-mRNA powodują również zmniejszenie ilości snRNA z charakterystyczną strukturą Cap, w jądrze komórki (82), b)  $U_2(C)$  i  $U_1(D)$ RNA są syntetyzowane przy udziale polimerazy II podobnie jak pre-mRNA (39, 40), c) snRNA połączone są z pre-mRNA wiązaniami wodorowymi (36) — pod wpływem wysokiego stężenia NaCl około 50%  $U_2(C)$  i  $U_1(D)$ RNA jest uwalniane z pre-mRNP, w postaci snRNP, a około 40% pozostaje związane z czystym pre-mRNA, d) na jedną cząsteczkę pre-mRNA przypada mniej niż jedna cząsteczka snRNA (83), e) fragmenty sekwencji niektórych snRNA są komplementarne do sekwencji na granicy intron/egzon wielu pre-mRNA (9, 33, 64, 84).

Powyższe dane świadczą za hipotezą Murray'a i Holliday'a dotyczącą udziału snRNA w wycinaniu intronowych sekwencji z pre-mRNA. Hipoteza zakłada, że niektóre snRNA hybrydują z pre-mRNA dzięki ich komplementarności wobec sekwencji na granicy intron/egzon w pierwotnych transkryptach mRNA. Dzięki temu struktura przestrzenna pre-mRNA ulega ściślejszej modyfikacji, warunkującej precyzyjne wycięcie intronu przez odpowiedni układ enzymów wycinających i łączących poszczególne egzony w nieprzerwaną nić mRNA (splicing enzymes) (10). Autorzy przyjmują trzy możliwości hybrydyzacji snRNA z pre-mRNA (Ryc. 4):

— hybrydyzacja cząsteczki snRNA z granicznymi sekwencjami egzonu pre-mRNA,

— hybrydyzacja snRNA z granicznymi sekwencjami intronu i egzonu pre-mRNA,

— hybrydyzacja snRNA z granicznymi sekwencjami intronu pre-mRNA.



**Ryc. 4.** Trzy możliwe sposoby wiązania cząsteczki snRNA wspomagającej wycinanie intronów („*splicer RNA*”) z sekwencjami hnRNA występującymi na granicy intron/egzon; a) hybrydyzacja z sekwencjami egzonu, b) hybrydyzacja z sekwencjami egzonu i intronu, c) hybrydyzacja z sekwencjami intronu. Miejsca wycięcia intronu i połączenia egzonów zaznaczono krótkimi strzałkami (10).

Wszystkie trzy przedstawione modele zapewniają precyzyjne wycięcie intronów i połączenie odpowiednich egzonów (10).

Jak już wyżej wspomniano, Lerner stwierdził występowanie snRNA w pre-mRNP w postaci specyficznych kompleksów rybonukleo-proteinowych (snRNP 10S). Każdy kompleks zawiera jedną cząsteczkę snRNA i 7 zawsze tych samych peptydów (12 000-35 000 D) (33). Lerner zasugerował, że snRNP jako całość mogłyby stanowić enzymy odpowiedzialne za dojrzewanie mRNA (9). Znane są przykłady enzymów składających się z części białkowej i z kwasu rybonukleinowego jak np. RNaza P w *E. coli* (85). Precyzyjne wycięcie sekwencji intronowych wymaga wysokiej konserwatywności struktur biorących udział w tym procesie. Stwierdzono, że 3 surowice wyizolowane z krwi chorych na LE precypitują snRNP pochodzące z gatunków bardzo oddalonych ewolucyjnie. Przy pomocy trzech wyżej wymienionych surowic precypitowano snRNP pochodzące zarówno z komórek ssaków jak i owadów. Świadczy to o wysokiej konserwatywności snRNP (33).

Badania sekwencyjne wykazały wysoką konserwatywność odcinków sekwencji  $U_1a(D)$  i  $4,5S(H)RNA$  hybrydujących z pre-mRNA, jak i sekwencji występujących na granicy intron/egzon w pre-mRNA (9, 64). Frakcja  $U_1a(D)$  występuje w dużej ilości w komórkach o szczególnie aktywnym metabolizmie, w których procesy dojrzewania mRNA są intensywne (9). Za hipotezą Murray'a i Holliday'a przemawia również fakt, że dwie z surowic izolowanych z krwi chorych na LE hamują proces dojrzewania mRNA w układzie *in vitro* o 45-80% (86). Badania struktury przestrzennej  $U_1a(D)RNA$  wykazały, że fragment cząsteczki komplementarny wobec sekwencji występującej na granicy intron/egzon w pre-mRNA pozostaje zawsze dostępny i jednoniciowy w szerokim zakresie pH i siły



jonowej w przypadku wszystkich dotychczas skonstruowanych modeli struktury przestrzennej  $U_1a(D)RNA$  (69).

Według Murray'a i Holliday'a specyficzność wycięcia sekwencji intronowych może być zapewniona przez odpowiedni snRNA, natomiast ten sam układ enzymatyczny (endonukleaza + ligaza RNA) zaangażowany w tym procesie niezależnie od rodzaju pre-mRNA byłby ten sam. Jeżeli tak jest w istocie to snRNA, a przynajmniej  $U_1a(D)$  i  $4,5S(H)RNA$ , byłyby czynnikami regulacji ekspresji genu na poziomie dojrzewania mRNA warunkując tym samym transport mRNA do cytoplazmy i translację, jako że mRNA przechodzi do cytoplazmy tylko w formie pozbawionej sekwencji intronowych.

Mimo, że hipoteza Murray'a i Holliday'a jest prawdopodobna i poparta danymi doświadczalnymi, mechanizm regulacji dojrzewania mRNA przez specyficzne snRNA nie wydaje się być wystarczający. Sekwencje snRNA i pre-mRNA wielu mRNA zaangażowane w wycinaniu intronów są bardzo podobne. Stwierdzono również, że wiele poznanych mRNA zawiera kilka sekwencji intronowych. Istnieje zatem pytanie, jaki mechanizm decyduje o wyborze właściwej sekwencji intron/egzon przez określony snRNA. Powyższy problem stał się jeszcze bardziej skomplikowany kiedy wykazano, że jeśli chodzi o wycinanie intronów, ten sam pierwotny transkrypt może podlegać różnej obróbce dając w rezultacie różne białka. Stąd, dany fragment pre-mRNA w jednym przypadku jest usuwany z pierwotnego transkryptu jako intron, w innym jest zachowywany jako sekwencja kodująca. Klasycznym przykładem takiego zjawiska jest synteza immunoglobulin oraz antygenów nowotworowych T i t wirusa SV40.

Stąd, konieczne są dalsze badania by wyjaśnić w jaki sposób hybrydyzacja określonego snRNA z odpowiednią sekwencją pre-mRNA jest kontrolowana przez komórkę.

#### IV. Uwagi końcowe

Jeśli spojrzeć z perspektywy kilku lat na to czego dokonano w dziedzinie niskocząsteczkowych jądrowych RNA, staje się jasne, że wiedza na ten temat została poszerzona w istotny sposób. Własności snRNA są coraz lepiej poznane włącznie z rozszyfrowaniem sekwencji niektórych z nich. Tym niemniej wyjaśnienie w jaki sposób metabolizm smRNA jest powiązany z metabolizmem całej komórki pozostaje w sferze hipotez mniej lub bardziej popartych danymi doświadczalnymi.

O istotnej roli snRNA w metabolizmie komórki świadczy wysoka konserwatywność cząsteczek obserwowana w rozwoju filogenetycznym od owadów do ssaków włącznie.

Pytaniem pozostającym dotychczas bez jednoznacznej odpowiedzi jest



to, czy wspólne cechy które łączą tę grupę RNA determinują ich podobną funkcję w komórce, czy też funkcja ta jest zróżnicowana w zależności od typu snRNA.

W miarę postępowania badań obserwuje się pewną zasadniczą zmianę w poglądach o ich roli w komórce. Jeszcze przed kilku laty, zważywszy wysoką trwałość metaboliczną snRNA, dominował pogląd, że są one stabilizatorami struktur subkomórkowych, takich jak chromatyna i in-formosomy. Obecnie, dzięki nowym danym dużą popularnością cieszy się opinia o ich istotnej roli w regulacji ekspresji genu na poziomie transkrypcji i dojrzewania RNA. Istotnym krokiem naprzód w badaniach na powyższy temat było wyizolowanie przez Lerner'a i wsp. przeciwciał skierowanych przeciwko cząstkom rybonukleoproteinowym zawierającym snRNA (snRNP). Umożliwia to przeprowadzenie wielu niezbędnych testów w układzie *in vitro* bez których bardziej precyzyjne badania np. oddziaływań snRNA — pre-mRNA byłyby niezwykle utrudnione.

Należy się spodziewać, że żywe zainteresowanie niskocząsteczkowymi jądrowymi RNA spowoduje znaczne przyspieszenie badań co z pewnością zaowocuje nowymi ciekawymi informacjami o ich funkcji w komórce.

Zaakceptowano do druku 4.12.1981

## PIŚMIENNICTWO

1. Weinberg R. A., Penman S., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 10—29.
2. Weinberg R. A., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 343—348.
3. Ro-Choi T. S., Busch H., (1974), *The cell nucleus*, red. Busch H., t. 3, 151—208, Academic Press, New York.
4. Lee S., Bailey S., Apirion D., (1978), *J. Bacteriol.*, **133**, 1015—1023.
5. Diaz-Ruiz I. R., Kaper I. H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **564**, 275—288.
6. Mathews M. B., (1978), *J. Mol. Biol.*, **119**, 293—328.
7. Waterworth H. E., (1979), *Science*, **204**, 845—847.
8. Busch H., (1976), *Perspect. Biol. Med.*, **19**, 549—567.
9. Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L., Steitz J. A., (1980), *Nature*, **283**, 220—224.
10. Murray V., Holliday R., (1979), *FEBS lett.*, **106**, 5—7.
11. Zieve G., Penman S., (1976), *Cell*, **8**, 19—31.
12. Eliceiri G. L., (1974), *Cell*, **3**, 11—14.
13. Eliceiri G. L., (1980), *J. Cell. Physiol.*, **102**, 199—207.
14. Eliceiri G. L., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **81**, 915—919.
15. Eliceiri G. L., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **72**, 507—512.
16. Goldstein L., (1974), *Exptl. Cell Res.*, **89**, 421—425.
17. Rein A., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 306—313.
18. Hellung-Larsen P., Frederiksen S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 290—307.
19. Larsen C. I., Galibert F., Hampe A., Boiron M., (1969), *Bull. Soc. Chim., Biol.*, **51**, 649—669.
20. Prestayko A. W., Tonato M., Busch H., (1970), *J. Mol. Biol.*, **47**, 505—515.

21. Kim K. T., Apirion D., Ghora B. K., (1978), *Molec. Gener. Genet.*, **160**, 25—32.
22. Goldstein L., (1976), *Nature*, **261**, 519—521.
23. Goldstein L., Wise G. E., Ko C., (1977), **73**, 322—331.
24. Wise J. A., Weiner A. M., (1980), *Cell*, **22**, 109—118.
25. Cory S., Adams J. M., (1975), *Molec. Biol. Repts.*, **2**, 287—294.
26. Weinberg R. A., Penman S., (1968), *J. Mol. Biol.*, **28**, 491—502.
27. Miller T. E., Huang C. Y., Pogo A. D., (1978), *J. Cell Biol.*, **76**, 692—704.
28. Augenlicht L. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3035—3041.
29. Brunel C., Sri-Widada J., Lelay M. N., Jeanteur P., Liautard J. P., (1981), *Nucl. Ac. Res.*, **9**, 815—830.
30. Deimel B., Louis C., Sekeris C. E., (1977), *FEBS Letters*, **73**, 80—84.
31. Gallinaro H., Jacob M., (1979), *FEBS Letters*, **104**, 176—181.
32. Guimont-Ducamp C., Sri-Widada J., Jeanteur P., (1977), *Biochimie*, **59**, 755—758.
33. Lerner M. R., Steitz J. A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5495—5499.
34. Northeman W., Scheurlen M., Gross V., Heinrich P. C., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **76**, 1130—1137.
35. Sekeris C. E., Niessing J., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **62**, 642—650.
36. Maxwell E. S., Maundrell K., Puvion-Dutilleul F., Scherrer K., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **113**, 233—247.
37. Prestayko A. W., Busch H., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **169**, 327—337.
38. Engberg J., Hellung-Larsen P., Frederiksen S., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 321—328.
39. Gram-Jensen E., Hellung-Larsen P., Frederiksen S., (1979), *Nucl. Ac. Res.*, **6**, 321—330.
40. Hellung-Larsen P., Kulamowicz J., Frederiksen S., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **609**, 201—204.
41. Brown A., Marzluff W., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 662—676.
42. Frederiksen S., Hellung-Larsen P., (1975), *FEBS Letters*, **58**, 374—378.
43. Nijhawan P., Marzluff W. F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1353—1360.
44. Frederiksen S., Pedersen I. R., Hellung-Larsen P., Engberg J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 64—67.
45. Goldstein L., Wise G. E., Stephenson C., Ko C., (1978), *J. Cell Sci.*, **30**, 227—235.
46. Krol A., Gallinaro H., Lazar E., Jacob M., Branlant C., (1981), *Nucl. Ac. Res.*, **9**, 769—787.
47. Hellung-Larsen P., Tyrsted G., Engberg J., Frederiksen S., (1974), *Exptl. Cell Res.*, **85**, 1—7.
48. Hellung-Larsen P., Tyrsted G., Frederiksen S., (1973), *Exptl. Cell Res.*, **80**, 393—304.
49. Howard E. F., (1973), *Exptl. Cell Res.*, **82**, 280—286.
50. Howard E. F., (1971), *Exptl. Cell Res.*, **70**, 460—462.
51. Clason A. E., Burdon R. H., (1969), *Nature*, **223**, 1063—1064.
52. Shibata H., Ro-Choi T. S., Reddy R., Choi Y. C., Henning D., Busch H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3909—3920.
53. Frederiksen S., Hellung-Larsen P., (1974), *Exptl. Cell Res.*, **89**, 217—227.
54. Maxwell E. S., Fischer M. S., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 302—318.

55. Marzluff W. F., White E. L., Benjamin R., Huang R., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3715—3724.
56. Denison R. A., Arsdell S. W., Bernstein L. B., Weiner A. M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 810—814.
57. Reddy R., Henning D., Busch H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7029—7033.
58. Proudfoot N. J., Shander M. H. M., Manley J. L., Gefter M. L., Maniatis T., (1980), *Science*, **209**, 1329—1342.
59. Rubin C. M., Houck C. M., Deininger P. L., Friedmann T., Schmid C. W., (1980), *Nature*, **284**, 372—374.
60. Reddy R., Ro-Choi T. S., Henning D., Shibata H., Choi Y. C., Busch H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7245—7250.
61. Ro-Choi T. S., Reddy R., Henning D., Takano T., Taylor C. W., Busch H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3205—3222.
62. Epstein P., Reddy R., Henning D., Busch H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8901—8906.
63. Kanehisha T., Oki Y., Ikuta K., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 146—152.
64. Harada F., Kato N., (1980), *Nucl. Ac. Res.*, **8**, 1273—1285.
65. Larsen C. I., Lebowitz P., Weissman S. M., Du Buy B., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 35—46.
66. Zapisek W. F., Saponara A. G., Enger M. D., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1170—1176 .
67. Ro-Choi T. S., Choi Y. C., Henning D., McCloskey J., Busch H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3921—3928.
68. Branlant C., Krol A., Ebel J. P., Lazar E., Gallinaro H., Jacob M., Sri-Widada J., Jeanteur P., (1980), *Nucl. Ac. Res.*, **8**, 4143—4154.
69. Branlant C., Krol A., Ebel J. P., (1981), *Nucl. Ac. Res.*, **9**, 841—858.
70. Britten R. J., Davidson E. H., (1969), *Science*, **165**, 349—367.
71. Petitjohn D. E., Hecht R., (1974), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 31—41.
72. Worcel A. E., Burgi I. R., Carlson C. L., (1974), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 43—51.
73. Kanehisha T., Tanaka T., Kano Y., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 584—589.
74. Tanaka T., Kanehisha T., (1972), *J. Biochem.* **72**, 1273—1280.
75. Kanehisha T., Kitazume Y., Ikuta K., Tanaka Y., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 501—513.
76. Kanehisha T., Kitazume Y., Matsui M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **479**, 265—278.
77. Kozlov A. P., Plyusnin A. Z., Evtushenko V. I., Seitz J. F., (1978), *Moliek. Biol.*, (Mos.), **12**, 91—99.
78. Kozlov A. P., Plyusnin A. Z., Evtushenko V. I., Seitz J. F., (1979), *Biokhimiya*, **44**, 27—32.
79. Kano Y., Komatsu H., Nakanain K., Fujiwara Y., (1978), *Exptl. Cell Res.*, **115**, 444—448.
80. Howard E. F., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3228—3236.
81. Seifert H., Scheurlen M., Northemann W., Heinrich P. C., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **564**, 55—66.
82. Tamm I., Kikuchi T., Darnell I. E., Salditt-Georgieff M., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2743—2748.
83. Gallinaro H., Jacob M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **652**, 109—120.



84. Avvedimento V. E., Vogeli G., Yamada Y., Maizel J. V., Pastan J., (1980), *Cell*, **21**, 689—696.
85. Stark B. C., Kole R., Bowmann E. J., Altman S., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3717—3721.
86. Lewin B., (1980), *Cell*, **22**, 324—326.



JACEK STAWIŃSKI \*)

## Zastosowanie syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej

### Application of Synthetic DNA Fragments in Molecular Biology

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Synteza fragmentów DNA
- III. Zastosowanie jednoniciowych syntetycznych fragmentów DNA
  - III-1. Wykrywanie określonych sekwencji w DNA i w RNA
  - III-2. Specyficzne startery enzymów polimeryzujących kwasy nukleinowe
  - III-3. Ukierunkowana mutageneza
- IV. Zastosowanie dwuniciowych syntetycznych fragmentów DNA
  - IV-1. Syntetyczne geny
  - IV-2. Badanie oddziaływań białko — DNA
- V. Zastosowanie syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów w inżynierii genetycznej
- VI. Uwagi końcowe

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Synthesis of DNA fragments
- III. Application of single-stranded synthetic DNA fragments
  - III-1. Detection of desire sequences in DNA and RNA
  - III-2. Specific primers
  - III-3. Directed mutagenesis
- IV. Application of double-stranded synthetic DNA fragments
  - IV-1. Synthetic genes
  - IV-2. Protein — DNA interactions
- V. Synthetic oligodeoxyribonucleotides as tools in genetic engineering
- VI. Concluding remarks

---

\*) Dr, Zakład Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań  
Wykaz stosowanych skrótów: cDNA — DNA komplementarny z mRNA, DBM-celuloza — m-dwuzobenzylksymetyloceluloza



## I. Wstęp

Od czasu wyjaśnienia molekularnych podstaw działania kodu genetycznego, w czym nie małą rolę odegrały fragmenty kwasów nukleinowych otrzymanych na drodze chemicznej syntezy (1), notuje się ciągły wzrost udziału tej syntezy przy rozwiązywaniu różnych problemów współczesnej biologii (2). Niemniej jednak dopiero na początku lat siedemdziesiątych, z chwilą wprowadzenia do biologii molekularnej nowych technik eksperymentalnych określanych łączną nazwą inżynierii genetycznej, nastąpił gwałtowny wzrost zapotrzebowania na syntetyczne fragmenty kwasów nukleinowych, a zwłaszcza na fragmenty DNA (3).

Stosowanie w badaniach biologicznych syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów, zamiast fragmentów uzyskiwanych ze źródeł naturalnych, daje wiele korzyści. Syntetyczne fragmenty DNA można otrzymywać jednorazowo w dużych ilościach, w stanie wysoce homogenym i bez zanieczyszczeń innymi związkami biologicznie czynnymi pochodzenia naturalnego, które mogłyby wpływać na wyniki doświadczeń. Jednak największą korzyścią wynikającą ze stosowania syntetycznych fragmentów, jest możliwość precyzyjnego dobierania oligodezoksyrybonukleotydów o różnej sekwencji nukleotydów, różnej długości łańcucha, z wprowadzonymi modyfikowanymi zasadami itp., w zależności od potrzeb, co w konsekwencji pozwala na przeprowadzanie bardziej precyzyjnych eksperymentów, nawet takich, których nie można by wykonać używając tylko fragmentów kwasów nukleinowych dostępnych ze źródeł naturalnych.

## II. Synteza fragmentów DNA

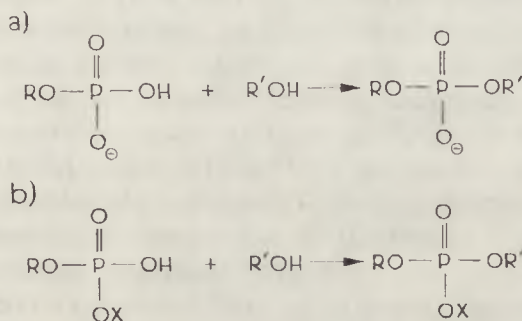
Synteza dwuniciowych fragmentów DNA przebiega w trzech etapach (4):

- chemiczna synteza krótkich, jednoniciowych fragmentów DNA (12-16 nukleotydowych)
- enzymatyczna fosforylacja grupy hydroksylowej na końcu 5' oligonukleotydu za pomocą kinazy polinukleotydowej (E.C. 2.7.1.7.8)
- enzymatyczne łączenie dwóch fragmentów DNA w obecności kompletarnej nici DNA za pomocą DNA-ligazy (E.C. 6.5.1.1.)

W tak otrzymanych fragmentach DNA ponad 90% wszystkich wiązań międzynukleotydowych obecnych w końcowym produkcie jest wytwarzanych na drodze chemicznej. Odzwierciedla to dość dobrze udział pracy typowo chemicznej w ogólnej syntezie DNA.

Chemiczna synteza krótkich fragmentów DNA polega na wytwarzaniu wiązań międzynukleotydowych (3'-5') między kolejnymi nukleotydami drogą aktywacji grupy 3'-fosforanowej jednego nukleotydu i konden-

sacji z grupą 5'-hydroksylową następnego, o odpowiednio zablokowanej grupie 3'. Po każdej kondensacji oligomer wyodrębnia się, oczyszcza od substratów i produktów ubocznych i poddaje następnym kondensacjom, aż do uzyskania oligomeru o pożądanej długości łańcucha. W toku takiej wieloetapowej syntezy wiązania międzynukleotydowe mogą występować w formie fosforodwuestrów (metoda dwuestrowa), (4), lub fosforotrójestrów (metoda trójestrowa) (5).



Ryc. 1. Metoda dwuestrowa (a) i trójestrowa (b) syntezy oligonukleotydów (X — grupa ochronna, R — R' — reszty nukleozydowe)

Mimo, że obie metody są jeszcze stosowane, bardziej obiecującą (i rozwijającą się bardziej dynamicznie) jest metoda trójestrowa, która pozwala na zastąpienie długotrwałych rozdzielów mieszanin poreakcyjnych na wymienniczkach jonowych szybką i efektywną chromatografią na żelu krzemionkowym.

W ostatnich latach czas syntezy oligonukleotydów metodą trójestrową uległ poważnemu skróceniu, dzięki wprowadzeniu do syntezy bardzo reaktywnych czynników kondensujących typu arylosulfonylotetrazoli (6). Czas wytwarzania wiązania międzynukleotydowego zmniejszył się z kilku dni do kilkunastu minut.

Połączenie efektywnych metod wytwarzania wiązań międzynukleotydowych (7) z innymi udoskonaleniami, jak np. nowymi sposobami usuwania grup ochronnych (7, 8) i nowymi technikami rozdzielczymi (9) spowodowało, że pracę która na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych wymagała dużego wysiłku dwudziestu kilku pracowników w ciągu 5 lat obecnie może wykonać jeden pracownik w czasie 3-4 miesięcy.

Bardziej szczegółowe informacje na temat chemicznej syntezy oligonukleotydów można znaleźć w artykułach przeglądowych poświęconych tym zagadnieniom (10, 11).

Mimo tak znacznego postępu chemiczna synteza dużych fragmentów DNA (np. genów strukturalnych) jest ciągle zadaniem bardzo pracochłon-

nym<sup>\*)</sup>. Prawdopodobnie metod chemicznych nie da się zastąpić analogiczną syntezą enzymatyczną, jednak istnieją możliwości stosowania w tych badaniach odpowiednich enzymów polimeryzujących, np. polimerazy DNA (E.C. 2.7.7.7) lub tzw. odwrotnej transkryptazy, które wykorzystują nie DNA jako matrycę w syntezie nici komplementarnej (13-15). Pozwala to na zredukowanie prawie o połowę syntezy chemicznej, gdyż drugą nie komplementarną z syntetyczną, można otrzymać używając krótkiego syntetycznego startera oraz czterech podstawowych dezoksyrybonukleozido-5'-trójfosforanów, w obecności jednego z wyżej wspomnianych enzymów. Koniecznym przy takim podejściu, jest otrzymywanie długich, jednoniciowych fragmentów DNA na drodze syntezy chemicznej lub chemiczno-enzymatycznej. Ten problem wymaga jeszcze pozytywnego rozwiązania doświadczalnego. Duże nadzieje wiąże się obecnie z możliwościami stosowania RNA-ligazy (E.C. 2.7.7.6) (16), która, jak stwierdzono w doświadczeniach z syntetycznymi oligodezoksyrybonukleotydami, może łączyć jednoniciowe fragmenty DNA bez dodania do mieszaniny inkubacyjnej komplementarnej nici DNA (16). Jednakże zadawalające rezultaty udało się dotychczas uzyskać tylko przy łączeniu krótkich oligodezoksyrybonukleotydów ( $T_{12-18}$ ) (17).

Należy w tym miejscu wspomnieć o jeszcze jednym użytecznym enzymie, mianowicie o fosforylaze polinukleotydowej (E.C. 2.7.7.8), która pozwala na stopniowe przyłączanie dezoksyrybonukleotydów do 3' końca startera (minimum trójnukleotydu) (18). Jest to podejście racjonalne, jeśli celem doświadczenia jest otrzymanie z jednego syntetycznego fragmentu wielu pochodnych, różniących się jednym lub dwoma nukleotydami przy końcu 3'. Otrzymywanie tą metodą dłuższych łańcuchów, aczkolwiek możliwe (19, 20), nie wydaje się być specjalnie korzystne z powodu niskich wydajności i pracochłonności syntezy.

I wreszcie ostatnia uwaga dotycząca wykorzystania syntetycznych oligonukleotydów w eksperymentach biologicznych. Ze względu na bardzo precyzyjny charakter niektórych tego rodzaju eksperymentów należy pamiętać, że syntetyczne fragmenty stosowane w badaniach biologicznych muszą być bardzo starannie oczyszczone, najlepiej za pomocą efektywnych metod jonowymiennych (21). Wskazane jest również dodatkowe sprawdzanie homogenności oligonukleotydów po reakcji znakowania końców 5'  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP przez kinazę polinukleotydową. Na etapie tym może bowiem zachodzić degradacja oligonukleotydu na skutek możliwości wystąpienia aktywności endonukleazowej, nawet w tzw. preparatach „kinazy wolnej od nukleaz” (22).

<sup>\*)</sup> W związku ze znacznym postępowaniem w syntezie oligonukleotydów na podłożu polimerowym, pojawiła się ostatnio możliwość mechanizacji całej syntezy (12). Obecnie dostępne są już w handlu aparaty do syntezy oligonukleotydów firm Vega Biochemicals i Bio Logical. Ta ostatnia firma przyjmuje także zlecenia na syntezę oligodezoksyrybonukleotydów o długości do 20 jednostek nukleotydowych.



### III. Zastosowanie jednoniciowych syntetycznych fragmentów DNA

Zastosowanie jednoniciowych fragmentów DNA w badaniach biologicznych opiera się na ich zdolności do rozpoznawania komplementarnych sekwencji w DNA lub w RNA i tworzeniu z nimi podwójnej helisy. Wykazano (23, 24), że trwałe i specyficzne struktury dwuniciowe można otrzymywać już z tak krótkimi fragmentami jak heksanukleotydy. Zaobserwowano także, że oligodezoksyrybonukleotydy oddziałują bardziej specyficznie z DNA niż z RNA (25). Różnica ta wynika prawdopodobnie z większej stabilności niewłaściwie dopasowanych par typu guanozyna-tymidyna niż dezoksyguanozyna-tymidyna (25).

#### III-1. Wykrywanie określonych sekwencji w DNA i w RNA

Podstawowymi etapami na drodze do poznania mechanizmów ekspresji genów, procesów ich regulacji, ewolucji itp., jest zlokalizowanie, a następnie wyizolowanie i poznanie struktury danego fragmentu DNA. Ponieważ możliwość wykrycia i identyfikacji określonego fragmentu DNA ma podstawowe znaczenie w tego typu badaniach, ostatnie lata przyniosły intensywne poszukiwania metod pozwalających na szybką i dokładną lokalizację poszukiwanych sekwencji nukleotydów.

Do wykrywania określonych sekwencji DNA (26, 27) lub RNA (28, 29) w izolowanych preparatach kwasów nukleinowych, lub też do stwierdzenia obecności określonych genów lub określonych sekwencji w klonach bakteryjnych (26, 27) bardzo użytecznymi okazały się syntetyczne oligodezoksyrybonukleotydy o długości 10-20 nukleotydów, które można stosować jako tzw. sondy hybrydacyjne (26).

Aby oligonukleotyd mógł spełniać rolę sondy hybrydacyjnej podaje się go znakowaniu radioaktywnym izotopem fosforu [<sup>32</sup>P], co pozwala na prostą, fotograficzną detekcję miejsca wiązania sondy z badanym DNA lub RNA. Do zwiększenia efektywności hybrydacji badany DNA zwykle wiąże się z azotanem celulozy (30, 31) (wiązanie niekowalencyjne) lub z DBM-celulozą (RNA lub DNA, wiązanie kowalencyjne) (32).

Warunki hybrydacji muszą być bardzo precyzyjnie dobierane (26) aby osiągnąć wysoką czułość wykrywania określonej sekwencji, przy jednoczesnym zachowaniu specyficzności oddziaływań. Kluczową rolę odgrywa temperatura hybrydacji. Prowadzi się ją przeważnie w temperaturze o 15-20°C niższej od temperatury topnienia danej struktury dwuniciowej (dupleksu). Zbyt niska temperatura powoduje obniżenie specyficzności sondy (asocjacja z sekwencjami DNA lub RNA zbliżonymi do komplementarnej), natomiast zbyt wysoka temperatura podwyższa specyficzność hybrydacji lecz znacznie obniża jej efektywność.

Specyficzność danego oligonukleotydu jako sondy hybrydacyjnej zależy od jego długości oraz ilości i miejsca występowania niesparowa-

nych zasad między sondą a badaną sekwencją. Możliwość występowania niesparowanych zasad w obrębie sekwencji do której sonda powinna być w pełni komplementarna bierze się stąd, że do niedawna większość informacji o sekwencjach DNA i RNA pochodziła z rozszyfrowanych sekwencji białek. Na skutek degeneracji kodu genetycznego trzeba się liczyć z faktem, że sekwencja wydedukowana może nie być identyczną z naturalną sekwencją DNA lub RNA. Aby ograniczyć do minimum skutki degeneracji kodu genetycznego wskazane jest stosowanie sond komplementarnych z DNA w obszarze kodującym głównie aminokwasy o pojedynczych kodonach (Met, Trp) lub aminokwasy o najmniej licznych kodonach (Asp, Asn, Cys, His, Phe, Tyr, Glu, Gln, Lys). W tym ostatnim przypadku, mając do wyboru pomiędzy dA i dG lub T i dC, należy wybierać odpowiednio dG i T, co będzie prowadziło do powstawania prawidłowej pary zasad, lub niedopasowanej, aczkolwiek względnie stabilnej, pary dG:T (25, 33).

Ciekawe badania nad wpływem rodzaju i miejsca występowania niesparowanych zasad na stabilność tworzących się dwuniciowych struktur (co ma bezpośredni związek z czułością i specyficnością sond hybrydacyjnych) zostały przeprowadzone przez Wu i wsp. (26). Używając syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów komplementarnych z operatorem laktozowym do hybrydyzacji z różnymi mutantami tego operatora wykazano, że przy dłuższych sondach hybrydacyjnych (pentadekanukleotydy) w pierwszej kolejności na stabilność dwuniciowej struktury ma wpływ rodzaj niesparowanych zasad. Stwierdzono, że występowanie naprzeciw siebie zasad purynowych działa bardziej destabilizująco na taką strukturę, niż obecność pirymidyn lub niedopasowanych par typu puryna-pirymidyna. Przy krótszych sondach (dodekanukleotydy) większy wpływ na stabilność dwuniciowych struktur ma pozycja występowania niedopasowania. Niesparowane zasady działają destabilizująco na sąsiednie, prawidłowo sparowane układy zasad, przez co zmniejsza się efektywna wielkość (ilość całkowicie sparowanych zasad) sondy hybrydacyjnej. Jest rzeczą zrozumiałą, że destabilizujące działanie niesparowanych zasad będzie miało szczególnie duże znaczenie w przypadku krótkich sond hybrydacyjnych, gdy niesparowane zasady będą występowały w środkowej części sondy. Obserwowano także duży wpływ temperatury na specyficzną hybrydyzację. Na przykład, dodekanukleotyd całkowicie komplementarny z operatorem laktozowym, w temperaturze 30°C hybrydował tak samo efektywnie z operatorem szczepu dzikiego (całkowita komplementarność) jak z mutantem różniącym się jedną parą zasad, natomiast w temperaturze 37°C sonda ta hybrydowała wyłącznie z operatorem szczepu dzikiego (26).

Przykładami praktycznego zastosowania syntetycznych sond hybrydacyjnych może być wykrycie wielu specyficznych sekwencji w DNA i w RNA, np. genu cytochromu C drożdży (27, 34), mRNA insuliny I i II szczura (35), gastrynowego mRNA świni (28, 29) i innych (patrz niżej).



Mimo, że krótkie syntetyczne sondy hybrydyzacyjne pozwalają zawsze znaleźć poszukiwaną sekwencję, nie zawsze sondy te są tak specyficzne jak można by tego oczekiwać. Na przykład, jest bardzo mało prawdopodobne, aby specyficzna sekwencja 12-to nukleotydomowa występowała więcej niż jeden raz w genomie drożdży ( $2 \times 10^7$  par zasad), jednakże z badań nad genem cytochromu C drożdży wynika (27, 34), że oligomery o 13 i 15 nukleotydomach użyte jako sondy hybrydyzacyjne asocjują odpowiednio z siedmioma (27) i dwoma (34) fragmentami genomu. Świadczy to o oddziaływaniu sond nie tylko z pożądaną sekwencją nukleotydomów, ale także z sekwencjami zbliżonymi. Podobna analiza bardziej złożonego materiału genetycznego, np. ssaków (wielkość unikalnej sekwencji DNA wzrasta do około 16 nukleotydomów) narzuca konieczność stosowania dłuższych sond hybrydyzacyjnych (ok. 20 nukleotydomów). Przy tak długich sondach mogą wystąpić trudności z takim wydedukowaniem odpowiedniej sekwencji sondy z sekwencji aminokwasów, która mogłaby zapewnić możliwie małą liczbę niesparowanych zasad między sondą a badanym DNA (RNA). Rozwiązaniem tych trudności, w przypadku poszukiwania określonych sekwencji nukleotydomowych w tzw. „banku genów”, może być użycie dwóch krótszych sond hybrydyzacyjnych, dla których prawidłową sekwencję jest łatwiej dobrać i wybranie tych klonów z którymi hybrydują obie sondy. Jeszcze innym rozwiązaniem może być poszukiwanie nowych wektorów klonujących (36) typu bakteriofagów używanych do sporządzania banku genów. Wektory, które dają większą liczbę fagów w łyśinkach niż np. powszechnie stosowany fag  $\lambda$ , powodują wzrost efektywności hybrydyzacji<sup>\*)</sup>, co umożliwi stosowanie krótkich sond hybrydyzacyjnych.

### III-2. Specyficzne startery enzymów polimeryzujących kwasy nukleinowe

Syntetyczne oligonukleotydy zhybrydizowane z DNA lub z RNA mogą służyć nie tylko jako sondy wskazujące na obecność określonych sekwencji nukleotydomów w badanym kwasie nukleinowym, ale także jako specyficzne startery (primery) dla takich enzymów polimeryzujących jak polimeraza DNA lub odwrotna transkryptaza (rewertaza).

Specyficzne startery znalazły szerokie zastosowanie w biologii molekularnej, szczególnie w syntezie dłuższych fragmentów DNA lub cDNA. Synteza ta jest punktem wyjścia w poznaniu sekwencji badanego DNA (RNA) (33, 37, 38), do klonowania określonych sekwencji DNA otrzymanych z mRNA (35, 39), lub wykrywania komplementarnych sekwencji z dużo większą czułością niż pozwalają na to krótkie sondy hybrydyzacyjne (29, 35).

<sup>\*)</sup> Na przykład, fag M13 (36) wytwarza łyśinki zawierające do  $10^9$  cząsteczek faga, przez co hybrydyzacja (*plaque hybridization*) jest około 100 krotnie wydajniejsza niż w przypadku użycia faga  $\lambda$ .



Do oznaczenia sekwencji nukleotydów nieznanego DNA wymagany jest specyficzny starter na każde 200-250 nukleotydów badanej cząsteczki (40). Rodzaj startera (jego sekwencję) dobiera się na podstawie znanej sekwencji aminokwasów białka, które dany fragment koduje (33, 37, 41), lub na podstawie znanej sekwencji RNA (34, 42) lub DNA (43, 44) w pobliżu badanego regionu. Jako fragmenty o znanej sekwencji (które spełniają zarazem rolę punktów odniesienia przy dalszym oznaczaniu sekwencji nukleotydów) wykorzystuje się często sekwencje rozpoznawane przez enzym restrykcyjny w DNA, a jako startery — fragmenty restrykcyjne badanego DNA (45-47). Jest to bardzo dogodne podejście ze względu na stosunkowo łatwe uzyskiwanie fragmentów restrykcyjnych DNA. Ponieważ jednak, rozpoczynając analizę sekwencji od jednego startera, można określić sekwencję do około 250 nukleotydów, to w przypadku braku dodatkowych miejsc restrykcyjnych w badanym fragmencie cząsteczki DNA jedyną możliwością poznania dalszych sekwencji tego fragmentu jest użycie syntetycznego startera, komplementarnego z badanym DNA w odległości około 200 nukleotydów od miejsca restrykcyjnego.

Ustalanie sekwencji nukleotydów w DNA z użyciem starterów bardzo ułatwiło stwierdzenie możliwości prowadzenia reakcji wydłużania startera w obecności drugiej, komplementarnej nici DNA (48), co nie wymaga, kłopotliwego niekiedy, izolowania jednej tylko nici DNA. Zwykle badany DNA poddaje się jedynie denaturacji termicznej i w takiej formie używa jako matrycy dla startera. Postępowanie takie zastosowano z powodzeniem do oznaczenia sekwencji nukleotydów w genach izo-1-cytochromu C (48) i izo-2-cytochromu C (49) drożdży.

Wprowadzenie w 1977 roku przez Gronenberga i Messinga (50) jednoniciowego DNA faga M13mp2 jako wektora klonującego stworzyło jednocześnie możliwość szybkiego oznaczania sekwencji nukleotydów w DNA z użyciem tzw. uniwersalnego startera (51). Jako startera użyto fragmentu restrykcyjnego EcoRI/AluI, komplementarnego do DNA faga w pobliżu miejsca EcoRI, które służyło do wszczepiania badanego fragmentu DNA. Jedyną wadą tego podejścia była zbyt duża wielkość startera (93 lub 96 nukleotydów) (51, 52), który był przynajmniej cztery razy za długi niż to było potrzebne, aby oddziaływanie z matrycowym DNA faga było specyficzne. Ponieważ długość oznaczanej sekwencji DNA ograniczona jest przede wszystkim zdolnością rozdzielczą metod chromatograficznych i elektroforetycznych stosowanych przy ustalaniu sekwencji nukleotydów, użycie długich starterów automatycznie redukuje wielkość oznaczanej sekwencji nieznaną. Zastosowanie w takich przypadkach syntetycznych starterów daje wyraźne korzyści. Na przykład, syntetyczny starter o długości 30 nukleotydów (53) pozwala wydłużyć realnie poznawaną sekwencję o około 70 nukleotydów, a nonadekanukleotyd (54), o jeszcze dalsze 10-15 nukleotydów. Wprowadzenie dodatkowych modyfikacji do wektora M13mp2 (54), a w szczególności nowych miejsc

restrykcyjnych w pobliżu miejsca EcoRI, pozwoli na wszczepianie do faga innych niż EcoRI fragmentów restrykcyjnych, co w konsekwencji umożliwi ustalanie ich sekwencji nukleotydowych, używając tylko jednego syntetycznego startera.

Synteza cDNA pozwalająca na badanie i klonowanie dowolnego genu, dla którego dostępny jest mRNA, stanowi inny przykład zastosowań syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów jako starterów. Po raz pierwszy syntetyczny starter zastosowano przy klonowaniu genu proinsuliny szczurzej (39). Wykorzystując znajomość dwóch nukleotydów poprzedzających sekwencję poli-A w mRNA proinsuliny, do otrzymania cDNA użyto jako startera oligonukleotydu  $dT_6GC$ . Podobne postępowanie zastosowano przy otrzymywaniu cDNA insuliny I i II szczura (35), stosując jednocześnie otrzymany cDNA jako czułą sondę hybrydyzacyjną przy selekcji transformowanych bakterii metodą Grunsteina-Hognesa (55).

Krótkie syntetyczne oligodezoksyrybonukleotydy okazały się bardzo specyficznymi starterami. Badając inicjację odwrotnej transkrypcji mRNA hormonu wzrostowego stwierdzono, że spośród 15 oligonukleotydów o sekwencjach  $dT_6N$  ( $N = A, C, G$ ) i  $dT_6NN'$  ( $N' = A, G, C, T$ ), tylko dwa, a mianowicie  $dT_6G$  i  $dT_6GC$ , działały jako efektywne startery (56). Z powyższego wynika, że w przypadkach niemożności dokonania jednoznacznego wyboru sekwencji nukleotydowej startera (np. gdy sekwencja nukleotydowa mRNA została wydedukowana z sekwencji aminokwasów odpowiedniego fragmentu białka) zamiast jednego startera można używać mieszaninę oligodezoksyrybonukleotydów o sekwencjach odpowiadających wszystkim kombinacjom wynikającym z kodu genetycznego. Takie podejście z powodzeniem zastosowano przy syntezie cDNA interferonu ludzkiego (57), używając 24 syntetycznych dodekanukleotydów<sup>\*</sup>). Dalszymi przykładami zastosowań syntetycznych starterów są np. inny sposób syntezy cDNA interferonu ludzkiego (58)<sup>\*\*</sup>), synteza cDNA owoalbuminy (59) i inne (60, 61).

Synteza cDNA jest stosunkowo prosta, gdy matrycowym kwasem nukleinowym jest np. mRNA różnych globin wchodzących w skład hemo-

<sup>\*</sup>) Wszystkie te oligonukleotydy podzielono na 6 grup, po 4 oligomery w każdej. Oligonukleotydy będące w jednej grupie otrzymywane były w jednym cyklu syntetycznym i używane jako startery w formie mieszanin. Powyższe 6 grup oligonukleotydów otrzymano przez kondensację dwóch grup heksanukleotydów (zawierających po dwa heksamery różniące się sekwencjami nukleotydów przy końcach 5') z trzema grupami heksanukleotydów (zawierających po dwa heksamery różniące się sekwencjami nukleotydów przy końcach 3').

<sup>\*\*</sup>) W tym przypadku, w odróżnieniu od (57), oznaczono najpierw fragment sekwencji nukleotydowej mRNA interferonu z jego końca 5' korzystając z dwóch syntetycznych starterów. Na podstawie tak poznanej sekwencji fragmentu mRNA syntetyzowano starter, który posłużył do syntezy całego cDNA interferonu ludzkiego.



globiny, mRNA owoalbuminy, lekkiego łańcucha immunoglobiny lub im podobne mRNA, które są główną frakcją mRNA znajdującą się w wytwarzającej te białka komórce, a więc ich wydzielanie i oczyszczanie nie przedstawia większych trudności. W większości jednak przypadków poszukiwany mRNA stanowi jedynie ułamek procenta z ogólnej puli mRNA komórki, co wymaga stosowania specjalnych metod jego wykrywania i oczyszczania. Zwykle w tym celu stosuje się bezkomórkowy układ translacyjny w połączeniu z testem radioimmunologicznym wykrywającym specyficzne białko kodowane przez dany mRNA (62). Podejście takie nie może być jednak stosowane do badania tych mRNA, które kodują białka podlegające modyfikacji po zakończeniu translacji. W takich przypadkach dobre rezultaty może dawać użycie syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów jako sond hybrydacyjnych i specyficznych starterów. Na przykład, aby wykryć gastrynowy mRNA, który stanowi 0,005% całkowitego ekstraktu RNA lub 0,6% puli poliadenylowanego mRNA, zastosowano syntetyczne oligonukleotydy o długościach 8, 12 i 15 nukleotydów (28, 29). Syntetyczne sondy umożliwiły nie tylko ilościowe oznaczenie badanego mRNA w puli RNA, ale także pozwoliły na specyficzną odwrotną transkrypcję gastrynowego mRNA bez wydzielania go z ogólnej puli mRNA. Wszystkie trzy sondy okazały się specyficznymi starterami, mimo znacznych różnic w ich optymalnych temperaturach hybrydacji (oktanukleotyd 4°C, dodeka- i pentadekanukleotyd 37°C). Interesującym było także stwierdzenie, że np. dodekamer, mimo że hybrydował specyficznie tylko z jednym fragmentem mRNA, użyty jako starter odwrotnej transkryptazy inicjował specyficznie syntezę dwóch różnych cDNA (29). Takie zjawisko świadczy prawdopodobnie o stabilizującym wpływie odwrotnej transkryptazy (lub) i warunków procesu transkrypcji, na trwałość tworzących się kompleksów starter-mRNA.

### III-3. Ukierunkowana mutageneza

Posiadanie różnych mutantów punktowych w badanym obszarze DNA pozwala często na bardzo precyzyjne przypisanie funkcji określonemu odcinkowi DNA. Mimo opracowania wielu użytecznych metod indukowania takiej ukierunkowanej mutagenezy (63, 64) żadna z nich nie pozwala na otrzymywanie mutacji punktowych w dowolnym miejscu DNA, ani też na wywoływanie wszystkich znanych typów mutacji.

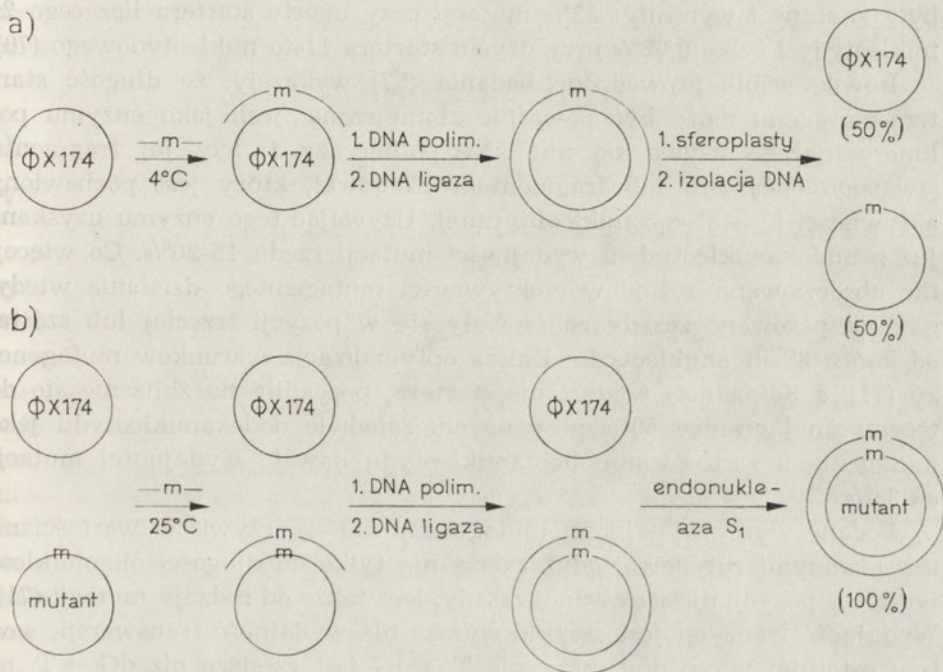
W zasadzie jedynym mutagenem \*) zdolnym do spełnienia wszystkich tych funkcji jest oligonukleotyd o odpowiedniej sekwencji (65). Badania stabilności krótkich struktur helikalnych DNA zawierających niesparo-

\*) Termin „mutagen” rozumiany jest tu bardzo szeroko jako każdy czynnik indukujący mutację.



wane zasady wykazały, że mimo mniejszej stabilności tych niecałkowicie dopasowanych struktur są one wystarczająco trwałe, aby służyć jako precyzyjne mutageny (25). Główną zaletą syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów jako potencjalnych mutagenów jest możliwość dokładnego wprowadzania mutacji do dowolnej sekwencji DNA, jak również możliwość indukowania wszystkich typów mutacji: tranzycji (66), transwersji (67), insercji (68) i delecji (69).

Badania z zastosowaniem bakteriofaga  $\Phi X 174$  w pełni potwierdziły przydatność oligonukleotydów jako potencjalnych mutagenów. Metoda tak ukierunkowanej mutagenyzy polega w dużym skrócie na dobudowie komplementarnej nici do matrycowego DNA faga z użyciem odpowiedniego oligonukleotydu, pełniącego funkcję startera i jednocześnie mutagenu (ryc. 2). Sekwencję takiego startera dobiera się w ten sposób, aby był w pełni komplementarny z DNA faga, z wyjątkiem miejsca, które



Ryc. 2. Ukierunkowana mutagenyza z użyciem syntetycznego oligonukleotydu jako mutagenu (— m —) (a) i metoda selekcji DNA mutantu (b)

ma podlegać mutacji (66). Ponieważ forma dojrziała faga  $\Phi X 174$  zawiera jednoniciowy kolisty DNA, forma dwuniciowa powstała przez wydłużenie syntetycznego startera-mutagenu odpowiada formie replikatywnej faga. W związku z obecnością w dwuniciowej formie faga niedopasowania, którego rodzaj zależy od sekwencji nukleotydowej startera-mutagenu i determinuje rodzaj mutacji, można się spodziewać, że po namno-

zeniu faga np. w sferoplastach *E. coli*, stosunek potomnych fagów szczepu dzikiego i mutantu będzie jak 1:1.

Praktycznie, wydajności mutagenozy są zwykle niższe od teoretycznej wartości 50% i zależą od wielu czynników, wśród których bardzo ważną rolę odgrywa długość użytego startera-mutagenu oraz pozycja niesparowanej zasady w sekwencji nukleotydu startera (70). Początkowo uzyskane wyniki zdawały się sugerować, że ze względu na obecność 5' → 3' i 3' → 5' egzonukleolitycznej aktywności DNA-polimerazy I (E.C. 2.7.7.7) używanej do wydłużania startera-mutagenu, niesparowane zasady (miejsce mutacji) powinny znajdować się w odległości około 10-ciu zasad od końca 3' i tyleż mniej więcej zasad od końca 5' oligomeru (70), co zmuszało do stosowania oligonukleotydów-mutagenów o długości około 20 nukleotydów. Doświadczalnie stwierdzone różnice w efektywności mutagennego działania oligonukleotydów w zależności od ich długości (niesparowane zasady występowały w środkowej części oligonukleotydów) były znaczne i wynosiły: 32% mutacji przy użyciu startera liczącego 23 nukleotydy i tylko 0,02% przy użyciu startera 11-to nukleotydu (70).

Równocześnie prowadzone badania (67) wykazały, że długość startera-mutagenu może być poważnie zmniejszona, jeśli jako enzymu polimeryzującego używa się nie DNA-polimerazy I, lecz jej fragmentu (zwanego enzymem lub fragmentem Klenowa), który jest pozbawiony aktywności 5' → 3' egzonukleolitycznej. Używając tego enzymu uzyskano już z undekanukleotydem wydajności mutacji rzędu 15-20%. Co więcej, nie obserwowano różnic w efektywności mutagennego działania wtedy, gdy niesparowane zasady znajdowały się w pozycji trzeciej lub szóstej od końca 3' oligonukleotydu. Dalsza optymalizacja warunków mutagenozy (71), a dokładniej wydłużanie startera, pozwoliła na zbliżenie się do teoretycznej granicy 50% przy użyciu zaledwie dodekanukleotydu jako mutagenu, a zastosowanie heptanukleotydu dawało wydajności mutacji aż 39%.

Podane wyżej wydajności mutagenozy nie są oczywiście wartościami uzyskiwanymi rutynowo, gdyż zależą nie tylko od długości oligonukleotydu, czy pozycji niesparowanej zasady, lecz także od rodzaju mutacji (71). Wydajność tranzycji jest zwykle wyższa niż wydajność transwersji, a w tym ostatnim przypadku, przejście T → dG jest częstsze niż dG → T.

Jeżeli mutacja punktowa prowadzi do zmian fenotypowych, nowe cechy mogą być podstawą wykrywania i selekcji mutantów (67, 72). Często zdarza się jednak, że mutacje punktowe nie powodują zmian fenotypowych (67), co utrudnia lub wręcz uniemożliwia wykrycie mutantów. W takich przypadkach niezwykle cenną jest metoda selekcji *in vitro* zmutowanego DNA (73) z mieszaniny z DNA szczepu dzikiego. Metoda ta opiera się na różnicy w stabilności struktur dwuniciowych dopasowanych całkowicie lub częściowo. Różnice te są nadszpodziewanie duże i wyrażają się obniżeniem temperatury topnienia struktury dwuniciowej aż o 10-15°C



w przypadku obecności jednej niedopasowanej pary zasad w strukturze dwuniciowej zawierającej od 11 do 17 par zasad (73, 74).

Omawiana metoda selekcji mutantów (ryc. 2) jest równie prosta jak efektywna (69, 73). Polega ona na wykorzystaniu oligonukleotydu-mutagenu jako startera do inicjacji syntezy DNA w mieszaninie zawierającej DNA szczepu dzikiego i mutanta. Mieszaninę taką otrzymuje się np. po wyizolowaniu DNA faga poddanego mutagenie i namnożonego w sferoplastach *E. coli*. Reakcję wydłużania startera prowadzi się jednak w wyższej temperaturze niż podczas omawianej uprzednio mutageny, co powoduje wybiórcze oddziaływanie syntetycznego oligonukleotydu z DNA mutantu (struktura całkowicie komplementarna). Po zakończeniu syntezy komplementarnej nici i zamknięciu powstałych dwuniciowych łańcuchów w formy koliste za pomocą DNA-ligazy, mieszaninę traktuje się endonukleazą S1 (E.C. 3.1.4.x), która degradowuje obecny w mieszaninie jednociowy DNA, a więc głównie DNA szczepu dzikiego. Powtarzając dwukrotnie cykl operacji: wzbogacanie — namnażanie, można otrzymać preparat zawierający prawie wyłącznie DNA mutantu (69, 73).

#### IV. Zastosowanie dwuniciowych syntetycznych fragmentów DNA

##### IV-1. Syntetyczne geny

Wykorzystanie dwuniciowych fragmentów DNA do syntezy genów było jednym z pierwszych zastosowań chemicznej syntezy w badaniach struktury i funkcji genów. Mimo, że syntetyczne geny dotychczas otrzymane mają swoje odpowiedniki wśród genów naturalnych, to jednak istnieje podstawowa różnica leżąca u podstaw chemicznej syntezy i syntezy DNA zachodzącej w żywych organizmach. Chemiczna synteza genów jest tworzeniem nowej informacji genetycznej, która może, lecz nie musi mieć swego odpowiednika w naturze, natomiast synteza genów jaka zachodzi *in vivo*, jest jedynie powielaniem (jeśli pominąć mutacje i rekombinacje) istniejącej już informacji genetycznej. W konsekwencji stosowanie syntetycznych fragmentów DNA jako podstawowych cegiełek w konstruowaniu genów stwarza możliwość wprowadzania różnych zmian do syntetyzowanych genów. Szczególnie użyteczne są takie modyfikacje, które nie powodując zmian znaczenia informacji genetycznej, ułatwiają pracę z syntetycznym genem. Typowym przykładem takiego działania jest wprowadzanie dodatkowych miejsc restrykcyjnych do sekwencji kodującej (dzięki zjawisku degeneracji kodu genetycznego). Temu podobne modyfikacje naturalnego genu przy planowaniu jego syntetycznego odpowiednika zwiększają potencjał badawczy biologicznych funkcji danego genu (75, 76).

Otrzymanie pierwszego syntetycznego genu w 1970 roku w laboratorium Khorany (77) było wielkim sukcesem chemii i enzymologii.



Niestety, po testach biologicznych, na skutek braku w genie odpowiednich sygnałowych sekwencji transkrypcji okazało się, że polimeraza RNA zamiast oczekiwanego produktu transkrypcji genu (tRNA alaninowego) wytwarzała jedynie niewielkie ilości RNA, będącego wynikiem niespecyficznego inicjacji i terminacji transkrypcji.

Pierwszym syntetycznym fragmentem DNA wykazującym pełną aktywność biologiczną był operator laktozowy (78). Wykazanie biologicznej aktywności polegało na stwierdzeniu *in vivo* specyficznego oddziaływania tego DNA z represorem laktozowym. W tym celu syntetyczny gen wszczepiono do plazmidu pMB9 i przeprowadzono transformację kompetentnych komórek *E. coli*. Ponieważ plazmid pMB9 może występować w komórkach *E. coli* w ilości 10-20 cząsteczek na jedną komórkę, natomiast represora laktozowego — białka, które specyficznie oddziałuje z operatorem jest w komórce o połowę mniej, należało się spodziewać, że w przypadku wykazywania przez syntetyczny operator biologicznej aktywności będzie następowało wychwytywanie represora przez nadmiar sekwencji syntetycznego operatora. Wynikiem takiego oddziaływania powinna być derepresja chromosomalnego operonu laktozowego, przejawiająca się m.in. konstytutywną syntezą  $\beta$ -galaktozydazy. Takie zjawisko rzeczywiście zaobserwowano, co w połączeniu z izolacją plazmidu zawierającego operator laktozowy z kolonii bakteryjnych produkujących konstytutywnie  $\beta$ -galaktozydazę stanowiło przekonujący dowód na przejaw biologicznej aktywności syntetycznego fragmentu DNA (78).

Następnym genem biologicznie aktywnym był gen somatostatyny. W tym przypadku podstawą testu biologicznego było stwierdzenie obecności somatostatyny (lub białka hybrydowego zawierającego fragment somatostatynowy) w komórkach *E. coli* transformowanych plazmidem zawierającym syntetyczny gen tego polipeptydu. Wykrycie nowego produktu białkowego w komórkach bakteryjnych świadczyło jednoznacznie o zachodzeniu prawidłowej transkrypcji i translacji syntetycznego genu (79).

Wykazanie biologicznej aktywności syntetycznych genów (78, 79) było nie tylko doświadczalnym potwierdzeniem założeń i teorii leżących u podstaw biologii molekularnej, lecz otworzyło również drogę do praktycznych zastosowań wynikających z otrzymania i klonowania syntetycznych genów, m.in. do syntezy biologicznie aktywnych substancji metodami inżynierii genetycznej. Dotychczas wprowadzając do bakterii syntetyczne geny udało się otrzymać szczepy produkujące następujące polipeptydy: somatostatynę (79), insulinę ludzką (80), N<sup>a</sup>-dezacetylotymozynę  $\alpha_1$  (81), bradykininę (82), enkefalinę (83), ludzki interferon (84)\*) i ludzki hormon wzrostowy (85). W tym ostatnim przypadku zastosowano bardzo

\*) Gen interferonu ludzkiego, liczący 514 par zasad jest najdłuższym dotychczas otrzymanym syntetycznym genem. Badania nad konstrukcją szczepów bakteryjnych produkujących interferon na podstawie tego genu są w toku.

interesujące połączenie metod chemicznych i enzymatycznych i otrzymano gen, którego początek (sekwencja odpowiadająca pierwszemu 24 aminokwasom) został otrzymany chemicznie, natomiast pozostała część pochodziła z klonowanego cDNA.

W ostatnim dziesięcioleciu otrzymano jeszcze wiele innych syntetycznych genów, których synteza torowała drogę metodom chemicznym w biologii molekularnej. Wymienić tu należy syntezę fragmentu genu łańcucha A insuliny wołowej (86), genu S-peptydu rybonukleazy trzustkowej A (87), genu ludzkiego hormonu angiotensyny II (88), genu hormonu GIP (*Gastric Inhibitory Polypeptide*) (89), syntezę fragmentu DNA kodującego polipeptyd poli (Asp-Phe) (90), oraz syntezę pełnego genu (wraz z promotorem i terminatorem) tyrozynowego tRNA z drożdży (4).

#### IV-2. Badanie oddziaływań białko — DNA

Podstawowe funkcje jakie spełniają kwasy nukleinowe w żywych organizmach wiążą się z ich zdolnościami do specyficznego oddziaływania z białkami. Zrozumiałym więc jest, że do jednych z najbardziej podstawowych problemów biologii molekularnej należy zrozumienie tych oddziaływań, które leżą u podstaw budowy różnych nukleoproteidów (np. chromosomów, wirusów, rybosomów), jak również odgrywają kluczową rolę w dynamicznych procesach, w których udział biorą kwasy nukleinowe i białka (np. konformacyjne zmiany w rybosomach podczas biosyntezy białka, oddziaływanie tRNA z aminoacylosyntetazami, reakcje represora z operatorem, polimerazy RNA z promotorami itp.).

Odcinki DNA, z którymi oddziałują białka w procesach dynamicznych są zwykle krótkie, rzędu kilkunastu do kilkudziesięciu par zasad, co stwarza możliwość intensywnego korzystania w tego rodzaju badaniach z syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów.

W ostatnim dziesięcioleciu badacze skupili największą uwagę na układzie operator-represor laktozowy, który był układem najlepiej poznanym pod względem biochemicznym i genetycznym (7, 92, 93). Oprócz chemicznej syntezy operatora laktozowego (7, 94, 95), pierwszego syntetycznego fragmentu DNA, którego aktywność biologiczną wykazano *in vivo* (77), przeprowadzono syntezę wielu analogów tego operatora (7, 95, 97, 98). Dzięki nim, a szczególnie tym, do których wprowadzono zmodyfikowane zasady (7, 95, 97), zlokalizowano tzw. „miejsca kontaktowe” układu operator-represor, co jest pierwszym krokiem na drodze do zrozumienia molekularnych podstaw oddziaływania białko-DNA (96).

Dzięki użyciu syntetycznych fragmentów udało się także określić minimalną długość operatora laktozowego (98). Stosując oligodezoksyrybonukleotydy o różnej długości oraz posługując się testem biologicznej aktywności jakim jest oddziaływanie z represorem, precyzyjnie określo-



no udział różnych par zasad operatora w jego oddziaływaniu z represorem (98). Było to ważne zarówno ze względów poznawczych (lokalizacja miejsc oddziaływania z represorem), jak również praktycznych (np. synteza mini-operatora dla potrzeb inżynierii genetycznej).

Dość dobrze zdefiniowanymi z punktu widzenia chemicznego są również układy promotor-polimeraza RNA. Częściowa znajomość I-rzędowej struktury polimerazy RNA z *E. coli* (E.C. 2.7.7.6) (99) oraz poznanie sekwencji nukleotydowych wielu promotorów bakteryjnych i wirusowych (100), stwarzają podstawy do szczegółowych badań nad oddziaływaniem polimerazy RNA z różnymi promotorami (101, 102).

Obecnie oddziaływania te są dość dobrze poznane w ogólnych zarysach (102) dzięki badaniom biochemicznym i genetycznym. Wydaje się natomiast, że dla uzyskania precyzyjnych ustaleń potrzebne są bardziej różnorodne substraty niż te, które można pozyskiwać ze źródeł naturalnych. Substratów takich, a więc różnych analogów promotorów różniących się od promotorów naturalnych delecjami, insertami, obecnością zmodyfikowanych zasad itp., może dostarczyć chemiczna synteza. Dotychczas przeprowadzono syntezę zaledwie kilku naturalnych promotorów (101, 103, 104). Badania oddziaływań polimerazy RNA z promotorami bardzo komplikuje fakt, że ten sam enzym (polimeraza RNA) rozpoznaje wiele znacznie różniących się między sobą sekwencji DNA (promotory). Przez porównanie wszystkich dotychczas poznanych promotorów ustalono sekwencję nukleotydową tzw. promotora idealnego (105), będącego niejako ich pierwowzorem. Ponieważ jest mało prawdopodobne, aby taki promotor występował w przyrodzie, podjęto próbę jego syntezy (106), jako użytecznego modelu badania oddziaływań polimeraza RNA-promotor. Promotor taki, jeśli rzeczywiście charakteryzowałby się wyjątkowo silnym oddziaływaniem z polimerazą RNA mógłby znaleźć praktyczne zastosowanie w inżynierii genetycznej, np. do podwyższania efektywności ekspresji różnych syntetycznych lub naturalnych genów.

W ostatnich latach, w związku z intensywnym rozwojem inżynierii genetycznej, wzrosło także zainteresowanie enzymami restrykcyjnymi (107) (endonukleazy restrykcyjne lub w skrócie, restryktazy), które są powszechnie stosowane przy otrzymywaniu różnych zrekombinowanych cząsteczek DNA. Enzymy te rozpoznają określone sekwencje DNA (o długości 4-6 i więcej par zasad) i powodują specyficzne rozszczepianie wiązań międzynukleotydowych w obu niciach DNA. Badania przeprowadzone na syntetycznym, dwuniciowym, samokomplementarnym oktanukleotydzie (dTGAATTCA) zawierającym sekwencję rozpoznawaną przez restryktazę EcoRI wykazały, że oktanukleotydowa struktura dwuniciowa jest substratem zarówno enzymu restrykcyjnego jak i odpowiedniej metylazy (108). Zaobserwowano jednak, że mimo zachowania specyficzności co do rejonu przecinania nici DNA, powinowactwo enzymu do oktanukleotydu jest dużo niższe niż do analogicznej sekwencji występującej w



natywnym DNA wirusa SV40 (108). Świadczy to o zachodzeniu dodatkowych oddziaływań z sekwencjami otaczającymi miejsce restrykcyjne, które nie wpływają na specyficzność działania enzymu, lecz na jego efektywność, tzn. szybkość cięcia przez enzym restrykcyjny tych samych sekwencji nukleotydowych lecz występujących w otoczeniu sekwencji różniących się między sobą (109, 110).

W ostatnich latach zapoczątkowano zatem bardziej szczegółowe badania nad znaczeniem sekwencji sąsiadujących z miejscami restrykcyjnymi w procesie restrykcji (111-114). Umieszczając sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne w różnych miejscach syntetycznych oligonukleotydów otrzymano różne struktury dwuniciowe, które testowano jako substraty odpowiednich restryktaz. Okazało się, że wymagania enzymów restrykcyjnych w stosunku do długości struktur dwuniciowych oraz miejsca usytuowania rozpoznawanych przez nie sekwencji nukleotydowych, są bardzo różne dla różnych restryktaz (111, 112, 114). Na przykład, dla restryktazy EcoRI wystarcza, jeśli sekwencja nukleotydowa rozpoznawana przez ten enzym posiada tylko jeden dodatkowy nukleotyd na jednym z końców struktury dwuniciowej, natomiast restryktaza HindIII nie rozszczepia charakterystycznej dla siebie sekwencji nawet jeśli otoczona jest z obu stron heksanukleotydami. Przypuszcza się, że enzym ten wymaga do działania obecności sekwencji nukleotydowej o długości odpowiadającej przynajmniej dwóm skrętom helisy DNA (114).

## V. Zastosowanie syntetycznych oligodezoksurybonukleotydów w inżynierii genetycznej

Wszczepianie fragmentów DNA naturalnych lub syntetycznych do plazmidowego lub wirusowego DNA (wektorowy DNA) jest kluczowym etapem w procesie wprowadzania nowej informacji genetycznej do żywych organizmów metodami inżynierii genetycznej.

Najczęściej stosowanym podejściem wyjściowym jest trawienie wektorowego i badanego DNA za pomocą takiego samego enzymu restrykcyjnego (115, 116), co powoduje powstawanie jednoniciowych, wzajemnie komplementarnych końcówek (tzw. lepkich końców) w obu rodzajach DNA. Po zmieszaniu tych dwóch rodzajów DNA, w obecności DNA-ligazy, następuje ich specyficzne połączenie z wytworzeniem hybrydowego DNA (wektorowy DNA + wszczepiony fragment), który może być wprowadzony do kompetentnych komórek bakteryjnych.

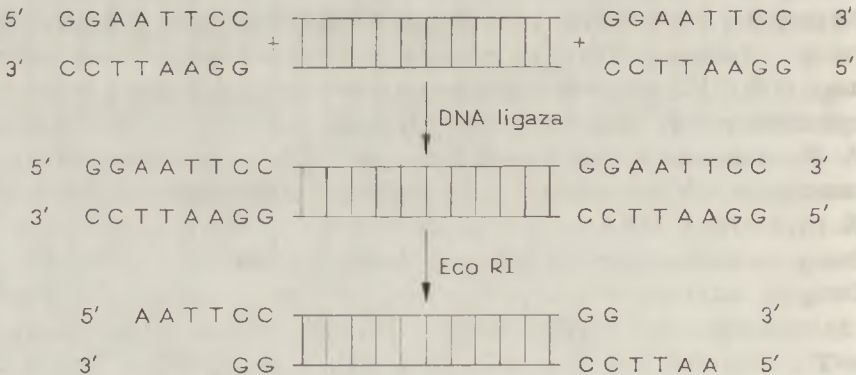
Drugim, alternatywnym podejściem, jest enzymatyczne wprowadzanie do wszczepianego i wektorowego DNA, jako 3'-końcowych sekwencji, oligo-T i oligo-dA lub oligo-dC i oligo-dG, które spełniają analogiczną rolę jak lepkie końce wytwarzane przez enzymy restrykcyjne (117).

Z obu metod, zdecydowanie prostszą i wygodniejszą jest metoda sto-

sująca enzymy restrykcyjne i to zarówno jeśli chodzi o wszczepianie badanego DNA do wektora, jak i o późniejsze nim operowanie (np. powrotne wycinanie badanego DNA z wektora). Mimo niewątpliwych zalet podejście to miało pewne ograniczenie: konieczna obecność odpowiednich miejsc restrykcyjnych w badanym DNA limitowała zarówno rodzaj jak i rozmiar wszczepianego DNA. Ograniczenie to dotyczyło również syntetycznych fragmentów DNA, które aczkolwiek można wyposażać w dowolne lepkie końce, to jednak raz zsyntetyzowane, mogły być wszczepiane tylko w jedno miejsce do wektora, określone sekwencją lepkich końców. W przypadku konieczności np. klonowania takiego fragmentu w innym miejscu plazmidu, należało syntetyzować nowe końcowe fragmenty i powtarzać proces ligowania całego syntetycznego fragmentu z jego komponentów.

W przewycięzeniu tych ograniczeń bardzo pomocne okazały się syntetyczne fragmenty DNA, za pomocą których można wprowadzać do dowolnego DNA sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez restryktazy (118). W skrócie, metoda wytwarzania miejsc restrykcyjnych polega na przyłączeniu za pomocą DNA-ligazy syntetycznego dwuniciowego fragmentu (zwykle samokomplementarny okta- lub dekanukleotyd) zawierającego sekwencję rozpoznawaną przez wybrany enzym restrykcyjny, do fragmentu DNA, który ma być wszczepiony do wektora. Po trawieniu produktów reakcji odpowiednią restryktazą otrzymuje się ten fragment DNA przedłużony z obu stron sekwencjami łączników z lepkiemi końcami (ryc. 3).

Stosując różne syntetyczne oligodezoksyrybonukleotydy (nazywane łącznikami lub adaptorami) można wytwarzać dowolne lepkie końce, odpowiadające różnym enzymom restrykcyjnym (118, 119). Łatwość wytwarzania lepkich końców stwarza dodatkowe możliwości przyłączania do fragmentu DNA poddawanego klonowaniu innych sekwencji DNA (np. operatora laktozowego) pozwalających na łatwiejsze wykrywanie i oczysz-



Ryc. 3. Metoda wytwarzania „lepkich końców” za pomocą syntetycznych oligonukleotydów i enzymu restrykcyjnego

czenie hybrydowego plazmidu zawierającego badany DNA (118). Do zalet tej metody należy również możliwość wytwarzania różnych lepkich końców za pomocą jednego tylko syntetycznego oligonukleotydu. Na przykład, dekanukleotyd dCCGGATCCGG (118) w formie dwuniciowej zawiera sekwencje rozpoznawane przez endonukleazy BamI (GGATCC), HpaII (CCGG), MboI (GATC), a po dimeryzacji, także sekwencję dla HaeIII (GGCC).

Opisana metoda została ostatnio ulepszona. Wprowadzenie tzw. asymetrycznych łączników \*) (120, 121), które nie wymagają trawienia restryktazami oraz adaptorów pozwalających na zmianę jednych lepkich końców na inne (120) uczyniły metodę tę jeszcze bardziej przydatną.

Przykładami wykorzystania w biologii molekularnej metody wytwarzania lepkich końców za pomocą syntetycznych oligodezoksyrybonukleotydów, mogą być m.in. prace nad operatorem laktozowym (118, 122), badania genów insulin szczurzych (123), genu  $\beta$ -endorfiny (124) i inne (125).

Celem różnych zabiegów polegających na wszczepianiu określonych fragmentów DNA do plazmidowego lub wirusowego DNA może być klonowanie danego fragmentu lub badanie jego ekspresji. W tym drugim przypadku informacja genetyczna zawarta w badanym fragmencie DNA musi ulegać transkrypcji i translacji. Ponieważ w inicjacji transkrypcji wykorzystuje się zwykle promotory znajdujące się w wektorowym DNA (116) może się zdarzyć, że kodony mRNA transkrybowanego z wszczepionego DNA będą w procesie translacji odczytywane z przesunięciem fazowym  $n+1$  lub  $n+2$ . Dla skorygowania tych możliwych przesunięć fazowych postanowiono wykorzystać syntetyczne oligonukleotydy o długościach  $n+1$  i  $n+2$  (gdzie  $n$  jest liczbą podzielną przez 3), które oprócz tej funkcji mogłyby pełnić zarazem rolę łączników i sygnałów startowych translacji (54). Fragmenty takie, nazywane adaptorami startowymi, zawierają sekwencję nukleotydową rozpoznawaną przez określony enzym restrykcyjny + dodatkowy nukleotyd (0,1 lub 2) + kodon inicjujący ATG. Oprócz takich adaptorów, syntetyzowano także: adaptory stopu (54) (kodon terminujący + sekwencja rozpoznawana przez restryktazę), adaptory zawierające tzw. sekwencję Shine-Dalgarno, odpowiedzialną za oddziaływanie mRNA z rybosomami (54) oraz adaptory do „przycinania” DNA po klonowaniu (*retrieving adaptor*) (54). Ten ostatni adaptor jest specyficznym łącznikiem zawierającym sekwencję nukleotydową rozpoznawaną przez restryktazy MboI lub HpnI, które rozszczepiają dwuniciowy DNA w odległości 8 par zasad od miejsca rozpoznawania. Użycie takich adaptorów posiadających oprócz sekwencji MboI lub HpnI zmienną ilość nukleotydów od 1 do 7 pozwala po ich przyłączeniu i trawieniu odpowied-

\*) Asymetryczne łączniki są dwuniciowymi oligonukleotydami o niejednakowej długości obu nici. Jedna strona takiego łącznika posiada równo zakończone nici, natomiast druga — gotowe lepkie końce.



nią restryktazą usunąć z badanego DNA od 7 do 1 pary zasad (54). Postępowanie takie może być użyte np. do usunięcia zbędnych końcowych fragmentów obecnych w DNA po klonowaniu.

## VI. Uwagi końcowe

Opisane powyżej przykłady zastosowania syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej wskazują, że połączenie chemicznej syntezy z różnymi metodami genetycznymi i biochemicznymi jest niezwykle użyteczne przy rozwiązywaniu różnych problemów współczesnej biologii. Chemiczna synteza fragmentów kwasów nukleinowych o dowolnych sekwencjach nukleotydowych dostarcza biologii coraz bardziej precyzyjnych narzędzi i metod badawczych. Z drugiej strony biologia molekularna, stawiając coraz to nowe i ważniejsze problemy do rozwiązania, stymuluje dalsze badania nad podniesieniem efektywności chemicznej syntezy fragmentów kwasów nukleinowych. Należy także wspomnieć, że bardzo istotną korzyścią jaką chemia może czerpać z biologii molekularnej jest możliwość powielania syntetycznych fragmentów DNA. Raz zsyntetyzowana sekwencja nukleotydowa może być bowiem klonowana np. w bakteriach i namnażana *in vivo* w dużych ilościach, służąc do dalszych badań.

Powyższy przegląd nie wyczerpuje oczywiście wszystkich zastosowań syntetycznych fragmentów DNA. Do ciekawszych zastosowań, które nie zostały omówione w niniejszym artykule zaliczyć można wykorzystanie syntetycznych fragmentów DNA w selektywnej inhibicji replikacji niektórych wirusów (126, 127), w badaniach topografii rybosomów (128) i inne (128, 129).

Te różnorodne i szerokie zastosowania \*) są świadectwem, że przy obecnym stanie rozwoju metod chemicznej syntezy polinukleotydów jedynym ograniczeniem w stosowaniu syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej jest tylko nasza wyobraźnia.

Zaakceptowano do druku 9.12.1981

## PIŚMIENNICTWO

1. Khorana H. G., (1968), *Biochem. J.*, **109**, 709—725.
2. Prokofiev M. A., Shabarova Z. A. (1978), *Mol. Biol.*, **12**, 245—259.
3. Itakura K., Riggs A. D., (1980), *Science*, **209**, 1401—1405.

\*) Już po napisaniu niniejszego artykułu ukazały się dalsze prace dotyczące zastosowań syntetycznych oligonukleotydów jako sond hybrydacyjnych (130), starterów do klonowania DNA (131), ustalania sekwencji nukleotydowych DNA i RNA (131, 132, 133), jako mutagenów w ukierunkowanej mutagenezie (134) oraz sonda do badania specyficzności przecinania i łączenia (*splicing*) RNA (135).

4. Khorana H. G., (1979), *Science*, **203**, 614—625.
5. Letsinger R. L., Ogilvie K. K., (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4801—4803.
6. Stawiński J., Hozumi T., Narang S. A., (1976), *Can. J. Chem.*, **54**, 670—672.
7. Stawiński J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 353—372.
8. Adamiak R. W., Biała E., Grześkowiak K., Kraszewski A., Kierzek R., Markiewicz W. T., Wiewiórowski M., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3397—3408.
9. Hsiung H. M., Brousseau R., Michniewicz J., Narang S. A., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 1371—1385.
10. Amarnath V., Broom A. D., (1977), *Chem. Rev.*, **77**, 183—217.
11. Reese C. B., (1978), *Tetrahedron*, **34**, 3143—3179.
12. Duckworth M. L., Gait M. J., Goelet P., Hohg G. F., Singh M., Timas R. C., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 1691—1706.
13. Richardson C. C., Inman R. B., Kornberg A., (1964), *J. Mol. Biol.*, **9**, 46—58.
14. Wu R., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 501—521.
15. Kacian D. L., Spigelman S., (1974), *Methods in Enzymology*, **29E**, 150—164.
16. Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3009—3013.
17. Snopek T. J., Sugino A., Agarwal K. L., Cozzarelli N. R., (1976), *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **68**, 417—424.
18. Gillam S., Smith M., (1972), *Nature New Biol.*, **238**, 233—234.
19. Gillam S., Rottman F., Jahnke P., Smith M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 96—100.
20. Gillam S., Jahnke P., Smith M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2532—2539.
21. Gillam S., Smith M., (1980), *Methods in Enzymology*, **65**, 687—701.
22. Loewen P. C., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3133—3141.
23. Astel C. R., Doel M. T., Jahnke P., Smith M., (1973), *Biochem.*, **12**, 5068—5074.
24. Doel M. T., Smith M., (1973), *FEBS Lett.*, **34**, 99—102.
25. Gillam S., Waterman K., Smith M., (1975), *Nucl. Acids Res.*, **2**, 625—634.
26. Szostak J. W., Stiles J. I., Tye B. K., Chin P., Sherman F., Wu R., (1979), *Methods in Enzymology*, **68**, 419—428.
27. Montgomery D. L., Hall B. D., Gillam S., Smith M., (1978), *Cell*, **14**, 673—680.
28. Mevareck M., Noyes B. E., Agarwal K. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7472—7475.
29. Noyes B. E., Mevareck M., Stein R., Agarwal K. L., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1770—1774.
30. Benton W. D., Davis R. W., (1977), *Science*, **196**, 180—182.
31. Southern E. M., (1975), *J. Mol. Biol.*, **98**, 503—517.
32. Alwine J., Kemp D., Stark G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5350—5354.
33. Wu R., (1972), *Nature New Biol.*, **236**, 198—200.
34. Szostak J. W., Stiles J. I., Bahl C. P., Wu R., (1977), *Nature*, **265**, 61—63.
35. Chan S. J., Noyes B. E., Agarwal K. L., Steiner D. F., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5036—5040.

36. Gronenberg B., Messing J., (1978), *Nature*, **272**, 375—377.
37. Sanger F., Coulson A. R., Kossel H., Fischer D., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1209—1213.
38. Sanger F., Coulson A. R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **94**, 441—448.
39. Villa-Komaroff L., Efstratiadis A. E., Broome S., Lomedico P., Tizard R., Naber S. P., Chic W. L., Gilbert W., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3727—3731.
40. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463—5467.
41. Schott H., Fischer D., Kossel H., (1973), *Biochem.*, **12**, 3447—3453.
42. Loewen P. C., Khorana H. G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3489—3499.
43. Sekiya T., Khorana H. G., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2978—2982.
44. Bambara R., Wu R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4607—4618.
45. Maniatis T., Ptashne M., Barrel B. G., Donelson J., (1974), *Nature*, **250**, 394—399.
46. Sanger F., Air G. M., Barrel B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchinsin III C. A., Slocombe P. M., Smith M., (1977), *Nature*, **265**, 687—695.
47. Brown N. L., Smith M., (1977), *Nature*, **265**, 695—698.
48. Smith M., Leung D. W., Gillam S., Astell C. R., Montgomery D. L., Hall B. D., (1979), *Cell*, **16**, 753—763.
49. Montgomery D. L., Leung D. W., Smith M., Shalit P., Faye G., Hall B. D., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3642—3646.
50. Messing J., Gronenberg B., Müller-Hill B., Hofschneider P. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3642—3646.
51. Heidecker G., Messing J., Gronenberg B., (1980), *Gene*, **10**, 69—73.
52. Schreier P. H., Cortese R., (1979), *J. Mol. Biol.*, **129**, 169—172.
53. Anderson S., Gait M. J., Moyol L., Young I. G., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 1731—1743.
54. Narang S. A., Brousseau R., Hsiung H. M., Sung W., Scarpulla R., Ghangas G., Lau L., Hess B., Wu R., (1980), *Nucl. Acids Res. Sym. Ser.*, **7**, 377—385.
55. Grunstein M., Hogness D. S., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3961—3965.
56. Sasavage N. L., Smith M., Gillam S., Astell C., Nilson J. H., Rotman F., (1980), *Biochem.*, **19**, 1737—1743.
57. Goeddel D. V., Shepard H. M., Yelverton E., Leung D., Crea R., Slana A., Pestka S., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4057—4074.
58. Houghton M., Stewart A. G., Doel S. M., Emtage J. S., Faton M. A. W., Smith J. C., Patel P. T., Levis H. M., Porter A. G., Birch J. R., Cartwright T., Carey N. H., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 1913—1931.
- 58a. Houghton M., Stewart A. G., Doel S. M., Emtage J. S., Faton M. A. W., Smith J. C., Patel P. T., Lewis H. M., Porter A. G., Birch J. R., Cartwright T., Carey N. H., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 2885—2893.
59. Cheng C. C., Brownlee G. G., Carey H. H., Doel M. T., Gillam S., Smith M., (1976), *J. Mol. Biol.*, **107**, 527—547.
60. Hamlyn P. H., Gillam S., Smith M., Longley J. I., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 1123—1134.
61. Praudfoot N. J., Gillam S., Smith M., Longley J. I., (1977), *Cell*, **11**, 807—818.



62. Dugnid J. R., Steiner D. F., Chic W. L., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 5324—5328.
63. Weissmann C., Nagata S., Taniguchi T., Weber H., Meyer F., (1979), w *Genetic Engineering. Principles and Methods*, eds. Setlow J. K., and Hollaender A., vol. 1, str. 133—150, Plenum, New York.
64. Salganic R. I., Dianov G. B., Ovchinnikova L. P., Voronona E. N., Kokoza E. B., Maxin A. V., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2796—2800.
65. Lederberg J., (1960), *Science*, **131**, 269—276.
66. Hutchinson III C. A., Philips S., Edgell M. H., Gillam S., Jahnke P., Smith M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6551—6560.
67. Gillam S., Jahnke P., Astell C., Philips S., Hutchinson III C. A., Smith M., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 2973—2985.
68. Heffron F., So M., McCarthy B. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6012—6016.
69. Gillam S., Astell C., Smith M., (1980), *Gene*, **12**, 129—137.
70. Razin A., Hirose T., Itakura K., Riggs A. D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4268—4272.
71. Gillam S., Smith M., (1979), *Gene*, **8**, 81—97.
72. Brown N. L., Smith M., (1977), *J. Mol. Biol.*, **116**, 1—28.
73. Gillam S., Smith M., (1979), *Gene*, **8**, 99—106.
74. Wallace R. B., Shaffer J., Murphy R. F., Bonner J., Hirose T., Itakura K., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 3543—3557.
75. Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5765—5761.
76. Sung W. L., Hsiung H. M., Brousseau R., Michniewocz J., Wu R., Narang S. A., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **7**, 2199—2212.
77. Agarwal K. L., Buchi H., Caruthers M. H., Gupta N., Khorana H. G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U. L., van de Sande J. H., Sgaramella V., Weber H., Yamada T., (1970), *Nature*, **227**, 27—34.
78. Marians K. J., Wu R., Stawiński J., Hozumi T., Narang S. A., (1976), *Nature*, **263**, 744—748.
79. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W., (1977), *Science*, **198**, 1056—1063.
80. Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 106—110.
81. Wetzel R., Heyneker H. L., Goeddel D. V., Jhrani P., Shapiro J., Crea R., Low T. L. K., McClure J. E., Thurman G. B., Goldstein A. L., (1980), *Biochem.*, **19**, 6096—7104.
82. Dobrynin N. V., Korobko V. G., Severtsova I. V., Boldyreva E. F., Chernov B. K., Kolosov M. N., (1979), *Bioorg. Khim.*, **5**, 776—778.
83. Sverdlov E. D., Dolganov G. M., Monastyrskaya G. S., Khodkova E. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F., (1979), *Bioorg. Khim.*, **5**, 1112—1115.
84. Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F., (1981), *Nature*, **292**, 756—762.
85. Goeddel D. V., Heyneker H. L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D. G., Ross M. J., Miozarii G., Crea R., Seeburg P. H., (1979), *Nature*, **281**, 544—548.

86. Narang S. A., Dheer S. K., (1969), *Biochem.*, **8**, 3443—3451.
87. Harvey C. L., Olson K., de Czekala A., Nussbaum A. L., (1975), *Nucl. Acids Res.*, **2**, 2007—2020.
88. Köster H., Blöcker H., Frank R., Genssenhaimer G., Kaiser W., (1975), *Hoope Seylers Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1585—1593.
89. Horn T., Vasser M. P., Struble M. E., Crea R., (1980), *Nucl. Acids Res. Sym. Ser.*, **7**, 225—232.
90. Doel M. T., Eaton M., Cook E. A., Lewis H., Patel T., Carey N. H., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4575—4592.
91. Riggs A. D., Bourgeois S., Cohen M., (1970). *J. Mol. Biol.*, **53**, 401—421.
92. Gilbert W., Maxam A., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3581—3584.
93. Bourgeois S., Pfah M., (1976), *Adv. Prot. Chem.*, **30**, 1—99.
94. Itakura K., Katagiri N., Narang S. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4592—4600.
95. Goeddel D. V., Yansura D. G., Caruthers M. H., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3039—3054.
96. Goeddel D. V., Yansura D. G., Caruthers M. H., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3578—3582.
97. Fisher E. F., Caruthers M. H., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **7**, 401—416.
98. Bahl C. P., Wu R., Stawiński J., Narang S. A., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 966—970.
99. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V., Khokhrykov V. S., Shuvaeva T. M., (1977), *FEBS Lett.*, **76**, 108—111.
- 99a. Marchenko T. V., Modyanov N. N., Lipkin V. M., Ovchinnikov Yu. A., (1980), *Bioorg. Khim.*, **6**, 325—331.
100. Gilbert W., (1976), w RNA Polymerase, eds. Losick R., and Chamberlin M., str. 193—205, Cold Spring Harbour Laboratory.
101. Brown E. L., Belagaja R., Fritz H. J., Fritz R. H., Norris K., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 732.
102. Pribnov D., (1979), w Biological Regulation and Development, vol. 1. Gene Expression, ed. Goldberger R. F., str. 219—277 Plenum Press, New York.
- 103a. Ovchinnikov Yu. V., Efimov V. A., Chakhmakhcheva O. G., (1979), *FEBS Lett.*, **100**, 341—346.
103. Ovchinnikov Yu. V., Efimov V. A., Chakhmakhcheva O. G., (1979), *Bioorg. Khim.*, **5**, 1782—1792.
104. Belagaje R., Brown E. L., Fritz H. J., Gait M. J., Lees R. G., Norris K. E., Sekiya T., Takeya T., Conterors R., Kupper H., Ryan M. J., Khorana H. G., (1978), w Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides, ed. Herman R. E., str. 1—20, Academic Press, New York.
105. Scherer G. E. F., Walkinshaw M. D., Arnott S., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 3759—3773.
106. Dobrynin V. N., Korobko V. G., Svartsova I. V., Bystrov N. S., Churpilo S. A., Kolosov M. N., (1980), *Nucl. Acids Res. Sym. Ser.*, **7**, 365—376.
107. Roberts R. J., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, r63—80.
108. Greene P. J., Poonian M. C., Nussbaum A. I., Tobias L., Garfin D. E., Boyer H. W., Goodman H. M., (1975), *J. Mol. Biol.*, **99**, 237—261.
109. Thomas M., Davis R. W., (1975), *J. Mol. Biol.*, **97**, 315—328.
110. Forsblom S., Rigler R., Ehrenberg M., Petterson U., Philipson L., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3255—3269

111. Baumstark B. R., Roberts R. J., RajBhandary U. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8943—8950.
112. Berlin Yu. A., Zvonok N. M., (1980), *Bioorg. Khim.*, **6**, 141—143.
113. Berlin Yu. A., Zvonok N. M., Kayushin A. L., (1980), *Bioorg. Khim.*, **6**, 1182—1195.
114. Berlin Yu. A., Zvonok N. M., Chuvoilo S. A., (1980), *Bioorg. Khim.*, **6**, 1522—1535.
115. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Helling R. B., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3240—3244.
116. Helinski D. R., (1977), w *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*, ed. Hollaender A., str. 19—49, Plenum Publishing Corporation, New York.
117. Jackson D. A., Symons R. H., Berg P., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2904—2908.
118. Bahl C. P., Marians K. J., Wu R., Stawiński J., Narang S. A., (1976), *Gene*, **1**, 81—92.
119. Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K., (1977), *Science*, **196**, 177—180.
120. Bahl C. P., Wu R., Brousseau R., Sood A. K., Hsiung H. M., Narang S. A., (1978), *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **81**, 695—703.
121. Norris K. E., Iserntant D., Contreras R., Fiers W., (1979), *Gene*, **7**, 355—362.
122. Heyneker H. L., Shine J., Goodman H. M., Boyer H. W., Rosenberg J., Dickerson R. E., Narang S. A., Itakura K., Lin S., Riggs A. D., (1976), *Nature*, **263**, 748—752.
123. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischler E., Rutter W. J., Goodman H. M., (1977), *Science*, **196**, 1313—1319.
124. Shine J., Feltes I., Lau N. C. Y., Roberts J. L., Baxter J. D., (1980), *Nature*, **258**, 456—461.
125. Scheller R. H., Thomas T. L., Lee A. S., Klein W. H., Niles W. D., Britten R. J., Davidson E. H., (1977), *Science*, **196**, 197—200.
126. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 280—284.
127. Stridh S., Öberg B., Chattopadhyaya J., Josephson S., (1981), *Antiviral Res.*, w druku.
128. Krinietski E. Yu., Ivanovskaja M. G., Drutsa V. L., Purmal A. A., Sokolova M. I., Shabarova Z. A., Prokofiev M. A., (1979), *Doklady AN ZSRR*, **247**, 752—754.
129. Shabarova Z. A., (1980), *Nucl. Acids Res. Sym. Ser.*, **7**, 259—279.
130. Wallace R. B., Johnson M. J., Hirose T., Miyake T., Kawashima E. H., Itakura K., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 879—894.
131. Winter G., Fields S., Gait M. J., Brownlee G. G., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 237—245.
132. Messing J., Crea R., Seeburg P. H., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 309—321.
133. Kitamura N., Semler B. L., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler Ch. J., Dorner A. J., Emini E. A., Hanecak R., Lee J. J., van der Werf S., Anderson C. W., Wimmer E., (1981), *Nature*, **291**, 547—553.
134. Wallace R. S., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Itakura K., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3647—3656.
135. Tabok M. F., van der Laan J., Osinge K. A., Schauten J. P., van Boom J. H., Veeneman G. H., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 4475—4483.



- 111. Barmann, J. ...
- 112. Barmann, J. ...
- 113. Barmann, J. ...
- 114. Barmann, J. ...
- 115. Barmann, J. ...
- 116. Barmann, J. ...
- 117. Barmann, J. ...
- 118. Barmann, J. ...
- 119. Barmann, J. ...
- 120. Barmann, J. ...
- 121. Barmann, J. ...
- 122. Barmann, J. ...
- 123. Barmann, J. ...
- 124. Barmann, J. ...
- 125. Barmann, J. ...
- 126. Barmann, J. ...
- 127. Barmann, J. ...
- 128. Barmann, J. ...
- 129. Barmann, J. ...
- 130. Barmann, J. ...
- 131. Barmann, J. ...
- 132. Barmann, J. ...
- 133. Barmann, J. ...
- 134. Barmann, J. ...
- 135. Barmann, J. ...
- 136. Barmann, J. ...
- 137. Barmann, J. ...
- 138. Barmann, J. ...
- 139. Barmann, J. ...
- 140. Barmann, J. ...
- 141. Barmann, J. ...
- 142. Barmann, J. ...
- 143. Barmann, J. ...
- 144. Barmann, J. ...
- 145. Barmann, J. ...
- 146. Barmann, J. ...
- 147. Barmann, J. ...
- 148. Barmann, J. ...
- 149. Barmann, J. ...
- 150. Barmann, J. ...
- 151. Barmann, J. ...
- 152. Barmann, J. ...
- 153. Barmann, J. ...
- 154. Barmann, J. ...
- 155. Barmann, J. ...
- 156. Barmann, J. ...
- 157. Barmann, J. ...
- 158. Barmann, J. ...
- 159. Barmann, J. ...
- 160. Barmann, J. ...
- 161. Barmann, J. ...
- 162. Barmann, J. ...
- 163. Barmann, J. ...
- 164. Barmann, J. ...
- 165. Barmann, J. ...
- 166. Barmann, J. ...
- 167. Barmann, J. ...
- 168. Barmann, J. ...
- 169. Barmann, J. ...
- 170. Barmann, J. ...
- 171. Barmann, J. ...
- 172. Barmann, J. ...
- 173. Barmann, J. ...
- 174. Barmann, J. ...
- 175. Barmann, J. ...
- 176. Barmann, J. ...
- 177. Barmann, J. ...
- 178. Barmann, J. ...
- 179. Barmann, J. ...
- 180. Barmann, J. ...
- 181. Barmann, J. ...
- 182. Barmann, J. ...
- 183. Barmann, J. ...
- 184. Barmann, J. ...
- 185. Barmann, J. ...
- 186. Barmann, J. ...
- 187. Barmann, J. ...
- 188. Barmann, J. ...
- 189. Barmann, J. ...
- 190. Barmann, J. ...
- 191. Barmann, J. ...
- 192. Barmann, J. ...
- 193. Barmann, J. ...
- 194. Barmann, J. ...
- 195. Barmann, J. ...
- 196. Barmann, J. ...
- 197. Barmann, J. ...
- 198. Barmann, J. ...
- 199. Barmann, J. ...
- 200. Barmann, J. ...

RYSZARD FARBISZEWSKI \*), HALINA GABRYEL \*\*)

## Polipeptydowe czynniki wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych

### Polypeptide Growth Factors of Normal and Neoplastic Cells

*Spis treści:*

- I. Wstęp
- II. Naskórkowy czynnik wzrostu
- III. Czynnik przysadkowy
- IV. Czynniki wzrostowe pochodzące z płytek
- V. Czynniki wzrostowe pochodzące z komórek śródbłonkowych
- VI. Czynnik wzrostowy komórek nerwowych
- VII. Czynniki wzrostowe zależne od hormonów wzrostu — somatomedyny i czynniki wzrostu podobne do insuliny
- VIII. Czynniki wzrostu wytwarzane przez komórki transformowane i nowotworowe
- IX. Uwagi końcowe

*Contents:*

- I. Introduction
- II. Epidermal growth factor (EGF)
- III. Fibroblast growth factor (FGF)
- IV. Platelet-derived growth factors (PDGFs)

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

Wykaz stosowanych skrótów: EGF (*epidermal growth factor*) — naskórkowy czynnik wzrostu; FGF (*fibroblast growth factor*) — czynnik przysadkowy; PDGFs (*platelet-derived growth factors*) — czynniki wzrostowe pochodzące z płytek; NGF (*nerve growth factor*) — czynnik wzrostowy komórek nerwowych; SM — somatomedyny; SM-A — somatomedyna A; SM-C — somatomedyna C; IGF (*insulin-like growth factor*) — czynnik wzrostowy o działaniu podobnym do insuliny = NSLA (*nonsuppressible insulin-like activity*); MSA (*multiplication stimulating activity*) — aktywność stymulująca mnożenie komórek; SGFs (*sarcoma growth factors*) — czynniki wzrostu komórek mięsaka; TGFs (*transforming growth factors*) — transformujące czynniki wzrostu; cAMP — cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; CSF (*colony stimulating factor*) — czynnik pobudzający wzrost kolonii granulocytów; MSV — wirus mięsaka myszy; 3T3 — linia fibroblastów mysich; BHK — linia fibroblastów nerki noworodka chomika syryjskiego.

- V. Endothelial growth factors
- VI. Nerve growth factor (NGF)
- VII. Growth hormon-dependent growth factors — somatomedins and insulin-like growth factors
- VIII. Growth factors produced by transformed and neoplastic cells
- IX. Concluding remarks

## I. Wstęp

Wzrost komórek zwierzęcych *in vitro* uzależniony jest od dostarczenia im składników pokarmowych, a także pewnych czynników polipeptydowych zawartych w surowicy krwi. Prawidłowe komórki rosną w płynnej hodowli w obecności czynników polipeptydowych wyłącznie jednowarstwowo na dnie naczynia; nie rosną zaś w pożywkach z półpłynnych żeli agarowych, mimo obecności w nich czynników wzrostowych zawartych w surowicy. Komórki nowotworowe i stransformowane onkogenicznie, przeciwnie, zdolne są w tych warunkach do wzrostu i tworzenia kolonii. Nie dotyczy to wzrostu klonalnego granulocytów, które rosną na szkle w systemie agarowym i wymagają swoistego stymulatora, jakim jest czynnik klonotwórczy CSF (*colony stimulating factory*).

Przez termin wzrost komórek rozumie się zwiększenie ilości składników komórkowych (wzrost masy) i mnożenie się komórek, tj. zwiększenie się liczbowe populacji. O biochemicznych czynnikach regulujących wzrost fibroblastów hodowanych *in vitro* traktuje praca pogładowa Bańkowskiego (1) a niektóre peptydy izolowane z surowicy opisał w 1978 r. Sudoł w Postęпах Biologii Komórki (2).

W niniejszym artykule omówiono ważniejsze, niezbędne dla wzrostu komórek prawidłowych, czynniki peptydowe, ich charakterystykę i pochodzenie oraz przedstawiono hipotetyczne mechanizmy ich oddziaływania na komórki. Szybki postęp badań w ostatnich latach, szczególnie nad polipeptydowymi czynnikami wytwarzanymi i uwalnianymi do środowiska przez komórki nowotworowe i stransformowane onkogenicznie, świadczy o wadze omawianego zagadnienia i skłonił nas do dokonania przeglądu osiągnięć w tej dziedzinie.

## II. Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF — Epidermal Growth Factor)

Jednym z dokładniej poznanych peptydowych czynników wzrostu jest występujący w osoczu, a wyizolowany po raz pierwszy przez Cohena w 1962 roku z gruczołów podszczękowych myszy, naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) (3). Czynnik ten w stężeniu  $10^{-11}$ — $10^{-10}$ M, tj. w stężeniu występującym w surowicy, swoiście pobudza *in vitro* proliferację i keratynizację komórek nabłonkowych pochodzących ze zwierząt



różnych gatunków (4—7). Cohen wykazał, że EGF podawany nowonarodzonym myszom powodował przedwczesne otwieranie oczu i wyrzanie zębów (3).

Masa cząsteczkowa EGF wynosi 6045 daltonów; zbudowany jest on z 53 aminokwasów, których sekwencja została określona (4). Charakter kwaśny nadają cząsteczki wchodzące w jej skład aminokwasy dwukarboksylowe. Trzy mostki dwusiarczkowe między resztkami cysteiny wpływają na swoiste pofałdowanie pojedynczego łańcucha polipeptydowego, którego konformacja określona metodą dichroizmu kołowego w świetle UV, jest w przeważającym stopniu niehelikalna. *In vivo* dwie cząsteczki EGF połączone są z dwiema cząsteczkami białka, z których każda ma masę 29 000 daltonów (8).

Bardzo podobną strukturę wykazuje polipeptydowy inhibitor wydzielania soku żołądkowego, który nazwano urogastryną (9, 10).

EGF z gruczołów podszczękowych myszy, zależnie od wielkości dawki, stymuluje syntezę DNA (wzrost włączania tymidyny) oraz syntezę białka (wzrost włączania znakowanej proliny do białek i proteoglikanów) w synchronizowanych hodowlach fibroblastów, pochodzących ze zdrowej ludzkiej tkanki łącznej dziąseł. EGF dodany w stężeniu 10 ng/ml hodowli komórkowej stymuluje po 48 godzinach inkubacji włącznie [<sup>14</sup>C] — proliny do białek komórkowych w 82% w porównaniu z hodowlą kontrolną (11). Wnioskowano, że proces ten nie przebiega poprzez wzmożoną syntezę prostaglandyn, ponieważ aspiryna i indometacyna, zastosowane w badanym układzie doświadczalnym, nie hamują działania EGF (11).

Pobudzenie włączania tymidyny do fibroblastów ludzkich przez EGF obniża interferon, przy czym maksymalne zmniejszenie inkorporacji zaobserwowano wówczas, gdy komórki poddane najpierw działaniu interferonu, a następnie EGF (12). Interferon, zwiększając glikozylację białek błonowych (13) wywołuje zmiany we właściwościach błony plazmatycznej, objawiające się m.in. wzmożeniem ekspresji antygenowej komórki (14, 15). Dlatego należy przypuszczać, że obniżenie przez interferon działania czynnika pobudzającego wzrost komórek (EGF) następuje w wyniku zmian w oddziaływaniu czynnika — receptor powierzchniowy komórek (12).

Właściwy mechanizm działania EGF na wzrost komórek pozostaje nadal niewyjaśniony. Najbardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza przedstawiona przez Maxfielda i wsp. (16). Autorzy ci, stosując inhibitory endocytozy, której przebieg obserwowali w komórkach BALB/c 3T3 bogatych w receptory, wykazali, że początkowym etapem działania peptydu na komórkę jest wiązanie go przez receptory powierzchniowe. Podobny mechanizm zaproponowano również w przypadku insuliny i innych hormonów peptydowych (17). Badania autoradiograficzne z zastosowaniem mikroskopu elektronowego potwierdziły, że EGF

wiążąc się z receptorami w obecności jonów wapnia jest gromadzony na powierzchni fibroblastów (18). W wyniku wpuklania się kompleksów w błony plazmatyczne, tworzą się pęcherzyki endocytarne, które zlewają się z lizosomami, tworząc wtórne lizosomy (16).

Podobny mechanizm zakłada się na podstawie badań z zastosowaniem oczyszczonego [<sup>125</sup>J] — EGF z gruczołów podszczękowych myszy i komórek naskórkowego nowotworu linii KB (19). Receptory powierzchniowe tych komórek są ustawicznie syntetyzowane i po interakcji z EGF wpuklane do błon plazmatycznych. Proces ten jest tylko przejściowo stymulowany przez wiązanie EGF z receptorami, przy czym receptory nie ulegają ponownie recyklicacji i nie wracają na powierzchnię błony plazmatycznej.

Należy podkreślić, że komórki pod wpływem oddziaływania wielu różnych czynników z zewnątrz mogą wytwarzać pewne substancje, które mają istotny wpływ na szybkość ich wzrostu. Stwierdzono, że EGF w następstwie interakcji z receptorami zwiększa aktywność dekarboksylazy L-ornityny EC 4.1.1.17 w komórkach naskórkowych myszy; enzym ten katalizuje ważny etap w biosyntezie putrescyny, która w znacznym stopniu reguluje wzrost komórek (20). Sam fakt stymulacji jej syntezy przez EGF może tłumaczyć biologiczną aktywność tego czynnika. Ponadto putrescyna może działać jako endogeny inhibitor transglutaminazy EC 2.3.2.13, katalizującej tworzenie wiązań krzyżowych między grupami ε-aminowymi lizyny polipeptydów i białek (21). Niski poziom tego enzymu a wysoka zawartość putrescyny, powstającej w wyniku interakcji peptyd-receptor, może zmniejszać zdolność oddziaływania czynnika-receptor, a ponadto powodować, że komórki stają się bardziej wrażliwe na EGF, który ulega wiązaniu z receptorami (16).

Przedstawiony powyżej mechanizm działania EGF na wzrost komórek może częściowo tłumaczyć obserwacja, że znacznie większą mitogenną odpowiedź uzyskuje się po dłuższym czasie kontaktu czynnika z komórkami (20 godz.) a jednym z wczesnych wyników reakcji wiązania EGF z receptorami jest indukcja dekarboksylazy ornitynowej, katalizującej wytworzenie putrescyny (20).

Należy podkreślić, że mitogenne działanie EGF ma związek z jego oddziaływaniem z receptorami i nagromadzeniem się na powierzchni komórek. Z chwilą wchłonięcia kompleksu do wnętrza pęcherzyka endocytarnego i degradacji kompleksu komórka przestaje odpowiadać na EGF (16).

Carpenter i wsp. (22) zaobserwowali, że znakowany [<sup>125</sup>J]-EGF nie tylko oddziałuje z błonami komórek nowotworowych linii A-431, lecz także, że fosforyluje on niektóre białka błonowe. Fosforylowane przy udziale [<sup>32</sup>P]-ATP są wyłącznie dwie specyficzne glikoproteiny błon komórkowych o ciężarze cząsteczkowym 170 000 i 150 000 (23). Autorzy wysuwają wniosek, że biochemiczną konsekwencją wytworzenia kompleksu EGF-receptor jest fosforylacja przez kinazę białkową treoniny



zawartej w glikoproteinach (22). Należy jednak mieć na uwadze, że powyższe działanie EGF nie odnosi się wyłącznie do komórek nowotworowych linii A-431, lecz również do prawidłowych fibroblastów ludzkich. Ta swoista odpowiedź komórki, objawiająca się fosforylacją glikoprotein o określonych masach cząsteczkowych może być początkowym sygnałem, który uruchamia zakodowane genetycznie w jądrze komórkowym określone czynności komórki. Na szybkość przekazywania sygnału wywiera wpływ płynność błonowych lipidów komórki (24).

### III. Czynniki przysadkowy (fibroblast growth factor — FGF)

Przysadka mózgowa produkuje czynnik wzrostowy zwany czynnikiem wzrostowym fibroblastów (*fibroblast growth factor* — FGF), którego działanie daje się porównać z działaniem czynników wzrostowych zawartych w surowicy krwi. Tkanka mózgowa zawiera FGF w ilości około czterokrotnie większej niż przysadka, lecz wyodrębnienie tego czynnika z mózgu napotyka na wiele trudności (25—28).

FGF jest polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 13 300, bogatym w lizynę, powstającym w wyniku ograniczonej proteolizy zasadowego białka mieliny (29). Wykazuje on aktywność mitogenną względem fibroblastów linii 3T3 już w stężeniu 0,01 mg/ml. FGF stymuluje transport aminokwasów i nukleotydów, pobudza syntezę DNA, mRNA oraz tworzenie rybosomów, jak również syntezę białka. Pobudza również do dodatkowych podziałów fibroblasty będące w stanie zahamowania kontaktowego. Działanie FGF dotyczy nie tylko fibroblastów, lecz również chondrocytów, komórek nadnerczy, komórek glejowych i endometrialnych (26). Nie wykazuje on wpływu na wzrost komórek nabłonkowych nerki (30). Nie wykazuje również swoistości gatunkowej. W równym stopniu ludzki FGF działa na komórki bydłące, mysie i ludzkie (26). Stwierdzono, że w ciągu 5 min po dodaniu FGF do hodowli komórek Swiss 3T3 obserwowano wzrost fosforylacji błonowego białka o ciężarze cząsteczkowym około 33 000. Fosforylacja tego białka odbywa się przy udziale cyklicznego AMP. Bardzo szybka i specyficzna odpowiedź komórki na mitogen wskazuje, że fosforylacja może być sygnałem inicjującym, prowadzącym do syntezy DNA (31).

### IV. Czynniki wzrostowe pochodzące z płytek krwi

Ludzkie płytki krwi zawierają dwa polipeptydowe czynniki wzrostu, które są uwalniane podczas ich rozpadu w procesie krzepnięcia krwi (32—37a). Jeden z nich jest czynnikiem termostabilnym o ciężarze cząsteczkowym 13 000-16 000 i punkcie izoelektrycznym 9,5-10,2, określa-



ny jest skrótem PGF-1 lub PDGF-1 (*platelet-derived growth factor-1*). Jest to czynnik stymulujący w stężeniach  $10^{-9}$ — $10^{-11}$ M wzrost komórek fibroblastów myszy, komórek mięśni gładkich i komórek glejowych (34). Jego obecność w hodowli nie jest konieczna do wzrostu fibroblastów transformowanych wirusami onkogennymi (38). Rozmieszczenie tego czynnika w płytkach wykryto poprzez wirowanie w gradiencie sacharozy homogenatu płytkowego i rozdział frakcji podkomórkowych. Stwierdzono, że w największej ilości występuje on w alfa-granulach (39).

Czynnik wzrostowy PGF-1 ma cechy biologiczne hormonów polipeptydowych: jest cząsteczką informacyjną, przenoszoną przez krew i działającą w nanogramowych stężeniach na swoiste komórki docelowe. Różni go jednak od innych hormonów polipeptydowych to, że nie występuje w osoczu krwi (32, 33, 35). Czynnik ten występuje w płytkach krwi w postaci utajonej. Nieuszkodzone płytki krwi dodane do hodowli nie stymulują podziałów komórkowych. Dopiero po homogenizacji płytek i zniszczeniu struktur błonowych ujawnia się *in vitro* jego działanie biologiczne lub *in vivo* po uszkodzeniu ściany naczyń i odsłonięciu kolagenu uwalnia się z agregowanych płytek czynnik wzrostowy, który działając na komórki tkanki łącznej pobudza podziały komórkowe (40).

Drugi czynnik mitogeny wyizolowany ostatnio z płytek krwi przez Kepnera i Liptona został zidentyfikowany jako glikoproteina termolabilna, niedializująca przez błony celofanowe, o ciężarze cząsteczkowym około 72 000 i pI 7,8—8,3, zw. PDGF-2 (*platelet-derived growth factor-2*). Jest ona odpowiedzialna za stymulację podziałów komórek nabłonkowych, transformowanych wirusami onkogennymi i czynnikami chemicznymi oraz za pobudzenie do podziałów komórek pochodzących od nowotworów i komórek nowotworowych dobrze dających się hodować *in vitro* (37).

## V. Czynniki wzrostowe pochodzące z komórek śródbłonkowych

Stwierdzono, że komórki śródbłonnów żyły pepowinowej ludzkiej, jak również śródbłonnów aorty małej rosną przy braku niektórych czynników wzrostu (41, 42). Nasunęło to myśl, że komórki te produkują własne czynniki wzrostowe. W rok później wykazano, że polipeptydy pochodzące z tych komórek o ciężarze cząsteczkowym 10 000—30 000 znacznie stymulują włączanie [ $^3$ H]-tymidyny do fibroblastów linii 3T3 i komórek mięśni gładkich (43). Polipeptydy te okazały się termolabilne, nie traciły aktywności podczas inkubacji przez 24 godz. w zakresie pH od 3 do 10 i nie ulegały absorpcji na CM-Sephadex.

Z uwagi na fakt, że komórki śródbłonkowe tworzą pojedynczą warstwę powierzchniową ściany naczyń przypuszcza się, że czynniki wzrostu wytwarzane przez te komórki mogą uczestniczyć w procesie tworzenia nowych naczyń. Uwalniane z komórek śródbłonkowych (44, 45) czynniki

peptydowe pobudzają wzrost i różnicowanie komórek mięśni gładkich.

W warunkach patologicznych, w miejscu uszkodzenia ściany naczyń czynniki wzrostu pochodzenia śródbłonkowego i płytkowego mogą odgrywać istotną rolę w proliferacji komórek i w mechanizmie powstawania aterosklerozy (46, 47).

## VI. Czynniki wzrostowy komórek nerwowych (Nerve growth factor — NGF)

Termin „czynniki wzrostowy komórek nerwowych” (*Nerve growth factor* — NGF) odnosimy do wszystkich polipeptydów, które mają zdolność podtrzymywania *in vitro* wzrostu neuronów współczulnych i czuciowych (48). Peptydy te wzbudzają również rozległe wyrastanie neurytów z komórek nerwowych wrażliwych na NGF.

Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że czynniki wzrostowy komórek nerwowych (NGF) powoduje w neuronach współczulnych i czuciowych mózgu wzrost aktywności kluczowego enzymu biorącego udział w biosyntezie poliamin — dekarboksylazy L-ornityny EC 4.1.1.17 (49). Jednorazowa dożołądkowa dawka 4,68  $\mu\text{g}$  na szczura o wadze 150 g, zwiększa około 7-krotnie tę aktywność po 4,5 godzinach od podania czynnika wzrostu (49).

Pierwsze próby ilościowego oznaczania czynnika wzrostowego komórek nerwowych (NGF) w surowicy zwierząt różnych gatunków napotykały trudności, ponieważ NGF łatwo wiąże się z białkami surowicy, głównie z  $\alpha_2$ -makroglobuliną ( $\alpha_2\text{M}$ ) (50, 51). Wiązanie czynnika z tym białkiem wykazuje małą specyficzność gatunkową; ludzka i końska  $\alpha_2$ -makroglobulina wiążą polipeptydy pochodzące z komórek mysich (52).

## VII. Czynniki wzrostu zależne od hormonu wzrostu — somatomedyny (SM) i czynniki wzrostu podobne do insuliny (IGF)

Somatomedyny są polipeptydowymi czynnikami wzrostu zależnymi od hormonu wzrostu wykazującego działanie w okresie dzieciństwa i dojrzewania (53) („*somato*” — wskazuje na hormonalny związek z somatotropiną). Są to więc mediatory hormonu wzrostu swoiste głównie względem komórek tkanki chrzęstnej.

Omawiane czynniki występują w osoczu krwi w postaci związanej kowalencyjnie ze swoistymi białkami nośnikowymi o ciężarach cząsteczkowych 60 000—150 000. Uważa się, że rola tych białek polega na ochronie czynników wzrostu przed działaniem proteaz uwalnianych z komórek oraz na transporcie do odpowiednich tkanek (54). Pomimo znacznej zdolności wiązania czynników z białkami, tworzenie kompleksów jest od-

wracalne. Całkowitą dysocjację kompleksu można uzyskać po zakwaszeniu osocza do pH 2,3 (55). Somatomedyny izoluje się najczęściej z IV frakcji Cohna. Dotychczas wyizolowano i oczyszczono z osocza ludzkiego 4 somatomedyny określane jako: somatomedyna A (SM-A), somatomedyna C (SM-C) oraz dwa czynniki wzrostu o działaniu podobnym do insuliny, tzw. *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) i *insulin-like growth factor-2* (IGF-2). Efekty metaboliczne dwóch ostatnich czynników są podobne do efektów insuliny. Polipeptydy te wykazują charakter obojętny lub lekko zasadowy, ich ciężary cząsteczkowe wynoszą 7 000—8 000, a pod względem strukturalnym zbliżone są do proinsuliny (56, 57). Są termo- i kwasostabilne, odporne na czynniki denaturujące SDS i mocznik. Określa się je również skrótami nazw angielskich NSILA I i NSILA II (*non-suppressible insulin-like activity I i II*). Wszystkie wyżej wymienione czynniki wywołują mitogenną odpowiedź komórek w hodowli i stymulują włączanie siarczanów do proteoglikanów komórek chrząstki miednicy kurcząt i żeber szczurów.

Somatomedyny wydają się odgrywać szczególnie ważną rolę w rozwoju zarodka i płodu. Hormon wzrostu nie przechodzi z organizmu matki przez barierę łożyska, mimo to płody z niedoborem hormonu wzrostu osiągają prawidłowe rozmiary (58). Ostatnio stwierdzono występowanie somatomedyn również w płynie owodniowym i we krwi pępowinowej (59—64). Tkanki płodowe zawierają specyficzne receptory tych substancji (60). Zjawisko to może sugerować rolę somatomedyn, jako substancji wzrostowych zarodka i płodu.

Do tej grupy czynników należą również peptydy o aktywności stymu-

Tabela 1

Własności biologiczne czynnika wzrostu MSA, wyizolowanego z hodowli komórek wątroby płodowej szczurów (65)

	Włączanie [ <sup>3</sup> H]-tymidyny do DNA fibroblastów zarodków kurcząt Liczba imp./ płytkę × 10 <sup>-3</sup>	Wzrost fibroblastów zarodków kurcząt Liczba komórek/ płytkę × 10 <sup>-5</sup>	Włączanie [ <sup>35</sup> S] siarczanów do komórek chrząstki żeber szczura* μg SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> /100 g suchej masy
Kontrola	6,0 ± 0,25	6,3 ± 0,2	12,7 ± 1,1
Czynnik wzrostowy MSA 0,1 μg/ml	15,05 ± 0,25	—	—
Czynnik wzrostowy MSA 1,33 μg/ml	—	—	27,0 ± 1,8
Czynnik wzrostowy MSA 5 μg/ml	—	10,05 ± 0,35	—

\* — liczbę impulsów <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>/min przeliczono na zawartość SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>



lującej mnożenie komórek fibroblastów zarodka kurczęcia (*multiplication stimulating activity* — MSA) (65). Czynniki ten dodany do hodowli komórek stymuluje włączanie [<sup>3</sup>H]-tymidyny do DNA, włączanie siarczanów do chrząstek żeber szczurów, którym usunięto przysadkę mózgową, utlenianie glukozy i lipogenezę w komórkach tłuszczowych oraz w nieznacznym stopniu hamuje wiązanie insuliny z receptorami limfocytów IM9. Niektóre efekty działania czynnika wzrostu MSA, wyizolowanego z hodowli komórek wątroby płodowej zebrane są w tabeli 1.

Jako materiał do wyodrębnienia peptydów o aktywności MSA stosuje się najczęściej hodowlę komórek wątroby płodowej szczurów w środowisku wolnym od surowicy i od hormonów (65). Stwierdzono, że komórki te są również odpowiedzialne za produkcję białka wiążącego somatomedyny (66—68).

Ostatnio opisano badania, których wyniki wskazują na synergistyczne działanie polipeptydowych czynników wzrostu. Np. dodanie egzogenego PDGF-1 do hodowli fibroblastów BALB/c 3T3, zawierającej znakowaną jodem SM-C powodowało wzrost jej wiązania z receptorami komórek. Stwierdzono, że nie jest to wynikiem zmian w powinowactwie czynnika do receptorów lecz wynikiem wzrostu ilości receptorów błonowych; zaobserwowano bowiem, że komórki będące w pomiotycznym okresie spoczynku metabolicznego, po dodaniu PDGF-1 przechodziły w fazę syntezy DNA a następnie w fazę syntezy białka (69).

### **VIII. Polipeptydowe czynniki wzrostu wytwarzane przez komórki transformowane i nowotworowe**

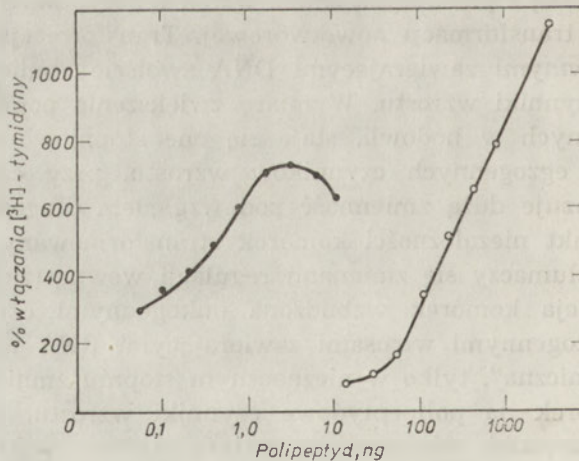
Komórki w hodowli poddane transformacji nowotworowej wykazują zmniejszone zapotrzebowanie na polipeptydowe czynniki wzrostu, w tym i na surowicę (70—76). Zmiana zapotrzebowania na egzogenne czynniki wzrostu jest jedną z pierwszych zmian wśród fenotypowych zmian obserwowanych po transformacji nowotworowej. Transformacja komórek wirusami onkogennymi zawierającymi DNA swoiście zmniejsza zapotrzebowanie na czynniki wzrostu. W miarę zwiększenia populacji komórek transformowanych w hodowli, stają się one stopniowo coraz bardziej niezależne od egzogennych czynników wzrostu, przy czym większość komórek wykazuje dużą zmienność pod względem długości cykliów podziałowych. Fakt niezależności komórek transformowanych od czynników wzrostu tłumaczy się zmianami regulacji wewnątrzkomórkowej.

Transformacja komórek wzbudzona onkogennymi czynnikami chemicznymi, onkogennymi wirusami zawierającymi RNA i tzw. transformacja „spontaniczna”, tylko w nieznacznym stopniu zmniejsza zapotrzebowanie komórek na polipeptydowe czynniki wzrostu. Uważa się, że wspomniane czynniki onkogenne wywołują mutację jednego lub kilku spośród wielu genów (77, 78). Prowadzi to do zmiany zapotrzebowania komórek tylko na niektóre czynniki wzrostowe. Późniejsze zmiany, za-

chodzące w metabolizmie tych komórek, zmniejszają zapotrzebowanie również na inne czynniki wzrostu.

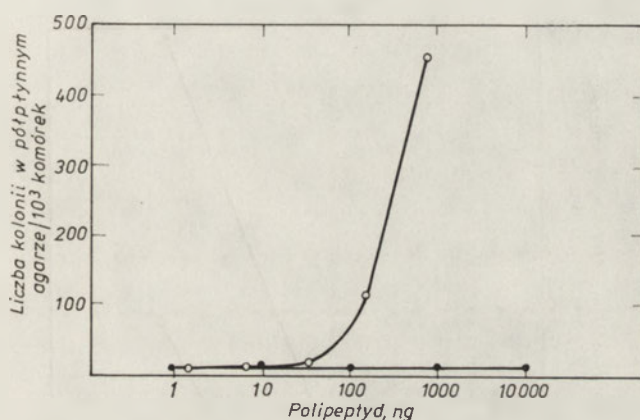
Badania z użyciem komórek fibroblastów chomika chińskiego i syryjskiego BHK-21, stransformowanych wirusem *polyoma* hodowanych w warunkach niedoboru jednego z niezbędnych czynników wzrostu (EGF) lub przysadkowego czynnika wzrostu (FGF)) wykazały korelację między zmniejszeniem zapotrzebowania tych komórek na EGF, a stopniem ich transformacji (79). Uniezależnienie wzrostu komórek nowotworowych i onkogenicznie transformowanych od egzogennych czynników wzrostu *in vitro*, może być skutkiem wydzielania do środowiska własnych swoistych polipeptydów, pozwalających na wzrost komórek w pożywce nie zawierającej surowicy.

W 1978 roku wyizolowano ze środowiska hodowlanego mysich komórek 3T3 zainfekowanych wirusem mięsaka myszy (MSV) polipeptydy wrażliwe na trypsynę, które De Larco i Todaro nazwali czynnikami wzrostu mięsaka (*sarkoma growth factors* — SGFs) (80). Aktywność biologiczna SGF była odrębna od czynnika pobudzającego wzrost komórek naskórka — EGF a także czynniki SGF nie reagowały z przeciwciałami wytworzonymi wobec EGF, ale czynniki te wzajemnie ze sobą współzawodniczyły o receptory powierzchniowe komórek. Aktywność biologiczną stwierdzano w trzech frakcjach, odpowiadających ciężarom cząsteczkowym: 7 000, 12 000 i 25 000. Frakcje te uzyskano z rozdzielenia na kolumnie wypełnionej Bio-Gel P-60 ekstraktu pochodzącego z komórek 3T3 zainfekowanych wirusem MSV. Najaktywniejszą frakcją stymulującą wbudowywanie się [<sup>3</sup>H]-tymidyny do DNA fibroblastów nerki szczura (linii komórkowej 49F) był polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 12 000. Pobudzał on w stężeniu 750 ng/ml hodowli komórkowej włączenie



Ryc. 1. Włączenie [<sup>3</sup>H]-tymidyny do fibroblastów nerki szczura linii klonalnej 49F pod wpływem różnych stężeń EGF (—●—●—) i SGF (—○—○—) (80)

tymidyny w takim samym stopniu jak czynnik wzrostowy EGF w stężeniu 1 ng/ml. Na rycinie 1 porównano zdolności wbudowywania tymidyny pod wpływem obu czynników wzrostu. Każda z trzech frakcji polipeptydowych, dodana do hodowli fibroblastów mysich i szczurzych wywoływała nową fazę wzrostu logarytmicznego i zanik zjawiska zahamowania kontaktowego. Komórki uzyskiwały nowe cechy morfologiczne — cechy komórek stransformowanych (80). Po usunięciu polipeptydów (SGF) z płynnego środowiska hodowlanego komórki odzyskiwały po pewnym czasie cechy morfologiczne, funkcjonalne i wzrostowe, charakterystyczne dla komórek prawidłowych. Polipeptydy te pozwalały ponadto na progresywny wzrost komórek w postaci kolonii w półpłynnym żelu agarowym, co uwarunkowane było zmianą fenotypu komórek. Rycina 2 przed-



Ryc. 2. Porównanie zdolności wytwarzania kolonii w półpłynnym żelu agarowym pod wpływem różnych stężeń SGF (—○—○—) i EGF (—●—●—) (80)

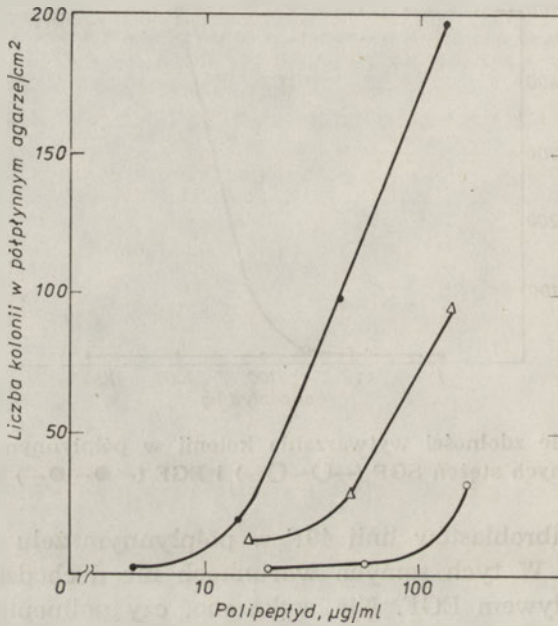
stawia wzrost fibroblastów linii 49F w półpłynnym żelu agarowym pod wpływem SGF. W tych samych warunkach nie dochodzi do tworzenia kolonii pod wpływem EGF. Nie wykazano, czy polipeptydy (SGF) powodują zmiany genetyczne w fibroblastach (80).

De Larco i wsp. wykorzystując zdolność wiązania czynników wzrostu mięsaka przez receptory niektórych komórek wyizolowali i oczyścili jeden z polipeptydowych czynników z podłoża pochodowlanego transformowanych fibroblastów (81). Autorzy zastosowali ludzkie komórki linii nowotworowej A-431 wykazujące znaczną liczbę receptorów wobec EGF (ok.  $2,2 \times 10^6$ /komórkę) i wiążących SGF. W wyniku dwukrotnego wiązania czynnika wzrostu przez receptory uzyskano homogenny polipeptyd, którego ciężar cząsteczkowy określono na 10 000 a pI 6,8 (pI EGF — 4,4).

Dotychczas nie wyjaśniono specyficzności wytwarzania i uwalniania z komórek stransformowanych do medium hodowlanego polipeptydów tej klasy. Próbę izolowania polipeptydów bezpośrednio z komórek nowotwo-



rowych, z przeszczepialnych raków pęcherza myszy i z fibroblastów nerki szczura, transformowanych wirusem mięsaka myszy podjęli dopiero Roberts i wsp. (82). Autorzy zastosowali do izolowania czynnych biologicznie związków kwaśną ekstrakcję etanolem homogenatu komórkowego. Stwierdzili, że największą zdolność do tworzenia kolonii wykazywały komórki prawidłowe rosnące w półpłynnym żelu agarowym w obecności polipeptydów uzyskanych z komórek 3T3, transformowanych wirusem mięsaka myszy. Polipeptydy izolowane z przeszczepialnych raków pęcherza myszy wykazywały mniejszą zdolność stymulowania komórek do wzrostu, zaś polipeptydy wyodrębnione z chemicznie indukowanych raków tchawicy szczurów wykazywały takie działanie w najmniejszym stopniu. Wyniki tych badań przedstawione są na rycinie 3.



**Ryc. 3.** Wytwarzanie kolonii w półpłynnym żelu agarowym przez fibroblasty nerki szczura pod wpływem różnych stężeń peptydów uzyskanych drogą kwaśnej ekstrakcji etanolem komórek 3T3 transformowanych wirusem mięsaka myszy (—●—●—), komórek nowotworu pęcherza indukowanych N-butylu-N-(4-hydroksybutylo)nitrozoaminą (—△—△—) i komórek raka tchawicy szczurów indukowanego 7,12-dwumetylobenzeno(a)antracenu (—○—○—) (82)

Właściwości mitogenne wszystkich polipeptydów wewnątrzkomórkowych są podobne do właściwości czynników wzrostowych, wyizolowanych ze środowiska hodowlanego komórek 3T3 transformowanych wirusem mięsaka myszy (czynnik SGF). Wskazuje to, że wytwarzane są podobne czynniki wzrostu komórek, niezależnie od czynnika indukującego transformację nowotworową lub pochodzenia komórek nowotworowych. Czyn-

niki te zostały określone przez autorów wspólną nazwą: transformujące czynniki wzrostu — *transforming growth factors* (TGFs). Są one pod względem właściwości biologicznych bardzo podobne do SGFs. Wywołują nową fazę wzrostu logarytmicznego w hodowli zawieszinowej, zanik zjawiska zahamowania kontaktowego, stymulują wzrost fibroblastów nerki szczura linii klonalnej 49F w półpłynnym żelu agarowym, współzawodniczą z EGF o receptory błon komórkowych i tracą aktywność biologiczną pod wpływem trypsyny lub dwutiotreitolu. Transformujące czynniki wewnątrzkomórkowe (TGFs) odpowiadają czynnikom wzrostu mięsaka (SGFs) o ciężarach cząsteczkowych 10 000 i 7 000 (83).

Badania nad czynnikami polipeptydowymi wytwarzanymi przez ludzkie komórki nowotworowe hodowane w pożywce wolnej od surowicy wykazały, że komórki te produkują czynniki zdolne do wzbudzenia transformacji komórek prawidłowych (84). Czynniki te mają wiele cech wspólnych z polipeptydami wytwarzanymi i uwalnianymi przez komórki transformowane wirusem mięsaka myszy i szczurów.

Wykazano, że niektóre polipeptydy z komórek raka wysiękowego Ehrlicha, zawierające dodatkowe składniki cukrowe, pobudzają również wzrost komórek. Ostatnio z frakcji cytoplazmatycznej tych komórek wyizolowano drogą sączenia molekularnego i chromatografii jonowymiennej sjałoglikopeptyd o takim działaniu. Ten złożony polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 18 500 i pI = 5,0 zawierający obojętne heksozy, heksozaminy i kwas sjałowy, znacznie stymuluje włączanie [<sup>3</sup>H]-tymidyny do nierozpuszczalnego w kwasie trójchlorooctowym materiału komórkowego, w hodowli mysich fibroblastów linii BALB/c 3T3 (85). Stymuluje on ponadto mnożenie fibroblastów *in vitro* (86).

Ostatecznie nie rozstrzygnięto, czy komórki nowotworów ludzkich produkują identyczne czynniki wzrostowe jak komórki stransformowane. Wydaje się jednak, że czynniki polipeptydowe pochodzące z komórek nowotworowych i stransformowanych nie mogą być utożsamiane z czynnikami wzrostowymi obecnymi w surowicy.

## IX. Uwagi końcowe

Komórki zwierzęce *in vitro* wymagają wielu różnorodnych substancji, wśród których czynniki polipeptydowe (hormonalne) odgrywają istotną rolę w regulacji wzrostu komórki.

Przyjmuje się, że następująca kolejność zdarzeń składa się na aktywność czynników peptydowych w stymulacji i regulacji komórkowego wzrostu (87): 1) wiązanie peptydów ze specyficznymi, o wysokim powinowactwie nasycenia, receptorami powierzchniowymi komórki; 2) gromadzenie lub agregacja kompleksów receptor-czynnik; 3) tworzenie pęcherzyków endocytarnych, zawierających te kompleksy; 4) indukcja ekspresji genu komórkowego; 5) wewnątrzkomórkowa degradacja kompleksu.

Badania nad regulatorami wzrostu wskazują, że w odpowiedzi na ich obecność w środowisku komórki mogą wytwarzać swoiste mechanizmy kompetencyjne lub synergistyczne (69, 88), przejawiające się zmianą zdolności wiązania czynnika przez receptor lub indukcją biosyntezy specyficznych receptorów na powierzchni komórki. Mogą również przyspieszać poszczególne wymienione powyżej fazy działania.

Czynniki te *in vivo* mogą być sterowane przez różnego typu efekторы, do których należą nukleotydy cykliczne, jony lub różne substancje organiczne, będące pod kontrolą bodźców hormonalnych i innych ciał czynnych. Fosforylacja specyficznych glikoprotein błonowych może działać regulatorowo, stanowić odpowiedź na sygnał zewnątrzkomórkowy, który przeniesiony do jądra komórkowego indukuje ekspresję genomu (22, 23, 31).

Komórki stransformowane i nowotworowe są w znacznym stopniu niezależne od peptydowych czynników wzrostowych, prawdopodobnie dzięki wytwarzaniu i uwalnianiu do środowiska swoistych peptydów, które „autostymulują” wzrost komórek. Czynniki tych nie można utożsamiać z polipeptydowymi czynnikami wzrostowymi wytwarzanymi przez niektóre komórki prawidłowe.

Zaakceptowano do druku 20.11.1981

## PIŚMIENNICTWO

1. Bańkowski E., (1977), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **31**, 503—520.
2. Sudol M., (1978), *Post. Biol. Kom.*, **5**, 325—340.
3. Cohen S., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1555—1562.
4. Sawage C. R., Inagami T., Cohen S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7612—7621.
5. Mierzejewski K., Rozengurt E., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 271—278.
6. Mierzejewski K., Rozengurt E., (1977), *Nature*, **269**, 155—156.
7. Westermarck B., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 304—310.
8. Taylor J. M., Cohen S., Mitchell W. M., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 164—171.
9. Feldman E. G., Aures D., Grossman M. J., (1978), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **159**, 400—402.
10. Gregory H., (1975), *Nature*, **257**, 325—327.
11. Huey J., Narayanan A. S., Jones K., Page R. C., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **632**, 227—233.
12. Lin S. L., Tso P. O. P., Hollenberg M. D., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 168—174.
13. Chang E. H., Jay F. T., Friedman R. M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 1859—1863.
14. Heron J., Hokland M., Berg K., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 6125—6129.



15. Lindahl P., Gresser I., Leany P., Tovey M., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1284—1287.
16. Maxfield F. R., Davies P. J. A., Klempner L., Willingham M. C., Pastan I., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5731—5735.
17. Kahn C. R., (1976), *J. Cell. Biol.*, **70**, 261—286.
18. Gorden P., Carpenter J. L., Cohen S., Orci L., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 5025—5029.
19. King A., Willis R. A., Cuatrecasas P., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 840—845.
20. Stastny M., Cohen S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 578—589.
21. Folk J. E., Finlayson J. S., (1977), *Adv. Protein Chem.*, **31**, 1—133.
22. Carpenter G., King L. Jr., Cohen S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4884—4891.
23. King L. Jr., Carpenter G., Cohen S., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1524—1528.
24. Lewitzki A., Helmreich E. J. M., (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 213—219.
25. Gospodarowicz D., (1974), *Nature*, **249**, 123—127.
26. Gospodarowicz D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2515—2520.
27. Gospodarowicz D., Moran J. S., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4584—4588.
28. Gospodarowicz D., Moran J. S., (1975), *J. Cell Biol.*, **66**, 451—457.
29. Thomas K. A., Riley M. C., Lemmon S. K., Baglan N. C., Bradshaw R. A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5517—5520.
30. Rudland P. S., Seifert W., Gospodarowicz D., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2600—2604.
31. Nilsen-Hamilton M., Hamilton R. T., (1979), *Nature*, **279**, 444—446.
32. Ross R., Glomset J., Kariya B., Harker L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1207—1210.
33. Kohler N., Lipton A., (1974), *Exp. Cell Res.*, **87**, 297—301.
34. Westermak B., Wasteson A., (1976), *Exp. Cell Res.*, **98**, 170—174.
35. Antoniades H. N., Scher C. D., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1973—1977.
36. Witte L. D., Kaplan K. L., Nossel H. L., Lages B. A., Weiss H. J., Goodman D. S., (1978), *Circ. Res.*, **42**, 402—409.
37. Kepner N., Lipton A., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 430—432.
- 37a. Bańkowski E., Dąbrowski A., (1980), *Acta Biochim. Polon.*, **27**, 405—411.
38. Scher C. D., Pledger W. J., Martin P., Antoniades H. N., Stiles C. D., (1978), *J. Cell. Physiol.*, **97**, 371—380.
39. Kaplan D. R., Chao F. C., Stiles C. D., Antoniades H. N., Seger C. D., (1979), *Blood*, **53**, 1043—1052.
40. Antoniades H. N., Scher C. D., Stiles C. D., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1809—1813.
41. Fass D. N., Downing M. R., Meyers P., Bowie E. J. W., Witte L. D., (1978), **32<sup>nd</sup> Annual Meeting Council on Atherosclerosis**, American Heart Association, str. 11, New York.
42. Gajdusek C. M., Schwartz S. M., DiCortelo P., Ross T., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 1075.
43. Gajdusek C., DiCortelo P., Ross R., Schwartz S. M., (1980), *J. Cell Biol.*, **85**, 467—472.
44. Folkman J., Cotran R., (1976), *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **16**, 207—248.
45. Schoefl G. A., (1963), *Virchows Arch. Abt. A. Pathol. Anat.*, **337**, 97—141.
46. Ross R., Glomset J., (1976), *N. Engl. J. Med.* **295**, 369—377.
47. Ross R., Glomset J., (1976), *N. Engl. J. Med.* **295**, 420—422.

48. Levi-Montalcini R., Angeletti P. U., (1968), *Physiol. Rev.*, **48**, 534—569.
49. Ikeno T., MacDonnell P. C., Nagaiah K., Guroff G., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 957—963.
50. Hugue-Angeletti R., (1969), *Brain Res.*, **12**, 234—237.
51. Suda K., Barde Y. A., Thoenen H., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 4042—4046.
52. Ronne H., Anundi H., Rask L., Peterson P. A., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 330—336.
53. Haselbacher G. K., Andres R. Y., Humbel R. E., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **111**, 245—250.
54. Ginsberg D. J., Smith G. L., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 7252—7256.
55. Ginsberg B. H., Kahn C. R., Roth J., Megyesi K., Baumann G., (1979), *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, **48**, 43—49.
56. Rinderknecht E., Humbel R. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2769—2776.
57. Rinderknecht E., Humbel R. E., (1978), *FEBS Lett.*, **89**, 283—286.
58. Turner R. C., Cohen N. M., (1974), *Dev. Med. Child Neurol.*, **16**, 371—373.
59. Bala R. M., Smith G. R., (1976), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **43**, 907—912.
60. D'Ercole A. J., Foushee D. B., Underwood L. E., (1976), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **43**, 1069—1077.
61. Furlanetto R. W., Underwood L. E., Van Wyk J. J., D'Ercole A. J., (1977), *J. Clin. Invest.*, **60**, 648—657.
62. Svan H., Hall K., Ritzen M., Takano K., Skottner A., (1977), *Acta Endocrinol.*, **85**, 636—643.
63. Bala R. M., Wright C., Bardai A., Smith G. R., (1978), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **46**, 649—652.
64. Heinrich U. E., Schalch D. S., Koch J. G., Johnson C. J., (1978), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **46**, 672—678.
65. Rechler M. M., Eisen H. J., Higa O. Z., Nissley S. P., Moses A. C., Schilling E. E., Fennoy I., Bruni C. B., Phillips L. S., Baird K. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7942—7950.
66. Schalch D. S., Heinrich U. E., Drazini B., Johnson C. J., Miller L. L., (1979), *Endocrinology*, **104**, 1143—1151.
67. Spencer E. M., (1979), *FEBS Lett.*, **99**, 157—161.
68. Moses A. C., Nissley S. P., Passamani J., White R. M., (1971), *Endocrinology*, **104**, 536—546.
69. Clemmons D. R., Van Wyk J. J., Pledger W. S., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 6644—6648.
70. Clarke G. D., Stoker M. G. P., Ludlow A., Thornton M., (1970), *Nature*, **227**, 798—801.
71. Dulbecco R., (1970), *Nature*, **227**, 802—806.
72. Green M., (1970), *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 701—756.
73. Dubrow R., Riddle V. G. H., Pardee A. B., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 2718—2726.
74. Holley R. W., Baldwin J. H., Kiernan J. A., Messmer T. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3229—3232.
75. Fernandez-Pol J. A., Bono V. H., Johnson G. S., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2889—2893.
76. Moses H. L., Proper J. A., Volkenant M. E., Wells D. J., Getz M. J., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 2807—2812.
77. Ames B. N., (1979), *Science*, **204**, 587—593.

78. Oppermann H., Levinson A. D., Varmus H. E., Levinton L., Bishop J. M., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1804—1808.
79. Cherington P. V., Smith B. L., Pardee A. B., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 3937—3941.
80. De Larco J. E., Todaro G. J., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 4001—4005.
81. De Larco J. E., Reynolds R., Calberg K., Engle C., Todaro G. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3685—3690.
82. Roberts A. B., Lamb L. C., Newton D. L., Sporn M. B., De Larco J. E., Todaro G. J., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 3496—3498.
83. De Larco J. E., Todaro G. J., (1980), *J. Cell. Physiol.*, **102**, 267—277.
84. Todaro G. J., Fryling C., De Larco J. E., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 5258—5262.
85. Gabryel H., Bańkowski E., Farbiszewski R., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 153—157.
86. Jodczyk K. J., Farbiszewski R., Bańkowski E., Gabryel H., (1981), *Biol. Zbl.*, w druku.
87. Lee L. S., Weinstein I. B., (1980), *Carcinogenesis*, **1**, 669—679.
88. De Asua L. J., Richmond K. M., Otto A. M., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 1004—1008.



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. The text also mentions the need for regular audits to ensure the integrity of the financial data.

In the second section, the author outlines the procedures for handling discrepancies. It is stated that any variance between the recorded amounts and the actual cash flow should be investigated immediately. The document provides a step-by-step guide for identifying the source of the error and correcting it.

The third part of the document focuses on the role of the accounting department in providing timely and accurate financial reports. It highlights the importance of clear communication between the accounting team and other departments to ensure that all financial activities are properly documented.

Finally, the document concludes with a summary of the key points discussed. It reiterates the importance of transparency and accountability in financial management and encourages all employees to adhere to the established policies and procedures.

Date	Description	Amount	Account
2023-01-01	Opening Balance	1000.00	1000
2023-01-05	Revenue from Sales	500.00	1000
2023-01-10	Payment of Rent	(200.00)	2000
2023-01-15	Salary Payment	(300.00)	3000
2023-01-20	Interest Income	50.00	4000
2023-01-25	Revenue from Services	400.00	1000
2023-01-30	Utility Bills	(150.00)	5000
2023-02-01	Closing Balance	1200.00	

ANNA M. RYCHTER \*)

## Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych

### Alternative Respiratory Pathway in Higher Plants

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Lokalizacja oddychania niewrażliwego na cyjanek w komórce roślinnej
- III. Struktura i przenośniki drogi alternatywnej
  - III-1. Miejsce rozgałęzienia głównego łańcucha przenoszenia elektronów
  - III-2. Przenośniki wchodzące w skład drogi alternatywnej
    - III-2-1. Flawoproteiny
    - III-2-2. Żelazosulfoproteiny
- IV. Charakterystyka drogi alternatywnej
  - IV-1. Powinowactwo wobec tlenu
  - IV-2. Końcowy produkt redukcji tlenu
  - IV-3. Problem syntezy ATP
- V. Regulacja przepływu elektronów drogą alternatywną
- VI. Funkcjonowanie alternatywnej drogi oddechowej
  - VI-1. Działanie alternatywnej drogi oddechowej w cyklu rozwojowym roślin
  - VI-2. Wpływ czynników zewnętrznych na funkcjonowanie drogi alternatywnej
- VII. Znaczenie fizjologiczne alternatywnej drogi oddechowej
- VIII. Uwagi końcowe

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Localization of cyanide resistant respiration in plant cell
- III. The structure of alternative pathway
  - III-1. Branching of the main chain of electron transport
  - III-2. Electron carriers of alternative pathway
- VI. Characteristics of alternative pathway
  - IV-1. Oxygen affinity
  - IV-2. The end product of oxygen reduction
  - IV-3. Problem of ATP synthesis
- V. The regulation of electron flow through alternative pathway

\*) Dr, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski, Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa.

## VI. Operation of alternative pathway

### VI-1. Operation of alternative pathway during the life cycle of plants

### VI-2. Operation of alternative pathway as affected by external factors

## VII. The physiological significance of alternative pathway

## VIII. Final remarks

## I. Wstęp

Badania nad funkcjonowaniem łańcucha oddechowego w roślinach wyższych, a także w niektórych mikroorganizmach doprowadziły w ostatnim dziesięcioleciu do wykazania rozgałęzienia tego łańcucha i wynikającej stąd możliwości przepływu elektronów z pominięciem przenośników cytochromowych (1). Tę drogę transportu elektronów zaczęto więc nazywać „alternatywną drogą oddechową” — alternatywną do opisywanej głównej drogi transportu elektronów — drogi cytochromowej. Jej obecność w mitochondriach tłumaczyła obserwowaną od dawna małą wrażliwość oddychania organizmów roślinnych na inhibitor oksydazy cytochromowej — cyjanek potasu.

W ciągu ostatnich pięciu lat ukazały się liczne artykuły przeglądowe poświęcone problemowi oddychania niewrażliwego na cyjanek (2—8), a wśród nich artykuł A. Drabikowskiej w *Postęпах Biochemii* (6) omawiający głównie wyniki badań przeprowadzonych na mikroorganizmach. Ostatnio opublikowane badania pozwoliły na uporządkowanie i ujednoczenie terminologii opisującej omawiane procesy i rzuciły nowe światło na regulację zjawisk oddechowych w organizmach roślinnych.

Obecnie terminem „oddychanie niewrażliwe na cyjanek” powszechnie określa się oddychanie całych roślin, tkanek lub też izolowanych mitochondriów, nie hamowane przez cyjanek potasu. Oddychanie to może być związane zarówno z pobieraniem tlenu przez mitochondria jak i z układami oksydaz występujących poza mitochondriami. Terminem „alternatywna droga oddechowa” określa się fragment mitochondrialnego łańcucha oddechowego, w którym elektrony przenoszone są na tlen z pominięciem przenośników cytochromowych. Alternatywna droga oddechowa może funkcjonować w obecności inhibitorów oksydazy cytochromowej (cyjanku, azydku, tlenku węgla) oraz inhibitorów łańcucha cytochromowego działających między cytochromami b i c (antymycyna A, N-tlenek hydroksychinoliny). „Oksydazą alternatywną” określa się końcowy fragment drogi alternatywnej, bliżej nie zbadany układ enzymatyczny, katalizujący przeniesienie elektronów na tlen. Układ ten jest hamowany przez kwasy hydroksamowe.

Celem niniejszego artykułu jest ogólna charakterystyka oraz omówienie regulacji i mechanizmu działania alternatywnej drogi oddechowej u roślin wyższych i jej fizjologicznego znaczenia.



## II. Lokalizacja oddychania niewrażliwego na cyjanek w komórce

Brak hamowania przez cyjanek oddychania roślin lub ich tkanek przypisuje się w części udziałowi obecnych w cytoplazmie cyjanoodpornych oksydaz przenoszących elektrony wprost na tlen (9). Jednakże wyniki wielu badań izolowanych mitochondriów wskazują, że zasadniczą rolę w tzw. cyjanoodporności oddychania odgrywa funkcjonująca w mitochondriach (1, 10—13) alternatywna droga oddechowa.

Cyjanek w różnym stopniu hamuje oddychanie mitochondriów izolowanych z różnych roślin. I tak np. oddychanie mitochondriów izolowanych z chwastu północno amerykańskiego *Symplocarpus foetidus* nie jest wcale hamowane przez cyjanek (12), cyjanek hamuje oddychanie mitochondriów fasoli w około 75% (14), natomiast oddychanie mitochondriów ziemniaka jest całkowicie zahamowane (15). Najczęściej mitochondria izolowane z roślin lub tkanek, których oddychanie nie jest hamowane przez cyjanek, charakteryzują się niewrażliwością na ten inhibitor.

Mitochondria wyizolowane z tkanek, których oddychanie jest niewrażliwe na cyjanek wykazują obecność obu dróg transportu elektronów: hamowaną przez cyjanek, drogę cytochromową, powiązaną z oksydacyjną fosforylacją oraz nie hamowaną przez cyjanek, alternatywną drogę oddechową, która prawdopodobnie nie jest związana z produkcją energii w postaci ATP.

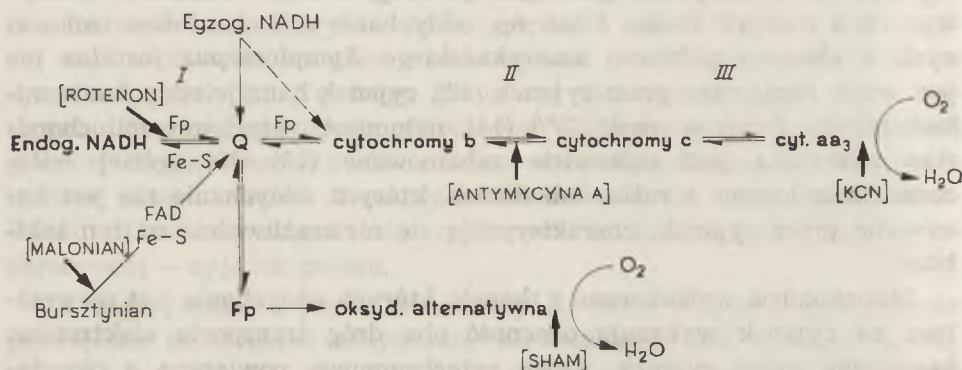
Odmienne charakterystyka mitochondriów tkanek, których oddychanie jest niewrażliwe na cyjanek wskazuje na obecność w nich układu oddechowego odpornego na cyjanek. Mitochondria izolowane z takich tkanek charakteryzują się małym stopniem sprzężenia oddychania z oksydacyjną fosforylacją (niski stosunek ADP/O). Zahamowanie drogi alternatywnej przez podanie mitochondriom specyficznych inhibitorów tej drogi, może stosunek ADP/O podnieść, wskazując również na to, że obie drogi mogą funkcjonować równocześnie (14). Alternatywna droga oddechowa, podobnie, jak łańcuch oddechowy funkcjonuje w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (16).

## III. Struktura i przenośniki drogi alternatywnej

### III-1. Miejsce rozgałęzienia głównego łańcucha przenoszenia elektronów

Uproszczony schemat roślinnego łańcucha transportu elektronów przedstawia rycina 1. W mitochondriach, których oddychanie było niewrażliwe na cyjanek zaobserwowano, że przy zahamowaniu cyjankiem potasu głównej drogi transportu elektronów — drogi cytochromowej, utle-

nianie substratów oddających elektrony przed pierwszym miejscem sprzężenia, prowadziło do wytworzenia jednej cząsteczki ATP (17, 18). Natomiast wszystkie substraty oddające elektrony przed drugim miejscem sprzężenia (np. bursztynian) mogą być utleniane w obecności cyjanek bez jednoczesnej syntezy ATP (17, 18). Ponadto antymycyna A, inhibitor działający na poziomie cytochromu b, nie hamuje, podobnie jak cyjanek, alternatywnej drogi oddechowej (1). Obserwacje te wskazywały na to, że obie drogi (wrażliwa i niewrażliwa na cyjanek) biegną wspólnie przez pewien fragment łańcucha przenoszenia elektronów, a odgałęzienie drogi alternatywnej następuje w rejonie ubichinon-flawoproteina-cytochrom b



**Ryc. 1.** Schemat roślinnego łańcucha oddechowego. Zmodyfikowane wg (7)

Fp — flawoproteina, Fe-S — żelazosulfoproteiny, Q — ubichinon, SHAM — kwas salicylohydroksamowy.

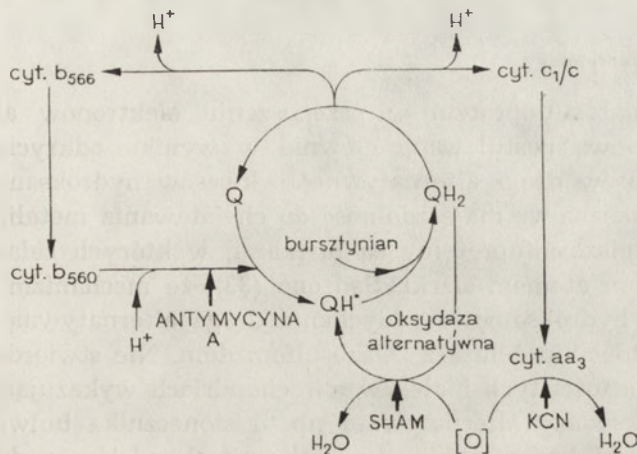
Grubymi strzałkami zaznaczono miejsca hamowania łańcucha przez powszechnie używane inhibitory, w nawiasach.

Rzymskimi cyframi oznaczono fosforylacje.

(19—23). Dokładniej miejsce rozgałęzienia łańcucha oddechowego wykazano stosując metodę pulsowego utleniania mitochondriów *Symplocarpus foetidus* będących w warunkach anaerobowych, przy jednoczesnym zahamowaniu łańcucha cytochromowego tlenkiem węgla (24). Transport elektronów przy pulsowym utlenianiu przebiegał głównie drogą alternatywną. Utlenianie ubichinonu i części flawoprotein zachodziło w tych warunkach bardzo szybko ( $t_{1/2} = 1$  sek), przy dość powolnym utlenianiu cytochromów a i a<sub>3</sub> ( $t_{1/2} = 3$  sek), odpowiadającym szybkości dysocjacji tlenku węgla ze zredukowanego cytochromu a, a<sub>3</sub>. Kwasy hydroksamowe, inhibitory drogi alternatywnej, gwałtownie hamowały utlenianie ubichinonu i flawoprotein. Zaproponowano więc, że ubichinon jest miejscem rozgałęzienia i wspólnym przenośnikiem zarówno dla drogi cytochromowej jak i dla drogi alternatywnej (24).

Chemiosmotyczna teoria Mitchella (25) zakłada, że tzw. cykl ubichinonu pełni zasadniczą rolę w działaniu pompy protonowej. Określenie stosunku P/O, stanu utlenienia lub redukcji przenośników podczas pulsowego podawania tlenu oraz potencjałów oksydo-redukcyjnych po-

szczególnych przenośników pozwoliło na zaproponowanie kolejności reakcji zachodzących w cyklu ubichinonu i powiązanie ich z alternatywną drogą oddechową (26, 27). Zaproponowano więc (28), że dehydrogenaza bursztynianowa redukuje układ  $QH^+/QH_2$ , natomiast układ enzymatyczny drogi alternatywnej (być może kompleks oksydazy alternatywnej) katalizuje reakcję odwrotną (Ryc. 2). Odgałęzienie drogi alternatywnej



**Ryc. 2.** Schemat rozgałęzienia roślinnego łańcucha oddechowego uwzględniający cykl ubichinonu. Zmodyfikowane wg (28)

Strzałkami oznaczono miejsca hamowania niektórych inhibitorów. Reszta objaśnień w tekście.

z głównej drogi cytochromowej jest więc odwróceniem katalizowanej przez dehydrogenazę bursztynianową reakcji redukcji  $QH^+$  do  $QH_2$  (29).

### III-2. Przenośniki wchodzące w skład drogi alternatywnej

#### III-2-1. Flawoproteiny

Duża różnorodność flawoprotein roślinnych oraz łatwość wchodzenia w reakcje utleniania-redukcji sugerowały ich udział w przenoszeniu elektronów na drodze alternatywnej (30, 31). Wyniki opisanego powyżej doświadczenia (24), w którym pulsowo podawano tlen zawieszinie mitochondriów w obecności tlenku węgla, wskazywały na udział w utlenianiu alternatywną drogą oddechową flawoproteiny o potencjale redukcyjnym +20 mV. Zaproponowano więc (24), że flawoproteina ta jest w równowadze oksydoredukcyjnej z ubichinonem (potencjał oksydo-redukcyjny +70 mV). Duża różnica potencjału między tymi dwoma przenośnikami mogłaby sprawiać, że niewielka redukcja ubichinonu powodowałaby znaczny stopień redukcji tej flawoproteiny. Taki układ przenośników doskonale odpowiada wcześniejszemu hipotetycznemu schematowi regulacji funkcjonowania obu dróg, który zaproponował Bahr i Bonner (32). Schemat ten zakłada (dokładne jego omówienie w dalszej części



artykułu) istnienie przenośnika o charakterze „przełącznika” mogącego zmienić kierunek przepływu elektronów z drogi cytochromowej (głównej drogi przenoszenia elektronów w 3-cim stanie energetycznym mitochondrionu, przy dużym stężeniu ADP) na drogę alternatywną (główną drogę przenoszenia elektronów w stanie 4-ym, przy braku ADP lub przy całkowitym lub częściowym zahamowaniu drogi cytochromowej).

### III-2-2. Żelazosulfoproteiny

Udział żelazosulfoprotein w przenoszeniu elektronów alternatywną drogą oddechową postulowano głównie w wyniku odkrycia specyficznych inhibitorów drogi alternatywnej — kwasów hydroksamowych (33). Kwasy hydroksamowe mają zdolność do chelatowania metali, a szczególnie żelaza. Żelazosulfoproteiny są białkami, w których żelazo związane jest z labilnym atomem siarki. Sądzono (33), że mechanizm hamowania przez kwasy hydroksamowe oddychania drogą alternatywną może polegać na chelatowaniu żelaza z żelazosulfoprotein. Nie stwierdzono jednak większej zawartości tych białek w mitochondriach wykazujących wysoką aktywność oksydazy alternatywnej np. u słonecznika bulwiastego (34). Również wyniki badań porównawczych mitochondriów o dużej wrażliwości oddychania na cyjanek i mitochondriów, których oddychanie było całkowicie niewrażliwe na cyjanek, nie wykazały zasadniczych różnic ilościowych w składzie żelazosulfoprotein (34).

Natomiast argumentem za udziałem żelazosulfoprotein w drodze alternatywnej był fakt wydzielania siarkowodoru podczas cieplnej inaktywacji tej drogi w mitochondriach (35, 36). Doświadczenie to jednak zostało zinterpretowane (37) w odmienny sposób niż proponowany przez autorów. W mitochondriach bowiem, w których cyjanek nie hamuje oddychania występuje więcej dehydrogenazy bursztynianowej, zawierającej w swym kompleksie centra żelazo-siarkowe. Inaktywacja cieplna drogi alternatywnej i wykrywalnie wyższe wydzielanie siarkowodoru w mitochondriach z działającą drogą alternatywną mogłoby polegać na proporcjonalnie (do jej ilości) większej inaktywacji dehydrogenazy bursztynianowej. W mitochondriach z działającą drogą alternatywną 1 cząsteczka dehydrogenazy bursztynianowej przypada na 1 łańcuch oddechowy, natomiast w mitochondriach, w których cyjanek hamuje oddychanie przypada tylko jedna cząsteczka dehydrogenazy bursztynianowej na trzy łańcuchy przenośników elektronów.

Udział żelazosulfoprotein w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek w sposób nie budzący zastrzeżeń wykazano u drożdży (38). Cyjanek hamował oddychanie drożdży, gdy hodowlę ich prowadzono w warunkach braku żelaza czy też przy udziale środków chelatujących (EDTA) (39).

Natomiast wprowadzenie żelaza lub siarki do środowiska hodowli powodowało indukcję alternatywnej drogi oddechowej (40, 41).

Przez parę lat, aż do roku 1978, wykazywano specyficzność działania kwasów hydroksamowych jako inhibitorów drogi alternatywnej i sądzono, że mechanizm ich hamowania polega na wiązaniu żelaza z żelazo-sulfoproteinami. Mechanizm ten jest obecnie podważany, ponieważ uważa się, że żelazo w żelazosulfoproteinach jest trudno dostępne do wiązania się z kwasami hydroksanowymi (42). Ponadto wykazano, że kwasy hydroksamowe hamują wiele innych układów enzymatycznych m.i. peroksydazę, tyrozynazę i lipoksygenazę (43, 44, 45). Zaproponowano więc (45), że mechanizm działania kwasów hydroksamowych może polegać na ich współzawodnictwie z substratem fenolowym o miejsce wiązania z białkiem enzymatycznym. Tym substratem oksydazy alternatywnej ma być ubichinon, a wiązanie — wiązaniem wodorowym.

Silniejszym i bardziej specyficznym inhibitorem alternatywnej drogi oddechowej jest disulfiram (46). Nieznany jest jak dotąd mechanizm jego działania, związek ten ma jednak również własności chelatujące metale.

Z mitochondriów *Arum maculatum* wyizolowano kompleks enzymatyczny utleniający durohydrochinon (2,3,5,6-tetrametylo-1,4-benzochinon), będący sztucznym substratem oksydazy alternatywnej (47, 48). Choć kompleks ten nie może być całkowicie utożsamiany z oksydazą alternatywną, to jednak godnym odnotowania jest fakt, że nie zawiera on żelazosulfoprotein, a w jego skład wchodzi prawdopodobnie flawoproteina i znaczna ilość miedzi (48, 49). W innej pracowni (37) również podjęto próbę izolowania i częściowego oczyszczenia oksydazy alternatywnej. Wyizolowany kompleks enzymatyczny utleniał ubichinol-1 i menadiol, jednakże nie wykazano obecności w nim centrów żelazosiarkowych, albowiem nie odnotowano charakterystycznych sygnałów przy badaniu rezonansu elektroparamagnetycznego (50).

Tak więc powyżej opisane badania praktycznie wykluczyły udział żelazosulfoprotein w przenoszeniu elektronów drogą alternatywną. Zastosowanie sztucznych substratów drogi alternatywnej oraz próby izolowania tego fragmentu łańcucha oddechowego dają nadzieję, że wkrótce zostanie dokładnie określona sekwencja oraz charakter przenośników alternatywnej drogi oddechowej.

#### IV. Charakterystyka drogi alternatywnej

##### IV-1. Powinowactwo wobec tlenu

Flawinowy charakter drogi alternatywnej wskazywałby na jej niskie powinowactwo do tlenu. Potwierdzają to obserwacje, że wymaga ona do swego działania często nieco wyższych stężeń tlenu niż droga cytochromowa. I tak, wysokie stężenie tlenu (powyżej 21%) powoduje wzrost



aktywności oddychania niewrażliwego na cyjanek w mitochondriach pszenicy (51). Wysokie stężenie tlenu indukuje syntezę drogi niewrażliwej na cyjanek w kulturach komórkowych jesionu (52). Skrawki ziemniaka z bulw traktowanych poprzednio mieszaniną etylenu z tlenem (o stężeniu bliskim 100%) wykazują większą odporność oddychania na cyjanek w porównaniu ze skrawkami z ziemniaków traktowanych mieszaniną etylenu i powietrza (53). Wykazano, że niskie powinowactwo oddychania korzeni *Senecio* (starca) do tlenu spowodowane jest wysoką aktywnością oksydazy niewrażliwej na cyjanek (54-56).

Powinowactwo oksydazy alternatywnej do tlenu u roślin wyższych określono w przybliżeniu jako dziesięciokrotnie niższe od powinowactwa do tlenu oksydazy cytochromowej (5). Wyniki badań powinowactwa oksydazy alternatywnej do tlenu u drożdży i mikroorganizmów (57-60) potwierdzają, że jest ono niskie i określają je jako 3,5-10 razy niższe niż oksydazy cytochromowej.

#### IV-2. Końcowy produkt redukcji tlenu

Mechanizm działania drogi alternatywnej związany jest z zagadnieniem stechiometrii końcowej reakcji redukcji tlenu w łańcuchu oddechowym. Tak więc istotną kwestią jest określenie, czy redukcja tlenu zachodząca w wyniku przeniesienia elektronów drogą alternatywną jest procesem wymagającym 4 elektronów i wytwarzającym wodę, czy procesem związanym z przeniesieniem 2 elektronów i wytwarzającym nadtlenek wodoru, czy też procesem 1 elektronowym wytwarzającym anion ponadtlenkowy. Ilość nadtlenku wodoru wytwarzana podczas oddychania alternatywną drogą oddechową w izolowanych mitochondriach fasoli jest bardzo mała (61). Mogłoby to być związane z obecnością w nienaruszonych mitochondriach katalazy i peroksydazy oraz donorów wodoru dla tego enzymu. Oba te enzymy mogą rozkładać nadtlenek wodoru wytwarzany przez drogę alternatywną i w ten sposób zapobiegać jego gromadzeniu. Wniosek ten potwierdziła obserwacja, że cząsteczki submitochondrialne otrzymane z tych samych mitochondriów, w obecności antymycyny A, wytwarzały nadtlenek wodoru w ilościach odpowiadających ilości tlenu pochłanianego przez funkcjonującą drogę alternatywną, aczkolwiek nie można było stwierdzić czy reakcja ta zachodzi również w obecności KCN i jest hamowana przez kwasy hydroksamowe bowiem oba te związki przeszkadzały w oznaczaniu peroksydazy utleniającej cytochrom c (61). Wyniki tych doświadczeń nie odpowiedziały jednak na pytanie, czy redukcja tlenu jest procesem dwu czy jedno elektronowym, bowiem reakcja mogłaby być jednoelektronowa, a nadtlenek wodoru mógłby powstać w wyniku działania dysmutazy ponadtlenkowej. Wykazano jednak (62), że zarówno oksydaza cytochromowa jak i oksydaza



alternatywna nie wytwarzają anionu ponadtlenkowego w znaczących ilościach. Ponadto stwierdzono (62), że obserwowane poprzednio wytwarzanie nadtlenu wodoru można przypisać redukcji tlenu do ponadtlenu przez fragment łańcucha oddechowego w rejonie ubichinon-cytochrom b. Ponadtlenek rozkładany byłby następnie do nadtlenu wodoru przez dysmutazę ponadtlenkową. Jednak, gdy jako donora elektronów dla łańcucha drogi alternatywnej używano bursztynianu, oksydaza alternatywna nie redukowała tlenu do nadtlenu wodoru ani do ponadtlenu wodoru (63). Tak więc, wydaje się obecnie, na podstawie omówionych wyników badań, że woda jest bezpośrednim, końcowym produktem redukcji tlenu przez alternatywną drogę oddechową u roślin wyższych (50) i drożdży (64).

#### IV-3. Problem syntezy ATP

Zagadnienie syntezy ATP związanej z przepływem elektronów dodatkową, alternatywną drogą utleniania badano różnymi metodami w wielu pracowniach (17, 28, 65-67). Wyniki badań, w których określano stosunek ADP/O wskazują, że utlenianie bursztynianu przez izolowane mitochondria na drodze alternatywnej, przy zahamowanej drodze cytochromowej, nie jest związane z syntezą ATP. Natomiast przy utlenianiu jabłczanu w obecności cyjanunku określono stosunek ADP/O jako bliski jedności. Znaczyłyby to, że w przypadku substratów oddających elektrony przed pierwszym miejscem sprzężenia, czynne jest jedno miejsce fosforylacji, we fragmencie łańcucha wspólnym dla obu dróg. W mitochondriach *Symplocarpus foetidus*, w których droga alternatywna działa w 3 stanie energetycznym zarówno kontrola oddechowa jak i stosunek ADP/O jest niski, podwyższenie tego stosunku można uzyskać przy zahamowaniu drogi alternatywnej kwasami hydroksamowymi (14).

Według chemioosmotycznej teorii Mitchella synteza ATP powiązana jest z reakcjami utleniania w łańcuchu oddechowym poprzez wytworzony na błonie mitochondrialnej gradient stężenia jonów  $H^+$  (25). W mitochondriach zwierzęcych stwierdzono, zgodnie z tą hipotezą, że gradient protonów na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, podczas oddychania mitochondriów regulowanego przez poziom ADP, jest istotnym wskaźnikiem stanu energetycznego mitochondrionu (68, 69). Zenergizowany mitochondrion ma dużą siłę protonomotoryczną  $\Delta p$ , równą  $\Delta \mu_{H^+}/F$  gdzie  $F$  jest stałą Faradaya. Oznaczenia siły protonomotorycznej w mitochondriach roślinnych potwierdziły, że jest to najbardziej bezpośredni wskaźnik stanu energetycznego mitochondrionu (71, 72). Siłę protonomotoryczną oznaczono w mitochondriach izolowanych z tkanek roślinnych charakteryzujących się oddychaniem niewrażliwym na cyjanek (*Phaseolus aureus*, *Symplocarpus foetidus* i *Arum*) (26, 27). Wykazano, że utlenianie

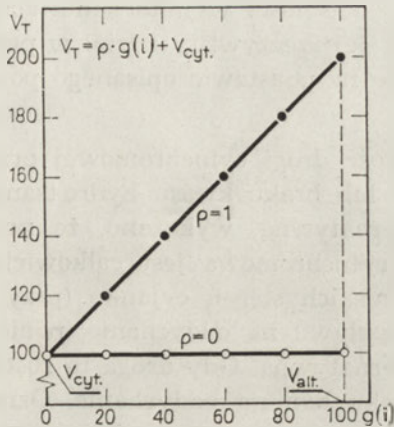
bursztynianu drogą alternatywną nie wytwarza potencjału transmembranowego i w związku z tym nie jest związane z syntezą ATP. Podobnie w mitochondriach drożdży przenoszenie elektronów drogą alternatywną nie jest związane z syntezą ATP (67). Są jednak dane (pochodzące z jednej pracowni) wskazujące na możliwość jednej fosforylacji przy przepływie elektronów związanym z utlenianiem bursztynianu na drodze alternatywnej (73). Dane te dotyczą izolowanych mitochondriów z kultur komórkowych jesionu oraz kwiatów *Arum maculatum*, inkubowanych przy stężeniach tlenu w środowisku reakcji przekraczających  $70 \mu\text{M}$  a także są potwierdzane przez zaobserwowanie odwrotnego transportu elektronów, częściowo niewrażliwego na cyjanek przy użyciu sztucznego donora elektronów — askorbinianu oraz NNN'N'-tetrametyleno p-fenyleno dwuaminy w mitochondriach fasoli. Obserwowany odwrotny transport elektronów zużywałby energię wytworzoną przy transporcie elektronów poprzez drogę alternatywną (74, 75). Na podstawie tych danych postuluje się jedno miejsce sprzężenia, wytwarzające ATP, związane z działaniem oksydazy alternatywnej (76).

## V. Regulacja przepływu elektronów drogą alternatywną

Wykazanie w mitochondriach dwóch dróg oddechowych, działających w pewnym fragmencie wspólnie, a następnie rozgałęziających się i działających równolegle, z których jedna związana jest z wytwarzaniem ATP, a druga nie — stawia pytanie — jaki jest udział każdej z nich w pobieraniu tlenu przez mitochondria i w jaki sposób zachodzi regulacja przepływu elektronów przez te drogi.

Maksymalny przepływ elektronów przez drogę alternatywną  $V_{\text{alt}}$  można łatwo oznaczyć mierząc pobieranie tlenu przez mitochondria w obecności cyjanku. Maksymalny przepływ elektronów drogą cytochromową ( $V_{\text{cyt}}$ ), natomiast można oznaczyć przy zahamowaniu drogi alternatywnej np. odpowiednimi stężeniami kwasów hydroksamowych. Maksymalne aktywności obu dróg wyznaczone w ten sposób po zsumowaniu dają ilość pobranego tlenu wyższą niż oddychanie ( $V_T$ ) mierzone przy braku inhibitorów. Wskazuje to na częściowe tylko wykorzystywanie jednej z dróg (lub obu) i wobec tego konieczne jest oznaczenie udziału każdej z nich w pobieraniu tlenu przez izolowane mitochondria przy braku inhibitorów. Oznaczenie i analizę tego typu opracowali i przeprowadzili po raz pierwszy B a h r i B o n n e r (32). Ustaliwszy maksymalną aktywność drogi alternatywnej w obecności cyjanku, dodawano następnie stopniowo wzrastające stężenia kwasu hydroksamowego (tzw. miareczkowanie drogi alternatywnej). Otrzymane w tych warunkach ilości pobieranego tlenu wyznacza funkcja  $g(i)$  opisująca maksymalny

udział drogi alternatywnej przy danym stężeniu inhibitora tej drogi. Następnie oznaczono pobieranie tlenu przez mitochondria wobec wzrastających stężeń kwasu hydroksamowego przy nie zahamowanej drodze cytochromowej ( $V_T$ ). Wyniki obu miareczkowań przedstawia liniowa zależność  $V_T$  od  $g(i)$  (Ryc. 3). Wykres ten wykazuje, że po pierwsze, droga



Ryc. 3. Oznaczenie udziału alternatywnej drogi oddechowej w pobieraniu tlenu przy nie zahamowanej drodze cytochromowej. Zmodyfikowane wg (32), objaśnienia w tekście.

alternatywna działa przy pewnej stałej aktywności drogi cytochromowej, określonej przez odcinek  $V_{\text{cyt}}$  na osi rzędnych, po drugie, że zmiany aktywności drogi alternatywnej nie mają wpływu na aktywności drogi cytochromowej (w przeciwnym wypadku zależność nie byłaby liniową prostą), po trzecie, że rzeczywisty udział drogi alternatywnej w pobieraniu tlenu ( $V_{\text{alt}}$ ) określa tangens kąta między prostą a osią odciętych, oznaczany jako współczynnik  $\rho$  (ro). Tak więc oddychanie izolowanych mitochondriów ( $V_T$ ) może być opisane przez równanie określające udział obu dróg w przenoszeniu elektronów  $V_T = \rho \cdot g(i) + V_{\text{cyt}}$ . Gdy droga alternatywna uczestniczy w przenoszeniu elektronów wykorzystując swą maksymalną aktywność to współczynnik  $\rho = 1$ , natomiast przy braku udziału drogi alternatywnej współczynnik  $\rho = 0$ , a zależność przybiera postać linii poziomej, równoległej do osi odciętych i  $V_T = V_{\text{cyt}}$  (32).

Opisane powyżej oznaczenia udziału obu dróg w oddychaniu mitochondrialnym pozwoliły na dokonanie ciekawej obserwacji. Mianowicie, okazało się, że udział drogi alternatywnej w oddychaniu częściowo niewrażliwych na cyjanek mitochondriów, znajdujących się w stanie energetycznym 3<sup>\*</sup>), izolowanych z fasoli azjatyckiej lub grochu, jest równy zeru; natomiast, gdy te same mitochondria znajdują się w stanie energetycz-

\* ) Określenia stanów wg Chance'a.



nym 4 (brak ADP) — droga alternatywna uczestniczy w przenoszeniu elektronów (współczynnik  $\rho = 1$ ) (14). Udział drogi alternatywnej w oddychaniu prawie całkowicie nie wrażliwych na cyjanek mitochondriów *Symplocarpus foetidus* będących w 3-cim stanie energetycznym jest mały (współczynnik  $\rho = 0,5$ ) i nieco wzrasta w stanie energetycznym 4 (14). Tak więc brak wrażliwości oddychania mitochondriów na dodany cyjanek świadczy wyłącznie o obecności w mitochondriach alternatywnej drogi oddechowej, natomiast jej rzeczywisty udział w przenoszeniu elektronów można określić jedynie na podstawie opisanego powyżej miareczkowania drogi alternatywnej.

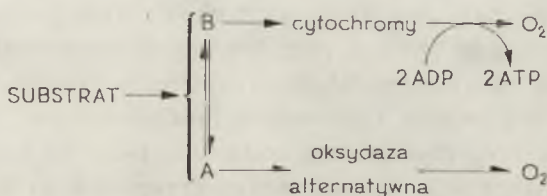
Określając aktywność drogi cytochromowej przy różnych stężeniach cyjanku, w obecności lub braku kwasu hydroksamowego, który hamuje całkowicie drogę alternatywną, wykazano, że przy działającej drodze alternatywnej droga cytochromowa jest całkowicie wysycona (77). Początkowe dodawanie niskich stężeń cyjanku (przy braku kwasu hydroksamowego) nie ma wpływu na oddychanie, ponieważ elektrony kierowane są na drogę alternatywną. Gdy droga ta zostanie wysycona, wtedy wyższe stężenia cyjanku hamują oddychanie. Oznaczony w ten sposób współczynnik  $\rho$  dla drogi cytochromowej był równy jedności, wskazując na pełne wysycenie drogi cytochromowej przy działającej drodze alternatywnej (77).

Opisane wcześniej różnice we współczynniku  $\rho$ , czyli w udziale drogi alternatywnej w przepływie elektronów w mitochondriach znajdujących się w 3-cim lub 4-ym stanie energetycznym, świadczą o regulacji aktywności drogi alternatywnej przez drogę cytochromową. Przy wyższej aktywności drogi cytochromowej niż drogi alternatywnej, droga cytochromowa może pomieścić cały przepływ elektronów w 3-cim stanie energetycznym mitochondriów. Natomiast ograniczenie aktywności drogi cytochromowej np. brakiem ADP w stanie 4-ym, lub niskim stężeniem cyjanku sprawia, że elektrony są kierowane na drogę alternatywną i współczynnik  $\rho$  jest większy od zera. Natomiast, gdy aktywność drogi alternatywnej ( $V_{alt}$ ) jest wyższa niż drogi cytochromowej ( $V_{cyt}$ ), to droga alternatywna działa w stanie 3-cim (np. w mitochondriach *Symplocarpus foetidus*). W tym przypadku ilość elektronów przekracza możliwość przeniesienia ich drogą cytochromową i muszą być one skierowane na drogę alternatywną. Tak więc faktyczny udział drogi alternatywnej w przepływie elektronów w 3-cim stanie energetycznym zależy między innymi i od pojemności przepływu obu dróg czyli stosunku ich wzajemnej aktywności.

Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione powyżej obserwacje B a h r i B o n n e r opracowali następujący model regulacji przepływu elektronów przez obie drogi (32) (Ryc. 4).

Droga alternatywna i droga cytochromowa mają wspólny przenoś-

nik B, który łatwo osiąga stan równowagi z pierwszym przenośnikiem drogi alternatywnej A. Przenośnik B ma potencjał oksydoredukcyjny wyższy niż A, tak, że przy częściowo zredukowanym przenośniku B, przenośnik A — pierwszy akceptor drogi alternatywnej — jest całkowicie utleniony. Przy całkowicie utlenionym przenośniku A nie ma przepływu elektronów drogą alternatywną. Natomiast częściowa redukcja A mogłaby powodować przepływ elektronów drogą alternatywną i wielkość tego przepływu określa omówiony wcześniej współczynnik  $\rho$ . Różnica potencjałów między przenośnikiem B i A powinna wynosić minimum 35 mV (32). W opisanych wcześniej pracach jako wspólny przenośnik obu dróg proponowano ubichinon, którego potencjał oksydoredukcyjny wynosi



**Ryc. 4.** Proponowany mechanizm regulacji przepływu elektronów przez alternatywną drogę oddechową, wg (32). Objasnienia w tekście.

+70 mV. Natomiast flawoproteina  $FP_{ma}$  z potencjałem oksydoredukcyjnym +20 mV miałyby rolę pierwszego akceptora drogi alternatywnej (23, 24). Różnica potencjałów między tymi składnikami +50 mV jest zgodna z opisany powyżej modelem przepływu elektronów przez obie drogi. Ubichinon jest wobec tego przenośnikiem B i stopień jego zredukowania określa aktywność drogi alternatywnej. Ponieważ zaś redukcja ubichinonu zależy zarówno od dopływu elektronów z substratu, jak i od ich odpływu na drogę cytochromową, to aktywność drogi cytochromowej będzie określała aktywność drogi alternatywnej. Przy całkowitym wysyceniu drogi cytochromowej większość ubichinonu będzie zredukowana i wtedy może działać droga alternatywna. Przy zahamowaniu drogi cytochromowej (np. cyjankiem) ubichinon jest w pełni zredukowany i cały przepływ elektronów zachodzi poprzez drogę alternatywną. Podsumowując więc, można powiedzieć na podstawie dotychczasowych badań, że przepływ elektronów przez drogę alternatywną zależy od stopnia zredukowania ubichinonu, który z kolei zależy od dopływu elektronów z substratu dehydrogenaz oraz od aktywności drogi cytochromowej.

Zaproponowano również inny model regulacji przepływu elektronów przez obie drogi (78, 79). Choć opiera się on na nowocześniejszej koncepcji ruchomej puli ubichinonu (80) to jednak zakłada współzawodnictwo obu dróg o zredukowane równoważniki (założenie odrzucone przez Bonnera (32)) i przypadkowość w kierowaniu elektronów na jedną lub drugą drogę. Model ten nie znalazł żadnego oddźwięku w piśmiennictwie.



## VI. Funkcjonowanie alternatywnej drogi oddechowej

### VI-1. Działanie alternatywnej drogi oddechowej w cyklu rozwojowym roślin

Udział oddychania niewrażliwego na cyjanek w oddychaniu całkowitym jest w różnych tkankach i organizmach roślinnych różny, może też zmieniać się w cyklu rozwojowym rośliny. Obszerny wykaz organizmów, u których zaobserwowano oddychanie niewrażliwe na cyjanek zamieścił N y n s (2). W cytowanych pracach udział oddychania niewrażliwego na cyjanek w oddychaniu całkowitym określano na podstawie procentu hamowania oddychania przez cyjanek. W ten sposób nie można jednak ocenić czy w warunkach naturalnych, przy nie zahamowanej drodze cytochromowej, alternatywna droga oddechowa rzeczywiście uczestniczy w pobieraniu tlenu. W pracach publikowanych przed rokiem 1970 oznaczano przeważnie oddychanie całych organizmów, tkanek bądź skrawków tkanek, bez uwzględniania izolowanych mitochondriów i techniki miareczkowania obu dróg (było to spowodowane brakiem znanych inhibitorów drogi alternatywnej). W najlepszym przypadku, przy tego typu badaniach, można jedynie stwierdzić obecność oddychania niewrażliwego na cyjanek, nie koniecznie związanego z działaniem alternatywnej drogi oddechowej. Ponadto wzrost oddychania niewrażliwego na cyjanek (oznaczany jako wzrost hamowania oddychania przez cyjanek) obserwowany w czasie cyklu rozwojowego rośliny, nie zawsze świadczy o rzeczywistym zwiększonym udziale w oddychaniu alternatywnej drogi oddechowej, natomiast może oznaczać po prostu spadek oddychania hamowanego przez cyjanek, przy nie zmienionym poziomie oddychania cyjanoodpornego. Przykładem może być obserwowany wzrost oddychania niewrażliwego na cyjanek w procesie starzenia się liści marchwi (81). Starzeniu temu towarzyszy jednak głównie zmniejszenie się oddychania drogą cytochromową, natomiast oddychanie niewrażliwe na cyjanek pozostaje na stałym poziomie (7). Przyspieszonemu starzeniu się nasion soi towarzyszy również spadek intensywności oddychania drogą cytochromową, przy utrzymującym się bez zmian poziomie oddychania niewrażliwego na cyjanek; droga alternatywna przejmuje jednak elektrony i uczestniczy w pobieraniu tlenu przez starzejące się nasiona (82). W starzejących się skrawkach ziemniaka oddychanie nie jest hamowane przez cyjanek (83-86).

Oznaczenie rzeczywistego udziału drogi alternatywnej w pobieraniu tlenu wykazało — że współczynnik  $\rho$ , określający ten udział, ma wartość zero, tzn. przy braku cyjanunku oddychanie zachodzi wyłącznie przy udziale drogi cytochromowej (77).

W wielu pracach opisywano stymulację kiełkowania nasion przez cyjanek (89-91) i postulowano udział oddychania niewrażliwego na cyjanek we wczesnych etapach kiełkowania nasion (87, 88, 92-95). Aczkolwiek nie można całkowicie odrzucić tego poglądu, są podstawy, aby kwestio-



nować udział mitochondrialnej drogi alternatywnej w kiełkowaniu i nie wydaje się, by można było uogólniać te spostrzeżenia (87, 96). Jak stwierdziła autorka tego artykułu w nasionach jabłoni, podczas ustępowania spoczynku w niskiej temperaturze, oddychanie całych nasion oraz izolowanych mitochondriów jest w części niewrażliwe na cyjanek (80% hamowania), ale transport elektronów zachodzi wyłącznie przy udziale drogi cytochromowej. Natomiast w tych samych nasionach, w czasie kiełkowania, oddychanie jest w 50% niewrażliwe na cyjanek i obie drogi w równym stopniu uczestniczą w pobieraniu tlenu; współczynnik  $q$ , określający udział drogi alternatywnej, równa się jedności (97). W trzech rodzajach nasion (słonecznik, jęczmień, groch) charakteryzujących się odmiennym materiałem zapasowym (lipidy, skrobia, białko) kwasy hydroksamowe nie hamują wcale, lub hamują w bardzo małym stopniu obserwowane oddychanie niewrażliwe na cyjanek (98). Ciekawą obserwacją był duży udział oddychania niewrażliwego zarówno na cyjanek jak i kwas salicylohydroksamowy w oddychaniu ziarniaków jęczmienia. Oddychanie to nie występuje w izolowanych mitochondriach i związane jest prawdopodobnie z układem oksydaz cytoplazmatycznych (98). Podobnie, duży udział oksydaz niewrażliwych na cyjanek i kwasy hydroksamowe zaobserwowano w skrawkach ziemniaka (77). Udział tego typu oksydaz niewrażliwych na cyjanek, ale nie mających jednocześnie nic wspólnego z alternatywną drogą oddechową, w pracach publikowanych przed rokiem 1970 prawdopodobnie często charakteryzowano jako oddychanie niewrażliwe na cyjanek.

W skrawkach dojrzewających owoców awokado i banana droga alternatywna nie uczestniczy w pobieraniu tlenu (współczynnik  $q = 0$ ) (99). Z drugiej strony wykazano, że inhibitory alternatywnej drogi oddechowej hamują proces dojrzewania owoców, a także wykazano w sposób bezsporny zależność między indukcją oddychania przez etylen i odpornością na cyjanek w trakcie dojrzewania owoców (100, 101, 102). Toteż udział drogi alternatywnej w pobieraniu tlenu w procesie dojrzewania owoców jest dyskusyjny (7).

## VI-2. Wpływ czynników zewnętrznych na funkcjonowanie drogi alternatywnej

Szereg autorów próbuje powiązać funkcjonowanie alternatywnej drogi oddechowej zarówno z warunkami metabolicznymi na terenie cytoplazmy, jak również z wpływem czynników zewnętrznych, które powodują indukcję lub uaktywnienie tej drogi. Solomos i Latics (100) zaobserwowali, że zarówno podanie etylenu jak i cyjanku powoduje zainicjowanie klimakterycznego wzrostu oddychania i dojrzewania owoców awokado. Zaobserwowano ponadto, że etylen stymuluje oddychanie wyłącznie w tkankach, które wykazują oddychanie cyjanoodporne (101).

Wyciągnięto więc wniosek, że wzrost oddychania powodowany przez etylen jest wynikiem indukcji drogi alternatywnej, a działanie tej drogi związane jest ściśle z typem metabolizmu w cytoplazmie, a ściślej, ze wzrostem glikolizy aerobowej (100, 103). Oddychanie całych bulw ziemniaka podawane było jako klasyczny przykład oddychania niewrażliwego na cyjanek (103, 104), natomiast cyjanek hamuje oddychanie świeżo przygotowanych skrawków, jak również izolowanych mitochondriów (86, 15). Fakt ten grupa Latiesa tłumaczyła labilnością alternatywnej drogi oddechowej, która przy krojeniu ziemniaka na skrawki lub homogenizacji podczas izolowania mitochondriów, ulega inaktywacji (5, 7, 100, 105-108). Potraktowanie nieuszkodzonych ziemniaków etylenem lub cyjankiem powoduje w ciągu 12 godzin znaczny wzrost intensywności oddychania bulw (103, 109, 110). Wykazano, że oddychanie skrawków oraz mitochondriów izolowanych z traktowanych w ten sposób ziemniaków jest w dużym stopniu odporne na cyjanek (111-114). Wyniki tych badań umożliwiły inną interpretację zjawiska „utruty cyjanoodporności” oddychania izolowanych mitochondriów ziemniaka. Prawdopodobnie nie labilność oksydazy alternatywnej, ale brak tego układu lub jego obecność w formie nieaktywnej w całych bulwach sprawia, że cyjanek silnie hamuje oddychanie mitochondriów izolowanych z bulw nietraktowanych. Niewielka intensywność oddychania spoczynkowych bulw ziemniaka prawdopodobnie nie ma związku z oddychaniem mitochondrialnym, lecz wynika z funkcjonowania oksydaz cytoplazmatycznych, niewrażliwych na cyjanek, inaktywowanych być może przy krojeniu skrawków. Przy znacznie zwiększonym, pod wpływem traktowania etylenem oddychaniu bulw, następuje wzrost oddychania mitochondrialnego, wysycenie elektronami drogi cytochromowej i uaktywnienie drogi alternatywnej, wyrażające się odpornością na cyjanek oddychania skrawków oraz izolowanych mitochondriów. Podanie etylenu lub cyjanku w mieszaninie z tlenem (stężenie prawie 100%) powoduje nie tylko znaczne zwiększenie oddychania (110), ale również całkowitą odporność na cyjanek oddychania świeżo przygotowanych skrawków i izolowanych mitochondriów (53, 111-113). Współczynnik  $q$  takich skrawków wynosi 0,5, co świadczy o faktycznym udziale drogi alternatywnej w oddychaniu (114). Ponadto stwierdzono, że traktowanie bulw ziemniaka etylenem lub cyjankiem powoduje również zmianę stężenia produktów pośrednich glikolizy, w sposób świadczący o stymulacji glikolizy (101, 103, 115).

Traktowanie całych ziemniaków alkoholem etylowym, aldehydem octowym czy kwasem octowym (podanymi w formie gazowej jako mieszanina z powietrzem lub tlenem) może również uaktywniać drogę alternatywną w bulwach ziemniaka (115-117). Związki te działają bardziej efektywnie, gdy podawane są w obecności tlenu (tlen w stężeniu blisko 100%) i podobnie jak etylen oraz cyjanek powodują stymulację glikolizy aerobowej (115). Wysokie stężenie tlenu stosowane wraz z wymienionymi



powyżej związkami skraca również okres zwłoki niezbędny do uaktywnienia drogi alternatywnej (116). Wpływ wysokiego stężenia tlenu (ponad 21<sup>0</sup>%) na aktywację drogi alternatywnej obserwowano również w nasionach (51) i kulturach komórkowych jesionu (52).

Uaktywnienie drogi alternatywnej w roślinach wyższych może nie być wynikiem syntezy jej składników, ale może polegać na regulacji dostępu tlenu do białek błony mitochondrialnej (34). Etylen, cyjanek (być może również etanol i aldehyd octowy) mogą zmieniać własności błon mitochondrialnych, między innymi ich przepuszczalność, ułatwiając dostęp tlenu (100).

Możliwy jest również inny mechanizm działania tzw. „induktorów” alternatywnej drogi oddechowej. Zarówno aldehyd octowy, alkohol etylowy czy kwas octowy mogą służyć jako substraty oddechowe powodując w ten sposób wysycenie łańcucha przenoszenia elektronów i zwiększenie całkowitego pobierania tlenu (118). Obserwowany wzrost aktywności glikolizy pod wpływem etylenu lub cyjanku i innych „induktorów” przemawiałby za tym mechanizmem (117). Indukowany przez etylen wzrost oddychania w tkance batatów (*Ipomoea batatas*) (119) odzwierciedla przemiany metaboliczne w cytoplazmie (120). Oddychanie bulw ziemniaka w warunkach naturalnych jest ograniczone dostępnością substratów, podanie etylenu czy też innych związków może to ograniczenie usuwać powodując stymulację oddychania (121). Choć koncepcja ta, jak podkreślano wcześniej, jest zgodna z postulowanym przez B a h r a i B o n n e r a (32) mechanizmem uaktywniania drogi alternatywnej poprzez wysycenie drogi cytochromowej, to jednak pozostają pewne wątpliwości, np. czy intensywna glikoliza jest przyczyną czy skutkiem zwiększonej aktywności drogi alternatywnej (7).

Inną wreszcie możliwością uaktywnienia drogi alternatywnej w ziemniaku jest hamujące działanie aldehydu octowego, etanolu czy kwasu octowego na drogę cytochromową, co powodowałoby ograniczenie jej aktywności, wysycenie i włączenie oddychania drogą alternatywną (117). Koncepcja ta jest analogiczna do opisywanej indukcji alternatywnej drogi oddechowej u drożdży lub *Neurospora* (64, 122).

Uaktywnienie oddychania drogą alternatywną może nastąpić również w wyniku podania 10<sup>0</sup>% dwutlenku węgla wraz z tlenem i etylenem (123). Prawdopodobnie tlen i dwutlenek węgla działają synergistycznie z etylenem, aczkolwiek rola tych gazów w indukcji oddychania niewrażliwego na cyjanek nie jest wyjaśniona (7, 123).

Synergistyczny efekt dwutlenku węgla i etylenu wykazano również w przerywaniu spoczynku nasion sałaty (124) oraz w aktywacji ATP-azy w liściach grochu (125). Hodowla żyta w atmosferze 75<sup>0</sup>% tlenu i 25<sup>0</sup>% dwutlenku węgla powoduje wzrost oddychania niewrażliwego na cyjanek w izolowanych mitochondriach (51).

Uaktywnienie drogi alternatywnej na skutek traktowania całego orga-



nizmu roślinnego różnymi czynnikami zachodzi w większości opisywanych przypadków przy nie zahamowanej, działającej drodze cytochromowej. Świadczą o tym wyniki oznaczenia oddychania mitochondriów izolowanych z tkanek traktowanych etylenem; dodanie inhibitora drogi alternatywnej powoduje w tych mitochondriach wzrost kontroli oddechowej oraz stosunku ADP/O, świadczące o działającej drodze cytochromowej (112).

## VII. Znaczenie fizjologiczne alternatywnej drogi oddechowej

Omawiając znaczenie fizjologiczne obecności i funkcjonowania drogi alternatywnej (a nie oddychania niewrażliwego na cyjanek!) należy ograniczyć się do rozpatrywania tych przypadków, gdzie udział tej drogi w oddychaniu ogólnym został bezspornie stwierdzony.

Udział drogi alternatywnej w oddychaniu wykazano u roślin należących do rodziny Obrzkowate (*Araceae*). Omówiono już w pierwszej części artykułu wyniki doświadczeń, w których zastosowano mitochondria izolowane z *Sauromatum gattatum*, *Symplocarpus foetidus* czy *Arum maculatum* (3). Procesowi kwitnienia tych roślin towarzyszy znaczny wzrost temperatury w pobliżu kwiatów oraz kwiatostanów. Temperatura ta może przekroczyć nawet o 22° temperaturę otoczenia (3). Znaczenie fizjologiczne drogi oddechowej u tych roślin polegać mogłoby więc na ogrzewaniu rośliny, co powodowałoby intensywniejszy jej zapach, wabiąc owady i umożliwiając zapylenie, w warunkach gdy temperatura otoczenia jest niska. Jednak przypadek ten jest dość odosobniony i u wielu innych roślin działanie drogi alternatywnej nie ma związku z wydzielaniem ciepła.

Aktywność (pojemność transportu elektronów) drogi cytochromowej i alternatywnej związana może być ze stężeniem związków cyjanogennych w roślinie. Oddychanie mitochondriów z korzeni tapioki o niskiej zawartości glikozydów cyjanogennych jest przez cyjanek bardziej hamowana niż oddychanie mitochondriów izolowanych z korzeni tapioki o wysokim stężeniu tych związków (różnica 30%) (126). Występowanie glikozydów cyjanogennych oraz cyjanowodoru stwierdzono u wielu gatunków roślin (127, 128). Amygdalina oraz wolny cyjanowodór występuje między innymi w nasionach jabłoni (129, 130, potwierdzone w nowszych badaniach 131, 132). W nasionach tych, w procesie kiełkowania, droga alternatywna bierze udział w oddychaniu (97) i związane to być może właśnie z ograniczeniem, przez endogenne cyjanowodór, aktywności drogi cytochromowej.

Jednakże udział drogi alternatywnej wykazano u wielu roślin, u których nie stwierdzono cyjanowodoru i które nie wytwarzają ciepła. Wiązać to można z gospodarką energetyczną tkanki w określonym stadium

fizjologicznym. Bah r i Bonner (32) określili, że rola alternatywnej drogi oddechowej polega na przyjmowaniu elektronów, które nie mogą być akceptowane (na skutek ograniczonej aktywności) przez drogę cytochromową. W tym przypadku działanie drogi alternatywnej, charakteryzujące się ograniczoną zdolnością do fosforylacji, może prowadzić do odtwarzania utlenionych form koenzymów. Odgrywać to może szczególnie rolę np. w procesie kiełkowania nasion. Palmer (4) sądzi, że wysycenie drogi cytochromowej i włączenie drogi alternatywnej może mieć miejsce przy zwiększonym utlenianiu NADH w warunkach małego zapotrzebowania na ATP. Pozwalałoby to na funkcjonowanie cyklu Krebsa i dzięki temu dostarczenie prekursorów do biosyntezy. Może to mieć miejsce nie tylko we wczesnych etapach kiełkowania nasion, ale również w dojrzewaniu owoców czy w warunkach szeroko pojętego stresu fizjologicznego, ograniczającego aktywność drogi cytochromowej. Udział alternatywnej drogi oddechowej wykazano między innymi w oddychaniu roślin znajdujących się w warunkach stresu spowodowanego chłodem (133, 134) oraz zranieniem (118). Alternatywna droga oddechowa odgrywałaby więc w pewnych określonych warunkach rolę „wentyla bezpieczeństwa” przy zwiększonym zapotrzebowaniu na procesy oksydacyjne w tkance. Obecność drogi alternatywnej byłaby tkance potrzebna, natomiast jej funkcjonowanie byłoby uzależnione od potrzeb organizmu.

### VIII. Uwagi końcowe

Omówione w niniejszym artykule wyniki dwudziestoletnich badań prowadzonych w wielu pracowniach nie doprowadziły do określenia przENOŚNIKÓW wchodzących w skład alternatywnej drogi oddechowej. Ponadto zarówno kwestia końcowego produktu redukcji tlenu jak i oksydacyjnej fosforylacji wymagają definitywnego wyjaśnienia.

Badania alternatywnej drogi oddechowej napotykają na trudności głównie natury metodycznej — własności spektralne jej przENOŚNIKÓW są zbliżone do przENOŚNIKÓW głównego łańcucha oddechowego. Ponadto izolowanie oksydazy alternatywnej przy obecnie dostępnych technikach jest utrudnione jej ścisłym powiązaniem z wewnętrzną błoną mitochondrialną i pozostałą częścią łańcucha oddechowego. Znalezienie sztucznych donorów elektronów (49, 50) oraz izolacja kompleksu enzymatycznego, który może być fragmentem alternatywnej drogi oddechowej, stanowi napewno postęp w tych badaniach.

Przy jednolitym systemie regulacji działania alternatywnej drogi oddechowej u roślin wyższych trudno jednak doszukiwać się jednolitego znaczenia fizjologicznego jej funkcjonowania. Z omówionych w poprzednim rozdziale przykładów wynika, że znaczenie to może być różnorakie,

w zależności od rośliny, jej cyklu rozwojowego, a przede wszystkim od typu metabolizmu tkanki.

Zaakceptowano do druku 10.12.1981

## PISMIENICTWO

1. Bendal D. S., Bonner W. D. Jr., (1971) *Plant Physiol.*, **47**, 236—245.
2. Henry M. F., Nyns E. J., (1975) *Sub.-Cell. Biochem.*, **4**, 1—65.
3. Meeuse B. J. D., (1975) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 117—126.
4. Palmer J. M., (1976) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 133—157.
5. Solomos T., (1977) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 279—297.
6. Drabikowska A. K., (1978) *Post. Bioch.*, **24**, 59—75.
7. Day D. A., Arron G. P., Laties G. G., (1980) *The Biochemistry of Plants*, vol. 2, Academic Press Inc., 197—241.
8. Lambers H., (1980) *Plant, Cell and Environment*, **3**, 293—302.
9. Beevers H., (1961) w *Respiratory metabolism in plants* red. Row-Peterson Evanston SU. White Plains, N.Y.
10. James W. O., Elliot D. C., (1955) *Nature Lond.*, **175**, 89.
11. Hackett D. P., (1957) *J. Exp. Bot.*, **8**, 157—171.
12. Lance C., Bonner W. D. Jr., (1968) *Plant Physiol.*, **43**, 756—766.
13. Wedding R. T., McCready C. C., Harley J. L., (1973) *New Phytol.*, **72**, 1—13.
14. Bahr J. T., Bonner W. D., Jr., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 3441—3445.
15. Hackett D. P., Haas D. W., Griffiths S. K., Niederpruem D. J., (1960) *Plant Physiol.*, **35**, 8—19.
16. Ikuma H., (1972) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 419—436.
17. Storey B. T., Bahr J. T., (1969) *Plant Physiol.*, **44**, 126—134.
18. Passam H., Palmer J. M., (1972) *J. Exp. Bot.*, **23**, 366—374.
19. Storey B. T., (1970) *Plant Physiol.*, **45**, 447—454.
20. Storey B. T., (1970) *Plant Physiol.*, **46**, 13—20.
21. Storey B. T., (1970) *Plant Physiol.*, **46**, 625—630.
22. Erecińska M., Storey B. T., (1970) *Plant Physiol.*, **46**, 618—624.
23. Storey B. T., (1971) *Plant Physiol.*, **48**, 493—497.
24. Storey B. T., (1976) *Plant Physiol.*, **58**, 521—525.
25. Mitchell P., (1966) *Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation*. Glynn Research Ltd. Bodwin U. K.
26. Moore A. L., Rich P. R., Bonner W. D. Jr., (1978) *J. Exp. Bot.*, **29**, 1—2.
27. Moore A. L., Bonner W. D. Jr., Rich P. R., (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **186**, 298—306.
28. Rich P., Moore A. L., (1976) *FEBS Lett.*, **65**, 339—344.
29. Lloyd D., Edwards S. W., (1977) *FEBS II Meeting Copenhagen*, red. Degn H., Lloyd D., Hill G. t. 46, str. 1—7, Pergamon Press.
30. Storey B. T., Bahr J. T., (1969) *Plant Physiol.*, **44**, 115—125.
31. James W. O., Beevers H., (1950), *New Phytol.*, **49**, 353—374.
32. Bahr J. T., Bonner W. D., Jr., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 3446—3450.
33. Schonbaum G. R., Bonner W. D. Jr., Storey B. T., Bahr J. T., (1971) *Plant Physiol.*, **47**, 124—128.
34. Dizengremel P., Chauveau M., Lance C., (1973) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **277**, 239—232.



35. Lance C., Dizengremel P., Chauveau M., (1977) FEBS II Meeting Copenhagen red. Regn H., Lloyd D., Hill G., t. 46, str. 133—139, Pergamon Press.
36. Chauveau M., Dizengremel P., Lance C., (1978) *Physiol. Plant*, **42**, 214—220.
37. Bonner W. D. Jr., Rich P. R., (1978) w *Plant Mitochondria*, red. Ducet G., Lance C., str. 241—248, Elsevier Biomed. Press.
38. Haddock B. A., Garland P. B., (1971) *Biochem. J.*, **124**, 155—170.
39. Henry M. F., Bonner W. D. Jr., Nyns E. J., (1974) *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **82**, 990.
40. Henry M. F., Bonner W. D. Jr., Nyns E. J., (1977) *Biochem. Biophys. Acta*, **460**, 94—100.
41. Henry M. F., Nyns E. J., (1977) *Arch. Microbiol.*, **114**, 171—174.
42. Malkin R., (1973) w *Iron-Sulphur Proteins* red. W. Lovenberg 2, 1—26, Academic Press, New York.
43. Schonbaum G. R., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 502—511.
44. Rich P. R., Bonner W. D. Jr., (1977) *Plant Physiol.*, **59**, 60P.
45. Rich P. R., Wiegand N. K., Blum H., Moore A. L., Bonner W. D. Jr., (1978) *Biochem. Biophys. Acta*, **525**, 325—337.
46. Grover S. A., Laties G. G., (1978) w *Plant Mitochondria* red. Ducet G., Lance C., str. 259—266, Elsevier, Amsterdam.
47. Hug S., Palmer J. M., (1978) *FEBS Lett.*, **92**, 317—320.
48. Hug S., Palmer J. M., (1978) *FEBS Lett.*, **95**, 217—220.
49. Hug S., Palmer J. M., (1978) w *Plant Mitochondria*, red. Ducet G., Lance C. str. 225—232, Elsevier Biomed. Press.
50. Rich P. R., Bonner W. D. Jr., (1978) w *Plant Mitochondria*, red. Ducet G., Lance C., str. 61—68, Elsevier Biomed. Press.
51. McCaig T. N., Hill R. D., (1977) *Can. J. Bot.*, **55**, 549—555.
52. Wilson S. B., (1971) *FEBS Letters* **15**, 49—52.
53. Rychter A., Janes H. W., Frenkel C., (1978) *Plant Physiol.*, **61**, 667—668.
54. Lambers H., Smakman G., (1978) *Physiol. Plant.*, **42**, 163—166.
55. Lambers H., Steingrover E., (1978) *Physiol. Plant.*, **42**, 179—184.
56. Lambers H., Steingrover E., Smakman G., (1978) *Physiol. Plant.*, **43**, 277—281.
57. Matsunoka S., Conti S. F., (1966) *Plant Physiol.*, **41**, 1370—1375.
58. Weston J. A., Collins P. A., Knowles C. J., (1974) *Biochem. Biophys. Acta*, **368**, 148—157.
59. Lyr H., Schewe T., (1975) *Acta Biol. Med. Ger.*, **54**, 1631—1641.
60. Sherald J. L., Sisler H. D., (1972) *Plant Cell Physiol.*, **13**, 1039—1052.
61. Rich P. R., Boveris A., Bonner W. D. Jr., Moore A. L., (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 695—703.
62. Rich P. R., Bonner W. D. Jr., (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 206—213.
63. Hug S., Palmer J. M., (1978) *Plant Sci. Lett.*, **11**, 351—358.
64. Downie J. A., Garland P. B., (1973) *Biochem. J.*, **134**, 1051—1061.
65. Hackett D. P., Haas W. D., (1958) *Plant Physiol.*, **33**, 27—32.
66. Lance C., (1974) *Plant Sci. Lett.*, **2**, 165—171.
67. de Troostembergh J. C., Nyns E. J., (1978) *Arch. Microbiol.*, **116**, 297—302.
68. Nicholls D. G., (1974) *Eur. J. Biochem.*, **49**, 573—583.
69. Nicholls D. G., (1974) *Eur. J. Biochem.*, **50**, 305—315.
70. Mitchell P., Moyle J., (1969) *Eur. J. Biochem.*, **7**, 471—484.
71. Moore A. L., (1977) *Biochem. Biophys. Acta* **460**, 455—466.

72. Moore A. L., (1977) *FEBS II Meeting Copenhagen*, red. Degn H., Lloyd D., Hill G. C., t. 46, str. 141—147, Pergamon Press.
73. Wilson S. B., (1970) *Biochem. Biophys. Acta* **223**, 383—387.
74. Wilson S. B., Moore A. L., (1973) *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 881.
75. Wilson S. B., (1977) *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1508—1509.
76. Wilson S. B., (1978) *Biochem. J.*, **176**, 129—136.
77. Theologis A., Laties G. G., (1978) *Plant Physiol.*, **62**, 232—237.
78. de Troostembergh J. C., Nyns E. J., (1977) *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, **85**, 404—406.
79. de Troostembergh J. C., Nyns E. J., (1978) *Eur. J. Biochem.*, **85**, 423—432.
80. Kröger A., Klingenberg, (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 348—367.
81. James W. O., (1953) w *Plant Respiration*, Oxford Univ. Press (Clarendon) London and New York.
82. Leopold A. C., Musgrave M. E., (1980) *Physiol. Plant.*, **49**, 49—54.
83. Romberger J. A., Norton G., (1961) *Plant Physiol.*, **36**, 20—29.
84. Laties G. G., (1963) w *Control mechanisms in respiration and fermentation*, wyd. Wright, str. 129—155, Ronald Press, New York.
85. Laties G. G., (1964) *Plant Physiol.*, **39**, 654—663.
86. Dizengremel P., Lance P., (1976) *Plant Physiol.*, **58**, 147—151.
87. Yentur S., Leopold A. C., (1976) *Plant Physiol.*, **57**, 274—276.
88. Burguillo P. F., Nicolas G., (1977) *Plant Physiol.*, **60**, 524—527.
89. Hendricks S. B., Taylorson R. B., (1972) *Nature*, **237**, 169—170.
90. Taylorson R. B., Hendricks S. B., (1973) *Plant Physiol.*, **52**, 23—27.
91. Major W., Roberts E. H., (1968) *J. Exp. Bot.*, **19**, 77—89.
92. Rollin P., (1975) *Physiol. Veg.* **13**, 369—382.
93. James T. W., Spencer M. S., (1979) *Plant Physiol.*, **64**, 431—434.
94. Esashi Y., Wakabalashi S., Tsukada Y., Satoh S., (1979) *Plant Physiol.*, **63**, 1039—1043.
95. Yu K. S., Mitchell C. A., Yentur S., Robitaille H. A., (1979) *Plant Physiol.*, **63**, 121—125.
96. Siedow J. N., Girvin M. R., (1980) *Plant Physiol.*, **65**, 669—674.
97. Bogatek R., Rychter A., (1981) w przygotowaniu do druku.
98. Ostrowska E. B., Rychter A., (1981) w przygotowaniu do druku.
99. Theologis A., Laties G. G., (1978) *Plant Physiol.*, **62**, 249—255.
100. Solomos T., Laties G. G., (1974) *Plant Physiol.*, **54**, 506—511.
101. Solomos T., Laties G. G., (1976) *Plant Physiol.*, **58**, 47—50.
102. Solomos T., Laties G. G., (1976) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 663—671.
103. Solomos T., Laties G. G., (1975) *Plant Physiol.*, **55**, 73—78.
104. Hanes C. S., Barker J., (1931) *Proc. R. Soc. Lond. Ser., B* **108**, 95—118.
105. Laties G. G., Hoelle C., Jacobson B. S., (1972) *Phytochem.*, **11**, 3403—3411
106. Theologis A., Laties G. G., (1976) *Plant Physiol.*, **57**, S—93.
107. Waring A. J., Laties G. G., (1977) *Plant Physiol.*, **60**, 5—10.
108. Waring A. J., Laties G. G., (1977) *Plant Physiol.*, **60**, 11—16.
109. Reid S. M., Pratt H. R., (1972) *Plant Physiol.*, **49**, 252—255.
110. Chin C., Frenkel C., (1977) *Plant Physiol.*, **59**, 515—518.
111. Rychter A., Janes H. W., Chin C., Frenkel C., (1977) *Plant Physiol.*, **59**, S—648.
112. Rychter A., Janes H. W., Frenkel C., (1979) *Plant Physiol.*, **63**, 149—151.

113. Frenkel C., Janes H. W., Rychter A., (1978) w *Plant Mitochondria*, wyd. Ducet G., Lance C. str. 315—322, Elsevier North Holland Biomedical Press.
114. Janes H. W., (1980) dane niepublikowane.
115. Rychter A., Janes H. W., Chin C., Frenkel C., (1979) *Plant Physiol.*, **64**, 108—111.
116. Janes H. W., Rychter A., Frenkel C., (1979) *Plant Physiol.*, **63**, 837—810.
117. Janes H. W., Rychter A., Frenkel C., (1981) *Planta*, **151**, 201—205.
118. Kinraide T. B., Marck L. F., (1980) *Plant Physiol.*, **65**, 409—410.
119. Tomlinson P. T. Jr., Moreland D. E., (1975) *Plant Physiol.*, **55**, 365—369.
120. Arron G. P., Day D. A., Grover S. D., Laties G. G., (1978) *Aust. J. Plant. Physiol.*, **5**, 239—48.
121. Theologis A., Laties G. G., (1978) *Plant Physiol.*, **62**, 243—248.
122. Schwab A. J., (1973) *FEBS Lett.*, **35**, 63—66.
123. Day D. A., Arron G. P., Christoffersen R. E., Laties G. G., (1978) *Plant Physiol.*, **62**, 820—825.
124. Keys R. D., Orrin E. S., Kumamoto J., Lyon J. L., (1975) *Plant Physiol.*, **56**, 826—829.
125. Malhotra S. S., Spencer M., (1974) *Can. J. Biochem.*, **52**, 1091—1096.
126. Passam H. C., (1976) *Plant Sci. Lett.*, **7**, 211—218.
127. Eyjolfsson R., (1970) *Progress in the Chemistry of Org. Natural Products*, **28**, 74—108.
128. Seigler D. S., (1977) *Progress in Phytochem.*, **4**, 83—120.
129. Lehmann E., (1874) *Pharmaceut. L.*, (fur Russ.) **13**, 33—46.
130. Lehmann E., (1874) *Pharmaceut. L.*, (fur Russ.) **13**, 65—78.
131. Dziewanowska K., Niedźwiedź I., Lewak St., (1979) *Physiol. Veg.*, **17**, 681—686.
132. Dziewanowska K., Niedźwiedź I., Lewak St., (1979) *Physiol. Veg.*, **17**, 687—695.
133. Yoshida S., Tagawa F., (1979) *Plant Cell Physiol.*, **20**, 1243—1250.
134. Leopold A. C., Musgrave M. E., (1979) *Plant Physiol.*, **64**, 702—705.

Po złożeniu artykułu ukazały się dwie bardzo interesujące prace przeglądowe: Lambers H., (1982) *Plant. Physiol.*, **55**, 478—485 i Laties G. G., (1982) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33** w druku.



1. Introduction 1

2. Theoretical Framework 2

3. Methodology 3

4. Results 4

5. Discussion 5

6. Conclusion 6

7. References 7

8. Appendix 8

9. Bibliography 9

10. Index 10

11. Glossary 11

12. Acknowledgements 12

13. Author's Note 13

14. Correspondence 14

15. Contact Information 15

16. Funding 16

17. Conflicts of Interest 17

18. Ethics Statement 18

19. Data Availability 19

20. Open Access 20

21. Peer Review 21

22. Copyright 22

23. Disclaimer 23

24. Terms and Conditions 24

25. Privacy Policy 25

26. About Us 26

27. Mission Statement 27

28. Vision Statement 28

29. Core Values 29

30. Services 30

31. Products 31

32. Pricing 32

33. Contact Us 33

34. Feedback 34

35. Support 35

36. Privacy 36

37. Security 37

38. Quality 38

39. Innovation 39

40. Sustainability 40

41. Diversity 41

42. Inclusion 42

43. Community 43

44. Partners 44

45. Sponsors 45

46. Media 46

47. Press 47

48. Awards 48

49. Certifications 49

50. Licenses 50

51. Trademarks 51

52. Patents 52

53. Intellectual Property 53

54. Legal 54

55. Terms of Use 55

56. Privacy Policy 56

57. Cookies 57

58. Accessibility 58

59. Usability 59

60. User Experience 60

61. Customer Satisfaction 61

62. Net Promoter Score 62

63. Customer Retention 63

64. Churn Rate 64

65. Lifetime Value 65

66. Customer Lifetime Value 66

67. Customer Acquisition Cost 67

68. Return on Investment 68

69. Return on Advertising Spend 69

70. Return on Marketing Spend 70

71. Return on Customer Acquisition 71

72. Return on Customer Retention 72

73. Return on Customer Lifetime Value 73

74. Return on Customer Acquisition Cost 74

75. Return on Customer Lifetime Value Cost 75

76. Return on Customer Lifetime Value Investment 76

77. Return on Customer Lifetime Value Spend 77

78. Return on Customer Lifetime Value Expense 78

79. Return on Customer Lifetime Value Revenue 79

80. Return on Customer Lifetime Value Profit 80

81. Return on Customer Lifetime Value Contribution 81

82. Return on Customer Lifetime Value Margin 82

83. Return on Customer Lifetime Value Yield 83

84. Return on Customer Lifetime Value Rate 84

85. Return on Customer Lifetime Value Ratio 85

86. Return on Customer Lifetime Value Index 86

87. Return on Customer Lifetime Value Score 87

88. Return on Customer Lifetime Value Grade 88

89. Return on Customer Lifetime Value Rating 89

90. Return on Customer Lifetime Value Classification 90

91. Return on Customer Lifetime Value Category 91

92. Return on Customer Lifetime Value Subcategory 92

93. Return on Customer Lifetime Value Group 93

94. Return on Customer Lifetime Value Segment 94

95. Return on Customer Lifetime Value Market 95

96. Return on Customer Lifetime Value Industry 96

97. Return on Customer Lifetime Value Sector 97

98. Return on Customer Lifetime Value Economy 98

99. Return on Customer Lifetime Value Global 99

100. Return on Customer Lifetime Value International 100

ADAM EDMUND LICZMAŃSKI \*)

## Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe

### The Plant Superoxide Dismutases

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Występowanie dysmutaz ponadtlenkowych w organizmach roślinnych i ich organelach komórkowych w aspekcie filogenetycznym
  - II-1. Dysmutazy ponadtlenkowe mikroorganizmów, glonów, grzybów i roślin wyższych
  - II-2. Występowanie dysmutaz ponadtlenkowych w komórkach prokariotów i eukariotów roślinnych
  - II-3. Wnioski, hipotezy, spekulacje
- III. Właściwości fizyko-chemiczne roślinnych dysmutaz
  - III-1. Masy cząsteczkowe i budowa enzymów
  - III-2. Widma absorpcji
  - III-3. Skład aminokwasowy
  - III-4. Metale jako grupy prostetyczne, sposób i miejsce wiązania oraz ich funkcje w enzymie
  - III-5. Mechanizmy działania centrów aktywnych
  - III-6. Inhibitory dysmutaz ponadtlenkowych
- IV. Dysmutazy ponadtlenkowe roślin wrażliwych na przechładzanie
- V. Rola dysmutazy ponadtlenkowej
- VI. Podsumowanie

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Distribution of superoxide dismutases in plants and their cellular organelles in phylogenic aspect
  - II-1. Superoxide dismutases of microorganisms, algae, fungus and higher plants

---

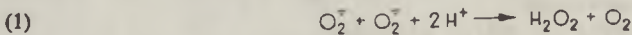
\*) Mgr, Zakład Enzymatyki Instytutu Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.

Stosowane skróty: Fe-SOD — żelazowa dysmutaza ponadtlenkowa, Mn-SOD — manganowa dysmutaza ponadtlenkowa, Cu/Zn-SOD — miedziowo-cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa, EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny, DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy; Tris — tris (hydroksymetylo-) aminometan, DCIP — 2,6-dichlorofenolindofenol.

- II-2. Distribution of superoxide dismutases in procariotic and eucariotic plant cells
- II-3. Conclusions, hypotheses, apeculations
- III. The physic-chemical properties of the plant dismutases
  - III-1. Molecular weights and structure of the enzymes
  - III-2. The absorption spectra
  - III-3. Amino acid composition
  - III-4. Metals as prostetic groups — binding, involvement and function in enzyme
  - III-5. Mechanisms of action of the active centers
  - III-6. Inhibitors of superoxide dismutases
- IV. Superoxide dismutases in the chilling-sensitive plants
  - V. The role of superoxide dismutase
- VI. Summary

## I. Wstęp

Badanie toksycznego działania tlenu, zwłaszcza produktów pośrednich jego redukcji doprowadziły Fridovicha i McCorda (1) do odkrycia w 1968 roku zjawiska dysmutacji jonów ponadtlenkowych i wyodrębnienia enzymu katalizującego reakcję dysproporcjonowania. Enzym



Reakcja 1: Reakcja dysmutacji jonów ponadtlenkowych katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową (3)

ten nazwany dysmutazą ponadtlenkową (2), należy do grupy oksydoreduktaz o nazwie systematycznej — oksydoreduktaza ponadtlenek : ponadtlenek (EC 1.18.1.1). W pracach poświęconych dysmutazie ponadtlenkowej najczęściej używa się skrótu pochodzącego od jej angielskiej nazwy *superoxide dismutase* — SOD.

Różnorodne zagadnienia dotyczące dysmutazy ponadtlenkowej były ostatnio przedmiotem dwóch Międzynarodowych Sympozjów w 1976 i 1979 roku oraz artykułu Michalskiego zamieszczonego w Postęпах Biochemii (3), w którym autor omówił między innymi: reakcje wytwarzające rodniko-jon ponadtlenkowy, lokalizację tychże w komórce oraz metody oznaczania aktywności enzymu. Tematem niniejszego artykułu są badania nad roślinnymi dysmutazami ponadtlenkowymi i ich rolą w komórce roślinnej.

Z bogatego materiału roślinnego wyizolowano różne, pod względem właściwości fizyko-chemicznych, dysmutazy ponadtlenkowe. Enzymy każdego typu zawierają specyficzną grupę prostetyczną, którą jest jon metalu. Stosując to kryterium podziału wyróżnia się dysmutazy ponadtlenkowe: a) żelazową (Fe-SOD), b) manganową (Mn-SOD), i c) miedziowo-cynkową (Cu/Zn-SOD) (4).



Tabela 1

Wykaz organizmów roślinnych, z których otrzymano bądź oczyszczono dysmutazy ponadtlenkowe (Objaśnienia: (+) — oznacza, z danego organizmu otrzymano, bądź oczyszczano enzym, (-), nie badano, bądź nie stwierdzono enzymu).

Organizm	Rodzaje dysmutazy ponadtlenkowej			Piśmiennictwo
	Fe-SOD	Mn-SOD	Cu/Zn-SOD	
<b>Bakterie beztlenowe</b>				
<i>Chromatium vinosum</i>	+	—	—	12
<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	+	—	—	13
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	+	—	—	14
<b>Bakterie fakultatywne i tlenowe</b>				
<i>Escherichia coli</i>	+	+	—	20, 31, 32
<i>Mycobacterium phlei</i>	—	+	—	21
<i>M. sp. Strain Takeo</i>	—	+	—	22
<i>M. lepraemurium</i>	—	+	—	23
<i>Streptococcus mutnas</i>	—	+	—	24
<i>S. faecalis</i>	—	+	—	25
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	—	+	—	26
<i>Termus aquaticus</i>	—	+	—	27
<i>T. termophilus</i>	—	+	—	28
<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	—	+	—	29
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	—	—	30
<i>Photobacterium sepieae</i>	+	—	—	19
<i>P. leiognathi</i>	+	—	—	19
<i>Pseudomonas ovalis</i>	+	—	—	33
<i>Bacillus megaterium</i>	+	—	—	67
<b>Glony</b>				
<i>Plectonema boryanum</i>	+	—	—	4,42
<i>Spirulina platensis</i>	+	—	—	10
<i>Anacystis nidulans</i>	+	—	—	43
<i>Porphyridium cruentum</i>	—	+	—	45
<i>Porphyratenera</i>	—	+	—	40
<b>Grzyby</b>				
<i>Saccharomycetes</i>	—	+	+	49, 50, 53
<i>Fusarium</i>	—	—	+	51
<i>Neurospora</i>	—	—	+	52
<i>Pleurotus olearius</i>	—	+	—	53
<b>Rośliny wyższe</b>				
<i>Pisum sativum</i>	—	+	+	54, 55, 63
<i>Triticum sp.</i>	—	+	+	56
<i>Spinacia oleracea</i>	—	+	+	59, 62
<i>Phaseolus vulgaris</i>	—	+	+	60
<i>Heliantus tuberosus</i>	—	+	—	61
<i>Zea mays</i>	—	+	—	55
<i>Lycopersicon esculentum</i>	—	+	+	98—101
<i>Brassica campestris</i>	+	—	—	68
<i>Camelia sp.</i>	—	+	—	62

## II. Występowanie dysmutaz ponadtlenkowych w organizmach roślinnych i ich organellach komórkowych w aspekcie filogenetycznym

### II-1. Dysmutazy ponadtlenkowe mikroorganizmów, glonów, grzybów i roślin wyższych

W 1975 roku Morris i Hewitt (5) wykryli obecność dysmutazy ponadtlenkowej w fotosyntetyzujących anaerobach: bakteriach redukujących siarczany i beztlenowych *Clostridium*. Następnie enzym ten wykryto u obligatoryjnych anaerobów (6), w bakterioidach (7, 11) i innych bakteriach fermentacyjnych (8, 9, 10). Żelazową dysmutazę ponadtlenkową wyizolowano z fotosyntetyzujących beztlenowców (Tabela 1). Molekularne właściwości żelazowej dysmutazy ponadtlenkowej z wymienionych w tabeli 1 anaerobów są podobne do właściwości tego enzymu z prokariotów tlenowych (40). Występowanie dysmutazy ponadtlenkowej w organizmach beztlenowych sugeruje, że wytwarzały one tlen w przeszłości co mogłoby wskazywać na prawdopodobną korelację pomiędzy występowaniem dysmutazy ponadtlenkowej i składem atmosfery.

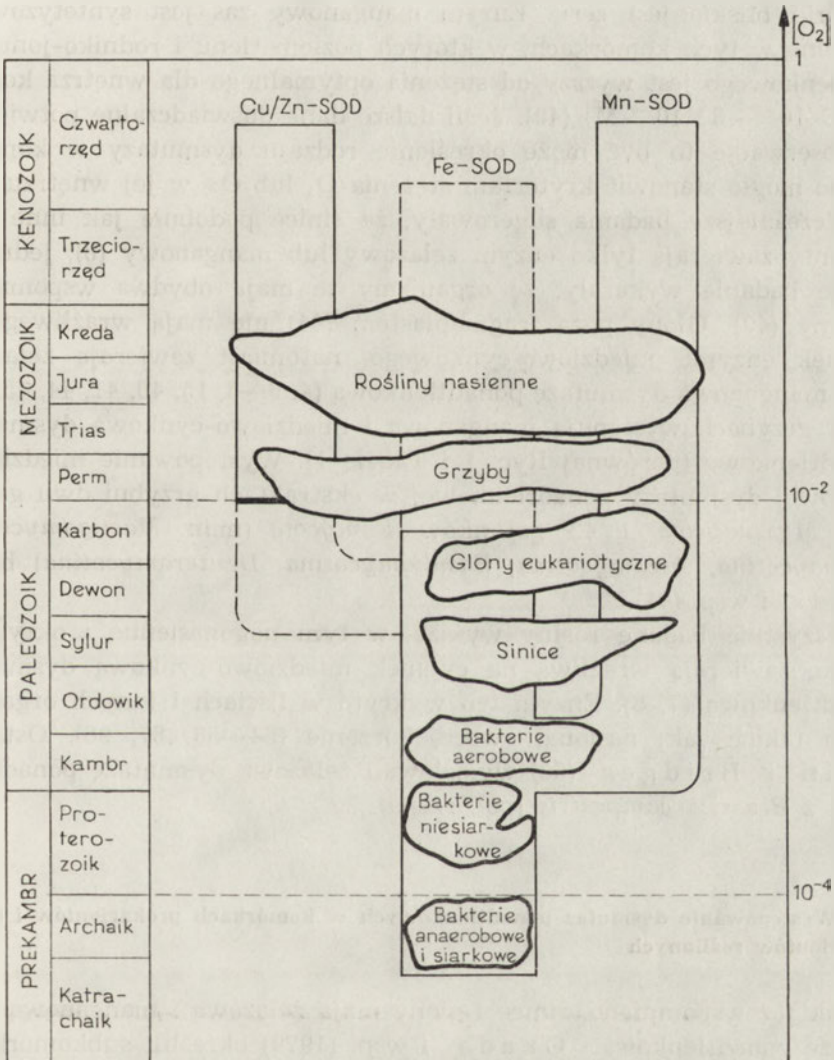
Jeśli w środowisku anaerobowych bakterii siarkowych znajdują się siarczyny i tiosiarczany, to w organizmach tych syntetyzowana jest żelazowa dysmutaza ponadtlenkowa. Fakt ten potwierdza ważną rolę dysmutazy w procesie detoksykacji tlenu (40).

Bakterie tlenowe i względnie tlenowe zawierają żelazową lub manganową dysmutazę ponadtlenkową, bądź obie jednocześnie (porównaj rysunek 1). Odsobnionym przykładem jest *Photobacterium leiognathi*, bakteria zawierająca oprócz enzymu żelazowego również dysmutazę ponadtlenkową z miedzią i cynkiem w centrum aktywnym (18). *P. leiognathi* jest symbiontem ryb. Przypuszcza się więc, że do tego mikroorganizmu przedostał się gen kodujący miedziowo-cynkową dysmutazę ponadtlenkową, a pochodzący z ryby gospodarza (19).

Britton i wsp. (25) badając bakterie 24 gatunków tlenowych przeprowadzili testy z zastosowaniem  $H_2O_2$ , jako specyficznego inhibitora dysmutazy żelazowej. Wykazali oni, że większość bakterii zawierających enzym manganowy jest bakteriami gramm-dodatnimi, natomiast bakterie zawierające enzym żelazowy, bądź jednocześnie żelazowy i manganowy są najczęściej bakteriami gramm-ujemnymi. Z badań tych wynika, że bakterie tlenowe fotosyntetyzujące zawierają tylko manganową dysmutazę ponadtlenkową, z wyjątkiem bakterii luminescencyjnych, które ponadto mają żelazową dysmutazę ponadtlenkową. Stąd występowanie żelazowej i manganowej dysmutazy ponadtlenkowej u prokariotów może stanowić kryterium taksonomiczne.

Większość diazotrofów (*Clostridium*, *Chromatium*, *Chlorobium* i *Desulfovibrio*) jest beztlenowcami, lecz bakterie takie jak *Azotobacter*, *Rhizobium* i sinice są aerobami. Nitrogenaza jest kompleksem enzyma-

tycznym umożliwiającym diazotrofom wiązanie azotu atmosferycznego. Enzym ten jest wrażliwy na tlen, jego półokres życia w atmosferze tlenu wynosi tylko 4,5 minuty (34). Jak już wspomniano dysmutazy nadtlenkowe chronią organizmy przed toksycznym działaniem tlenu oraz produktów pośrednich jego redukcji. Ażeby nastąpiło wiązanie azotu, stężenie tlenu wewnątrz komórki musi być więc bardzo niskie bądź bliskie zeru. Na przykładzie komórek *Rhizobium* wykazano skokowy gradient stężenia tlenu między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym; wewnątrz *Rhizobium* stężenie to utrzymuje się na stałym niezmiennym poziomie wynoszącym mniej niż  $3 \times 10^{-8}$ — $3 \times 10^{-9}$  M (35). Biosynteza że-



Ryc. 1. Występowanie dysmutaz nadtlenkowych w organizmach roślinnych — aspekt filogenetyczny



żelazowego enzymu i jego „hybrydu” manganowej dysmutazy ponadtlenczkowej jest indukowana przez  $O_2$  (36, 37) lub  $O_2^-$  (38). Stąd też biosynteza żelazowej dysmutazy ponadtlenczkowej następuje wówczas, gdy stężenie tlenu wewnątrz komórki jest bardzo niskie. Aerobowe diazotrofy mogą zawierać tylko enzym żelazowy z powodu bardzo niskiego stężenia tlenu wewnątrz komórek. Jest to jednak zjawisko odosobnione (39). Anaeroby i anaerobiotycznie rosnące beztlenowce fakultatywne oraz tlenowe diazotrofy zawierają tylko żelazową dysmutazę ponadtlenczkową (Ryc. 1). Właściwością wspólną tych trzech bakterii jest niskie stężenie tlenu i jonu ponadtlenczkowego wewnątrz komórek. Biosynteza enzymu żelazowego następuje więc zapewne tylko wtedy, gdy stężenie  $O_2$  i  $O_2^-$  wewnątrz komórki bliskie jest zeru. Enzym manganowy zaś jest syntetyzowany zapewne w tych komórkach, w których poziom tlenu i rodniko-jonu ponadtlenczkowego jest wyższy od stężenia optymalnego dla wnętrza komórki ( $3 \times 10^{-8}$ — $3 \times 10^{-9}$  M) (40). Jeśli dalsze dane doświadczalne potwierdzą te obserwacje to być może określenie rodzaju dysmutazy w komórce będzie mogło stanowić kryterium stężenia  $O_2$  lub  $O_2^-$  w jej wnętrzu (40).

Wcześniejsze badania sugerowały, że sinice podobnie jak inne prokarioty zawierają tylko enzym żelazowy lub manganowy (8), jednakże dalsze badania wykazały, że organizmy te mają obydwa wspomniane enzymy (40). Głony poza fragmoplastem (44) nie mają wrażliwego na cyjanek enzymu miedziowo-cynkowego, natomiast zawierają żelazową i/lub manganową dysmutazę ponadtlenczkową (4, 6—8, 15, 40, 41, 44, 45, 92).

W grzybach występują manganowa i miedziowo-cynkowa dysmutazy ponadtlenczkowe (porównaj Ryc. 1 i Tabelę 1). Występowanie miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenczkowej w ekstraktach grzybni dwu gatunków *Myxomycota* i 42 gatunków *Eumycota* (m.in. *Mastigomycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina*, *Deuteromycotina*) badali A s a d a i wsp. (41).

Wszystkie badane rośliny wyższe, w tym nagonasienne i okrytonasienne, zawierają wrażliwą na cyjanek miedziowo-cynkową dysmutazę ponadtlenczkową (7, 8). Enzym ten wykryto w liściach i innych organach roślin takich jak: nasiona, owoce, korzenie (54—58, 87, 96). Ostatnio S a l i n i B r i d g e s (68) wyizolowali żelazową dysmutazę ponadtlenczkową z *Brassica campestris* (pol. rzepa).

## II-2. Występowanie dysmutaz ponadtlenczkowych w komórkach prokariotów i eukariotów roślinnych

Jak już wspomniano, sinice i glony mają żelazową i manganową dysmutazę ponadtlenczkową. O k a d a i wsp. (1979) określili subkomórkowe rozmieszczenie manganowej i żelazowej dysmutazy ponadtlenczkowej w trzech sinicach. Wyniki analizy immunologicznej i badanie wpływu  $H_2O_2$

na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, wykazały, że żelazowa dysmutaza występuje w cytosolu, natomiast manganowa związana jest z tylakoidami chloroplastów (porównaj tabelę 2).

Tabela 2

Subkomórkowe rozmieszczenie dysmutaz ponadtlenkowych w roślinnych organizmach prokariotycznych i eukariotycznych

Rodzaj organizmu	Organelum komórkowe				cytosol
	Chloroplast		Mitochondrion		
	Tylakoidy	Stroma	Przestrzeń międzybłonowa	Matriks	
Sinice	Mn-SOD	—	—	—	Fe-SOD
Głony	Mn-SOD	Fe-SOD	Fe-SOD	—	Cu/Zn
Rośliny wyższe	Mn-SOD Cu/Zn-SOD	Cu/Zn	Cu/Zn-SOD	Mn-SOD	Cu/Zn

W roślinach wyższych wykryto obecność dysmutaz ponadtlenkowych zawierających w centrum aktywnym miedź i cynk, mangan, a także żelazo.

Aktywność dysmutazowa frakcji tylakoidowej była hamowana przez cyjanek w 1/2 do 1/3 w stosunku do próby kontrolnej, natomiast aktywność dysmutazowa stromy ulegała całkowitemu zahamowaniu. Stąd wynikało, że 33-50% całkowitej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej odpowiada enzymowi miedziowo-cynkowemu, manganowemu zaś 50-67%, oraz, że w stromie znajduje się tylko enzym miedziowo-cynkowy. Analogiczne badania dotyczące rozmieszczenia dysmutaz ponadtlenkowych w subfrakcjach chloroplastów *Brassica campestris* wykazały, że większość aktywności dysmutazy ponadtlenkowej znajduje się we frakcji stromy chloroplastów (ponad 60%), natomiast mniej niż 40% całkowitej ilości enzymu występuje w granach (86). Stroma chloroplastów liści *Brassica campestris* zawiera wszystkie trzy rodzaje dysmutazy ponadtlenkowej. Są jednak poglądy, że jednym z tych enzymów jest żelazowa dysmutaza ponadtlenkowa, a drugim enzymem niewrażliwym na cyjanek może być dysmutaza manganowa lub też kompleks manganu z dowolnym białkiem mający aktywność dysmutazy (86). Te same spostrzeżenia dotyczące aktywności manganowej dysmutazy ponadtlenkowej z chloroplastów sygnalizowano wcześniej (98, 108).

Enzym manganowy związany z tylakoidami chloroplastów szpinaku nie jest uwalniany podczas inkubacji tych substruktur w środowisku hypotonicznym czy roztworach soli (40). Całkowitą jego aktywność obserwowano tylko wtedy, gdy mieszanina reakcyjna zawierała detergent taki jak Triton X-100 (Triton X-100 nie wpływa na enzymy zawarte w stro-



mie) (40). Wpływ Tritonu X-100 na manganową dysmutazę ponadtlenkową z tylakoidów chloroplastów liści szpinaku wskazuje, że enzym ten jest silniej wiązany z błonami, niż miedziowo-cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa (39). Podobne wyniki otrzymano podczas badania tego samego rodzaju enzymu związanego z tylakoidami sinic (15) i *Euglena* (46).

Tylakoidy chloroplastów odpowiadają wewnętrznej błonie i matriks mitochondrionu w odniesieniu do ich funkcji transportowania elektronów. Dlatego też subchloroplastowe i submitochondrialne rozmieszczenie dysmutazy ponadtlenkowej wskazuje, że te organelle wywodzą się od wspólnego prokariota (40). Wykazano bowiem, że w mitochondriach *Euglena* zawarta jest żelazowa dysmutaza ponadtlenkowa. Na podstawie tego spostrzeżenia zespół *Asady* sugeruje (40), że enzym ten zlokalizowany w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów glonów i pierwotniaków, w roślinach wyższych i grzybach zastąpiony jest przez miedziowo-cynkową dysmutazę ponadtlenkową. W mitochondriach grzybów i roślin wyższych manganowa dysmutaza ponadtlenkowa związana jest z błoną wewnętrzną, a także występuje w matriks (53, 61, 64, 88, 90, 91).

### II-3. Wnioski, hipotezy, spekulacje

Do dnia dzisiejszego pozostają nierozstrzygniętymi: czas pojawienia się beztlenowych prokariotów, oraz okres, w którym tlen uwalniany był w reakcjach abiotycznych (16, 17).

Analizując rycinę 1 można zauważyć, że we wczesnym okresie ery prekambryjskiej ( $30-20 \times 10^8$  lat temu) stężenie tlenu w atmosferze wynosiło  $10^{-4}$  obecnego jego poziomu (65). Wówczas to jedynymi organizmami, których dowody istnienia zachowały się w najstarszych geologicznie pokładach, były bakterie beztlenowe i siarkowe zawierające tylko żelazowe dysmutazy ponadtlenkowe. Pojawienie się manganowej dysmutazy ponadtlenkowej obok żelazowej mogło nastąpić w odpowiedzi na zwiększenie się stężenia tlenu w biosferze (porównaj ryc. 1). Wysoki stopień homologii w sekwencjach aminokwasowych zarówno żelazowej jak i manganowej dysmutazy ponadtlenkowej, wskazuje, że enzymy te mogą wywodzić się od wspólnego antenata — dysmutazy żelazowej organizmów anaerobowych (40). Wytworzenie miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej przez organizmy eukariotyczne szacuje się na okres kambryjski ( $6-4,5 \times 10^8$  lat temu). Zdaniem *Berknera* i *Marshalla* (65) stężenie tlenu w atmosferze w tym czasie wynosiło  $10^{-2}$  obecnego. Rozważania nad występowaniem trzech rodzajów dysmutaz ponadtlenkowych w organizmach i organellach komórkowych oraz ich molekularną ewolucją skupiają się wokół takich zagadnień jak:

— przyczyny ewoluowania organizmów w kierunku wytworzenia trzech rodzajów dysmutaz ponadtlenkowych,



— brak żelazowej dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach organizmów eukariotycznych i jednoczesna niezbędność enzymu miedziowo-cynkowego.

Ostatnio Salin i Bridges (1980) donieśli o otrzymaniu żelazowej dysmutazy ponadtlenkowej z *Brassica campestris*. Fakt ów podważa dotychczas ogólnie przyjmowany pogląd, że dysmutaza żelazowa jest enzymem charakterystycznym dla prymitywnej flory. Zatem w jaki sposób wytłumaczyć obecność żelazowej dysmutazy ponadtlenkowej w organizmie eukariotycznym, tym bardziej, że jej skład aminokwasowy jest bardzo podobny do składu aminokwasowego enzymu żelazowego z *Rhodospseudomonas spheroides* (29). Czy można fakt ten przypisać mutacjom jakie mogły zajść w genie kodującym miedziowo-cynkową dysmutazę ponadtlenkową?

Z punktu widzenia kinetyki enzymatycznej żelazowa dysmutaza z *E. coli*, manganowa z *S. coli* i miedziowo-cynkowa z erytrocytów wołu, osiągają zbliżone wartości  $k$  (stała szybkości reakcji dysmutacji jonów ponadtlenkowych) przy pH 7,8 wynoszące odpowiednio 1,6; 1,8;  $1,9 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (12). Ponad dwukrotnie wyższą stałą szybkości reakcji dysmutacji w tych samych warunkach wykazuje dysmutaza manganowa z mitochondriów (95). Na podstawie danych tych można przypuszczać, że jeśli nie decydująca, to przynajmniej istotną rolę w zabezpieczeniu żywych organizmów przed toksycznym działaniem tlenu odgrywa szybkość dysmutacji  $\text{O}_2^-$  katalizowana przez dysmutazy ponadtlenkowe. Wskazują na to wartości  $k$  wyznaczone w pH 6,0 i 10,2, gdzie dysmutazy miedziowo-cynkowa i manganowa osiągają odpowiednio dwu i czterokrotnie wyższe wartości w porównaniu z żelazową dysmutazą z *E. coli* czy *Chromatium* (95).

### III. Właściwości fizyko-chemiczne roślinnych dysmutaz

#### III-1. Masy cząsteczkowe i budowa enzymów

Dysmutazy ponadtlenkowe są metaloproteiny o zróżnicowanych masach cząsteczkowych. Najmniejsze zróżnicowanie obserwuje się w obrębie dysmutaz miedziowo-cynkowych ze szpinaku (59), pszenicy (56), zielonego groszku (54). Ich masy mieszczą się w granicach 31000—35000. Największą masę cząsteczkową ma dysmutaza manganowa z *Pisum sativum* (62), bo wynoszącą 94000 (porównaj tabelę 3).

Cząsteczki tych enzymów zbudowane są z dwu identycznych podjednostek. Masy cząsteczkowe podjednostek wynoszą od 16000 do 20000 (porównaj tabelę 3). Obecne w cząsteczce enzymu mostki dwusiarczkowe nieuczestniczą w tworzeniu dimeru (4, 20, 31, 42, 56).

Tabela 3

Masy cząsteczkowe i podjednostkowe trzech typów roślinnych dysmutaz ponadtlenkowych

Źródło	Typ SOD	Masa cząsteczkowa*	Masa podjednostki	Piśmiennictwo
<i>Brassica campestris</i>	Fe	41 000 (a)	20 000	Salin i wsp. (1980)
<i>Pisum sativum</i>	Mn	94 000 (b)	—	Sevilla i wsp. (1980)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mn	44 000 (b)	—	Kono i wsp. (1979)
<i>Triticum sp.</i>	Cu/Zn	31 000 (d)	17 000	Beauchamp i wsp. (1973)
<i>Spinacia oleracea</i>	Cu/Zn	31 000 (b)	16 000	Asada i wsp. (1973)
<i>Pisum sativum</i>	Cu/Zn	31 000 (c)	—	Sawada i wsp. (1972)

\* Oznaczono metodą:

(a) Sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-150.

(b) Sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-100.

(c) Sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-75.

(d) Stałej sedymentacji.

### III-2. Widma absorpcji

Tabela 4 podaje przykłady maksimów absorpcji w zakresie UV i fal widzialnych niektórych dysmutaz ponadtlenkowych otrzymanych z różnych materiałów biologicznych. Znajomość tych wartości może stanowić dodatkowe kryterium rozróżniania poszczególnych rodzajów dysmutaz ponadtlenkowych. Z analizy tabeli 4 wynika, że dysmutazy miedziowo-

Tabela 4

Maksima absorpcji oraz molowe współczynniki absorpcji wybranych dysmutaz ponadtlenkowych otrzymanych z roślin wyższych. Indeksy I i II oznaczają dwa izoenzymy tego samego typu

Źródło	Typ	Zakres fal widzialnych (nm)	$\epsilon_m$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	UV (nm)	$\epsilon_m$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Piśmiennictwo
<i>Pisum sativum</i>	Cu/Zn	680	290	259	—	(54)
<i>Triticum sp.</i>	Cu/Zn	670	330 <sub>I</sub> 360 <sub>II</sub>	258	9740 9960	(56)
<i>Brassica campestris</i>	Fe	—	—	278	$7,4 \times 10^4$	(68)

cynkowe maksymalnie pochłaniają wiązkę światła widzialnego w zakresie fal o długości 670-680 nm, natomiast w zakresie UV przy 258-259 nm. Maksimum pochłaniania dysmutaz żelazowych w zakresie UV przypada na falę elektromagnetyczną o długości 272-278 nm. Nie ma natomiast

danych dotyczących manganowej dysmutazy ponadtlenkowej z roślin wyższych.

Skład aminokwasowy dysmutaz ponadtlenkowych nie jest jednakowy.

### III-3. Skład aminokwasowy

Dotyczy to przede wszystkim obecności bądź nieobecności reszt tryptofanu, fenyloalaniny, leucyny i waliny. Żelazowa dysmutaza ponadtlenkowa z *Brassica campestris* (68) zawiera wszystkie wyżej wymienione aminokwasy, natomiast w miedziowo-cynkowej dysmutazie z *Pisum sativum* (54) nie stwierdzono ich (porównaj tabelę 5). W enzymie miedziowo-cynkowym (54) znajduje się znacznie więcej niż w żelazowym,

Tabela 5

Skład aminokwasowy żelazowej i miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej z roślin wyższych

Aminokwas	Liczba reszt aminokwasu/mol podjednostki	
	<i>Brassica campestris</i> Fe-SOD (a)	<i>Pisum sativum</i> Cu/Zn-SOD (b)
Alanina	17	21
Glicyna	16	56
Kwas asparaginowy	18	45
Treonina	9	30
Izoleucyna	6	21
Histydyna	4	18
Cysteina	2	21
Metionina	1	20
Leucyna	14	0
Fenyloalanina	7	0
Tryptofan	4	0
Walina	11	0
Tyrozyna	6	9
Prolina	10	14
Kwas glutaminowy	16	19
Seryna	11	14
Arginina	5	6
Lizyna	11	10

(a) Salin i wsp. (1980)

(b) Savada i wsp. (1972)

reszt glicyny, kwasu asparaginowego, treoniny, izoleucyny, histydyny, cysteiny i metioniny odpowiednio 4, 2, 3, 4, 4, 10 i 20-to krotnie.



### III-4. Metale jako grupy prostetyczne, sposób i miejsce wiązania oraz ich funkcja w enzymie

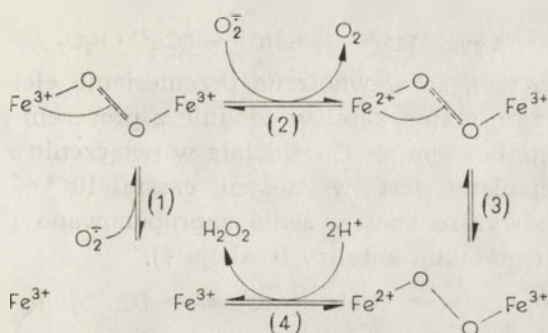
Katalityczne właściwości dysmutaz ponadtlenkowych wynikają z obecności jonów metali połączonych z podjednostkami enzymów. Żelazowe dysmutazy ponadtlenkowe z różnego materiału biologicznego zawierają zwykle po 2 atomy Fe na cząsteczkę białka (4, 31, 68). Każdy atom żelaza wiązany jest co najmniej przez jedną z reszt histydyny i tryptofanu każdej podjednostki (70, 71). Badania z zastosowaniem EPR wskazują na obecność 1 atomu Mn w każdej podjednostce dysmutazy manganowej (20, 26, 88), wyjątek stanowi dysmutaza z *Pisum sativum* (63), gdzie 1 atom Mn przypada na dimer. Mangan występuje w formie  $Mn^{+3}$  i jest mocno związany z białkiem (75).

Wszystkie wyodrębnione i zbadane dotąd dysmutazy ponadtlenkowe typu Cu/Zn (54, 56, 59, 60), zawierały po 2 atomy Cu i Zn na cząsteczkę białka. Każdy atom Cu w cząsteczce dysmutazy jest połączony trzema wiązaniami koordynacyjnymi z atomami azotu grup imidazolowych histydyny, natomiast czwarty orbital jest wolny (3, 72). Cynk połączony jest z His-61, His-69, His-78 i Asp-81, natomiast miedź z His-44, His-46, His-61 i His-118. W natywnym enzymie do każdego z tych metali przyłączona jest cząsteczka wody, co stwierdzono na podstawie badań EPR (73).

Podczas gdy Fe i Mn pełnią jednocześnie funkcję katalityczną i stabilizującą strukturę enzymu, w miedziowo-cynkowej dysmutazie ponadtlenkowej funkcję katalityczną spełnia Cu, podczas gdy cynk pełni funkcję stabilizującą w stosunku do apoenzymu (3, 72).

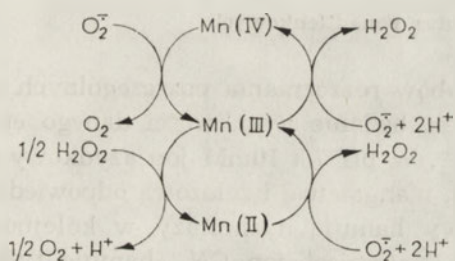
### III-5. Mechanizmy działania centrów aktywnych

W dysmutazie ponadtlenkowej zawierającej żelazo obydwa atomy Fe biorą udział w przyłączaniu jonu ponadtlenkowego i wytwarzaniu kompleksu „*superoxo*” (71). Badania z zastosowaniem EPR wykazały, że jeden z dwóch atomów żelaza pełni funkcję katalityczną, polegającą na zmianie stopnia jego utlenienia podczas cyklu katalitycznego. Kolejność reakcji przedstawiono na rycinie 2. Jon ponadtlenkowy jest wiązany przez jony  $Fe^{+3}$ , przy czym reszta bądź reszty histydyny, z którymi połączony jest jon  $Fe^{+3}$  mogą uczestniczyć w przyjmowaniu elektronu, jak również w rozszczepianiu kompleksu „*superoxo*”. Jon ponadtlenkowy jest utleniany z uwolnieniem  $O_2$  i redukcją jednego z jonów  $Fe^{+3}$  (reakcja 2). Druga cząsteczka ponadtlenku wiąże się z  $Fe^{+2}$ , następuje redukcja układu enzymatycznego i utworzenie kompleksu „*peroxo*”, a  $Fe^{+2}$  jest ponownie utleniane. W końcowym etapie (reakcja 4) kompleks „*peroxo*” ulega rozpadowi z uwolnieniem  $H_2O_2$  i regeneracją centrum aktywnego (74).



Ryc. 2. Reakcje przebiegające w centrum aktywnym żelazowej dysmutazy ponadtlenkowej (74)

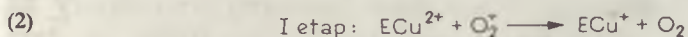
Kataliza reakcji dysmutacji  $O_2^-$  przez manganową dysmutazę ponadtlenkową przebiega w sposób podobny jako opisano powyżej. W reakcji tej zakłada się możliwość tworzenia par  $Mn^{+3}$  centrum aktywnego enzymu z wolnym manganem środowiska. Hipotetyczny mechanizm działania tych par przedstawiono na rycinie 3. Para Mn (IV), Mn (III) katalizuje

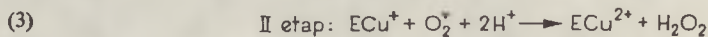


Ryc. 3. Proponowany przebieg reakcji w centrum aktywnym manganowej dysmutazy ponadtlenkowej, zakładający współdziałanie wolnego manganu (75)

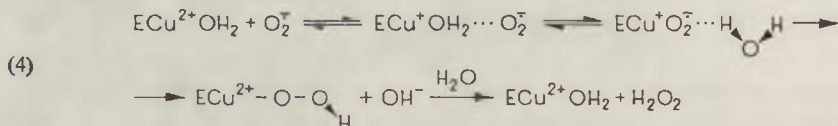
usuwanie jonu ponadtlenkowego znacznie efektywniej niż para Mn (III), Mn (II). Do Mn (II) przyłączany jest  $O_2^-$  w obecności  $2H^+$ , następuje utlenienie manganu do Mn (III) z jednoczesnym uwolnieniem  $H_2O_2$ . Mn (III) silniej reaguje z aniono-rodnikiem ponadtlenkowym i utlenia się do Mn (IV). Kompleks enzymatyczny rozpada się z uwolnieniem  $H_2O_2$ , a  $O_2^-$  (następna cząsteczka) przyłącza się do Mn (IV) i utlenia do  $O_2$  z jednoczesną redukcją manganu do trzeciego stopnia utlenienia. Mn (III) oddziałując z  $H_2O_2$  jest redukowany do Mn (II) i cykl zamyka się (75).

Badając cykl katalityczny miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej wykazano (76, 77), że Cu podlega cyklicznej redukcji i utlenieniu podczas katalizy:





Zasugerowano (89), że wewnętrzne przeniesienie elektronu musi nastąpić na pierwszym etapie katalizy zgodnie z procesem podstawiania ligandu. Okazało się bowiem, że  $\text{Cu}^{+2}$  działa w połączeniu z cząsteczką wody, która wymieniana jest w stałym czasie  $10^{-8} < t_{\text{TM}} \leq 4 \times 10^{-6}$  s. Uwzględniając powyższe spostrzeżenie zaproponowano (79) następujący mechanizm drugiego etapu katalizy (reakcja 4),



w którym  $\text{O}_2^-$  wiąże się z wolną pozycją koordynacyjną  $\text{Cu}^+$  i oddziałuje z protonem cząsteczki wody. Strukturą przestrzenną wody zaznaczono w celu podkreślenia jej stałej obecności w czasie działania enzymu. Przeniesienie elektronu indukuje tworzenie anionu nadtlenkowego połączonego koordynacyjnie z  $\text{Cu}^{+2}$ , po czym anion ten jest szybko usuwany z kompleksu enzymatycznego (78).

### III-6. Inhibitory dysmutaz ponadtlenkowych

Jednym ze sposobów rozróżniania poszczególnych rodzajów dysmutaz ponadtlenkowych jest badanie wrażliwości danego enzymu na obecność jonów  $\text{N}^-$ ,  $\text{CN}^-$  i  $\text{F}^-$ . W pH 7,8 10mM jon azydkowy hamuje dysmutazy miedziowo-cynkową, manganową i żelazową odpowiednio w 10, 30 i 73%. Zatem jon azydkowy hamuje dysmutazy w kolejności  $\text{Fe-SOD} > \text{Mn-SOD} > \text{Cu/Zn-SOD}$ . Natomiast jon  $\text{CN}^-$  hamuje tylko dysmutazę miedziowo-cynkową i w nieznacznym stopniu manganową (12, 80, 81). Wszystkie dysmutazy miedziowo-cynkowe są bardziej wrażliwe na  $\text{CN}^-$  w pH 10,2 niż w pH 7,8 (56).

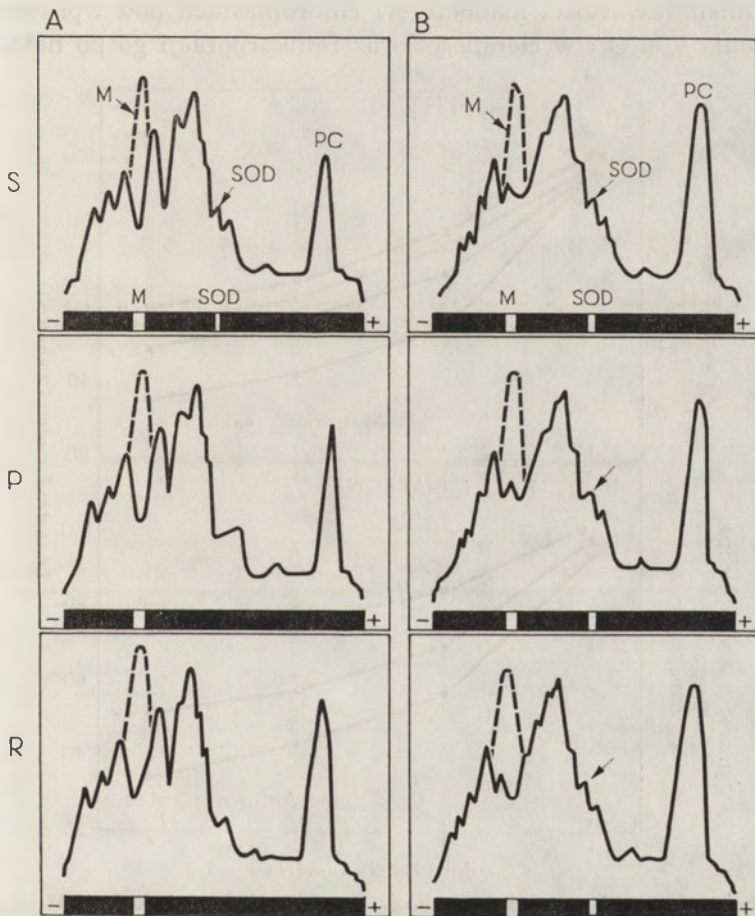
Związki reagujące z grupami tiolowymi i związki chelatujące (82), hamują enzym miedziowo-cynkowy nieznacznie w niskich stężeniach (rzędu 0,1 mM), natomiast w stężeniach wysokich (rzędu 1 do 10 mM) nawet do 70%. Dysmutazy są również wrażliwe na produkt reakcji dysmutacji — nadtlenek wodoru (2), dotyczy to dysmutazy miedziowo-cynkowej i żelazowej. Manganowa dysmutaza ponadtlenkowa jest niewrażliwa na  $\text{H}_2\text{O}_2$  (83).

### IV. Dysmutazy ponadtlenkowe roślin wrażliwych na przechładzanie

Badania Kaniugi i wsp. (97, 98, 99, 100, 101) dostarczyły interesujących obserwacji związanych z wpływem obniżonej temperatury na aparat fotosyntetyczny roślin wrażliwych na przechładzanie, w tym

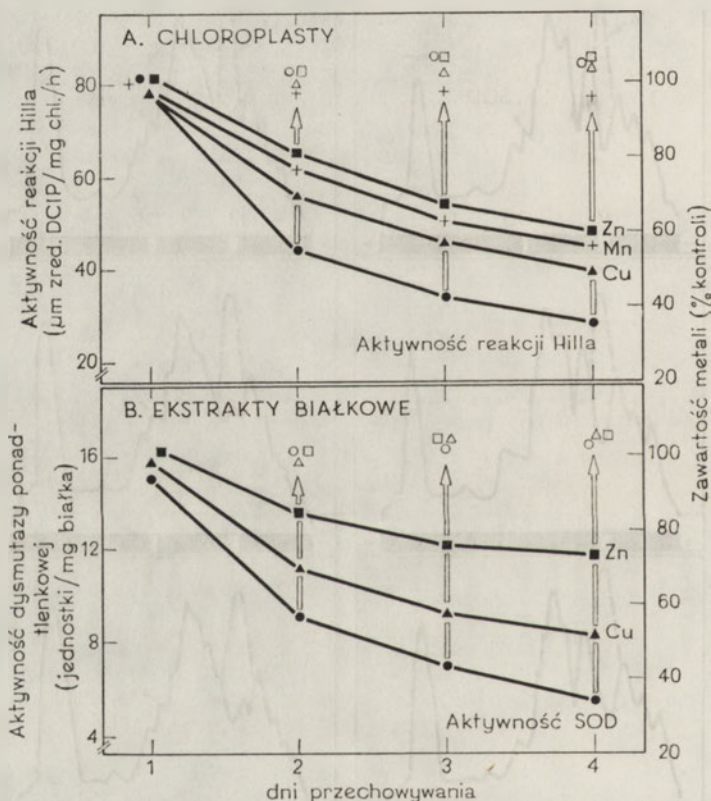


między innymi na aktywność chloroplastowych dysmutaz ponadttlenkowych (98) i zmian zawartości takich jonów jak  $Mn^{+2}$  (99) oraz  $Cu^{+2}$  i  $Zn^{+2}$  (100) w chloroplastach odciętych liści i rosnących roślin pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Stwierdzono bowiem, że całkowita aktywność dysmutazy ponadttlenkowej w chloroplastach (98) ulega wyraźnemu obniżeniu w wyniku przechładzania w  $0^{\circ}C$ , w ciemności, zarówno odciętych liści jak i rosnących roślin pomidora, a oświetlenie liści czy roślin tylko częściowo przywraca mierzoną aktywność. Ponadto stwierdzono, że całkowita aktywność dysmutaz ponadttlenkowych zależy nie tylko od aktywności dysmutaz chloroplastowych, ale także od ilości manganu (labilnego i/lub silnie związanego z błonami tylakoidów), który w nieobecności białkowych składników błon tylakoidów ma zdolność dysmutacji  $O_2^-$  (98).



**Ryc. 4.** Densytogramy rozdzielu białek ekstraktów butanolowych chloroplastów pomidora (A) i szpinaku (B), metodą elektroforezy „natywnej”. Lokalizacja aktywności dysmutazy ponadttlenkowej: M — erytrokuperina jako wskaźnik aktywności SOD; PC — plastocyjanina; S — liście świeże; P — liście przechowywane w  $0^{\circ}C$  i ciemności; R — liście oświetlane po przechowywaniu w  $0^{\circ}C$  i ciemności (100).

W dalszych badaniach (100, 101) nad mechanizmem zaniku aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w przechładzanych liściach i rosnących roślinach pomidora stwierdzono, że aktywność miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej w ekstraktach butanolowych białek chlorostów liści pomidora przechowywanych w temperaturze 0°C i ciemności (Ryc. 4A), oraz przechładzanych i oświetlanych (Ryc. 4A), całkowicie zanika. Natomiast w przypadku liści szpinaku, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej nie ulegała zmianie w takich samych warunkach (Ryc. 4B). Obserwacje te wskazują, że zmiany tego typu są charakterystyczne dla roślin wrażliwych na przechładzanie (np. pomidor), lecz nie dla opornych na niskie temperatury (np. szpinak). Badając przyczyny tego zjawiska stwierdzono, że jest ono wynikiem wpływu jonów  $\text{Cu}^{+2}$  i  $\text{Zn}^{+2}$  z chloroplastów liści pomidora (100), analogicznie jak to wcześniej zaobserwowano w przypadku zmian zawartości manganu w chloroplastach pod wpływem przechowywania w 0°C i w ciemności oraz reinkorporacji go po naświetlaniu



**Ryc. 5.** Zmiany w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i reakcji Hilla oraz zawartości Mn, Cu i Zn w liściach roślin pomidora przechowywanych w temperaturze 0°C i w ciemności a następnie naświetlanych w temperaturze 25°C (8000 lx). Zawartość Cu i Zn w próbie kontrolnej chloroplastów Mn wynosiła 20,30; 17,15; i 34,33 ngatomów/mg chl., natomiast w próbie kontrolnej ekstraktów białkowych Cu i Zn odpowiednio 26,38 i 43,35 ngatomów/mg białka (100).

liści (99). W przeciwieństwie jednak do reaktywacji aktywności reakcji Hilla (97, 99), oświetlanie odciętych liści przechowywanych uprzednio w chłodzie i ciemności nie przywracało aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (101).

Analogiczne badania wpływu niskiej temperatury i ciemności na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wykonano w rosnących roślinach pomidora (Ryc. 5) (100). Dwunastogodzinne naświetlanie tych roślin w temperaturze 20°C z dwunastogodzinną przerwą nocną (w tej samej temperaturze) i ponowne naświetlanie przez 3 godziny powoduje całkowitą reaktywację aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, reakcji Hilla, przy równoczesnej reinkorporacji manganu i miedzi (Ryc. 5) (100). Natomiast przechowywanie preparatów chloroplastów pomidora w temperaturze 4°C w ciągu nawet 7 dni, nie powoduje istotnych zmian w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, ani w zawartości Mn i Cu (100).

Badania te dostarczyły następujących obserwacji:

- Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej nie ulega zmianie podczas przechowywania preparatów chloroplastów w ciemności i chłodzie.
- W warunkach ciemności przechładzania rosnących roślin następuje migracja Cu i Zn z chloroplastów i ich reinkorporacja podczas naświetlania roślin.
- W czasie przechowywania odciętych liści i rosnących roślin w temperaturze 0°C i ciemności następuje inaktywacja dysmutazy ponadtlenkowej.
- Proces inaktywacji dysmutazy ponadtlenkowej pod wpływem chłodu i ciemności jest odwracalny tylko w rosnących roślinach poddawanych kilkunastogodzinnemu naświetlaniu.

## V. Rola dysmutazy ponadtlenkowej

Dysmutaza ponadtlenkowa wychwytuje reaktywne cząsteczki rodnikojonu ponadtlenkowego i katalizuje reakcję ich dysmutacji. Zabezpiecza więc organizmy przed spontaniczną dysmutacją rodników organicznych indukowanych obecnością  $O_2^-$ . Tę rolę ochronną pełnią również peroksydazy i katalazy, których substratem jest produkt dysmutacji jonów ponadtlenkowych —  $H_2O_2$ . Dysmutazy ponadtlenkowe zabezpieczają DNA przed możliwymi modyfikacjami, a struktury subkomórkowe przed uszkodzeniami, które niekiedy mogą być nawet nieodwracalne, jak to może mieć miejsce w przypadku błon lizosomów i mitochondriów (69, 84, 85). Dysmutazy ponadtlenkowe chronią przed fotodynamicznymi uszkodzeniami tkanek roślin zielonych, przed uszkodzeniami wywołanymi promieniami słonecznymi w pomidorach, szczególnie zielonych owocach i innych zielonych tkankach roślin (87).



Tabela 6

Szybkość peroksydacji lipidów w stosunku do aktywności reakcji Hilla w kontroli i chloroplastach przemywanych buforem Tris (101)

Źródło chloroplastów	Fotoperoksydacja [nmol wytworzonego dialdehydu malonowe- go/min/mg chl.]	Aktywność reakcji Hilla [ $\mu$ mol zred. DCIP/ /h/mg chl.]
<b>Kontrola</b>		
liście świeże	1,92	76,0
liście przechowywane w chłodzie i ciemności	3,90	24,3
liście naświetlane po przechowywaniu	4,30	70,4
<b>Przemywane buforem Tris</b>		
liście świeże	4,56	14,4
liście przechowywane w chłodzie i ciemności	4,48	10,3
liście naświetlane po przechowywaniu	4,40	12,6

Wskazuje się (86, 108) na współdziałanie dysmutazy ponadtlenkowej z II, a także częściowo z I układem fotosyntezy.

Jak już wspomniano, przechowywanie liści pomidora w temperaturze 0°C i ciemności (101), powoduje utratę aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, ale naświetlanie ich nie przywraca aktywności chloroplasto-

Tabela 7

Aktywność wrażliwej na cyjanek dysmutazy ponadtlenkowej w białkowych ekstraktach butanowych z chloroplastów liści pomidora: świeżych, przechowywanych w chłodzie i ciemności oraz przechowywanych i następnie naświetlanych. Aktywność reakcji Hilla podano w  $\mu$ mol zredukowanego DCIP/mg chlorofilu/h,(101). Wersja skrócona.

Doświadczenie numer	Źródło chloroplastów	Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (jednostki mg/białka)	Aktywność reakcji Hilla
1.	liście świeże	10,3	85,0
	liście przechowywane w ciemności i chłodzie	0,6	5,3
	liście przechowywane i naświetlane	0,0	81,4
2.	liście świeże	8,4	58,0
	liście przechowywane w ciemności i chłodzie	0,3	4,6
	liście przechowywane i naświetlane	0,1	50,1
3.	liście świeże	8,6	68,0
	liście przechowywane w ciemności i chłodzie	0,0	11,0
	liście przechowywane i naświetlane	0,0	70,0

wej dysmutazy. Zanikiem aktywności chloroplastowej dysmutazy ponadtlenkowej spowodowany jest wzrost szybkości fotoperoksydacji lipidów (101) lecz nie zmniejszonym transportem elektronów (103, 104) (porównaj tabele 6 i 7). Zdaniem badaczy (101) wskazuje to, że dysmutaza ponadtlenkowa jest czynnikiem kontrolującym szybkość procesu peroksydacji lipidów, który z kolei jest jednym z elementów powodujących uszkodzenie roślin wrażliwych na przemarzanie, poddawanych działaniu chłodu.

## VI. Podsumowanie

Jak to wynika z przedstawionego powyżej przeglądu, dysmutazy ponadtlenkowe występują powszechnie w świecie roślin począwszy od tych najprymitywniejszych (bakterie, sinice), po wysoce zorganizowane nasienne. Można przypuszczać (w kontekście wcześniej omawianych hipotez), że środowiska, które organizmy te zasiedliły, zdeterminowały rodzaje enzymu spotykane u poszczególnych przedstawicieli. Tak więc bakterie żyjące w środowisku beztlenowym mają tylko żelazową dysmutazę ponadtlenkową, glony, które w głównej mierze opanowały wody — żelazową i manganową, natomiast rośliny wyższe charakterystyczne dla biocenoz lądowych, zawierają manganową i cynkowo-miedziową, a *Brassica campestris* (86) ma także żelazową dysmutazę ponadtlenkową. Co prawda jest to jedyne doniesienie, które podważa dotychczas ogólnie przyjęty pogląd, że organizmy ewoluowały w kierunku wytworzenia takiego rodzaju enzymu, który skutecznie i z dużą wydajnością dysmutuje rodniko-jony ponadtlenkowe, szczególnie w tych, których procesy życiowe przebiegają w warunkach tlenowych. Stałe szybkości reakcji dysmutacji  $O_2^-$  katalizowanych przez dysmutazy, a wyznaczone w różnych przedziałach pH potwierdzają powyższe, dysmutazy miedziowo-cynkowa i manganowa bowiem dysmutują rodniko-jony ponadtlenkowe dwu i czterokrotnie szybciej niż dysmutaza żelazowa (12). Brak dysmutazy ponadtlenkowej w komórce powodowałby spontaniczną dysmutację  $O_2^-$ , oraz indukcję rodniko-jonów organicznych, które między innymi, w wyniku szeregu reakcji chemicznych powodują peroksydację wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (109) i lipidów błon chloroplastowych (101).

Z przedstawionych dotychczas badań wynika, że enzymy te stanowią skuteczne zabezpieczenie organizmów przed toksycznym działaniem tlenu i jego form zredukowanych. Fakty te potwierdzają kluczową rolę dysmutaz ponadtlenkowych w żywych układach biologicznych.

*Składam serdeczne podziękowania Panu Prof. Zbigniewowi Kaniudze za krytyczne uwagi i pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy.*

*Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach problemu węzłowego Nr 10.2.10 i międzyresortowego MR-II/15 oraz MR.II.7.*

Zaakceptowano do druku 4.12.1981

## PIŚMIENICTWO

1. Fridovich I., McCord J. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5753—5759.
2. McCord J. M., Fridovich I., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049—6055.
3. Michalski W. P., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 295—317.
4. Asada K., Yoshikawa K., Takahashi M., Maeda Y., Enmanji K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2801—2807.
5. Hewitt J., Morris J. G., (1975), *FEBS Lett.*, **50**, 315—317.
6. Lumsden J., Hall D. O., (1975), *Nature*, **257**, 670—672.
7. Asada K., Kanematsu S., Takahashi M., Kono Y., (1976), w *Iron and Copper Proteins*, red. Yasunobu K. T., Mower H. F., Hayaishi O., str. 551—564, Academic Press, New York.
8. Asada K., Kanematsu S., Uchida K., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 243—256.
9. Tally F. P., Golden B. R., Jacobus N. V., Gorbach S. L., (1977), *Infec. Immunity*, **16**, 20—25.
10. Carlsson J., Werthau C., Beckman G., (1977), *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 280—284.
11. Gregory E. M., Moore W. E. C., Holdeman L. V., (1978), *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 988—991.
12. Kanematsu S., Asada K., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 473—482.
13. Kanematsu S., Asada K., (1978), *FEBS Lett.*, **91**, 94—98.
14. Hatchikian E. C., Henry Y. A., (1977), *Biochimie*, **59**, 153—161.
15. Kanematsu S., Asada K., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 535—545.
16. Schwarz R. M., Dayhoff M. O., (1978), *Science*, **199**, 395—403.
17. Towe K. M., (1978), *Nature*, **274**, 657—661.
18. Puget K., Michelson A. M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 830—838.
19. Puget K., Lavell F., Michelson A. M., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 139—150, Academic Press, New York.
20. Keele B. B., McCord J. M., Fridovich I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176—6181.
21. Chikata Y., Kusunose E., Ichihara K., Kusunose M., (1975), *Osaka City Med. J.*, **21**, 127—136.
22. Kusunose M., Noda Y., Ischihara K., Kusunose E., (1976), *Arch. Microbiol.*, **108**, 65—73.
23. Ichihara K., Kusunose E., Kusunose M., Mori T., (1977), *J. Biochem. Tokyo*, **81**, 1427—1433.
24. Vance P. G., Keele B. B., Rajogopalan K. V., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4782—4786.
25. Britton L., Malinowski D. P., Fridovich I., (1978), *J. Bacteriol.*, **134**, 229—236.
26. Harris J. I., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 151—157, Academic Press, New York.
27. Sato S., Hariis J. I., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 373—381.
28. Sato S., Nakazawa K., (1978), *J. Biochem. Tokyo*, **83**, 1165—1171.
29. Lumsden J., Cammack R., Hall D. O., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **438**, 380—392.



30. Kusunose E., Ichihara K., Noda Y., Kusunose M., (1976), *J. Biochem. Tokyo*, **80**, 1343—1352.
31. Yost F. J., Fridovich I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4905—4908.
32. Slykhouse T. O., Fee J. A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5472—5477.
33. Yamakura F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 280—294.
34. Israel D. W., Howard R. L., Evans H. J., Russel S. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 500—508.
35. Wittenberg J. B., Bergersen F. J., Appleby C. A., Turner C. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4057—4066.
36. Dougherty H. W., Sadowski S. J., Baker E. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5220—5223.
37. Hassan H. M., Fridovich I., (1977), *J. Bacteriol.*, **129**, 1574—1583.
38. Hassan H. M., Fridovich I., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7667—7672.
39. Kanematsu S., Asada K., (1977), *Proc. Agr. Chem. Soc. Japan*, str. 226.
40. Asada K., Kanematsu S., Okaka S., Hayakawa T., (1980), w *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Bannister J. V., Hill H. A. O., str. 136—153, Elsevier (North-Holland).
41. Asada K., Kanematsu S., (1978), w *Evolution of Protein Molecules*, red. Matsubara H., Yamanaka T., Str. 361-372, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
42. Misra H. P., Keele B. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 418—425.
43. Cseke C., Horvath L. J., Simon P., Borbely G., Keszthelyi L., Farkas G., (1979), *J. Biochem. Tokyo*, **85**, 1397—1404.
44. Henry L. E. A., Hall D. O., (1977), w *Photosynthetic Organelles*, red. Miyachi S., Fujita Y., Shibata K., str. 377—382, Japanese Soc. Plant. Physiol., Kyoto.
45. Misra H. P., Fridovich I., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6421—6423.
46. Okada S., Kanematsu S., Asada K., (1979), *FEBS Lett.*, **103**, 106—110.
47. Asada K., Takahashi M., Tanaka K., Nakano Y., (1977), w *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen*, red. Hayaishi O., Asada K., str. 45—63, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
49. Weser U., Fretzdorff A., Printz R., (1972), *FEBS Lett.*, **27**, 267—269.
50. Goscin S. A., Fridovich I., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 276—283.
51. Rapp U., Adams W. C., Miller R. W., (1973), *Can. J. Biochem.*, **51**, 158—171.
52. Misra H. P., Fridovich I., (1975), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3410—3414.
53. Ravindranath S. D., Fridovich I., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6107—6112.
54. Sawada Y., Ohyama T., Yamazaki J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 305—312.
55. Giannopolitis C. N., Ries S. K., (1977), *Plant Physiol.*, **59**, 315—318.
56. Beauchamp C. O., Fridovich I., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 50—64.
57. Baker J. E., (1976), *Plant Physiol.*, **58**, 644—647.
58. Hai D. Q., Kovacs K., Matkovics J., Matkovics B., (1975), *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **167**, 357—359.
59. Asada K., Urano M., Takahashi M., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 257—266.
60. Kono Y., Takahashi M., Asada K., (1979), *Plant Cell Physiol.*, **20**, 1229—1237.

61. Arron G. P., Henry J. M., Palmer J. M., Hall D. O., (1976), *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 618—620.
62. Hakamada K., Kanematsu S., Asada K., (1978), *Study of Tea*, **54**, 6—10.
63. Sevilla F., Lopez-George J., Gonez del Rio L. A., (1980), *Planta*, **150**, 153—157.
64. Jackson C., Dench J., Moore A. L., Halliwell B., Foyer C. H., Hall D. O., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 339—344.
65. Berkner L. C., Marshall L. C., (1965), *J. Atmos. Sci.*, **22**, 225—261.
66. Hodgson E. K., Fridovich I., (1975), *Biochemistry*, **14**, 5299—5303.
67. Anastasi A., Bannister J. V., Bannister W. H., (1976), *Int. J. Biochem.*, **7**, 541—546.
68. Salin M. L., Bridges S. M., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 369—374.
69. Michelson A. M., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 245—255, Academic Press, New York.
70. Puget K., Michelson A. M., (1974), *Biochemie*, **56**, 1255—1267.
71. Vanopdenbosch B., Crichton R. R., Puget K., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 199—205, Academic Press, New York.
72. Fridovich I., (1974), *Adv. Enzymol.*, **41**, 35—97.
73. Richardson D. C., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 217—223, Academic Press, New York.
74. Kavelle F., McAdam M. E., Fielden E. M., Roberts P. B., Puget K., Michelson A. M., (1977), *Bioch. J.*, **161**, 3—11.
75. Lumsden J., Hall D. O., (1975), *Biochem. Biophys. Acta*, **64**, 595—602.
76. Fieldman E. M., Roberts P. B., Bray R. C., Lowe D. J., Mautner G. N., Rotillio G., Calabrese L., (1974), *Biochem. J.*, **139**, 49—60.
77. Klug-Roth D., Fridovich I., Rabani J., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2786—2790.
78. Fee J. A., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 173—192, Academic Press, New York.
79. Fee J. A., Ward R. L., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 427—437.
80. Misra H. P., Fridovich I., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**, 317—322.
81. Fridovich I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4053—4057.
82. Asada K., Takahashi M., Nagate M., (1974), *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 471—473.
83. Kirby T., Blum J., Kamane J., Fridovich I., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 551—555.
84. Fong K. L., McCoy P. B., Payer I. L., Keele P. B., Misra H. P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792—7798.
85. Zimmerman R., Flohe L., Weser V., Hartman H. J., (1973), *FEBS Lett.*, **29**, 117—121.
86. Salin M. L., Bridges S. M., (1980), *Z. Pflanzenphysiol.*, **99**, 37—45.
87. Rabinowitch H. D., Sklan D., (1980), *Planta*, **148**, 162—167.
88. McCord J. M., Boyle J. A., Day E. D., Rizollo L. J., Salin M. L., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 129—138, Academic Press, New York.

89. Harris J. J., Steinman H. M., (1977), w *Superoxide and Superoxide Dismutases*, red. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich I., str. 225—230, Academic Press, New York.
90. Weisiger R. A., Fridovich I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3582—3592.
91. Peeters-Joris C., Vandevoorde A., Baudhuin P., (1975), *Biochem. J. Tokyo*, **150**, 31—39.
92. Henry L. E. A., Hall D. O., (1977), *Plant Cell Physiol.*, (Spec. Iss., Photosynthetic organelles), 377—382.
93. Baum J. A., Scandalios J. G., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 249—264.
94. Baum J. A., Scandalios J. G., (1979), *Differentiation*, **13**, 133—140.
95. Forman H. J., Fridovich I., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 396—400.
96. Lumsden J. O., Hall D. O., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 41—55.
97. Kaniuga Z., Sochanowicz B., Ząbek J., Krzystyniak K., (1978), *Planta*, **140**, 121—128.
98. Kaniuga Z., Ząbek J., Michalski W. P., (1979), *Planta*, **145**, 145—150.
99. Kaniuga Z., Ząbek J., Sochanowicz B., (1978), *Planta*, **144**, 49—56.
100. Michalski W. P., Kaniuga Z., (1981), praca przygotowywana do druku.
101. Michalski W. P., Kaniuga Z., (1981), *Biochem. Biophys. Acta*, **637**, 159—167.
102. Jackson C., Deutch J., Morre A. L., Halliwell B., Foyer C., Hall D. O., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 339—344.
103. Takahama U., Nishimura M., (1975), *Plant Cell Physiol.*, **16**, 737—748.
104. Takahama U., Nishimura M., (1976), *Plant Cell Physiol.*, **17**, 111—118.
105. Elstner E. F., Heupel A., (1975), *Planta*, **123**, 145—154.
106. Allen J. F., Hall D. O., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 856—862.
107. Van Ginkel G., Brown J. S., (1978), *FEBS Lett.*, **94**, 284—286.
108. Foyer G. H., Hall D. O., (1980), w *Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide Dismutases*, red. Bannister J. V., Hill H. A. O., str. 388—389, Elsevier, North-Holland-New York.
109. Halliwell B., (1978), *Cell Biol. Int. Rep.*, **2**, 113—128.



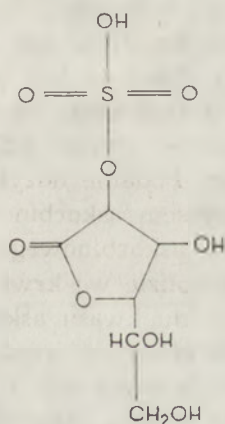
171. The first of these is the...  
 172. The second is the...  
 173. The third is the...  
 174. The fourth is the...  
 175. The fifth is the...  
 176. The sixth is the...  
 177. The seventh is the...  
 178. The eighth is the...  
 179. The ninth is the...  
 180. The tenth is the...  
 181. The eleventh is the...  
 182. The twelfth is the...  
 183. The thirteenth is the...  
 184. The fourteenth is the...  
 185. The fifteenth is the...  
 186. The sixteenth is the...  
 187. The seventeenth is the...  
 188. The eighteenth is the...  
 189. The nineteenth is the...  
 190. The twentieth is the...  
 191. The twenty-first is the...  
 192. The twenty-second is the...  
 193. The twenty-third is the...  
 194. The twenty-fourth is the...  
 195. The twenty-fifth is the...  
 196. The twenty-sixth is the...  
 197. The twenty-seventh is the...  
 198. The twenty-eighth is the...  
 199. The twenty-ninth is the...  
 200. The thirtieth is the...

JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA \*)

## 2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego

### L-Ascorbic acid 2-sulphate

2-Wodorosiarczan kwasu L-askorbinowego został wyizolowany po raz pierwszy w 1969 roku przez Mead i Finamore (1) z cyst krewetki *Artemia salina*. Naturalny związek okazał się 2-wodorosiarczanem kwasu askorbinowego, chociaż początkowo przypuszczano, że jest to 3-wodorosiarczan kwasu askorbinowego. Wspomnieć wypada, że o obecności „związanego” kwasu askorbinowego w wątrobach świni i kozy, donosili już w 1952 roku Summerwell i Sealock (2), a w 1963 roku Malakar (3). Nie jest wykluczone, że wspomnianą związaną pochodną był 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego.



Ryc. 1. 2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego

W warunkach fizjologicznych 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego ma właściwości dwuanionu; czysty związek w środowisku o pH 2, wykazuje maksimum absorpcji przy 233 nm, a w środowisku o pH 7.0 przy 254 nm. Ekstynkcja molowa  $E_{254}$  wynosi 16 000 przy pH 7.0, a przy długości fali 330 nm i w pH 2.0 ma wartość 12 000 (4-6).

2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego jest naturalnym metabolitem

\*) Doc. dr hab., Zakład Biochemii Instytutu Biologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń.

wydalanym z moczem przez organizmy syntetyzujące kwas askorbinowy, jak też przez niezdolne do jego syntezy (7-10). Według Bakera i współpracowników (7), aż 25% ogólnej ilości kwasu askorbinowego wydalana jest w postaci 2-wodorosiarczanu. Po iniekcji podskórnej nieorganicznego siarczanu- $^{35}\text{SO}_4$  wraz z  $[1-^{14}\text{C}]$ askorbinianem szczurom, 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego odnajdowano w różnych tkankach jak: wątroba, śledziona, nadnercza (11). Stężenie 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego w wątrobie wynosi 12.3 do 40.2 mg na 100 gramów tkanki i zależy w dużej mierze od wieku zwierzęcia (11-13).

Opracowanie szeregu metod syntezy 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego (6, 14-16) umożliwiło prześledzenie niektórych jego efektów fizjologicznych jak i wpływu na przemiany metaboliczne. Z efektów fizjologicznych w pierwszym rzędzie wykazano, że jest on skutecznym środkiem w zapobieganiu skorbutu u ryb i małp (17-19). Działania przeciwskorbutowego nie wykazano jednak u świnki morskiej (17, 20). Brak efektu leczniczego u świnki morskiej może być wynikiem szybkiego wydalania 2-wodorosiarczanu witaminy C, które praktycznie rzecz biorąc zachodzi w przeciągu pięciu godzin od momentu iniekcji. Po 100 godzinach stwierdzono zaledwie 1% wprowadzonej dawki. U ryb nagromadza się radioaktywnego 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego następowo szczególnie obficie w obszarach intensywnej biosyntezy kolagenu, w chrząstce a także w skórze i kościach. 2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego podany pawianowi doustnie, nie ulegał wchłanianiu z jego przewodu pokarmowego (21). Związek ten podany w iniekcji dożylniej ulegał szybszemu wydalaniu aniżeli kwas askorbinowy; ustalono, że okres półtrwania kwasu askorbinowego wynosi 120 min a 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego 90 min. Podanie dożylnie 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego wraz z kwasem askorbinowym wywoływało znacznie wolniejsze wydalanie kwasu askorbinowego. 2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego nie ulegał hydrolizie we krwi pawiana (21).

Katabolizm 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego zależy od organizmu. U małp stwierdzono, że głównymi produktami katabolizmu obydwu związków jest dwutlenek węgla wydalany z oddechem. U innych zwierząt i ludzi wydalany zostaje wraz z moczem niezmienny kwas askorbinowy, dehydroaskorbinowy, 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego oraz kwas szczawowy.

Występowanie w moczu 2-wodorosiarczanu  $^{14}\text{C}$ -kwasu askorbinowego po wprowadzeniu znakowanego  $[1-^{14}\text{C}]$ askorbinianu, wskazywałoby na istnienie u zwierząt enzymów zdolnych do syntezy tego związku.

Z doniesień Horniga i współpracowników (22), wynika, że askorbinian podany doustnie wraz z nieorganicznym siarczaniem —  $^{35}\text{SO}_4$ , ulega procesowi „usiarczania” w śluzówce przewodu pokarmowego. Enzymatyczną syntezę 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego *in vitro*, przeprowadzili Mohamram i współpracownicy (23). Źródło sulfo-



transferazy stanowiły wątroba i jelito grube szczura. Fibroblasty ludzkie w warunkach hodowli tkankowej posiadają również nieznaczną zdolność syntezy 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego (24). Z badań nad metabolizmem 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego w fibroblastach wynika, że grupa siarczanowa, najprawdopodobniej po uprzednim hydrolytycznym odszczepieniu przy udziale sulfohydrolazy, uczestniczy w takich samych reakcjach jak nieorganiczny siarczan.

Aktywność sulfohydrolazową wobec 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego wykazali Hatanaka i współpracownicy (6, 25-28). Enzym o masie cząsteczkowej 56 000 został wyizolowany z wątroby ślimaka morskiego *Charonia Lampas*, optimum jego działania przypada przy pH 4.0; enzym ten jest silnie hamowany przez jony fosforanowe,  $K_m$  ma wartość 0.34 mM (25). Enzymy hydrolizujące 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego wyizolowano również z wątroby i mózgu wołu oraz z wątroby świnki morskiej (6, 20, 29, 30). Z prac Roya (29, 30) wynika, że 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego hydrolizowany jest przez oczyszczone preparaty arylosulfatazy A (E.C. 3.1.6.8 — Cerebrozydo-3-siarczano sulfohydrolaza), dla której fizjologicznym substratem jest cerebrozydo-3-siarczan. Hydrolizę 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego katalizuje również arylosulfataza A z moczu ludzkiego (31, 32). Arylosulfatazy B (E.C. 3.1.6.9 — Chondroityno-4-sulfataza), nie hydrolizują w tym samym stopniu 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego co arylosulfataza A.

Według Tolberta (20), enzym z wątroby wołu hydrolizujący 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego jest białkiem o masie cząsteczkowej 138 000 przy pH 8.0 i 300 000 przy pH 5.4. Optimum jego działania przypada w zakresie pH 5.0-5.7, wartość  $K_m$  wynosi 3 mM, jony fosforanowe silnie hamują enzym. Ustalona przez Tolberta i współpracowników (20) masa cząsteczkowa sulfohydrolazy 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego, różni się od masy cząsteczkowej arylosulfatazy A, która w zależności od źródła enzymu wynosi 104 000—109 000 przy pH 7.5 i około 400 000 przy pH 5.0 (33). Sprawa identyczności arylosulfatazy A z sulfatazą 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego jest nadal dyskusyjna.

W świetle tych jeszcze nielicznych danych, bezsporna jednak wydaje się możliwość syntezy i hydrolizy 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego w organizmach zwierzęcych, kwestią otwartą pozostaje sprawa znaczenia tego związku i miejsca w procesach biochemicznych.

2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego (6), jako związek bardziej stabilny od wolnego kwasu (14), może stanowić depozytową formę uruchomianą w warunkach wyczerpania wolnego kwasu askorbinowego. Obecność 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego w dużych ilościach w spoczynkowych cystach krewetki morskiej *Artemia salina*, mogłoby potwierdzać to przypuszczenie.

Istnieją również dane, że 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego uczestniczy w regulacji reakcji zależnych od obecności kwasu askorbinowego np. związek ten jest inhibitorem reakcji hydroksylacji dopaminy, zachodzącej przy udziale  $\beta$ -hydroksylazy dopaminy (E.C. 1.14.17.1 — 3,4-dwufenyloetanolamina, askorbinian: tlen oksydoreduktaza) (25).

Udział 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego w przekazywaniu grupy siarczanowej na wiele związków, w tej liczbie również na cholesterol, wykazano zarówno w doświadczeniach *in vivo* jak i *in vitro* (34-37). Dla przykładu, po dosercowym wprowadzeniu  $^{35}\text{SO}_4$ -2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego, radioaktywność odnajdowano w siarczanie cholesterolu żółci (21, 37, 38), nie stwierdzano natomiast radioaktywności w siarczanie chondroityny.

Zdolność przekazywania grupy siarczanowej na cholesterol skierowała uwagę na ewentualny udział 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego na procesy wchłaniania, wydalania oraz poziomu cholesterolu we krwi. Badania nad 2-wodorosiarczaniem witaminy C wydawały się tym bardziej celowe, iż efekt hipolipemiczny i antysklerotyczny wolnego kwasu askorbinowego stwierdzany był przez wielu badaczy (39-41). Badania przeprowadzone w tym aspekcie z 2-wodorosiarczaniem witaminy C, wykazały, że jest on związkiem bardziej skutecznym od witaminy C w usuwaniu hiperlipidemii a w szczególności hipercholesterolemii.

Obniżenie poziomu cholesterolu i lipidów krwi po doustnym podaniu 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego, zostało stwierdzone przez H a y a s h i i współpracowników w 1974 roku (42). Ta sama grupa badaczy (43), wykazała, że 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego wywołuje również znaczny efekt hipolipemiczny w eksperymentalnej hiperlipidemii królików wywołanej podaniem Tritonu X-100. Przykładowo w grupie kontrolnej z hiperlipidemią, poziom cholesterolu wynosił  $277 \pm 15.4$  mg %; w grupie zwierząt, którym podano kwas askorbinowy, zawartość cholesterolu nie ulegała obniżeniu i wynosiła  $262 \pm 23.4$  mg %, natomiast u zwierząt, którym podano 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego stężenie cholesterolu obniżało się do wartości  $203 \pm 15.4$  mg %.

Z dalszych prac opublikowanych przez H a y a s h i i współpracowników (44,45) i dotyczących wpływu doustnie podanego 2-wodorosiarczanu kwasu askorbinowego i wolnego kwasu askorbinowego w eksperymentalnej hiperlipidemii u królików wywołanej wysokocholesterolową dietą, wynika, że hipolipemiczny efekt obydwu związków jest odmienny. Wyciąg danych liczbowych z pracy H a y a s h i i współpracowników (44) zestawiono w tabeli I.

2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego wydaje się być efektywniejszym czynnikiem w usuwaniu hipercholesterolemii, natomiast wolny kwas askorbinowy wpływa wydatniej na obniżenie poziomu trójglicerydów, w szczególności w długoterminowej diecie wysokocholesterolowej.

2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego okazał się również skutecz-



Tabela 1

Wpływ kwasu askorbinowego i 2-wodorosiarczany kwasu askorbinowego na poziom cholesterolu i trójglicerydów w eksperymentalnej hipercholesterolemii u królików (44)

Lipid	Czas trwania eksperymentu w tygodniach	I kontrola (mg %)	II kwas askorbinowy (mg %)	III 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego (mg %)
cholesterol	4	899 ± 68	1025 ± 117	372 ± 53
trójglicerydy	4	230 ± 10	250 ± 52	182 ± 15
cholesterol	10	2119 ± 125	1446 ± 125	910 ± 100
trójglicerydy	10	552 ± 39	211 ± 18	315 ± 57

Hipercholesterolemię wywoływano u zwierząt o wadze 2,5 kg, przez podawanie paszy, dziennie 100 g, zawierającej 1% cholesterolu (I). Zwierzętom grupy II podawano dodatkowo doustnie 150 mg kwasu askorbinowego, natomiast zwierzętom grupy III, 300 mg 2-wodorosiarczany kwasu askorbinowego  $\times 3H_2O$ .

niejszym czynnikiem zapobiegawczym przed nagromadzeniem się cholesterolu w tkankach a w szczególności w aorcie zwierząt; i tak jeśli w grupie kontrolnej procent zmian miażdżycowych wynosił  $44.7 \pm 6^0/0$ , to w grupie zwierząt, którym podano kwas askorbinowy lub 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego odpowiednie wartości wynosiły:  $5.1 \pm 2.2^0/0$  i  $2.9 \pm 0.7^0/0$ ,

2-Wodorosiarczan kwasu askorbinowego nie obniżał jednak poziomu już odłożonego cholesterolu (44, 46, 47).

Na podstawie dotychczasowych danych można sądzić, że 2-wodorosiarczan kwasu askorbinowego w bliżej jeszcze nieokreślony sposób wpływa na proces wchłaniania cholesterolu, co w konsekwencji objawia się efektem hipolipemicznym. Nie jest wykluczone, że jako dawca grupy siarczanowej z wysokim potencjałem transferu wywołuje estryfikację cholesterolu, umożliwiając tym samym proces wchłaniania tego związku.

Reasumując wydaje się, że warto przebadac szerzej mechanizmy biochemiczne leżące u podstaw biologicznych efektów 2-wodorosiarczany witaminy C.

Zaakceptowano do druku 15.11.1981

## PIŚMIENNICTWO

1. Mead C. G., Finamore F. J., (1969), *Biochemistry*, 8, 2652—2655.
2. Summerwell W. N., Sealock R. R., (1952), *J. Biol. Chem.*, 196, 753—759.
3. Malakar M. C., (1963), *Nature*, 198, 185—186.
4. Mumma R. O., McKee E., Verlangieri A. J., Barron G., (1972), *Nutr. Repts. Inter.*, 6, 133—137.



5. Mumma R. O., Verlangieri A. J., Weber W. W., (1977), *Carbohydrate Res.*, **19**, 127.
6. Hatanaka H., Ogawa Y., Egami F., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 861—866.
7. Baker E. M., Hammer D. C., March S. C., Tolbert B. M., Canham J. E., (1971), *Science* 826—827.
8. Baker E. M., Halver J. E., Johnsen D. O., Joyce B. E., Knight M. K., Tolbert B. M., (1975), *Ann. New York Acad. Sci.*, **258**, 72—80.
9. Tolbert B. M., Isherwod D. J., Atchely R. W., Baker E. M., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 521.
10. Compeau J. D., March S. C., Tolbert B. M., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 931 (Abstract).
11. Mumma R. O., Verlangieri A. J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **273**, 249—253.
12. Hornig D., (1975), *Ann. New York Acad. Sci.*, **258**, 103—118.
13. Salomon L. L., (1961), *Ann. New York Acad. Sci.*, **92**, 133.
14. Quadri S. F., Sieb P. A., Deyoe C. W., (1973), *Carbohydrate Res.*, **29**, 259—264.
15. Sieb P. A., Liang Y. T., Lee C. H., Hosenev R. C., Deyoe C. W., (1974), *J. Chem. Soc. (Perkin Trans)*, **1**, 1220—1224.
16. Muccino R. R., Markezich R., Vernice G. G., Perry C. W., Liberman A. A., *Carbohydrate Res.*, (1976), **47**, 172—175.
17. Kuenzig W., Avenia R., Kamm J. J., (1974), *J. Nutr.*, **104**, 952—956.
18. Halver J. E., Smith R. R., Tolbert B. M., Baker E. M., (1975), *Ann. New York Acad. Sci.*, **258**, 81—102.
19. Brin M., Machlin L. J., Kuenzig W., Garcia F. C., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 884 (Abstract).
20. Tolbert B. M., Downing M., Carlson R. W., Knight M. K., Baker E. M., (1975), *Ann. New York Acad. Sci.*, **258**, 49—69.
21. Kotzé J. P., Menne I. V., (1978), *South African J. Sci.*, **74**, 21—24.
22. Hornig D., Gallo-Torres H. E., Weise H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 549—556.
23. Mohamram M., Rucker R. B., Hodges R. F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **437**, 305—310.
24. Bond A. D., (1975), *Ann. New York Acad. Sci.*, **258**, 307—316.
25. Hatanaka H., Ogawa Y., Egami F., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 801—806.
26. Hatanaka H., Ogawa Y., Egami F., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 353—359.
27. Hatanaka H., Ogawa Y., Egami F., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 807—810.
28. Hatanaka H., Egami F., Koto T., Nagatsu T., (1975), *J. Biochem.*, **78**, 821—824.
29. Roy A. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **377**, 356—363.
30. Roy A. B., (1979), *Methods in Enzymology*, Vol. **62**, 42—47.
31. Fluharty A. L., Stevens R. L., Miller R. T., Shapiro S. L., Kihara H., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 508—516.
32. Stevens R. L., Fluharty A. L., Shapiro S. S., Miller R. T., Davies L. L., Kihara H., (1977), *Anal. Biochem.*, **79**, 23—32.
33. Gniot-Szulżycka J., Wydawnictwa Naukowe UMK, 1977, 1—86.
34. Chu T. M., Slaunwhite W. R., (1968), *Steroids*, **12**, 309—321.
35. Ford E. A., Ruoff P. M., (1965), *Chem. Comm.* **24**, 630—631.
36. Mumma R. O., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 571—573.
37. Hornig D., Weber F., Wiss O., (1974), *Z. Klin. Chem. Biochem.*, **12**, 62—65.
38. Verlangieri A., Mumma R., (1973), *Atherosclerosis*, **17**, 37—48.
39. Ginter E., Kajba I., Nizner D., (1967), *J. Nutr.*, **91**, 107—118.

40. Pool W. R., Newmark H. L., Dalton C., Banziger R. F., Howard A. N., (1971), *Atherosclerosis*, **14**, 131—135.
41. Spittle C. R., (1971), *Lancet*, **2**, 1280—1281.
42. Hayashi E., Yamada J., Terada M., Kunitomo M., Kinoshita T., (1974), *Folia Pharmacol., Japan*, **70**, 75p.
43. Hayashi E., Yamada Y., Kunitoma M., Terada M., Tomita T., Kinoshita T., (1976), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 201—208.
44. Hayashi E., Yamada Y., Kunitoma M., Terada M., Sato M., (1978), *Japan J. Pharmacol.*, **28**, 61—72.
45. Hayashi E., Yamada Y., Kunitoma M., Terada M., Watanabe Y., (1978), *Japan J. Pharmacol.*, **28**, 133—143.
46. Finamore F. J., Feldman R. P., Cosgrove G. E., (1976), *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **46**, 275—285.
47. Finamore F. J., Feldman R. P., Serrano L. J., Cosgrove G. E., (1977), *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **47**, 62—67.

- 401. W. R. ...
- 402. ...
- 403. ...
- 404. ...
- 405. ...
- 406. ...
- 407. ...
- 408. ...
- 409. ...
- 410. ...
- 411. ...
- 412. ...
- 413. ...
- 414. ...
- 415. ...
- 416. ...
- 417. ...
- 418. ...
- 419. ...
- 420. ...



WŁODZIMIERZ BEDNARSKI <sup>\*)</sup>, STEFAN POZNAŃSKI <sup>\*\*)</sup>

## Synteza plastein w hydrolizatach białkowych

### Plastein synthesis in protein hydrolysates

#### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Podstawowe zasady plasteinowania
- III. Hipotezy dotyczące tworzenia plastein
- IV. Praktyczne wykorzystanie procesu plasteinowania
- V. Podsumowanie

#### Contents:

- I. Introduction
- II. The basic principles of the plastein formation
- III. Hypotheses concerning the plastein formation
- IV. Practical application of the plastein formation process
- V. Summary

## I. Wstęp

Enzymy proteolityczne dodane do zagęszczonych, częściowych hydroli-  
zatów białek katalizują powstawanie nierozpuszczalnego produktu, o kon-  
systencji żelu nazwanego „plasteiną” (1-3). Właściwości plasteiny różnią  
się wyraźnie od właściwości białek, które poddano enzymatycznej hy-  
drolizie.

W prezentowanym opracowaniu omawiamy aktualny stan wiedzy do-  
tyczący plasteinowania białek, charakterystykę procesu oraz możliwości  
zastosowania dotychczasowych osiągnięć w praktyce.

---

<sup>\*)</sup> dr hab., <sup>\*\*)</sup> prof. dr hab., Instytut Inżynierii i Biotechnologii Żywności, Akade-  
mia Rolniczo-Techniczna, 10-957 Olsztyn.

## II. Podstawowe zasady plasteinowania

Większość autorów definiuje proces plasteinowania jako enzymatyczne przeprowadzenie hydrolizatów białkowych w wysokocząsteczkowe peptydy, nierozpuszczalne w 10-procentowym roztworze kwasu trójchloro-octowego, w acetonie lub 70-procentowym roztworze etanolu (4-6).

Proces plasteinowania przebiega najskuteczniej jeżeli: stężenie oligopeptydów w hydrolizacie jest w granicach 30-50%, hydrolizat zawiera niskocząsteczkowe peptydy, a stężenie jonów wodorowych różni się od tego w jakim prowadzono enzymatyczną hydrolizę białek (7, 8). Wydajność procesu plasteinowania zależy w dużym stopniu od rodzaju i specyficzności działania enzymu proteolitycznego wprowadzonego do zagęszczonych hydrolizatów (9).

Dobre wydajności uzyskiwano stosując  $\alpha$ -chymotrypsynę, pepsynę, nagarazę, esperazę, pronazę (2, 3, 10-12).

Na wydajność procesu wpływa również rodzaj substratu (11). Hydrolizaty białek hydrofilnych nie są właściwymi substratami, ponieważ otrzymuje się plasteiny rozpuszczalne, co utrudnia ich wydzielanie ze środowiska reakcji. Natomiast z hydrolizatów, charakteryzujących się dużą zawartością substancji hydrofobowych, powstają łatwo strącalne plasteiny jeszcze przed optymalnym ich nagromadzeniem (13, 14).

W celu ułatwienia kontroli plasteinowania, Arai i współautorzy (15) wprowadzili wskaźnik określający zależność wydajności procesu ( $\alpha$ ) od rozpuszczalności plasteiny ( $\beta$ ). Stwierdzono, że wydajność procesu plasteinowania ( $\alpha$ ) hydrolizatu wysokohydrofilnej kazeiny wynosi 40%, natomiast wyliczony współczynnik  $\beta/\alpha$  wynosi zaledwie 0,28. W przypadku hydrolizatów zeiny, która jest białkiem hydrofobowym wartość wynosi 57%, a wartość  $\beta/\alpha$  aż 0,87; mieszaninę zaś tych dwóch hydrolizatów w stosunku 3:1 charakteryzują wartości  $\alpha = 88\%$  i  $\beta/\alpha = 0,47$ . Arai i współautorzy (15, 16) podkreślają, że przebieg procesu plasteinowania jest optymalny, gdy współczynnik  $\beta/\alpha$  sięga 0,5.

Na wydajność procesu plasteinowania wpływają czynniki aktywujące lub inhibujące działanie enzymów proteolitycznych. Do czynników hamujących plasteinowanie przez  $\alpha$ -chymotrypsynę można zaliczyć n-heksan, benzyl-D,L-fenylalaninę oraz dwuwartościowe kationy. Wydajność procesu zależy też od stężenia jonów w środowisku. Stwierdzono, że obecność NaCl w granicach od 0,1 M do 0,8 M w hydrolizatach ovalbuminy stymuluje wydajność syntezy plasteiny o 10% (16). Ponadto dodanie 0,2 M roztworu NaCl przyspiesza proces plasteinowania (11).

## III. Hipotezy dotyczące tworzenia plastein

Dotychczas brak jest jednoznacznej teorii wyjaśniającej mechanizm plasteinowania białek. Hipotezy, dotyczące mechanizmu powstawania

plastein, różnią się znacznie i często są przeciwstawne (2, 3). Stwierdzono, że ilość substancji nierozpuszczalnych w 10% roztworze kwasu trójchlorooctowego wzrasta podczas plasteinowania białek, lecz nie zawsze prowadzi to do ich wytrącania się (18). Eriksen i współautorzy (12) stwierdzają, że powstawanie plastein jest wynikiem agregacji i polimeryzacji peptydów w wyniku oddziaływania niepolarnych reszt aminokwasów. Reakcja ta zachodzi łatwiej w roztworach o wysokiej sile jonowej, np. w obecności dużego stężenia NaCl. Yamashita i współautorzy (7, 12, 19) przypuszczają, że plasteinowanie polega głównie na polikondensacji. Za podstawę tej interpretacji cytowani autorzy przyjmują wzrost ilości wiązań peptydowych.

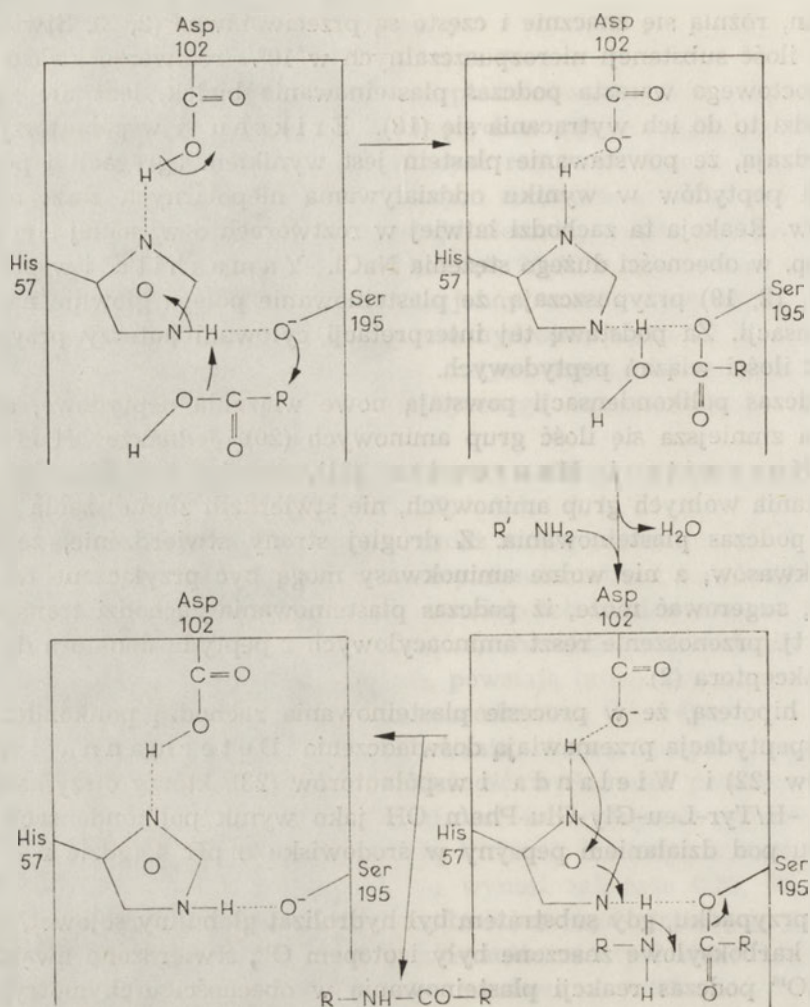
Podczas polikondensacji powstają nowe wiązania peptydowe, a tym samym zmniejsza się ilość grup aminowych (20). Jednakże Hofsten (11), Horowitz i Haurowitz (21), stosując trzy różne metody oznaczania wolnych grup aminowych, nie stwierdzili zmniejszania się ich ilości podczas plasteinowania. Z drugiej strony stwierdzenie, że estry aminokwasów, a nie wolne aminokwasy mogą być przyłączane do peptydów, sugerować może, iż podczas plasteinowania zachodzi transpeptydacja, tj. przenoszenie reszt aminoacylowych z peptydu donatora do peptydu akceptora (2).

Za hipotezę, że w procesie plasteinowania zachodzą polikondensacja i transpeptydacja przemawiają doświadczenia Determanna i współautorów (22) i Wielanda i współautorów (23), którzy otrzymali plasteinę -H/Tyr-Leu-Gly-Glu-Phe/n OH jako wynik polikondensacji monomeru pod działaniem pepsyny w środowisku o pH 4 (gdzie  $n = 2, 9, 4$  i  $5$ ).

W przypadku, gdy substratem był hydrolizat globuliny sojowej, której grupy karboksylowe znaczone były izotopem  $O^{18}$ , stwierdzono uwalnianie się  $H_2O^{18}$  podczas reakcji plasteinowania w obecności  $\alpha$ -chymotrypsyny w środowisku o pH 5,3. Stwierdzono również, że wartość pH jest ważnym czynnikiem w powstawaniu acylo- $\alpha$ -chymotrypsyny. Powstawanie jej maleje wraz ze wzrostem pH powyżej 7 (13). Natomiast Tamimoto i współautorzy (17) wskazali na znaczenie seryny 195 i histydyny 57 oraz  $\alpha$ -chymotrypsyny w tworzeniu plastein. Schemat reakcji inicjujących powstawanie plastein przedstawia Ryc. 1. Według Araiego i współautorów (15) zrozumienie mechanizmu procesu plasteinowania może ułatwić schemat proteolizy zaproponowany przez Werbera (24). Po reakcji enzymu z substratem powstaje kompleks ES, który przechodzi w acyloenzymatyczną formę pośrednią ( $ES'$ ) z uwolnieniem peptydu  $P_1$ . Pośrednia forma ( $ES'$ ) ulega następnie hydrolizie przy współdziałaniu wody z uwolnieniem peptydu  $P_2$ .

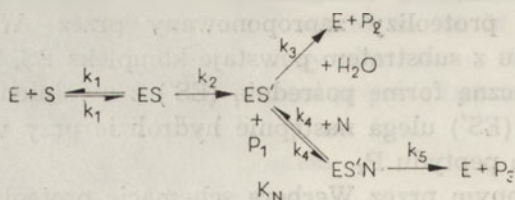
W przedstawionym przez Werbera schemacie proteolizy mogą występować reakcje transestryfikacji, transamidacji i transpeptydacji. Podczas transpeptydacji końcowe grupy -COOH z substratu S reagują z enzymem





**Ryc. 1.** Schemat reakcji inicjujących tworzenie plastein w obecności  $\alpha$ -chymotrypsyny (1)

i powstaje peptydyloenzym, który reaguje z tak zwanym peptydem N tworząc peptyd  $P_3$  o wyższym ciężarze cząsteczkowym. Estry aminokwasów mogą być również w ten sposób wbudowywane w plasteinę (25). Wydajność reakcji plasteinowania zależy od rodzaju wbudowywanych estrów



**Ryc. 2.** Schemat proteolizy wg Werbera (24)

Oznaczenia: E — enzym, ES — kompleks enzym-substrat, ES' — acyloenzymatyczna forma pośrednia, N,  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  — peptydy

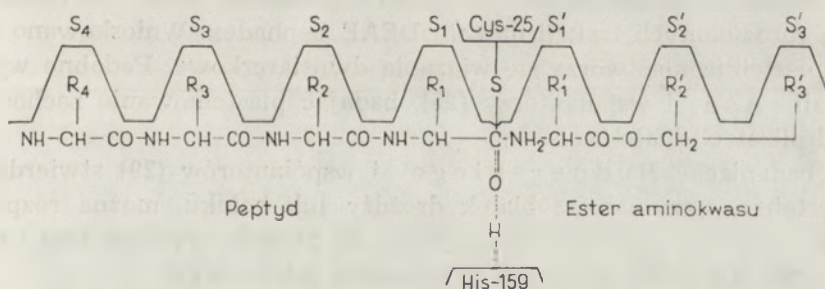
aminokwasów. Lepsze efekty uzyskano stosując np. estry waliny czy  $\beta$ -izoleucyny (25). O wyniku syntezy wysokocząsteczkowego peptydu P<sub>3</sub> o jego właściwościach decyduje również rodzaj alkoholu, który brał udział

Tabela 1

Kinetyka wbudowywania estrów aminokwasów do peptydów w reakcji z hippurylo-papainą (1)

Rodzaj estru	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>
<i>L</i> -alanina	mM	mmole/min
ester etylowy	27,0	0,98
ester butylowy	9,0	0,91
<i>L</i> -norwalina		
ester etylowy	2,5	0,91
ester butylowy	2,0	0,93
<i>L</i> -walina		
ester etylowy	33,3	0,95
ester butylowy	13,9	0,88
<i>L</i> -fenyloalanina		
ester etylowy	2,0	0,85
ester butylowy	1,9	0,80

w powstawaniu estru. Im wyższe właściwości hydrofobowe zastosowanego alkoholu, tym wyższa wydajność procesu, tym bardziej hydrofobowy produkt. Parametry, określające kinetykę procesu plasteinowania w zależności od rodzaju estrów przedstawiono w tabeli 1. Rycina 3 przedstawia natomiast schemat wbudowywania estrów w łańcuchach peptydów.



Ryc. 3. Schemat przyłączenia estru aminokwasu do peptydu przy współdziałaniu papainy (1)

Według hipotezy zaprezentowanej przez Schechtera i Bergera, a opisaną przez Araiego i współautorów (1), zewnętrznej części łańcucha substratu R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> oraz R'<sub>1</sub>, R'<sub>2</sub>, i R'<sub>3</sub> odpowiadają aktywne miejsca w enzymie S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> oraz S'<sub>1</sub>, S'<sub>2</sub> i S'<sub>3</sub>, które uwalniają się na przeciw siebie i wówczas możliwa jest resynteza (schemat reakcji str. 148).

Uwzględniając powyższą interpretację oraz kinetykę reakcji plasteinowania (tabela 1), przyjęto, że zewnętrzne grupy estrów aminokwasów przyłączają się do aktywnych miejsc w enzymie  $S_1$ , a możliwym jest również przyłączenie części alkoholowej do  $S_2$  i dlatego estry aminokwasów mogą łatwo się wbudować w plasteinę, szczególnie wówczas kiedy mają możliwość przyłączenia się do grupy karboksylowej, np. tioestrów w acylo-papainie (1, 15, 16, 26).

O wydajności i szybkości tego procesu decyduje rodzaj enzymu, a ściślej acylo-enzymu (27, 28). Na przykład stosując jako (ES') cynamoil-papainę uzyskano 670 razy szybszy przebieg procesu niż w przypadku cynamoil-chymotrypsyny (1).

Proces plasteinowania hydrolizatów białek drożdży oraz bobiku lub ich połączeń z hydrolizatami białek serwatkowych względnie białek plazmy krwi bydłowej badał Bednarski i współautorzy (29, 30). Pod działaniem  $\alpha$ -chymotrypsyny na hydrolizaty tych białek otrzymano żel, w którym zawartość substancji azotowych, rozpuszczalnych w 12-procentowym roztworze kwasu trójchlorooctowego, wynosiła 35% substancji azotowych w hydrolizacie.

Poprzez porównanie ciężarów cząsteczkowych peptydów hydrolizatów białek wyjściowych z ciężarami cząsteczkowymi peptydów hydrolizatów poddanych plasteinowaniu stwierdzono w tych ostatnich 3-4-krotny wzrost ilości peptydów o c.c.z. powyżej  $4 \times 10^5$  (30).

Stwierdzono również (stosując rozdział na żelu DEAE Sephadex) różnice w składzie aminokwasów w poszczególnych frakcjach surowców i plastein, co sugeruje, że plasteinowanie polega na ponownym odtworzeniu wiązań peptydowych białek hydrolizowanych pepsyną (29, 30). Po działaniu  $\alpha$ -chymotrypsyny na hydrolizaty, niezależnie od obecności lub nieobecności merkaptoetanolu, otrzymano plasteiny, które nie różnią się ilością rozdzielonych frakcji na żelu DEAE Sephadex. Wnioskowano stąd, że w plasteinie nie tworzą się wiązania dwusiarczkowe. Podobne wyniki uzyskali Aso i współautorzy (25), badając plasteinowanie zachodzące w hydrolizatach białek soi.

W badaniach Bednarskiego i współautorów (29) stwierdzono, że plasteiny, otrzymane z białek drożdży lub bobiku, można rozpuścić w 8 M roztworze mocznika, co sugeruje, że plasteinowanie polega na powstawaniu n-merów łączonych wiązaniami wodorowymi.

Analiza hydrolizatu białek bobiku oraz plasteiny otrzymanej z tego hydrolizatu w podczerwieni (w zakresie fal od  $1000 \text{ cm}^{-1}$  do  $3400 \text{ cm}^{-1}$ ) wykazała różnice w pasmach absorpcji 1530, 1650 i 3300 do  $3400 \text{ cm}^{-1}$  (30). Pasma absorpcji przy  $1530 \text{ cm}^{-1}$  okazało się bardziej niejednorodne w przypadku hydrolizatu białek bobiku. W paśmie tym uwidacznia się oddziaływanie grup  $\text{NH}$  i zjonizowanych grup  $\text{COO}^-$ . Otrzymane wyniki sugerują, że więcej tych grup występuje w hydrolizacie niż w plasteinie. Analiza całego widma pozwala także przypuszczać, że podczas działania



$\alpha$ -chymotrypsyny na hydrolizaty nastąpił wzrost liczby wiązań peptydowych. Podobnie analiza widma w podczerwieni hydrolizatu ze zdenaturowanych białek soi oraz plasteiny z tego hydrolizatu pozwoliła stwierdzić różnice w absorpcji w pasmach  $1575\text{ cm}^{-1}$  i  $1450\text{ cm}^{-1}$  co sugeruje również, że podczas procesu plasteinowania powstawały wiązania peptydowe.

Przedstawione powyżej hipotezy wskazują, że w zależności od enzymu katalizującego proces tworzenia plastein, mechanizm jego może być różny.

#### IV. Praktyczne wykorzystanie procesu plasteinowania

Zapotrzebowanie na białko spożywcze skłania do poszukiwań nowych metod uszlachetniania i modyfikacji białek z surowców nietradycyjnych i produktów ubocznych.

Do znanych metod „uszlachetniania białek” tzn. poprawy jakości zalicza się ich enzymatyczną hydrolizę. Hydroliza białek poprawia ich przyswajalność i umożliwia eliminację towarzyszących białkom substancji toksycznych. Podczas hydrolizy białek występuje degradacja substancji toksycznych, lecz pojawiają się tak zwane „gorzkie peptydy” wywołujące niekorzystny smak. Metody usuwania gorzkich peptydów, np. z zastosowaniem absorpcji na węglu aktywnym lub ich enzymatyczny rozkład, np. karboksypeptydazą, nie znalazły praktycznego zastosowania (4, 5, 10, 31). Stosując natomiast proces plasteinowania można otrzymać białko pozbawione gorzkiego smaku (charakterystycznego dla hydrolizatów białkowych) o zmienionych w porównaniu do surowca właściwościach fizykochemicznych.

W tym zakresie istnieją duże możliwości kombinacji, np. łączenie różnorodnych peptydów lub hydrolizatów białek różnego pochodzenia albo wbudowywania żądanych aminokwasów w strukturę białek plasteiny.

Zmianę właściwości fizykochemicznych białek soi uzyskano wprowadzając do hydrolizatu przed plasteinowaniem ester etylowy kwasu glutaminowego (32). W innych badaniach wskazano na możliwość wyodrębnienia fenyloalaniny z roztworu hydrolizatów białek soi z równoczesnym wzbogaceniem ich w tyrozynę lub tryptofan (26). Po plasteinowaniu otrzymano produkty o zmienionych w większości korzystniejszych właściwościach fizykochemicznych, np. lepszym emulgowaniu tłuszczów, wyższą odpornością termiczną. W porównaniu do białek surowca uzyskano produkty o wyższej wartości odżywczej (26, 30).

Mieszając hydrolizat białek soi z hydrolizatem keratyny wełny uzyskano wyraźny wzrost wartości odżywczej wyrażonej wskaźnikiem wydajności wzrostowej białek (*protein efficiency ratio* — PER) z 1,2 stwierdzonego dla białek mąki sojowej do 2,86 wykazanego dla plasteiny (14). Poprawę wartości odżywczej plasteiny soi uzyskano przez wprowadzenie

bogatego w aminokwasy siarkowe hydrolizatu keratyny przed reakcją plasteinowania. Podobne wyniki w tym zakresie uzyskano poprzez wbudowywanie zestryfikowanych aminokwasów siarkowych w strukturę plasteiny otrzymanej z hydrolizatu białek soi w reakcji z nagarzą (14).

Bednarski i współautorzy (29, 30), prowadząc proces plasteinowania białek bobiku, otrzymali produkt o zmniejszonej zawartości inhibitorów trypsyny z 15,8 jednostek/mg białek surowca do 1,04 jednostek/mg białek plasteiny.

W porównaniu z białkami surowców, białka bobiku oraz drożdży po plasteinowaniu charakteryzowały się korzystniejszymi właściwościami fizykochemicznymi (30). Na podkreślenie zasługuje poprawa wartości biologicznej białek bobiku oraz drożdży, szczególnie w plasteinie otrzymanej z mieszaniny hydrolizatów tych białek z hydrolizatem białek serwatkowych w stosunku 3:2. Stwierdzono, że współczynnik PER białek bobiku wzrósł z 0,93 do 2,43 dla plasteiny otrzymanej z łączonych hydrolizatów pod wpływem działania  $\alpha$ -chymotrypsyny. W przypadku białek drożdży wzrost współczynnika PER wynosił od 1,42 do 2,62. Dla porównania w mieszaninie białek bobiku i białek serwatkowych w tym samym stosunku co w mieszaninie hydrolizatów poddanych reakcji plasteinowania współczynnik ten wynosił 1,32, a drożdży i białek serwatkowych 2,38 (30).

Ostatnio Arai i współautorzy (1) w wyniku tworzenia peptydów z udziałem proteaz otrzymali plasteiny wykazujące właściwości biologiczne aktywnych peptydów. W ten sposób otrzymali oni angiotensynę, sekretynę, elediozynę.

## V. Podsumowanie

Można przypuszczać, że proces plasteinowania znajdzie zastosowanie w „uszlachetnianiu” i „modyfikacji białek” z surowców nietradycyjnych i odpadowych produktów przemysłu spożywczego.

Otrzymane w ten sposób białka o świadomie ukształtowanych właściwościach, o określonym składzie aminokwasów i soli mineralnych można będzie stosować do modyfikowania składu i konsystencji produktów żywnościowych, sporządzania diet dla ludzi cierpiących na fenyloketonurię lub dolegliwości układu pokarmowego.

Postęp w unieruchamianiu enzymów proteolitycznych stwarzający możliwość wielokrotnego wykorzystania tej samej porcji enzymów (33-35) pozwoli w niedługim czasie obniżyć koszty procesu oraz ułatwi wykorzystanie reakcji plasteinowania w przemysłowym uszlachetnianiu, czy też modyfikowaniu białek do celów farmaceutycznych i spożywczych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Arai S., Fujimaki M., (1978), *Ann. Nutr. Alim.* **32**, 701—707.
2. Erikson S., Fagerson J. S., (1976), *J. Food Sc.* **41**, 490—492.
3. Schmandke H., (1976), *Nahrung* **20**, 567—573.
4. Fujimaki M., Yamashita M., Arai S., Kato M., (1970), *Agricult. Biol. Chem.*, **34**, 1325—1332.
5. Fujimaki M., Yamashita M., Arai S., (1973), *Agricult. Biol. Chem.* **37**, 2303—2312.
6. Yamashita M., Arai S., Matsuyama J., Gonda M., Kato M., Fujimaki M. (1970) *Agricult. Biol. Chem.* **34**, 1484—1491.
7. Yamashita M., Arai S., Tsai S., Fujimaki M., (1970) *Agricult. Biol. Chem.* **34**, 1593—1596.
8. Yamashita M., Arai S., Tsai S., Kato M., Fujimaki M. (1971), *Agricult. Biol. Chem.*, **35**, 86—91.
9. Determan H., Heuer I., Jaworek D., (1956) *Ann. Chem.* **690**, 189—202.
10. Edwards J. H., Shipe W. F., (1978), *J. Food Sc.*, **43**, 1215—1218.
11. Hofsten B., Lalasidis G., (1976), *J. Agricult. Food Chem.* **24**, 460—465.
12. Yamashita M., Arai S., Gonda M., Kato H., Fujimaki M., (1970), *Agricult. Biol. Chem.* **34**, 1333—1337.
13. Yamashita M., Arai S., Tanimoto S., Fujimaki M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **358**, 105—107.
14. Yamashita M., Arai S., Aso K., Fujimaki M. (1971), *J. Agricult. Chem.* **19**, 1151—1154.
15. Arai S., Yamashita M., Fujimaki M., Aso K., (1975), *J. Food Sc.* **40**, 342—344.
16. Aso K., Yamashita M., Arai S., Fujimaki M., (1973), *Agricult. Biol. Chem.* **37**, 2505—2509.
17. Tanimoto S., Yamashita M., Arai S., Fujimaki M., (1972), *Agricult. Biol. Chem.* **36**, 1595—1602.
18. Tsai S. J., Yamashita M., Arai S., Fujimaki M., (1973), *Agricult. Biol. Chem.*, **36**, 1045—1048.
19. Yamashita M., Arai S., Tanimoto S., Fujimaki M., (1973), *Agricult. Biol. Chem.*, **37**, 953—954.
20. Yamashita M., Arai S., Fujimaki M., (1976), *J. Food Sc.* **41**, 1029—1032.
21. Horowitz I., Haurowitz F., (1959), *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 231—233.
22. Determann H., Eggenschwiller S., Michel W., (1965) *Ann. Chem.* **690**, 182—188.
23. Wieland T., Determann H., Albrecht E., (1960), *Ann. Chem.* **633**, 185—188.
24. Werber M., Greenzaid P., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **293**, 208—211.
25. Yamashita M., Arai S., Aso K., Fujimaki M., (1972), *Agricult. Biol. Chem.* **36**, 1253—1356.
26. Aso K., Yamashita M., Arai S., Fujimaki M., (1974), *Agricult. Biol. Chem.* **38**, 679—682.
27. Blackburn G. M., Jeneks W. P., (1968), *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 2638—2641.
28. Brubcher L. J., Bender M. L., (1966), *J. Amer. Chem. Soc.* **88**, 5871—5872.
29. Bednarski W., Poznański S., Jędrychowski L., Leman J., Szczepanik M., (1976), *J. Milk Food Technol.* **39**, 521—525.



30. Bednarski W., (1979), *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie* Nr. 14, *Technologia Żywności* 3—71.
31. Yamashita M., Arai S., Matsayama J., Kato H., Fujimaki M., (1970), *Agricult. Biol. Chem.* **34**, 1492—1500.
32. Yamashita M., Arai S., Kakubo S., Aso K., Fujimaki M., (1975), *J. Agricult. Food Chem.* **23**, 27—30.
33. Kowalewska J., Poznański S., Bednarski W., Jakubowski J., Leman J., (1978), *North European Dairy Journal* **1**, 20—26.
34. Kowalewska J., Poznański S., (dane niepublikowane).
35. Pallavicini C., Finley J. W., Stanley W. L., Watters G. G., (1980), *J. Sc. Food Agric.*, **31**, 273—278.

## SPRAWOZDANIA

### The 11-th Linderström-Lang Conference — Poliaminy jako regulatory komórkowe

W dniach 9—13.08.1981 roku w Hanasaari Swedish-Finnish Cultural Center Espoo (Helsinki, Finlandia) odbywała się The 11-th Linderström-Lang Conference na temat: „Poliaminy jako regulatory komórkowe”.

W konferencji, która miała charakter wybitnie monotematyczny, wzięło udział około 100 osób z całego świata (z Europy, Kanady, USA, Nowej Zelandii, Japonii). Obecni byli chyba wszyscy przedstawiciele ośrodków zajmujących się problemem poliamin.

Program naukowy obejmował wystąpienia zaproszonych gości — prominentów w odpowiedniej tematyce w pięciu sesjach.

#### Sesja I

Tabor C. W. (Bethesda) — Zaburzenia w biosyntezie poliamin u mutantów *Saccharomyces cerevisiae*; Badania nad regulacją dekarboksylazy ornitynowej. Canellakis E. S. (New Haven) — Dekarboksylaza ornitynowa (przeгляд). Russel D. H. (Tucson) — Dekarboksylaza ornitynowa; Klucz regulacyjny białek. Canellakis Z. N. (New Haven) — Wpływ acetylowanych poliamin na dekarboksylazę ornitynową komórek HTC szczura. Morris D. R. (Seattle) — Regulacja syntezy i degradacja dekarboksylazy S-adenozylu-metioniny w aktywowanych limfocytach.

#### Sesja II

Stevens L. (Stirling) — Regulacja biosyntezy dwuamin, spermidyny i sperminy u grzybów. Rosengren E. (Lund) — Metabolizm poliamin a wzrost i hormony. Pegg A. E. (Hershey) — Regulacja poziomu putrescyny w wątrobie szczura. Seiler N. (Strasbourg) — Konwersja i katabolizm poliamin. Mamont P. S. (Strasbourg) — Metabolizm acetylowych pochodnych poliamin w komórkach hepatoma u szczura. Hayashi S. (Tokyo) — Dekarboksylaza ornitynowa wątroby szczura — oczyszczanie, własności immunochemiczne.

#### Sesja III

Tabor H. (Bethesda) — Biosynteza poliamin u mutantów *Escherichia coli*. Cohen S. S. (Stony Brook) — Poliaminy a namnażanie się wirusa w chloroplastach. Bagni N. (Bologna) — Wpływ różnych inhibitorów syntezy poliamin na wzrost *Helianthus tuberosus*. Herbst E. J. (Durham) — Rola poliamin w proliferacji komórek HeLa. Heby O. (Lund) — Rola poliamin w różnicowaniu komórkowym. Suzuki F. (Osaka) — Rola poliamin w ekspresji odróżnicowania chondriocytów w hodowli.

#### Sesja IV

Raina A. (Kuopio) — Rola poliamin w replikacji wirusów zwierzęcych. McCann P. P. (Cincinnati) — Hamowanie dekarboksylazy ornitynowej u niższych eukariotów. Bachrach U. (Jerusalem) — Poliaminy a wzrost parazytów *Leishmanii*. Jänne J. (Helsinki) — Zastosowanie antymetabolitów poliamin w eksperymentalnych guzach i w leukemii u ludzi. Marton L. J. (San Francisco) — Inhibitory poliamin w terapii guzów mózgu.

#### Sesja V

Algranti I. D. (Buenos Aires) — Wpływ poliamin i antybiotyków na translacje. Abraham A. K. (Bergen) — Poliaminy a synteza makromolekuł. Kleppe K. (Ber-

gen) — Wpływ poliamin na naprawczy DNA. Jacob S. T. (Hershey) — Rola sperminy aktywującej kinazę białkową a ekspresja genowa w rybosomach.

Wystąpienia sympozjalne miały często charakter wykładów, czasami zaś było to szerokie przedstawienie dorobku danego zespołu badawczego. Dyskuje towarzyszące każdej sesji były prowadzone w postaci bardzo swobodnych i spontanicznych wystąpień. Konferencja stworzyła okazję do poznania i wyjaśnienia szeregu zagadnień bezpośrednio z autorami interesujących prac. Szczególną korzyścią była możliwość zaznajomienia się z niektórymi szczegółami metodycznymi. Konferencja była jednocześnie okazją do nawiązania kontaktu naukowego z ludźmi prezentującymi ośrodki o najwyższym poziomie a zajmujące się tylko tym wąskim zakresem badań dotyczącym poliamin. Fakt ten ma zasadnicze znaczenie dla rozpoczęcia i programowania dalszych badań własnych w tym zakresie już w rodzimym ośrodku.

Podczas konferencji odbywała się również prezentacja 25 prac plakatowych. Sesja plakatowa zajęła całe popołudnie, była zatem traktowana równocześnie z wystąpieniami sympozjalnymi. W dyskusji przy plakatach uczestniczyli chyba prawie wszyscy obecni na konferencji.

Do najciekawszych z prezentowanych w tej sesji prac należy zaliczyć doniesienia S. Hayashi i K. Fujita (Japonia) na temat mechanizmu regulacji komórkowej dekarboksylazy ornitynowej w wątrobie szczura oraz pracę D. Morgana (W. Brytania) dotyczącą poliaminooksydazy (PAO) ludzkiej.

Interesujące prace przedstawili S. Henningsson, A. Henningsson i G. O. Löwendahl z Uniwersytetu w Lund (Szwecja). W pracach powyższych autorów omówiono metabolizm dwuamin i poliamin podczas rozwoju ssaków. Powyższa grupa badawcza przedstawiła ciekawe dane związane z wpływem DFMO (dwufluorometyloornityny) na metabolizm kadaweryny i putrescyny w nerce pobudzonej do wzrostu przez anaboliczne sterydy. Bardzo ciekawe, szczególnie dla medyków były prace dotyczące acetylowanych poliamin u pacjentów z nowotworami (W. Kersten, RFN) oraz wyniki badań H. Desser'a (Austria) przedstawiające poziomy poliamin w surowicy krwi i w skórze pacjentów z czerniakiem złośliwym. W powyższej grupie prac należałoby wspomnieć również pracę G. Scalabrino (Włochy) dotyczącą biosyntezy i aktywności dekarboksylaz w guzach mózgu ludzkiego.

K. Kamiński

## **FEBS Advanced Course N° 81, "Control and Processing in the Biosynthesis of Macromolecules"**

Spetses (Grecja), 30.VIII—12.IX.1981

Wyspa Spetses, położona u południowo-wschodnich brzegów Peloponezu, była miejscem kolejnej Szkoły Biologii Molekularnej i Komórkowej. Szkołę (formalnie określoną jako kurs FEBS) zorganizowano wspólnym wysiłkiem FEBS i EMBO a pracami organizatorów kierował prof. B. F. C. Clark (Aarhus).

Zagadnienie podane w tytule jest obszerne i obejmuje cały wachlarz problemów biologii molekularnej. Ale też takie było założenie Szkoły — spotkanie biochemików, reprezentujących różne kierunki badawcze i przekazanie im najnowszych wiadomości z podanego wyżej, szeroko zakreślonego tematu. Było to więc podejście przeciwstawne spotkaniom poświęconym wąskiemu, ściśle określoneemu zagadnieniu.

Cel swój organizatorzy realizowali przy pomocy 25 wykładowców — wybitnych specjalistów z dziedzin podanych w temacie. Z założenia wykłady podawały głównie ustalenia, przy rezygnacji ze szczegółowego opisu strony doświadczalnej. Przy-



jęto bowiem, że przy różnych zainteresowaniach badawczych uczestników Szkoły lepiej pozostawić część doświadczalną do odrębnego przedstawienia i przedyskutowania w mniejszych grupach.

Uzupełnieniem wykładów i wiążących się z nimi dyskusji była prezentacja prac własnych uczestników w sesjach plakatowych oraz dokładna dyskusja tych prac w małych zespołach pod kierunkiem wykładowców.

Wykład wstępny na temat struktury chromatyny wygłosił A. Klug (Cambridge), dokonując przeglądu ustaleń uzyskanych na drodze dysocjacji i renaturacji chromatyny, trawienia nukleazami i metod krystalograficznych.

Po tym nastąpiła najobszerniejsza seria wykładów na temat organizacji, struktury i ekspresji genów. Wprowadzenie stanowił wykład Ph. Kourilskyego (Paryż), omawiający analizę genomu za pomocą enzymów restrykcyjnych oraz przegląd metod izolacji genu. Dla przykładu przedstawiono bliżej izolację genu kodującego mRNA owalbuminy i genów mRNA antygenów zgodności tkankowej H2, występujących w kraincowo różnej zawartości w obrębie genomu. Z kolei N. Kjeldgaard (Aarhus) i H. Bujard (Heidelberg) omówili strukturę i transkrypcję genów prokariotycznych. Transkrypcję genów eukariotycznych, na przykładzie genów kodujących tRNA, przedyskutował G. Tocchini-Valentini (Rzym). Z dużym zainteresowaniem wysłuchaliśmy wykładu Ch. Weissmanna (Zurich) na temat manipulacji w obrębie genu i promotora, polegających na delecjach, insercjach i mutacjach punktowych. W konsekwencji zabiegi te doprowadziły do ustalenia wkładu poszczególnych fragmentów w regulację ekspresji. Temat kontynuował R. Kamen (Londyn), koncentrując się na genach transkrybowanych za pomocą polimerazy II. W. Fiers (Ghent) omówił zastosowanie bakteriofagów RNA, jako układów modelowych do badania ekspresji genu. Następnie H. Feldmann (Monachium) zreferował strukturę i ekspresję ludzkiego, mitochondrialnego DNA, odbijającego w uproszczony sposób większość procesów zachodzących podczas ekspresji genu u eukariotów. Przy okazji zwrócono uwagę na odczytywanie niektórych słów kodu genetycznego w mitochondriach w sposób odbiegający od zasady uniwersalności kodu. Uzupełnieniem tego tematu były 2 wykłady informujące o przemysłowych możliwościach zastosowań inżynierii genetycznej. Przejściem do następnego tematu były 2 krótkie wykłady D. Peattie (Londyn) i G. Marboix (Bruksela), w których podano zasady badania ekspresji RNA.

Badania nad translacją przedstawili obszernie M. Grunberg-Manago (Paryż) i B. F. C. Clark, zatrzymując się po kolei na problemach wiążących się z inicjacją, elongacją i terminacją biosyntezy białka oraz strukturą rybosomów.

Trzecią grupę tematyczną stanowiła regulacja ekspresji genu pod wpływem hormonów (R. Palmiter, Seattle) oraz fosforylacji *in vivo* i *in vitro* (P. Cohen, Aberdeen i J. Demaille, Paryż).

Czwartą i ostatnią grupę tematyczną wprowadził A. E. Smith (Londyn) — omawiając ogólnie transformację komórek pod wpływem wirusów. Ułatwieniem dla śledzenia dalszych wykładów było podanie klasyfikacji onkogennych wirusów na podstawie sposobu ekspresji materiału genetycznego. Wykład R. Eriksona (Denver) stanowił częściowe nawiązanie do poprzedniego tematu poprzez zarysowanie roli fosforylacji w regulacji ekspresji wirusa. Temat dopełniło omówienie organizacji genomu onkogennych wirusów RNA (N. Kjeldgaard) i DNA (A. Levin, Stony Brook). W ostatnim wykładzie dużo uwagi poświęcono funkcji biologicznej antygenów T produkowanych podczas wirusowej transformacji komórki.

W ostatniej części zaprezentowano jeszcze 4 wykłady nie powiązane z poprzednimi. Omówiono m.in. hipotezę sygnałną (T. Rapoport, Berlin) oraz udział enzymów proteolitycznych w regulacji biosyntezy białka (T. Petersen, Aarhus).

W Szkole wzięło udział 175 uczestników z Europy, USA, Kanady i Izraela. Polskę reprezentowały 4 osoby.

Smiało można mówić o walorach spotkania tego typu. Z jednej strony umożliwiała

ono kontakt z najnowszymi osiągnięciami biologii molekularnej (na co przy śledzeniu literatury z własnego tematu nie zawsze starcza czasu) a z drugiej daje nowe spojrzenie na własne badania w kontekście postępu w innych dziedzinach biochemii.

K. Szyfter

### VIII Zjazd Międzynarodowego Towarzystwa Neurochemicznego (ISN)

W dniach 7—11 września 1981 odbył się w Nottingham (Anglia) VIII Zjazd Międzynarodowego Towarzystwa Neurochemicznego. W obradach uczestniczyło ponad 800 osób, w tym 7 osób z Polski. W ramach zjazdu zorganizowano następujące sympozja, kolokwia i dyskusje okrągłego stołu:

**Sympozja** — 1. Nowe aspekty badań nad receptorami neurotransmiterowymi — regulacja fizjologiczna i genetyka molekularna, 2. Immunohistochemia, 3. Mielinogeneza, 4. Biosynteza i metabolizm neuropeptydów, 5. Pochodne purynowe w neurotransmisji, 6. Aminokwasy jako neurotransmitery, 7. Zmiany biochemiczne a rozwój mózgu (Symposium zorganizowane pod auspicjami UNESCO), 8. Monoaminooksydaza — zagadnienia kliniczne i podstawowe, 9. Interakcje transmitterowe w zwojach postawnych, 10. Odpowiedź immunologiczna białek układu nerwowego w chorobach neurologicznych, 11. Układ wzrokowy jako model do badań neurochemicznych, 13. Wrodzone i nabyte zaburzenia w metabolizmie węglowodanowym mózgu.

**Kolokwia** — 1. Neurofilamenty, 2. Współczesne poglądy na udział wapnia w regulacji procesów neurochemicznych, 3. Podstawowe kwasy tłuszczowe i prostaglandyny, 4. Choroby wywołane neurotoksynami — mechanizmy, 5. Zastosowanie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) w neurochemii, 6. Konkanawalina A a neuroreceptory, 7. Fosforylacja białek i rola inozytolu w przekaźnictwie synaptycznym, 8. Nowe neurotoksyny, 9. Mózg a peptydy trzewne — najnowsze odkrycia.

**Dyskusje okrągłego stołu** — 1. Dezoksyglukoza w neurofarmakologii, 2. Charakterystyka i właściwości pierwotnych hodowli astrogleju, 3. Śladowe aminy, 4. Neurochemiczne efekty etanolu w ośrodkowym układzie nerwowym, 5. Historia neurochemii, 6. Szybki transport lipidów i glikoprotein, 7. Paraneurony nadnerczy i komórek PC 12 jako modele czynności neuronalnych, 8. Problemy napotymane w neurochemii mózgu człowieka post-mortem, 9. Strukturalna i biochemiczna organizacja granul chromafinowych, 10. Mechanizmy kontrolne w synapsie cholinergiczej.

Zagadnieniom poruszonym w trakcie sympozjów, kolokwii i dyskusji okrągłego stołu towarzyszyły sesje komunikatów ustnych i plakatowych. W czasie trwania Zjazdu odbyło się szereg posiedzeń poza programowych m.in. sesja poświęcona sytuacji naukowców w Ameryce Łacińskiej w związku z naruszaniem Praw Człowieka w tych krajach.

Ze względu na obfitość tematyczną omówimy jedynie niektóre zagadnienia poruszane na Zjeździe.

W sekcji sympozjalnej pt.: „Nowe aspekty badań nad receptorami neurotransmiterowymi — regulacja fizjologiczna i genetyka molekularna” dużo miejsca poświęcono receptorom bezodiazepinowym, ich charakterystyce oraz interakcjom z receptorami kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA). W pracowni Snydera (USA) wykazano, że po solubilizacji i bardzo intensywnym oczyszczaniu tych receptorów stwierdza się w dalszym ciągu jednoczesne występowanie miejsc rozpoznawania benzodiazepin i GABA, co sugeruje, że stanowią one część tego samego wielkocząsteczkowego kompleksu. Przedstawiono również nowe dane z pracowni Braestrupa (Dania) na temat interakcji pomiędzy receptorami benzodiazepinowymi a różnymi pochodnymi  $\beta$ -karbolin. Szeroko omawiana była też sprawa lokalizacji receptorów



na różnych elementach komórkowych w mózgu: zwracano uwagę na obecność klasy tzw. autoreceptorów — tj. receptorów występujących na elementach presynaptycznych i regulujących proces uwalniania neurotransmitera. Przedstawiono nowe przykłady lokalizacji niektórych receptorów na elementach glejowych. Podnoszono kwestię modulacji działania receptorów jednych neurotransmiterów przez inne klasyczne neurotransmitery (Ladinsky, Włochy) jak również niektóre neuropeptydy (Costa, USA).

Na specjalnej sesji sympozjalnej jak i w czasie dyskusji okrągłego stołu, omawiając zagadnienia interakcji neuronów — glej, zwracano szczególną uwagę na wydzielanie różnych czynników troficznych przez komórki astrocytów, stymulujących rozrastanie się wypustek komórek nerwowych (Seifert, RFN).

Dane przedstawione na sekcji sympozjalnej na temat neurochemicznych korelatów zachowania nie wniosły wiele nowego w poszerzenie wiedzy dotyczącej tego zagadnienia: jeszcze raz ukazano jak trudna jest sprawa odpowiedniego postawienia problemu i skorelowania uzyskiwanych wyników behawioralnych i biochemicznych (Rose, Anglia).

Sympozjum pt.: „Układ wzrokowy jako model do badań neurochemicznych” miało charakter interdyscyplinarny. Przedstawiono dwa referaty o charakterze ogólnobiologicznym, które dotyczyły organizacji anatomicznej (Guillery, Anglia) i funkcjonalnej (Wiesel — laureat tegorocznej nagrody Nobla z dziedziny medycyny, USA) układu wzrokowego. Pomimo doskonale poznanej budowy i właściwości elektrofizjologicznych tego układu nadal niewiele można powiedzieć na temat neurochemicznego podłoża jego specyficznych właściwości. Stosując bardzo różnorodną technikę badawczą, tj. na przykład skrawki mózgu, mikrojontoforezę, wybiórcze niszczenie neuronów przy pomocy kwasu kainowego, metody ablacyjne oraz badania podczas rozwoju, usiłowano zidentyfikować neurotransmitery pobudzające i hamulcowe w układzie wzrokowym. Z referatu Fonnum (Norwegia) wynika, że z kory wzrokowej do ciała kolankowatego bocznego biegną połączenia glutamergiczne. Prace innych autorów zdają się wskazywać na pobudzającą rolę kwasu glutaminowego i hamującą kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego w układzie wzrokowym. Postuluje się również, że transmisja GABA-ergiczna bierze udział w kształtowaniu takich właściwości neuronów kory wzrokowej jak selektywność odpowiedzi na kierunek prezentowanych bodźców wzrokowych (Sillito, Anglia).

Specyficzne neurotoksyny są doskonałym narzędziem w badaniach organizacji neurochemicznej i funkcjonalnej mózgu. Podczas obrad (kolokwium pt.: „Nowe neurotoksyny”) zaprezentowano dane o właściwościach i zastosowaniach do badań neurochemicznych nowych substancji neurotoksycznych. Jak dotychczas mechanizm działania tych neurotoksyn jest nieznan, a informacje o ich działaniu mają charakter opisowy. Na przykład DSP<sub>4</sub> (N-2-chloroetylo-N-etylo-2 bromobenzylamina) na skutek degeneracji połączeń noradrenergicznych powoduje wybiórczo długotrwały spadek zawartości noradrenaliny w zakończeniach nerwowych, dając możliwość śledzenia wzajemnych relacji pomiędzy różnymi układami neurotransmiterowymi. Kwas ibotenowy — neurotoksyna niszcząca lokalnie ciała glutamergicznych komórek nerwowych, wydaje się mieć większe zastosowanie niż kwas kainowy. Jady mitotyczne: metyloazoksymetanol oraz kolchicina wykazują preferencję w niszczeniu niektórych neuronów. Związki te zatem mogą mieć zastosowanie w badaniach rozwoju układu nerwowego.

Kolokwium na temat neurofilamentów dotyczyło ich składu białkowego. Filamenty komórek nerwowych są zbudowane z trzech białek o masie około 200 000, 150 000 i 70 000. W preparatach filamentów z komórek astroglejowych występuje natomiast białko o masie około 50 000. Obserwuje się różnice gatunkowe i regionalne (Soifer, USA). Badania immunochemiczne wykazały, że białko 70 000 stanowi rdzeń filamentu, który jest opleciony białkiem 150 000, natomiast białko 200 000 jest po-



wiązane dość luźno z pozostałymi dwoma tworząc mostki między niciami (Willard, USA). Stwierdzono też, że białko 200 000 nie ma właściwości ATPazy, co postulowano poprzednio. Przedstawiono dane wskazujące, że synteza białek filamentów występuje na oddzielnych niciach mRNA (Soifer). Nie mniej badania immunologiczne wykazują obecność wspólnych determinantów antygenowych na białkach filamentów, co sugeruje ich homologię (Anderston, Anglia). Postuluje się rolę filamentów w regulacji szybkości transportu aksonalnego. W wielu jednostkach chorobowych następuje akumulacja filamentów zbudowanych z białka 50 000 (Wiśniewski, USA). Podczas sesji plakatowej towarzyszącej omówionemu kolokwium przedstawiano prace dotyczące zarówno filamentów jak i mikrotubul. Stwierdzono obecność tubuliny, w formie spolimeryzowanej w mikrotubule, w synaptosomach (Gordon-Weeks, Anglia), a także przedstawiono dane wskazujące na interakcję tubuliny z błonami (Hargreaves, Anglia). Z zagadnień funkcjonalnych wykazano zwiększenie syntezy tubuliny w procesach regeneracji (Koenig, USA).

Problemom fosforylacji i roli wapnia w układzie nerwowym było poświęcone wiele doniesień ustnych i plakatowych. Grupa badaczy z Utrechtu (Holandia) przedstawiła ciąg prac dotyczących fosforylacji synaptycznego białka B-50 i lipidów z udziałem kinazy zależnej od  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny. Stwierdzono, że ACTH stymuluje fosforylację lipidów hamując fosforylację B-50. Rolę fosfolipidów błonowych w regulacji fosforylacji białek synaptycznych, zależnej od kalmoduliny i jonów wapnia przedstawił Rodnight (Anglia). Sporo uwagi poświęcono wielostronnej roli kalmoduliny w układzie nerwowym. Z ciekawszych doniesień warto odnotować plakat Puszkińa (USA), który metodami radioimmunologicznymi wykazał obecność kalmoduliny w pęcherzykach synaptycznych i potwierdził, że kalmodulina nie jest tropoiną C.

Wiele miejsca poświęcono omówieniu nowych technik bądź ich modyfikacji oraz możliwościom ich zastosowania. Między innymi wskazywano na szerokie zastosowanie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej w badaniach amin biogennych i ich metabolitów. Ciekawostką metodyczną była nowa chemiluminiscencyjna metoda oznaczania zawartości acetylocholino, użyteczna także przy pomiarach wydzielania tego neurotransmitera, oparta na chemiluminiscencyjnej reakcji  $H_2O_2$  (powstałej przy przemianie choliny w betainę) z luminolem. W sposób krytyczny omówiono problem napotykanie przy zastosowaniu znakowanej 2-dezoksyglukozy do badań metabolizmu węglowodanów w mózgu w normie i stanach patologicznych oraz w powiązaniu z badaniami neurofarmakologicznymi. Uyskane dane wskazują na ogół na ścisłe powiązanie metabolizmu energetycznego struktur mózgowych z ich stanem funkcjonalnym. Nie jest to jednak regułą: na przykład wzmożonej aktywności receptora dopaminergicznego wywołanej podaniem środków farmakologicznych, towarzyszy spadek zużycia glukozy. Ciekawa również była zorganizowana przez Stavinohę (USA) nieformalna (poza programem) dyskusja okrągłego stołu na temat nowych zastosowań mikrofal do badań metabolizmu neurotransmiterów.

W czasie Zjazdu odbyło się posiedzenie robocze członków Międzynarodowego Towarzystwa Neurochemicznego (z Polski wzięły w nim udział 3 osoby). W trakcie zebrania ustępujące władze przedstawiły sprawozdanie z działalności w okresie swej kadencji. Szczególnie szeroko dyskutowano sprawy redakcyjne oficjalnego pisma Towarzystwa — „Journal of Neurochemistry”, które niedawno zmieniło wydawcę. Nowym przewodniczącym Towarzystwa jest obecnie dr Kvamme (Norwegia) a sekretarzem pozostaje na następną kadencję dr Porcellati (Włochy).

B. Oderfeld-Nowak

A. Potempska

J. Skangiel-Kramaska

**XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**

W dniach 16—18 września 1981 roku odbył się we Wrocławiu XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Miejszem obrad była Politechnika Wrocławska, która udostępniła swoją aulę i kilka przyległych pomieszczeń dla potrzeb Zjazdu.

Inauguracyjny wykład: „Neurotransmitery peptydowe” wygłosił prezes PTBioch. prof. Kazimierz Zakrzewski. Naskwicował on aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie, która łączy problematykę biochemiczną z zagadnieniami neurofizjologii i endokrynologii, oraz wskazał zarysowujące się tu koncepcje i hipotezy.

W ramach sesji otwierającej Zjazd jego uczestnicy uczcili pamięć profesora Michała Laskowskiego seniora, honorowego członka Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, zmarłego w bieżącym roku. Wspomnienie o profesorze Laskowskim wygłosił dr Tomasz Kurecki z Instytutu Badań Jądrowych. Uczczono także pamięć zamordowanych przez hitlerowców we Lwowie w 1941 roku uczonych polskich, składając kwiaty pod ich pomnikiem znajdującym się na terenach Politechniki Wrocławskiej.

Wiodąca tematyka Zjazdu zgrupowana została w trzech sympozjach: I — Receptory komórkowe, lektyny, II — Struktura biopolimerów i III — Zmienność gatunkowa enzymów. Doniesienia nie związane bezpośrednio tematycznie z tymi sympozjami przedstawiano w formie plakatowej na odrębnych sesjach biegnących równoległe z sympozjami. Doniesienia te podzielono na 6 sekcji: Genetyka molekularna, Składniki chromatyny, Biosynteza białka, Enzymy, Biochemia kliniczna i Doniesienia różne.

Organizatorzy Zjazdu starali się ułożyć program tak, aby umożliwić uczestnikom swobodny udział we wszystkich trzech sympozjach; odbywały się one kolejno w trzech dniach Zjazdu, nie kolidując ze sobą. Starano się też tak rozmieścić sesje plakatowe, aby ich tematyka nie była zbieżna z tematyką równocześnie biegnącego sympozjum.

Sympozjum I, „Receptory komórkowe, lektyny”, zorganizowane przez E. Lisowską i B. Morawiecką miało w programie dwa półgodzinne referaty oraz kilkanaście komunikatów przygotowanych w formie plakatowej. Referat „Microheterogeneity of glycoproteins tested by affinity electrophoresis with lectins” wygłosił prof. T. C. Bøg-Hansen z Kopenhagi. Przedstawił w nim technikę elektroforezy powinowactwa glikoproteidów z zastosowaniem wolnych i związanych lektyn. Uzyskiwane tą techniką rezultaty rzucają światło na molekularne podstawy mikroheterogenności glikoproteidów w normalnych i patologicznych surowicach ludzkich. Wyniki takich badań mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i diagnostyczne.

Referat „Przeciwciała reagujące z laktozyloosfingozydem u chorych na nowotwory” J. Kościelaka i W. Józwiaka w zastępstwie nieobecnych Autorów przedstawił dr H. J. Krauze.

Plakatowa część Sympozjum obejmowała 19 doniesień. Dotyczyły one m.in. zagadnień: wydzielania i oczyszczania lektyn, wpływu lektyn na aktywność enzymów, wydzielania, właściwości i funkcji receptorów insulinowych, serotoninowych i cholinergicznym z różnych tkanek oraz badań nad strukturą głównego glikoproteidu erytrocytów ludzkich. Plakaty rozmieszczone były w sali, w której odbywało się Sympozjum. Zaproponowano Autorom dokonanie krótkiej, ustnej prezentacji zasadniczych tez każdego doniesienia, aby ułatwić bardziej zorganizowaną dyskusję. Tej formy nie stosowano na następnych Sympozjach.

Na Sympozjum II, „Struktura biopolimerów”, zorganizowanym przez K. Maskosa i K. Nowaka, sporą część doniesień: 4 referaty i 6 komunikatów przedstawiono w formie ustnej; 20 komunikatów w formie plakatowej eksponowano na sali obrad. Były one dostępne w czasie przerw Sympozjum.

Organizatorzy Zjazdu przewidywali omówienie w ramach tego Sympozjum za-



gadnień struktury białek i kwasów nukleinowych, wyłączając problematykę struktury polisacharydów. Tematyka Sympozjum była jednak wyraźnie zdominowana przez problemy białkowe. Obszernie omówiono badania nad białkami wiążącymi wapń. Zagadnienia te, przedstawione w referacie Drabikowskiego i współpracowników, były także tematem kilku innych doniesień ustnych i plakatowych; tematycznie łączyły się z nimi doniesienia o pracach nad innymi białkami mięśniowymi. Zagadnienia konformacji białek przedstawił I. Z. Siemion w swoim referacie: „Beta-zgięcie jako element struktury białek”. Inne zagadnienia z tej dziedziny poruszono w kilku dalszych doniesieniach. J. Łomako przedstawił obszerną pracę (której współautorami byli E. Smith i W. J. Whelan z Miami, USA): „Białko jako integralny składnik glikogenu mięśniowego”. Duże zainteresowanie i żywą dyskusję wzbudził referat T. Wilusza i współpracowników: „Preperacja i struktura pierwotna obszaru reaktywnego inhibitora trypsyny z nasion ogórków”. Do tej tematyki nawiązywało również jedno z doniesień plakatowych.

Współczesną problematykę badań nad strukturą pierwszorzędową kwasów nukleinowych przedstawił J. Augustyniak w referacie: „Szybkie metody sekwencjonowania kwasów nukleinowych i ich znaczenie dla współczesnej biochemii”. Przedstawiono też kilka doniesień dotyczących innych zagadnień struktury pierwszorzędowej oraz fizykochemicznych właściwości kwasów nukleinowych.

W dyskusjach i podsumowaniu obrad uczestnicy Sympozjum podkreślali konieczność i możliwości zacieśnienia współpracy między paroma polskimi ośrodkami zajmującymi się strukturą białek. Zwrócono też uwagę na upodabnianie się technik badania kwasów nukleinowych do technik stosowanych dla białek i wynikające z tego możliwości współpracy i wzajemnej pomocy różnych laboratoriów.

Sympozjum III, „Zmienność gatunkowa enzymów”, otwierał referat organizatora Sympozjum, St. Karpiaka. Dokonał on ogólnego przeglądu rozwoju badań nad gatunkową zmiennością enzymów, uzależnionego w dużej mierze od rozwoju technik badawczych. Wskazał też na korelacje zachodzące między zmiennością morfologiczną gatunków a powstawaniem nowych form enzymatycznych. Te ostatnie miały fundamentalne znaczenie w dostosowywaniu się gatunków do rodzaju dostępnego pożywienia i trybu życia. Autor przedstawił duże znaczenie poznawcze i praktyczne, jakie ma wiedza o zmienności gatunkowej enzymów dla genetyków, hodowców, farmakologów i in.

Tezy wykładu St. Karpiaka zostały rozwinięte i potwierdzone w następnych referatach. I tak, M. Kochman omówił zmienność strukturalną aldolaz w rozwoju filogenetycznym. Szczególnie zaciekała słuchaczy jego teza o bliskim pokrewieństwie aldolaz z kinazami, oparta na badaniach własnych, wykazujących istnienie domen wiążących nukleotydy w aldolazach. W referacie M. Żydowo znalazły się dowody na przystosowanie się form enzymu do rodzaju metabolizmu zachodzącego u różnych gatunków zwierząt. I tak, aktywność deaminazy AMP jest daleko wyższa w organach wydzielniczych zwierząt amoniotelicznych niż ureotelicznych. Duże zainteresowanie enzymologów wzbudził referat H. Strzeleckiej-Gołaszewskiej, traktującej o zmienności form bardzo swoistego białka o funkcji enzymatycznej, jakim jest miozyna. Zmienność kinaz białkowych w tkankach roślin i zwierząt była tematem wykładu K. Wagnera (z Braunschweig-Stockheim, RFN). Różnorodność form molekularnych fosfatyz u kręgowców została ciekawie omówiona przez A. Kubiczową, a arylosulfataz — przez J. Nagadowską.

Plakatowe doniesienia sympozjalne (w liczbie 18) stanowiły doskonałą ilustrację tematów poruszanych w wykładach.

W XVIII Zjeździe PTBioch. uczestniczyło około 460 osób, w tym 2 gości zagranicznych. Na Zjazd zgłoszono 330 prac z następujących ośrodków:

Warszawy — 90 prac, Wrocławia — 50, Poznań — 44, Łodzi — 35, Białegosto-



ku — 20, Lublina — 19, Katowic — 19, Gdańska — 14, Torunia i Bydgoszczy — 13, Olsztyna — 12, Szczecina — 6, innych ośrodków — 8.

Mniej formalne dyskusje można było prowadzić na spotkaniu towarzyskim, które odbyło się w drugim dniu Zjazdu, w lokalu Klubu Lekarza.

Działająca w czasie Zjazdu komisja pod przewodnictwem prof. A. Szewczuka oceniała prace 14 młodych biochemików ubiegających się o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego. Odbyło się również plenarne posiedzenie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Ustalono, że następny zjazd Towarzystwa odbędzie się w 1982 roku w Szczecinie.

Po zakończeniu Zjazdu, w sobotę, uczestnicy mogli wziąć udział w wycieczce autokarowej do najciekawszych zabytków Swidnicy, Książa i Krzeszowa.

*A. Morawiecki  
J. Kwiatkowska*

### **Biochemia-82 — Przewodnik po bibliotekach**

Przewodnik niniejszy lokalizuje międzynarodowe czasopisma naukowe niezbędne w codziennej pracy biochemika, w polskich bibliotekach w połowie roku 1982. Dobór czasopism — z natury rzeczy — jest dosyć subiektywny: pominięto pisma wyspecjalizowane, nawet jeżeli są szeroko czytane (np. Nucl. Acid Res., Clin. Biochemistry) natomiast włączono czasopisma bardziej ogólne (np. Nature, Science). Tabela poniżej może więc być traktowana jako zawierająca informacje o czasopismach potrzebnych każdemu biochemikowi, stanowiących warunek konieczny (ale niewystarczający) dla prowadzenia efektywnej działalności naukowej, dydaktycznej, produkcyjnej, czy usługowej. Dla uniknięcia zbędnych telefonów czy podróży biochemików szukających tych czasopism, w tabeli zamieszczono tylko te pisma, które w danym ośrodku biblioteki mają kompletne i w formie oryginalnej (tj. nie jako mikrofiszki, kserokopie). Adresy i telefony bibliotek mających dane czasopismo znajdują się we wszystkich oddziałach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Różnych czasopism, niestety, biochemik musi szukać w różnych ośrodkach i w rozmaitych bibliotekach, nie ma bowiem w Polsce ani jednej biblioteki, która miałaby komplet podstawowych (wg. zastosowanej definicji) czasopism biochemicznych o charakterze ogólnym. Stosunkowo najlepiej sytuowany jest Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (brak tam tylko Arch. Bioch. Bioph.), mający jednak tylko po jednym egzemplarzu poszczególnych czasopism (w części — dzięki darom). Gdyby tylko część zainteresowanych zawodowo pracujących biochemików chciała zaoszczędzić delegacji i korzystać z biblioteki IBB w Warszawie, to powstał by tam wielki tłok, bo jest nas łącznie nie mniej niż 1250. Nb. w tabeli w ostatniej kolumnie zamieszczono „Indeks” dostępności czasopism — iloraz liczby egzemplarzy danego czasopisma i liczby owych zawodowo pracujących biochemików w Polsce w roku 1982.

*S. A. Pientisat*

## Dostępność niektórych czasopism biochemicznych w Polsce w roku 1982

Ośrodek akademicki:	Warszawa	Poznań	Wrocław	Lublin	Gdańsk	Łódź	Toruń	Kraków	Katowice	Białystok	Olsztyn	Szczecin	Indeks
Tytuł czasopisma	Liczba egzemplarzy												
Biochem. Biophys. Acta Nature	5	4	2	4	1	1	1	2	0	0	0	0	0,0160
Eur. J. Bioch.	4	4	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0,0136
Biochem. J.	4	1	3	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0,0112
Anal. Bioch.	3	1	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0,0096
J. Mol. Biol.	2	2	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0,0088
J. Biol. Chem.	1	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0,0056
Biochemistry Science	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0,0040
Proc. Nat. Acad. Sci. USA.	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0032
Arch. Biochem. Biophys.	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0,0024
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
<b>Razem</b>	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>= 95</b>

## RECENZJE

### Biochemia w cukrownictwie

M. Z. Cheleński, M. L. Pelc, I. P. Sapożnikowa  
WNT, Warszawa 1981, stron 234, cena 40 zł  
tłum. z rosyjskiego I. Januszewicz

Książka jest przeznaczona głównie dla pracowników inżynierijno-technicznych cukrowni, kadry agrotechnicznej PGR i spółdzielni produkcyjnych. Lepsze poznanie przez nich procesów biochemicznych, zachodzących w buraku cukrowym powinno przynieść w efekcie ograniczenie strat surowca i półproduktów oraz uzyskanie wysokiej jakości krystalicznego cukru.

Treść książki ujęta jest w dwóch częściach. W części I omówione są zagadnienia dotyczące biochemii rozwoju i przechowywania buraków cukrowych: układy enzymatyczne buraka cukrowego, podstawowe procesy fizjologiczne i biochemiczne zachodzące w buraku cukrowym w okresie wegetacji i przechowywania oraz biochemiczne podstawy ochrony buraków przed chorobami, porażeniem drobnoustrojami fitopatogennymi i przed porastaniem. W części II omówiono zagadnienia związane z biochemią przerobu buraków cukrowych: procesami biochemicznymi zachodzącymi podczas otrzymywania soku surowego, podczas oczyszczania soków i otrzymywania cukru oraz przerobu wysłodków i melasu.

Każda część książki składa się z 3 rozdziałów. W formie załącznika ujęto metody oznaczania niektórych wskaźników biochemicznych buraków i produktów ich przerobu. Książka zakończona jest spisem literatury dotyczącej każdego rozdziału i załącznika oraz skorowidzem.

Układ książki jest logiczny, informacja przedstawiona w sposób jasny i przejrzysty, a treść odpowiada poziomowi potencjalnego odbiorcy, jakim ma być kadra inżynierijno-techniczna, zatrudniona w przemyśle cukrowniczym oraz w produkcji surowca. Słabą stroną książki jest brak nowszych informacji w zakresie omawianych zagadnień. Piśmiennictwo oparte jest głównie o źródła radzieckie z lat sześćdziesiątych, często przytaczane są też pozycje wcześniejsze np. z lat trzydziestych. Najnowsze, nieliczne zresztą pozycje piśmiennictwa pochodzą z lat 1973-74. Przekazanie polskiemu Czytelnikowi w 1981 r. przez WNT tłumaczenia oryginału wydanego w 1977 r. w oparciu często o tradycyjną literaturę jest zdaniem recenzenta mocno opóźnione. Niektóre uaktualnienia do tekstu (np. dotyczące nazewnictwa enzymów) wnoszą opiniodawcy.

Na polskim rynku wydawniczym nie ma wielu pozycji z zakresu biochemii przemysłu rolno-spożywczego. Praca Cheleńskiego, Pelca i Sapożnikowej, stanowiąca próbę uogólnienia wcześniejszych doświadczeń w dziedzinie badań biochemicznych w przemyśle cukrowniczym, prowadzonych głównie w ZSRR uzupełni w pewnym stopniu braki istniejące w tym zakresie.

*B. Jacórzyński*



**Gaurangakumar Das****Aspects of Photosynthesis**

Publ. Mitra Das, 1981, Calcutta, stron j+176+XXVII, cena Rs 212

Obecne podręczniki akademickie wyraźnie zaczynają dzielić się na dwie grupy. Do pierwszej należą te tradycyjne, omawiające całościowo daną dziedzinę wiedzy. Ponieważ zaś wiedza szybko poszerza się, przeto podręczniki takie pęcznieją, nie-rzadko osiągając ponad tysiąc stron (np. 1). Niby to dobrze, że student w jednym to-mie znajduje całościowy zarys osiągnięć danej dziedziny wiedzy. Ilu jednak studen-tów podręczniki takie przestudiuje? Zapewne niewielu, ponieważ specjalizacja sięga już pierwszych lat studiów. Najważniejszy jest jednak czynnik psychologiczny: zbyt obszerny podręcznik działa odstręczająco przez samą swą opasłość.

Jako swoiste remedium na elephantiasis tradycyjnego podręcznika akademic-kiego, coraz częściej pojawiać się zaczynają opracowania wysoce specjalistyczne, a przez to niezbyt obszerne, obiecujące studentowi opanowanie wiedzy co prawda wąskiej, ale za to dogłębnie. Takim właśnie podręcznikiem jest książka G. Dasa, napisana na podstawie wieloletnich wykładów i seminariów magisterskich oraz dokto-ranckich. Mając duże doświadczenie dydaktyczne, Autor świadomie stosuje pewne powtórki oraz odnośniki do innych miejsc tekstu, mające na celu ułatwienie czytelnikowi opanowania materiału w sposób powiązany i całościowy. Świadomie też autor nie skupia się na omawianiu prac szczegółowych i technicznych, aby nie rozpra-szać uwagi, nie gubić istoty zagadnienia w powodzi spraw jednostkowych.

Całość składa się z 14-tu rozdziałów, zgrupowanych w trzech częściach. W częś-ci I omówiono fizyczne, biochemiczne i strukturalne podstawy procesu fotosyntezy. Część drugą poświęcono omówieniu czynników, wpływających na efektywność fo-tosyntezy w liściach roślin wyższych i w bakteriach fotosyntetyzujących; nie za-pomniano o pewnych problemach ekologicznych i genetycznych. Część trzecia, zwykle nie omawiana w tego rodzaju podręcznikach, poświęcona jest praktycznym aspektom fotosyntezy — zwłaszcza powiązaniu fotosyntezy z odżywianiem azotowym roślin (rozdział 13) oraz związkowi fotosyntezy ze wzrostem owoców i plonowaniem. Te dwa rozdziały uznać należy za wyjątkowo cenne, ponieważ pozwalają studentowi dostrzec powiązania pomiędzy dosyć abstrakcyjnym procesem fotosyntezy a wzros-tem i rozwojem roślin. Całość uzupełniają czarnobiałe plansze z mikroskopu elek-tronowego, wykaz literatury uzupełniającej, słowniczek terminologiczny oraz indeks rzeczowy.

Dzięki narzuconym sobie samemu ograniczeniom autor nie nudzi i nie męczy, a jednocześnie przekazuje istotę zagadnienia — prosto, zrozumiale, z wyjaśnieniem pewnych podstawowych faktów, które „powinny” być skąd inąd znane, ale znane być nie muszą. Zaletę stanowi wiązanie procesów fizycznych i biochemicznych z fi-zjologicznymi — a tych z ultrastrukturą i strukturą komórki i rośliny. Dodatkową zaletę podręcznika stanowi prosty i precyzyjny język; widać, iż autor hołduje za-sadzie, że mądrze ten mówi tylko, kto zrozumiale mówi. Występujące w tekście „literówki” są łatwe do skorygowania. W sumie otrzymaliśmy bardzo dobry podręcz-nik, godny polecenia każdemu, kto pragnie zdobyć podstawy wiedzy o fotosyntezie tj. o procesie, warunkującym życie na Ziemi.

*J. S. Knypl*

1. Por. Z. Kaniuga, *Post. Bioch.* 25 (2): 266-269, 1979.

## Das Stabilitätsverhalten von Osteosynthesen mit äusserer Knochenfixation und Kompression.

### Biomechanische Modellversuche und tierexperimentelle Untersuchungen.

G. Mayer przy współpracy K. H. Haase

VEB Georg Thieme Leipzig 1981, str. 112, cena 28 M.

„Stabilność osteosyntezy z zewnętrznym unieruchomieniem i kompresją kości. Biomechaniczne badania modelowe i doświadczenia na zwierzętach” stanowi 26 tom z serii: Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik, redagowanej przez prof. W. Beiera w Lipsku.

Osteosynteza przy pomocy aparatów unieruchamiających odłamy kostne z zewnątrz stanowi nowy sposób leczenia złamań, pod pewnymi względami przewyższający dotychczas stosowane metody łączenia odłamów za pomocą śrub, płytek metalowych czy gwoździowania jamy szpikowej. Dr Mayer przy współpracy inż. Haase (przy okazji jesteśmy świadkami nie stosowanej w Polsce praktyki — na okładce autorem jest Mayer, natomiast na stronie tytułowej — Mayer przy współpracy Haase) przeprowadzili podstawowe badania z zakresu biomechaniki kości i połączeń odłamów kostnych zestawianych za pomocą różnego typu aparatów kompresyjno-dystrakcyjnych zewnętrznego unieruchomienia (typ AO, Hoffmana-Vidala, Wagnera, Ilisarowa oraz Heillingera-Hoffmana) na modelu ludzkich kości piszczelowych z materiału sekcyjnego. Podobny typ badań, uzupełnionych analizą rentgenowską i histologiczną, przeprowadzono *in vivo* na zwierzętach doświadczalnych.

Rozdział „Podstawy wytrzymałości mechanicznej” (siły nacisku między odłami, elastyczne odkształcenia kości, działanie sił nacisku w zależności od ich przyłożenia) oraz opis aparatury do pomiaru tych sił stanowią część ogólną monografii. W części szczegółowej przedstawiono wyniki pomiaru sił nacisku między fragmentami modelowej osteotomii przy zastosowaniu różnych systemów unieruchamiania zewnętrznego oraz stabilności osteosyntezy na zginanie i skręcanie, określając takie parametry jak krytyczny moment zginania, wartość oporności na zginanie, krytyczny moment skrętu i oporność skręcania.

W doświadczeniach na owcach, którym wykonywano osteotomię poprzeczną kości piszczelowych, zastosowano aparaty kompresyjno-dystrakcyjne unieruchomienia zewnętrznego AO, Hoffmana-Vidala oraz Hellingera-Hoffmana. Celem tych doświadczeń była analiza sił nacisku pomiędzy odłamami, jakie aparaty te wywierają i związek tych sił z przebiegiem leczenia złamania. Wyniki pomiarów korelowano z wynikami badań rentgenowskich oraz histologiczną oceną osteogenezy. W oparciu o parenteralne podawanie zwierzętom różnych fluorochromów wykazujących powinowactwo do kości oceniano przebieg regeneracji kości w miejscu osteotomii na nieodwapnianych skrawkach w mikroskopie UV. Jest to metoda bardzo nowoczesna i czuła, niestety stosunkowo mało popularna, gdyż wymaga sporządzania albo bardzo cienkich szlifów kostnych, albo dysponowania, jak w przypadku autorów recenzowanej pracy, specjalnym mikrotomem do twardych tkanek i tkanek zmineralizowanych. Niech mi będzie w tym miejscu wolno wyrazić żal, że takiego mikrotomu nie mają w Warszawie placówki, gdzie problematyka kości jest tematem wiodącym (np. Instytut Biostruktury A.M. w W-wie), a „Bokassa polskiej medycyny” bez trudu zakupił go dla swego Zakładu w Katowicach, lecz nie słyhać, by był wykorzystywany.

Zmiany podczas fazy konsolidacji osteotomii przyłożonego nacisku na odłamy kostne są ściśle skorelowane z szybkością osteosyntezy, a stabilność połączenia odłamów kostnych determinuje typ i przebieg gojenia kości zbitej. Przy osteosyntezie stabilnej kość goi się przez rychłozrost, natomiast przy osteosyntezach niestabilnych osteotomia konsoliduje się przez wytwarzanie kołnierza kostny.



Monografia napisana jest bardzo hermetycznym, lapidarnym, technicznym językiem i ma charakter wysoce specjalistyczny. Załączony na początku monografii słowniczek skrótów i stosowanych symboli stanowi dwie strony druku. Praca jest naszpikowana wzorami, tabelami (33) i rycinami (40), z których przeważająca część to wykresy. Praca oparta jest na 115 pozycjach literatury ostatnich lat, z podaniem pełnych tytułów prac, co oczywiście podnosi jej walor.

Uważam, że jest to bardzo cenna pozycja dla dość wąskiego grona specjalistów traumatologów i biomechaników. Niezwykle trudna w odbiorze dla czytelnika bez przygotowania matematyczno-fizycznego.

K. Włodarski

**The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans**  
**Red. W. J. Lennarz**

Plenum Press, 1980, New York, London, str. 385+XIX, \$ 35

Recenzowana książka jest pracą zbiorową wybitnych badaczy, którzy przedstawili bieżący stan wiedzy w dziedzinie biochemii glikoprotein i proteoglikanów.

Powszechnie znanym faktem jest to, że glikoproteiny stanowią dużą, bardzo zróżnicowaną grupę makrocząsteczek, w których łańcuchy oligosacharydowe powiązane są kowalencyjnie ze szkieletem białkowym. Glikoproteiny i proteoglikany budzą stale rosnące zainteresowanie zarówno ze względu na ich powszechność jak i specyficzność funkcji biologicznych. Glikoproteiny występują w komórkach zwierząt wyższych, roślin zielonych, grzybów, bakterii i wirusów. Związki te wchodziły w skład hormonów, enzymów, immunoglobulin, wydzielin śluzowych przewodu pokarmowego, płynów ustrojowych, wielu receptorów powierzchniowych komórki jak i powierzchniowych osłonek wirusowych. Proteoglikany natomiast stanowią element strukturalny tkanki łącznej różnych gatunków zwierząt.

Z uwagi na olbrzymi zakres poruszanych zagadnień, książka podzielona została na siedem rozdziałów.

Rozdział pierwszy dotyczy prac nad strukturą glikoprotein i ich jednostek oligosacharydowych, oraz roli oligosacharydów w syntezie glikoprotein.

W następnym rozdziale omówiona została rola poliizoprenoli w biosyntezie glikoprotein, oraz opisano model glikozylacji glikoprotein błonowych i wydzielniczych, regulację syntezy glikoprotein i inhibitory glikozylacji.

Autorzy trzeciego rozdziału bardzo szczegółowo scharakteryzowali zwierzęce glikozylotransferazy biorące udział w wydłużaniu łańcuchów oligosacharydowych połączonych wiązaniem N-glikozydowym jak i O-glikozydowym. Podkreślili również rolę aparatu Golgiego jako głównego miejsca w procesie wydłużania łańcucha. Poza tym część rozdziału autorzy poświęcili omówieniu gangliozydów, których łańcuchy oligosacharydowe podlegają reakcji glikozylacji.

Kolejny rozdział traktuje o strukturalnych zmianach występujących w części węglowodanowej glikoprotein powierzchniowych wyselekcjonowanych mutantów komórek zwierzęcych opornych na lektyny roślinne.

Dane przedstawione w rozdziale piątym dotyczą przemian w glikoproteinach powierzchniowych komórki zachodzących w czasie ich wzrostu lub transformacji. Zmiany te występują w łańcuchach oligosacharydowych związanych z asparaginą i seryną (czasem treoniną). Przedstawione wyniki badań dotyczą oznaczania struktury oligosacharydów tj. składników cukrowych, wielkości oligosacharydu, typu wiązań oligosacharydu z łańcuchem peptydowym, sekwencji cukrów w łańcuchu



oligosacharydowym, oraz przestrzennej konfiguracji poszczególnych wiązań glikozydowych. Ostatnim osiągnięciem jest wprowadzenie do omówionych badań strukturalnych endoglikozydaz, wykrytych w latach siedemdziesiątych.

Rozdział szósty poświęcony został zagadnieniu pinocytozy, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów pośredniczących, które biorą udział w rozpoznawaniu specyficznych reszt węglowodanowych. Znanych jest pięć systemów receptorów pośredniczących w pinocytozie glikoprotein. Systemy te występują specyficznie w pewnych komórkach i tak np. w hepatocytach ssaczy są to galaktoza i L-fukoza, w hepatocytach ptasich — N-acetyloglukozoamina, w ssaczych komórkach siateczkowo-śródbłonkowych — N-acetyloglukozoamina lub mannoza, w ludzkich fibroblastach — mannozo-6-fosforan.

W ostatnim rozdziale przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat biosyntezy i katabolizmu proteoglikanów tkanki łącznej, a mianowicie: kwasu hialuronowego, siarczanu chondroityny, siarczanu keratanu, heparyny i siarczanu dermatanu.

Recenzowana książka zawiera bardzo dużo wskazówek metodycznych, oraz omawia wiele mechanizmów reakcji. Bogaty materiał zawarty w omawianej monografii poparty jest licznymi wzorami, schematami, tabelami oraz piśmiennictwem do 1979 roku włącznie.

Książka ta powinna zainteresować badaczy zajmujących się biochemią, immunologią, replikacją wirusów, rozwojem embrionalnym, oddziaływaniem pomiędzy komórkami, działaniem hormonów.

*B. Kędzierska*

[The following text is extremely faint and illegible due to low contrast and blurring. It appears to be a list or index of items, possibly with numerical identifiers on the right side.]

SPIS TREŚCI

J. Fronk — Geny mozaikowe — struktura, ekspresja, ewolucja . . . . .	3
J. Jaruzelska, R. Słomski — Metabolizm i funkcja biologiczna niskocząsteczkowych jądrowych RNA . . . . .	25
J. Stawiński — Zastosowanie syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej . . . . .	45
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Polipeptydowe czynniki wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych . . . . .	71
A. M. Rychter — Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych . . . . .	89
A. E. Liczmański — Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe . . . . .	113
J. Gniot-Szulżycka — Wodorosiarczan kwasu askorbinowego . . . . .	137
W. Bednarski, S. Poznański — Synteza plastein w hydrolizatach białkowych . . . . .	145

Sprawozdania:

The 11-the Linderström-Lang Conference, Finlandia ( <i>K. Kamiński</i> ) . . . . .	155
FEBS Advanced Course No. 81, Grecja ( <i>K. Szyfter</i> ) . . . . .	156
VIII Międzynarodowy Zjazd Towarzystwa Neurochemicznego, Anglia ( <i>B. Oderfeld-Nowak, A. Potempska, J. Skangiel-Kramska</i> ) . . . . .	158
XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ( <i>A. Morawiecki, J. Kwiatkowska</i> ) . . . . .	161
Biochemia 82 — Przewodnik po bibliotekach . . . . .	163

Recenzje:

Biochemia w cukrownictwie . . . . .	165
Aspects of Photosynthesis . . . . .	166
Das Stabilitätsverhalten von Osteosynthesen mit äusserer Knochenfixation und Kompression . . . . .	167
The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans . . . . .	168



# POSTĘPY BIOCHEMII

March 1982

## ARTICLES IN POLISH

Volume 28

Number 1—2

J. Fronk — Split genes — structure, expression, evolution (Instute of Biochemistry, Warsaw University, Warszawa) . . . . .	3
J. Jaruzelska, R. Słomski — Metabolism and Biological Function of small nuclear RNA (Institute of Human Genetics, Pol. Acad. Sci., Poznań)	25
J. Stawiński — Application of synthetic DNA Fragments in molecular Biology (Institute of Bioorganic Chemistry, Pol. Acad. Sci., Poznań) . . . . .	45
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Polypeptide growth Factors of normal and neoplastic Cells (Institute of Chemistry and Biophysics, Medical School, Białystok) . . . . .	71
A. M. Rychter — Alternative respiratory Pathway in higher Plants (Institute of Botany, University of Warsaw, Warszawa) . . . . .	89
A. E. Liczmański — The Plant Superoxide Dismutases (Institute of Biochemistry, Warsaw University, Warszawa) . . . . .	113
J. Gniot-Szulżycka — L-Ascorbic acid 2-sulphate (Institute of Biology, M. Kopernik University, Toruń) . . . . .	137
W. Bednarski, S. Poznański — Plastein Synthesis in protein Hydrolysates (Institute of Engineering and Biotechnology of Food, Agriculture-Technical School, Olsztyn) . . . . .	145
Reports . . . . .	155
Book Reviews . . . . .	165



## SPIS TREŚCI

J. Fronk — Geny mozaikowe — struktura, ekspresja, ewolucja . . . . .	3
J. Jaruzelska R. Słomski — Metabolizm i funkcja biologiczna niskocząsteczkowych jądrowych RNA . . . . .	25
J. Stawiński — Zastosowanie syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej . . . . .	45
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Polipeptydowe czynniki wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych . . . . .	71
A. M. Rychter — Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych . . . . .	89
A. E. Licmański — Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe . . . . .	113
J. Gniot-Szulżycka — Wodorosiarczan kwasu askorbinowego . . . . .	137
W. Bednarski S. Poznańska — Synteza plastein w hydrolizatach białkowych . . . . .	145
Sprawozdania	
The 11-th Linderstrom-Lang Conference, Finlandia (K. Kamiński) . . . . .	155
FEBS Advanced Course No. 81, Grecja (K. Szyfter) . . . . .	156
VIII Międzynarodowy Zjazd Towarzystwa Neurochemicznego, Anglia (B. Oderfeld-Nowak, A. Potempska, J. Skangiel-Kramska) . . . . .	158
XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (A. Morawiecki J. Kwiatkowska) . . . . .	161
Biochemia-82 — Przewodnik po bibliotekach . . . . .	163
Recenzje	
Biochemia w cukrownictwie . . . . .	165
Aspects of Photosynthesis . . . . .	166
Das Stabilitätsverhalten von Osteosynthesen mit äusserer Knochenfixation und Kompression . . . . .	167
The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans . . . . .	169