

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTĘPY 29 (3—4)  
(245—428) (1983)

1983

tom 29 nr 3—4

PL 1000 0000-0000



Pw<sup>Δ</sup>

PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>



POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1983 TOM 29 ZESZYT 3—4

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 29 (3—4)  
(245—432) (1983)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Choraży (Gliwice), E. Czuryło

(Warszawa), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), E. Gąsior

(Lublin), J. Gregorczyk (Szczecin), M. Gumińska (Kraków), D. Hulanicka

(Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław),

S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław),

J. Pawełek (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa),

L. Wojtczak (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

## SEKRETARZ REDAKCJI

M. Skup

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), J. Rytko

(Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

## Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1983

Nakład 1820 egz.

Ark. wyd. 13,75, ark. druk. 12,0

Papier druk. b. sat. kl. IV, 71 g 70×100

Zam. 4952/12/83

Oddano do składania 1.VIII.1983 r.

Podpisano do druku w marcu 1984 r.

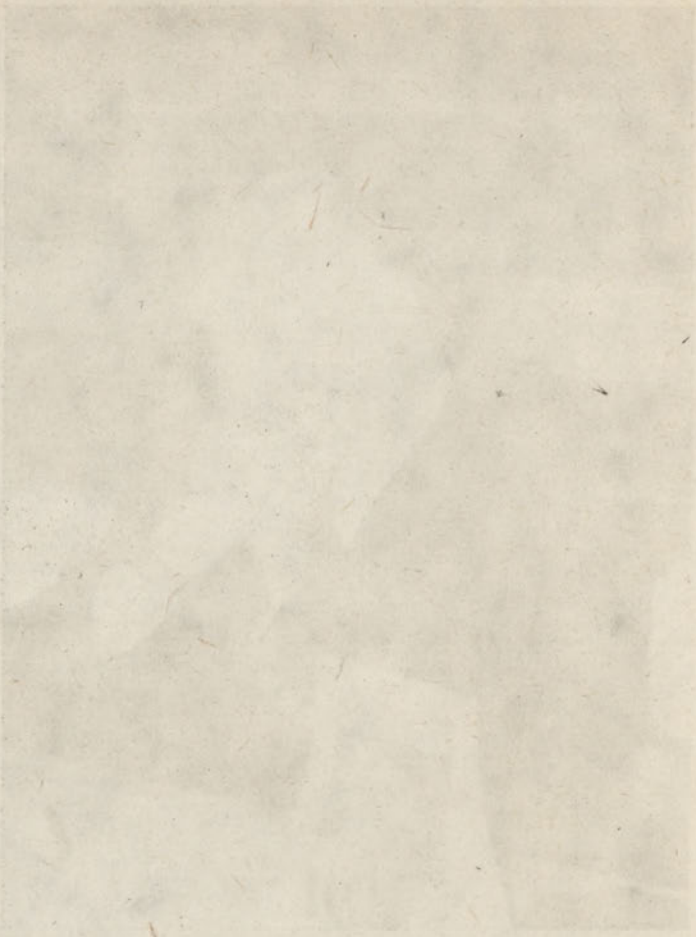
Druk ukończono w lipcu 1984 r.

Cena zł 180,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



**PROFESOR DR HAB. MARIAN SZYMONA**  
1925—1983



PROFESSOR DR. HAN. MATHIAS WYKON  
1871-1872

W dniu 27 lipca 1983 r. zmarł Prof. dr Marian Szymona, kierownik Zakładu Biochemii Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Lublinie i wieloletni dyrektor Instytutu Chemii Podstawowych tej Uczelni.

Urodzony 10 kwietnia 1925 roku w Ostrówku k/Lublina, wyższe studia medyczne ukończył na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 1951 roku uzyskując w tym samym roku stopień doktora medycyny. Pracę zawodową rozpoczął w 1947 r., po drugim roku studiów, jako zastępca asystenta w Katedrze Chemii Fizjologicznej kierowanej przez prof. dr Janinę Opieńską-Blauth. Awansując kolejno, M. Szymona uzyskał w 1956 roku stopień doktora habilitowanego, a w 1974 r. tytuł profesora nadzwyczajnego.

Prof. Marian Szymona odbył szereg krótko i długoterminowych stażów zagranicznych w znanych placówkach biochemicznych. W latach 1953/54 przebywał w Budapeszcie na 4 miesięcznym stażu w laboratorium prof. F. B. Strauba, a w okresie grudzień 1957 — luty 1959 r. w pracowni chemii bakteryjnej, Uniwersytetu Kalifornijskiego w Berkeley, kierowanej przez prof. M. Doudoroffa jako stypendysta Fundacji Rockefellera.

Głównym kierunkiem działalności naukowej Prof. M. Szymony były zagadnienia enzymologii i regulacji metabolizmu u drobnoustrojów, w szczególności zaś u mykobakterii. Wysokiej rangi dokonaniem było wykrycie u prątków, a następnie scharakteryzowanie nowego enzymu — polifosforanowej glukokinazy (Polyphosphate: D-glucose 6 phosphotransferase, EC 2.7.1.63) wykorzystującej nieorganiczny polifosforan do fosforylacji glukozy. W okresie późniejszym stwierdził obecność u mykobakterii i korynebakterii innych kinaz wykorzystujących nieorganiczne polifosforany. W bezpośrednim związku z badaniami nad rolą polifosforanów pozostawały zagadnienia syntezy tych związków u drobnoustrojów. W latach 60-tych Prof. M. Szymona wysunął sugestię wskazującą na możliwość syntezy nieorganicznych polifosforanów drogą fosforylacji substratowej. W kilka lat później we współpracy z I. S. Kulajewem (Moskwa) udało się wykazać u *Neurospora crassa* powstawanie polifosforanów bezpośrednio z 1,3-dwufosfoglicerynianu. Oryginalne badania nad nieorganicznymi polifosforanami przyniosły prof. M. Szymonie szeroki rozgłos światowy i uznanie w kręgach specjalistów. Dowodem na to były m.in. liczne kontakty zagraniczne z laboratoriami zajmującymi się podobną tematyką jak również cytowanie wyników badań prof. M. Szymony w renomowanych czasopismach specjalistycznych, monografiach i podręcznikach. Warte wzmianki jest wykazanie przez M. Szymonę semiindukcyjnej syntezy enzymów zapoczątkowujących przemianę niektórych węglowodanów, polioli i kwasu mlekowego u mykobakterii.

Całość badań zamyka się liczbą ponad 80 publikacji. Niektóre z nich, jak praca nad polifosforanową glukokinazą uzyskała nagrodę I stopnia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej.

Prof. dr Marian Szymona wykształcił liczną kadre doktorów i doktorów habilitowanych w zakresie biochemii. Stawiał bardzo wysokie wymagania sobie i wymagał tego od współpracowników. Uczył rzetelności w pracy naukowej i w życiu poza-zawodowym. Umiał jednocześnie wzbudzać zapał i głębokie zainteresowanie nauką u swoich uczniów. Był doskonałym wykładowcą i dydaktykiem.

Prof. M. Szymona aktywnie uczestniczył w organizacji życia naukowego w ośrodku lubelskim i poza nim, pełniąc często rolę inspiratora nowych przedsięwzięć naukowych i rzetelnego krytyka. Dotyczyło to Instytutu, którym kierował, życia Uczelni, towarzystw i komitetów naukowych. Zmarły był członkiem Rady Redakcyjnej *Physiological Chemistry & Physics* (U.S.A.), *Acta Biochimica Polonica* oraz członkiem Komitetu Biochemicznego i Biofizycznego PAN.

Prof. M. Szymona był człowiekiem o rozległych horyzontach myślowych i szerokich zainteresowaniach. Obdarzony wnikliwym umysłem interesował się filozofią, literaturą, sztuką. Z powodzeniem uprawiał malarstwo. Pozostał jednocześnie człowiekiem skromnym i prawym, nie szukającym łatwej kariery i zaszczytów.

Jego odejście stanowi wielką stratę dla ośrodka lubelskiego i biochemii w Polsce.



## Z HISTORII BIOCHEMII

W. S. OSTROWSKI \*)

### Zarys rozwoju badań nad metaloporfirynami

#### Research in the Field of Metaloporphirins. A Historical note

Minęło niedawno 50 lat od chwili, kiedy nastąpił zwrotny moment w badaniu struktury metaloporfiryn oraz ich biologicznej funkcji. Z początkiem bowiem lat trzydziestych naszego stulecia, zarówno badacze zajmujący się strukturą pierścienia porfirynowego, jak i ci, którzy zajmowali się rolą żelazoporfiryn w procesach oddychania tkankowego, doszli do ważnych etapów w swych badaniach. Hans Fischer (1881—1945) otrzymał w 1930 r. nagrodę Nobla „za badania nad strukturą heminy i chlorofilu, a zwłaszcza za syntezę heminy”, a w 1931 r. Otto Warburg (1883—1970) został wyróżniony nagrodą Nobla „za wykrycie natury i sposobu działania enzymu oddechowego”, czyli oksydazy cytochromowej. Ponieważ w początkowej fazie badań nad strukturą pierścienia porfirynowego wydatnie uczestniczyli dwaj wybitni chemicy polscy, Marceli Nencki i Leon P. Marchlewski, wydawało mi się celowe przybliżyć z tej okazji ten właśnie fragment historii biochemii naszemu młodemu pokoleniu biochemików.

W drugiej połowie XIX w. było już wiadomo, że czerwony barwnik krwi reaguje w jakiś sposób z tlenem. Kolor krwi ulegał zmianie w zależności od jej nasycenia tlenem i w 1862 r. F. Hoppe-Seyler opisał charakterystyczne widmo absorpcyjne utlenowanego barwnika. Zainteresowany tym spostrzeżeniem Hoppe-Seyler izoluje czerwony barwnik krwi, krystalizuje go i nadaje mu nazwę hematoglobiny lub hemoglobiny, która to nazwa przyjmuje się odtąd powszechnie. Hoppe-Seyler wykazuje następnie, że hematynę, czyli grupę prostetyczną barwnika, można łatwo odszczepić od części białkowej za pomocą alkaliów, i stwierdza, że hematyna zawiera zarówno azot jak i żelazo. Nie zdołał on jednak przeprowadzić odwracalnej redukcji hemoglobiny, co udało się G. G. Stokesowi w 1864 r.

Badania nad strukturą hemoglobiny rozpoczął w 1884 r. M. Nencki (1847—1901) pracujący wówczas w Instytucie Chemii Medycznej w Bernie

\*) Prof. dr hab., Instytut Biochemii lekarskiej A.M., ul. M. Kopernika 7, 31-034 Kraków.

w Szwajcarii. Traktując  $\text{HbO}_2$  alkoholem uwalniał heminę, którą następnie rozkładał głównie za pomocą  $\text{HJ}$  i ustalał strukturę poszczególnych produktów. Końcowym wynikiem tych badań prowadzonych wspólnie z drugim Polakiem, J. Zaleskim, było wydzielenie tzw. hemopyrolu i koncepcja czteropyrolowej struktury hemu. Dalsze badania nad strukturą grupy prostetycznej hemoglobiny rozwinął W. Küster, który w 1913 r. ustalił niemal kompletny wzór pierścienia porfirynowego, a Hans Fischer w kilkanaście lat później przeprowadził jego pełną syntezę, za co otrzymał, jak już wspomniano, nagrodę Nobla.

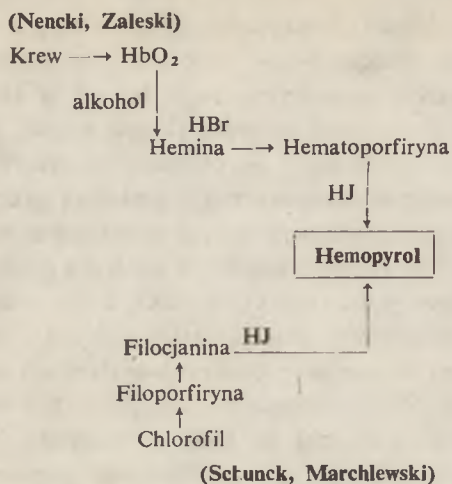
W 1892 r. Leon P. Marchlewski (1869—1946) kończy studia chemiczne na Politechnice w Zurychu i przenosi się do prywatnej pracowni znanego wówczas organika, Edwarda Schuncka, w Manchesterze. Schuncka interesował wtedy czerwony barwnik świeżo przez niego wyosobniony z zielonych części roślin, który przez analogię do hematoporfiryny, wyosobnionej wcześniej przez Nenckiego z krwi ludzkiej, nazwał filoporfiryną. Marchlewski włącza się do badań nad filoporfiryną, której poświęcił prawie 30 lat pracy, i ustala jej wzór empiryczny. Obserwuje przy tej okazji duże podobieństwo wzorów empirycznych filoporfiryny i hematoporfiryny i uzyskuje po raz pierwszy widma absorpcyjne obu tych substancji. We wspólnej pracy z Schunckiem opublikowanej w 1896 r. uczeni formułują pogląd, że chociaż substancje te pochodzą ze świata roślin i ze świata zwierząt, mają bardzo zbliżoną, lub wręcz wspólną strukturę chemiczną (1).

W tym samym mniej więcej czasie Nencki przenosi się do Petersburga i wtedy poznaje bliżej wyniki badań Marchlewskiego nad filoporfiryną. Ponieważ wyniki te wydają mu się bardzo interesujące, proponuje, o dwadzieścia lat młodszemu Marchlewskiemu, przeprowadzenie wspólnych badań nad filoporfiryną według schematu zastosowanego w badaniu hematoporfiryny (por. Ryc. 1). W 1901 r. ukazuje się ich wspólna praca, w której wykazują, że filoporfiryna przy odbudowie daje identyczny hemopyrol jak hematoporfiryna i że obie substancje pod względem chemicznym są niemal identyczne (2).

Dalsze badania nad strukturą chlorofilu Marchlewski przeprowadza w Krakowie wraz z J. Roblem i C. A. Jacobsonem. W 1907 r. wprowadza atom żelaza do pierścienia filoporfiryny i otrzymuje związek, nazwany przez niego filohemina, o identycznych niemal właściwościach jak hemina z hemoglobiny ludzkiej (3). Podobieństwo strukturalne filoheminy z chlorofilu i grupy prostetycznej barwnika krwi naprowadza R. Willstättera na myśl, że — podobnie jak hem chlorofil może być metaloporfiryną — i w 1916 r. znajduje w nim magnez.

Pozostawmy obecnie badania nad strukturą porfiryn, a przyjrzyjmy się, jak rozwijały się badania nad rolą hemoprotein w procesie oddychania tkankowego.

W 1880 r. C. A. MacMunn stwierdza, że w niektórych tkankach



**Ryc. 1.** Schemat reakcji prowadzących do powstania hemopyrolu podczas odbudowy hemoglobiny i chlorofilu.

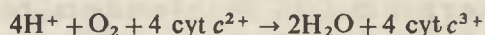
znajdują się nieznanne barwne składniki, nazwane przez niego histohematynami, które zredukowane przez brak dostępu tlenu wykazują smugi absorpcyjne w spektroskopie podobne do widma hemoglobiny. Spostrzeżenie Mac Munn'a zostało zignorowane przez współczesnych i dopiero w 45 lat później uznano je za znaczące odkrycie naukowe. W ciągu bowiem tych lat toczył się zacięty spór między O. Warburgiem a T. L. Thunbergiem i H. Wielandem na temat roli żelaza w procesie oddychania tkankowego.

W 1913 r. Warburg wykazuje, że ślady cyjanku hamują niemal całkowicie zużycie tlenu przez oddychające tkanki, utrzymuje przeto, że biologiczne utlenianie wymaga enzymu zawierającego żelazo, nazwanego przez niego „enzymem oddechowym”. Według niego aktywacja O<sub>2</sub> przez enzym oddechowy miała być głównym mechanizmem w procesie utleniania tkankowego. Thunberg natomiast — wykrywając w 1917 r. dehydrogenazy reagujące z błękitem metylenowym — wykazał, że katalizują one odszczepianie wodoru od różnych metabolitów i że tlen w tych reakcjach jest całkowicie zbyteczny. Wieland z kolei wykazywał, że aktywacja wodoru przez dehydrogenazy jest głównym procesem zachodzącym podczas biologicznego utleniania i że aktywacja O<sub>2</sub> nie jest potrzebna aby odszczepiony wodór przez dehydrogenazy mógł z nim reagować. Warburg jednak nie daje za wygraną i w 1921 r. wykazuje, że sole żelaza dodane do roztartej tkanki znacznie zwiększają zużycie tlenu podczas oddychania. Spór między uczonymi został częściowo załagodzony w 1925 roku, kiedy D. Keilin, również nasz rodak, odkrył cytochromy opisane wcześniej przez Mac Munn'a jako histohematyny. Keilin wykazał, że zawarte w cytochromach żelazo ulega odwracalnej redukcji i utlenieniu (4). Wskazywało to, że cytochromy działają jako przenośniki wodorów

pomiędzy dehydrogenazami i enzymem Warburga aktywującym tlen, ale wówczas nie było jeszcze jasnej opinii na ten temat.

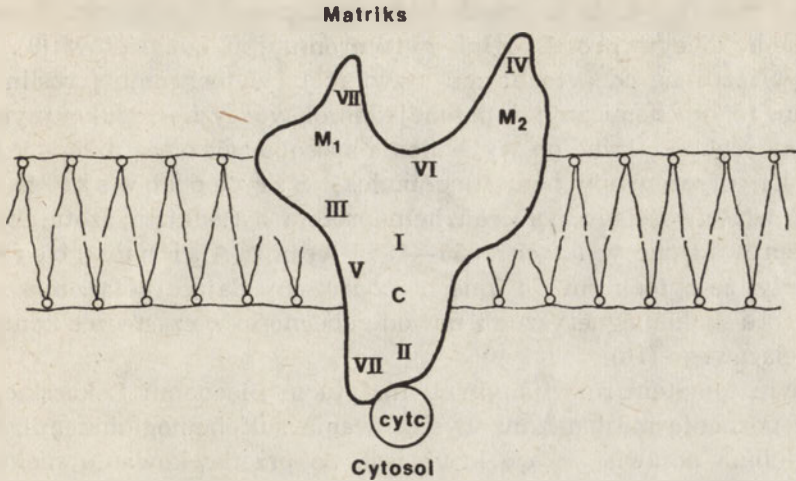
Warburg uparcie eksperymentuje dalej i w 1926 r. stwierdza, że enzymy oddechowe zatrutowane są przez tlenek węgla. Używając hemoglobiny jako białka modelowego i porównując z enzymami oddechowymi konkluduje, że enzymy oddechowe mają podobną grupę prostetyczną jak hemoglobina, ponieważ zawierają żelazo ulokowane w pierścieniu porfirynowym. W dalszych rozważaniach Warburg doszedł do wniosku, że enzymy oddechowe pobierają  $O_2$  z  $HbO_2$  krwi wiążąc go z  $Fe^{2+}$  i że szereg takich czynników żelazoporfirynowych oscyluje pomiędzy  $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$ , a zatem że enzymy oddechowe działają w ścisłym powiązaniu z cytochromami. Za powyższe badania, jak już wspomniano na początku, Warburg otrzymał w 1931 r. nagrodę Nobla. Ale dopiero w 1939 r. A. Szent-György przedstawił pierwszy schemat działania łańcucha oddechowego sprzężonego z transporterem elektronów i wytwarzaniem energii, a Keilin i Hartree w tym samym roku wykazali, że oksydaza cytochromowa składa się z dwóch komponent, cytochromu *a* i cytochromu *a*<sub>3</sub>. Ten ostatni hamowany przez CO i CN<sup>-</sup> okazał się identyczny z enzymem Warburga „przenoszącym tlen” (5).

Według dzisiejszego stanu wiedzy zasadniczą funkcją oksydazy cytochromowej jest aktywacja tlenu molekularnego  $O_2$  jako końcowego akceptora elektronów w łańcuchu oksydacyjnych przemian w komórce. Ogólnie katalizuje ona reakcję:



Z równania widać, że enzym działa jako czynnik sprzęgający jednoelektronowy donor, czyli cytochrom *c*, z czteroelektronowym akceptorem, czyli  $O_2$ . Oksydaza cytochromowa pełni także istotną funkcję w syntezie ATP przez wytwarzania gradientu protonowego opisanego przez teorię chemiosmotyczną Mitchella.

W większości komórek eukariotycznych oksydaza cytochromowa jest białkiem membranowym, złożonym co najmniej z 7 podjednostek, o masie cząsteczkowej od 5000 do 36 000, najczęściej występującym w postaci dimeru o masie cząsteczkowej około 300 000, choć w komórkach niektórych gatunków znajdująca jest w postaci monomerycznej (6). Zawiera 4 grupy prostetyczne: 2 żelazoporfiryny typu *a*, oraz 2 atomy Cu. Ogólna organizacja cząsteczki enzymu, wraz z przestrzennym rozmieszczeniem podjednostek opracowana na podstawie badań rentgenograficznych, wiązania swoistych przeciwciał, sprzęgania za pomocą odczynników dwufunkcyjnych oraz znakowania techniką fopowinowactwa, przedstawiona jest schematycznie na rycinie 2. Jak widać, oksydaza cytochromowa ukształtowana jest w postaci litery Y i można w niej wyróżnić 3 domeny. Domena C obejmuje podjednostki I, II, III i V zwrócona jest na zewnątrz błony wewnętrznej mitochondrionu i zawiera centrum wiązania cytochromu



**Ryc. 2.** Schematyczne przedstawienie monomeru oksydazy cytochromowej z zaznaczeniem lokalizacji domen (C, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>) oraz podjednostek (I—VII) enzymu. Schemat opracowano na podstawie ref. 6 i 7.

mu c oraz, prawdopodobnie, wszystkie grupy prostetyczne, tj. dwa hemy typu a i dwa atomy miedzi (7). W podjednostce II domeny C zlokalizowano funkcję cytochromu *a* oraz jeden atom Cu. Domena C przechodzi w dwa ramiona tworzące domeny M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>, sterzące do wnętrza mitochondrionu, czyli do jego matriksu. Domena M<sub>1</sub> zawiera 8-12 fragmentów helikalnych, podczas gdy domena M<sub>2</sub> jest mniejsza i zawiera 5-8 odcinków helikalnych.

Obecnie lansuje się model dwóch odrębnych stanów molekularnych oksydazy cytochromowej (8): stan spoczynkowy R i stan pulsujący P. Obie formy są zdolne katalizować reakcję charakterystyczną dla oksydazy cytochromowej lecz z różną szybkością. Niezależnie od stopnia utlenienia oksydaza cytochromowa w stanie R może przechodzić w stan P i odwrotnie, ale charakteryzuje się wtedy różnymi parametrami kinetycznymi i właściwościami spektralnymi. Pulsująca oksydaza działa z większą wydajnością i włącza się w bieg reakcji katalizacyjnej dopiero w momencie redukcji przez dopływające elektrony; oksydaza spoczynkowa R występuje na ogół w postaci całkowicie utlenionej. Przyjęcie powyższego modelu oksydazy cytochromowej tłumaczy szereg fizykochemicznych właściwości enzymu jak i zespół następujących po sobie zdarzeń w procesie złożonej reakcji enzymatycznej katalizowanej przez ten enzym.

Po drugiej wojnie światowej tradycja badań nad metaloporfirynami przetrwała w Krakowie w Instytucie Biochemii Lekarskiej, przede wszystkim w pracach Skarżyńskiego i Szczepkowskiego, Kojana i Frendo oraz Zgliczyńskiego i Stelmaszyńskiej.

Badania metabolizmu samożywnych bakterii siarkowych *Thiobacillus thioparus* i *Thiobacillus thiooxydans*, rozwijane w latach pięćdziesiątych,

doprowadziły do wykrycia i częściowej charakterystyki cytochromu *s*, odpowiednika cytochromu *c* lub cytochromu *f* u eukariotów (9). Cytochrom *s* różni się od cytochromu *c* zwierząt i cytochromu *f* roślin właściwościami fizykochemicznymi, potencjałem oksydacyjno-redukcyjnym oraz kinetyką reakcji. Dążąc do wyjaśnienia sposobu wiązania układów hematynowych przez grupy hemofilne białek, Szczepkowski zajął się z kolei właściwościami połączeń hemoprotein z tlenkiem azotu. Badania te przeprowadzone w latach 1956—1958 wraz z A. Ehrenbergiem wykazały, że cytochrom *c* i inne hemoproteiny dające połączenia z tlenkiem azotu są diamagnetyczne z powodu obecności w cząsteczce kompleksu jonu żelazawego (10).

Innym tematem rozwijanym w Instytucie Biochemii Lekarskiej było bliższe poznanie mechanizmu występowania sulfohemoglobinemii. Sulfohemoglobina pojawia się we krwi osób po przedawkowaniu niektórymi lekami, jak na przykład fenacetyną, i charakteryzuje się strukturą chlorynową. Wynika to z przyłączenia atomu siarki do jednego z pierścieni pyrolowych i wysycenia podwójnego wiązania pomiędzy węglami  $\beta$ - $\beta'$  tegoż pierścienia. Badania Kojai i Frendo (11) wykazały, że substancje wywołujące sulfohemoglobinemę, jak fenacetyna, *p*-aminofenol i acetanilid, wywierają katalityczny efekt na reakcję  $\text{HbO}_2$  z  $\text{H}_2\text{S}$ . Wyjaśniono, że  $\text{H}_2\text{S}$  niezbędny dla powstania sulfohemoglobiny *in vivo* powstaje nie w przewodzie pokarmowym, jak dotychczas sądzono, ale wewnątrz erytrocytów jako produkt reakcji siarki elementarnej ze zredukowanym glutationem. Siarka elementarna gromadzi się w erytrocytach w następstwie zahamowania wspomnianymi związkami aktywności sulfotransferazy 3-merkaptopirogronianu. Gromadzący się w erytrocytach 3-merkaptopirogronian w większych ilościach ulega samorzutnemu rozpadowi do siarki elementarnej i pirogronianu.

Pod koniec lat 60-tych rozpoczęto w Instytucie badania katalitycznych właściwości mieloperoksydazy w fagocytujących leukocytach ludzkich (12). Na podstawie wcześniejszych prac Agnera (13), a później Zgliczyńskiego i współprac. (14), stało się jasne, że mieloperoksydaza bierze udział w niespecyficznym działaniu antybakteryjnym poprzez katalizowanie w neutrofilach reakcji biologicznego chlorowania. W obecności  $\text{H}_2\text{O}_2$  enzym utlenia jon chlorkowy, który w obecności akceptora, na przykład aminy, daje jako produkt chlorowania chloraminę (12). Powstający kompleks  $\text{E-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}$  prowadzi do wytworzenia czynnika chlorującego, który zidentyfikowano jako  $\text{HOCl}$ , a który w obecności akceptora chloru daje stosowny produkt;  $\text{HOCl}$  jest najprawdopodobniej głównym czynnikiem cytotoksycznym w fagocytuującym leukocycie. Na podstawie szczegółowych badań spektralnych Zgliczyński (15) przedstawił przypuszczalny mechanizm udziału mieloperoksydazy w omawianym procesie. Według zaproponowanego mechanizmu obie cząsteczki hematyny zawarte w enzymie partycypują równocześnie w reakcji biologicznego chlorowa-

nia. Model halogenacji jest zgodny z danymi widmowymi kompleksów enzymu z poszczególnymi substratami i różnymi akceptorami atomu chloru.

Jak widać z powyższego artykułu, badania nad żelazoporfirynami i hemoproteinami są kontynuowane od ponad 100 lat. Mniej więcej 50 lat temu zakończył się jak gdyby pierwszy etap tych badań, który otworzył nowe kierunki eksploracji na kolejne 10-lecia, zwłaszcza nad biologiczną funkcją hemoprotein. Badania nad strukturą porfiryn inicjowali Polacy, a także w późniejszych okresach biochemicy polscy dołączali z oryginalną myślą i doświadczeniem do badań nad rolą różnych hemoprotein w procesach biologicznych. Miejmy nadzieję, że w przyszłości będziemy także obecni wśród tych, którzy rozszyfrowują tajniki struktury i mechanizmu działania tej niezwyklej grupy białek złożonych znajdujących w każdej dużej komórce.

#### PISMIENICTWO

1. Schunck E., Marchlewski L., (1896), *Proc. Royal Soc.*, **59**, 233—236.
2. Nencki M., Marchlewski L., (1901), *Ber. dtsh. chem. Ges.*, **34**, 1687—1690.
3. Marchlewski L., Robel J., (1907), *Bull. Intern. Acad. Sci. Cracovie*, 1037—1039.
4. Keilin D., (1925), *Proc. Royal Soc., Ser. B.*, **98**, 312—339.
5. Warburg O., (1949), „Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action”, Oxford University Press, London.
6. Brunori M., Wilson M. T., (1982), *TIBS*, **7**, 295—299.
7. Capalli R. A., (1982), *TIBS*, **7**, 292—295.
8. Antonini E., Brunori M., Colosimo A., Greenwood C., Wilson M. T., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3128—3132.
9. Skarżyński B., Klimek R., Szczepkowski T. W., (1956), *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **4**, 299—326.
10. Ehrenberg A., Szczepkowski T. W., (1960), *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1684—1692.
11. Koj A., Frendo J., (1964), *Clin. Chim. Acta*, **9**, 500—501.
12. Zgliczyński J. M., Stelmaszyńska T., Ostrowski W., Naszkalski J., Sznajd J., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 540—547.
13. Agner K., (1958), *4th Int. Congr. Biochem.*, Vienna, p. 15.
14. Zgliczyński J. M., Stelmaszyńska T., Domański J., Ostrowski W., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 419—424.
15. Zgliczyński J. M., (1980), „Characteristics of Myeloperoxidase from Neutrophils and other Peroxidases from Different Cell Types”, in „The Reticuloendothelial System” (A. J. Sbarra a. R. R. Strauss, eds.), Plenum Press, New York-London, vol. **2**, 255—278.

The first part of the paper is devoted to a general discussion of the problem. It is shown that the problem is equivalent to the problem of finding a function which satisfies certain conditions. The second part of the paper is devoted to the construction of such a function. It is shown that such a function exists and is unique. The third part of the paper is devoted to the study of the properties of this function. It is shown that this function has certain properties which are of interest in the theory of functions.

The fourth part of the paper is devoted to the study of the properties of this function. It is shown that this function has certain properties which are of interest in the theory of functions. The fifth part of the paper is devoted to the study of the properties of this function. It is shown that this function has certain properties which are of interest in the theory of functions. The sixth part of the paper is devoted to the study of the properties of this function. It is shown that this function has certain properties which are of interest in the theory of functions.

The seventh part of the paper is devoted to the study of the properties of this function. It is shown that this function has certain properties which are of interest in the theory of functions. The eighth part of the paper is devoted to the study of the properties of this function. It is shown that this function has certain properties which are of interest in the theory of functions. The ninth part of the paper is devoted to the study of the properties of this function. It is shown that this function has certain properties which are of interest in the theory of functions.



JAN BARCISZEWSKI \*

## **Transferowe kwasy rybonukleinowe — dwadzieścia pięć lat badań \*\***

### **Transfer Ribonucleic Acids — twenty five years of studies**

Postęp w badaniach kwasów nukleinowych jest olbrzymi. Do retrospektywnego potraktowania tematu zachęcają mijające właśnie 3 ważne rocznice:

- stulecie prac Kössela o chemii jądra komórkowego,
- 30 lecie prac Watsona i Cricka donoszących o odkryciu podwójnej spirali DNA, oraz
- 25 lecie prac wykazujących istnienie transferowych kwasów rybonukleinowych.

Kwasy nukleinowe odkrył Fryderyk Miescher w 1868 r. Wyodrębnił je z jąder komórkowych obumarłych leukocytów (z ropy ludzkiej) i nazwał je nukleiną. Era badań kwasów nukleinowych zaczęła się zatem ponad 100 lat temu. W 1882 roku Albrecht Kössel opublikował pracę o chemii jądra komórkowego (Zur Chemie Zellkerns), w której opisał metodę ilościowego oznaczania fosforu kwasów nukleinowych wychodząc z 15 g świeżego materiału komórkowego. Białka denaturowano kwasem i taniną, fosfolipidy ekstrahowano etanolem a kwas fosforowy oznaczano ówczesnymi metodami grawimetrycznymi. Na podstawie analizy zawartości fosforu, Kössel porównywał stosunek ilości fosforu zawartego w jądrze do całkowitej ilości fosforu w różnych komórkach i znalazł korelację z liczbą jąder komórkowych. W 1884 Kössel scharakteryzował również zasadowe białko w jądrach czerwonych ciałek krwi ptaków, które nazwał histonem. On też wyizolował zasady kwasów nukleinowych i wyjaśnił ich strukturę (1), która została potwierdzona pracami Emila Fischera. Znacznie później, w latach 1930—31 P. A. Levene wyjaśnił chemiczną strukturę kwasów nukleinowych. Nie wchodząc w szczegóły jego dociekań warto przypomnieć, że wyznawał on „teorię czteronukleotydomową” ostatecznie w myśl której, jednostka czteronukleotydomowa była podstawowym powtarzającym

---

\* Doc. dr hab. Zakład Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań.

\*\* *Artykuł ten stanowi część referatu przedstawionego na konferencji naukowej pt. „Chemia i Biologia Kwasów Nukleinowych”, organizowanej w Poznaniu w dniach 20 i 21 kwietnia 1983.*

się fragmentem kwasów nukleinowych. W 1932 Casperson ponownie stwierdził silne pochłanianie promieni ultrafioletowych przez kwasy nukleinowe. Właściwość tę wykorzystał następnie w badaniach cytochemicznych jądra komórkowego, na podstawie których zaproponował diagram obrazujący chemiczną budowę chromosomu (1). Analizując cytoplazmę trzustki, Casperson stwierdził duże stężenie RNA w ergastoplazmie i obserwację tę związał z biosyntezą białka. Uzyskane wyniki upoważniały Caspersona do stwierdzenia, że chemiczna natura materiału genetycznego to kwasy nukleinowe. Będąc pod wpływem innych badaczy, tak oczywistego wniosku Casperson wówczas nie wysunął. Uczynił to dopiero w 1944 O. T. Avery. To wielkie odkrycie nie zostało przyjęte tak głośno jak odkrycie podwójnej spirali 10 lat później (2).

Od około 1950 r. hipoteza o tetranukleotydowej strukturze kwasów nukleinowych została odrzucona. Wykazano, że kwasy nukleinowe różnią się znacznie w molarnych proporcjach w zależności od pochodzenia materiału. Chargaff po raz pierwszy stwierdził, że liczba nukleotydów mających grupę aminową w pozycji 6 (adenina i cytozyna) jest na ogół równa w przybliżeniu liczbie nukleotydów mających grupę ketonową w pozycji 6 (guanina i uracyl). Równoważność A i T oraz G i C jest bardzo ważnym czynnikiem w tworzeniu struktury DNA. Wiosną i latem 1953 James Watson i Francis Crick napisali cztery prace o strukturze i funkcji DNA. Pierwsza publikacja z tej serii ukazała się w *Naturze*, 25 kwietnia 1953 i zawierała m.in. stwierdzenie „..... it has not escape our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material”. Znaczenia tego przypuszczenia nie sposób przecenić. Struktura podwójnej spirali zaproponowana przez Cricka i Watsona dla DNA daje dobre wyjaśnienie jego wielu właściwości fizycznych takich jak duża gęstość, znaczna zawartość wody czy obrazy ugięcia promieni rentgenowskich. Na początku 1955 r. F. H. C. Crick rozpowszechnił wśród członków tzw. „RNA tie club” ideę znaną jako hipoteza adaptorowa. Postulował on, że każdy aminokwas może być związany przy pomocy specyficznego enzymu z małą cząsteczką która wiązaniami wodorowymi mogłaby się specyficznie łączyć z matrycowym kwasem nukleinowym. Inaczej mówiąc mogłoby być 20 różnych cząsteczek adaptorowych specyficznie wiążących poszczególne aminokwasy i 20 różnych enzymów do łączenia aminokwasów z jego adaptorem. Dwa lata później, na przełomie 1956—1957 w laboratorium P. C. Zamecnika z Massachusetts General Hospital w Boston, USA, stwierdzono, że frakcja ekstraktu komórkowego tzw. „enzym pH 5” włącza radioaktywną leucynę do kwasu nukleinowego. Związany aminokwas mógłby być przeniesiony do białka (3). W tym samym czasie Japończycy uzyskali podobny wynik (4). Obecny stan wiedzy umożliwia nam stwierdzenie, że to właśnie tRNA ulegał aminoacylacji ponieważ enzym pH 5 zawiera praktycznie całą ilość tRNA i syntetaz aminoacylo-tRNA.

Po odkryciu transferowych (przenoszących, rozpuszczalnych) kwasów rybonukleinowych wyodrębniono pierwsze preparaty tRNA oraz określono ich sekwencję nukleotydową. Holley i Merrill oczyścili tRNA<sup>Ala</sup> z drożdży, stosując dzisiaj prawie zapomnianą chromatografię przeciwprądową. W 1965 Holley i współpracownicy ustalili pierwszorzędową strukturę (sekwencji nukleotydów) w tRNA<sup>Ala</sup> z drożdży. Rok później H. G. Zachau (Monachium) określił pierwszorzędową strukturę dwóch izoakceptorowych tRNA<sup>Sea</sup> również z drożdży. Następnie J. T. Madison (Wisconsin) pokazał sekwencję tRNA<sup>Vh</sup>, U. L. RajBhandary (Wisconsin) strukturę tRNA<sup>Ter</sup> a A. A. Bayev (Moskwa) pierwszorzędową strukturę tRNA<sup>rP</sup>. Wszystkie te tRNA otrzymane były z drożdży (5). Wówczas to powszechnie zaakceptowano model struktury II rzędowej zaproponowany przez Holley'a, tzw. model liścia koniczyny, który jest aktualny do dnia dzisiejszego. Warto przypomnieć tutaj, że Robert Holley rozpoczął swoje prace nad tRNA jako „*part-time project*” zajmując się głównie różnymi aspektami żywienia. Do zajęcia się bardziej serio tRNA zachęcony został przez dyrektora jego laboratorium, który wówczas zdawał sobie dobrze sprawę z wielkiego znaczenia prac nad biosyntezą białka. R. W. Holley tak charakteryzuje tamten okres „... początkowo pracowaliśmy nad tRNA wątroby szczura, ale okazało się, że dużo łatwiej jest izolować duże ilości tRNA z drożdży. Zwykle do tego celu używaliśmy około 50 kg drożdży, wrzucaliśmy je do 200 l polietylenowej beczki z 30—40 litrami fenolu. Otrzymaliśmy 50—70 g mieszaniny tRNA z którego wyodrębnialiśmy tRNA<sup>Ala</sup>. Przypuszczam, że w tamtych latach pracowaliśmy z 1—2 gramami czystego tRNA. Był to tRNA<sup>Ala</sup>, którego sekwencję nukleotydową zdołaliśmy określić. Praca ta doprowadziła do przyznania mi nagrody Nobla w 1968 za prace nad kodem genetycznym i jego rolą w biosyntezie białka, wspólnie z M. Nirenbergiem i H. G. Khoraną” (6). Dla pełnej ścisłości faktów dodam, że sekwencja określona przez Holley'a w 1965 zawierała kilka błędów, które poprawiono kilkanaście lat później.

Wielkim przełomem w badaniach tRNA było wprowadzenie sekwencjonowania kwasów nukleinowych, w tym również tRNA, znaczonych fosforem <sup>32</sup>P *in vivo*. Zaletami tej metody są duża szybkość oraz niewielkie ilości wyjściowego materiału. Na początku lat 70 wprowadzono technikę znaczenia następczego (ang. *post labeling*) tRNA przy pomocy enzymu T<sub>4</sub> kinazy i [γ-<sup>32</sup>P] ATP, która umożliwiła badania struktury dowolnego tRNA. Wprowadzenie metod sekwencjonowania DNA przez Gilberta i Sangera otworzyło nową erę w badaniach kwasów nukleinowych. Wykorzystując technikę żeli sekwencyjnych Stanley i Vassilenko zaproponowali szybką metodę określania pierwszorzędowej struktury tRNA. Polega ona na ograniczonej hydrolizie tRNA (tzw. alkaliczna hydroliza statystyczna — tylko jedno wiązanie fosforodwuestrowe ulega hydrolizie w jednej cząsteczce tRNA), piętnowaniu hydrolizatu tRNA przy pomocy T<sub>4</sub> kinazy i ATP oraz rozdzieleniu produktów hydrolizy na żelu poliakryloa-

midowym. Identyfikacja 5' nukleotydu w każdym fragmencie (pasma na żelu) pozwala zrekonstruować pełną strukturę cząsteczki tRNA. Obecnie jest to podstawowa technika wykorzystywana do analizy struktury i rzędowej tRNA.

Po 10 latach od określenia pierwszej sekwencji tRNA, w 1976 znanych było już około 100 sekwencji. Obecnie po 25 latach od tamtej daty znamy ich już ponad 600. Pierwszym opracowaniem znanych struktur była publikacja B. G. Barrell i B. F. C. Clark z 1974 (7). Jedno z najnowszych opracowań struktur tRNA i modyfikowanych nukleozydów zostało niedawno opublikowane (5). Ze względu na szybki napływ nowych informacji tego typu prace stają się coraz mniej przydatne i dlatego w większym stopniu wykorzystuje się obecnie do tego celu maszyny cyfrowe.

Pierwsze kryształy tRNA otrzymano w 1968 roku w kilku laboratoriach jednocześnie. Ze względu na niewielki stopień ich uporządkowania wewnętrznego nie nadawały się one do badań rentgenostrukturalnych. W 1973 roku zespół Aleksandra Richa (MIT, Cambridge, Mass, USA) zaproponował przestrzenne ułożenie łańcucha polinukleotydowego cząsteczki tRNA<sup>Phe</sup> drożdży na podstawie mapy gęstości elektronowej otrzymanej z dokładnością 4 Å. Wówczas to zaczęło obowiązywać określenie, że struktura tRNA jest podobna do litery L lub rosyjskiej litery G. W roku następnym zespoły A. Richa i Aarona Kluga (MRC, Cambridge, Anglia) przedstawiły analizę struktury kryształów tRNA<sup>Phe</sup> (układ rombowy — A. Rich, układ jednoskośny — A. Klug) w której pokazano strukturę przestrzenną tRNA w kryształach, w tym również tzw. oddziaływania trzeciorzędowe np. między pętlami dwuhydrourydyny i rybotymidyny (8,9). Z dotychczas ustalonych struktur wynika, że struktura krystaliczna różnych tRNA jest podobna. Istnieją jednak niewielkie różnice np. w kryształach tRNA<sup>Asp</sup> nie stwierdzono oddziaływań fragmentów dwuhydrourydyny i rybotymidyny (10). Sukcesy w rozwiązywaniu struktury krystalicznej tRNA wywarły niewątpliwy wpływ na badania tRNA w roztworze. Postawiono wówczas pytanie aktualne również i dziś: „czy struktura tRNA w roztworze jest taka sama jak w kryształach?”. Wieloletnie badania chemiczne i biochemiczne „dostępnych i niedostępnych fragmentów” cząsteczki tRNA w pełni potwierdzają podobieństwa struktury w roztworze i kryształach.

Ze względu na udział tRNA w różnych procesach nie tylko w biosyntezie białka (11) próbowano znaleźć rozwiązanie jednego z podstawowych problemów w biologii molekularnej: rozpoznawanie kwas nukleinowy — białko. Od początku problem rozpoznawania tRNA — aminoacylo tRNA syntetazy był przedmiotem szczególnego zainteresowania. Mimo nagromadzenia olbrzymiej ilości danych nie ma obecnie odpowiedzi jaki jest mechanizm tego oddziaływania. Należy przypuszczać, że problem ten w znacznym stopniu rozstrzygnie analiza rentgenostrukturalna. Pierwsze

kryształy kompleksu tRNA<sup>Asp</sup> — syntetaza aspartylo-tRNA otrzymane w 1980 nie nadawały się do analizy rentgenostrukturalnej (12).

Nowy etap badań tRNA dotyczy struktury ich genów. Wyodrębnienie genów tRNA, wprowadzenie ich do plazmidów lub fagów umożliwiło otrzymanie w drodze klonowania znacznych ilości preparatów dzięki czemu stała się możliwa również analiza struktury odcinków DNA poprzedzających gen struktury. W genach tRNA chloroplastów oraz cytoplazmy stwierdzono występowanie sekwencji wtrąconych (*ang. intervening sequences*). Te fragmenty mają długość od kilku do kilkunastu nukleotydów w genach tRNA drożdży, a do kilkuset w chloroplastowym DNA. Jak dotychczas tego typu sekwencji nie wykryto w genach tRNA pochodzenia mitochondrialnego. Pełna analiza mitochondrialnego genomu ssaków pozwoliła na wykrycie tRNA o niespotykanych dotąd właściwościach (tRNA<sup>Ser</sup>) oraz wykrycie nowych zasad rozpoznawania kodon-anty kodon (13).

Na zakończenie wspomnę o nowej technice tzw. rekombinowanych tRNA, wprowadzonej przez O. Uhlenbeck w ostatnich 2 latach. Polega ona na wymianie nukleotydów w strukturze tRNA poprzez przecinanie łańcucha polinukleotydowego w żądanym miejscu, usunięcie nukleotydu, wprowadzenie na jego miejsce innego oraz złączeniu fragmentów tRNA przy pomocy T4 ligazy. Tak chimeryczny tRNA można testować w reakcji aminoacylacji lub oddziaływaniach z kodonem. Przy pomocy tej techniki można badać biosyntezę niektórych zmodyfikowanych nukleozydów w tRNA, lub wpływ niektórych nukleozydów znajdujących się w pętli antykodonu na właściwości supresorowe tRNA.

Jak widać z przedstawionych faktów, po 25 latach intensywnych badań zagadnienie to jest przedmiotem coraz to szerszych kompleksowych badań biologicznych, chemicznych i fizycznych również w naszym kraju.

## PIŚMIENNICTWO

1. Karlson P., (1982), *Trends in Biochem. Sci.*, 8, 302—305.
2. Crick F. H. C., (1974), *Nature*, 248, 766—169.
3. Hoagland M. B., Zamecnik P. C., Stephenson M. L., (1957) *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 215—216.
4. Ogata K., Nohara H., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 659—660.
5. Barciszewski J., Rafalski, A. J., (1981), Atlas of transfer ribonucleic acids and modified nucleosides, PWN, Warszawa—Poznań.
6. *Chemist-Analyst*, (1979), 68, 1—3.
7. Barrell B. G., Clark, B. F. C., (1974), Handbook of Nucleic Acids Sequences, Ed. Joynson-Bruvvers, Oxford.
8. Kim, S. H., Suddath F. L., Quigley G. J., McPherson A., Sinden D., Sussman J. L., Wang A., Seeman N. C., Rich A., (1974), *Science*, 185, 435—441.
9. Robertus J. D., Ladner J. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R. S., Clark B. F. C., Klug A., (1974), *Nature*, 250, 546—551.
10. Moras D., Commarmond M. B., Fischer J., Weiss R., Thierry J. C., Ebel J. P., Gieger R., (1980), *Nature*, 288, 669—674.

11. Rich A., RajBhandary U. L., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 805—860.
12. Giege R., Lorber B., Ebel J. P., Moras D., Thierry J. C., (1980), *C.R. Acad. Sci. Paris*, **2**, 393—396.
13. Attardi G., (1981), *Trends in Biochem. Sci.*, (86—89 i 100—102).

## ARTYKUŁY

MIECZYŚLAW CHORAŻY <sup>\*)</sup>, STANISŁAW SZALA <sup>\*\*)</sup>

### Komórkowe geny transformujące

#### Cellular Transforming Genes

##### *Spis treści*

- I. Wstęp
- II. Struktura retrowirusów
- III. Geny transformujące retrowirusów i ich komórkowe homologu
- IV. Aktywacja onkogenów komórkowych w nowotworach
- V. Transformujące właściwości DNA komórek prawidłowych
- VI. Rola onkogenów komórkowych w nowotworach u ludzi
- VII. Lokalizacja onkogenów w chromosomach i przegrupowania w nowotworach
- VIII. Podsumowanie

##### *Contents*

- I. Introduction
- II. Structure of retroviruses
- III. Viral transforming genes and their cellular homologues
- IV. Activation of cellular oncogenes in neoplasia
- V. Transforming properties of DNA of normal and neoplastic cells
- VI. The role of cellular oncogenes in human neoplasia
- VII. Localization of oncogenes in chromosomes — rearrangements in neoplasia
- VIII. Summary

### I. Wstęp

Ostatnie lata przyniosły doniosłe odkrycia pozwalające na zrozumienie molekularnego podłoża i niektórych mechanizmów procesu nowotworzenia. W genomach kręgowców, w tym także człowieka, odkryto obecność genów, które biorą udział w nowotworowej transformacji. Geny te zwane

---

<sup>\*)</sup> Prof. dr hab. i <sup>\*\*)</sup> Doc. dr hab., Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice

obecnie onkogenami (geny *onc*, geny transformujące) prawdopodobnie biorą udział w kluczowych funkcjach komórki związanych z procesami wzrostu i różnicowania.

Dotychczas zidentyfikowane onkogeny można sklasyfikować w dwie grupy. Jedne z nich występują w „silnie” raktowórczych (onkogennych) wirusach typu RNA (retrowirusach). „Silnie” onkogenne retrowirusy mają zdolność indukowania nowotworów u zwierząt i transformacji nowotworowej kultur komórkowych fibroblastów. Właściwość ta wynika z obecności w genomie wirusa onkogenów. Onkogeny wirusowe kodują swoiste białka, które uważa się za bezpośrednio odpowiedzialne za proces nowotworowej transformacji. Najwcześniej zidentyfikowanym onkogenem był gen *src* występujący w genomie wirusa mięsaka Rousa (RSV). Gen *src* został pobrany na drodze rekombinacji z genomu kurczęcia w trakcie zakażenia nieonkogennym retrowirusem ptaków. Gen *src* włączony w genom retrowirusa staje się aktywnym wirusowym onkogenem gdyż jego ekspresja nie jest dłużej zależna od nadzoru elementów kontrolujących geny komórkowe, lecz zależy bezpośrednio od sekwencji kontrolujących (promotorów) genomu wirusa. Ekspresja genu *src* po zakażeniu zwykle ustala się na znacznie wyższym poziomie niż homologicznego genu komórki prawidłowej. Poznano dotychczas kilkanaście rekombinantów retrowirusów (chimery retrowirusów), które podobnie jak wirus mięsaka Rousa są silnie onkogenne ponieważ zawierają pobrany uprzednio gen *onc*.

Onkogeny komórkowe zaliczamy do drugiej grupy onkogenów indukujących nowotworową transformację u kręgowców od ryb do człowieka. Wykryto je za pomocą testów transfekcyjnych w genomach ptaków, małych gryzoni, małpy i człowieka. Fragmenty jądrowego DNA komórek prawidłowych, a w jeszcze większym stopniu fragmenty DNA komórek rakowych indukowanych chemicznie u zwierząt, lub DNA komórek naturalnych nowotworów ludzkich, mają zdolność indukowania transformacji po wprowadzeniu do mysich fibroblastów linii NIH 3T3. Transformowane poprzez transfekcję fibroblasty po zaszczepieniu nagim myszom („*nude mice*” — szczep myszy pozbawiony grasicy z genetycznym defektem immunologicznym), dają typowe guzy nowotworowe. Uważa się, że w komórkach prawidłowych onkogeny komórkowe są w stanie spoczynku lub że ekspresja ich jest na niskim poziomie (proto-onkogeny). Dopiero pobudzenie (aktywacja) komórkowych genów *onc* prowadzi do transformacji komórek prawidłowych w komórki nowotworowe. Poznano przynajmniej kilka mechanizmów aktywacji komórkowych genów *onc*.

Ewolucyjnie onkogeny obu grup pochodzą z tych samych genetycznych elementów, które są naturalnymi składnikami genomu komórek kręgowców. Molekularna analiza onkogenów stała się możliwa dzięki postępom metodycznym, zwłaszcza analizie restrykcyjnej i sekwencjonowaniu DNA oraz poznaniu zjawisk transformacji i transdukcji.

Dla uniknięcia niejasności podajemy znaczenie kilku terminów używa-



nych w biologii molekularnej nowotworów. „Transfekcją” nazywamy przeniesienie do komórek-biorców hodowanych w kulturze cech genetycznych przez wprowadzenie do komórek obcego DNA. „Transformacja nowotworowa” — jest to przekształcenie komórek prawidłowych (przeważnie fibroblastów hodowanych w kulturach) w komórki nowotworowe na drodze transfekcji przy użyciu DNA z komórek prawidłowych lub nowotworowych. Komórki stransformowane nowotworowo tworzą wielowarstwowe kolonie o chaotycznym, nieuporządkowanym układzie i — w odróżnieniu od komórek prawidłowych — mogą wzrastać w agarze miękkim wskutek zmian we właściwościach przyczepnych błony komórkowej. Kolonie komórek stransformowanych nowotworowo wszczepione odpowiednim szczepom myszy dają guzy o typowych cechach nowotworowych. „Transdukcją” nazywamy proces przeniesienia informacji genetycznej z jednej komórki do drugiej za pomocą wirusów i fagów. Terminem „transdukcja” będziemy obejmowali proces pobrania z komórki prawidłowej onkogeny przez retrowirusa i ewentualne włączenie go (w postaci prowirusa) do genomu innej komórki. „Białko transformujące” — jest to białko kodowane przez onkogen wirusowy lub aktywowany onkogen komórkowy. Przypisuje się mu zdolność indukowania i podtrzymywania transformacji nowotworowej.

Podstawowe informacje o biologii i strukturze wirusów onkogennych typu RNA zawarte są w wydawnictwach książkowych (1) — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (2) — Viral Oncology i (3) — Molecular Biology of RNA Tumor Viruses.

## II. Struktura retrowirusów

Wirusy RNA indukujące nowotwory u ptaków i ssaków zaliczane są do rodziny Retroviridae; w procesie replikacji swego materiału genetycznego syntetyzują DNA przy pomocy swoistej RNA-zależnej polimerazy zwanej odwrotną transkryptazą (rewertazą), (2, 3, 4, 5). Wiriony tych wirusów mają około 100 nm średnicy, a ich kapsyd, prawdopodobnie, ikosaedralny, zawiera dwie identyczne cząsteczki RNA o stałej sedymentacji 30-35S, tworząc dimer o stałej sedymentacji 70S.

Infekcyjne cząstki wirusowe, po penetracji do wnętrza komórek, uwalniają na terenie cytoplazmy RNA, który służy jako matryca do syntezy DNA. Starterem swoistej reakcji syntezy DNA na matrycy wirusowego RNA jest — w zależności od wirusa — tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, a enzymem biorącym w niej udział jest wirusowa, wielofunkcyjna, RNA-zależna polimeraza DNA (rewertaza) mająca zdolność syntezy komplementarnego łańcucha DNA i enzymatycznej degradacji matrycy RNA po ukończeniu syntezy. Końcowe produkty reakcji — dwupasmowe, kołowe cząsteczki DNA przemieszczają się do jądra i są następnie włączane w liczne

loci genomu gospodarza. W fazie tej, tzw. fazie prowirusa, geny wirusowe są transkrybowane przez polimerazę RNA gospodarza.

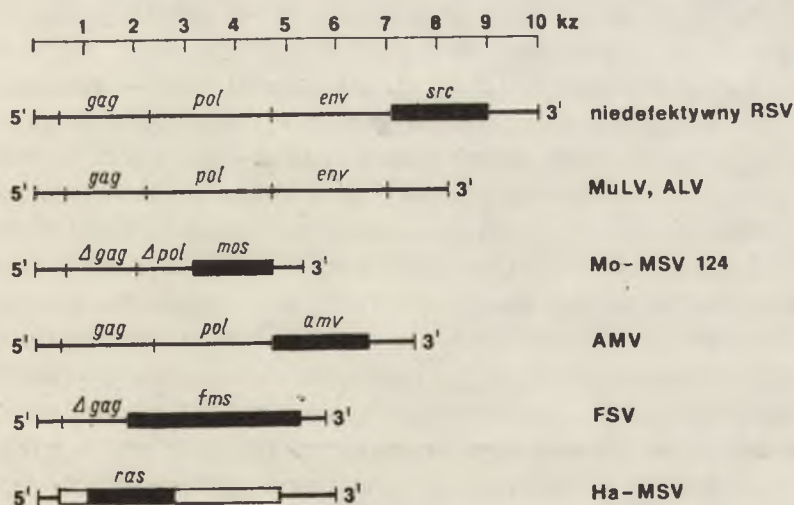
Niedefektywne replikacyjnie retrowirusy, wywołujące z reguły białaczki u gryzoni i ptaków (np. wirusy białaczek myszy — MuLV, ptaków — ALV) zawierają geny *gag*, *pol*, *env*. Kodują one odpowiednio: *gag* — strukturalne białka wnętrza wirionu, *pol* — RNA-zależną polimerazę DNA (rewertazę) i *env* — glikoproteidy otoczki wirionu. U zakażonych wirusem zwierząt, białaczki ujawniają się po dość długim okresie latencji, z reguły po paru miesiącach. Retrowirusy defektywne replikacyjnie, które do replikacji swego materiału genetycznego używają składników wirionu, wymagają współdziałania wirusów wspomagających — helperów (np. retrowirusów białaczkowych) mają w przeciwieństwie do wirusów białaczek, zdolność transformacji fibroblastów *in vitro* i wywołują u gryzoni i ptaków nowotwory typu mięsaków (rzadko raków) w parę tygodni po infekcji. W wirusach tych występują często delecje (defekty genetyczne) całości lub fragmentów genów *pol*, *env* i *gag* (np. wirusy indukujące mięsaki u myszy — Mo-MSV; Tab. 1). Wirusy indukujące mięsaki zwane również „silnie onkogennymi” — zawierają w genomie nowy gen — zwany onkogenem (*v-onc*), który prawdopodobnie został wbudowany do genomu retrowirusa w wyniku rekombinacji kompletnego wirusa białaczki z materiałem genetycznym gospodarza (3), (patrz rozdział III). Jednym kompletnym wirusem zachowującym zdolność replikacji i transformacji fibroblastów jest wirus Rousa (RSV), który oprócz genów *gag*, *pol* i *env* zawiera dodatkowy gen *v-src*, odpowiedzialny za transformację nowotworową (Ryc. 1). Defektywne replikacyjnie wirusy białaczek (DLV) wywołują ostre choroby nowotworowe układu krwiotwórczego np. typu erytroblastozy lub mieloblastozy a także mięsaki u ptaków. Wirusy DLV powstają prawdopodobnie w wyniku rekombinacji wirusa białaczki ptaków typu ALV z materiałem genetycznym gospodarza (7). Mieloblastozy wywołują wirusy AMW zawierające w genomie gen *v-myb*; mieloblastozy indukowane są przez wirusy MC29 zawierające geny *v-myc*, a erytroblastozy przez wirusy AEV zawierające geny *v-erb*.

Jak dotąd zsekwencjonowano w pełni genomy wirusa mięsaka myszy typ Moloney (Mo-MSV) i wirusa białaczki myszy typ Moloney (Mo-MuLV) oraz genom wirusa mięsaka Rousa. RNA wirusa białaczki myszy Mo-MuLV ma 8 331 nukleotydy. Koniec 5' RNA jest metylowany, podobnie jak w innych mRNA (7mGppp), a koniec 3' zawiera sekwencje poli(A). RNA wirusowy zawiera geny, w kolejności od końca 5': *gag-pol-env*. RNA wirusa mięsaka myszy (Mo-MSV) ma około 5 300 nukleotydów i różni się od RNA MuLV delecją znacznych części genów *pol* i *env*, przy jednoczesnej obecności nowych, stanowiących onkogen, sekwencji — genu *v-mos* (Tab. 1). Genom wirusa mięsaka Rousa (szczep Prague C) złożony jest z 9 312 nukleotydów (8). Geny ułożone są w kolejności 5' *gag-pol-env*-

Tabela I

Geny niektórych retrowirusów oraz kodowane przez nie białka

Gen	Produkt pierwotny	Produkt końcowy	Funkcja	Długość w nukleosomach
Wirus Rousa mięsaka ptaków (RSV), wg (8)				
<i>gag</i>	Pr76	p19, p12, p27, p15	Udział w wewnętrznej strukturze wirionu (białka rdzenia)	2102
<i>pol</i>	Pr180	p100, p70	Udział w syntezie prowirusowego DNA	2684
<i>env</i>	Pr95	gp85, gp35	Udział w powierzchniowej strukturze wirionu (otoczka wirusa), adsorpcji wirusa na komórkach	1616
<i>src</i>	p60	p60	Udział w transformacji komórek (fibroblastów)	1577
Wirus białaczek myszy, szczep Moloney, Mo-MuLV, wg (108)				
<i>gag</i>	Pr65	p15, p12, p30, p10	Podobnie jak <i>gag</i> RSV	1943
<i>pol</i>	Pr180	p80	Podobnie jak <i>pol</i> RSV	3596
<i>env</i>	Pr80	gp70, p15E	Podobnie jak <i>env</i> RSV	2000
Wirus mięsaka myszy, szczep Moloney, Mo-MSV, wg (109, 110)				
<i>gag</i>	Pr62	p15, p12, p30, p10	Podobnie jak <i>gag</i> RSV	1736
<i>pol</i> -	—	—	—	delecja około 2800
<i>env</i>	—	—	—	delecja 1985
<i>v-mos</i>		koduje białko liczące 374 aminokwasów	Transformacja komórek (fibroblastów)	1157

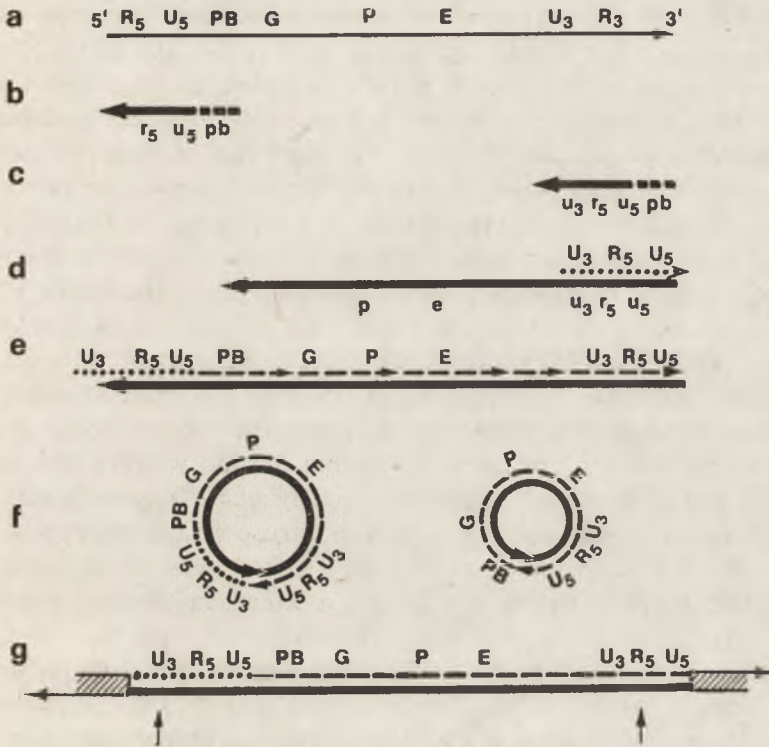


Ryc. 1. Struktura retrowirusów. Czarnymi prostokątami oznaczono fragmenty sekwencji pochodzenia komórkowego, białymi — te fragmenty wirusa, których pochodzenie jest nieustalone. Symbole Δ oznaczają delecje w poszczególnych genach.

*src-3'*. Gen *gag* kończy się kodonem *amber*. Geny *pol* i *env* nakładają się. Na końcu 3' genu *src* RSV szczepu Prague C a u końca 5' szczepu Schmidt-Rupin znajduje się sekwencja E o 153 nukleotydach stanowiąca prawdopodobnie część 250 nukleotydowych sekwencji ograniczających pierwotny gen *src*. Delecja jednej kopii sekwencji E doprowadziła do różnic w położeniu elementu E w obu szczepach wirusa.

W cyklu życiowym retrowirusów proces replikacji odgrywa szczególną rolę: po pierwsze — prowadzi do powstania infekcyjnych cząstek wirusowych, po drugie, do powstania struktur genetycznych, które mogą rekombinować oraz (lub) integrować z materiałem genetycznym gospodarza (3, 5). Wieloetapowy proces replikacji przedstawiono na Ryc. 2. Etap pierwszy obejmuje syntezę przez rewertazę krótkiego fragmentu DNA zainicjowanego przez odpowiedni tRNA (primer) w odległości około 200 nukleotydów do końca 5' RNA) jest to tzw. „*short stop cDNA*”). Wirusowa rybonukleaza H, związana z rewertazą, degraduje fragment 5' RNA związany z zsyntetyzowanym cDNA. Fragment DNA następnie zostaje przeniesiony do końca 3' RNA i przyłączony do identycznej sekwencji nukleotydowej jak w końcu 5' (sekwencja ta na Ryc. 2 nosi nazwę R). Przyłączony do końca 3' fragment DNA służy jako sekwencja inicjująca syntezę DNA przy pomocy rewertazy (jest to synteza tzw. nici minus (-). Następny etap polega na syntezie swoistego primera DNA dla syntezy nici (+), (na Ryc. 2d oznaczonej jako sekwencja  $U_3R_5U_5$ ). Nic (-) DNA, uwolniona od nici RNA przez rybonukleazę H, z przyłączonym primerem  $U_3R_5U_5$ , służy do syntezy nici (+) DNA, (Ryc. 2e). W wyniku takiej syntezy powstaje dwupasmowa liniowa cząsteczka DNA, której końce 5' i 3' są identyczne i zawierają sekwencje  $U_3R_5U_5$  (sekwencje  $U_3R_5U_5$  — zwane są także LTR — ang. „*long terminal repeat*”). Etap następny obejmuje cyklizację liniowych cząsteczek i powstanie kołowych cząsteczek DNA zawierających jedną lub dwie sekwencje  $U_3R_5U_5$  (LTR). Ostatni etap — integracji kołowych cząsteczki DNA z materiałem genetycznym gospodarza, przebiegający przy udziale hipotetycznych nukleaz i ligaz — prowadzi do powstania formy prowirusa, w której kolejność genów zostaje zachowana w podobny sposób jak w wirusowym RNA. Sekwencje prowirusa są z obu stron ograniczone sekwencjami LTR (Ryc. 2g). Analiza sekwencji nukleotydowych LTR wskazuje, że są one ograniczone krótkimi odwróconymi sekwencjami powtarzającymi się, które występują w prowirusie jak również w formie liniowej i cyklicznej DNA (9, 10). Dodatkowo sekwencje prowirusa są terminalnie ograniczone powtarzającymi się 4, 5 lub 6 parami zasad DNA gospodarza powstałymi w wyniku integracji formy cyklicznej DNA (11, 12, 13). Sekwencje LTR wraz z sekwencjami ograniczającymi jednostki LTR wskazują na podobieństwo sekwencji LTR i elementów transpozonalnych u Prokaryota (14) a cały prowirus podobny jest do elementów transpozonalnych (transpozonów) typu *copia* lub Ty1 u *Saccharomyces*

i *Drosophila* (11, 15, 16, 17, 18). Sekwencje LTR zawierają sekwencje nukleotydowe, które są transkrypcyjnymi promotorami oraz zawierają sekwencje sygnałne dla poliadenylacji wirusowych mRNA (9, 19). Rolę sekwencji promotorowych w LTR w indukcji białaczek u ptaków przedstawiono w rozdziale IV.



**Ryc. 2.** Schemat replikacji i integracji retrowirusów.

a) Mapa genetyczna wirusowego RNA (RSV). Symbole: R<sub>5</sub> i R<sub>3</sub> oznaczają sekwencje powtarzające się przy końcu 5' i 3'; U<sub>5</sub> i U<sub>3</sub> niepowtarzające się sekwencje przy końcu 5' i 3'; PB — miejsce wiązania tRNA; G, P, E, S — oznacza odpowiednio geny *gag*, *pol*, *env* i *src*.

b) Synteza DNA przy końcu 5' zainicjowana przez tRNA. Dla uproszczenia na pozostałych rysunkach podano tylko nić DNA.

c) Przeniesienie zszyntetyzowanego fragmentu DNA z końca 5' do końca 3'.

d) Synteza nici „minus” oraz krótkiego fragmentu „+” (oznaczonego kropkami) stanowiącego primer dla nici „+”.

e) Przeniesienie primera „+” na drugi koniec nici „minus”. Synteza nici „+” (linia przerywana). Odtworzenie powtarzających się końców U<sub>3</sub>R<sub>5</sub>U<sub>5</sub>.

f) Cyklizacja podwójnie pasmowego DNA zawierającego jeden lub dwa fragmenty U<sub>3</sub>R<sub>5</sub>U<sub>5</sub>.

g) Integracja cyklicznego DNA z genomem gospodarza. DNA gospodarza przedstawiono prostokątami zakreskowanymi. Strzałki wskazują przypuszczalne miejsca inicjacji i terminacji syntezy wirusowego RNA.

### III. Geny transformujące retrowirusów i ich komórkowe homologi

„Silnie” onkogenne retrowirusy mogą indukować transformację nowotworową komórek hodowanych *in vitro* a także indukować nowotwory po zakażeniu zwierzęcia. Za transformację nowotworową odpowiedzialne są białka kodowane przez onkogen wirusowy (*v-onc*, „v” od *virus*). Geny komórkowe zwane obecnie genami *c-onc* („c” od *cell*) lub onkogenami komórkowymi są naturalnymi sekwencjami z komórek prawidłowych kręgowców i cechują się wielką trwałością ewolucyjną (1). Biologiczna rola komórkowych genów *onc* nie jest w pełni wyjaśniona. W procesie embriogenezy myszy ekspresja genów *onc* ma charakterystyczny przebieg (20). Na tej podstawie sądzi się, że geny *onc* zawierają informację niezbędną dla procesów wzrostu i różnicowania. Wykazano również, że są one genetycznym, dominującym determinantem o aktywności onkogennej na co wskazuje ich zdolność przenoszenia cech nowotworowych w teście transfekcji. „Hipoteza onkogenów” przedstawiona przez Huebnera i Todaro zakładała, że onkogeny wirusowe zawierają część materiału genetycznego komórek zwierzęcych. Wykrycie onkogenu *c-src* wirusa mięsaka Rousa (RSV) zweryfikowało tę hipotezę. W komórkach prawidłowych wielu kręgowców wykryto homologiczny do genu *v-src* komórkowy gen *c-src* (w starszej nomenklaturze „*sarc*”). Obecnie nie ma wątpliwości, że genomy wielu gatunków zwierząt zawierają geny *onc* — odpowiedniki genów transformujących „silnych” onkogennych wirusów rakotwórczych. Bliskie pokrewieństwo onkogenów retrowirusów i genów wielu kręgowców nasuwa pytanie, które geny są pierwotne, a które są genami potomnymi. Obecnie przyjmuje się, że onkogeny retrowirusów wywodzą się z genów komórkowych (proto-onkogenów). Przemawiają za tym następujące argumenty, które przytaczamy za Bishopem (21). W trakcie pasażowania wirusów białaczkowych u gryzoni pojawia się szereg szczepów wirusów indukujących z kolei mięsaki, tak jakby wirusy nabrały nowych właściwości patogennych. U kręgowców większość genów komórkowych homologicznych względem genów *onc* wirusów wykazuje wysoką stabilność ewolucyjną. Onkogeny (proto-onkogeny) komórkowe wykazują stałe umiejscowienie w chromosomach danego gatunku (por. Tab. 2). Wiele onkogenów komórkowych — podobnie jak inne geny strukturalne — ma strukturę mozaikową, w której fragmenty sekwencji kodujących (eksony) są przedzielone sekwencjami niekodującymi (intronami). Proto-onkogeny komórkowe występują w różnych gatunkach reprezentujących duże obszary ewolucyjnego czasu, podczas gdy wirusowe onkogeny są ograniczone do pojedynczych szczepów retrowirusów, które izolowano z poszczególnych gatunków.

W DNA guzów uzyskanych przez indukcję retrowirusami o silnych właściwościach onkogennych (jak np. wirusy mięsaków ptaków, wirusy mięsaków myszy i szczurów) geny *v-onc* występują jako integralna część

Tabela II

Mianownictwo retrowirusów i genów *onc*\*)

Szczep wirusa	Symbol	Naturalny gospodarz	Nazwa genu <i>v-onc</i>	Produkt białkowy genu <i>onc</i>	Homolog genu <i>onc</i> u człowieka	Umiejscowienie w chromosomie Nr	Aktywność fosfokinazy białkowej
Avian reticuloendotheliosis virus-T	AEV	indyk	<i>rel</i>				
Rous sarcoma virus	RSV	kura	<i>src</i>	pp60 <sup>src</sup>			+
Avian sarcoma virus B77	B77	kura	<i>src</i>	pp60 <sup>src</sup>			+
Recovered Avian sarcoma virus	rASV	przepiórka japoń.	<i>src</i>	pp60 <sup>src</sup>			+
Prague strain Rous sarcoma virus	PR-RSV	kura	<i>src</i>	pp60 <sup>src</sup>			
Avian myeloblastosis virus BAJ-A	AMV	kura	<i>myb</i>		<i>c-myb</i>	6	
Avian myeloblastosis virus szczep E26	E26	kura	<i>myb</i>				
Avian myeloblastosis virus MC29	MC29	kura	<i>myc</i>	P110 <sup>gag-myc</sup>	<i>c-myc</i>	8	
Avian myeloblastosis virus CMII	CMII	kura	<i>myc</i>	P90 <sup>gag-myc</sup>			
Avian myeloblastosis and carcinoma virus MH2	MH2	kura	<i>myc</i>	P100 <sup>gag-myc</sup>			
Avian myeloblastosis virus OK10	OK10	kura	<i>myc</i>	P200 <sup>gag-myc</sup>			
Avian erythroblastosis virus	AEV	kura	<i>erb-A</i>	P75 <sup>gag-erbA</sup>			
Avian erythroblastosis virus	AEV	kura	<i>erb-B</i>	p45 <sup>erb-B</sup>			

Fujinami sarcoma virus	FSV	kura	<i>fps</i>	P140 <sup>gag-fps</sup>			+
PRCII sarcoma virus	PRCII	kura	<i>fps</i>	P105 <sup>gag-fps</sup>			+
PRCIV sarcoma virus	PRCIV	kura	<i>fps</i>	P170 <sup>gag-fps</sup>			+
Y73 avian sarcoma virus	Y73	kura	<i>yes</i>	P90 <sup>gag-yes</sup>			+
Esh sarcoma virus	ESV	kura	<i>yes</i>	P80 <sup>gag-yes</sup>			+
UR2 avian sarcoma virus	UR2	kura	<i>ros</i>	P68 <sup>gag-ros</sup>			+
Moloney murine sarcoma virus	Mo-MSV	mysz	<i>mos</i>			c-mos	8
Gazdar murine sarcoma virus	Gz-MSV	mysz	<i>mos</i>				
Kirsten murine sarcoma virus	Ki-MSV	szczur	<i>ras</i>	p21 <sup>ras</sup>		c-Ki-ras	11
Harvey murine sarcoma virus	Ha-MSV	szczur	<i>ras</i>	p21 <sup>ras</sup>		c-Ha-ras	
Rasheed rat sarcoma virus	Ra-RaSV	szczur	<i>ras</i>	p29 <sup>gag-ras</sup>			9
Abelson murine leukemia virus	Ab-MuLV	mysz	<i>abl</i>	P120 <sup>gag-abl</sup>		c-abl	11
BALB-murine sarcoma virus	Balb-MSV	mysz	<i>bas</i>	p21 <sup>bas</sup>		c-bas	15
Snyder-Theilen feline sarcoma virus	ST-FeSV	kot	<i>fes</i>	P85 <sup>gag-fes</sup>		c-fes	
Gardner-Arnstein feline sarcoma virus	GA-FeSV	kot	<i>fes</i>	P110 <sup>gag-fes</sup>			(+)
McDonough-Salma feline sarcoma virus	MS-FeSV	kot	<i>fms</i>	P170 <sup>gag-fms</sup>			
Simian sarcoma virus	SISV	małpa wężnista	<i>sis</i>			c-sis	22

\* Wg (107), zachowano oryginalne nazwy wirusów stosowane w j. ang. Tabelę zmodyfikowano i rozszerzono.



prowirusa. Natomiast w komórkach prawidłowych onkogeny komórkowe (*c-onc*) bytują jako własne sekwencje komórkowe nie związane z żadnymi sekwencjami wirusów (prowirusów).

Nazwy i podstawowa charakterystyka retrowirusów i onkogenów wirusowych przedstawia Tabela 2. Wszystkie wyszczególnione w Tabeli 2 geny *v-onc* mają swoje odpowiedniki komórkowe w genomie kręgowców, niektóre z nich wykryto w genomie człowieka.

Onkogeny wirusowe *v-onc* zbudowane są z jednego, nieprzerwanego traktu sekwencji kodujących i nie zawierają intronów. Organizacja strukturalna komórkowych genów *c-onc* jest odmienna od organizacji wirusowych onkogenów *v-onc*. Na ogół budowa genów *c-onc* jest analogiczna ze strukturą innych genów komórkowych kodujących polipeptydy. Dla ilustracji podajemy strukturę ludzkiego genu *c-sis* homologicznego z genem transformującym (*v-sis*) wirusa mięsaka małp (SiSV) i kilka innych przykładów.

Wirus SiSV izolowany z włókniako-mięsaka (fibrosarcoma) małpy wełnistej jest defektywnym wirusem transformującym, który w porównaniu z towarzyszącym mu wirusem mięsaka małpy (*simian sarcoma-associated virus*, SiSAV) zawiera dodatkową sekwencję długości około 1.2 kbp reprezentującą gen *v-sis*. Klony wirusa SiSV i SiSAV oraz klonowany fragment SiSV zawierający *v-sis* hybrydyzowano z fragmentami DNA z różnych ludzkich normalnych tkanek, z linii komórkowych, jak również z DNA ludzkich limfocytów białaczkowych i DNA guzów litych. Jedynie DNA z SiSV (ale nie SiSAV) lub sekwencje *v-sis* SiSV hybrydyzowały z ludzkim DNA (22). Wyniki te jednoznacznie wskazują, że ludzki DNA zawiera sekwencje homologiczne z *v-sis*, czyli zawiera komórkowy homolog (*c-sis*) transformującego genu SiSV. Analiza w mikroskopie elektronowym heterodupleksów sekwencji DNA genu *c-sis* z DNA genu *v-sis* połączona z analizą restrykcyjną wykazała, że gen *c-sis* jest genem o budowie rozproszonej (gen mozaikowy), złożonym z 5 eksonów rozrzuconych na odcinku DNA o długości około 12 kbp. Sumaryczna długość eksonów *c-sis* wynosi około 1300 pz, czyli mogłyby one kodować polipeptyd o długości około 430 aminokwasów. Nie jest wiadomym czy ludzki gen *c-sis* jest aktywny i czy ekspresji ulegają wszystkie eksony. Wstępne badania wskazują, że mRNA komplementarny z *v-sis* uzyskany z komórek transformowanych SiSV daje w układzie translacyjnym białko o m.c. około 20 000 daltonów (22) zbliżone pod względem wielkości do białek kodowanych przez inne onkogeny (21 000 daltonów).

Wirus mieloblastozy ptaków (AMV) u końca 3' swego genomu posiada gen transformujący *v-myb*, którego sekwencja nukleotydowa została poznana (23). W komórkach transformowanych AMV znajduje się mRNA homologiczny względem genu *v-myb* (24, 25), ale funkcja tego genu i jego produkt nie są jeszcze znane (26). Sekwencja nukleotydowa genu transformującego AMV (*v-myb*) i jego komórkowego homologu (*c-myb*) u kur-

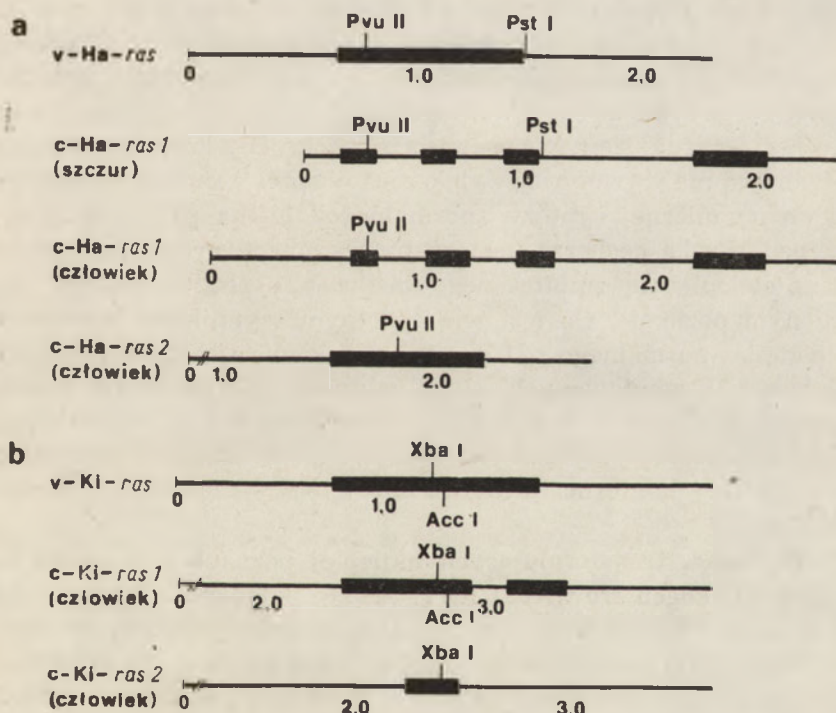
czątkę wykazują wybitną zgodność sekwencji; na długości 1197 nukleotydów występuje tylko 15 niezgodności z tym, że w genie *c-myb* sekwencje homologiczne są rozproszone i występują w postaci 7 eksonów. Przyjmując, że introny w genie *c-myb* kończą się dwunukleotydami 5' GT...AG 3' wyznaczono regiony homologii między genem *v-myb* a eksonami *c-myb*, których końce dokładnie zgadzały się z granicznymi dwunukleotydami intronów (26). Z sekwencji znalezionych w genie *c-myb* można zatem dokładnie zrekonstruować gen *v-myb*. Na obu końcach genu *v-myb* znaleziono sekwencje komplementarne względem końcowego fragmentu genu *env*, a sekwencje końca 5' genu *v-myb* były jednocześnie nakładającymi się sekwencjami końca 3' genu *pol* (przyjmując genom wirusa Rousa Prague C PR-C RSV, jako genom referencyjny). Dane te wskazują, że w badanym szczepie wirusa AMV onkogen *v-myb* powstał z sekwencji *c-myb* wtrąconych w procesie rekombinacji w sekwencje *env*, wirusa które uległy jednocześnie delecji. Proces rekombinacji stanowiący zapewne wstępny etap transdukcji prowadzący do wytworzenia genu *v-myb* jest niejasny. Przypuszcza się, że przetworzony „dojrzały” transkrypt RNA genu *c-myb* (mRNA<sup>myb</sup>) mógł służyć w tym procesie jako cząsteczka pośrednicząca. Dedukowana sekwencja aminokwasowa białek kodowanych przez *v-myb* i *c-myb* wykazuje tylko niewiele różnic w sekwencji aminokwasów.

W genomie ptaków a także w linii komórek HL-60 uzyskanej od pacjenta chorego na ostrą promielocytarną białaczkę wykryto komórkowy homolog (*c-myc*) transformującego genu *myc* wirusa mieloblastozy ptaków MC29. Gen *c-myc* jest aktywny w wielu prawidłowych proliferujących i nowotworowych komórkach ludzkich (27). Ekspresja genu *c-myc* jest szczególnie wysoka w linii komórek HL-60 ludzkiej białaczki promielocytarnej (28), co najpewniej związane jest z amplifikacją tego genu w komórkach HL-60 (29, 30).

W genomie prawidłowych komórek myszy BALB/c wykryto za pomocą analizy restrykcyjnej i metody heterodupleksów sekwencje *c-mos* homologiczne do sekwencji transformujących *v-mos* wirusa mięsaka myszy Moloneya (Mo-MSV), (31). Gen *v-mos* i jego komórkowy homolog *c-mos* zostały zsekwencjonowane (32). Gen *v-mos* koduje białko o 374 aminokwasach wykazując dużą homologię z białkiem — produktem *v-src* (pp60<sup>src</sup>) wirusa RSV (Tabela 1). Porównanie części sekwencji *v-mos* i *c-mos* wykazuje dużą homologię sekwencji: w ciągu złożonym z 500 nukleotydów u końca 5' znaleziono zaledwie 5 zmienionych zasad. Ani gen *v-mos* ani *c-mos* nie zawierają u końca 5' sekwencji typu „TATA” lub sekwencji zbliżonej. Sugeruje się, że miejscem wiążącym polimerazę RNA typu II jest sekwencja TTGTAAA poprzedzająca kodon inicjujący o około 150 nukleotydów.

Szczepy Harvey i Kirstena wirusa mięsaków myszy i szczurów zawierają onkogeny *v-Ha-ras* i *v-Ki-ras*. Poznana została struktura pierwszo-

rzędowa onkogeny *v-Ha-ras* (wg niektórych autorów *v-has*) i jego sekwencji ograniczających (33). Gen *v-Ha-ras* zawiera informację o strukturze 3 białek: p30, p29 i p21, odczytywaną w tej samej fazie z trzech oddzielnych i odpowiednio przesuniętych kodonów inicjujących. Najbardziej w lewo przesunięty kodon ATG inicjujący transkrypcję białka p30 jest poprzedzony sekwencją TATA oraz dwoma potencjalnymi promotorami polimerazy RNA typu III. W onkogenie *v-Ki-ras* (wg niektórych autorów *v-kis*) zidentyfikowano sekwencję złożoną z 567 nukleotydów kodującą białko p21 (34). Dedukowana sekwencja aminokwasowa p21<sup>kis</sup> i p21<sup>ras</sup> wykazuje znaczną homologię zwłaszcza od końca aminowego. Oba białka przejawiają krzyżową reaktywność immunologiczną. Komórkowe homologie obu tych onkogenów występują jako geny o budowie rozproszonej oraz jako geny bezintronowe (por. Ryc. 3). Produktem genów



Ryc. 3. Schemat organizacji genów *Ha-ras* (a) i *Ki-ras* (b) wirusów mięsaków myszy i szczurów oraz ich komórkowych genów homologicznych u człowieka i szczura. Zaznaczono miejsca cięć kilkoma enzymami restrykcyjnymi, które wskazują na zachowaną topografię sekwencji w genach *v-onc* i *c-onc*. Geny *c-Ha-ras2* i *c-Ki-ras2* są bezintronowymi pseudogenami. Zwraca uwagę wybitne podobieństwo organizacji genu *c-Ha-ras1* u człowieka i szczura. Fragmenty skalowane są w tysiącach par zasad. (wg (35) — uproszczone).

*c-Ha-ras* i *c-Ki-ras* zidentyfikowanym dotychczas jest tylko jeden typ białka o m.c. 21 000 (p21). W genomie człowieka występują dwa geny homologiczne względem onkogeny *v-Ha-ras*, oznaczone *c-Ha-ras1* i *c-Ha-*

*ras2* oraz dwa geny homologiczne z *v-Ki-ras* (*c-Ki-ras1* i *c-Ki-ras2*), (35). Gen *c-Ha-ras1* człowieka podobnie jak gen *c-Ha-ras1* szczura jest genem rozproszonym o 4 eksonach i 3 sekwencjach intronowych, natomiast geny *c-Ha-ras2* u obu gatunków nie posiadają sekwencji intronowych. Gen *c-Ha-ras1* jest ewolucyjnie bardziej konserwatywny niż *c-Ha-ras2*. Ludzki gen homologiczny z onkogenem wirusa Kirstena występuje również w dwóch postaciach, jako gen zawierający jeden intron (*c-Ki-ras1*) i gen bezintronowy (*c-Ki-ras2*), (35), (Ryc. 3). Sekwencje ludzkiego genu *c-fes* są rozproszone w regionie około 9.5 kbp i przedzielone trzema niehomologicznymi z *v-fes* sekwencjami (intronami), (36).

Produkt białkowy onkogenów wirusowych lub ich aktywnych homologów komórkowych uważany jest za kluczową cząsteczkę odpowiedzialną za indukcję i utrzymanie stanu transformacji nowotworowej („białka transformujące”), (por. (37)). Białka kodowane przez geny *onc* (por. Tabela 2) zostały dotąd tylko częściowo scharakteryzowane, a ich udział w procesie przekształcenia komórki prawidłowej w nowotworową jest niewyjaśniony. Na przykładzie omówionego niżej białka p21 — produktu onkogeny *c-ras* — rysuje się nawet pewien paradoks. Z jednej strony indukcję nowotworową ma wywoływać zwiększona ekspresja onkogeny *ras* prowadząca do nadmiernej syntezy „normalnego” białka p21, z drugiej, jak w przypadku raka pęcherza u ludzi, proces nowotworowy ma być wynikiem pojawienia się zmutowanego białka p21 produkowanego na nie zmienionym poziomie. Co jest więc istotnym czynnikiem transformującym: nadmiar normalnego p21 czy też pojawienie się w małych ilościach cząsteczek p21 zmutowanych? Jeśli mutacja p21 powoduje powstanie szczególnej konformacji drugo- i trzeciorzędowej białka, odpowiedzialnej za efekt transformacyjny czy jest możliwe „spontaniczne” powstanie takiej szczególnej konformacji wśród dużej liczby cząsteczek „normalnego” p21?

Wśród białek transformujących najlepiej poznane jest białko kodowane przez onkogen *src* wirusa RSV. Jest to pojedyncze białko hydrofobowe o m.c. 60 000 występujące w formie fosforylowanej (w serynie) i wykazujące aktywność fosfokinazy białkowej swoistej dla reszt tyrozyny. Oznaczone jest symbolem pp60<sup>v-src</sup>. Struktura genu *v-src* jest poznana a sekwencja i cechy białka pp60<sup>v-src</sup> dedukowane na podstawie sekwencji genu *v-src* są zbieżne z cechami izolowanego białka (38).

Białko pp60<sup>src</sup> wykryto, w ekstraktach transformowanych szczepem Schmid-Rupin RSV komórek kurcząt i chomików, jako swoisty precipitat powstający po dodaniu surowicy królików nosicieli przeszczepialnych guzów indukowanych RSV. Wykazano, że ekspresja białka pp60<sup>src</sup> zależała od temperatury w przypadku komórek kurczęcia zakażonych termowrażliwym mutantem wirusa SR-RSV.

Białko pp60<sup>r-c</sup> syntetyzowane jest na wolnych polirybosomach a następnie przemieszcza się i wiąże z błonami siateczki endoplazmatycznej.

W cytoplazmie pp60<sup>src</sup> występuje w kompleksie z dwoma białkami komórkowymi (50 kd i 89—90 kd). W stanie skompleksowanym pp60<sup>src</sup> nie wykazuje aktywności kinazy fosfoproteinowej (39, 40). Po przemieszczeniu kompleksu, na powierzchni błon ujawnia się jego aktywność kinazowa swoista dla tyrozyny a jednocześnie pojawia się fosforylacja samego pp60<sup>src</sup> w resztach tyrozyny. Białko pp60<sup>src</sup> zlokalizowano na błonach cytoplazmatycznych już uprzednio (41) i wykazano pewne różnice gatunkowe w rozmieszczeniu tego białka (42). Za kluczową, dla transformacyjnej aktywności pp60<sup>src</sup> i białek kodowanych przez inne onkogeny, uważa się właściwość fosforylacji reszt tyrozynowych białek, chociaż ani sam proces ani substraty nie są dokładnie określone. Aktywność kinazowa pp60<sup>src</sup> została jednoznacznie wykazana po wprowadzeniu plazmidu zawierającego gen *v-src* RSV do *E. coli* (43).

Białka — produkty innych onkogenów wirusowych różnią się ciężarem cząsteczkowym i część z nich wykazuje aktywność fosfokinazy białkowej swoistej wobec reszt tyrozyny. Wiele z białek *onc* jest produktem policistronowego mRNA i występuje w połączeniu z innymi białkami kodowanymi przez geny wirusa (najczęściej białko *onc* połączone jest z białkiem *gag*, por. Tabela 2). Jest to wyraz fuzji komórkowego genu *onc* z wirusowym genem *gag* u jego końca 3' w procesie rekombinacji. Poszczególne białka *onc* charakteryzują podobne właściwości uwarunkowane homologią struktury. Dla przykładu białko p90<sup>gag-yes</sup>, produkt genu *v-yes* wirusa Y73 mięsaka ptaków, wykazuje (oprócz końca N) około 82% homologii z białkiem pp60<sup>src</sup>, w niektórych jego regionach podobieństwo sekwencji dochodzi nawet do 93% (44). Tak wysoki stopień homologii p90<sup>gag-yes</sup> i pp60<sup>src</sup> wskazuje, że komórkowe odpowiedniki obu genów (*c-yes* i *c-src*) pochodzą ze wspólnej prototypowej sekwencji.

Nie wszystkie białka — produkty genów *onc* występują w cytoplazmie. Gen *v-myc* wirusa mieloblastozy ptaków MC29 jest transkrybowany łącznie z genem *gag* dając złożone białko P110<sup>gag-myc</sup>. Białko to nie ma aktywności fosfokinazowej, występuje w jądrze komórek stransformowanych i ma wybitne powinowactwo wobec DNA (45, 46).

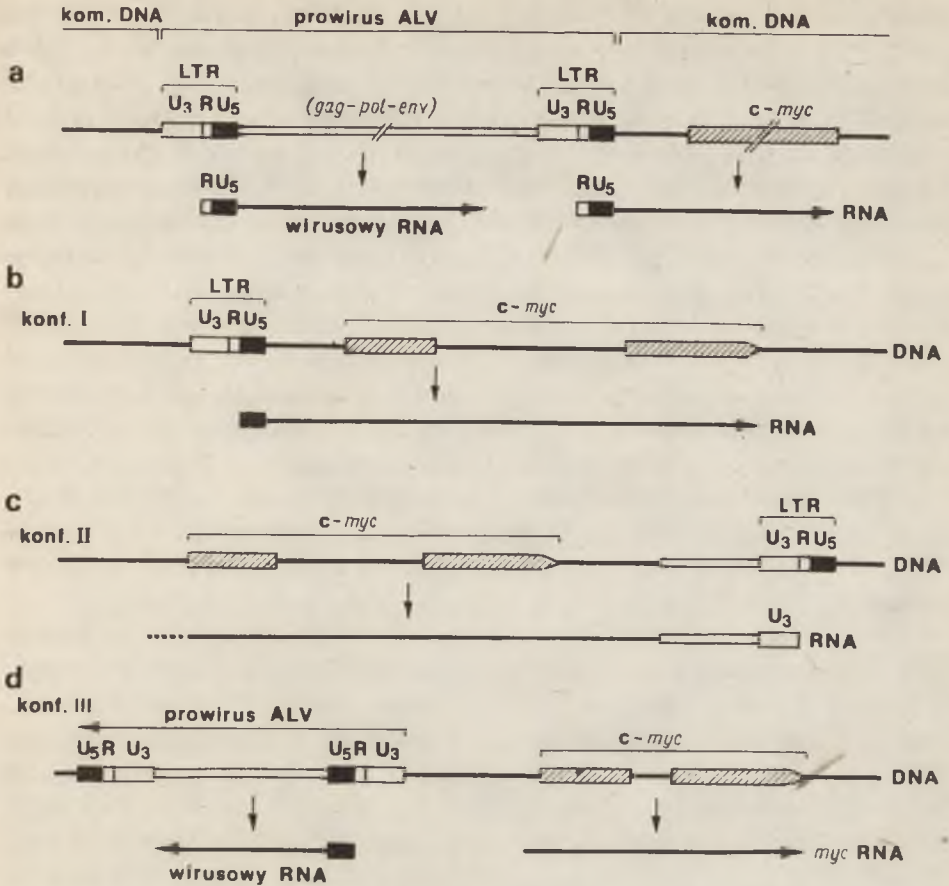
Liczne peptydowe czynniki wzrostowe (np. *epidermal growth factor* — EGF, *leukemia derived growth factor* — LDGF) mają właściwości indukowania w kulturach komórkowych zmian fenotypowych podobnych do zmian indukowanych retrowirusami: zmniejszenie adhezji komórek do podłoża, zmiany w budowie aktywniej struktury szkieletu cytoplazmatycznego, pobudzenie aktywności mitotycznej itd. Doszukiwano się relacji między białkami genu *onc* a czynnikami wzrostowymi, ale poza faktem, że niektóre peptydy wzrostowe, podobnie jak niektóre białka genu *onc* cechuje tyrozynowo-swoista aktywność fosfokinazowa i zdolność indukcji podobnych zmian w komórkach hodowanych *in vitro*, nie stwierdzono innych cech wspólnych.

#### IV. Aktywacja onkogenów komórkowych w nowotworach

Wirus leukozy ptaków (ALV) indukuje nowotwory układu limfatycznego (*lymphoma*) złożone z komórek typu B jak również, choć rzadziej, inne typy nowotworów (włókniako-mięsaki, erytoblastozy, *nefroblastoma*). Wirus ALV nie zawiera w swoim genomie onkogenu i nie wydaje się aby jakikolwiek produkt kodowany przez geny tego wirusa był odpowiedzialny za proces nowotworzenia. Guzy indukowane ALV zawierają prowirus zintegrowany w chromosomach w jednym lub więcej miejsc (*loci*). Szereg guzów indukowanych ALV zawiera nowy typ RNA złożony z sekwencji homologicznych do sekwencji U<sub>5</sub> LTR wirusa, kowalentnie związanych z sekwencjami pochodzenia komórkowego. Opierając się na tych spostrzeżeniach H a y w a r d i A s t r i n (por. (47)) postawili hipotezę, że indukcja nowotworowa po infekcji ALV polega na włączeniu do genomu komórki silnych sekwencji promotorowych przez retrowirus (hipoteza „*promoter insertion*”). Sekwencje promotorowe pochodzące z prawego LTR prowirusa zlokalizowane na lewo od końca 5' onkogenu komórkowego powodowałyby „aktywację” onkogenu.

Hipotezę insercji promotora potwierdzono w przypadku złośliwych chłoniaków (*lymphoma*) kurcząt (47, 48). W wielu guzach (w 31 na 37 chłoniaków w doświadczeniach H a y w a r d a) indukowanych przez ALV stwierdzono, że prowirus ALV włącza się w DNA w odcinek graniczący z końcem 5' genu *c-myc* i że transkrypt zawiera u końca 5' sekwencje homologiczne z sekwencją RU<sub>5</sub> prawego LTR prowirusa oraz kowalentnie związane sekwencje homologiczne względem *c-myc* (Rys. 4). W wyniku insercji promotora ilość transkryptu mRNA<sup>myc</sup> w komórce nowotworowej wzrasta 30—100 razy w porównaniu do komórki prawidłowej.

Nowotworowa transformacja indukowana mechanizmem „insercji promotora” została potwierdzona w testach transfekcji. DNA izolowany z chłoniaków indukowanych ALV zawierający provirus ALV zintegrowany w rejonie przyległym do *c-myc* dawał wysoki stopień transformacji komórek NIH 3T3, (doświadczenia Coopera i N e i m a n a, cyt. wg. (47)). LTR wirusa Mo-MuLV zrekombinowany *in vitro* z sekwencją *c-mys* indukuje transformację komórek NIH 3T3 z bardzo wysoką wydajnością (49). Około 1000-krotne zwiększenie aktywności transformującej uzyskano po transfekcji komórek fragmentem restrykcyjnym zawierającym gen *src* (wirusa mięsaka myszy, Mo-MSV) zrekombinowanym u końca 5' lub 3' z sekwencją LTR (50). Tłumaczyć to można obecnością w LTR wirusa, miejsca stanowiącego sygnał inicjacji dla polimerazy RNA typ II (51). Podobnie zwiększoną aktywność transformującą dają sekwencje *c-Ha-ras* po rekombinacji u końca 5' z sekwencją LTR (52). Inne doświadczenia również wskazują na udział LTR w ekspresji genów. Prowirusowy DNA wirusa Ab-MuLV wykazuje aktywność transformującą jedynie wówczas gdy zachowany jest 5' LTR i około 300 pz w prawo od LTR. Kłony fragmentów



Ryc. 4. Schemat umiejscowienia sekwencji prowirusa ALV w stosunku do genu *c-myc* w chłoniakach kur indukowanych wirusem ALV.

a) Schemat hipotezy „insercji promotora” (wg Haywarda i Astrin (47)).

b), c), d) Trzy konformacje prowirusa w stosunku do genu *c-myc* znalezione w DNA chłoniaków bursy Fabricjusza (wg Payne, Bishop i Varmus, (48)).

subgenomu, w których usunięto 3' LTR i około 1.3. kpz w lewo od 3' LTR były tak samo aktywne jak dzikie szczepy wirusa (53).

LTR wirusa mięsaka Rousa zrekombinowany z genem kodującym acetylotransferazy chloramifenikolowej po transfekcji (do komórek-biorców pochodzących od zwierząt różnych gatunków) wykazuje silny efekt promotorowy w komórkach biorców wyrażający się podwyższoną transkrypcją i zwiększonym poziomem swoistego RNA (54).

Molekularny mechanizm onkogenezy poprzez „insercję promotora” wydaje się być jednak bardziej złożony. Hipoteza podana przez Haywarda i Astrin choć potwierdzona doświadczalnie jest tylko szczególnym przypadkiem aktywacji onkogeny komórkowego przez LTR prowirusowego DNA. W chłoniakach (*lymphoma*) bursy Fabricjusza indukowanych u kurczątków wirusem ALV znaleziono również inne położenia sekwencji

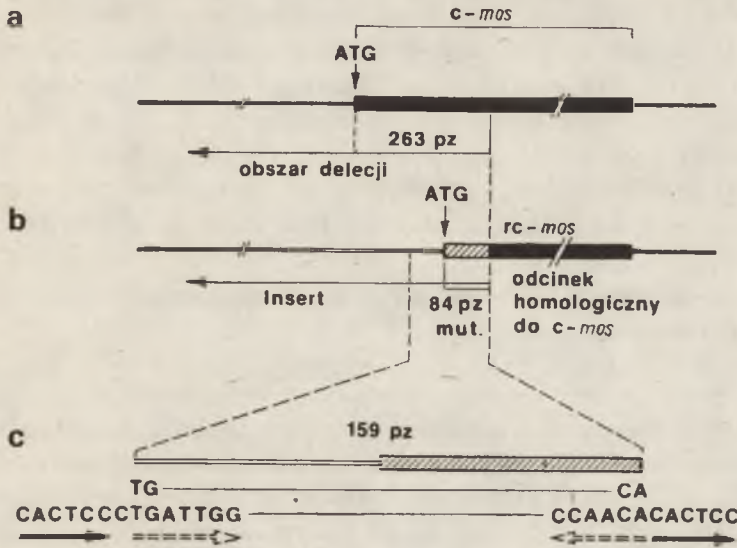
prowirusa w stosunku do genu *c-myc*. Szczegółowa analiza restrykcyjna genu *c-myc* i sekwencji ograniczających wykazała, że prowirusowy DNA może być w stosunku do *c-myc* w trzech konformacjach (48) pokazanych na Ryc. 4. Konformacja I: prowirus, a ściślej jego prawa sekwencja LTR lokalizuje się w rejonie sekwencji poprzedzających koniec 5' genu *c-myc*. Transkrypt zawiera sekwencje homologiczne z U<sub>5</sub> LTR oraz sekwencje homologiczne z *c-myc* (U<sub>5</sub>-mRNA<sup>myc</sup>). Jest to więc konformacja typu „insercja promotora”. Konformacja II: fragment prowirusa zajmuje miejsce w rejonie ograniczającym koniec 3' genu *c-myc*. Włączeniu fragmentu prowirusa towarzyszy delecja sekwencji komórkowych. Transkrypt zawiera sekwencje homologiczne do *c-myc*, część sekwencji homologicznych względem prowirusowego genu *env* i sekwencji U<sub>3</sub>, ale nie zawiera sekwencji homologicznych z U<sub>5</sub>. Ilość mRNA<sup>myc</sup> zwiększa się w komórkach zawierających prowirus w konformacji II około 20-krotnie. Konformacja III: prowirus zajmuje rejon poprzedzający gen *c-myc* ale przyjmuje odwróconą orientację. W tej konformacji sekwencje RNA pochodzące z *c-myc* i prowirusa nie są kowalentnie związane ale ilość mRNA<sup>myc</sup> wzrasta.

Aktywację genu *c-myc* można tłumaczyć włączeniem silnego promotora tylko w przypadku konformacji I. Mechanizmu aktywacji *c-myc* w przypadku konformacji II i III jednak nie znamy. Prowirus ALV (lub jego LTR) działa tu jak mutagenne sekwencje insercyjne wzmagające ekspresję genu komórkowego przypominając sytuację spostrzeganą w przypadku nomadycznych sekwencji IS2 u bakterii lub Ty1 u drożdży. Niewykluczone, że włączenie prowirusa może indukować zmiany w konformacji chromatyny w rejonie insercji, powodować przesunięcia nukleosomów, zmieniać strukturę superhelikalną chromatyny, zwiększać liczbę miejsc dostępnych dla polimerazy RNA. Następstwem tych zmian w rejonie genu *c-myc* byłaby zwiększona ekspresja genu. Indukcje tych procesów przez prowirusa można także wyjaśniać działaniem „sekwencji wzmacniających” transkrypcję (*enhancing sequences*). Klasyczne sekwencje wzmacniające wykryte w DNA wirusów grupy papova (np. wirusa SV40) składają się z sekwencji o długości 72 pz powtórzonej w orientacji „wprost” (forma tandemu); zidentyfikowano je również w LTR retrowirusów.

Jeszcze inny mechanizm aktywacji odkryto w indukowanych chemicznie nowotworowych komórkach plazmatycznych myszy. W komórkach nowotworowych szpiczaka gen *c-mos* ulega przemieszczeniu. Gen *c-mos* jest komórkowym homologiem i protoplastą genu *v-mos* wirusa mięsaka myszy Moloneya (Mo-MSV). W genomie wirusa sekwencje *v-mos* składają się z 369 kodonów połączonych w fazie u końca 5' z 5 kodonami pochodzącymi z sekwencji wirusa wspomagającego (helpera). Produktem genu *v-mos* jest białko o m.c. 37 000 kodowane przez 374 kodony odpowiedzialne za transformację nowotworową po infekcji Mo-MSV. Gen *c-mos*



jest większy niż *v-mos* i zawiera dodatkowo 21 kodonów przyległych bezpośrednio i w fazie u końca 5' do sekwencji 369-cio kodonowej. Komórkowy produkt tego genu nie jest zidentyfikowany. Rechavi i in. (55) stwierdzili, że u niektórych indukowanych chemicznie szpiczaków region DNA zawierający gen *c-mos* ulega przegrupowaniu, przy czym



Ryc. 5. Struktura genu *c-mos*.

a) Struktura w prawidłowych komórkach plazmatycznych.

b), c) Przemieszczenia sekwencji w genie *c-mos* znalezione w szpiczakach myszy (por. 55).

aktywność biologiczna *rc-mos* (*rearranged* *c-mos* = *rc-mos*) mierzona testem transfekcji wzrasta od 50—70 razy. Geny *c-mos* i *rc-mos* różnią się sekwencjami ograniczającymi u końca 5' (Ryc. 5). Przegrupowanie sekwencji w rejonie *c-mos* polega na powstaniu rozległej delecji obejmującej obszar w lewo od kodonu inicjującego *c-mos* oraz delecji na prawo od kodonu inicjującego o długości 263 pz sekwencji kodujących. W miejscu delecji podstawiony jest nowy fragment DNA mający w swej części prawej 159-cio nukleotydową sekwencję zawierającą struktury charakterystyczne dla bakteryjnych i eukariotycznych sekwencji przemieszczających (nomadycznych, transposonalnych). W obrębie tej sekwencji u obu

jej końców jest zawarta sekwencja  $\frac{\text{CCAA-CA}}{\text{GGTTAGT}}$  w konformacji „*inverted-repeat*”. Ponadto — jak podkreśla Rechavi i in. (55) fragment ten kończy się dwunukleotydem TG...CA podobnie, jak wędrujące (nomadyczne) sekwencje znalezione u Eukaryota, a koniec 3' zawiera pentanukleotydy CAACA identyczny z końcem 3' elementu *copia* u *Drosophila* i *Ty1* u drożdży oraz u końca DNA wirusa nekrotycznego śledziony. Aktywacja onkogenów w wyniku przemieszczeń sekwencji w genomie może więc być bardziej częstym zjawiskiem niż początkowo sądzono.

Jednym z mechanizmów prowadzących do zwiększonej ekspresji onkogenów jest ich amplifikacja. Amplifikacja ludzkiego onkogenu *c-myc* występuje w linii HL60 promielocytów pochodzących z ostrej białaczki promielocytarnej (29, 30). Zwiększenie liczby kopii genu *c-myc* nie było skutkiem hyperploidyacji, gdyż linia ta jest hypodiploidalna. W tej samej linii komórek nie spostrzegano multiplikacji genów *c-abl* i *c-fes* (29). Amplifikacja genów *onc* może być gatunkowo swoista. Dla przykładu u *Mus phari* znaleziono 10 kopii homologu *v-Ha-ras* podczas gdy inne gatunki myszy zawierały tylko pojedyncze kopie. Podobnie u chomika Chińskiego występuje 6 kopii *c-Ki-ras* podczas gdy u chomika Syryjskiego jest tylko pojedyncza kopia (56). Szczególny przypadek „aktywacji” przez mutację genu *c-Ha-ras1* w raku pęcherza u ludzi podaliśmy w rozdz. VI.

## V. Transformujące właściwości DNA komórek normalnych i nowotworowych

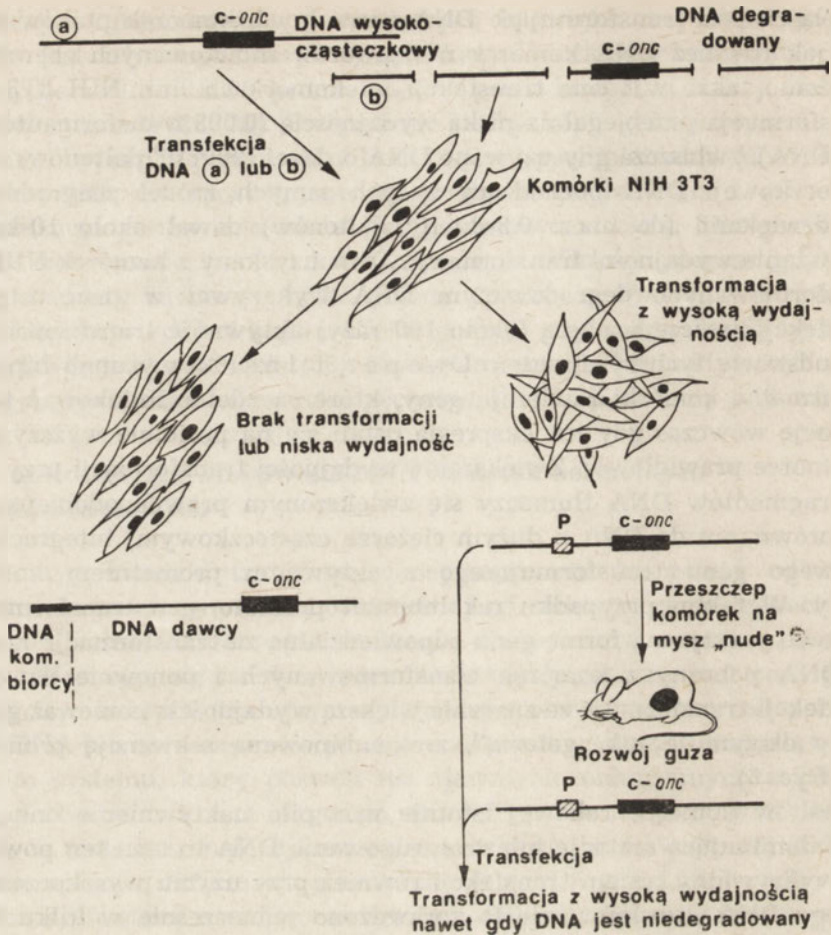
Fenotyp komórki transformowanej nowotworowo zależy od zmian w aparacie genetycznym komórki, ściślej od zmian w genie (genach) kodujących białka o kluczowym znaczeniu dla procesów wzrostu i różnicowania. Wzorując się na doświadczeniach nad przenoszeniem cech genetycznych u bakterii (transformacją) podejmowano badania nad pobieraniem DNA lub chromosomów przez komórki eukariotyczne z myślą o znalezieniu systemu, który pozwoli na ujawnienie onkogennych sekwencji DNA pochodzenia nowotworowego, (por. (57)). Nie ulega obecnie wątpliwości, że metodą transfekcji można wprowadzić do prawidłowej komórki zwierzęcej nową informację genetyczną w tym również cechy charakterystyczne dla stanu nowotworowego (por. (58, 59)). Sekwencje egzogenne DNA wprowadzone do komórek tworzą wielkie agregaty liniowe (konkatenaty), które sprzęgają się z sekwencjami genomu komórki biorcy i replikują w sposób skoordynowany z DNA gospodarza (60).

Spośród DNA 15 różnych linii nowotworowych komórek mysich i szczurzych transformowanych chemicznie, DNA z 5 linii podany komórkom-biorcom linii fibroblastów NIH 3T3 myszy indukował transformację (61). Transformację uzyskano również po podaniu izolowanych chromosomów metafazowych. Transformujący gen zachowuje swoją aktywność w następnym pasażu. Wyniki doświadczeń nad transfekcją wskazują, że w genomie komórek nowotworowych występuje gen transformujący (gen *onc*, onkogen), który wprowadzony do komórek linii NIH 3T3 zachowuje się jak gen dominujący. Weinberg (61) sądzi, że transformacja nie zależy od wprowadzenia dwóch lub więcej niesprzężonych elementów. Wynika to z porównania niskiej wydajności transfekcji i wielkiego rozcieńczenia genów w komórce. Geny transformujące komórki nowotworowe mogą być genami komórkowymi, które uległy modyfikacji pod wpływem kancerogenów i działają jako elementy transformujące.

Właściwości transformujące DNA normalnych komórek ptaków i ssaków jak również DNA komórek nowotworów indukowanych chemicznie wykazano także w teście transfekcji na komórkach linii NIH 3T3 (62). Transformacja przebiegała z niską wydajnością (0.003 transformantów na 1  $\mu\text{g}$  DNA), zwłaszcza gdy używano DNA o dużej ( $20 \times 10^6$  daltonów) masie cząsteczkowej. DNA pochodzący z tych samych źródeł zdegradowany ultradźwiękami (do m.c.z.  $0.3-3 \times 10^6$  daltonów) dawał około 10-krotne zwiększenie wydajności transformacji. DNA uzyskany z komórek NIH 3T3 transformowanych degradowanym DNA wykazywał w drugim cyklu transfekcji jeszcze większą (około 100 razy) aktywność transformacyjną. Na podstawie tych spostrzeżeń Cooper i in. (62) wysunęli hipotezę, że normalne komórki zawierają geny, które są zdolne indukować transformację wówczas gdy ich ekspresja ustali się na poziomie wyższym niż w komórce prawidłowej. Zwiększenie wydajności transformacji przy użyciu fragmentów DNA tłumaczy się zwiększonym prawdopodobieństwem (w porównaniu do DNA o dużym ciężarze cząsteczkowym) integracji donorowego genu transformującego z aktywnym promotorem komórki biorcy. W takim przypadku rekombinant promotor-gen transformujący stanowiłby aktywną formę genu odpowiedzialną za transformację komórki. DNA pobrany z komórek transformowanych i ponownie użyty do transfekcji transformuje ze znacznie większą wydajnością ponieważ genom biorcy otrzymuje już „gotową”, zrekombinowaną sekwencję promotor-gen (Ryc. 6).

Jeśli w komórce rakowej istotnie nastąpiło uaktywnienie onkogeny przez dominującą mutację lub przegrupowanie DNA to stan ten powinien być wykrywalny testem transfekcji również przy użyciu wysokocząsteczkowego DNA. Rozumowanie to sprawdzono jednocześnie w kilku laboratoriach. Wysokocząsteczkowy DNA z 26 nowotworów ludzkich lub linii ludzkich komórek rakowych testowano na komórkach NIH 3T3. Tylko dwie linie komórek raka pęcherza (EJ i J82) indukowały transformację z dużą wydajnością (63). Obie linie cechowały się odmiennym od innych linii kariotypem i morfologią kolonii oraz stopniem złośliwości (w teście na myszach nagich). Przyczyna braku aktywności transformującej pozostałych 24 guzów ludzkich nie jest jasna. Podobne wyniki otrzymała grupa Barbacida (64). Spośród wielu linii raków i mięsaków różnych narządów oraz glejaka (*glioblastoma*) u ludzi tylko jedna linia raka pęcherza, jedna raka płuc i jedna włókniako-mięsaka wykazała obecność genów o aktywności transformującej.

Dane doświadczalne wskazują, że gen transformujący jest unikalny. W DNA dwóch linii komórek raka płuc i jednej linii raka okrężnicy wykryto aktywność transformacyjną i wykazano, że geny transformujące tych nowotworów były blisko spokrewnione lub identyczne (65). W różnych liniach komórek transformowanych metylocholanem w teście transfekcji połączonym z analizą restrykcyjną liczby genów transforma-



**Ryc. 6.** Schemat transformacji fibroblastów myszy NIH 3T3 wysokocząsteczkowym (a) i degradowanym (b) DNA zawierającym gen *onc*. W dolnej części ryciny po stronie lewej: domniemana konformacja genu *onc* w komórkach nietransformowanych (brak sekwencji promotorowych w sąsiedztwie genu *onc*). Po stronie prawej: gen *onc* zrekombinowany z sekwencją promotorową P DNA dawcy lub DNA komórki-biorcy.

cyjnych określoną jako niską lub był to gen unikalny (66). Jednak w innych badaniach transformujący DNA linii raka jelita grubego i raka pęcherza u ludzi oraz promielocytarnej białaczki myszy wykazywał obecność 3 niehomologicznych genów (67).

Sekwencje transformujące DNA linii EJ raka pęcherza zawarte są w jednym ciągłym bloku DNA (68). Efekt biologiczny nie jest więc indukowany transfekcją niesprzężonych genów rozproszonych w genomie komórki rakowej. Dokładne położenie w chromosomach komórek-biorców onkogenów przeniesionych w teście transfekcji nie jest znane. Zapewne marker genetyczny wraz z DNA nośnikowym tworzą wielkie konkatenaty, które lokalizują się w różnych *loci* różnych chromosomów (69).

Logicznym etapem badań zmierzających do charakterystyki genu transformującego było sklonowanie aktywnego biologicznie genu. Pierwsze klony sekwencji transformujących z ludzkiego raka pęcherza (linia T24), uzyskały grupa Wiglera (70) oraz grupa Barbacida (64). Grupa Barbacida we współpracy z grupą Aaronsona stwierdziły, że fragment ten zawiera sekwencje homologiczne względem genu *v-bas* wirusa mięsaka myszy BALB. Nowotworową transformację metodą transfekcji indukował również normalny ludzki gen kodujący białko p21 — homolog do onkogenu *v-Ha-ras* wirusa mięsaka myszy (Harvey) po sprzężeniu z LTR retrowirusów myszy lub kota (71).

Wybitne wzmoczenie wydajności transformacji komórek NIH 3T3 DNA normalnych narządów myszy BALB spostrzeżono po uprzednim zakażeniu komórek NIH 3T3 wirusem białaczek myszy (MuLV), (72). Mechanizm tego zjawiska jest nieznan; przypuszczać można, że zakażenie wirusem indukuje destabilizację genomu.

Doświadczenia nad transformacją fibroblastów myszy linii NIH 3T3 poprzez transfekcję nasuwają szereg uwag krytycznych. Komórki NIH 3T3 pod wpływem chemicznych kancerogenów ulegają transformacji nowotworowej w reakcji mającej cechy procesu jednostopniowego, podczas gdy naturalny proces rakowacenia jest procesem wielostopniowym wymagającym przejścia komórki przez kilka kolejnych przemian. Ponadto komórki NIH 3T3 wykazują również zdolność transformacji samorzutnej, są to więc komórki tumorogenne, w których proces nowotworowy jest prawdopodobnie już daleko zaawansowany. Mogą one wykrywać tylko pewien szczególny typ potencji nowotworowej DNA, dominujący w sensie genetycznym. Ponadto podatność na transformację cechuje tylko bardzo małą, część komórek (jedna na milion). Tylko część preparatów DNA izolowanych z komórek nowotworowych wywołuje efekt transformacyjny w teście transfekcji z komórkami NIH 3T3. Tak więc zjawiska związane z transformacją nowotworową na modelu komórek NIH 3T3 nie wydają się być uniwersalnymi.

W kontekście tej dyskusji interesującym było wykazanie, że komórki zarodka chomika Chińskiego (fibroblasty linii CHEF/18), które są diploidne i nie tumorogenne, ulegały podobnie jak komórki NIH 3T3 transfekcji i transformacji nowotworowej pod wpływem DNA izolowanego z linii EJ komórek raka pęcherza ludzkiego (73). Komórki CHEF/18 wymagają wielostopniowego traktowania kancerogenem chemicznym i selekcji zanim dadzą potomne komórki nowotworowe.

## VI. Rola onkogenów komórkowych w nowotworach u ludzi

Ważne znaczenie dla zrozumienia istoty procesu nowotworowego u ludzi miało wyjaśnienie czy onkogeny „silnych” rakotwórczych retrowirusów, komórkowe onkogeny ptaków i gryzoni oraz onkogeny znajdujące

w genomie ludzkich komórek rakowych są takie same. Onkogen linii EJ raka pęcherza u ludzi (por. rozdz. V) zidentyfikowany we fragmencie restrykcyjnym metodą transfekcji w teście homologii z szeregiem sekwencji onkogenów retrowirusów (*v-abl*, *v-erb*, *v-ST-fes*, *v-myc* i *v-src*) oraz *c-Ha-ras* (szczur) dawał hybrydyzację jedynie z sekwencjami *c-Ha-ras* (74). Komórki NIH 3T3 transformowane DNA z linii EJ i linii T24 komórek raka pęcherza podejmowały syntezę nowej klasy RNA homologicznego względem sekwencji *v-Ha-ras*. Porównanie map restrykcyjnych i wielkości rejonów homologicznych w transkryptach sugeruje, że sekwencje onkogenu *v-Ha-ras* i onkogenu EJ nie mogą leżeć obok siebie w restrykcyjnym fragmencie *BamHI* DNA EJ lecz muszą nakładać się. Już te dane wskazywały na ewolucyjne współzależności i pokrewieństwo obu onkogenów. Onkogen *v-ras* (w szczepie Harvey i Kirstena) koduje białko o m.cz. 21 000 (p21). Białko o tym samym ciężarze cząsteczkowym strącalne przeciwciałem anti-p21-*ras* wykryto w komórkach NIH 3T3 — po transfekcji DNA pochodzącym z komórek EJ (74), gdzie występuje ono w tych komórkach w zwiększonej ilości (71). Wydaje się, że białko p21 kodowane przez ludzki onkogen występujący w linii komórek EJ może być czynnikiem pośredniczącym w rozwoju przynajmniej niektórych nowotworów (74). Transformujący gen izolowany z linii T24 komórek raka pęcherza u ludzi jest blisko spokrewniony z onkogenem *v-bas* retrowirusa mięsaka myszy BALB i jednocześnie z onkogenem *v-Ha-ras* (74, 75). Onkogen linii T24 zlokalizowano we fragmencie restrykcyjnym o długości 4.6 kpz. Produktem transkrypcji genu jest poliadenylowany RNA o długości 1200 nukleotydów zawierający sekwencje homologiczne do sekwencji *v-Ha-ras/v-bas*. W komórkach linii T24 znaleziono białko p23 (przypuszczalnie jest to zmutowane białko p21) o właściwościach antygenowych białka p21 kodowanych przez *v-bas* i *v-Ha-ras*. Ponieważ ludzki onkogen T24 występujący w komórkach rakowych jest nierozróżnialny (metodą heterodupleksów i analizą restrykcyjną) z sekwencjami homologicznymi w tkankach normalnych (proto-onkogenami), zatem aktywacja *in vitro* onkogeny musi polegać na subtelnym zmianach genetycznych (75a). Opisane wyżej badania grupy Weinberga i Barbacida jak również Coopera (76) doprowadziły do wniosku, że onkogeny wyizolowane z dwóch linii komórkowych T24 i EJ raka pęcherza u ludzi są identyczne, co podejrzewano już na zasadzie wyników z testu transfekcji (68) i homologiczne względem sekwencji *onc* (*v-bas*, *v-Ha-ras*) występujących w retrowirusach mięsaków myszy i szczurów (Balb-MSV i Ha-MSV) a także mają swoje odpowiedniki w DNA prawidłowych komórek łożyska i różnych narządów ludzkich (70, 74). Uzyskanie klonów onkogenów „nieaktywnych” (z prawidłowych tkanek) i onkogenów „aktywnych” (z komórek rakowych) umożliwiło wykrycie i poznanie molekularnych zmian w onkogenie towarzyszących procesowi rakowacenia u człowieka.

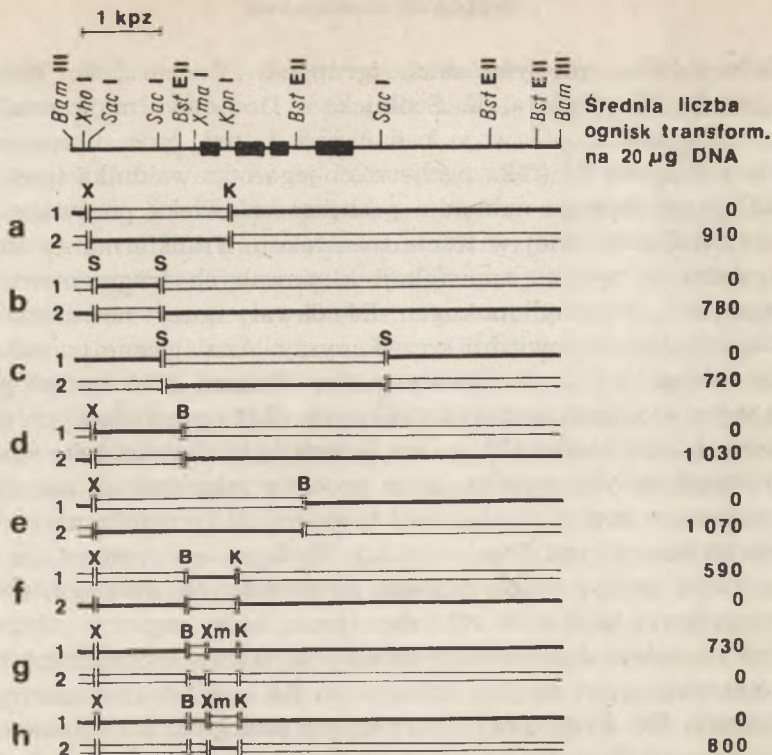
Odkrycia dokonane w tej dziedzinie równocześnie łącznym wysiłkiem

kilku laboratoriów amerykańskich (grupy G. Coopera, R. Weinberga, M. Barbacida, M. Wiglera, E. Scolnicka i D. Lowy) mają przełomowe znaczenie dla dalszego rozwoju badań nad naturą procesu rakowacenia.

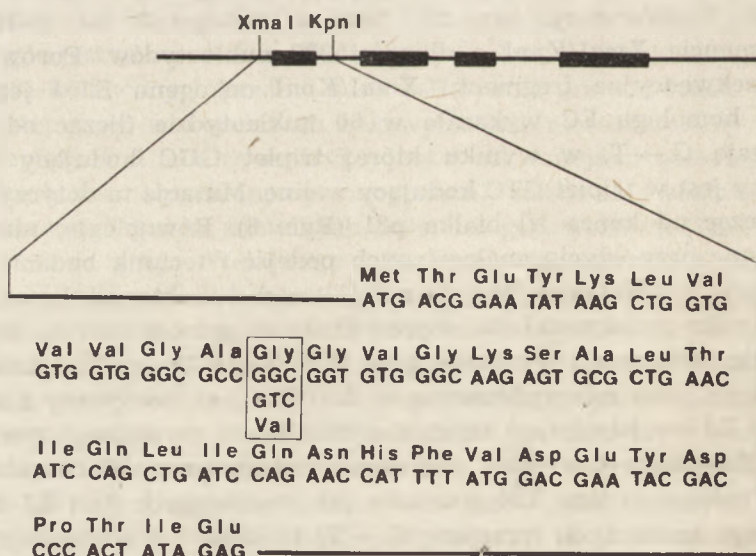
Klony onkogenu EJ (raka pęcherza) i jego odpowiednika (proto-onkogen) EC prawidłowego nabłonka pęcherza człowieka porównano co do potencji transformacyjnej w teście transfekcji. Transformanty linii NIH 3T3 uzyskane w wyniku transfekcji klonowanych fragmentem *Bam*HI zawierającym „aktywny” onkogen EJ dawały guzy nowotworowe po przeszczepieniu na odpowiedni szczep myszy. Analogiczne transformanty po proto-onkogenie EC nie dawały guzów. Poziom RNA homologicznego z sondą *v-ras* w liniach komórek rakowych (EJ) i prawidłowych (EC) był jednakowy, a ilość białka p21 w obu liniach była również taka sama (75). Z powyższych danych wynika, że w procesie rakowacenia nie jest krytyczna zmiana w regulacji ekspresji tych genów (przynajmniej w odniesieniu do badanego typu nowotworów). Wydaje się natomiast, że różnice w funkcji obu genów muszą polegać na subtelnym zmianach struktury pierwszorzędowej białka. W celu określenia, które regiony „aktywnego” onkogeny określają domniemane zmiany w białku sporządzono *in vitro* szereg rekombinantów między onkogenem EJ i jego homologicznym proto-onkogenem EC. Fragmenty restrykcyjne onkogeny EJ usuwano i podstawiano odpowiednim fragmentem proto-onkogeny i odwrotnie. Rekombinanty te testowano w teście transfekcyjnym poszukując fragmentu onkogeny EJ, który daje morfologiczną transformację linii komórkowej NIH 3T3. Wyniki takiego doświadczenia ilustruje Ryc. 7 (wg. 75a).

Z doświadczenia tego wynika jasno, że fragment odpowiedzialny za efekt transformacji zawarty jest w onkogenie EJ (*c-Ha-ras1*) we fragmencie *Xma*I/*Kpn*I o długości 350 nukleotydów. Porównawcza analiza sekwencyjna fragmentu *Xma*I/*Kpn*I onkogeny EJ i jego normalnego homologu EC wykazała w 60 nukleotydzie (licząc od *Xma*I) transwersję G → T, w wyniku której triplet GGC kodujący glicynę zmieniony jest w triplet GTC kodujący walinę. Mutacja ta dotyczy 12 kodonu (licząc od końca N) białka p21 (Ryc. 8). Równoległe, niezależne i wykonane przy użyciu analogicznych podejść i technik badania grupy Barbacida (76a) oraz Wiglera (77) nad charakterystyką onkogeny linii T24 raka pęcherza u ludzi doprowadziły do jednoznacznych wyników całkowicie zbieżnych z wynikami grup Weinberga, Scolnicka i Lowy.

Onkogen *c-bas* zidentyfikowany w linii T24 jest identyczny z onkogenem linii EJ i w istocie jest zmutowanym allelem normalnego genu ludzkiego *c-Ha-ras1* (*c-has/c-bas1*, wg nomenklatury grupy Barbacida). Mutacja w onkogenie linii T24 podobnie jak w onkogenie linii EJ dotyczy środkowego nukleotydu (przejście G → T) 12 kodonu i warunkuje zastąpienie w „aktywowanym” onkogenie T24 glicyny przez walinę (Ryc. 8). Zmutowana pozycja (GCCGTC) występuje w sześcioklebotydowej sekwencji (GCCGGC) zawierającej miejsca rozpoznawane i cięte przez trzy



**Ryc. 7.** Aktywność transformacyjna i struktura rekombinantów klonów genu *c-Ha-ras1* z linii prawidłowych komórek nabłonka pęcherza (linia podwójna) i z linii komórek raka pęcherza człowieka (linia pojedyncza). U góry: mapa restrykcyjna genu *c-Ha-ras1* człowieka. (Reprodukowano z pracy Tobin i in. (75a) za zgodą Autorów i dzięki uprzejmości wydawcy *Nature*).



**Ryc. 8.** Sekwencja pierwszego eksonu genu *c-Ha-ras1* i miejsce mutacji w genie *c-Ha-ras1* w przypadku raka pęcherza człowieka (linie komórek raka pęcherza EJ i T24).



enzymy restrykcyjne: *NaeI* (GCCGGC), *HpaII* (CCGG) i *MspI* (CCGG). Mutacja G → T wyklucza atak nukleolityczny jak to wykazano stosując *NaeI* (76a), co może mieć nawet pewne znaczenie praktyczne we wczesnej diagnostyce określonych typów raka.

Interesującym jest, że zarówno w obu ludzkich onkogenach (w linii EJ i T24) oraz w homologicznych genach transformujących retrowirusów mutacja w obrębie początkowych 37 kodonów (stanowiących w przypadku onkogenów ludzkich pierwszy ekson) dotyczy ściśle tej samej pozycji: 12 aminokwasu białka p21. Tak więc w onkogenie ludzkim w miejscu kodonu glicynowego (obecnego w *c-Ha-ras1*) występuje walinowy, w onkogenie wirusa Harvey (v-*Ha-ras*) występuje kodon argininowy, w onkogenie wirusa Kirstena (v-*Ki-ras*) w pozycji tej znaleziono serynowy. Ponieważ DNA komórek niektórych raków u człowieka zawiera gen *c-Ki-ras* (35, 78, 79) przypuszcza się, że jego aktywacja może przebiegać w sposób podobny do aktywacji onkogenu T24 (76a).

Analiza N-końcowej części białka p21 wskazuje, że białko to kodowane przez normalny ludzki gen *c-Ha-ras1* zawiera dwa regiony  $\alpha$ -heliksu zbudowane z 10 i 13 aminokwasów połączone odcinkiem zawierającym 7 reszt aminokwasowych, które umożliwiają sfałdowanie cząsteczki. Zastąpienie glicyny przez walinę w nowotworowym p21 powoduje usztywnienie i wyekspozowanie (wypchnięcie) regionu N z wnętrza cząsteczki białkowej (76). Taka zmiana konformacji cząsteczki może mieć istotne znaczenie dla reaktywności i funkcji białka p21. Dotychczas nie ma jednak jasnego obrazu w jakim stopniu w mechanizmie nowotworzenia odgrywa rolę zmiana konformacji białka p21 wynikła z mutacji 12 kodonu a w jakim ilościowe zmiany w postaci nadprodukcji p21. Niewątpliwie transformację fibroblastów NIH 3T3 można uzyskać wprowadzając rekombinant v-*Ha-ras* z sekwencjami LTR (52) a także rekombinant normalnego ludzkiego genu *c-Ha-ras1* z sygnalnymi sekwencjami promotorowymi zawartymi w LTR kociego lub mysiego retrowirusa (71). Nadprodukcję p21 kodowanego przez normalny ludzki klon genu *c-Ha-ras1* spostrzegano w jednej linii transformowanej komórek NIH 3T3 wykazującej dużą aktywność proliferacyjną (77). Zdaniem tych badaczy „potencjał transformacyjny” zmutowanego białka p21 kodowanego przez onkogen T24 jest przynajmniej 100-krotnie większy niż normalnego białka p21.

Wykrycie onkogenów w kulturach linii komórkowych guzów (głównie raków) człowieka nasuwa możliwość, że geny te mogły być aktywowane sztucznie, lub że nastąpiła kontaminacja linii komórkowych onkogenami retrowirusów w toku manipulacji laboratoryjnych. Jednakże w pobranych od pacjentów próbkach guzów litych (dwa raki jelita grubego, rak płuc, rak trzustki i mięsak wywodzący się z mięśni prądkowanych) *rhabdomyosarcoma* przechowywanych przez szereg lat w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  wykryto także geny transformujące (78). Wszystkie te guzy oraz 2 linie raka płuc, jedna linia raka jelita grubego, jedna linia raka pęcherzyka

żółciowego i jedna linia raka pęcherza moczowego, miały wspólny onkogen o sekwencji homologicznej z onkogenem *v-Ki-ras* wirusa mięsaka myszy i szczurów (szczep Kirstena). Onkogeny w tkance rakowej nie są więc artefaktami wytworzonymi w laboratorium.

Bezpośrednim dowodem aktywności genów *c-onc* w nowotworach u ludzi i w tkankach prawidłowych było wykrycie swoistych homologicznych z sekwencją *onc* transkryptów RNA i końcowych produktów białkowych. Kompletny ludzki gen *c-myc* homologiczny do *v-myc* wirusa mielocytomatozy ptaków (MC29) występuje najpewniej w jednej kopii oraz w postaci kilku spokrewnionych sekwencji, które reprezentują albo odległe lecz pokrewne geny, lub pseudogeny. Gen *c-myc* przypuszczalnie zawiera jeden intron (80). W normalnych fibroblastach ludzkich i liniach kilku nowotworów człowieka gen *c-myc* daje 2.7 kZ poliadenylowany transkrypt RNA<sub>myc</sub> (27). W niektórych liniach komórek mięsaków i raków oraz promielocytarnej białaczki HL-60 człowieka spostrzegano 5—10-krotny wzrost ilości tego swoistego RNA.

Wzrost poziomu poli(A)(+)RNA homologicznego względem sekwencji *v-myc* spostrzegano w liniach komórkowych wywodzących się z mięsaków a także w linii komórek limfoidalnych typu B (linia NC37) wywodzących się z limfoidalnych komórek zawierających wirus Epsteina-Barra (EBV). Transkrypty homologiczne względem onkogennych sekwencji *c-sis* o wielkości 4.2 kZ wykryto w 8 spośród 23 linii nowotworów ludzi. Nie ma korelacji między ilością 2.7 kZ RNA<sub>myc</sub> i 4.2 kZ RNA<sub>sis</sub> (27).

Różnice w poziomie ekspresji sekwencji *c-onc* spokrewnionych z *v-sis* i *v-myc* w różnych typach nowotworów ludzkich nie wskazują na korelację ekspresji ze szczególnym typem tkanki. Natomiast fakt, że sekwencje *c-sis* ulegają ekspresji w komórkach włókniako-mięsaka (*fibrosarcoma*), a nie wykazują takiej ekspresji w homologicznych komórkach (fibroblastach prawidłowych) wskazuje na związek ekspresji genu *onc* z procesem transformacji nowotworowej.

Ponadto w komórkach niektórych guzów ludzkich znajdują się złożone pod względem wielkości (7.0, 5.9 i 1.8 kZ) poliadenylowane transkrypty RNA spokrewnione z sekwencjami *v-bas* wirusa Balb-MSV oraz transkrypty spokrewnione z sekwencjami *v-abl* wirusa białaczki myszy Abelsona (Ab-MuLV), które występowały w większości badanych guzów (27).

W innych nowotworach u ludzi i w komórkach prawidłowych wykryto obecność genów *onc*, ale ich rola w procesie nowotworzenia nie jest jeszcze wyjaśniona. W linii białaczki ludzkiej SMS-SB pochodzącej z limfoblastów chorego na ostrą limfoblastyczną białaczkę z prekursorowych komórek B ulega ekspresji gen homologiczny z onkogenem *v-abl* wirusa Abelsona mysiej białaczki (81). DNA pochodzący z tych komórek ma właściwości transformujące ale sekwencje odpowiedzialne za transformację nie są homologiczne z genem *abl* a transformanty NIH 3T3 wytwarzają czynnik wzrostowy podobny do czynnika wzrostowego

w transformantach uzyskanych po zakażeniu wirusem Ab-MSV. Analogiczna sytuacja występuje w przypadku bursy Fabricjusza u kurcząt, gdzie ekspresja genu *c-myc* jest wybitnie zwiększona, ale transformujący gen zidentyfikowany w teście transfekcji nie jest genem *c-myc*. Przykłady powyższe wskazują na złożoność procesu transformacji nowotworowej.

W genomie ludzkim znaleziono sekwencje homologiczne względem transformującego genu *v-sis* wirusa mięsaka małp (SiSV) (22,82) oraz do genu *v-fes* wirusa mięsaka kotów — ST-FeSV (82). W liczbie jednej kopii w genomie ludzkim występuje gen *c-mos*, który jest homologiem onkogenu *v-mos* wirusa Moloneya mięsaka myszy (83). W liniach komórek raka płuc i raka jelita grubego u człowieka zidentyfikowano gen *c-Ki-ras* — homolog onkogenu *v-Ki-ras* mięsaka Kirstena szczurów (76, 79). Oba typy komórek nowotworowych wykazywały ekspresję zmienionego białka p21 co przemawia za mutacją genu *c-Ki-ras*. W klonach DNA raka płuc u ludzi wykryto sekwencje *c-fes* wspólne z sekwencjami *v-fes* wirusa mięsaka kotów, szczep Gardnera i szczep Snyder-Theilen (GA-FeSV, ST-FeSV). Jednak ludzki *c-fes* nie wykazał efektu transformującego w teście transfekcji na komórkach linii RAT-2 (36).

Liczba onkogenów ludzkich nie wydaje się być wielka. W dwu liniach komórek raka pęcherza znaleziono jednakowy onkogen (homolog genu *v-Ha-ras*), raki jelita grubego, płuc oraz trzustki i *rhabdomyosarcoma* wykazują obecność jednego onkogenu homologicznego do *v-Ki-ras*. Na podstawie analizy sekwencyjnej onkogenów retrowirusów można onkogeny komórkowe połączyć w grupy o zbliżonej homologii (cyt. wg 84). Dla przykładu: geny *c-Ha-ras* i *c-Ki-ras* i przynajmniej dwa inne onkogeny pochodzące od szczura posiadają bardzo duże podobieństwo.

Sekwencje spokrewnione z innymi (poza genami *onc*) sekwencji retrowirusów również występują w genomach licznych gatunków kręgowców, w tym także człowieka. W genomie ludzi znaleziono sekwencje pokrewne genom *gag*, *pol*, *env*, wirusa raka gruczołu mlecznego myszy (MMTV), (85). Sekwencje homologiczne względem ekotropowego wirusa białaczki myszy (MuLV) i endogennego wirusa pawiana (BaEV) znajdują się w restrykcyjnych fragmentach DNA komórek mózgowych człowieka (86).

W genomie człowieka znaleziono również sekwencje homologiczne genów *gag* p15 i *gag* p30, genu polimerazy Mo-MuLV oraz 3' LTR we względnej odległości takiej samej jak w genomie wirusa (87). Wzmiankujemy o tych odkryciach aby jedynie zwrócić uwagę na złożone zależności między genomem retrowirusów a genomem zwierząt.

## VII. Lokalizacja onkogenów w chromosomach i przegrupowania w nowotworach

Lokalizacja onkogenów w chromosomach ludzkich służy poszukiwaniu relacji między funkcją onkogenów i aberacjami chromosomalnymi, które

wykazują charakterystyczny rozkład w kariotypie niektórych nowotworów, (por. (88)). Dotychczas oznaczono umiejscowienie kilku onkogenów w chromosomach ludzi i myszy. Ogólny schemat doświadczeń polegał na selekcji linii hybrydów komórkowych (mysz-człowiek, chomik-człowiek) z zachowanymi i zidentyfikowanymi poszczególnymi chromosomami ludzkimi. Identyfikacja chromosomów ludzkich jest możliwa przy pomocy metod cytogenetycznych jak i markerów biochemicznych, (por. np. (89)). Z hybrydowych linii komórkowych z zachowanymi pojedynczymi chromosomami ludzkimi izolowano DNA, cięto enzymami restrykcyjnymi i fragmenty restrykcyjne rozdzielone elektroforetycznie, hybrydyzowano z sondami radioaktywnymi pochodzącymi z wirusowych sekwencji onkogennych (*v-*onc**) homologicznych względem sekwencji onkogennych komórkowych (*c-*onc**). Posługując się tą metodą stwierdzono, że u ludzi sekwencja onkogenna homologiczna z genem *c-fes* występuje w chromosomie 15 (90), a ludzki gen *c-myb* znajduje się w chromosomie 6 (91). Onkogen ludzki homologiczny względem wirusowego genu transformującego *v-abl* zlokalizowano w chromosomie 9 (90). Genowi transformującemu (*v-mos*) wirusa Moloneya mięsaka myszy odpowiada w genomie ludzkim homologiczna sekwencja *c-mos* w postaci pojedynczej kopii umiejscowiona w chromosomie 8 (83). W chromosomie 8 znajduje się też gen *c-myc* (cyt. wg (93)). Ludzki homolog (*c-sis*) transformującego genu (*v-sis*) małpiego wirusa mięsaka (*simian sarcoma virus*, SiSV) umiejscowiono natomiast w chromosomie 22 (89, 92).

W przypadku kilku nowotworów ludzkich stwierdzono, że onkogeny mogą ulegać swoistym translokacjom wraz z translokacjami fragmentów chromosomalnych. W ponad 90% przypadków przewlekłej białaczki mielocytarnej (*chronic myelocytic leukemia* — CML) spostrzega się przemieszczenie długiego ramienia chromosomu 22 (prążek 21q11) do długiego ramienia chromosomu 9 (co oznacza się jako translokacja 9; 22). W wyniku takiego przemieszczenia powstaje anormalny chromosom 22q<sup>-</sup> (zwany przez cytologów chromosomem Philadelphia — Ph<sup>1</sup>) oraz chromosom 9 z dodatkowym materiałem chromosomalnym (chromosom 9q<sup>+</sup>). Translokacji tej towarzyszy jednoczesna i wzajemna translokacja onkogenu *c-abl* z chromosomu 9 do chromosomu 22q<sup>-</sup> (94).

Sekwencja transformująca *v-abl* wirusa Abelsona białaczek myszy (Ab-MuLV) homologiczna z sekwencją ludzkiego *c-abl* powstała w wyniku przejęcia przez wirus Moloneya białaczki mysiej (Mo-MuLV) mysich sekwencji *c-abl* (95). Endogenna mysia sekwencja *c-abl* znajduje się w chromosomie Nr 2 (96). Sekwencje *abl* po transdukcji znalazły się w sąsiedztwie końca 3' genu *gag* wirusa Mo-MuLV. Produktem sekwencji transformujących wirusa Ab-MuLV jest białko o masie cząsteczkowej 21 000 (p21) wykazujące aktywność tyrozyno-swoistej fosfokinazy. W białku p21 fragment u końca N pochodzi z 3' końcowych sekwencji *gag* wirusa Mo-MuLV a fragment karboksylowy wywodzi się z sekwencji onkogenu

mysiego *c-abl*. W chwili obecnej nie wiadomo, czy w przewlekłej białaczce mieloblastycznej u ludzi jest zwiększona ekspresja onkogenu *c-abl*. Postulat taki jest wysuwany na zasadzie analogii ze zwiększoną ekspresją innych onkogenów w komórkach rakowych. Postuluje się (94), że uaktywienie onkogenu *c-abl* w CML następuje wskutek jego translokacji w sąsiedztwo silnych sekwencji wzmacniających (*enhancer*) lub silnego promotora innego genu znajdującego się w chromosomie 22 (mógłby to być np. promotor genu łańcucha lekkiego immunoglobuliny typu *lambda*).

Układ komórek hybrydowych (mysz-człowiek, chomik-człowiek) segregujących chromosomy ludzkie został również użyty dla lokalizacji normalnego allelu onkogenu *c-bas* (identycznego z *c-Ha-ras1*) — prekursora aktywnego onkogenu linii T24 komórek rakowych pęcherza (97). Jako „sondy” użyto restrykcyjny fragment wirusa mięsaka myszy BALB zawierający wirusowe sekwencje transformujące (*v-bas*) homologiczne względem sekwencji onkogenu *c-bas*. Sonda taka daje sygnał (hybrydyzuje) z fragmentem 20 kz uzyskanym z trawienia *EcoRI* DNA ludzkiego pochodzącego z normalnych komórek (łożysko). W przypadku DNA pochodzącego z komórek chimerycznych sonda hybrydyzowała jedynie z DNA tych linii komórkowych, które zawierały ludzki chromosom 11. Zatem normalny allel onkogenu *bas* mieści się w chromosomie 11. Dokładna pozycja onkogenu *c-bas* w chromosomie nie jest poznana, ale na podstawie położenia genów markerowych dehydrogenazy mleczanowej A (LDH-A) i esterazy A4 (EsA4) i częstej zbieżności obecności allelu *c-bas* z tymi aktywnościami oraz na podstawie występowania miejsc złamań wyklucza się umiejscowienie tego genu w dystalnej części długiego ramienia chromosomu 11. Fakt, że część chromosomu 11 ulega delecji w przypadku złośliwych guzów nerek u dzieci (guzy Wilmsa) nasuwa przypuszczenie, że normalny onkogen *c-bas* może być aktywowany w procesie przegrupowania materiału chromosomu 11.

W ludzkim chromosomie 22 w rejonie q11 znajduje się allel *c-sis* — homolog transformującego genu *v-sis* wirusa mięsaka małp *simian sarcoma virus*, SiSV, (92). Oprócz aberacji chromosomu 22 w przewlekłej białaczce mieloblastycznej spostrzeżono również przegrupowania związane z chromosomem 22 w guzie (*lymphoma*) Burkitta (translokacja 8;22) i w ostrej białaczce szpikowej (translokacja 9;22). Jednak w tych przypadkach nie ma jednoznacznego dowodu na równoczesną aktywację onkogenu *c-sis*. Tak np. w guzach i liniach komórkowych chłoniaka z komórek B lub przewlekłej białaczki szpikowej nie znaleziono transkryptów (mRNA) homologicznych względem sekwencji *c-sis* (89). Podobne ograniczenia ekspresji genu *c-sis* spostrzegano w ludzkich białaczkach (28). Tylko w jednym przypadku chłoniaka wywodzącego się z komórek T stwierdzono wzmoczoną ekspresję onkogenu *c-sis* (28, 80). Natomiast w przypadku linii chłoniaka z komórek T stwierdzono wysoki poziom RNA<sub>myb</sub> (80). W guzach ludzkich typu włókniako-mięsaka i glejaka (*glioblastoma*)

spostrzeżono wzrost ilości *c-sis* mRNA, natomiast w kulturach fibroblastów ludzkich, w nabłoniakach i czerniakach nie wykryto *c-sis* mRNA (27).

Słabo onkogenny wirus leukozy kur (*avian leukosis virus*, ALV) nie posiada sekwencji transformujących i indukuje białaczki i chłoniaki z komórek typu B po długim okresie utajenia. W DNA guzów indukowanych ALV, prowirus zintegrowany jest w pobliżu komórkowego genu *c-myc* i prawdopodobnie działa jako promotor (por. rozdz. IV). Gen *c-myc* jest homologiem genu *v-myc* silnie onkogenego retrowirusa MC29 należącego do grupy wirusów z defektywną replikacją, a indukującego nowotwory układu krwiotwórczego, raki i mięsaki.

Udział genu *c-myc* w powstawaniu nowotworów u ludzi nie jest do wiadomości, jednak spostrzeżenia nad translokacją genu *c-myc* zasługują na uwagę. W chłoniakach Burkitta i niektórych innych ludzkich nowotworach układu chłonnego wywodzących się z komórek B spostrzega się translokacje między chromosomem 8 a chromosomem 14 i rzadziej chromosomem 2 i 22 (por. 89, 101). Miejsce złamania w chromosomie 8 występuje w locus genu *c-myc*. W chromosomach 14, 2 i 22 pęknięcia występują dokładnie w miejscu gdzie znajduje się gen łańcuchów ciężkich (chromosom 14), łańcucha lekkiego *kappa* (chromosom 2) i łańcucha *lambda* (chromosom 22) immunoglobulin. Dokładne analizy cytogenetyczne wskazują że translokacje w chłoniaku Burkitta są wzajemne. Dystalna część chromosomu 14 przemieszcza się do chromosomu 8 a jednocześnie fragment sekwencji z genem *c-myc* chromosomu 8 przemieszcza się do chromosomu 14. Gen *c-myc* może więc trafić w sąsiedztwo promotorów genów kodujących immunoglobuliny lub w otoczenie aktywnej chromatyny.

Translokacje genu *c-myc* prowadzące do sprzężenia go z genami kodującymi immunoglobuliny spostrzegano także w przypadkach szpiczaków myszy — guzów nowotworowych wywodzących się z komórek plazmatycznych.

W różnych liniach szpiczaka (98, 99) stwierdzono rekombinację genu *c-myc* z genem kodującym region stały ciężkiego łańcucha immunoglobuliny ( $C_{H\alpha}$ ). Gen *c-myc* we wszystkich tych przypadkach przyjął przeciwną polarność niż gen  $C_{H\alpha}$ , a miejsce rekombinacji znajdowało się w obrębie tzw. sekwencji przełączających (sekwencji, które warunkują wtórną rekombinację ciężkich łańcuchów immunoglobuliny, w wyniku których po pierwotnej ekspresji immunoglobuliny typu IgM następuje ekspresja właściwego przeciwciała np. typu IgG, IgA itd.). Gen *c-myc* w nowej pozycji, sprzężony z  $C_{H\alpha}$  daje nowy, krótszy transkrypt RNA niż *c-myc* w położeniu normalnym. Gen *c-myc* myszy złożony jest przynajmniej z 2 eksonów. Ponieważ  $RNA_{myc}$  po rekombinacji jest krótszy o ok. 400 pz nie można wykluczyć, że istnieje jeszcze jeden ekson u końca 5', który ulega eliminacji w trakcie rekombinacji. Struktura onkogenu *c-myc* ulega zatem zmianie w trakcie rekombinacji zachodzących w szpiczakach myszy i prawdopodobnie zmiana ta jest istotna dla procesu powstawania i wzros-

tu szpiczaka. Przypomnijmy, że gen *c-myc* bierze udział w indukcji chłoniaków (lymphoma) z komórek B (47), a włączony w genom wirusa MC29 nadaje wirusowi silne onkogenne właściwości. W większości szpiczaków dostrzega się translokacje chromosomowe, głównie przeniesienie dystalnej części chromosomu Nr 15 zawierającej gen *c-myc* do chromosomu 12 (99) lub rzadziej do 6. Wiadomo, że geny łańcucha ciężkiego immunoglobulin zlokalizowane są w chromosomie 12. W procesie nowotworzenia nie można zatem wykluczyć przyczynowego związku między translokacjami chromosomalnymi a uczynieniem genu *c-myc* w wyniku rekombinacji z  $C_{H\alpha}$ . Mechanizm uczynienia *c-myc* nie jest znany. Możliwe, że  $C_{H\alpha}$  zawiera sekwencje stanowiące promotor dla *c-myc* lub też rekombinacja zmienia strukturę chromatyny udostępniając sekwencje *c-myc* do transkrypcji (98). Koncepcja o zwiększonej aktywności onkogenów wskutek translokacji chromosomalnych w procesie kancerogenezy jest rozwinięta w pracy Kleina (100), oraz przedstawiona w pracy przeglądowej (101).

Nowotworom u ludzi nie zawsze towarzyszą swoiste aberacje chromosomalne. Nie wyklucza to jednak możliwości przegrupowań i „aberracji” w strukturalnej organizacji DNA. Niektóre argumenty przemawiające za udziałem przegrupowań sekwencji w genomie w procesie kancerogenezy przedstawił Cairns (102). U *Prokaryota* a także u roślin i niższych *Eukaryota* występują sekwencje przemieszczające. Sekwencje przemieszczające biorą udział i są odpowiedzialne za głębokie i rozległe uszkodzenia i zaburzenia organizacji sekwencji DNA (delecje, translokacje, inwersje). W niektórych przypadkach sekwencje przemieszczające stanowią naturalny element mechanizmów ekspresji genów. W genomie wyższych zwierząt znajdują się sekwencje mające wielkie podobieństwo strukturalne do sekwencji przemieszczających (np. grupa sekwencji powtarzających o konformacji „direct-repeat” oraz „inverted-repeat”). Dokładniej poznane sekwencje B1 u myszy i *Alu* u człowieka są sekwencjami posiadającymi strukturalne cechy sekwencji przemieszczających. Technika hybrydyzacji segmentu DNA z regionu obejmującego sekwencje *Alu* wykryto w genomie ludzkim przegrupowania w DNA izolowanym z różnych narządów ludzi chorych na nowotwory (103). W DNA izolowanym z komórek raka przewodu pokarmowego u człowieka zauważono przegrupowanie wskazujące albo na delecję sekwencji albo na zmianę ich lokalizacji (104).

W guzach pochodzenia limfatycznego u myszy znaleziono region sekwencji LyR (*Lymphoid Rearranging DNA*), który wykazuje głębokie przegrupowania w DNA plazmocytoza typu dojrzałych komórek B. Natomiast w chłoniakach indukowanych wirusem Ab-MuLV zbudowanych z prekursorowych komórek B zmiany w regionie LyR nie występują (105). Region Lyr ulega przegrupowaniu w przypadku chłoniaków wywodzących się z komórek T. Wydaje się, że przegrupowanie w regionie LyR prowadzi albo do uruchomienia nowych promotorów, albo do modyfikacji dojrze-

wania transkryptów RNA gdyż przemieszczeniom towarzyszy zwykle pojawienie się nowych gatunków RNA.

W szpiczakach myszy a także w białaczce monocytarnej spostrzegano translokacje chromosomalne zapoczątkowane i związane z tzw. sekwencją NIARD (*non-immunoglobulin-associated rearranging DNA*). Przemieszczenia DNA związane z sekwencją NIARD spostrzegano w szpiczakach ale nie wykryto ich w normalnych limfocytach (106). Sekwencje NIARD są pierwszym zidentyfikowanym fragmentem DNA zlokalizowanym w miejscu translokacji chromosomalnych w komórce ssaków.

### VIII. Podsumowanie

W komórkach kręgowców znajdują się transformujące geny *onc* homologiczne z genami *onc* retrowirusów (onkogennych wirusów typu RNA) indukujących nowotwory. Komórkowe geny *onc* (onkogeny komórkowe) są naturalnymi genami, które biorą udział w procesie rozwoju embrionalnego i różnicowania. Ekspresja genów *onc* w genomie osobników dojrzałych jest nieznaczna. Geny *onc* włączone do retrowirusów nadają im silne właściwości rakotwórcze wynikające z umiejscowienia genu *onc* w sąsiedztwie wirusowych sekwencji promotorowych. Zakażenie hodowli komórkowych lub zwierząt takimi rekombinantami wirusów prowadzi do zwiększonej syntezy białka *onc* i ostatecznie do indukcji nowotworu. Podobnie, pobudzenie aktywności komórkowych genów *onc* (aktywacja) powoduje zwiększenie w komórce stężenia białka *onc* i może prowadzić do nowotworowej transformacji. Poznano kilka mechanizmów aktywacji onkogenów komórkowych. Aktywację może wywołać włączenie w pobliże genu *onc* sekwencji promotorowych lub „wzmacniających” (pochodzących np. z LTR prowirusów), sekwencji insercyjnych, przemieszczenie genu *onc* w sąsiedztwo silnych sekwencji promotorowych (np. sekwencji promotorowych genów immunoglobulin) w trakcie translokacji chromosomowych oraz mutacje w obrębie samego genu.

W DNA komórek nowotworowych raka pęcherza u ludzi została wykazana punktowa zmiana mutacyjna w obrębie genu *c-Ha-ras1*, która ma przyczynowy związek z powstaniem raka tego narządu. W chłoniakach Burkitta i niektórych białaczkach u ludzi komórkowe onkogeny *c-myc* i *c-abl* ulegają swoistym translokacjom co może prowadzić do wzmożonej ekspresji tych genów. W powstaniu innych nowotworów u ludzi również podejrzewa się udział genów *onc*.

Sekretarkom Zakładu Biologii Nowotworów p. Annie Jojko i p. Barbarze Kowalczyk dziękujemy za wydatną pomoc techniczną w przygotowaniu maszynopisu.



## PIŚMIENICTWO

1. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (1980), vol. 44.
2. Klein G. (red.), (1980), Viral Oncology, Raven Press, New York.
3. Stephenson J. R. (red.), (1980), Molecular Biology of RNA Tumor Viruses. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
4. Tooze J. (red.), (1973), The Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
5. Bishop J. M., (1978), *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 34—88.
6. Copeland N. G., Jenkins N. A., Cooper G. M., (1981), *Cell*, 23, 51—60.
7. Graf T., Stéhelin D., (1982), *Biochim. Biophys. Acta.* 651, 245—271.
8. Schwartz D. E., Tizard R., Gilbert W., (1983), *Cell*, 32, 853—869.
9. Dhar R., McClements N. L., Enquist L. W., Van de Woude G. F., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77, 3937—3941.
10. Shoemaker C., Goff S., Gilboa E., Paskina M., Mitra S. W., Baltimore D., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77, 3932—3936.
11. Shimotohno K., Mizutani S., Temin H. M., (1980), *Nature*, 285, 559—564.
12. Temin H. M., (1981), *Cell*, 27, 1—3.
13. Temin H. M., (1982), *Cell*, 28, 3—5.
14. Ju G., Skalka A. M., (1980), *Cell*, 22, 379—386.
15. Calos M. P., Miller J. H., (1980), *Cell*, 20, 559—595.
16. Finnegan D. J., (1981), *Nature*, 292, 800—801.
17. Shapiro J. A., Cordell J. A., (1982), *Biol. Cell.*, 43, 31—54.
18. Majors J. E., Varmus H. E., (1981), *Nature*, 289, 253—258.
19. Swanstrom R., DeLorbe W. J., Bishop J. M., Varmus H. E., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 78, 124—128.
20. Müller R., Slamon D. J., Tremblay J. M., Cline M. J., Verma I. M., (1982), *Nature*, 299, 640—644.
21. Bishop J. M., (1981), *Cell*, 23, 5—6.
22. Dalla-Favera R., Gelmann E. P., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1981), *Nature*, 292, 31—35.
23. Rushlow K. E., Lautenberger J. A., Papas T. S., Baluda M. A., Perbal B., Chirikjian J. G., Reddy E. P., (1982), *Science*, 216, 1421—1423.
24. Chen J. H., Hayward W. S., Moscovici C., (1981), *Virology*, 110, 128—136.
25. Gonda T. J., Sheiness D. K., Fanshier L., Bishop J. M., Moscovici M. B., (1981), *Cell*, 23, 279—290.
26. Klempnauer K-H., Gonda T. J., Bishop J. M., (1982), *Cell*, 31, 453—463.
27. Eva A., Robbins K. C., Andersen P. R., Srinivasan A., Tronick S. R., Reddy E. P., Ellmore N. W., Galen A. T., Lautenberger J. A., Papas T. S., Westin E. H., Wong-Staal F., Gallo R. C., Aaronson S. A., (1982), *Nature*, 295, 116—119.
28. Westin E. H., Wong-Staal F., Gelmann E. P., Dalla-Favera R., Papas T. S., Lautenberger J. A., Eva A., Reddy E. P., Tronick S. R., Aaronson S. A., Gallo R. C., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 79, 2490—2494.
29. Collins S., Groudine M., (1982), *Nature*, 298, 679—681.
30. Dalla-Favera R., Wong-Staal F., Gallo R. C., (1982), *Nature*, 299, 61—63.

31. Oskarsson M., McClements W. L., Blair D. G., Maizel J. V., Vande Woude G. F., (1980), *Science*, **207**, 1222—1224.
32. Van Beveren C., Galleshaw J. A., Jonas V., Berns A. J. M., Doolittle R. F., Donoghue D. J., Verma I. M., (1971), *Nature*, **289**, 258—262.
33. Dhar R., Ellis R. W., Shih T. Y., Oroszlan S., Shapiro B., Maizel J., Lowy D., Scolnick E., (1982), *Science*, **217**, 934—936.
34. Tsuchida N., Ryder T., Ohtsubo E., (1982), *Science*, **217**, 937—939.
35. Chang E. H., Gonda M. A., Ellis R. W., Scolnick E. M., Lowy D. R., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 4848—4852.
36. Groffen J., Heisterkamp N., Grosveld F., Van de Ven W., Stephenson J. R., (1982), *Science*, **216**, 1136—1138.
37. Hynes R. O., (1980), *Cell*, **21**, 601—602.
38. Czernilofsky A. P., Levinson A. D., Varmus H. E. Bishop J. M., Tischer E., Goodman H. M., (1980), *Nature*, **287**, 198—203.
39. Courtneidge S. A., Bishop J. M., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 7117—7121.
40. Mayer A., Dorsch-Häsler K., (1982), *Nature*, **295**, 253.
41. Krueger J. G., Wang E., Goldberg A. R., (1980), *Virology*, **101**, 25—40.
42. Krueger J. G., Wang E., Garber E. A., Goldberg A. R., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 4142—4146.
43. Gilmer T. M., Erikson R. L., (1981), *Nature*, **294**, 771—773.
44. Kitamura N., Kitamura A., Toyoshima K., Hirayama Y., Yoshida M., (1982), *Nature*, **297**, 205—208.
45. Donner P., Greiser-Wilke I., Moelling K., (1982), *Nature*, **296**, 262—266.
46. Abrams H. D., Rohrschneider L. R., Eisenman R. N., (1982), *Cell*, **29**, 427—439.
47. Hayward W. S., Neel B. G., Astrin S. M., (1981), *Nature*, **290**, 475—480.
48. Payne G. S., Bishop J. M., Varmus H. E., (1982), *Nature*, **295**, 209—214.
49. Blair D. G., Oskarsson M., Wood T. G., McClements W. L., Fischinger P. J., Vande Woude G. F., (1981), *Science*, **212**, 941—943.
50. Blair D. G., McClements W. L., Oskarsson M. K., Fischinger P. J., Vande Woude G. F., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 3504—3508.
51. Fuhrman S. A., Van Beveren C., Verma I. M., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 5411—5415.
52. Chang E. H., Ellis R. W., Scolnick E. M., Lowy D. R., (1980), *Science*, **210**, 1249—1251.
53. Srinivasan A., Dunn C. Y., Yuasa Y., Devare S. G., Reddy E. P., Aaronson S. A., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 5508—5512.
54. Gorman C. M., Merlino G. T., Willingham M. C., Pastan I., Howard B. H., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 6777—6781.
55. Rechavi G., Givol D., Canaani E., (1982), *Nature*, **300**, 607—609.
56. Chattopadhyay S. K., Chang E. H., Lander M. R., Ellis R. W., Scolnick E. M., Lowy D. R., (1982), *Nature*, **296**, 361—366.
57. Bhargava P. M., Shanmugam G., (1971), *Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, ed. Davidson J. N., Cohn W. E., vol. **11**, 103—162.
58. Weinberg R. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **651**, 25—35.
59. Cooper G. M., (1982), *Science*, **218**, 801—806.
60. Perucho M., Hanahau D., Wigler M., (1980), *Cell*, **22**, 309—317.

61. Shih C., Shilo B-Z., Goldfarb M. P., Dannenberg A., Weinberg R. A., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**, 5714—5718.
62. Cooper G. M., Okenguist S., Silverman L., (1980), *Nature*, **284**, 418—421.
63. Krontiris T. G., Cooper G. M., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 1181—1184.
64. Pulciani S., Santos E., Lauver A. V., Long L. K., Robbins K. C., Barbacid M., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 2845—2849.
65. Perucho M., Goldfarb M., Shimizu K., Lama C., Fogh J., Wigler M., (1981), *Cell*, **27**, 467—476.
66. Shilo B-Z., Weinberg R. A., (1981), *Nature*, **289**, 607—609.
67. Murray M. J., Shilo B-Z., Shih C., Cowing D., Hsu H. W., Weinberg R. A., (1981), *Cell*, **25**, 355—361.
68. Shih C., Weinberg R. A., (1982), *Cell*, **29**, 161—169.
69. Robins D. M., Ripley S., Henderson A. S., Axel R., (1981), *Cell*, **23**, 23—39.
70. Goldfarb M., Shimizu K., Perucho M., Wigler M., (1982), *Nature*, **296**, 404—409.
71. Chang E. H., Furth M. E., Scolnick E. M., Lowy D. R., (1982), *Nature*, **297**, 479—483.
72. Krump-Konvalinkova V., van den Berg K. J., (1980), *Nature*, **287**, 353—354.
73. Smith B. L., Anisowicz A., Chodosh L. A., Sager R., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 1964—1968.
74. Parada L. F., Tabin C. J., Shih C., Weinberg R. A., (1982), *Nature*, **297**, 474—478.
75. Santos E., Tronick S. R., Aaronson S. A., Pulciani S., Barbacid M., (1982), *Nature*, **298**, 343—347.
- 75a. Tabin C. J., Bradley S. M., Bargmann C. I., Weinberg R. A., Papageorge A. G., Scolnick E. M., Dhar R., Lowy D. R., Chang E. H., (1982), *Nature*, **300**, 143—149.
76. Der C. J., Krontiris T. G., Cooper G. M., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 3637—3640.
- 76a. Reddy E. P., Reynolds R. K., Santos E., Barbacid M., (1982), *Nature*, **300**, 149—152.
77. Taparowsky E., Suard Y., Fasano E., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M., (1982), *Nature*, **300**, 762—765.
78. Pulciani S., Santos E., Lauver A. V., Long L. K., Aaronson S. A., Barbacid M., (1982), *Nature*, **300**, 539—542.
79. Der C. J., Cooper G. M., (1983), *Cell*, **32**, 201—208.
80. Dalla-Favera R., Gelmann E. P., Martinotti S., Franchini G., Papas T. S., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 6497—6501.
81. Ozanne B., Wheeler T., Zack J., Smith G., Dale B., (1982), *Nature*, **299**, 744—749.
82. Wong-Staal F., Dalla-Favera R., Franchini G., Gelman E. P., Gallo R. C., (1981), *Science*, **213**, 226—228.
83. Prakash K., McBride O. W., Swan D. C., Devare S. G., Tronick S. R., Aaronson S. A., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 5210—5214.
84. Weinberg R. A., (1982), *Cell*, **30**, 3—4.
85. Callahan R., Drohan W., Tronick S., Schlom J., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 5503—5507.

86. Martin M. A., Bryan T., Rasheed S., Khan A. S., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **78**, 4892—4896.
87. Bonner T. I., O'Connell C., Cohen M., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 4709—4713.
88. Mitelman F., Levan G., (1981), *Hereditas*, **95**, 79—139.
89. Swan D. C., McBride O. W., Robbins K. C., Keitheley D. A., Reddy E. P., Aaronson S. A., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 4691—4695.
90. Heisterkamp N., Groffen J., Stephenson J. R., Spurr N. K., Goodfellow P. N., Solomon E., Carritt B., Bodmer W. F., (1982), *Nature*, **299**, 747—749.
91. Dalla-Favera R., Franchini G., Martinotti S., Wong-Stall F., Gallo R. C., Croce C. M., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 4714—4717.
92. Dalla-Favera R., Gallo R. C., Giallongo A., Croce C. M., (1982), *Science*, **218**, 686—688.
93. Marx J. L., (1982), *Science*, **218**, 983—985.
94. de Klein A., van Kessel A. G., Grosveld G., Bartram C. R., Hagemeyer A., Bootsma D., Spurr N. K., Heisterkamp N., Groffen J., Stephenson J. R., (1982), *Nature*, **300**, 765—767.
95. Goff S. P., Gilboa E., Witte O. N., Baltimore D., (1980), *Cell*, **22**, 777—785.
96. Goff S. P., D'Eustachio P., Ruddle F. H., Baltimore D., (1982), *Science*, **218**, 1317—1319.
97. McBride O. W., Swan D. C., Santos E., Barbacid M., Tronick S. R., Aaronson S. A., (1982), *Nature*, **300**, 773—774.
98. Shen-Ong G. L. C., Keath E. J., Piccoli S. P., Cole M. D., (1982), *Cell*, **31**, 443—452.
99. Crews S., Barth R., Hood L., Prehn J., Calame K., (1982), *Science*, **218**, 1319—1321.
100. Klein G., (1981), *Nature*, **294**, 313—318.
101. Klein G., (1983), *Cell*, **32**, 311—315.
102. Cairns J., (1981), *Nature*, **289**, 353—357.
103. Calabretta B., Robberson D. L., Barrera-Saldana H. A., Lambrou T. P., Saunders G. F., (1982), *Nature*, **296**, 219—225.
104. Humphries P., (1981), *Nature*, **293**, 146—148.
105. Adams J. M., Gerondakis S., Webb E., Mitchell J., Bernard O., Cory S., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 6966—6970.
106. Harris L. J., D'Eustachio P., Ruddle F. H., Marcu K. B., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 6622—6626.
107. Coffin J. M., Varmus H. E., Bishop J. M., Essex M., Hardy W. D., Martin G. S. Jr., Rosenberg N. E., Scolnick E. M., Weinberg R. A., Vogt P. K., (1981), *J. Virol.*, **40**, 953—957.
108. Schinnick T. M., Lerner R. A., Sutcliffe J. G., (1981), *Nature*, **293**, 543—548.
109. Reddy E. P., Smith M. J., Aaronson S. A., (1981), *Science*, **214**, 445—450.
110. Van Beveren C., van Straaten F., Galleshaw J. A., Verma I. M., (1981), *Cell*, **27**, 97—108.

CELINA JANION \*)

## Enzymy naprawiające modyfikowane zasady w DNA: DNA-glikozylazy, DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny

Enzymes Correcting the Modified Bases in DNA: DNA-glycosylases,  
O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA transmethylase

### Spis treści

- I. Wstęp
- II. DNA-glikozylaza uracylu
  - II-1. Naturalne inhibitory DNA-glikozylazy uracylu
  - II-2. Rola fizjologiczna DNA-glikozylazy uracylu
- III. DNA-glikozylaza hipoksantyny
- IV. DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny
- V. DNA-glikozylaza formamidopirymidyny
- VI. DNA-glikozylaza mocznika
- VII. DNA-glikozylaza dimerów pirymidyny
- VIII. DNA-glikozylaza glikolu tyminy
- IX. Adaptacja komórek do letalnych i mutagennych skutków działania czynników alkilujących
  - IX-1. DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny
  - IX-2. Kontrola genetyczna warunkująca odporność *E. coli* na działanie czynników alkilujących
- X. Uwagi końcowe

### Contents

- I. Introduction
- II. Uracil-DNA glycosylase
  - II-1. Natural inhibitors of DNA-uracil glycosylase
  - II-2. Physiological role of uracil-DNA glycosylase
- III. Hypoxanthine-DNA glycosylase
- IV. 3-methyladenine-DNA glycosylases
- V. Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
- VI. Urea-DNA glycosylase

\*) Doc. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, ul. Rakowiecka 36.

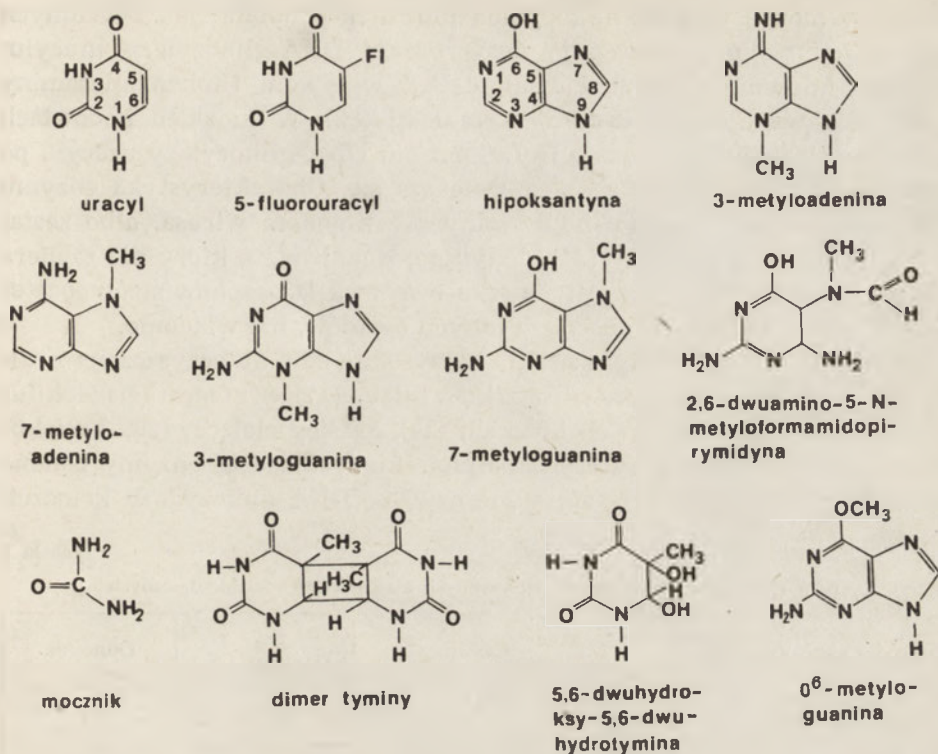
Wykaz stosowanych skrótów: MNNG — N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna; MMS — sulfotlenek metano-metylowy; EMS — sulfotlenek metano-etylowy; MNU — N-metylo-N-nitrozo-mocznik; AP — endonukleaza- endonukleaza hydrolizująca DNA w miejscach apurynowych i apirymidynowych.

**VII. Pyrimidine dimer-DNA glycosylase****VIII. Thymine glycol-DNA glycosylase****IX. Cells adaption to the lethal and mutagenic effects of alkylating agents.****IX-1. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA transmethylase****IX-2. Genetical control of *E. coli* leading to alkylating agents resistance****X. Final remarks****I. Wstęp**

Ostatnie lata przyniosły wzrastającą liczbę doniesień o występowaniu w komórkach bakteryjnych i zwierzęcych szeregu odrębnych, specyficznie działających enzymów, które inicjują proces naprawy DNA poprzez hydrolityczne odszczepienie obcych zasad, lub produktów ich degradacji (1). W miejscu odszczepienia w łańcuchach DNA pozostają pozbawione puryn lub pirymidyn reszty dezoksyrybozylowe, tak zwane miejsca apurynowe i apirymidynowe, wrażliwe na działanie alkaliów. Enzymy te ogólnie zwane DNA-glikozylazy (DNA-glycosylase, wcześniejsze nazwy: DNA-glycosydase, DNA-N-glycosylase) mogą występować w komórce konstytutywnie, ale też mogą być indukowane. Proces indukcji zauważono po raz pierwszy podczas badania wpływu niskich dawek N-metylo-N'-nitro-N-nitrosoguanidyny (MNNG) na hodowlę *E. coli* (2). Stwierdzono, że bakterie adaptowane do niskich dawek MNNG (1μg/ml) wykazują zwiększoną przeżywalność i zmniejszoną mutagenność pod wpływem ponownych, wysokich dawek MNNG (100μg/ml). Podobne działanie wykazują i inne czynniki alkilujące jak MMS, EMS, czy MNU (3). Proces ten został nazwany odpowiedzią adaptacyjną komórki (the adaptive response). Obecnie wiemy, że w czasie adaptacji zachodzi indukcja DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II usuwającej alkilowane zasady, oraz enzymu o niezwykle ciekawym działaniu, DNA-transmetylasy O<sup>6</sup>-metyloguaniny (4—7). DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-guaniny przenosi grupę metylową z reszt O<sup>6</sup>-metyloguaniny znajdujących się w DNA na resztę cysteiny własnego białka. Następuje regeneracja guaniny, a enzym zostaje inaktywowany (6, 7).

Zarówno szerokie rozpowszechnienie, jak i zróżnicowana specyficzność DNA-glikozylaz, nasuwa przypuszczenie, że hydrolityczne odszczepienie zasad, stanowi główną drogę naprawy modyfikowanego DNA. Dalsze etapy naprawy obejmują: rozpad szkieletu cukrowo-fosforanowego w miejscu apurynowym/apirymidynowym (AP-endonukleaza), wycięcie i resyntezę kawałka DNA (DNA-polimeraza), oraz integrację z pozostałą częścią DNA (ligaza), (8, 9). Wzory strukturalne zasad lub produktów ich degradacji które są usuwane z DNA pod wpływem działania DNA-glikozylaz, oraz O<sup>6</sup>-metyloguaniny która w DNA ulega demetylacji podane są na Ryc. 1.

Doniesienia o enzymach typu insertaz, które włączają puryny w miejsca apurynowe DNA (10—12), spotkały się z ostrą krytyką (1, 13, 14) i nie będą obecnie dyskutowane.



**Ryc. 1.** Zasady lub produkty rozpadu zasad, które są usuwane pod wpływem działania DNA-glikozylaz. Ostatni wzór przedstawia 0<sup>6</sup>-metyloguaninę, która gdy występuje w DNA jest substratem dla DNA-transmetylasy 0<sup>6</sup>-metyloguaniny.

## II. DNA-glikozylaza uracylu

DNA-glikozylaza uracylu była pierwszą glikozylazą, której mechanizm działania został dobrze poznany i jest najbardziej intensywnie badanym przedstawicielem całej grupy DNA-glikozylaz. Niewątpliwie przyczyniły się do tego wysoki poziom aktywności występującej w komórkach, jak i szerokie rozpowszechnienie tego enzymu. W ekstraktach *E. coli* poziom DNA-glikozylazy uracylu jest około 1000-razy wyższy od poziomu DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny I, która zajmuje następane miejsce w wydajności usuwania obcych zasad z DNA (4).

Po raz pierwszy wykryta w *E. coli* (15) została znaleziona i w innych rodzajach bakterii, jak *B. subtilis* (16), *M. luteus* (17, 18), w bakterii termofilnej *B. stearothermophilus* (19). Wykryto ją w wielu hodowlach kultur komórkowych ludzkich, normalnych i rakowych (20—26), w drożdżach (27) i kulturach komórek marchwi (28). Występuje w grasicy cielęcej (29, 30) i w różnych tkankach szczura (31). Poziom aktywności enzymu jest wyższy w tkankach szybko dzielących się: najwyższy jest w grasicy, naj-

niższy w mózgu (32). W limfocytach ludzkich, podobnie jak i w innych komórkach ssaków, występują dwa rodzaje DNA-glikozylazy uracylu: jądrowa (główna) i mitochondrialna. Pod wpływem fitohemaglutaminy tylko jądrowa ulega 10-krotnej stymulacji (33). W ludzkich hodowlach tkankowych (komórki rakowe HeLa) poziom DNA-glikozylazy uracylu po infekcji wirusem *herpes simplex* zwiększa się. Charakterystyka enzymu wskazuje, że jest on albo indukowany przez genom wirusa, albo został przez niego modyfikowany (34). Jedynym organizmem, który nie zawiera DNA-glikozylazy uracylu jest muszka owocowa *Drosophila melanogaster* (35). Czy enzym ten jest obecny u innych owadów, nie wiadomo.

DNA-glikozylaza uracylu została w wysokim stopniu oczyszczona z kilku źródeł: *E. coli* (36), *B. subtilis* (37), *M. luteus* (17), *B. stearothermophilus* (19), komórek białaczkowych ludzkich (24), grasicy cielęcej (29, 30) i komórek marchwi (27). Niektóre dane charakteryzujące te enzymy podane są w Tabeli 1. Ogólnie można stwierdzić, że DNA-glikozylazy komórek

Tabela 1

Charakterystyka DNA-glikozylaz uracylu izolowanych z różnych źródeł biologicznych

Źródło enzymu	Stopień oczyszczenia (krotność)	Ciężar cząst.	$K_m$ (M)	Oдноśnik
<i>E. coli</i>	11 000	24 500	$4 \times 10^{-8}$	36
<i>B. subtilis</i>	1 000	24 000	$1.1 \times 10^{-9*}$	37
<i>M. luteus</i>	3 000	19 400	$7 \times 10^{-8}$	17
<i>B. stearothermophilus</i>	5 300	30 000	$4 \times 10^{-5}$	19
Myeloblasty białaczkowe	1 000	30 000	$8 \times 10^{-7}$	24
Grasica cielęca	457	28 300	$5 \times 10^{-6}$	30
Hodowla komórek marchwi	100	29 500	$3.3 \times 10^{-6}$	28

\* Tylko w tym przypadku substratem był jednoniciowy polimer kwasu dezoksyrybourydylowego; w pozostałych przypadkach substratem był zawierający reszty uracylu dwuniciowy DNA.

bakteryjnych (z wyjątkiem *B. stearothermophilus*) mają większe powinowactwo do reszt uracylowych w DNA, niż DNA-glikozylazy komórek eukariotycznych.

DNA-glikozylazy uracylu, podobnie jak wszystkie pozostałe, nie wymagają żadnych kofaktorów reakcji. Mogą być badane w ekstraktach nieoczyszczonych w obecności wersenianu sodu, który hamuje działanie nukleaz. Wysokie stężenie soli (NaCl, KCl) powoduje hamowanie reakcji (19, 24, 29, 33, 36), choć w niektórych przypadkach może mieć efekt stymulujący (34, 37).

DNA-glikozylazy uracylu odszczepiają hydrolitycznie uracyl tylko z polimerów dezoksyrybonukleinowych. Z dwuniciowego DNA uracyl usuwany jest zarówno z reszt komplementarnych A:U, jak i niekomplemen-



tarnych G:U (36, 37). Substratami dla tego rodzaju badań są DNA izolowane z faga PBS1, który zamiast tyminy zawiera uracyl, syntetyczne polidezoksynukleotydy, lub DNA grasicowe w których reszty cytozyny zostały chemicznie przekształcone w reszty uracylu.

Najkrótszymi substratami z których uracyl jest wycinany są tetramery składające się z czterech reszt dezoksyrybonukleotydowych (37). Z hybrydowego DNA·RNA, DNA-glikozylaza uracylu usuwa uracyl wyłącznie z nici DNA (30). Obecność rybozydów w DNA hamuje aktywność enzymu (26). W odróżnieniu od pozostałych DNA-glikozylaz które usuwają obce zasady prawie wyłącznie z dwuniciowego DNA, niektóre DNA-glikozylazy uracylu mają 2, 3-krotnie wyższe powinowactwo do DNA jednoniciowego, niż do dwuniciowego. Są to enzymy występujące w *E. coli*, *B. subtilis*, *M. luteus* i komórkach białaczkowych. Żadna z zasad naturalnych: adenina, guanina, cytozyna, tymina (15, 37), 5-hydroksymetylouracyl (16), jak też 5-bromouracyl (16, 36) dimery uracylu czy tyminy (36, 37, 39, 40) nie są usuwane przez ten enzym. Jedynie 5-fluorouracyl może być usuwany z DNA, ale z szybkością znacznie mniejszą niż uracyl (41, 42).

Aktywność enzymu silnie hamuje dodanie wolnego uracylu, a wartość  $K_i$  wynosi około  $10^{-4}$  M (36, 38). Sposób hamowania jest niekompetytywny, co nasuwało przypuszczenie, że enzym działa w sposób procesywny (*processive enzyme*) i odpada od DNA po całkowitym usunięciu reszt uracylowych. Doświadczenie z użyciem dwóch różnie znakowanych substratów [ $^3\text{H}$ ]-U-DNA i [ $^{14}\text{C}$ ]-U-DNA podawanych z opóźnieniem w czasie reakcji, świadczy że tak nie jest. Suma uwolnionego uracylu znakowanego [ $^3\text{H}$ ] i [ $^{14}\text{C}$ ] równa się ilości uwolnionego uracylu gdy enzym działał tylko na jeden z substratów. Nie było preferencji w uwalnianiu uracylu z preparatu DNA podanego wcześniej (38).

Poza uracylem znaczny wpływ hamujący na reakcję wywierają i inne zasady jak np: 5-azauracyl, 6-aminouracyl (26), dimery uracylu, 5-bromo-6-hydroksy-5,6-dwuhydrouuracyl (38). Natomiast 5-fluorouracyl i 5-bromouracyl są bardzo słabymi inhibitorami DNA-glikozylazy uracylu (19, 26, 38). Tak więc hamowanie reakcji przez dany związek nie zawsze świadczy, że może on być końcowym produktem reakcji.

## II-1. Naturalne inhibitory DNA-glikozylazy uracylu

Dotychczas znamy dwa naturalne inhibitory, które hamują aktywność DNA-glikozylazy uracylu. Obydwa zostały wykryte w ekstraktach bakteryjnych zakazonych fagami: w *B. subtilis*, po infekcji fagami PBS1 (16, 48—50), oraz w *E. coli*, po infekcji fagami T5 (51). Fag PBS1 i jego nieli-zogenny mutant PBS2 są jedynymi organizmami które zawierają uracyl w DNA zamiast tyminy. Indukcja inhibitora umożliwia więc wzrost fagów w bakterii. Natomiast w DNA faga T5 występuje normalnie tymina i rola inhibitora nie jest całkowicie jasna.

Obydwa inhibitory są substancjami białkowymi i pojawiają się bardzo wcześniej po infekcji: inhibitor *B. subtilis* w 2-giej minucie (50), a *E. coli* po wprowadzeniu 8% fagowego DNA (51). Inhibitor *B. subtilis* (c.cz. 12 000) jest białkiem ciepłotrwałym. Ogrzewanie 5 minut w 100°C nie powoduje strat aktywności. Zbyt intensywne oczyszczanie powoduje utratę trwałości termicznej i inhibitor szybko traci aktywność nawet w temperaturze pokojowej (50). Inhibitor *E. coli* jest białkiem ciepłochwiejnym. C.cz. szacowany jest na 10 do 15 000 (51). Badania z inhibitorem DNA-glikozylazy uracylu oczyszczonym z *B. subtilis* wykazują, że jest on gatunkowo niespecyficzny. W równym stopniu powoduje inhibicję DNA-glikozylazy uracylu *B. subtilis*, jak i *E. coli*, komórek ludzkich, czy drożdży. Natomiast nie ma wpływu na DNA glikozylazy usuwające hipokstantynę czy 3-metyloadeninę z DNA (52).

## II-2. Rola fizjologiczna DNA-glikozylazy uracylu

Uracyl może powstawać w DNA w wyniku spontanicznej lub indukowanej (kwas azotowy, siarczyny, promieniowanie UV) dezaminacji reszt cytozynowych (43). Taka reakcja może powodować mutacje. Rolą fizjologiczną DNA-glikozylazy uracylu jest więc ochrona przed mutacjami. Mutanty bakteryjne *B. subtilis urg* (44), oraz *E. coli ung* (45) u których na skutek uszkodzenia genu struktury aktywność DNA-glikozylazy uracylu nie występuje, wykazują istotnie podwyższoną zdolność do mutacji spontanicznych. Zgodnie z przypuszczeniami są to mutacje typu tranzycji par zasad GC → AT (46).

O znaczeniu DNA-glikozylaz przy zapobieganiu mutacji, świadczą również badania nad częstością i rozmieszczeniem (spectrum) mutacji amber i ochre w genie represora operonu laktozy *lacI* (47). Stwierdzono, że znaczne zagęszczenie mutacji spontanicznych GC → AT zbiega się z miejscem występowania w DNA reszt 5-metylocytozyny. W tym przypadku dezaminacja prowadzi do powstawania tyminy, zasady naturalnej, która nie jest substratem dla jakiegokolwiek ze znanych DNA-glikozylaz.

## III. DNA-glikozylaza hipoksantyny

Hipoksantyna jest produktem dezaminacji adeniny. W DNA może znajdować się w wyniku dezaminacji reszt adeniny, lub inkorporacji pochodnych hipoksantyny. DNA-glikozylazę specyficznie usuwającą reszty hipoksantyny z DNA wykryto w ekstraktach *E. coli*, grasicy cielęcej i fibroblastów ludzkich (53, 54). Enzym oczyszczony z *E. coli* i grasicy cielęcej ma podobny ciężar cząsteczkowy około 30 000 i usuwa reszty hipoksantyny z komplementarnych (HX:C) jak i niekomplementarnych (HX:T) par zasad w DNA. Nie uwalnia ksantyny, oraz żadnej z metylo-

wanych ani naturalnych puryn. Wykazuje 10—15-krotnie wyższe powinowactwo w stosunku do dwuniciowego DNA niż do jednoniciowego. Podobnie jak pozostałe DNA-glikozylazy nie wymaga jonów dwuwartościowych do reakcji. Enzym nie jest inhibowany przez końcowy produkt reakcji, hipoksantynę w stężeniu 1—3 mM, natomiast ulega inhibicji przez natywny DNA.

#### IV. DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny

Należą do grupy enzymów usuwających z DNA metylowane zasady, lub produkty ich degradacji. Szereg czynników alkilujących jak: MMS, EMS, MNNG, czy MNU, alkilują z różną szybkością zasady w DNA, a głównymi produktami reakcji są reszty N<sup>7</sup>-alkiloguaniny (tolerowane), 3-alkiloguaniny (letalne) i O<sup>6</sup>-alkiloguaniny (mutagenne). Ostatnio stwierdzono, że S-adenozylometionina, główny donator grup metylowych w reakcjach biologicznych, może działać jako czynnik metylujący w reakcji nieenzymatycznej. Wśród produktów reakcji nieenzymatycznej wykryto w DNA reszty 7-metyloguaniny i 3-metyloadeniny (55, 56). To odkrycie tłumaczy przyczynę szerokiego rozpowszechnienia w organizmach żywych różnorodnych enzymów usuwających z DNA szkodliwe produkty alkilacji.

Pierwszymi którzy zauważyli, że 3-metyloadenina jest enzymatycznie usuwana z alkilowanego DNA w postaci wolnej zasady byli Kirtikar i Goldthwait (57). Jednak sądzili oni mylnie, że jest to reakcja katalizowana przez endonukleazę II (obecna nazwa: endonukleaza VI, lub egzonukleaza III) *E. coli*. Lindahl wykazał, że te dwie aktywności w różny sposób ulegają inaktywacji cieplnej (58), a Lavall z ekstraktów *M. luteus*, rozdzielił DNA-glikozylazę od endonukleazy i wykazał, że najpierw zachodzi odczepienie 3-metyloadeniny a potem rozpad w miejscu apurynowym (59).

Aktywność DNA-glikozylazy usuwającej reszty 3-metyloadeniny została znaleziona w wielu bakteriach (57—61), tkankach zwierzęcych (32, 62—65) i ludzkich (22, 66, 67). Nieoczekiwanie stwierdzono, że w *E. coli* występują dwa enzymy które usuwają reszty 3-metyloadeniny z DNA, a które obecnie są rozróżniane jako DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny I i II. Odkrycie drugiego enzymu stało się możliwe dzięki izolacji mutantów *E. coli tag*, o znacznie zredukowanej aktywności DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny (68). Resztkowa aktywność wskazywała na istnienie odrębnego enzymu o innych cechach biochemicznych. Obecnie obydwa enzymy zostały wyizolowane, a ich odrębność nie budzi wątpliwości.

DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny I (c.c. 20 000) stanowi 95% aktywności enzymatycznej *E. coli* służącej do usuwania reszt 3-metyloadeniny z DNA. Specyficznie usuwa reszty 3-metylo, lub 3-etyloadeniny z DNA. Stała K<sub>m</sub> dla reszt 3-metyloadeniny w DNA wynosi  $1.2 \times 10^{-8}$  M. DNA-gli-

kozylaza 3-metyloadeniny I w sposób niekompetywny ulega inhibicji przez 3-metyloadeninę ( $K_i = 1.6 \text{ mM}$ ) i łatwiej niż DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny II ulega termicznej inaktywacji (60, 68).

DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny II (c.c. 27 000) stanowi pozostałe 5% aktywności i jest mało specyficzna. Obok 3-metyloadeniny, w mniejszym stopniu uwalnia 7-metyloguaninę, 3-metyloguaninę, 7-metyloadeninę, jak również pochodne etylowe tych zasad. Ma podobne powinowactwo do reszt 3-metyloadeniny jak DNA-glikozylaza I ( $K_m = 9.2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ), ale nie ulega inhibicji przez wolną 3-metyloadeninę (68, 69). Obydwie DNA-glikozylazy nie wymagają kofaktorów do reakcji i wykazują znaczną preferencję do dwuniciowego DNA. Żadna z nich nie uwalnia O<sup>6</sup>-metyloguaniny. Ponadto DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny II (ale nie I) jest indukowana pod wpływem czynników alkilujących (4, 5). Po indukcji jej aktywność do usuwania reszt 3-metyloadeniny wzrasta około 20-krotnie i osiąga poziom aktywności DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny I (4).

Genem strukturalnym DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II jest prawdopodobnie gen *alk*, mapujący się w rejonie 43—45 minut na mapie genetycznej *E. coli* (70). Mutanty *alk* nie wykazują zdolności indukcji DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II (4, 5). Bakterie *E. coli* z mutacją w genie *tag* lub genie *alk* wykazują znacznie niższą przeżywalność w obecności czynników alkilujących, niż ich szczepy rodzicielskie (68, 70, 71). Ponadto wykazują mniejszą zdolność do reaktywacji fagów lambda, ØX174 i T7 uszkodzonych działaniem MMS (68, 70, 71). Wszystko to świadczy, że nieusunięte reszty 3-metyloadeniny i innych metylowanych puryn stanowią dla komórki zagrożenie letalne.

Wykazanie, że DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny II jest enzymem niespecyficznym, pozostawia nadal nierozwiązanym zagadnienie odrębnej DNA-glikozylazy specyficznej wobec reszt 7-metyloguaniny, jak też wymaga ponownego zbadania niektórych wyników uzyskanych wcześniej. DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny oczyszczona z *E. coli* (60) jest niewątpliwie DNA-glikozylazą I. Specyficzność DNA-glikozylazy II wykazuje 100-krotnie oczyszczony preparat enzymatyczny z frakcji jądrowej wątroby szczura (65). Mieszanina obydwu enzymów może występować w *M. luteus* (61), we frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczurów i świnek morskich (63) i w częściowo oczyszczonych preparatach DNA-glikozylazy z hodowli komórek mysich (64).

## V. DNA-glikozylaza formamidopirymidyny

Imidazolowy pierścień 7-metyloguaniny w warunkach alkalicznych łatwo ulega rozpadowi i powstaje wówczas 2,6-dwuamino-4-oksy-5-N-metyloformamido-pirymidyna (skrótowa nazwa: formamidopirymidyna). W pH obojętnym wydajność tej reakcji jest raczej niewielka (73), tym

nie mniej reakcja taka w komórkach zachodzi (katalizowana enzymatycznie?), gdyż w ekstraktach *E. coli* wykryty został enzym, który specyficznie usuwa z DNA reszty formamidopirymidyny (74, 75). DNA-glikozylaza formamidopirymidyny (m.cz. 30 000) wykazuje znaczną preferencję do dwuniciowego DNA. Jej aktywność jest hamowana przez dodanie 5-nitrozo,2,4,6-trójaminopirymidyny, lub formamidopirymidyny (75). DNA-glikozylazę formamidopirymidyny wykryto również w ekstraktach wątroby szczurów i świnek morskich (63).

## VI. DNA-glikozylaza mocznika

Reszty mocznika mogą pojawiać się w DNA w wyniku daleko posuniętej degradacji pirymidyn. Były znajdowane w produktach rozpadu DNA otrzymanych po działaniu promieniowaniem jonizującym (76), lub nadmanganianem potasu (77). Stwierdzono, że ekstrakty *E. coli* zawierają jeszcze jeden enzym, różny od poprzednich DNA-glikozylaz, który specyficznie usuwa reszty mocznika z DNA (77). DNA glikozylaza mocznika (c.cz. 25 000) wykazuje silne powinowactwo do dwuniciowego DNA i podobnie jak inne glikozylazy nie wymaga kofaktorów do reakcji.

## VII. DNA glikozylaza dimerów pirymidyny

Enzym ten nacina jedną z dwóch reszt dimeru pirymidyny (od strony 5') pozostawiając miejsce apirymidynowe. Druga reszta dimeru pozostaje związana glikozylowo z DNA. Monomeryzacja dimeru, fotochemiczna, lub po działaniu fotolizy, prowadzi do otrzymania z naciętej pirymidyny wolnej zasady. Pojawienie się wrażliwych na alkalia miejsc apirymidynowych, oraz uwalnianie wolnej zasady po monomeryzacji dimerów są głównymi dowodami na działanie DNA-glikozylazy dimerów pirymidyny.

Wykrycie DNA-glikozylazy nacinającej dimery pirymidyny było przypadkiem. Droga do naprawy dimerów w DNA była dawno ugruntowana. Wiadomo było na podstawie danych z *E. coli*, że usuwanie dimerów pirymidynowych zaczyna się od nacięcia szkieletu cukrowofosforanowego po stronie 5' dimeru, po czym następowało wycięcie i resynteza uszkodzonego fragmentu \* (78, 79). Zamiarem H a s e l t i n e i w s p. (81) było zbadanie wpływu sekwencji nukleotydów na tworzenie dimerów pirymidynowych. W tym celu używali fragmentów DNA o znanej sekwencji co pozwalało na ich dokładną analizę. Do trawienia DNA naświetlanego promieniami UV używali UV-endonukleazę z bakterii *M. luteus*, o której

\* Ostatnio stwierdzono, że UV-endonukleaza *E. coli* ma zdolność do przecięcia nici po obydwu stronach dimeru: od strony 5', między zasadą 7-mą i 8-mą; od strony 3', między zasadą 3-cią i 4-tą. Tak więc istnieje możliwość, że enzym nie tylko nacina ale i usuwa uszkodzony fragment nici DNA (80).

było wiadomo że specyficznie nacina DNA w miejscu występowania dimerów pirymidynowych. Analiza strawionych odcinków wskazywała, że cięcie następowało nie po stronie 5' dimeru, czego oczekiwano, a raczej między jego obydwoma resztami. Ponadto pojawiały się fragmenty DNA zakończone resztą apirymidynową. To sugerowało, że preparaty UV-endonukleazy zawierają dwie różne aktywności: DNA-glikozylazy i AP-endonukleazy. Autorom udało się rozdzielić te dwie aktywności i udowodnić, że rozpad DNA naświetlanego UV pod wpływem UV-endonukleazy *M. luteus* jest wynikiem działania dwóch odrębnych aktywności enzymatycznych: DNA-glikozylazy, nacinającej jedną z dwóch reszt pirymidynowych dimeru, oraz AP-endonukleazy, powodującej rozpad DNA w miejscu apirymidynowym.

Aktywność DNA-glikozylazy nacinającej dimery pirymidynowe i jednocześnie AP-endonukleazy wykazuje również enzym indukowany w *E. coli* po infekcji fagami T4, T4-UV-endonukleaza (82—85), zwana też T4 endonukleaza V. Poprzednio znana była tylko funkcja nukleolityczna enzymu, oraz było wiadomo, że genem strukturalnym enzymu jest gen *denV* (wcześniejsza nazwa: gen *v*) faga T4 (86—88). Liczne badania genetyczne i biochemiczne świadczą, że gen *denV* jest genem struktury zarówno dla AP-endonukleazy, jak i DNA-glikozylazy, a obie te aktywności są obecne w jednym łańcuchu polipeptydowym. Przekonywujących dowodów dostarczyły badania z mutantami amber w genie *denV* faga T4. Mutanty amber fagów T4 w genie *denV*, gdy namnażane są w szczepach *E. coli* nie zdolnych do supresji mutacji amber, tracą zdolność do indukcji obydwu aktywności: DNA-glikozylazy i AP-endonukleazy. Gdy natomiast fagi amber są namnażane w bakteriach zawierających aktywność supresorową, zależnie od mutantu i rodzaju supresji przywrócona zostaje jedna, lub obydwie aktywności enzymatyczne (89, 90).

T4 UV-endonukleaza (c.cz. 16 000) została oczyszczona do homogenności (89, 90). W czasie oczyszczania zachowany jest jednakowy stosunek aktywności AP-endonukleazy do DNA-glikozylazy. W jednakowy też sposób następuje utrata aktywności w czasie przechowywania. Tym niemniej, obydwie aktywności wykazują znaczne różnice w optimum działania pH, wpływu siły jonowej i trwałości cieplnej. Optimum działania DNA-glikozylazy waha się w granicach pH od 6.0 do 8.5. Optimum działania AP-endonukleazy wynosi pH 6.5. Obecność NaCl stymuluje aktywność DNA-glikozylazy, a inhibuje aktywność AP-endonukleazy. Różna też jest trwałość termiczna tych dwóch aktywności: endonukleaza jest bardziej czuła na ogrzewanie niż DNA-glikozylaza (89, 91). Gdyby nie istniały dowody genetyczne, te dane można byłoby uznać za dowody na fizyczną odrębność białek. Obecnie mogą świadczyć o istnieniu dwóch różnych centrów katalitycznych w tym samym łańcuchu białkowym.

Ostatnio gen *denV* został przeniesiony na plazmid i namnożony w

*E. coli* (92). Ekspresja genu *denV* w mutantach *uvrA recA*, powoduje przywrócenie wszystkich utraconych przez mutację *uvrA* właściwości: zniesienie wrażliwości bakterii na promieniowanie UV, podwyższenie przeżywalności fagów T4 *denV* naświetlanych promieniami UV i zdolność do usuwania dimerów z DNA (92).

DNA-glikozylaza dimerów pirymidyny, w odróżnieniu od pozostałych DNA-glikozylaz, nie wydaje się być enzymem szeroko rozpowszechnionym. Enzymu nie znaleziono w *E. coli* (83, 85), *M. radiodurans*, drożdżach, hodowlach komórek ludzkich (85) i fibroblastach ludzkich (93).

Infekcja fagami T4 (i T5) powoduje inaktywację UV-endonukleazy *E. coli*, enzymu wycinającego dimery pirymidynowe z DNA (94). Tak więc w bakteriach *E. coli* infekowanych fagami T4, dimery pirymidynowe z DNA są wycinane w sposób dyktowany przez DNA-glikozylazę fagów T4.

Cechą charakterystyczną AP-endonukleaz połączonych z aktywnością DNA-glikozylazy jest ta, że w przeciwieństwie do endonukleazy VI, czy IV, przecinają nić DNA po stronie 3' miejsca apirymidynowego i pozostawiają apirymidynową resztę dezoksyrybozy po stronie 5' nici DNA (81, 83). Tak zakończony fragment nie jest substratem dla polimerazy DNA I i reszta apirymidynowa musi zostać usunięta ażeby mogła zachodzić aktywna resynteza DNA (95, 96).

### VIII. DNA-glikozylaza glikolu tyminy

Glikol tyminy: 5,6-dwuhydro-5,6-dwuhydroksytymina, może powstawać po naświetlaniu promieniami gamma, działaniu czterochlorkiem osmu, lub nadtlenkiem wodoru na tyminę lub N-1 podstawione pochodne tyminy (76, 97, 98). W preparatach endonukleazy III z *E. coli* wykryto aktywność DNA-glikozylazy, która specyficznie usuwa glikol tyminy z DNA (83). Endonukleaza III jest więc kolejnym przykładem enzymu, który łączy aktywność DNA-glikozylazy i AP-endonukleazy, a u którego pierwotnie rozpoznano tylko jedną z dwóch katalizowanych aktywności. Jest wysoce prawdopodobne, że enzym o podobnym działaniu znajduje się w komórkach mysich. Oczyszczona endonukleaza komórek mysich ma zdolność fragmentacji uszkodzonego DNA, a rozpoznawanym uszkodzeniem jest prawdopodobnie glikol tyminy (89, 100).

### IX. Adaptacja komórek do letalnych i mutagennych skutków działania czynników alkilujących

Czynniki alkilujące obejmują obszerną grupę związków chemicznych, które łatwo metylują lub etylują zasady purynowe i pirymidynowe w DNA. Obecność alkilowanych zasad w DNA może powodować zmniejsze-

nie przeżywalności (letalność), lub indukcję mutacji (mutagenność) komórek żywych. Po alkilacji czynnikami alkilującymi monofunkcyjnymi w DNA powstają następujące zasady: 7-alkiloguanina (główny produkt reakcji), 3-alkiloadenina, O<sup>6</sup>-alkiloguanina, N<sup>7</sup>-alkiloadenina, 1-alkiloadenina, 3-alkiloguanina, O<sup>2</sup> i O<sup>4</sup>-alkilowane pochodne tyminy, O<sup>2</sup>-alkilocytozyna (101—103). Stosunek ilościowy otrzymanych produktów jest różny i zależy od rodzaju użytego odczynnika. I tak dla najczęściej używanych odczynników: MMS, EMS i MNNG, stosunek O<sup>6</sup>-alkiloguaniny do N<sup>7</sup>-alkiloguaniny wynosi kolejno, 0,004, 0,03 i 0,1 (101).

Badania lat ostatnich wykazały, że komórki bakteryjne i w mniejszym stopniu zwierzęce mają zdolność do indukcji systemu obronnego, który znosi mutagenne i letalne skutki działania czynników alkilujących (104, 105). System ten został nazwany tymczasowo odpowiedzią adaptacyjną komórki (*the adaptive response*).

Początek badań stanowiła obserwacja, że komórki *E. coli* hodowane w obecności niskich dawek (1 μl/ml) MNNG po upływie 30 minut tracą zdolność indukowania mutacji pod wpływem MNNG. Po ponownym podaniu znacznie wyższych dawek (100 μg/ml) MNNG okazało się, że komórki nie tylko tracą zdolność indukowania mutacji, ale stają się bardziej odporne na letalne działanie MNNG (2). Nasuwało to przypuszczenie, że odpowiedź adaptacyjna jest wynikiem indukcji systemu reperacyjnego, który usuwa mutagenne i letalnie działające produkty alkilacji.

Zdolność do adaptacji na działanie czynników alkilujących nie zależy od funkcjonowania genów *lexA* czy *recA* (3). System „adaptive response” jest więc różny od systemu „SOS” indukowanego w komórkach pod wpływem promieniowania UV, lub działania czynników degradujących DNA (106).

Indukcję systemu obronnego powoduje obecność i innych czynników alkilujących jak MMS, EMS, czy MNU, przy czym komórki adaptowane do jednego z czynników uzyskują odporność na wszystkie pozostałe (3). Istnieją jednak różnice w efektywności indukcji, np. komórki adaptowane w obecności EMS uzyskują o około połowę mniejszą odporność na letalne działanie MMS, niż komórki adaptowane w obecności MMS (3, 107). Przyczyna powstawania tych różnic nie została do końca wyjaśniona.

Z badań nad indukcją systemu adaptacyjnego u mutantów bakteryjnych *polA* (gen DNA polimerazy I) wynikało, że mogą istnieć różnice między produktami alkilacji o znaczeniu mutagennym, a produktami alkilacji o znaczeniu letalnym. Mutanty *polA* po preinkubacji w obecności niskich dawek czynników alkilujących uzyskiwały odporność na mutagenne, ale nie na letalne działanie czynników alkilujących (108). Obecnie wiemy, że w czasie adaptacji indukowane są dwa różne enzymy: DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny i DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny II (4, 5, 105). Wiemy też, że po działaniu DNA-glikozylazy w dalszym etapie naprawy



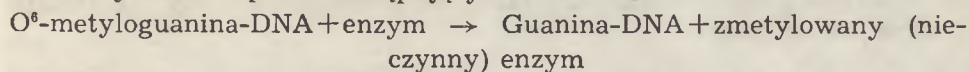
wymagany jest udział DNA polimerazy I. Brak zwiększenia odporności na letalne działanie czynników alkilujących nie musi znaczyć wcale, że w mutantach *polA* DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny II nie jest indukowana, ale może być wynikiem zatrzymania procesu naprawy DNA. Indukcja DNA-transmetylasy O<sup>6</sup>-metyloguaniny w mutantach *polA* przebiega normalnie (109).

### IX-1. DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny

Wykrycie DNA-transmetylasy O<sup>6</sup>-metyloguaniny i ustalenie mechanizmu jej działania łączy się ściśle z badaniami nad odpowiedzią adaptacyjną *E. coli*. Analiza produktów metylacji w DNA w komórkach *E. coli* przed i po adaptacji wskazywała, że wartość O<sup>6</sup>-metyloguaniny w komórkach adaptowanych wyraźnie obniża się (110). Z kinetyki zaniku wynikało, że ilość brakujących reszt jest zależna i ściśle związana z ilością pojawiającego się w czasie adaptacji białka. Białko to nie ulegało reaktywacji i działało tylko raz (111).

Dalszy postęp w rozumieniu mechanizmu reperacji przyniosły badania z ekstraktami komórkowymi. Stwierdzono, że ekstrakty komórek adaptowanych zawierają aktywność enzymatyczną, która powoduje zanikanie znakowanego metylu z reszt O<sup>6</sup>-metyloguaniny w DNA, ale piętna metylu nie udało się wykryć we frakcji kwaso-rozpuszczalnej (112). Świadczyło to, że reszty O<sup>6</sup>-metyloguaniny nie są wycinane w postaci wolnej zasady czy nukleotydów, ani też uwalniane jako wolny metanol. Ostateczny sukces przyniosły badania z częściowo oczyszczonymi preparatami enzymu. Znakowany metyl wyizolowano z hydrolizantów enzymatycznych w postaci S-metylocysteiny. Stwierdzono, że enzym jest transmetylazą która przenosi grupę metylową z reszt O<sup>6</sup>-metyloguaniny w DNA na resztę własnego białka. W wyniku reakcji odzyskiwana jest guanina w DNA, a enzym ulega inaktywacji (113, 7).

Reakcję demetylacji O<sup>6</sup>-metyloguaniny w DNA można przedstawić schematycznie w sposób następujący:



DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny ma również zdolność usuwania grupy etylowej z reszt O<sup>6</sup>-etyloguaniny w DNA, ale szybkość tej reakcji jest około 10-razy mniejsza (114). Wydaje się więc, że istnieją wspólne systemy enzymatyczne do usuwania szkodliwych produktów metylacji i etylacji w DNA.

DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny została oczyszczona do homogenności (115). Enzym ma 4-ry (lub 5) reszt cysteinowych, ale tylko jedna z nich może być akceptorem metylu. Inaktywacja enzymu nie jest wyni-

kiem rozpadu białka po przyłączeniu reszty metylowej. Masa cząsteczkowa formy aktywnej, lub metylowanej nieaktywnej jest podobna i wynosi około 18 000 (115). Ilość cząsteczek enzymu w *E. coli* jest szacowana na około 20/komórkę. Po adaptacji liczba cząsteczek enzymu wzrasta do 3000 (111, 105), natomiast w mutantach *adc*, gdzie enzym jest syntetyzowany konstytutywnie, ilość enzymu oblicza się na około 10 000 cząsteczek/komórkę (115).

Podobny system reperacji alkilowanej O<sup>6</sup>-guaniny mają tkanki ssaków (115—128). Ponieważ O<sup>6</sup>-alkiloguanina uważana jest jako główny związek karcinogeny i mutageny (129—131), system ten wzbudził zrozumiałe zainteresowanie. Podobnie jak u bakterii reakcja przeniesienia grupy alkilowej na białko akceptorowe jest reakcją stechiometryczną (124, 126), aminokwasem akceptorowym jest reszta cysteiny (124, 126), a dealkilacji ulegają zarówno reszty O<sup>6</sup>-metyloguaniny, jak O<sup>6</sup>-etyloguaniny (123, 128). Różnice jakie istnieją wydają się być głównie ilościowe i dotyczą wielkości indukcji, czy też szybkości resyntezy zużywanego białka. Adaptacja powoduje nie większy niż 3-krotny wzrost odporności na czynniki alkilujące (120), czy też aktywności DNA-transmetylazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny (117, 125). Stwierdzono również, że istnieją znaczne różnice w reperacji O<sup>6</sup>-metyloguaniny w zależności od tkanki (116), rodzaju komórek tej samej tkanki (118, 127), czy też w wyniku odchyień indywidualnych tych samych linii komórkowych (119, 121, 125). Np. w limfocytach ludzkich osób zdrowych poziom zdolności do usuwania reszt O<sup>6</sup>-metyloguaniny waha się średnio od 14 000 do 110 000/komórkę (124). Różnice są wynikiem odchyień indywidualnych i nie zależą od płci czy wieku pacjenta. Zakładając, że ilość DNA w komórkach ssaków jest około 1000 razy wyższa niż w komórkach bakterii, ilość enzymu nie jest zbyt duża. Zasadnicze znaczenie wydaje się mieć jednak nie tyle poziom podstawowy enzymu, ile zdolność do resyntezy zużywanego białka (125).

Jak dotychczas brak jest danych czy istnieje w komórkach ssaków indukcja DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II.

Istnieją doniesienia, że w komórkach *E. coli*, O<sup>6</sup>-etyloguanina (ale nie O<sup>6</sup>-metyloguanina) może być wycinana z DNA przy udziale *uvrA uvrB uvrC*-zależnej UV-endonukleazy (130). Bezpośrednie dowody nie zostały jeszcze przedstawione.

#### **IX-2. Kontrola genetyczna warunkująca odporność *E. coli* na działanie czynników alkilujących**

Dotychczas wyizolowano kilka różnorodnych mutantów *E. coli*, które wykazują zmienioną zdolność do reperacji metylowanych zasad. Ogólna charakterystyka poszczególnych mutantów podana jest w Tabeli 2. Mutanty *ada* wyizolowane jako niezdolne do adaptacji (133) nie są zdolne do

indukcji DNA-transmetylazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny (134) i mają znacznie obniżoną zdolność do indukcji DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II (5). Mutanty *adc* (135), charakteryzują się wysokim konstytutywnym poziomem DNA-transmetylazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny (134). Poziom DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II w mutantach *adc* nie został oznaczony. Obydwie mutacje *ada* i *adc*, mapują się na 47 minucie mapy genetycznej *E. coli* (136); prawdopodobnie są to mutacje w genie, lub genach regulatorowych. Mutanty *tag* nie wykazują aktywności DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny I i są mutantami w genie struktury (67). Mutanty *alk* nie są zdolne do indukcji DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II (5). Prawdopodobnie jest to mutacja w genie struktury.

Z danych zgromadzonych w Tabeli 2, trudno jest ocenić jaki wpływ wywierają reszty O<sup>6</sup>-metyloguaniny w DNA na letalność i mutagenność komórki. Wysoki efekt letalny i mutageny czynników alkilujących obserwuje się zarówno u mutantów *ada*, jak i mutantów *alk*. Ponieważ mutanty *ada* mają znacznie zredukowaną zdolność indukcji DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II, trudno jest określić czy przyczyną obserwowanych efektów biologicznych jest brak indukcji enzymu usuwającego O<sup>6</sup>-metyloguaninę, czy znaczne obniżenie zdolności do indukcji DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II.

Wyższy efekt letalny i mutageny czynników alkilujących u mutantów *alk*, łączy te zjawiska z brakiem indukcji DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny II. Enzym ten jak poprzednio podano, usuwa z DNA reszty 3-alkiloadeniny, 7-alkilguaniny, 7-alkiloadeniny i 3-alkilguaniny. Ponieważ: a) komórki *E. coli* dzięki obecności DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny I mogą w dalszym ciągu usuwać reszty 3-alkiloadeniny z DNA, b) ilość usuwanych reszt 3-metyloadeniny przez DNA-glikozylazę 3-metyloadeniny I równa się ilości reszt usuwanych przez DNA-glikozylazę 3-metyloadeniny II po jej indukcji, c) mutacja w genie *tag* (brak DNA-glikozylazy 3-metyloadeniny I) nie ma wpływu na częstość mutacji indukowanych czynnikami alkilującymi i w znacznie mniejszym stopniu niż mutacja *alk* wpływa na obniżenie przeżywalności bakterii; przyczyny zwiększenia efektu letalnego i mutagennego czynników alkilujących u mutantów *alk* należy szukać w upośledzonym wycinaniu z DNA trzech pozostałych zasad. Różne względy jak umiejscowienie grupy alkilowej poza płaszczyzną biorącą udział w wytwarzaniu wiązań wodorowych między parami zasad, łatwość spontanicznej dezaminacji (69, 137) eliminują z rozważań 7-alkilo pochodne adeniny i guaniny, prawdopodobnie więc zasadą o silnym działaniu mutagennym i letalnym jest 3-alkilguanina.

Zadziwiające jest podwójne zabezpieczenie komórek *E. coli* w celu usuwania 3-metyloadeniny z DNA. O szkodliwym działaniu tego związku świadczy fakt, że przeżywalność podwójnych mutantów *ada tag* pod wpływem MMS jest o 4-ry rzędy niższa, niż przeżywalność pojedynczych mutantów *ada*, lub *tag* (5).

Tabela 2

Charakterystyka mutantów *E. coli* defektywnych w genach warunkujących odporność na czynniki alkilujące

Szczepy bakteryjne	Mutacja w badanym genie	Lokalizacja genu (min)	DNA-glikozylaza 3-me-tyloadeniny I	ZDOLNOŚĆ DO INDUKCJI		EFEKT CZYNNIKÓW ALKILUJĄCYCH	
				DNA-transmetylaza O <sup>6</sup> -meG	DNA-glikozylazy 3-meAII	Mutageny	Letalny
<i>E. coli</i> K-12							
AB1157	dziki		+	+	+	+	+
BK2110	<i>ada</i>	47	+	-	+	+	+
MS23	<i>alk</i>	43-45	+	+	-	+	+
BK2114	<i>tag</i>	70-74	-	+	+	+	+
<i>E. coli</i> B/r BS21	<i>adc</i>	47		+	+	-	-

Znak + (-) świadczy o obecności (braku) aktywności enzymatycznej, bądź efektu mutagennego czy letalnego.

(a) Mutacja *adc* powoduje stałą obecność wysokiego poziomu DNA-transmetylazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny. Opracowano na podstawie 5, 68, 71, 114, 133 i 137.

## X. Uwagi końcowe

Wraz z odkryciem szeregu specyficznych enzymów usuwających z DNA przeróżne modyfikowane zasady, rozwiął się mit o trwałości zasad kwasów nukleinowych. Zasady azotowe ulegają przeróżnym przemianom, a zachowanie ciągłości genetycznej w organizmach jest możliwe dzięki wypracowaniu w okresie ewolucji licznych i różnorodnych systemów naprawczych. Enzymy te mogą występować stale w komórce (większość DNA-glikozylaz), jak też pojawiać się po ich indukcji (DNA-glikozylaza 3-metyloadeniny II, DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny).

Proces reperacji zapoczątkowany przez DNA-glikozylazy wymaga udziału AP-endonukleazy, DNA-polimerazy I i ligazy. Odtworzenie naprawianego fragmentu zachodzi na komplementarnej nici DNA. Naprawa reszt O<sup>6</sup>-metyloguaniny jest aktem pojedynczym i prowadzi do odzyskania reszt guaniny. Zaskakujący jest więc podany ostatnio fakt (138), że DNA-transmetylaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny usuwa reszty metylowe z O<sup>6</sup>-metyloguaniny prawie wyłącznie z dwuniciowego DNA.

Adaptacja do czynników alkilujących stanowi drugi, obok systemu SOS (106, 139, 140) podlegający indukcji system obronny *E. coli* wykryty w ostatnich latach. Podczas gdy system SOS umożliwia przeżycie komórki kosztem błędów w replikacji DNA, system adaptacji pozwala na usunięcie uszkodzonych zasad — potencjalnego źródła błędów genetycznych — i chroni komórki przed letalnymi i mutagennymi skutkami działania czynników alkilujących.

Panu Prof. dr Tadeuszowi Korzybskiemu składam gorące podziękowanie za pomoc w słownictwie enzymów.

Zaakceptowano do druku 10 lutego 1983

## PIŚMIENNICTWO

1. Lindahl T., (1982), *Ann. Review of Biochem.*, **51**, 61—88.
2. Samson L., Cairns J., (1977), *Nature*, **267**, 281—283.
3. Jeggo P., Defais M., Samson L., Schendel P., (1977), *Molec. Gen. Genet.*, **157**, 1—9.
4. Karran P., Hjelmgren T., Lindahl T., (1982), *Nature*, **296**, 770—773.
5. Evensen G., Seeberg E., (1982), *Nature*, **296**, 773—775.
6. Olsson M., Lindahl T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10569—10571.
7. Foote R. S., Mitra S., Pal B. C., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **97**, 654—659.
8. Lindahl T., (1976), *Nature*, **259**, 64—66.
9. Laval P., (1977), *Nature*, **269**, 829—831.
10. Deutsch W. A., Linn S., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 141—144.
11. Deutsch W. A., Linn S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2099—2103.
12. Livneh Z., Elad D., Sperling J., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1089—1093.

13. Verly W. G., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 977—982.
14. Kataoka H., Sekiguchi M., (1982), *J. Biochem. Japan.*, **92**, 971—973.
15. Lindahl T., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3649—3653.
16. Friedberg E. C., Ganesan A. K., Minton K., (1975), *J. Virol.*, **16**, 315—321.
17. Tomilin N. V., Aprelikova O. N., Barenfeld L. S., (1978), *Nucleic Acid Res.*, **5**, 1413—1428.
18. Laval F., (1978), *W DNA Repair Mechanism* red. Hanawalt P. C., Friedberg E. C., Fox C. F., str. 195—197. Academic Press, New York.
19. Kaboew O. K., Luchina A., Akhmedov T., Bekker M. L., (1981), *FEBS Lett.*, **132**, 337—340.
20. Sekiguchi M., Hayakawa H., Makuro F., Tanaka K., Okada Y., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **73**, 293—299.
21. Kühnlein U., Lee B., Linn S., (1978), *Nucleic Acid Res.*, **5**, 117—126.
22. Ishiwata K., Oikawa A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **563**, 375—384.
23. Sirover M., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 2090—2095.
24. Caradonna S. J., Cheng Y-C, (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2293—2300.
25. Anderson C. T. M., Friedberg E. C., (1980), *Nucleic Acid Res.*, **8**, 875—888.
26. Krokan H., Wittwer C. U., (1981), *Nucleic Acid Res.*, **9**, 2599—2613.
27. Crosby B., Prakash L., Davis H., Hinkle D. C., (1981), *Nucleic Acid Res.*, **9**, 5797—5809.
28. Talpaert-Borle M., Luizzi M., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 435—440.
29. Talpert-Borle M., Clerici L., Campagnari F., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6387—6391.
30. Talpaert-Borle M., Campagnari F., Creissen D. M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1208—1214.
31. Aprelikova O. N., Tomilin N. Y., (1982), *FEBS Lett.*, **137**, 193—195.
32. Gombar C. T., Katz E. J., Magge P. N., Sirover A., (1981), *Carcinogenesis*, **2**, 595—599.
33. Gupta P. K., Sirover M. A., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 3133—3136.
34. Caradonna S. J., Cheng Y-C, (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9834—9837.
35. Deutsch W. A., Spiering A. L., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3366—3368.
36. Lindahl T., Ljungquist S., Siegert S. Nyberg B., Sperens B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3286—3294.
37. Cone R., Duncan J., Hamilton L., Friedberg E. C., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3194—3201.
38. Leblanck K. J. P., Martin B., Cadet J., Laval J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3477—3483.
39. Teebor G., Goldstein M., Frenkel K., Duker N., Brent T., (1978), *W DNA Repair Mechanism*, red., Hanawalt P. C., Friedberg E. C., Fox C. F., str. 295—299. Academic Press, New York.
40. Duker N. J., Davies W. A., Hart D. M., (1981), *Photochem. Photobiol.*, **34**, 191—195.
41. Ingraham H. A., Tseng B. Y., Goulian M., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 998—1001.
42. Warner H. R., Rockstroh P. A., (1980), *J. Bacteriol.*, **141**, 680—686.
43. Lindahl T., Nyberg B., (1972), *Biochemistry*, **13**, 3405—3410.
44. Makino F., Munakata N., (1977), *J. Bacteriol.*, **131**, 438—445.
45. Duncan B. K., Rockstroh P. A., Warner H. R., (1978), *J. Bacteriol.*, **134**, 1039—1045.
46. Duncan B. K., Weiss B., (1978), *W DNA Repair Mechanism*, red. Hanawalt P. C., Friedberg E. C., Fox C. F., str. 183—186. Academic Press, New York.

47. Colouandre C., Miller J. H., Farabaugh P. J., Gilbert W., (1978), *Nature*, **274**, 775—780.
48. Duncan J., Hamilton L., Friedberg E. C., (1976), *J. Virol.*, **19**, 338—345.
49. Katz G. E., Price A. R., Pomerantz M. J., (1976), *J. Virol.*, **20**, 535—538.
50. Cone R., Bonura T., Friedberg E. C., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10354—10358.
51. Warner H. R., Johnson L. K., Sustad D. P., (1980), *J. Virol.*, **33**, 535—538.
52. Karran P., Cone R., Friedberg E. C., (1981), *Biochemistry*, **20**, 6092—6096.
53. Karran P., Lindahl T., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5877—5879.
54. Karran P., Lindahl T., (1980), *Biochemistry*, **19**, 6005—6010.
55. Rydberg B., Lindahl T., (1982), *EMBO J.*, **1**, 211—216.
56. Barrows L. R., Magee P. N., (1982), *Carcinogenesis*, **3**, 349—351.
57. Kirtikar D. M., Golgthwait D. A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2022—2026.
58. Lindahl T., (1976), *Nature*, **259**, 64—66.
59. Laval J., (1977), *Nature*, **269**, 829—833.
60. Riazuddin S., Lindahl T., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2110—2118.
61. Laval J., Pierre J., Laval F., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 852—855.
62. Shackleton J., Warren W., Roberts J. J., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **97**, 425—433.
63. Margison G. P., Pegg A. E., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 861—865.
64. Male R., Nes I. F., Kleppe K., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **121**, 243—248.
65. Cathcart R., Goldthwait D. A., (1981), *Biochemistry*, **20**, 273—280.
66. Brent T. P., (1979), *Biochemistry*, **18**, 911—916.
67. Singer B., Brent T. P., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 856—860.
68. Karran P., Lindahl T., Øfsteng I., Evensen G. B., Seeberg E., (1980), *J. Mol. Biol.*, **140**, 101—127.
69. Thomas L., Yang C-H, Goldthwait D. A., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1162—1168.
70. Yamamoto Y., Katsuki M., Sekiguchi M., Otsuji; N., (1978), *J. Bacteriol.*, **135**, 144—152.
71. Yamamoto Y., Sekiguchi M., (1979), *Mol. Gen. Genet.*, **171**, 251—256.
72. Dodson L., Masker W. E., (1981), *J. Bacteriol.*, **147**, 720—721.
73. Lawley P. D., Brookes P., (1963), *Biochem. J.*, **89**, 127—138.
74. Chetsanga C. J., Lindahl T., (1979), *Nucleic Acid Res.*, **6**, 3673—3684.
75. Chetsanga C. J., Lozon M., Makaroff C., Savage L., (1981), *Biochemistry*, **20**, 5201—5207.
76. Teoule R., Bert C., Bonicel A., (1977), *Radiation Res.*, **72**, 190—200.
77. Breimer L., Lindahl T., (1980), *Nucleic Acid Res.*, **8**, 6199—6211.
78. Setlow R. B., Carrier W. L., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 226—231.
79. Boyce R. P., Howard-Flanders P., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 293—300.
80. Rupp W. D., Sancar A., Sancar G. B., (1982), *Biochemie*, **64**, 595—598.
81. Haseltine W. A., Gordon L. K., Lindan C. P., Grafstrom R. H., Shaper N. L., Grossman L., (1980), *Nature*, **285**, 634—641.
82. Radany E. H., Friedberg E. C., (1980), *Nature*, **286**, 182—185.

83. Demple B., Linn S., (1980), *Nature*, **287**, 203—208.
84. McMillan S., Dahlberg H. J. E., Radany R. C., Friedberg R. C., Friedberg E. C., (1981), *J. Virol.*, **40**, 211—223.
85. Radany E. H., Friedberg E. C., (1982), *J. Virol.*, **41**, 88—96.
86. Friedberg E. C., King J. J., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 646—651.
87. Yasuda S., Sekiguchi M., (1970), *J. Mol. Biol.*, **47**, 243—255.
88. Sato K., Sekiguchi M., (1976), *J. Mol. Biol.*, **102**, 15—26.
89. Nakabeppu Y., Sekiguchi M., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 2742—2746.
90. Nakabeppu Y., Yamashika K., Sekiguchi M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2556—2562.
91. Seawell P. C., Smith C. A., Ganesan A. K., (1980), *J. Virol.*, **35**, 790—797.
92. Lloyd R. S., Hanawalt P. C., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 2796—2800.
93. La Belle M., Linn S., (1982), *Photochem. Photobiol.*, **36**, 319—324.
94. Strike P., (1978), W DNA Repair Mechanism, red. Hanawalt P., Friedberg E. C., Fox C. F., str. 271—275, Academic Press, New York.
95. Hariharan P. V., Cerutti P. A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3532—3536.
96. Demple B., Linn S., (1982), *Nucleic Acid Res.*, **10**, 3781—3790.
95. Gordon L. K., Haseltine W. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6608—6616.
96. Mosbaugh D. W., Linn S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 575—583.
97. Hariharan P. V., Cerutti P. A., 1974, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3532—3536.
98. Demple B., Linn S., (1982), *Nucleic Acid Res.*, **10**, 3781—3790.
99. Nes I. F., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **112**, 161—168.
100. Nes I. F., (1981), *FEBS Lett.*, **133**, 217—220.
101. Lawley P. D., (1974), *Mutation Res.*, **23**, 283—295.
102. Laval J., (1978), *Biochimie*, **60**, 1123—1134.
103. Singer B., Spengler S., (1982), Molecular and Cellular Mechanism of Mutagenesis, red. Lemontt J. F., Generoso W. M., str. 1—42. Plenum Press, London.
104. Cairns J., Robins P., Sedgwick B., Talmud P., (1981), *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **26**, 237—243.
105. Lindahl T., Rydberg B., Hjelmgren T., Olsson M., Jacobsson A., (1982), W Molecular and Cellular Mechanism of Mutagenesis, red. Lemontt J. F., Generoso W. M., str. 89—102. Plenum Press, London.
106. Witkin E. M., (1976), *Bacteriol. Rev.*, **40**, 869—907.
107. Janion C., (1982), *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 419—426.
108. Jeggo P., Defais M., Samson L., Schendel P., (1978), *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 299—305.
109. Karran P., Stevens S., Sedgwick B., (1982), *Mutation Res.*, **104**, 67—73.
110. Schendel P. F., Robins P. E., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 6017—6020.
111. Robins P., Cairns J., (1979), *Nature*, **280**, 74—76.
112. Karran P., Lindahl T., Griffin B., (1979), *Nature*, **280**, 76—77.
113. Olsson M., Lindahl T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10569—10571.
114. Sedgwick B., Lindahl T., (1982), *J. Mol. Biol.*, **154**, 169—175.
115. Lindahl T., Karran P., Demple B., Sedgwick B., Harris A., (1982), *Biochimie*, **64**, 581—583.



116. Pegg A. E., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 166—173.
117. Montesano R., Bresil H., Plouche-Martel G., Margison G. P., Pegg A. E., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 452—458.
118. Lewis J. G., Swenberg J. A., (1980), *Nature*, **288**, 185—187.
119. Day R. S., Ziolkowski C. H. J., Scrudiero D. A., Mayer S. A., Lubinecki A. S., Girardi A. J., Galloway S. M., Bynum G. D., (1980), *Nature*, **288**, 724—727.
120. Samson L., Schwartz J. L., (1980), *Nature*, **287**, 861—863.
121. Sklar R., Strauss B., (1981), *Nature*, **289**, 417—420.
122. Bogden J. M., Eastman A., Bresnick E., (1981), *Nucleic Acid Res.*, **9**, 3089—3103.
123. Mehta J. R., Ludlum D. B., Renard A., Verly W. G., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 6766—6770.
124. Weldstein E. A., Cao E-H, Bender M. A., Setlow R. B., (1982), *Mutation Res.*, **95**, 405—416.
125. Weldstein E. A., Cao E-H, Setlow R. B., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 5117—5121.
126. Pegg A. E., Roberfroid M., von Bahr C., Foote R. S., Mitra S., Bresil H., Likhachev A., Montesano R., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 5162—5165.
127. Swenberg J. A., Bedell M. A., Billings K. C., Umbenhauer R., Pegg A. E., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 5499—5502.
128. Lemaitre M., Renard A., Verly W. G., (1982), *FEBS Lett.*, **144**, 242—246.
129. Loveless A., (1969), *Nature*, **223**, 206—207.
130. Goth R., Rajewsky M. F., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 639—643.
131. Kleihues P., Margison G. P., (1976), *Nature*, **259**, 153—155.
132. Warren W., Lawley P. D., (1980), *Carcinogenesis*, **1**, 67—78.
133. Jeggo P., (1979), *J. Bacteriol.*, **139**, 783—791.
134. Lindahl T., (1981), W Chromosome Damage and Repair, red. Seeberg E., Kleppe K., str. 207—218. New York, Plenum Press.
135. Sedgwick B., Robins P., (1980), *Mol. Gen. Genet.*, **180**, 85—90.
136. Sedgwick B., (1982), *J. Bacteriol.*, **150**, 984—988.
137. Lawley P. D., Brookes P., (1963), *Biochem. J.*, **89**, 127—138.
138. Lindahl T., Demple B., Robins P., (1982), *EMBO J.*, **1**, 1359—1364.
139. Radman M., (1975), W Molecular Mechanism for Repair of DNA, red. Hawalt P. C., Seltow R. B., Plenum Publishing Corp., New York.
140. Little J. W., Mount D. W., (1982), *Cell*, **29**, 11—22.



WALDEMAR MICHAŁ PRZYBYSZEWSKI \*

## Kompleks reduktazy rybonukleotydowej

### Complex of Ribonucleotide Reductase

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Struktura kompleksu reduktazy rybonukleotydowej
- III. Regulacja aktywności reduktazy rybonukleotydowej
- IV. Inhibitory reduktazy rybonukleotydowej
  - IV-1. Inhibitory interferujące z podjednostką katalityczną
  - IV-2. Inhibitory interferujące z podjednostką regulacyjną
- V. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Structure of the complex of Ribonucleotide reductase
- III. Regulation of the activity of Ribonucleotide reductase
- IV. Inhibitors of Ribonucleotide reductase
  - IV-1. Inhibitors interfering with the catalytic subunit
  - IV-2. Inhibitors interfering with the regulating subunit
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: dNTP — 2'-dezoksynukleozydo-5'-trójfosforany; NDP — nukleozydo-5'-dwufosforany; EDTA — kwas etyleno-dwuamino-czterooctowy; TR-(SH)<sub>2</sub> — zredukowana forma reduktazy tioredoksynowej; TR-S<sub>2</sub> — utleniona forma reduktazy tioredoksynowej; T-(SH)<sub>2</sub> — zredukowana forma tioredoksyny; T-S<sub>2</sub> — utleniona forma tioredoksyny; B1-(SH)<sub>2</sub> — zredukowana forma białka B1; B1-S<sub>2</sub> — utleniona forma białka B1; B<sub>2</sub> — białko B2; NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego; NADPH — zredukowany NADP; FAD — dwunukleotyd flawinoadeninowy; FADH<sub>2</sub> — zredukowany FAD.

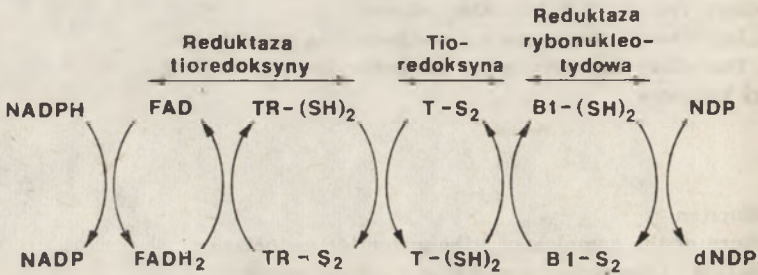
## I. Wprowadzenie

Reduktaza rybonukleotydowa jest enzymem katalizującym redukcję rybonukleotydów, w wyniku której powstają dezoksyrybonukleotydy, prekursorzy DNA. Obserwuje się zbieżność aktywności enzymatycznej

\* Mgr Zakład Biochemii, Instytut Hematologii, 00-957, Warszawa, ul. Chocimska 5.

i intensywności syntezy DNA (1). W tkankach proliferujących aktywność reduktazy rybonukleotydu jest wysoka i przewyższa aktywności innych enzymów szlaku biosyntezy DNA (1—3). W komórkach tkanek nowotworowych może być ona niekiedy jednym z wyznaczników procesu nowotworowego. Reduktaza rybonukleotydu jest enzymem docelowym w działaniu niektórych związków przeciwnowotworowych. Ponieważ pula dezoksyrybonukleotydtrójfosforanów w komórce jest niska i nie zapewnia utrzymania ciągłości syntezy DNA, przeto stopień redukcji rybonukleotydów ogranicza tę syntezę. Aktywność enzymu regulowana jest allosterycznie przez powstałe w procesie redukcji dNTP (2—4).

W wyniku redukcji rybonukleotydów zostaje zastąpiona grupa OH w pierścieniu rybozy przez atom wodoru, którego donorem jest NADPH, a który jest przekazywany poprzez system tioredoksyna-reduktaza tioredoksynowa. Badania kinetyki enzymu w stanie równowagi dały podstawę do przypuszczenia, że enzym w trakcie katalizy może znajdować się przemienne w formie utlenionej lub zredukowanej.



Ryc. 1. Schemat redukcji rybonukleotydów przez enzym z *E. coli* z udziałem dwusiarczków o właściwościach oksydoredukcyjnych (2).

Powyższy schemat został przedstawiony przez Thelander (4—6) na podstawie wyników badań enzymu z *E. coli* i określony jako mechanizm „ping-pong”. Założenie przemienności utlenionej i zredukowanej formy enzymu w procesie redukcji rybonukleotydów ułatwia zrozumienie mechanizmu redukcji. Wykazano, że pęknięcie wiązania C-H w pozycji 3' pierścienia rybozy jest zasadniczym elementem mechanizmu redukcji. Hipotetyczny mechanizm redukcji UDP przez enzym z *E. coli* uwzględnia działanie wolnego organicznego rodnika tyrozylowego, a także sugeruje powstanie kationu rodnikowego rybonukleotydu w trakcie redukcji rybonukleotydu (7). W organizmach prokariotycznych i eukariotycznych występują dwa enzymy różniące się od siebie budową jak i zredukowanym substratem. Komórki eukariotów oraz niektóre bakterie i pierwotniaki cechują się obecnością enzymu redukującego dwufosforany rybonukleotydów. Inne mikroorganizmy zawierają enzym redukujący trójfosforany rybonukleotydów. W centrum katalitycznym enzymu redukującego trójfosforany rybonukleotydów znajduje się 5' dezoksyadenozylkobalamina

(8—16). Tak reduktaza dwufosforanów rybonukleozydów, jak i reduktaza trójfosforanów rybonukleozydów tworzą kompleks enzymatyczny, który składa się z trzech białek: reduktazy rybonukleotydowej E.C.1.17.4.1 lub E.C.1.17.4.2, tioredoksyny i reduktazy tioredoksynowej E.C.1.6.4.5.

## II. Struktura kompleksu reduktazy rybonukleotydowej

Reduktaza tioredoksynowa jest enzymem katalizującym redukcję tioredoksyny w obecności NADPH jako donoru atomów wodoru. Obserwuje się podobieństwo budowy enzymu z *E. coli* i enzymu z komórek ssaków. Różnice dotyczą wielkości cząsteczki enzymu a także jego specyficzności gatunkowej. Badania wyizolowanej z *E. coli* reduktazy tioredoksynowej wykazały, że jest ona flawoproteiną o masie cząsteczkowej 66 000, złożoną z dwu identycznych lub bardzo podobnych łańcuchów polipeptydowych powiązanych wiązaniami niekowalencyjnymi. W strukturze enzymu znajdują się dwa identyczne miejsca katalityczne, każde z nich zawiera jedną aktywną grupę dwusiarczkową i jedną cząsteczkę FAD (17, 18). W komórkach ssaków zbadano dotychczas enzym z wątrobiaka szczura (19), wątroby szczura (20), regenerującej wątroby szczura po hepatoktomii (21), grasicy i wątroby cielęcej (22). Reduktaza tioredoksynowa z komórek raka wysiękowego Novikoffa jest enzymem o masie cząsteczkowej 116 000 złożonym z dwóch podjednostek o masach 58 000 każda z jedną cząsteczką FAD (23).

Tioredoksyna stanowiąca drugi składnik kompleksu reduktazy rybonukleotydowej redukuje aktywne grupy dwusiarczkowe w białku B1. Tioredoksynę tworzy pojedynczy łańcuch polipeptydowy o masie cząsteczkowej 10 000—12 000. Cechuje się on obecnością mostka dwusiarczkowego pomiędzy dwiema resztami cysteiny. Tioredoksynę wyizolowano z komórek wątroby cielęcej (24), wątrobiaka szczura (25), *E. coli* (26, 27), oraz *E. coli* zakażonej fagiem T4 (28—30). Różnice w budowie tioredoksyny z komórek poszczególnych organizmów dotyczą liczby aminokwasów w łańcuchu, usytuowania mostka dwusiarczkowego jak również homologicznych czy heterologicznych reakcji tioredoksyny jednego organizmu w systemie enzymatycznym innego organizmu.

W kompleksie reduktazy rybonukleotydowej transport elektronów zachodzić może nie tylko przez układ tioredoksyna-reduktaza tioredoksynowa. Badania wyizolowanego kompleksu reduktazy rybonukleotydowej z komórek grasicy cielęcej ujawniły inny układ, którego składowymi są: glutaredoksyna i reduktaza glutationowa (31). Znaczenie biologiczne tych dwóch układów transportu wodoru w kompleksie zawierającej reduktazy rybonukleotydowej nie jest jeszcze poznane.

Trzeci układ transportujący elektrony w kompleksie reduktazy rybonukleotydowej stwierdzono w mutancie *E. coli* oznaczonym symbolem

tsnC7004 o normalnym fenotypie, niezdolnym do replikacji DNA faga T7. Zmutowany gen tioredoksyny powoduje tworzenie się innego układu oksydacyjnego: glutation-reduktaza glutationowa (32).

Zbadano dotychczas reduktazę z *E. coli* (5,33—36), z *E. coli* zakażonej fagiem T4 (37—39), z komórek ssaków takich jak grasica cielęca (40—42), szpik kostny królika (43), regenerująca wątroba szczura (44), rak wysiękowy Novikoffa (23), guz Ehrlicha (45—47) oraz komórki Molt4F izolowane z krwi obwodowej osobników z ostrą białaczką limfatyczną (48).

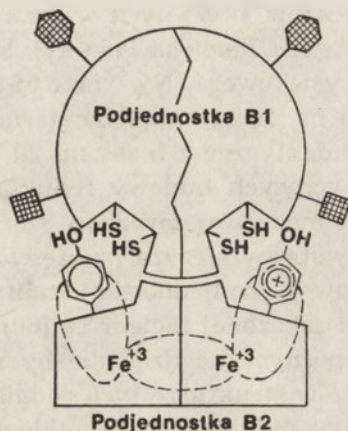
Tabela 1

Budowa i właściwości reduktazy rybonukleotydowej (+) — pozytywny, (+ —) — nie jest niezbędny, (+ ?) — prawdopodobnie pozytywny.

Źródło enzymu	Podjednostki lub odpowiadające im frakcje białkowe		Wpływ $Mg^{+2}$ na łączenie się podjednostek	Masa cząsteczkowa enzymu	Piśmiennictwo
	Regulacyjna	Katalityczna			
<i>E. coli</i>	B1	B2	+	240 000	5,33—36
<i>E. coli</i> zakażona fagiem T4	$\alpha_2$	$\beta_2$	+ —	230—240 000	37—39
Grasica cielęca	M1	M2	+	300 000	40—42
Guz Ehrlicha	Dye	Tris	+	313 000	45—47
Komórki białaczkowe linii Molt4F	B	A	+	310 000	48
Rak wysiękowy Novikoffa	P1	P2	+ ?	200—250 000	23
Szpik kostny królika	S2	S1	+ ?	—	43

Najwięcej jednak informacji o strukturze reduktazy rybonukleotydowej uzyskano z badań enzymu z komórek *E. coli*. Dane dotyczące struktury reduktazy rybonukleotydowej z innych organizmów są dotąd niepełne i na ogół badacze dyskutują je porównując ze strukturą enzymu z *E. coli*. Dlatego omówiono tu szczegółowo najprzód strukturę reduktazy rybonukleotydowej z *E. coli*. Zbudowana jest ona z dwóch podjednostek: regulacyjnej i katalitycznej. Podjednostka regulacyjna, oznaczona symbolem B1, o masie cząsteczkowej 160 000, jest złożona z dwu łańcuchów polipeptydowych z dwoma identycznymi COOH-terminalnymi aminokwasami (izoleucyna), ale różnymi  $NH_2$ -terminalnymi aminokwasami (kwas glutaminowy i asparaginowy), (budowa  $\alpha$ ;  $\alpha'$ ), (33, 34). W białku B1 występują cztery miejsca wiążące efekторы, którymi są dezoksynukleozydotrójfosforany. Dwa miejsca wiążące o wysokim powinowactwie w stosunku do efektoru określono symbolem h (ang. high). Dwa zaś miejsca wiążące o niskim powinowactwie określono symbolem l (ang. low). Oby-

dwa miejsca h wiążą efekторы ATP, dATP, dGTP, dTTP, które regulują specyficzność enzymu wobec substratu (ang. specificity sites). Podczas gdy miejsca l wiążą tylko ATP i dATP regulując całkowitą aktywność enzymu (ang. activity sites), (5, 36, 49, 50).



**Ryc. 2.** Schemat struktury reduktazy rybonukleotydu z *E. coli* (2). Sześciokąty oznaczają miejsca, decydujące o specyficznosci substratowej enzymu wobec ATP, dATP, dTTP, dGTP, określane jako miejsca wiążące h. Kwadraty oznaczają miejsca, decydujące o aktywności enzymu wobec ATP i dATP, określane jako miejsca wiążące l.

Podjednostka katalityczna enzymu, o symbolu B2 i masie cząsteczkowej 78 000, jest zbudowana z dwu identycznych łańcuchów polipeptydowych z jednym  $\text{NH}_2$ -terminalnym aminokwasem (alanina) i  $\text{COOH}$ -terminalnym (leucyna), (budowa  $\beta_2$ ), (33, 34). Podjednostkę tę cechuje obecność dwóch atomów żelaza niehemowo związanych w formie  $\text{Fe}^{+3}\text{-O}_2\text{-Fe}^{+3}$ . Generują one wolny organiczny rodnik w pierścieniu benzyłowym reszty tyrozyny. Pojawienie się rodnika w białku B2 powoduje wzrost absorpcji światła przy 410 nm, oraz charakterystyczny sygnał EPR (51—56). Masa cząsteczkowa enzymu z *E. coli* wynosi 240 000, a jej budowę określają symbole  $\alpha$ ;  $\alpha'$ ;  $\beta_2$ . Podjednostki enzymu występują w stosunku stechiometrycznym 1:1, są nieidentyczne lecz komplementarne (34). Połączenie wyodrębnionych podjednostek enzymu następuje tylko w obecności  $\text{Mg}^{+2}$ , jakkolwiek jednowartościowe jony  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ , w pewnych ściśle określonych warunkach mogą z równą efektywnością zastąpić dwuwartościowy jon magnezu (33).

Struktury enzymu indukowanego w *E. coli* przez fag T4 i enzymu bakteryjnego są podobne, ale podjednostki enzymu faga w przeciwieństwie do enzymu bakteryjnego nie dysocjują w trakcie izolowania, a także połączenie wyodrębnionych podjednostek nie jest bezwzględnie zależne od dwuwartościowych jonów  $\text{Mg}^{+2}$  (37—39).

Budowa enzymu z komórek grasicy cielęcej jest w zasadzie podobna do budowy enzymu z *E. coli*. Jej podjednostki określane jako M1-170 000 i M2-110 000 występują w stosunku niestechiometrycznym. Badania wykazały mniejszą zawartość żelaza w podjednostce M2 enzymu z grasicy cielęcej niż w podjednostce B2 enzymu z *E. coli*. Wyniki badań wskazują na odmienną budowę centrów aktywnych w tych enzymach (40—42, 57, 58). Enzymy z komórek guza Ehrlicha (45—47), komórek białaczkowych linii Molt4F (48), raka wysiękowego Novikoffa (23), szpiku kostnego królika (43), rozdzielono na dwie komplementarne frakcje białkowe. Są one równoważne ale nieidentyczne z białkami B1 i B2 enzymu z *E. coli*. Niewiele informacji dotyczących budowy reduktazy rybonukleotydowej uzyskano z badań tkanki mózgowej zarodków szczura, małpy i człowieka (59) oraz regenerującej wątroby szczura po częściowej hepatektomii (44). Badania rodnika tyrozylowego podjednostki katalitycznej enzymu z *E. coli* (54, 55), enzymu z *E. coli* zakażonej fagiem T4 (60) oraz enzymu z mysich fibroblastów linii 3T6 opornych na działanie hydroksymocznika (61, 62) wykazały pewne analogie w strukturze tych rodników.

Analiza występowania reduktazy rybonukleotydowej we frakcjach komórkowych wykazała, że w komórkach regenerującej wątroby szczura, wątrobiaka Novikoffa 80%—90% aktywności znajduje się we frakcji błon supernatantu postmikrosomalnego. Badania z zastosowaniem mikroskopii elektronowej tej frakcji ujawniły fragmenty błonowe jako amorficzne struktury o średnicy 30—100 nm, co nie jest tylko cechą komórek wątroby, ale także śledziony i grasicy szczura oraz komórek HeLa (3, 44, 63, 64). Aktywność enzymu w komórkach białaczkowych linii Molt4F (48), a także w komórkach mięsaka M1 szczura (65) występuje we frakcji cytozolowej.

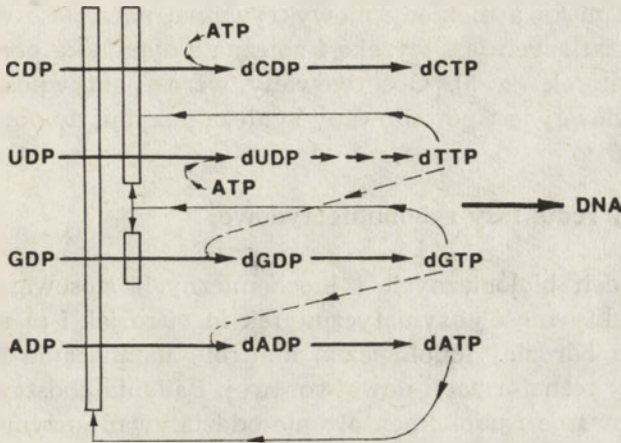
### III. Regulacja aktywności reduktazy rybonukleotydowej

Aktywność a także specyficzność reduktazy rybonukleotydowej wobec substratu, podlega regulacji allosterycznej przez powstałe w reakcji dezoksyrybonukleotydy. Wiążą się one z miejscami regulacyjnymi enzymu, co powoduje zmiany szybkości maksymalnej reakcji oraz obniżenie stałej substratowej redukowanego przez enzym substratu (36, 41, 46, 49, 50). Dezoksyrybonukleotydy obniżają lub podwyższają  $V_{max}$  enzymu i zależnie od tego określa się je jako efekторы pozytywne lub negatywne (66). Związany przez enzym pozytywny efektor powoduje wzrost maksymalnej szybkości redukcji substratu i nazywany jest pierwszorzędowym efekto-rem (ang. prime effector) danego substratu. W nieobecności efektora, enzym wykazuje ograniczoną aktywność. Redukcja CDP i UDP jest stymulowana tylko przez ATP, redukcja GDP przez dTTP a redukcja ADP przez dGTP. Reakcję redukcji rybonukleotydów purynowych stymulują ATP z dTTP oraz ATP z dGTP. Należy podkreślić, że dCTP nie stymuluje



i nie hamuje aktywności enzymu (67). Schemat allosterycznej regulacji aktywności enzymu z *E. coli* i komórek ssaków jest podobny.

Zgodnie z przedstawionym schematem, reakcją zapoczątkowującą jest



Ryc. 3. Schemat regulacji syntezy dezoksyrybonukleotydów (2). Wydłużone prostokąty oznaczają efekt negatywny (hamujący). Linie przerywane, oznakowane strzałkami symbolizują efekt pozytywny (stymulujący).

redukcja CDP i UDP przez enzym aktywowany przez ATP. Nagromadzenie się dTTP, będącego produktem reakcji wywołuje zahamowanie redukcji substratów pirymidynowych, natomiast nagromadzenie się dGTP prowadzi do upośledzenia redukcji GDP. Nagromadzenie się dATP całkowicie hamuje aktywność enzymu w nieobecności syntezy DNA. Hamowaniu aktywności enzymu przez dATP zapobiega ATP i dlatego też całkowita aktywność enzymatyczna reduktazy rybonukleotydowej w komórce jest kontrolowana przez stosunek stężeń  $[ATP] / [dATP]$  (4, 5, 49, 68, 69).

Proces regulacji allosterycznej w zakażonych fagiem T4 komórkach *E. coli* jest bardziej złożony, ponieważ dATP nie hamuje aktywności enzymu, natomiast aktywuje reakcję redukcji rybonukleotydów pirymidynowych. Uważa się, że podjednostka regulacyjna enzymu faga zawiera tylko miejsca wiążące h co powoduje, że enzym redukuje rybonukleotydy pirymidynowe z większą wydajnością (70). Badania enzymu z mysich fibroblastów zakażonych wirusem PRVR-135 wykazały, że dATP a także dTTP nie hamują aktywności reduktazy rybonukleotydowej (71). Powiązania pomiędzy aktywnością enzymu a fazą cyklu komórkowego oraz komórkową pulą dNTP opisano uprzednio (patrz artykuł przeglądowy poz. 72).

Różnice w aktywności reduktazy wobec CDP i ADP w komórkach *E. coli* (73), komórkach raka włośniowego Ehrlicha (69) i komórkach guza Ehrlicha (74) skłaniają do przypuszczenia, że występują w nich dwa odrębne białka enzymatyczne, jedno redukujące CDP oraz drugie redukujące ADP.

Wyniki badań enzymu z *E. coli* zakażonej fagiem T4 (75) oraz enzymu z komórek grasicy cielęcej (67) wykazały jednak tylko jedno białko enzymatyczne redukujące wszystkie rybonukleotydy. Aktywność reduktazy rybonukleotydowej w komórkach tkanek, które ukończyły rozwój ontogenetyczny jest niska a niekiedy niewykrywalna, natomiast w komórkach tkanek proliferujących jest wysoka i zbieżna z dynamiką procesu namnażania się komórek (2, 3). Obserwowany wzrost aktywności reduktazy rybonukleotydowej jest powodowany syntezą enzymu *de novo* (76—78).

#### IV. Inhibitory reduktazy rybonukleotydowej

W badaniach biologicznych i biochemicznych stosowanie związków hamujących aktywność enzymatyczną, tak *in vitro* jak i *in vivo*, pozwala na mniej lub bardziej fizjologiczną kontrolę namnażania się komórek, które podległy transformacji nowotworowej. Badania podstawowe pozwoliły na opracowanie i udokumentowanie oddziaływań enzym-inhibitor, co znajduje praktyczne zastosowanie w leczeniu nowotworów. Związki hamujące aktywność enzymu podzielono na dwie grupy: inhibitory interferujące z podjednostką katalityczną oraz inhibitory interferujące z podjednostką regulacyjną (57).

##### IV-1. Inhibitory interferujące z podjednostką katalityczną enzymu

Wśród najczęściej badanych inhibitorów podjednostki katalitycznej reduktazy rybonukleotydowej omówimy: hydroksymocznik, guanazol, niektóre heterocykliczne karboksyaldehydo-tiosemikarbazony oraz imidazopirazol.

Hydroksymocznik (72) zmienia charakterystyczne parametry wolnego organicznego rodnika tyrozolowego w podjednostce katalitycznej enzymu z *E. coli*. Wykazano, że związek ten uszkadza rodnik tyrozylowy w białku B2, nie naruszając ilości żelaza w badanej podjednostce. Obserwowano, że spadek aktywności enzymatycznej był zawsze połączony z zanikiem absorpcji światła przy długości fali 410 nm i z zanikiem sygnału EPR (51—53). Postulowany przez badaczy mechanizm sugerował, że hydroksymocznik wychwytuje wolne rodniki (*ang. free radical scavenger*).

Guanazol (3,5-dwuamino-1,2,4-triazol) jest inhibitorem aktywności reduktazy rybonukleotydowej tak *in vivo* jak i *in vitro* w wyniku odwrotnego uszkodzenia podjednostki katalitycznej enzymu. Wyniki badań enzymu z ludzkich komórek raka nabłonka, L1210 myszy, CHO chomika i H.Ep2 wykazały, że efektywność hamowania aktywności redukcji CDP, UDP, GDP przez guanazol jest równa efektywności hamowania przez hydroksymocznik (79—81). Molekularny mechanizm hamowania aktywności enzymu przez guanazol jest niewyjaśniony.

$\alpha$ -(N)-heterocykliczne karboksyaldehydo-tiosemikarbazony mogą tworzyć koordynacyjne połączenia z metalami tranzycyjnymi, wykazując szczególnie silne powinowactwo do żelaza. Hamują one aktywność reduktazy rybonukleotydowej od kilkudziesięciu do kilkuset razy efektywniej niż klasyczny inhibitor jakim jest hydroksymocznik. Jednakże, tworzenie połączeń koordynacyjnych tiosemikarbazonów z żelazem nie wyjaśnia mechanizmu hamowania aktywności enzymu przez te związki. Dodanie żelaza do mieszaniny inkubacyjnej enzymu z inhibitorem nie przywraca zahamowanej przez inhibitor aktywności reduktazy rybonukleotydowej. Obserwuje się większe powinowactwo inhibitora do enzymu niż do żelaza. Bliższe spręcyzowanie mechanizmu działania tych związków wymaga dalszych badań (82, 83).

Imidazopirazol (2,3-dwuhydro-1H-pirazolo/2,3A) imidazol hamuje aktywność reduktazy rybonukleotydowej tak *in vitro* jak i *in vivo*. Badania enzymu z komórek L1210 myszy i H.Ep2 oraz komórek guza Ehrlicha wykazały odwracalne uszkodzenie podjednostki katalitycznej przez imidazopirazol. Mechanizm działania tego związku polega na chelatacji żelaza, co wykazały badania enzymu z komórek guza Ehrlicha. Zahamowana przez imidazopirazol aktywność enzymu jest przywracana przez dodanie do medium żelaza. Zastąpienie żelaza przez wyizolowaną podjednostkę katalityczną enzymu również powoduje powrót aktywności enzymatycznej. Dodanie EDTA do mieszaniny inkubacyjnej potęguje hamowanie aktywności enzymu przez imidazopirazol. Porównanie redukcji ADP i CDP w obecności inhibitora wykazało większy stopień hamowania enzymu w czasie redukcji ADP niż CDP (84, 85).

#### IV-2. Inhibitory interferujące z podjednostką regulacyjną enzymu

Jako przykłady inhibitorów interferujących z podjednostką regulacyjną enzymu omówimy tu: dwualdehydowe pochodne inozyny, kwasu inozynowego, adenozyne, ATP, AMP, fosforan pirydoksalu, kwasy rybonukleinowe.

Dwualdehydowe pochodne inozyny, kwasu inozynowego, adenozyne, ATP, AMP hamują aktywność reduktazy rybonukleotydowej poprzez zablokowanie grupy aminowej lizyny w podjednostce regulacyjnej, w efekcie interakcji z grupą aldehydową analogu nukleozydu. Badania enzymu z komórek raka wosłkowego Ehrlicha (69) i komórek guza Ehrlicha (86—88) wykazały większy stopień hamowania redukcji CDP niż ADP przez aldehydowe pochodne nukleozydów. Hamowanie aktywności enzymu jest nieodwracalne.

Fosforan pirydoksalu jest inhibitorem enzymów charakteryzujących się obecnością reszt lizylowych w centrum aktywnym. Hamuje on także aktywność reduktazy rybonukleotydowej. Inne, pokrewne temu związko-

wi substancje tj. pirydoksal, pirydoksyna, pirydoksamina, fosforan pirydoksaminy nie hamują aktywności reduktazy rybonukleotydydowej. Dodanie ATP do medium zapobiega częściowo hamowaniu redukcji CDP i ADP przez fosforan pirydoksalu. Hamowanie przez fosforan pirydoksalu aktywności enzymu z komórek guza Ehrlicha jest odwracalne (87, 89).

rRNA, tRNA z komórek raka wysiękowego Ehrlicha a także tRNA z drożdży, jak również syntetyczne policytydylany hamują aktywność reduktazy rybonukleotydydowej z komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Poliguanylany i poliurydylany jednak hamowały aktywność enzymu w niewielkim stopniu, a poliadenylany nie hamowały jej wcale. Kwasy rybonukleinowe zaś, znacząco hamowały redukcję rybonukleotydydów już w stężeniach fizjologicznych (90).

Współdziałanie związków uszkadzających niezależnie i specyficznie podjednostki enzymu powoduje, że kombinacje inhibitorów: imidazopirazolu i dGTP, hydroksymocznika i dATP, imidazopirazolu i dwualdehydowej pochodnej inozyny hamują aktywność enzymu synergistycznie lub addytywnie. Natomiast kombinacje inhibitorów działających na tę samą podjednostkę tj. pochodne tiosemikarbazonów i imidazopirazolu lub imidazopirazolu i hydroksymocznika hamują aktywność enzymu antagoniście. Po dodaniu do medium związków silnie chelatujących żelazo obserwuje się, że zamiast hamowania antagonistycznego pojawia się hamowanie addytywne (91).

## V. Uwagi końcowe

Stopień redukcji rybonukleotydydów ogranicza syntezę DNA, a ogólniej i replikację DNA. Fakt, że enzym zbudowany jest z podjednostek a aktywność enzymu podlega regulacji allosterycznej stwarza możliwość świadomej regulacji enzymu w chemioterapii tkanki nowotworowej. Wykazał to C o r y i w s p. (91—93), który określił działania synergistyczne, addytywne i antagonistyczne inhibitorów aktywności enzymu. Nieliczne jeszcze prace dotyczące badań nad mechanizmem współdziałania inhibitorów aktywności enzymu nie wyjaśniają dogłębnie tego zagadnienia ale go sygnalizują. Wyniki badań wpływu inhibitorów aktywności enzymu *in vitro* zapewne nie zawsze odzwierciedlają analogiczne efekty *in vivo*, ale mogą stanowić podstawę dla dalszych badań. Zastosowanie inhibitorów aktywności podjednostek katalitycznej jak i regulacyjnej enzymu, pojedynczo a także w kombinacji, może spowodować, że chemioterapia stanie się bardziej zróżnicowana i wielostronna.

*Praca napisana w ramach badań finansowanych przez Program Rządowy PR-6, Umowa Nr 2501.*

*Zaakceptowano do druku 17 maja 1983.*

## PIŚMIENICTWO

1. Turner M. K., Abrams R., Lieberman I., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3725—3728.
2. Elford H. L., Freese M., Passamani E., Morris H. P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5228—5233.
3. Elford H. L., (1972), *Adv. Enzyme Regul.*, **10**, 19—38.
4. Thelander L., Reichard P., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 133—158.
5. Thelander L., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 606—610.
6. Thelander L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4858—4862.
7. Stubbe J.-A., Ackles D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8027—8030.
8. Goulian M., Beck W. S., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 4233—4242.
9. Panagou D., Orr M. D., Dustone J. R., Blakley R. L., (1972), *Biochem.*, **11**, 2378—2388.
10. Hogenkamp H. P. C., Ghamber R. K., Brownson C., Blakley R. L., Vitols E., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 799—808.
11. Panagou D., Orr M. D., Blakley R. L., (1970), *Fed. Proc.*, **29**, 915.
12. Singh D., Tamao Y., Blakley R. L., (1977), *Adv. Enzyme Regul.*, **15**, 81—100.
13. Munavalli S., Parker D. V., Hamilton F. D., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4233—4237.
14. Gleason F. K., Hogenkamp H. P. C., (1970), *P. Biol. Chem.*, **245**, 4894—4891.
15. Hamilton F. D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4428—4434.
16. Gleason F. K., Wood J. M., (1976), *Science.*, **192**, 1342—1344.
17. Thelander L., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 407—422.
18. Thelander L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6026—6029.
19. Moore E. C., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 264—268.
20. Larson G., Larsson A., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 119—124.
21. Larsson A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 346—349.
22. Holmgren A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4600—4606.
23. Moore E. C., (1977), *Adv. Enzyme Regul.*, **15**, 101—114.
24. Engström N. E., Holmgren A., Larsson A., Söderhäll S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 205—210.
25. Herrmann E. C., Moore E. C., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1219—1223.
26. Holmgren A., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **6**, 467—484.
27. Holmgren A., Söderberg B.-O., Eklund H., Bränden C.-J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2305—2309.
28. Berglund O., Sjöberg B.-M., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6030—6035.
29. Berglund O., Holmgren A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6036—6038.
30. Sjöberg B.-M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8058—8062.
31. Luthman M., Eriksson S., Holmgren A., Thelander L., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2158—2162.
32. Holmgren A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2275—2279.
33. Brown N. C., Canallakis Z. N., Lundin B., Reichard P., Thelander L., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **9**, 561—573.
34. Thelander L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4591—4601.
35. Eriksson S., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **56**, 289—294.
36. von Döbeln U., (1977), *Biochemistry.*, **16**, 4368—4371.
37. Berglund O., Karlström O., Reichard P., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **62**, 829—835.
38. Berglund O., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7270—7275.
39. Berglund O., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7450—7455.

40. Engström Y., Eriksson S., Thelander L., Åkerman M., (1979), *Biochem.*, **18**, 2941—2948.
41. Thelander L., Eriksson S., Åkerman M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7426—7432.
42. Mattaliano R. J., Sloan A. M., Plumer E. R., Klippenstein G. L., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 667—674.
43. Hopper S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3336—3340.
44. Larsson A., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **11**, 113—121.
45. Cory J. G., Fleischer A. E., Munro J. B., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2898—2901.
46. Klippenstein G. L., Cory J. G., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 252—258.
47. Cory J. G., Okada M., Fleischer A. E., Pollet R. J., (1980), *Fed. Proc.*, **39**, 1851.
48. Chang C-H., Cheng Y-C., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 436—442.
49. Brown N. C., Reichard P., (1969), *J. Mol. Biol.*, **46**, 25—55.
50. von Döbeln U., Reichard P., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3616—3622.
51. Brown N. C., Eliasson R., Reichard P., Thelander L., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **9**, 512—518.
52. Ehrenberg A., Reichard P., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3485—3488.
53. Atkin C. L., Thelander L., Reichard P., Lang G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7464—7472.
54. Sjöberg B-M., Reichard P., Gräslund A., Ehrenberg A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 536—541.
55. Sjöberg B-M., Reichard P., Gräslund A., Ehrenberg A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6863—6865.
56. Petersson L., Gräslund A., Ehrenberg A., Sjöberg B-M., Reichard P., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6706—6712.
57. Thelander L., Larsson B., Hobbs J., Eckstein F., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1398—1405.
58. Larsen I. K., Sjöberg B-M., Thelander L., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **125**, 75—81.
59. Millard S. A., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2395—2400.
60. Sahlin M., Gräslund A., Ehrenberg A., Sjöberg B-M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 366—369.
61. Åkerblom L., Ehrenberg A., Gräslund A., Lankinen H., Reichard P., Thelander L., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2159—2163.
62. Gräslund A., Ehrenberg A., Thelander L., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5711—5715.
63. Baril E., Baril B., Eiford H. L., (1972), *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **13**, 84.
64. Eiford H. L., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 537—543.
65. Silaeva S. A., Debov S. S., Chesnokova N. B., (1972), *Voprosy Med. Chimii.*, **13**, 400—403.
66. Beck S. W., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3148—3158.
67. Eriksson S., Thelander L., Åkerman M., (1979), *Biochem.*, **18**, 2948—2952.
68. Reichard P., (1972), *Adv. Enzyme Regul.*, **10**, 3—16.
69. Cory J. G., Mansell M. M., Whitford T. W. Jr., (1976), *Adv. Enzyme Regul.*, **14**, 45—62.
70. Berglund O., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7276—7281.
71. Lankinen H., Gräslund A., Thelander L., (1982), *J. Virol.*, **41**, 893—900.

72. Przybyszewski W. M., Malec J., (1982), *Postępy Biochemii*, **28**, 353—372.
73. Yeh Y. C., Tessman J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1323—1324.
74. Cory J. G., Mansell M. M., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 2327—2331.
75. Yeh Y. C., Tessman J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3252—3254.
76. Feller W., Follmann H., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 752—758.
77. Lowdon L., Vitols E., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 177—184.
78. Elford H. L., Gourley B. C., Hanna S. Hinkle B., (1975), *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **17**, 206.
79. Brockman R. W., Shaddix S., Laster W. L. Jr., Schabel F. M. Jr., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 2358—2368.
80. Lewis W. H., Wright J. A., (1978), *J. Cell Physiol.*, **97**, 73—97.
81. Lewis W. H., Wright J. A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 926—933.
82. Both B. A., Agraval K. C., Moore E. C., Sartorelli A. C., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 1308—1314.
83. Sartorelli A. C., Agraval K. C., Tsiftoglou A. S., Moore E. C., (1977), *Adv. Enzyme Regul.*, **15**, 117—139.
84. Cory J. G., Fleischer A. E., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 3891—3894.
85. Brockman R. W., Shaddix S. C., Carpenter J. W., DuBois N. F., Struck R. F., (1978), *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, **19**, 21.
86. Cory J. G., George B. C., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 496—503.
87. Cory J. G., Mansell M. M., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 390—396.
88. Cory J. G., Mansell M. M., Whitford T. W. Jr., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 3166—3170.
89. Cory J. G., Mansell M. M., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1533.
90. Cory J. G., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 993—998.
91. Cory J. G., Sato A., Lasater L., (1981), *Adv. Enzyme Regul.*, **19**, 139—150.
92. Cory J. G., Fleischer A. E., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 4600—4604.
93. Sato A., Cory J. G., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 1637—1641.





ANNA BARAŃCZYK-KUŹMA \*

## Metabolizm siarczanów

### Sulfate Metabolism

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Źródła siarczanów
- III. Aktywacja siarczanów
  - III-1. Transport siarczanów do wnętrza komórki
  - III-2. Biosynteza adenozy-3'-fosfo-5'-sulfosforanu
  - III-3. Witamina A a metabolizm siarczanów
- IV. Reakcje przenoszenia reszty siarczanowej
  - IV-1. Przyłączenie reszty siarczanowej a detoksykacja związków egzogennych
  - IV-2. Przyłączenie reszty siarczanowej a zobojętnianie związków endogennych
  - IV-3. Przyłączanie reszty siarczanowej a kancerogeneza
- V. Usuwanie siarczanów

#### Contents

- I. Introduction
- II. Sulfate supply
- III. Sulfate activation
  - III-1. Sulfate transport into the cell
  - III-2. 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate biosynthesis
  - III-3. Vitamin A and sulfate metabolism
- IV. Sulfation
  - IV-1. Sulfation and detoxication of xenobiotics
  - IV-2. Sulfation and inactivation of endogenous compounds
  - IV-3. Sulfation and carcinogenesis
- V. Sulfate elimination

\*) dr n.med., Zakład Biochemii Instytutu Biofarmacji Akademii Medycznej w Warszawie, 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.

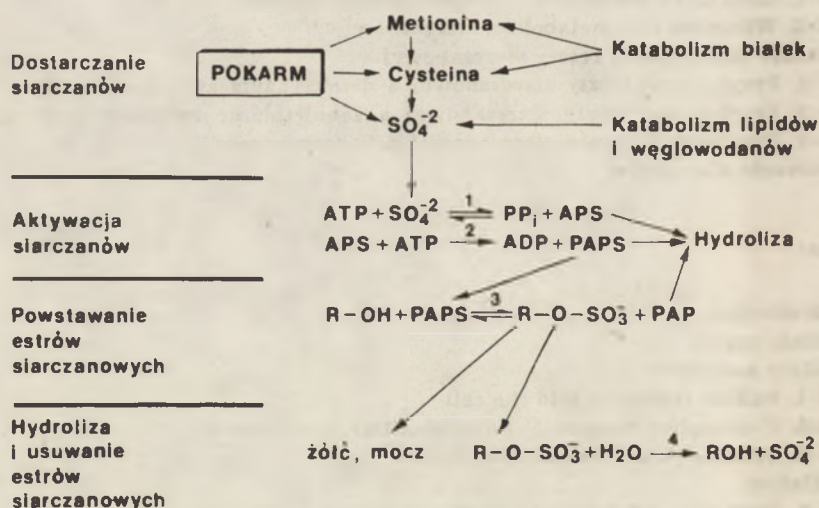
Wykaz stosowanych skrótów:

PAPS — adenozy-3'-fosfo-5'-sulfosforan; APS — adenyllosiarczan; PAP — adenozy-3',5'-dwufosforan; PST — sulfotransferaza arylowa (fenolowa); MHPG — 3-metoksy-4-hydrokso fenyloglikol; DHPG — 3,4-dihydrokso fenyloglikol; AAF — 2-acetyloaminofluoren; N-OH-AAF — N-hydrokso-2-acetyloaminofluoren; PCP — penta-chlorofenol; DCNP — 2,6-dichloro-4-nitrofenol.

## I. Wprowadzenie

Szeroko rozpowszechnione u zwierząt, roślin i mikroorganizmów nieorganiczne siarczany odgrywają bardzo istotną rolę w metabolizmie wielu endo- i egzogennych związków. Siarczany wbudowywane do polisacharydów i lipidów stają się ważnym składnikiem tkanki łącznej i nerwowej (1, 2, 3). Reagując z grupami hydroksylowymi endogennych fenoli czy alkoholi przyczyniają się do zubożniania takich związków jak katecholaminy, kwasy żółciowe czy sterydy (4). Przyłączając się do różnych pochodnych fenolowych powodują inaktywację farmakologicznie czynnych, egzogennych substancji oraz ułatwiają ich wydalanie z organizmu (5). W reakcjach z N-hydroksyloaminami i N-hydroksyloamidami tworzą niestabilne lecz wysoce reaktywne, kancerogenne pochodne (6).

Podstawowym warunkiem wykorzystania reszty siarczanowej jest jej aktywacja do adenozyno-3'-fosfo-5'-sulfofosforanu (PAPS). Jest to dwuetapowy proces zachodzący przy udziale adenylilotransferazy siarczanowej i kinazy adenylilosiarczanu (7, 8). Przeniesienie reszty siarczanowej



Ryc. 1. Metabolizm siarczanów: 1. Adenylilotransferaza siarczanowa; 2. Kinaza adenylilosiarczanu; 3. Sulfotransferazy; 4. Sulfatazy.

z PAPS na odpowiednie akceptory jest katalizowane przez stosunkowo słabo do tej pory poznane enzymy sulfotransferazy (EC 2.8.2). Powstające estry kwasu siarkowego mogą następnie ulegać hydrolizie przy udziale sulfatazy (EC 3.1.6) lub być wydalane z moczem lub żółcią (5) (Ryc. 1).

Celem niniejszego artykułu jest zwrócenie uwagi na metabolizm oraz udział i znaczenie nieorganicznych siarczanów w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych zachodzących w tkankach ssaków.

## II. Źródła siarczanów

Obecne w organizmie siarczany dostarczane są bezpośrednio z pokarmem lub uwalniane w wyniku katabolizmu sulfolipidów czy mukopolisacharydów. Mogą one również powstawać na drodze przemian dostarczanej z zewnątrz lub pochodzącej z rozpadu białek cysteiny.

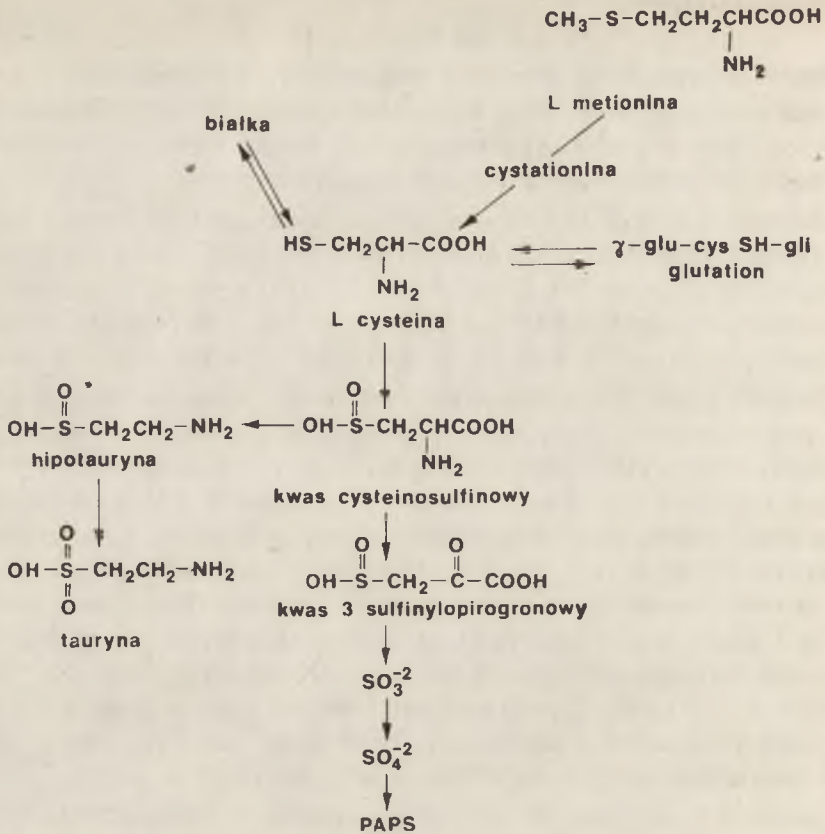
Siarczany dostarczane bezpośrednio z pokarmem są bardzo szybko wchłaniane z przewodu pokarmowego do krwi skąd prawie natychmiast dostają się do wątroby (9). Z badań Batt (10) wynika, że wchłanianie siarczanów u młodych myszy odbywa się wzdłuż całego jelita cienkiego i okrężnicy, natomiast u osobników dorosłych głównie w jelicie czczym.

Ponieważ anion siarczanowy nie jest dobrze rozpuszczalny w tłuszczach przypuszcza się, że w jelicie podobnie jak i w najlepiej do tej pory zbadanych erytrocytach występuje specjalny przenośnik białkowy ułatwiający transport tego jonu przez błony biologiczne. Pierwsze doniesienia na temat czynnego transportu siarczanów z jelita do krwi pochodzą z pracy Deyrupa (11), który w 1963 roku w badaniach przeprowadzonych *in vitro* stwierdził zależność pomiędzy transportem jonów siarczanowych i jonów sodowych. Anesti i wsp. (12) wykazali, że transport siarczanów wymaga dostarczenia energii, a w drugiej połowie lat 70-tych Cardin i Mason (13, 14) stosując technikę odwróconego jelita oraz znakowany [<sup>35</sup>S]-siarczan udowodnili, że w jelicie czczym szczura wchłanianie siarczanów odbywa się wbrew gradientowi stężeń.

Pomimo iż do tej pory nie zostało stwierdzone w jakim stopniu dostarczane z pokarmem nieorganiczne siarczany pokrywają zapotrzebowanie organizmu na siarkę, wciąż panuje pogląd że głównym źródłem tego pierwiastka jest cysteina (15, 16).

Cysteina powstająca jako produkt katabolizmu białek lub na drodze transulfuracji z metioniny odgrywa kluczową rolę w metabolizmie różnych egzo- i endogennych związków jako prekursor kosubstratów reakcji sprzęgania takich jak tauryna, glutation czy wreszcie „aktywny siarczan” (PAPS), Ryc. 2).

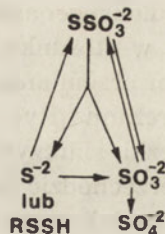
Cysteina zarówno w formie L- jak i D- jest bardzo dobrze wchłaniana z przewodu pokarmowego do krwi gdzie występuje głównie w formie cystyny (17). W wątrobie L-cysteina jest utleniana do kwasu cysteinosulfinowego. Reakcję tę katalizuje dioksygenaza cysteinowego (EC 1.13.11.20), enzym stereospecyficzny tylko w stosunku do formy L- (18, 19). Kwas cysteinosulfinowy ulega dalszym przemianom prowadzącym do powstania tauryny i nieorganicznego siarczanu (Ryc. 2). W wyniku metabolizmu cysteiny powstają również siarczki, siarczyny i tiosiarczany które w t.zw. cyklu tiosiarczanowym mogą przechodzić w siarczany (Ryc. 3), (20, 21). Utlenienie siarczków i innych zredukowanych form siarki do siarczanów zachodzi głównie w mitochondriach w obecności zredukowanego glutatio-



**Ryc. 2.** Centralna rola L-cysteiny w syntezie kosubstratów reakcji sprzęgania: PAPS, tauryny, glutationu.

nu, który bierze udział w redukcyjnym rozczepieniu tiosiarczanów do siarczynów (22, 23).

Poziom nieorganicznych siarczanów w surowicy różnych ssaków jest różny i wynosi od 0,3 do 2,5 mM (24). Może on ulec zmianie, gdy dojdzie do zachwiania równowagi pomiędzy zawartością siarczanów w pokarmie i metabolizmem związków zawierających siarkę a inkorporacją siarczanów do odpowiednich substratów i ich wydalaniem z moczem.



**Ryc. 3.** Cykl tiosiarczanowy (wg. 21).

Do tej pory niewiele wiadomo na temat wpływu różnych czynników takich jak wiek, waga, wzrost czy płeć na poziom siarczanów w surowicy krwi (25). Z nielicznych badań stężenia siarczanów w surowicy wynika, że jest ono stosunkowo wysokie u noworodków (0,47 mM) poczym spada z wiekiem i u trzyletnich dzieci wynosi tyle co u dorosłych (0,33 mM), (26). Nie ma również bezpośrednich danych na temat regulacji hormonalnej poziomu tych anionów w surowicy. Zaobserwowano jednak wzrost stężenia siarczanów we krwi przy nadczynności tarczycy oraz w ciąży i miesiączce, co pozwala przypuszczać iż taka regulacja istnieje (25).

### III. Aktywacja siarczanów

Proces aktywacji siarczanów do adenzyno-3'-fosfo-5'-sulfofosforanu wyjaśnili w latach 50-tych Wilson i Bandurski (27) oraz Robbins i Lipmann (28, 29). Chemiczną syntezę tego związku jako pierwsi wykonali Baddiley i wsp. (30).

#### III-1. Transport siarczanów do wnętrza komórki

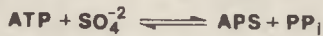
Od dawna uważano, że hydrofilny anion  $\text{SO}_4^{2-}$  nie może łatwo penetrować przez fosfolipidowe błony biologiczne i w związku z tym tylko nieznaczna jego część może dostawać się do komórki na drodze zwykłej dyfuzji. Intensywne badania ostatnich lat przeprowadzone na erytrocytach i komórkach nowotworowych wykazały, że dwustronny transport siarczanów do tych komórek oraz wymiana siarczanów z chlorkami ułatwia wbudowany w błonę komórkową specjalny przenośnik białkowy (31—41). Przenośnik ten został wyizolowany i oczyszczony a jego ciężar cząsteczkowy oznaczono na 85 000—110 000 (42). Białko to jest specyficzne nie tylko w stosunku do jonów  $\text{SO}_4^{2-}$ , gdyż aniony takie jak octany, szczawiany, jony  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  mogą hamować kompetycyjnie transport siarczanów do wnętrza komórki (43). Transport siarczanów jest silnie hamowany również przez niski poziom wapnia wewnątrz komórki (40). Stwierdzono, że zależy on ponadto od pH środowiska obniżając się w miarę jego alkalizacji (35).

#### III-2. Biosynteza adenzyno-3'-fosfo-5'-sulfofosforanu (PAPS)

Synteza PAPS zachodzi w cytozylu i wymaga obecności siarczanów, ATP i enzymów adenylilotransferazy siarczanowej (EC 2.7.7.4.) i kinazy adenylilosiarzanowej (EC 2.7.1.25).

Pierwszy etap aktywacji siarczanów zachodzi przy udziale adenylilotransferazy siarczanowej (Ryc. 4). Równowaga tej reakcji jest znacznie

przesunięta w kierunku syntezy ATP. Przesunięcie jej w prawo jest możliwe tylko w przypadku natychmiastowego i ciągłego usuwania powstających produktów, adenylosiarczanu (APS) i pirofosforanu. Adenylotransferaza siarczanowa z wątroby szczura jest białkiem o masie cząsteczkowej około 500 000 mogącym występować w formie dimeru (44, 45). Enzym ten jest specyficzny w stosunku do ATP, nie wykazuje jednak



**Ryc. 4.** Reakcja katalizowana przez adenylotransferazę siarczanową (EC 2.7.7.4).



**Ryc. 5.** Reakcja katalizowana przez kinazę adenylosiarczanu (EC 2.7.1.25).

wysokiej specyficzności w stosunku do jonów siarczanowych, ponieważ może także wykorzystywać inne aniony grupy VI takie jak  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$  (46). Powstające w tych reakcjach produkty są jednak bardzo niestabilne i prawie natychmiast rozkładają się do AMP i  $\text{PP}_i$  (31, 45).

Następna reakcja katalizowana przez kinazę adenylosiarczanową prowadzi bezpośrednio do syntezy „aktywnego siarczanu” (Ryc. 5). Reakcja ta jest praktycznie nieodwracalna. Dzięki bardzo wysokiemu powinowactwu enzymu do adenylosiarczanu już niewielkie ilości tego związku mogą być wykorzystywane do syntezy PAPS. Kinaza adenylosiarczanowa nie wykazuje absolutnej specyficzności ani w stosunku do adenylosiarczanu ani w stosunku do ATP, które może być zastąpione przez CTP, UTP czy GTP (46, 29).

Pomimo iż oba enzymy niezbędne do syntezy PAPS, nazywane wspólnie „układem aktywującym siarczanu” są obecnie prawie we wszystkich tkankach, pula tego związku *in vivo* nie jest duża i np. w wątrobie szczura wynosi około 30 nmoli/g tkanki (47, 48).

### III-3. Witamina A a metabolizm siarczanów

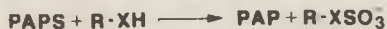
W latach 60-tych ukazało się wiele prac na temat wpływu witaminy A na metabolizm siarczanów. Początkowo uważano, że wszystkie formy tej witaminy (alkoholowa, aldehydowa i kwasowa) wpływają aktywująco na reakcje przenoszenia reszty siarczanowej (49). Następnie stwierdzono wpływ witaminy A na proces aktywacji siarczanów. W wielu pracach opisano spadek aktywności adenylotransferazy siarczanowej przy awitaminozie A oraz stabilizujące działanie witaminy A na ten dość labilny enzym (49—52). Wreszcie Subba Rao i Ganguly (53) wykazali, iż niedobór witaminy A zaburza zarówno aktywację siarczanów jak i przenoszenie ich na odpowiednie akceptory. Autorzy ci stwierdzili, że

obniżony na skutek niedoboru witaminy A w pożywieniu proces aktywacji siarczanów wraca do normy po podaniu retinolu, a powstawanie estrów siarczanowych po podaniu formy kwasowej witaminy. Ponieważ nie wszyscy autorzy potwierdzają przedstawione wyżej wyniki, wpływ witaminy A na metabolizm siarczanów wymaga dalszych badań (54, 55).

#### IV. Reakcje przenoszenia reszty siarczanowej

W warunkach fizjologicznych zarówno aktywacja siarczanów jak i przenoszenie reszty siarczanowej na odpowiedni akceptor zachodzi w tej samej komórce (56).

W przeciwieństwie do aktywacji, przenoszenie reszty siarczanowej wymaga dużej różnorodności enzymów t.zw. sulfotransferaz. Reakcje katalizowane przez sulfotransferazy są na ogół nieodwracalne i przebiegają wg. schematu przedstawionego na Ryc. 6. Dawcą reszty siarczanowej jest



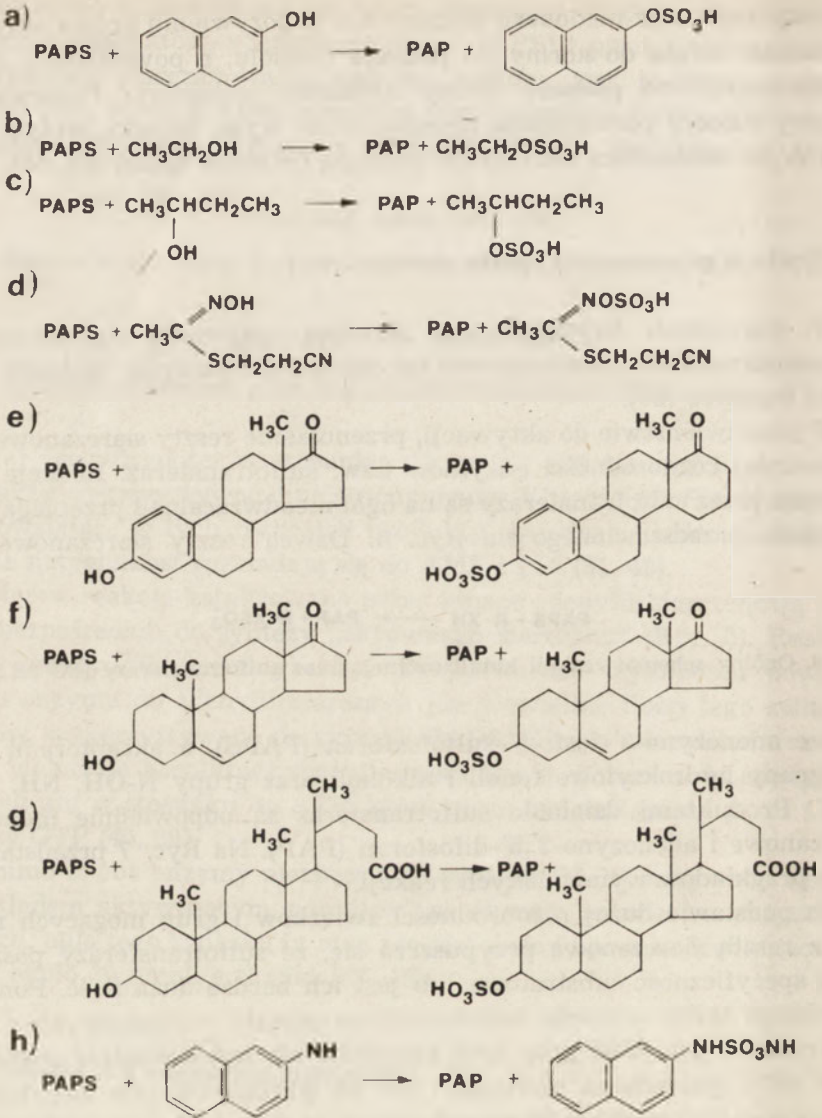
Ryc. 6. Ogólny schemat reakcji katalizowanej przez sulfotransferazy (EC 2.8.2).

zawsze adenozyjno-3'-fosfo-5'-sulfofosforan (PAPS), a akceptorami mogą być grupy hydroksylowe fenoli i alkoholi oraz grupy N-OH, NH, P-OH i SH. Produktami działania sulfotransferaz są odpowiednie monoestry siarczanowe i adenozyjno-3',5'-difosforan (PAP). Na Ryc. 7 przedstawiono kilka przykładów wymienionych reakcji.

Na podstawie dużej różnorodności związków i grup mogących reagować z resztą siarczanową przypuszcza się, że sulfotransferazy posiadają niską specyficzność substratową lub jest ich bardzo duża ilość. Ponieważ dotychczas tylko niewiele sulfotransferaz zostało oczyszczonych i scharakteryzowanych, ilość grup tych enzymów nie jest dokładnie znana.

W 1978 sporządzono pierwszą i jak się wkrótce okazało niepełną klasyfikacją sulfotransferaz biorących udział w procesach detoksykacji (45). Klasyfikacja ta zawierała następujące enzymy: sulfotransferazę arylową (PST; EC 2.8.2.1), 3β-hydroksysterydową (EC 2.8.2.2.), aryloaminową (EC 2.8.2.3), estronową (EC 2.8.2.4), sulfotransferazę estrów tyrozyny (EC 2.8.2.9) i sulfotransferazę soli kwasów żółciowych (EC 2.8.2.14).

Koniec lat 70-tych był okresem bardzo intensywnych badań nad sulfotransferazami kiedy to opracowano szereg metod ich oczyszczania. Pozwoliło to między innymi na wyizolowanie z wątroby szczura czterech homogennych sulfotransferaz arylowych i sześciu sulfotransferaz sterydowych (45, 57—62). W związku z tym zaistniała konieczność wprowadzenia uzupełnień do opracowanej już klasyfikacji. W 1979 r. Komitet Nomenklatury Międzynarodowej Unii Biochemicznej zatwierdził nową, nieco zmienioną



**Ryc. 7.** Przykłady reakcji katalizowanych przez sulfotransferazy (wg. 45). Akcepto-rami reszty siarczanowej są: a) fenole — naftol, b) alkohole pierwszorzędowe — etanol i c) drugorzędowe — 2-butanol, d) hydroksyloaminy — 2-cjanoetylotiooksym aldehydu octowego, e) hydroksysterdy fenolowe — estron i f) alicykliczne — dehydroepiandrosteron, g) kwasy żółciowe — kwas litocholowy, h) aryloaminy — 2-naftyloamina.

i poszerzoną klasyfikację sulfotransferaz (Tabela 1), (45). Przedstawiona w Tabeli 1 klasyfikacja dotyczy jak już wspomniałam sulfotransferaz biorących udział w procesach detoksykacji. Nie obejmuje ona wszystkich wyizolowanych do tej pory enzymów tej grupy, jak np. sulfotransferazy mukopolisacharydowej (EC 2.8.2.5), cerebrozydowej (EC 2.8.2.11) czy licznych bardzo słabo zbadanych sulfotransferaz t-RNA.



Tabela 1.

Klasyfikacja sulfotransferaz biorących udział w reakcjach detoksykacji (wg. 45).

EC numer	Nazwa	Aktywna w stosunku do:
2.8.2.1	Sulfotransferaza arylowa	fenoli, katecholamin, estrów tyrozyny, organicznych hydroksylamin
2.8.2.2	Sulfotransferaza 3- $\beta$ -hydroksysterydowa	hydroksysterydów, pierwszo i drugorzędowych alkoholi
2.8.2.4	Sulfotransferaza estronowa	grup fenolowych pierścienia aromatycznego sterydów
2.8.2.14	Sulfotransferaza soli kwasów żółciowych	sprzężonych i wolnych kwasów żółciowych

#### IV-1. Przyłączenie reszty siarczanowej a detoksykacja związków egzogennych

W 1876 roku B a u m a n jako pierwszy wykazał, że u psów na diecie zawierającej fenol powstają nietoksyczne estry siarczanowe tego związku (63). W następnych latach okazało się, że przyłączenie reszty siarczanowej prowadzi do zobojętnienia wielu innych egzogennych związków. Mechanizm detoksykacji nie zawsze jest taki jak w przypadku fenolu, a więc nie zawsze polega on tylko na powstawaniu wysoce zjonizowanych, lepiej rozpuszczalnych w wodzie a zatem łatwiej usuwanych z organizmu estrów. Przyłączenie reszty siarczanowej może również zapobiegać tworzeniu się reaktywnych matabolitów, tak jak to zaobserwowano w przypadku paracetamolu (N-acetylo-p-aminofenol), związku stosowanego jako lek przeciwbólowy i przeciwgorączkowy (64).

Metabolizm paracetamolu polega głównie na sprzęganiu z kwasem siarkowym i glukoronowym. Związek ten może również ulegać katalizowanemu przez układ cytochromu P-450 utlenieniu. Ta ostatnia droga prowadzi jednak do powstawania hepatotoksycznych pośredników, które ulegają zobojętnieniu w reakcji z grupą -SH glutationu. Neutralizacja toksycznych pośredników zachodzi tak długo jak długo jest osiągalny zredukowany glutation.

Zaobserwowano, że przy wysokich dawkach paracetamolu dochodzi do spadku ilości estrów siarczanowych oraz wzrostu ilości produktów sprzęgania z kwasem glukouronowym i toksycznych produktów utleniania. Następnie wykazano, że toksyczność paracetamolu znacznie spada po podaniu siarczanu sodu lub jednego z prekursorów jonów  $\text{SO}_4^{2-}$ , N-acetylocysteiny (65—67). Przypuszcza się, że spadek toksyczności paracetamolu występujący po podaniu siarczanów związany jest z pośrednim wpływem tych anionów na metabolizm cysteiny, która w tych warunkach w większym stopniu jest wykorzystywana do syntezy glutationu.

Podobny mechanizm zobojętniającego działania siarczanów stwierdzono w przypadku innego egzogenego, toksycznego związku, harmolu (7-hydrokxy-1-metylo-9H-pirydo[3,4-b]indol). W tym przypadku podanie siarczanów obniża powstawanie toksycznych produktów sprzęgania tego związku z kwasem glukuronowym (68).

Przez wiele lat reakcje detoksykacji umiejscawiano głównie w wątrobie. Ostatnio ukazało się szereg prac opisujących udział innych narządów w tym procesie. Stwierdzono, że związki fenolowe dostające się do organizmu drogą doustną są sprzęgane z resztą siarczanową już w przewodzie pokarmowym (11, 12, 69, 70), a dostające się przez drogi oddechowe w płucach (71—73). Wątroba odgrywa bardzo istotną rolę w detoksykacji fenolu podawanego z pominięciem przewodu pokarmowego czy płuc (74).

#### IV-2. Przyłączenie reszty siarczanowej a zobojętnianie związków endogennych

Przyłączenie reszty siarczanowej odgrywa bardzo istotną rolę również w funkcji i metabolizmie wielu biologicznie czynnych, endogennych związków. I tak, estry siarczanowe cerebrozydów, produkty działania sulfotransferazy cerebrozydowej (CST; EC 2.8.2.11), są istotnym składnikiem otoczki mielinowej izolującej włókna nerwowe. Estry siarczanowe sterydów powstałe w wyniku działania szeroko rozpowszechnionej w wielu tkankach i gruczołach ssaków sulfotransferazy 3 $\beta$ -hydroksysterydowej (EC 2.8.2.2.) i estronowej (EC 2.8.2.4) są nie tylko końcowymi produktami przemian tych związków, ale mogą również działać jako aktywne pośredniki metaboliczne lub być formą przechowywania hormonów sterydowych (75). Katalizowane przez sulfotransferazę arylową (PST; EC 2.8.2.1) przyłączenie reszty siarczanowej do grup hydroksyloowych fenoli odgrywa bardzo ważną rolę w przemianach amin biogennych, a szczególnie katecholamin (76—83).

O tym, że katecholaminy mogą ulegać estryfikacji kwasem siarkowym wiadomo od przeszło czterdziestu lat, kiedy to R i c h t e r wykazał, że po doustnym podaniu adrenaliny więcej niż 65% tego związku pojawia się w moczu w formie nieczynnego farmakologiczne estru siarczanowego (76, 77). Lata 60-te, a szczególnie 70-te i 80-te były okresem intensywnych badań nad udziałem estrów siarczanowych w matabolizmie katecholamin (78—81). Za jedno z ważniejszych odkryć ostatnich kilkunastu lat uważa się wykazanie, że w surowicy człowieka prawie cała obecna tam dopamina (99%) i zdecydowana większość noradrenaliny i adrenaliny (75%) występuje w formie estrów siarczanowych (83).

W mózgu wykazano obecność estrów siarczanowych katecholamin oraz ich O-metylowanych i dezaminowanych pochodnych (84—86). Do ważniejszych metabolitów noradrenaliny występujących w mózgu należą estry siarczanowe 3-metoksy-4-hydroksy fenyloglikolu (MHPG) i 3,4-dihydro-

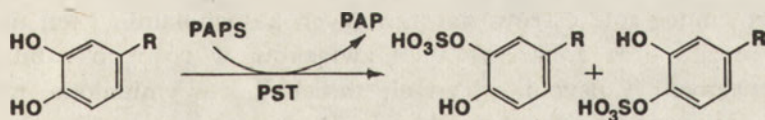
ksy fenyloglikolu (DHPG) (87—90). Uważa się, że pomiar stężenia siarczanu MHPG w mózgu lub nawet w moczu może mieć istotne znaczenie dla śledzenia mózgowej aktywności noradrenaliny (88).

W ostatnim czasie ukazało się sporo prac na temat metabolizmu katecholamin w płynie mózgowo-rdzeniowym, szczególnie po wykazaniu, iż w chorobie Parkinsona 80% wydalanej z moczem, endogennej dopaminy występuje w formie zestryfikowanej kwasem siarkowym (92, 93). Choroba Parkinsona związana jest z degeneracją neuronów dopaminergicznych i obniżeniem poziomu dopaminy w niektórych częściach mózgu. Lekiem z wyboru stosowanym w tej jednostce chorobowej jest 3,4-dihydroksyfenyloalanina (L-DOPA). W płynie mózgowo-rdzeniowym chorych zarówno leczonych jak i nieleczonych preparatem L-DOPA wykazano obecność estrów siarczanowych dopaminy przy równoczesnym braku wolnej dopaminy (93, 94).

Poza wymienionymi katecholaminami i ich metabolitami, również tyramina ulega estryfikacji w obecności sulfotransferazy arylowej (95, 96). Spadek ilości estru siarczanowego tyraminy zaobserwowano u chorych z głębokimi depresjami (97). Nie wiadomo jednak czy spadek ten jest spowodowany niedoborem sulfotransferazy arylowej czy zaburzeniami w syntezie PAPS. Zaburzenia włączeniu tyraminy z resztą siarczanową stwierdzono również u osób z tyramino-wrażliwą migreną (98).

W mózgu i płytkach krwi wykazano obecność estru siarczanowego pochodnej tryptofanu, 5-hydroksy-tryptaminy (serotoniny), (95, 96, 99—102). Do tej pory nie jest znana fizjologiczna rola tej drogi przemiany serotoniny.

W wyniku przyłączenia reszty siarczanowej do katecholamin powstają estry w pozycji 3-O- i/lub 4-O- (91), (Ryc. 8). Stosunek ilościowy tych



Ryc. 8. Powstawanie 3-O- i 4-O-estrów siarczanowych katecholamin.

izomerów zbadano dla dopaminy i stwierdzono, że zarówno w wątrobie jak i w mózgu ilościowo przeważa forma 3-O- (94—96). Przypuszcza się, że jest to wynikiem działania arylosulfataz (EC 3.1.6.1), które wykazują wyższą aktywność w stosunku do estrów siarczanowych w pozycji para niż meta (104—106).

Dość powszechna w tkankach ssaków obecność arylosulfataz sugeruje dodatkową oprócz ostatecznej degradacji katecholamin rolę estrów siarczanowych tych związków, polegającą na miejscowej i/lub tylko czasowej ich inaktywacji.

Przypuszcza się również, że estry katecholamin mogą pełnić rolę czynnych pośredników metabolicznych lub być formą transportowania lub magazynowania tych związków. Potwierdzają to badania *Buu* i *Kuchel* (107), którzy stwierdzili, że 3-O- i 4-O-estry siarczanowe dopaminy w obecności  $\beta$ -hydroksylazy dopaminy mogą przekształcać się w wolną noradrenalinę.

Rozważano możliwość współzależności powstawania estrów siarczanowych i reakcji O-metylacji katecholamin. Współzależność tych dwóch reakcji wykazano w wątrobie szczura w przypadku estronu (108, 109). Nie stwierdzono jednak podobnej zależności w stosunku do kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego. W przypadku tego związku przyłączenie reszty siarczanowej podobnie jak i przyłączenie grupy metylowej przebiega niezależnie, pomimo iż każda z tych reakcji zachodzi znacznie łatwiej w stosunku do grupy OH- znajdującej się w pozycji meta (106).

Odpowiedzialna za powstawanie estrów siarczanowych fenoli sulfotransferaza arylova (PST) jest cytozolowym enzymem, którego obecność wykazano w różnych tkankach człowieka takich jak wątroba, nerki, nadnercza, przewód pokarmowy, erytrocyty, trombocyty (69, 70, 95, 96, 110, 111). Zmierzono poziom sulfotransferazy arylowej w różnych częściach mózgu używając serotoniny jako substratu akceptorowego (100). Najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono w podwzgórze a najniższą we wzgórze.

Ostatnio wykazano w mózgu i płytkach krwi człowieka obecność dwóch form sulfotransferazy arylowej, z których jedna nazwana P jest specyficzna w stosunku do fenolu, natomiast druga, M w stosunku do monamin (112—114). Według *Renskera* i wsp. (96) sulfotransferaza arylova z trombocytów może służyć jako dobry model do badania tego enzymu w mózgu człowieka. Jeżeli spostrzeżenie *Renskera* i wsp. są słuszne, badanie sulfotransferazy arylowej z trombocytów pozwoli lepiej zrozumieć rolę estrów siarczanowych katecholamin i ich metabolitów w mózgu oraz znaczenie tych związków w różnych zaburzeniach neurologicznych i psychiatrycznych takich jak wymienione wcześniej depresje, migrena czy wreszcie choroba Parkinsona.

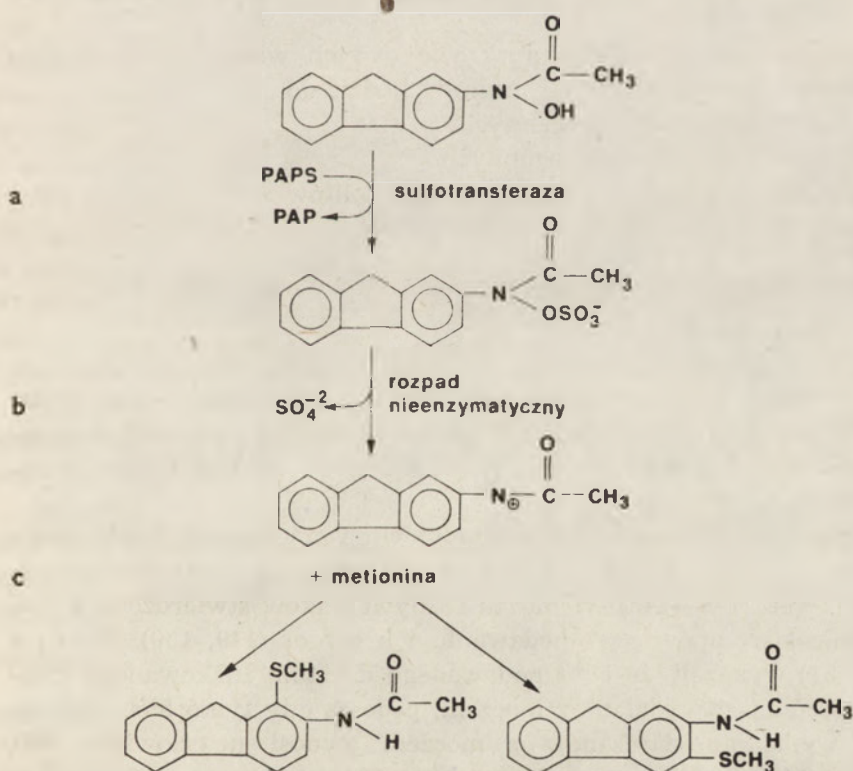
#### IV-3. Przenoszenie reszty siarczanowej a kancerogeneza

W ostatnich latach zwrócono szczególną uwagę na niestabilne połączenia reszty siarczanowej z N-hydroksyloaminami i N-hydroksyloamidami (115). Zainteresowanie tymi związkami wzrosło po stwierdzeniu, że N-O-estry siarczanowe N-hydroksy-2-acetyloaminofluorenu (N-OH-AAF) i jego prekursora acetyloaminofluorenu (AAF) pomimo swej labilności mają działanie kancerogenne (116, 117).

Stosując znakowany w różnych pozycjach, radioaktywny preparat N-OH-AAF wykazano, że zarówno pierścienie fluorenu jak i reszta ace-

tylowa tego związku wiążą się kowalencyjnie z RNA i białkiem (117). Ilość wiązań kowalencyjnych pomiędzy N-OH-AAF a DNA, RNA i białkiem wzrasta w obecności aktywnego siarczanu (PAPS), (119). Stwierdzono istnienie zależności pomiędzy kancerogennym działaniem AAF a aktywnością sulfotransferazy (119).

W laboratorium Muldera (120, 121) wykazano, że pentachlorofenol (PCP) i 2,6-dichloro-4-nitrofenol (DCNP) wybiórczo hamują przyłączenie reszty siarczanowej do różnych pochodnych fenolowych. Związki te działają zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Podanie jednego z wymienionych inhibitorów powoduje spadek poziomu estrów siarczanowych N-OH-AAF w wątrobie, równoległy wzrost ilości estrów glukuronowych oraz znaczne obniżenie ilości kowalencyjnych wiązań pomiędzy N-OH-AAF a DNA, RNA i białkiem (122, 123). Z badań *in vivo* wynika, że co najmniej 70% połączeń AAF z DNA jest utworzone poprzez N-O-ester siarczanowy N-OH-AAF (122). Przyłączenie reszty siarczanowej do grupy hydroksylowej N-OH-AAF prowadzi do powstania labilnego estru, który rozpadając się samoistnie tworzy produkt zdolny do reagowania z dostępnymi grupami nukleofilnymi (Ryc. 9). Głównym miejscem łączenia się



**Ryc. 9.** Reakcja N-OH-AAF z metioniną (wg. 6): a) estryfikacja grupy hydroksylowej resztą siarczanową oraz powstawanie labilnego estru, b) nieenzymatyczny rozpad estru siarczanowego N-OH-AAF do pośrednika zdolnego reagować z metioniną, c) powstawanie 1- i 3-metylotio AAF.

reaktywnego pośrednika z białkiem jest atom siarki metioniny, a z kwasami nukleinowymi C<sub>8</sub> guanozyny lub dezoksyguanozyny (119, 124, 122).

N-OH-AAF poza kancerogennym ma również hepatotoksyczne działanie. Wykazano istnienie zależności pomiędzy toksycznością tego związku a aktywnością sulfotransferazy wątrobowej (125—128). Ponadto zaobserwowano całkowity zanik toksyczności tego kancerogenu po uprzednim podaniu PCP czy DCNP (128).

Pomimo iż udział estrów siarczanowych N-OH-AAF w kancerogennym działaniu tego związku nie wzbudza wątpliwości, wymaga on jednak dalszych badań tym bardziej, że przyłączenie reszty siarczanowej nie jest jedyną reakcją prowadzącą do powstawania kancerogennych pośredników AAF (129—133).

Oprócz AAF w latach 70-tych zidentyfikowano szereg innych związków działających kancerogennie w formie estrów siarczanowych. Do najlepiej zbadanych należą: N-OH-2-acetyloaminofenantren (134, 135) N-OH-fenacetyna (138, 139), N-OH-ksantyna (140—143) czy wreszcie C-O-ester, 1-OH-safarol (144, 145). Związki te podobnie jak estry siarczanowe N-OH-AAF mogą wiązać się kowalencyjnie z nukleofilnymi grupami DNA, RNA i białka.

Z przedstawionych w dużym skrócie danych widać, że w wyniku przyłączenia reszty siarczanowej może dochodzić do:

- a) detoksykacji związków egzogennych
- b) zubożenia związków endogennych
- c) powstawania fizjologicznie czynnych metabolitów
- d) powstawania kancerogennych pośredników

## V. Usuwanie siarczanów

Nieorganiczne siarczany mogą być usuwane z organizmu jako wolne jony  $\text{SO}_4^{2-}$  lub jako estry. U szczura 80% wydalanych z moczem siarczanów występuje w formie wolnej, reszta tj. około 20% w formie związanej (24).

Nieorganiczne siarczany są usuwane głównie przez nerki. Wielu badaczy wykazało wzrost poziomu siarczanów w surowicy chorych z niewydolnością nerek (146—148). W moczu różnych ssaków stwierdzono wysokie stężenie siarczanów przy podawaniu ich *per os* (149, 150). Berry i w s.p. (51) wykazali, że 58% podawanego doustnie znakowanego [<sup>35</sup>S]-siarczanu sodu jest wydalane z moczem, podczas gdy tylko 5% z kałem. Dzielne wydalanie siarczanów z moczem wynosi u człowieka 360, a u szczura 1400—1700 μmoli/kg wagi (152—154).

Siarczany ulegają swobodnej filtracji w kłębkach nerkowych, po czym część z nich wchłania się zwrotnie w kanalikach dystalnych, a reszta po przekroczeniu odpowiedniej wartości progowej jest wydalana z moczem

ostatecznym. Kanalikowa sekrecja siarczanów wydaje się nie mieć większego znaczenia dla usuwania tych anionów z organizmu (155).

Do tej pory niewiele wiadomo na temat mechanizmu reabsorpcji zwrotnej siarczanów z kanalików nerkowych do krwi. Wiadomo jedynie, że transport ten zależy od stężenia jonów sodowych i od stężenia dwuwęglanów (156, 157). Mechanizm czynnego transportu siarczanów w nerce wydaje się być odmienny od obserwowanego w erytrocytach, gdyż nie jest on hamowany ani przez chlorki ani przez inne specyficzne dla erytrocytów inhibitory transportu tych anionów (158).

Zdecydowana większość substratów sulfotransferaz jest dobrze rozpuszczalna w tłuszczach w związku z czym są one stosunkowo wolno usuwane z organizmu. Sprzężenie tych związków z resztą siarczanową zwiększa ich polarność oraz ułatwia wydalanie powstających produktów.

Estry siarczanowe podobnie jak i nieorganiczne siarczany są wydalane głównie z moczem, jakkolwiek mogą być również usuwane z żółcią (159, 160). Dzielne wydalanie estrów siarczanowych z moczem wynosi u człowieka 25 a u szczura 125  $\mu$ moli/kg wagi (153, 162). Brak jest danych dotyczących wydalania tych związków z kałem.

Droga wydalania zależy między innymi od gatunku zwierzęcia i tak np. szczur wydalala wiele związków z żółcią, natomiast królik z moczem (161). Innym czynnikiem wpływającym na „wybór” drogi eliminacji danego związku z organizmu jest jego ciężar cząsteczkowy i tak szczur wydalala z żółcią związki o masie cząsteczkowej powyżej  $325 \pm 50$ , natomiast z moczem związki o masie cząsteczkowej poniżej  $352 \pm 50$  (161).

W badaniach *in vivo* wykazano, że estry siarczanowe egzogenego akceptora harmolu (7-hydroksy-1-metylo-9H pirydo[3,4-b]indol), które w warunkach fizjologicznych są usuwane głównie z moczem, w przypadku wyłączenia z obiegu krwi nerek mogą być wydalane z żółcią (159). Wzrost diurezy powoduje wyraźny wzrost ekskrecji estru siarczanowego harmolu z moczem oraz spadek wydalania tego związku z żółcią. Odwrotną sytuację a mianowicie wzrost wydalania estru siarczanowego harmolu z żółcią kosztem usuwania go z moczem obserwowano po podaniu nafenopinu, związku przyspieszającego wydalanie żółci.

Badania te potwierdzają sugerowaną wcześniej kompensacyjną zależność różnych dróg usuwania estrów siarczanowych z organizmu oraz wskazują na możliwość zmiany drogi wydalania tych związków w różnych stanach patologicznych.

Zaakceptowano 15 kwietnia 1983.

## PIŚMIENNICTWO

1. Kennedy J. F., w *Advances in Clinical Chemistry* (Bodensky O., Latner A. L., eds.), vol. 18, p. 1, Academic Press, N.Y., 1976.
2. Silbert J. E., w *Molecular Pathology of Connective Tissues* (Perez-Tamayo R., Rojkin M., eds.), pp. 323 i 355, Marcel Dekker, N.Y., 1973.

3. Farooqui A. A., (1978), *Int. J. Biochem.*, **9**, 709—716.
4. Mulder G. J., Caldwell J., v.Kempen G. M. J., Vouk R. J., (eds.) *Sulfate Metabolism and Sulfate Conjugation, Proceedings of an International Workshop in Noordwijkerhout, The Netherlands. Taylor i Francis LTD., London, 1982.*
5. Powell G. M., Olaversen A. H., w *Sulfate of Drugs and Related Compounds* (Mulder G. J., ed.), ch. 7, CRC Press Boca Raton, Fl., 1981.
6. Mulder G. J., w *Sulfation of Drugs and Related Compounds* Mulder G. J., ed., ch. 8, CRC Press Boca Raton, Fl., 1981.
7. Mulder G. J., w *Sulfation of Drugs and Related Compounds* (Mulder G. J., ed.), ch. 4, CRC Press Boca Raton, Fl., 1981.
8. De Meio R. H., w *Metabolism of Sulfur Compounds. Metabolic Pathways* (Greenberg D. M., ed.), vol. 7, 3rd ed., ch. 8, Academic Press, N.Y., 1975.
9. Krijgsheld K. R., Frankena H., Scholtens E., Zweens J., Mulder G. J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 492—500.
10. Batt E. R., (1969), *Am. J. Physiol.*, **217**, 1101—1104.
11. Deyrup I. J., (1963), *Fed. Proc.*, **22**, 332—338.
12. Anest C., Kennedy R., Valk G., Adamson L., (1965), *J. Lab. Clin. Med.*, **65**, 903—911.
13. Cardin C. J., Mason J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 46—54.
14. Cardin C. J., Mason., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 937—946.
15. Wellers G., (1964), *Ann. Nutr. Aliment.*, **18**, 19—20.
16. Mulder G. J., w *Sulfation of Drugs and Related Compounds* (Mulder G. J., ed.), ch. 3, CRC Press Boca Raton, Fl., 1981.
17. Crawhall J. C., Segal S., (1967), *Biochem. J.*, **105**, 891—896.
18. Singer T. P., w *Metabolism of Sulfur Compounds, Metabolic Pathways* (Greenberg D. M., ed.), vol. 7, pp. 535—546, Academic Press, N.Y., 1975.
19. Ewtz L., Sorbo B., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 296—305.
20. Dziewiatkowski D. D., (1945), *J. Biol. Chem.*, **161**, 723—729.
21. Stipanuk M. H., (1979), *J. Nutr.*, **109**, 2126—2139.
22. Koy A., Frendo J., Janik Z., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 791—795.
23. Bartholomew T. C., Powell G. M., Dodgson K. S., Curtis C. G., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2431—2437.
24. Krijgsheld K. R., Scholtens E., Mulder G. J., (1980), *Comp. Biochem. Physiol.*, **67**, 683—686.
25. Tallgren C. G., (1980), *Acta Med. Scand.*, Suppl.
26. Cocchetto D. M., Levy G., (1981), *J. Pharm. Sci.*, **70**, 331—333.
27. Wilson L. G., Bandurski R. S., (1956), *Arch. Biochem. Biophys.*, **62**, 503—506.
28. Robbins P. W., Lipmann F., (1956), *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6409—6410.
29. Robbins P. W., Lipmann F., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 681—685.
30. Badilley J., Buchanan J. G., (1957), *Proc. Chem. Soc.*, London, 147—148.
31. Steck T. L., (1974), *J. Cell. Biol.*, **62**, 1—19.
32. Zaki L., Fasold B., Schuhmann B., Passow H., (1975), *J. Cell. Physiol.*, **86**, 471—494.
33. Lepke S., Passow H., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 353—370.
34. Wolosin J. M., Ginsburg H., Cabantchik Z. I., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2419—2427.
35. Cabantchik Z. I., Knauf P. A., Rothstein A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 239—302.
36. Ross A. H., McConnell H. M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1318—1325.



37. Knauf P. A., Fuhrmann G. F., Rothstein S., Rothstein A., (1977), *J. Gen. Physiol.*, **69**, 363—386.
38. Low P. S., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **514**, 262—273.
39. Deuticke B., v.Bentheim M., Beyer E., Kamp D., (1978), *J. Membr. Biol.*, **44**, 135—158.
40. Rakitzis E. T., Gilligan P. J., Hoffmann J. F., (1978), *J. Membr. Biol.*, **41**, 101—115.
41. Ormos G., Manyai S., (1978), *J. Physiol.*, **276**, 501—513.
42. Grinstein S., McCulloch L., Rothstein H., (1979), *J. Gen. Physiol.*, **73**, 493—514.
43. Schnell K. F., Gerhafdt S., Schoppe-Fredenburg A., (1977), *J. Membr. Biol.*, **30**, 319—350.
44. Levi A. S., Wolf G., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 262—282.
45. Jakoby W. B., Sekura R. D., Lyon E. S., Marcus C. J., Wang Jun-Lan, w *Enzymatic Basis of Detoxication* (Jakoby W. B., ed.), vol. 2, p. 199, Academic Press N.Y., 1980.
46. Wilson G. J., Bandurski R. S., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 975—981.
47. Mulder G. J., Scholtens E., (1978), *Biochem. J.*, **172**, 247—251.
48. Wong K. P., Yeo T., (1979), *Biochem. J.*, **181**, 107—110.
49. Wolf G., Varandani P. T., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **43**, 501—512.
50. Varandani P. T., Wolf G., Jahson B. C., (1960), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 97—100.
51. Sundaresan P. R., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 95—109.
52. Levi A. S., Geller S., Roor D. N., Wolf G., (1968), *Biochem. J.*, **109**, 69—74.
53. Subba Rao K., Sastry P. S., Ganguly J., (1963), *Biochem. J.*, **87**, 312—317.
54. Pasternak C. A., Humphries S. K., Pirie A., (1963), *Biochem. J.*, **86**, 382—384.
55. Mukherji B., Bachhawet B. K., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 318—320.
56. Mulder G. J., w *Sulfation of Drugs and Related Compounds* (Mulder G. J., ed.), ch. 1, CRC Press Boca Raton, Fl., 1981.
57. Sekura R. D., Jakoby W. B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5658—5663.
58. Sekura R. D., Jakoby W. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, w druku.
59. Singer S. S., Bruns L., (1979), *Can. J. Biochem.*, **58**, 660—666.
60. Singer S. S., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 340—349.
61. Lewis W. G., Witt K. R., Singer S. S., (1981), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **166**, 70—75.
62. Singer S. S., Federspiel M. J., Green J., Lewis W. G., Martin V., Witt K. R., Tappel J., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **700**, 110—117.
63. Bauman E., (1879), *Arch. Gen. Physiol.*, **13**, 285—308.
64. Krijgsheld K. R., (1982), w *The Availability of Inorganic Sulfate Conjugation of Xenobiotics in the Rat in vivo*, teza doktorska.
65. Slattery I. T., Levy G., (1977), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **18**, 167—170.
66. Lin J. H., Levy G., (1981), *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2723—2725.
67. Galinsky R. E., Levy G., (1981), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **219**, 506—510.
68. Krijgsheld K. R., Koster H. J., Scholtens E., Mulder G. J., (1983), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, w druku.
69. Barańczyk-Kuźma A., Borchardt R. T., Schasteen C. S., Pinnick C. L., *Biochim. Biophys. Acta*, w druku.

70. Anderson R. J., Weinshilboum R. M., (1980), *Clin. Chim. Acta*, **103**, 79—90.
71. Metha R., Cohen G. M., (1979), *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 2479—2484.
72. Cohen G. M., Gibby E. M., Metha R., (1981), *Nature*, **291**, 662—664.
73. Hogg S. I., Curtis C. G., Upshall D. G., Powell G. M., (1981), *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1551—1555.
74. Powell G. M., Miller J. J., Olaversen A. H., Curtis C. G., (1974), *Nature*, **252**, 234—235.
75. Dodgson K. S., Rose F. A., w *Sulfotransferase in Metabolic Pathways* (Fishman W. H., ed.), vol. 9, 3rd ed., ch. 9, Academic Press, N.Y., 1975.
76. Richter D., (1940), *J. Physiol.*, **98**, 361—374.
77. Richter D., Macintosh F. C., (1941), *Am. J. Physiol.*, **135**, 1—5.
78. Haggendal J., (1963), *Acta Physiol. Scand.*, **59**, 255—260.
79. Kahane Z., Essner A. H., Kline N. S., Vestergaard P., (1967), *J. Lab. Clin. Med.*, **69**, 1042—1050.
80. Goodall M., Alton H., (1972), *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2401—2409.
81. Jenner W. N., Rose F. A., (1974), *Nature*, **252**, 237—238.
82. Bronaugh R. L., Hattox S. E., Hoehn N. M., Murphy R. C., Rutledge C. O., (1975), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **195**, 441—452.
83. Johnson G. A., Baker C. A., Smith R. T., (1980), *Life Sci.*, **26**, 1591—1598.
84. Buu N. T., Duhaime J., Savard C., Truang I., Kuchel O., (1981), *J. Neurochem.*, **36**, 769—772.
85. Barańczyk-Kuźma A., Borchardt R. T., Schasteen C. S., Pinnick C. L., w *Phenolsulfotransferase* (Usdin E., ed.), Macmillan Press, Ltd., London, 1981.
86. Barańczyk-Kuźma A., Borchardt R. T., Schasteen C. S., Pinnick C. L., (1981), *Psychopharmacol. Bull.*, **17**, 50—56.
87. Schenberg S. M., Schildkraut J. J., Breese G. R., Kopin I. J., (1968), *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 247—254.
88. Sugden R. F., Eccleston D., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 2461—2468.
89. Eccleston D., Ritchie J. M., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 635—646.
90. Stone E. A., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 589—601.
91. Van Kempen G. M. J., Pennings E. J. M., w *Sulfate Metabolism and Sulfate Conjugation, Proceedings of an International Workshop in Noordwijkerhout, The Netherlands* (Mulder G. J., Caldwell J., v.Kempen G. M. J., Vonk R. J., eds.), Taylor i Francis Ltd., London, 1982.
92. Rutledge C. O., Hoehn M. M., (1973), *Nature*, **244**, 447—450.
93. Tyce G. M., Sharpless N. S., Kerr F. W., Muenster M. S., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 210—212.
94. Hammond D. L., Rorie D. K., Sharpless N. S., Yaks T. L., Tyce G. M., 1981, w *Phenolsulfotransferase* (Usdin E., ed.) Macmillan Press, Ltd, London.
95. Hart R. F., Renskers K. J., Nelson E. B., Roth I. A., (1979), *Life Sci.*, **24**, 125—130.
96. Renskers K. J., Feor K. D., Roth J. A., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 1362—1368.
97. Bonham Carter S. M., Goodwin B. L., Sandler M., (1980), *British J. Clin. Pharmacol.*, **10**, 305—312.
98. Smith I., Mcleod M. N., Dawidson G., (1976), *Am. J. Psychiatry.*, **133**, 1191—1195.
99. Hidaka H., Nagatsu T., Yagi K., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 783—785.
100. Hidaka H., Austin J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 132—137.

101. Rein G., Glover V., Sandler M., (1981), *Clin. Chim. Acta*, **111**, 247—256.
102. Anderson R. J., Weinshilboum R. M., Phillips S. F., Broughton D. D., (1981), *Clin. Chim. Acta*, **110**, 157—167.
103. Jenner W. N., Rose F. A., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 109—114.
104. Pennings F. J. M., v.Kempen G. M. J., (1980), *Biochem. J.*, **191**, 133—138.
105. Jenner W. N., Rose F. A., w Conjugation in Drug Biotransformation (Aitio A., ed.), p. 501, Elsevier/North Holland Biomedical, 1978.
106. Pennings E. J. M., v.Kempen G. M. J., (1981), *Biochem. J.*, **193**, 869—874.
107. Buu N. T., Kuchel O., (1979), *Can. J. Biochem.*, **57**, 1159—1162.
108. Miyazaki M., Yoshizawa I., Fishman J., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1669—1672.
109. Brooks S. C., Horn L., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 233—241.
110. Bostrom H., Wengle B., (1967), *Acta Endocrin.*, **56**, 285—308.
111. Foldes A., Meek J. L., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 303—307.
112. Rein G., Sandler M., w Phenolsulfotransferasu in Mental Health Research (Usdin E., Sandler M., eds.) Macmillan Press, Ltd, London, 1981, pp. 99—126.
113. Sandler M., Glover V., Bonham Carter S. M., Littlewood J., Rein G., w Phenolsulfotransferase in Mental Health Research (Usdin E., Sandler M., eds.) pp. 186—206, Macmillan Press, Ltd, London, 1981.
114. Glover V., Bonham Carter S. M., Littlewood J., Rein G., Sandler M., w Sulfate Metabolism and Sulfate Conjugaton, Proceedings of an International Workshop in Noordwijkerhout, The Netherlands, (Mulder G. J., Caldwell J., v.Kempen G. M. J., Vonk R. J., eds.), Taylor i Francis Ltd., London 1982.
115. Kadluber F. F., Miller J. A., Miller E. C., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 2350—2359.
116. Maher V. M., Miller E. C., Miller J. A., Szybalski W., (1968), *Mol. Pharmacol.*, **4**, 411—426.
117. Irring C. C., (1971), *Xenobiotica*, **1**, 387—398.
118. King C. M., Phillips B., (1968), *Science*, **159**, 1351—1353.
119. De Baun J. R., Rowley J. Y., Miller E. C., Miller J. A., (1968), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **129**, 268—273.
120. Mulder G. J., Scholtens E., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 553—559.
121. Koster H., Scholtens E., Mulder G. J., (1979), *Med. Biol.*, **57**, 340—344.
122. Meerman J. H. N., Beland F. A., Mulder G. J., (1981), *Carcinogenesis*, **2**, 413—416.
123. Meerman J. H. N., v.Doorn A. B. D., Mulder G. J., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 3772—3779.
124. King C. M., Phillips B., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6209—6216.
125. De Baun I. R., Smith J. Y. R., Miller E. C., Miller J. A., (1970), *Science*, **167**, 184—186.
126. Ieving C. C., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 2959—2961.
127. Weinsberger J. H., Yamamoto R. S., Willams G. M., Grant-ham P. H., Matsushima T., Weisburger E. K., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 491—500.
128. Meerman J. H. N., Mulder G. J., (1971), *Life Sci.*, **28**, 2361—2365.
129. Floyd R. A., Soong L. M., Culver P. L., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 1510—1519.
130. Floyd R. A., Soong L. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **498**, 249—256.
131. Irving C. C., (1970), *Xenobiotica*, **1**, 387—388.
132. Lotlikar P. D., (1971), *Xenobiotica*, **1**, 543—544.

133. Bartsch H., Dworkin D., Miller E. C., Miller J. A., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **286**, 272—298.
134. Scribner J. D., Naimy N. K., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 1159—1164.
135. De Baum J. R., Miller E. C., Miller J. A., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 577—595.
136. Blunk J. M., Crowther C. E., (1975), *Eur. J. Cancer.*, **11**, 23—32.
137. Lubac G. E., Blunck J. M., (1979), *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 2367—2373.
138. Mulder G. J., Hinson J. A., Gillette J. R., (1977), *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 189—196.
139. Mulder G. J., Hinson J. A., Gillette J. R., (1978), *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1641—1649.
140. Stöhrer G., Brown G. B., (1970), *Science*, **167**, 1622—1624.
141. Stöhrer G., Brown G. B., Corbin E., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 637—642.
142. Lee T. C., Salemnick G., Brown G. B., (1973), *J. Org. Chem.*, **38**, 3102—3105.
143. Stöhrer G., Salemnick G., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 122—131.
144. Wislocki P. G., Borchert P., Miller J. A., Miller E. C., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 1686—1695.
145. McCoy E. C., Rosenkranz H. S., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 1883—1891.
146. Tallgren C. G., (1980), *Acta Med. Scand.*, Suppl.
147. Michalk D., Klare B., Manz F., Scharer K., (1981), *Clin. Nephrol.* **16**, 8—12.
148. Freeman R. M., Richards C. J., (1979), *Kidney Int.*, **15**, 167—175.
149. Dziewiatkowski D. D., (1949), *J. Biol. Chem.*, **178**, 389—393.
150. O'Connor W. J., Summeril R. A., (1976), *J. Physiol.*, **260**, 597—607.
151. Berry R. K., Hansard S. L., Ismail R. J., Wysocki A. A., (1969), *J. Nutr.*, **97**, 399—408.
152. Buch H., Rummel W., Pflieger K., Eschrich C., Texter N., (1968), *Arch. Pharmacol.*, **259**, 279—281.
153. Binkley F., (1949), *J. Biol. Chem.*, **178**, 821—826.
154. Lunquist P., Martensson I., Sorbo B., Ohman S., (1980), *Clin. Chem.*, **26**, 1178—1181.
155. Mudge G. H., Berndt W. O., Valtin H., (1973), w *Handbook of Physiology*, ch. 9, Am. Physiol. Soc., Bethesda, MD.
156. Lucke H., Stange G., Murer H., (1979), *Biochem. J.*, **182**, 223—229.
157. Ullrich K. J., Rumrich G., Kloss S., (1980), *Pflugers Arch.*, **383**, 159—163.
158. Mulder G. J., w *Sulfation of Drugs and Related Compounds* (Mulder G. J., ed.), ch. 3. CRC Press, Boca Raton, FL, 1981.
159. Jorritsma J., Meerman J. H. N., Vonk R. J., Mulder G. J., (1979), *Xenobiotica*, **9**, 247—252.
160. Hirom P. C., Millburm P., Smith R. L., (1976), *Xenobiotica*, **6**, 55—64.
161. Millburm P., w *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*, (Fishman W. H., ed.), v. 2, pp. 1—74, N.Y. Academic Press, 1970.
162. Wellers G., (1959), *J. Physiol.*, **51**, 999—1012.

DARIUSZ STĘPKOWSKI <sup>\*)</sup>, IRENA KĄKOL <sup>\*\*)</sup>

## Łańcuchy regulujące miozyny z mięśni szkieletowych

### Regulatory Light Chains of Skeletal Muscle Myosin

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Rodzaje łańcuchów regulujących miozyny
- III. Łańcuchy regulujące jako podjednostki miozyny z mięśni szkieletowych szybkich
  - III-1. Warunki dysocjacji łańcuchów regulujących
  - III-2. Struktura łańcuchów regulujących
  - III-3. Położenie łańcuchów regulujących w cząsteczce miozyny
  - III-4. Fosforylacja łańcuchów regulujących
- IV. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Regulatory light chains in myosins
- III. Regulatory light chains as subunits of fast skeletal muscle myosin
  - III-1. Dissociation conditions of the regulatory light chains
  - III-2. Structure of the regulatory light chains
  - III-3. Localization of the regulatory light chains in myosin molecule
  - III-4. Phosphorylation of the regulatory light chains
- IV. Final remarks

#### I. Wstęp

Procesy biochemiczne zachodzące w mięśniach, w których energia chemiczna przekształcana jest w mechaniczną, są tak złożone, że do chwili obecnej mimo rozlicznych badań — prowadzonych na układach wyizolowanych jak i na całych mięśniach — ich molekularny mechanizm jest nadal zbyt mało poznany. Zaproponowano już wiele modeli skurczu opisujących oddziaływanie aktyny i miozyny lecz jak dotąd nie uwzględniano w nich złożonej struktury miozyny. (1—4).

<sup>\*)</sup> mgr, <sup>\*\*)</sup> doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, 02-093 Warszawa, Pasteura 3.

Jak wiadomo cząsteczka tego białka jest heksamerem. Trzon cząsteczki stanowi ciężkie łańcuchy zwinięte w podwójny heliks. N-końce tych łańcuchów zwinięte są w kłębki, tworzące zgrubienia nazwane główkami. W strukturę główek oprócz łańcuchów ciężkich uwikłane są dwie pary lekkich łańcuchów miozyny (por. rozdz. II). Główki miozyny wraz z przylegającym do nich fragmentem zwiniętych w podwójny heliks łańcuchów ciężkich o długości ok. 450 Å stanowią wypustki filamentu grubego (miozynowego) w mięśniu szkieletowym (por. Ryc. 3).

Dotychczas przyjmuje się zgodnie, że przekształcenie energii chemicznej w mechaniczną uzależnione jest od zmian konformacyjnych wypustek (2—4, 8—10). Przyczyną tych zmian jest oddziaływanie miozyny z adenozynotrójfosforanem i cienkim filamentem (aktynowym). Lekkie łańcuchy miozyny, o masie cząsteczkowej 18 000, ulegające zmianom konformacyjnym pod wpływem wiązania wapnia i fosforylacji mogą w sposób istotny decydować o położeniu główek. Wzajemne ułożenie główek względem siebie, jak również względem płaszczyzny filamentów oraz ich oddziaływanie na sąsiednie struktury może mieć decydujące znaczenie w efektywności wykorzystania energii chemicznej.

Wiadomo, że skurcz mięśni wszystkich rodzajów \*) jest inicjowany przez wzrost stężenia jonów wapnia wewnątrz komórki mięśniowej. Zmiany stężenia wapnia w komórce mięśniowej, uzależnione od systemu membranowego, powodują zmiany wzajemnego oddziaływania grubych i cienkich filamentów. W zależności od rodzaju mięśni dominują określone mechanizmy regulacji interakcji wypustek miozynowych z aktyną. I tak w mięśniach szkieletowych zależna od stężenia wapnia regulacja oddziaływania filamentów miozynowych i aktynowych jest konsekwencją zmiany konformacji białek regulujących, kompleksu tropomiozyny i troponiny, tworzących wraz z aktyną cienki filament (11). W mięśniach gładkich kręgowców i w komórkach niemięśniowych regulacja ta zachodzi poprzez uaktywnienie kinazy fosforylującej lekki łańcuch miozyny (12—12b). Zupełnie inny mechanizm regulacji dominuje w mięśniach mięczaków, gdzie lekki łańcuch miozyny wiążąc jon wapnia ulega zmianom konformacyjnym umożliwiając oddziaływanie aktyny z miozyną (13, 14).

Jednakże, zarówno modele skurczu jak i hipotezy dotyczące procesów regulujących interakcję miozyny i aktyny są zbyt uproszczone i niekiedy obserwacje poczynione tak w badaniach biochemicznych, jak i w fizjologicznych bardzo trudno z nimi pogodzić (4). Na przykład właściwie nie wiadomo jakie znaczenie w mięśniu szkieletowym — w którym dominuje system regulacji skurczu uzależniony od zmian konformacyjnych tropomiozyny i troponiny — ma obecność specyficznej kinazy i fosfatasy lek-

\*) Zagadnienia regulacji skurczu, jak również inne dotyczące struktury i funkcji komórki mięśniowej poruszane tutaj w ogromnym skrócie zostały bardziej szczegółowo omówione w „Postęпах Biochemii” (18—22).

kich łańcuchów (15—17), układ enzymów, który w mięśni gładkim wydaje się być całkowicie wystarczającym systemem regulacji skurczu.

Powstają więc pytania, czy oprócz dobrze już znanych mechanizmów regulacji skurczu w różnych mięśniach działają jakieś inne mechanizmy dodatkowe? Jaka jest rola łańcuchów regulujących miozyny w mięśni szkieletowym szybkim? Czy w skurczu mięśnia szybkiego oprócz regulacji oddziaływania miozyny z aktywną uzależnionej od zmian konformacyjnych kompleksu tropomiozyny i troponiny, składników cienkiego filamentu, działa inny jeszcze mechanizm regulacyjny, w którym istotne znaczenie mieć mogą łańcuchy regulujące miozyny? W artykule omówiono badania zmierzające do udzielenia odpowiedzi na powyższe pytania.

## II. Rodzaje łańcuchów regulujących miozyny

Jak już wspomniano główki miozyny utworzone są z 200 Å odcinków N-końców łańcuchów ciężkich i dwóch par łańcuchów lekkich (5—7). Każda główka zawiera po jednym z dwóch rodzajów łańcuchów\*). Łańcuchami regulującymi nazwano łańcuchy o masie cząsteczkowej 18 000—20 000 (masy cząsteczkowe są różne w zależności od rodzaju mięśnia). Wspólną charakterystyczną ich cechą jest zdolność wiązania się z miozyną z mięśni mięczaków, którą pozbawiono uprzednio działaniem EDTA łańcucha regulującego. Są one w stanie w określonych warunkach zastąpić usunięte łańcuchy w ich funkcji. Opisana wyżej właściwość łańcuchów regulujących, której zawdzięczają swą nazwę wynika z ich budowy. Ze względu na charakterystyczną sekwencję aminokwasów należą one do grupy białek wiążących wapń (23—26).

Wprawdzie łańcuchy drugiego rodzaju (nie należące do łańcuchów regulujących), mocniej uwikłane w strukturze główek miozyny po oddzieleniu od trzonu cząsteczki nie wiążą jonów wapnia jednakże zalicza się je również do tej samej grupy białek. Łańcuchy te nie mają wpływu na wiązanie metali dwuwartościowych przez miozynę (26). Wszystkie dotychczas stosowane metody oddzielania tych łańcuchów od trzonu cząsteczki miozyny prowadziły równocześnie do inaktywacji ATPazy miozynowej. Dlatego nazwano je istotnymi (*ang.* „*essential*”). Przypuszczano, że są niezbędne dla zachowania enzymatycznej aktywności miozyny. Jednakże ostatnio Wagner i Giniger (27) otrzymali ciężkie łańcuchy subfragmentu miozyny (główek miozyny) pozbawione lekkich łańcuchów a wykazujące 30—80% aktywności enzymatycznej tego subfragmentu.

\*) Obok nazw określających funkcję łańcuchów stosowane są nazwy wynikające z ich ruchliwości elektroforetycznej np. LC<sub>1</sub>, LC<sub>2</sub>, LC<sub>3</sub>, w przypadku miozyny z mięśni szkieletowych, lub mające związek ze sposobem oddzielania tych łańcuchów od trzonu cząsteczki np. łańcuchy alkaliczne, oddzielające się w środowisku alkalicznym lub łańcuchy DTNB ulegające dysocjacji po zablokowaniu grup tiolowych miozyny dwusiarczkiem 3-karboksy,4-nitrofenylowym (DTNB).

Do oddzielania lekkich łańcuchów od trzonu cząsteczki zastosowali oni chromatografię powinowactwa wiążąc je, po oddysocjowaniu w bardzo łagodnych warunkach, z unieruchomionymi na kolumnie z sefarozy specyficznymi ich przeciwciałami. Okazało się więc, że lekkie łańcuchy zaliczane do „niezbędnych” dla zachowania enzymatycznej aktywności, najprawdopodobniej stabilizują i modyfikują centrum aktywne ATPazy miozynowej, lecz nie biorą bezpośredniego udziału w tworzeniu tego centrum. Podobieństwo strukturalne lekkich łańcuchów obu rodzajów pomimo różnic w zdolności wiązania wapnia i funkcji w cząsteczce, zostało również potwierdzone w badaniach immunologicznych (28).

Powracając jednak do łańcuchów regulujących pozostaje do uzasadnienia dlaczego ta nazwa jest słuszna i na czym polega regulacja oddziaływania miozyny i aktyny w mięśniu szkieletowym przez te łańcuchy, jaki jest jej mechanizm. Na podstawie dotąd zebranych informacji odpowiedź niestety nie jest łatwa.

Początkowo przypuszczano, że obecność w miozynie miejsc wykazujących duże powinowactwo do wapnia, oraz utrata zdolności wiązania wapnia przez miozynę po oddzieleniu łańcuchów regulujących może mieć związek z nieznanym dotąd dodatkowym mechanizmem kontroli skurczu, w którym grają one decydującą rolę (29, 30). Jednakże hipoteza ta nie uzyskała potwierdzenia w badaniach Bagshaw i Reed (31) chociaż nie wykluczają oni możliwości istnienia takiej regulacji. Być może, że zaobserwowane zmiany konformacyjne miozyny po przyłączeniu wapnia w badaniach przeprowadzanych na mięśniach trudno powtórzyć na układach izolowanych (32, 33). W doświadczeniach z białkami kurczliwymi takiej regulacji nie stwierdzono (31). Zasadniczą różnicą pomiędzy łańcuchami regulującymi miozyny z mięśni mięczaków a łańcuchami, które nazwano regulującymi z mięśni ssaków jest ich niezdolność przywracania miozynie z mięśni mięczaków utraconego powinowactwa do wapnia.

Jony magnezu lub wapnia wiążą się do miejsc niespecyficznych w każdym z łańcuchów regulujących miozyny niezależnie od rodzaju mięśni z których pochodzą i utrwalają wiązania pomiędzy tymi łańcuchami a łańcuchami ciężkimi stanowiącymi trzon cząsteczki miozyny (34). Kendrick-Jones i in. (35) rozróżniają dwie grupy łańcuchów regulujących. Do pierwszej zaliczają łańcuchy tworzące z pozbawioną łańcucha miozyną z mięśni mięczaków miejsce silnie i specyficznie wiążące jony wapnia oraz przejmujące funkcję regulacji interakcji z aktyną. Do tej grupy oprócz łańcuchów regulujących miozyny z mięśni mięczaków zalicza się analogiczne łańcuchy miozyny z mięśni gładkich. W obydwu przypadkach nazwa jest zgodna z funkcją tych łańcuchów. Do drugiej grupy zalicza się łańcuchy o dużym powinowactwie do jonów dwuwartościowych ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) i w obecności tych jonów silniej związane z trzonem cząsteczki. Zdaniem niektórych autorów aktyna wiąże się z cząsteczką miozyny z dala od miejsc, w których wiążą się jony dwuwartościowe (35).



Jak już wspomniano łańcuchy regulujące zaliczone do drugiej grupy mogą w pewnych warunkach zastąpić łańcuch regulujący miozyny z mięśni mięczaków. Dzieje się to wówczas gdy w miozynie z mięśni mięczaków obecny jest jeden z jej własnych łańcuchów regulujących i jak można przypuszczać on to wtedy reguluje jej interakcje z aktyną (35). Drugim koniecznym warunkiem jest obecność aktyny w czasie usuwania jednego z łańcuchów regulujących miozyny z mięśni mięczaków. Aktyna bowiem tworząc kompleks z miozyną utrwała jej strukturę (35). Jaki jest mechanizm przejmowania funkcji regulatora interakcji miozyny z aktyną przez natywny łańcuch regulujący pozostały w jednej z dwóch główek miozyny z mięczaków po działaniu EDTA dotychczas nie jest wyjaśnione (36). Kendrick-Jones wysuwa przypuszczenie kooperacji pomiędzy główkami miozyny, z których jedna zawiera natywny łańcuch regulujący, druga zaś zawiera wbudowany łańcuch pochodzący z miozyny mięśni szkieletowych, a więc łańcuch regulujący zaliczany do grupy drugiej (36, 37). Jednakże ostatnio wykazano, że obecność dwóch główek nie jest konieczna dla zachowania regulowanej stężeniem wapnia interakcji miozyny i aktyny. Subfragment 1 (Ryc. 3), odtrawione enzymami proteolitycznymi główki miozyny mięśni mięczaków po wbudowaniu nieuszkodzonego enzymami proteolitycznymi łańcucha regulującego reagują z aktyną dopiero wówczas, gdy utworzone pomiędzy tym łańcuchem a trzonem cząsteczki miejsce wykazujące duże powinowactwo do wapnia zostanie nim wysyczone (38). Ponieważ w odtrawionych główkach miozyny kooperacja jest raczej niemożliwa, przypuszczenie Kendricka-Jonesa zostało potwierdzone.

### III. Łańcuchy regulujące jako podjednostki miozyny z mięśni szkieletowych szybkich

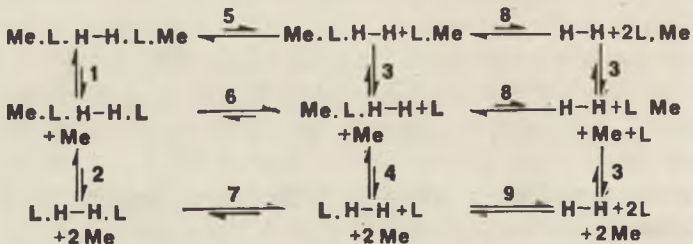
#### III-1. Warunki dysocjacji łańcuchów regulujących

Zastanawia zróżnicowana trwałość wiązania zaobserwowana w badaniach warunków dysocjacji łańcuchów regulujących miozyny z mięśni szkieletowych królika. Konsekwencją termodynamiczną znacznego obniżenia powinowactwa łańcuchów, po oddzieleniu ich od trzonu cząsteczki, do jonów dwuwartościowych (39—42) jest ich dysocjacja w obecności EDTA (43—45). Istnieje tutaj pewne podobieństwo do łańcuchów regulujących miozyny z mięśni mięczaków. W obecności EDTA w temperaturze 0° można również oddzielić tylko ok. 50% analogicznych łańcuchów miozyny z mięśni szkieletowych szybkich (43). Całkowite ich usunięcie wymaga równoczesnego rozluźnienia wiązania z trzonem cząsteczki (np. przez zablokowanie grup tiolowych lub podwyższoną temperaturę) oraz wyeliminowania związanego z białkiem jonu metalu dwuwartościowego (przez

wprowadzenie chelatora do środowiska) (45—47). Zastosowanie kontrolowanego blokowania grup tiolowych asymetrycznym dwusiarczkiem pozwoliło na wykazanie, że dysocjacja obydwu łańcuchów jest możliwa wówczas, gdy blokowaniu ulegają grupy tiolowe lekkich łańcuchów miozyny. (48, 49).

We wcześniejszych badaniach do oddzielania łańcuchów regulujących od miozyny z mięśni szkieletowych królika stosowano działanie symetrycznego dwusiarczku (DTNB) w obecności EDTA. Kendrick-Jones, Szentkiralyi i Szent-Györgyi (35) zwrócili uwagę, że obecność EDTA zwiększa ilość zdysocjowanych łańcuchów. Jednakże większość autorów uważa, że i tą metodą tylko niewiele ponad 50% łańcuchów łatwo oddziela się od trzonu cząsteczki (29, 50, 51). Podobne wyniki otrzymano wywołując dysocjację łańcuchów regulujących w obecności ich przeciwciał (52). Taka zróżnicowana trwałość wiązania dwóch łańcuchów regulujących nasuwa przypuszczenie o różnicach w ich budowie lub w budowie główek miozyny. Jednakże na ogół panuje pogląd, że zarówno łańcuchy regulujące wbudowane do obu główek cząsteczki miozyny jak i te główki są identyczne (53). Interesujące wyjaśnienie różnej trwałości wiązania łańcuchów regulujących proponuje Bagshaw (53). Przyjmuje on w swych rozważaniach następujące założenie: miejsca w cząsteczce miozyny wiążące łańcuchy regulujące stają się po ich dysocjacji (w nieobecności jonów dwuwartościowych) jak gdyby „lepkie” i przylaczające się łatwo do drugiej główki miozyny. Następuje wówczas zaburzenie równowagi kontrolującej wiązanie jonów dwuwartościowych, dysocjację i asocjację lekkich łańcuchów miozyny. Obniżenie stężenia jonów dwuwartościowych powoduje odwracalną dysocjację łańcuchów regulujących i uwarunkowane kinetycznie odwracalne zlepianie główek miozyny. Przesunięcie równowagi, wywołane zlepieniem się główek może w zależności od warunków powodować zaburzenia wiązania jonów dwuwartościowych.

Ogólny schemat dysocjacji łańcuchów regulujących i jonów dwuwartościowych przedstawiono na rycinie-1. Przez dobór odpowiednich parametrów Bagshaw wykazał możliwość uzyskania pozytywnej lub negatyw-



Ryc. 1. Schemat dysocjacji jonów metali dwuwartościowych i łańcuchów regulujących miozyny. Me — jon metalu dwuwartościowego; L — łańcuch regulujący; H — H miozyna pozbawiona łańcuchów regulujących.

nej kooperacji główek w czasie wiązania jonów dwuwartościowych przez miozynę (53). Rozważania te jednak nie mają znaczenia dla wyjaśnienia mechanizmów zachodzących w mięśniu ze względu na znaczne wewnątrzkomórkowe stężenie jonów magnezu.

Nie łatwo też przyjmując założenia Bagshawa wyjaśnić wpływ usuwania łańcuchów regulujących na aktywność ATPazy miozynowej. W tabeli I zestawiono wyniki badań aktywności ATPazy miozyny częściowo lub całkowicie pozbawionej łańcuchów regulujących. Prawie we wszystkich przytoczonych w tabeli przykładach nie stwierdzano wpływu usuwania łańcuchów na aktywność miozynowej ATPazy oznaczanej w nieobecności aktyny, wykazano natomiast bardzo wyraźny wpływ w obecności aktyny. Można zatem uważać, że usunięcie łańcucha regulującego zaburza oddziaływanie miozyny z aktyną oraz, że ten łańcuch reguluje wzajemne oddziaływanie tych dwóch białek pełniąc funkcję efektoru aktomiozynowej ATPazy. Zastanawia jednak wyraźny brak zbieżności pomiędzy ilością usuniętych łańcuchów a aktywnością ATPazy oznaczanej w obecności jonów magnezu i aktyny. Wprawdzie przyjmując założenia Bagshaw można sobie wyobrazić że zlepianie główek powoduje zaburzenie powstawania bipolarnych filamentów miozyny i to właśnie jest przyczyną obniżenia ATPazy aktomiozynowej. Następujący jednak wzrost aktywności ATPazy po usunięciu ok. 50% łańcuchów działaniem EDTA w temperaturze 0°, wskazuje, że w tym przypadku modyfikacja miozyny prowadzi do ułatwienia oddziaływania aktyny z miozyną (por. Tabela 1).

Tabela 1

Zmiany aktywności ATPazy miozynowej po częściowym lub całkowitym pozbawieniu tego białka łańcuchów regulujących

Metoda usuwania łańcuchów z trzonu cząsteczki miozynowej	Ilość usuniętych łańcuchów (%)	Aktywność ATPazy oznaczanej w obecności			Piśmienictwo
		K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> oraz aktyny	
Działanie EDTA w temp. 0°C	48	108	145	160	43
Działanie EDTA w temp. 37°C	70	103	104	89	45
Działanie DTNB w obecności EDTA w temp. 0°C	55	38	96	30, 40, 74 <sup>*)</sup>	29
	60	100	100	27	54
	50	100	101	38—78 <sup>**)</sup>	51
Działanie DTNB w obecności EDTA i ponowne działanie EDTA w temp. 0°C	98—100	101	100	30—39 <sup>**)</sup>	55

Aktywności ATPazy podano w % aktywności specyficznej miozyny natywnej (kontrolnej).

<sup>\*)</sup> Aktywność ATPazy oznaczano w obecności różnych ilości KCl w środowisku (stężenie końcowe kolejno 25, 53, 100 mM).

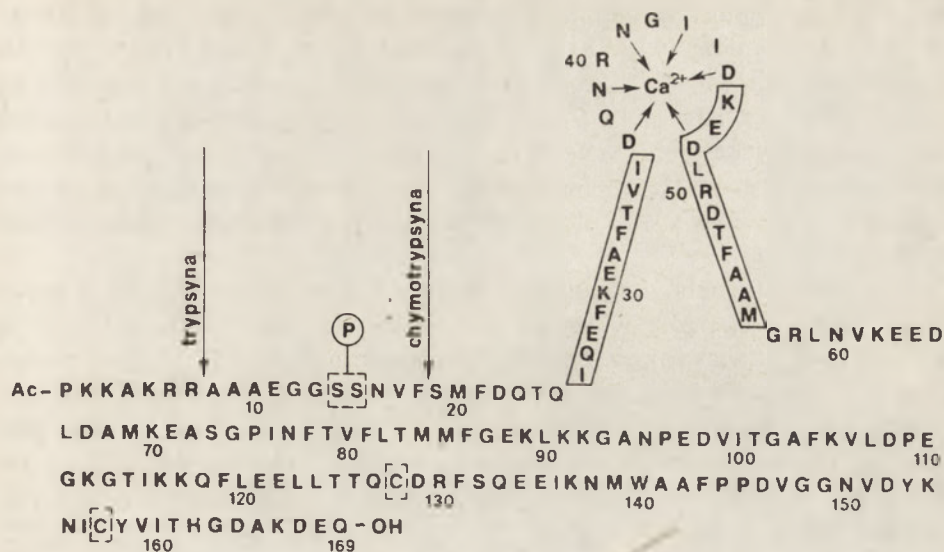
<sup>\*\*)</sup> Aktywność ATPazy oznaczano w obecności różnych ilości aktyny od 0,5 mola aktyny na mol miozyny (nieдобór) do 24 moli aktyny na mol miozyny (znaczny nadmiar).

Porównując warunki usuwania łańcuchów regulujących i zmiany aktywności aktomiozynowej ATPazy można z łatwością dostrzec, że w miarę wprowadzania czynników rozluźniających strukturę główek miozyny (termiczna denaturacja lub blokowanie grup tiolowych miozyny) następuje znaczne obniżenie aktywności aktomiozynowej ATPazy. Po ponownym wbudowaniu usuniętych łańcuchów następuje powrót aktywności ATPazy do poziomu aktywności miozyny natywnej traktowanej jako układ kontrolny (55).

Przytoczone powyżej wyniki badań wyraźnie wskazują, że wraz z modyfikacją miozyny z mięśni szkieletowych szybkich, przez częściowe lub całkowite usunięcie jej łańcuchów regulujących, modyfikacji ulega oddziaływanie tej miozyny z aktyną. Zmiany jednak wywołane brakiem lub zmniejszeniem ilości łańcuchów regulujących nie dadzą się wytłumaczyć zwykłą stechiometrią wiązania i dotyczą bardziej złożonych procesów, których zaburzenie nastąpiło po usunięciu podjednostki pełniącej funkcję białkowego efektoru enzymu.

### III-2. Struktura łańcuchów regulujących

Homologiczne białka wiążące wapń do których zalicza się również łańcuchy regulujące omówiono już w „Postępach Biochemii” (56). Białka te wykazują znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasowych, a co z tym idzie duże podobieństwo w strukturze drugorzędowej. Charakterystycznym elementem strukturalnym tych białek są tzw. domeny wiążące wapń (Ryc. 2), które wykryto badając strukturę krystalograficzną parwalbuminy (57, 58). Na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej postuluje się występowanie trzech lub czterech analogicznych domen w cząsteczkach pozostałych białek wiążących wapń w tym i łańcuchów regulujących miozyny (57—60). Na rycinie 2 przedstawiono sekwencję aminokwasów łańcucha regulującego miozyny z mięśni szkieletowych królika (58) z zaznaczoną domeną wiążącą jony wapnia lub magnezu, składającą się z dwóch odcinków  $\alpha$ -heliksu oraz „pętli” wiążącej te jony wraz z resztami aminokwasowymi, dostarczającymi ligandów do ich koordynacji. Domena jest położona w N-końcowym fragmencie sekwencji. W dalszej jej części łańcuch polipeptydowy wykazuje mniejsze podobieństwo struktury do parwalbuminy, w miejscach odpowiadających pozostałym trzem domenom zwłaszcza w „pętlach” wiążących jony dwuwartościowe. Na tej podstawie można przewidywać, że łańcuchy regulujące miozyny mięśni szkieletowych będą wiązać tylko jeden jon wapnia lub magnezu na cząsteczkę (58, 59) co potwierdzają omówione wcześniej prace doświadczalne. W łańcuchach tych przed domeną wiążącą wapń znajduje się 25-cio aminokwasowy odcinek zawierający dwie położone obok siebie reszty serynowe, z których jedna ulega fosforylacji przez



Ryc. 2. Sekwencja aminokwasowa łańcuchów regulujących miozyny mięśni szkieletowych królika wg. (26). Na rysunku zaznaczono domenę wiążącą wapń, reszty serynowe 14 i 15 z których jedna ulega fosforylacji, miejsca trawienia trypsyną i chymotrypsyną oraz dwie reszty cysteinowe modyfikowane przez DTNB.

A — Ala, B — Asx, C — Cys, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Liz, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Tre, V — Val, W — Trp, Y — Tyr, Z — Glx.

kinazę lekkich łańcuchów. Trawienie enzymami proteolitycznymi w łagodnych warunkach prowadzi do odszczepienia fragmentów lekkiego łańcucha położonych w tym odcinku (61, 62) co pokazano na rycinie 2. Na samym N-końcu sekwencji występuje aż pięć hydrofilowych reszt aminokwasowych o charakterze zasadowym. Duża hydrofilność a także podatność na trawienie i fosforylację wskazuje, że ta część łańcucha regulującego znajduje się na powierzchni cząsteczki miozyny i jest łatwo dostępna dla enzymów odpowiedzialnych za te procesy.

Cząsteczka łańcucha regulującego jest asymetryczna, składa się prawdopodobnie z części globularnej i wydłużonej części elastycznej. Długość cząsteczki ok. 150 Å ulega zmniejszeniu do 100 Å po związaniu jonu wapnia. Po odtrawieniu od N-końca fragmentu o masie ok. 2000 zawierającego serynę ulegającą fosforylacji (Ryc. 2) zmiany długości cząsteczki łańcucha regulującego po związaniu wapnia są o połowę mniejsze (63). Można wnioskować zatem, że N-końcowy fragment ma istotne znaczenie dla konformacyjnych zmian cząsteczki wywołanych związaniem jonów wapnia (63). Miozyna rekonstruowana z łańcuchem regulującym zawierającym znacznik spinowy ulegała zmianom konformacyjnym po związaniu jonu wapniowego, obserwowanym w różnicy sygnału EPR (64). Zmiany te są inne niż w badaniach na wyizolowanym łańcuchu, co jak się wydaje

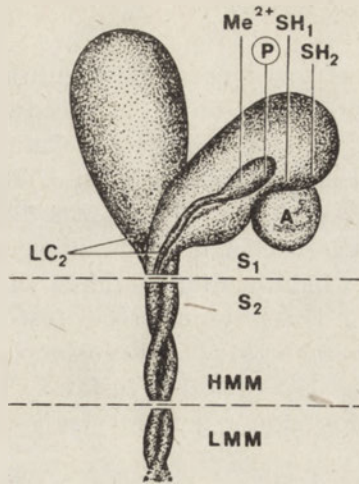
może być spowodowane oddziaływaniem łańcucha regulującego z łańcuchem ciężkim miozyny (29). Występowanie takich oddziaływań wynika z różnic stałych wiązania jonów wapnia i magnezu, których wartości są o kilka rzędów niższe w przypadku łańcucha wyizolowanego w stosunku do wartości uzyskanych dla całej miozyny (29, 30). Jeżeli seryna w łańcuchu regulującym występuje w formie ufosforylowanej zmniejsza się powinowactwo do jonów wapnia zarówno miozyny jak i łańcuchów wyizolowanych (63, 64).

Struktura łańcuchów regulujących warunkuje zatem ich funkcję regulacyjną dwojako, przez wiązanie jonów wapnia oraz przez fosforylację seryny. Oba zjawiska, koordynacji jonów wapnia i kowalencyjnej modyfikacji białka wpływają, jak omówiono powyżej, na konformację regulujących łańcuchów niezależnie od tego czy są one związane z cząsteczką miozyny czy wyizolowane z cząsteczki. Te właśnie zmiany konformacyjne mogą wskazywać na możliwość oddziaływania łańcuchów regulujących na ułożenie główek miozynowych.

### III-3. Położenie łańcuchów regulujących w cząsteczce miozyny

Pierwsze informacje dotyczące położenia łańcuchów regulujących w cząsteczce miozyny uzyskano w badaniach struktury i właściwości poszczególnych fragmentów miozyny otrzymanych w wyniku trawienia proteazami. Okazało się, że w zależności od obecności lub nieobecności jonów dwuwartościowych łańcuchy regulujące mogą wpływać na trwałość rozluźnionej, dostępnej dla enzymów proteolitycznych części łańcucha ciężkiego łączącej główki (tzw. subfragmenty 1 — S<sub>1</sub>) z dalszą częścią cząsteczki miozyny (65—70).

Pod wpływem działania proteaz łańcuchy regulujące ulegają częściowej degradacji. Dlatego przy otrzymywaniu ciężkiej meromiozyny — HMM (zawierającej obie główki oraz odcinek ciężkich łańcuchów o długości 450Å nazwany subfragmentem 2 — S<sub>2</sub>) dla zmniejszenia dostępności enzymów proteolitycznych do łańcuchów regulujących wprowadza się do środowiska jony magnezu rzadziej wapnia, stabilizujące czwartorzędową strukturę cząsteczki. Powstała w wyniku fragmentacji proteolitycznej część miozyny lekka meromiozyna — LMM, nieaktywna enzymatycznie jest tym fragmentem miozyny, który tworzy trzon filamentu grubego, ciężka meromiozyna odpowiada temu odcinkowi cząsteczki miozynowej, który tworzy wypustki na filamencie grubym (Ryc. 3). Łańcuch regulujący wiąże się z główką miozyny oddzieloną w wyniku trawienia ciężkiej meromiozyny trypsyną (71). Fakt ten stanowi potwierdzenie, że łańcuch regulujący znajduje się w enzymatycznie aktywnym fragmencie miozyny, jak również może być wykorzystany jako pośredni dowód możliwości oddziaływania łańcucha regulującego na zmiany położenia główki mio-



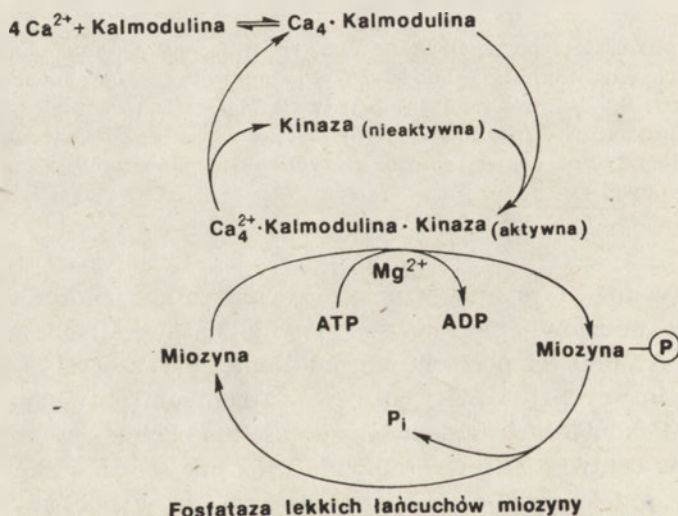
**Ryc. 3.** Przypuszczalne położenie łańcucha regulującego w cząsteczce miozyny.  $Me^{2+}$  — miejsce wiązania  $Mg^{2+}$  lub  $Ca^{2+}$ . P — miejsce fosforylacji;  $S_1$  — subfragment 1 miozyny;  $S_2$  — subfragment 2 miozyny; HMM — ciężka meromiozyna; LMM — lekka meromiozyna; A — monomer aktyny w kontakcie z główką miozyny;  $SH_1$ ,  $SH_2$  — charakterystyczne grupy tiolowe, których blokowanie wpływa na aktywność ATPazy miozynowej.

zyny. Na rycinie 3 przedstawiono przypuszczalne położenie łańcucha w cząsteczce miozyny opierając się głównie na sugestiach Morna i in. (72). Autorzy ci porównując położenie charakterystycznych grup tiolowych miozyny  $SH_1$  i  $SH_2$ , jak również centrum aktywnego (73—82) sugerują, iż C-końcowy fragment miozyny — na odcinku, w którym znajdują się ma centrum aktywne enzymu oraz miejsce interakcji miozyny z aktyną — przedstawia wraz z znajdującym się w pobliżu łańcuchem regulującym system biorący udział w regulacji oddziaływania miozyny i aktyny przez zmiany położenia główki miozyny względem osi (trzonu) filamentu grubego. Na poparcie swego przypuszczenia autorzy, powołują się na wykazaną przez Huxleya i Simons'a (3) rolę labilnego odcinka łączącego subfragment 1 z subfragmentem 2.

Dodatkowe informacje dotyczące ułożenia łańcuchów regulujących w główce miozynowej pochodzą z badań metodami immunologicznymi. Przeciwciała otrzymane zarówno przeciw łańcuchom regulującym, jak i przeciw łańcuchom lekkim stabilizującym aktywne centrum enzymu, wiążą się z cząsteczką miozyny w rejonie subfragmentu 1 bliskim C-końca oraz labilnego odcinka sąsiadującego z subfragmentem 2 (83). Badania te potwierdzają sugestie wysuwane na podstawie informacji pośrednich z badań fragmentacji cząsteczki miozynowej w różnych warunkach, jak również z badania charakterystyki i lokalizacji aktywnego centrum miozyny (4).

### III-4. Fosforylacja łańcuchów regulujących

Przy omawianiu struktury łańcuchów regulujących zwrócono uwagę, że jedna z reszt serynowych (14 lub 15) ulega odwracalnej kowalencyjnej modyfikacji przez fosforylację. Enzymem katalizującym przyłączenie reszty fosforylowej, pochodzącej z cząsteczki ATP, do grupy hydroksylowej łańcucha bocznego seryny jest, specyficzna dla łańcucha regulującego kinaza, nazwana kinazą lekkich łańcuchów miozyny (15, 16). Kinaza jest aktywna w kompleksie z kalmoduliną białkiem wiążącym wapń wysyconą czterema jonami wapnia. Dzięki temu proces fosforylacji jest regulowany przez stężenie jonów wapnia (84, 85). Defosforylacja łańcucha regulującego zachodzi przy udziale specyficznej fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny (17). Reakcję fosforylacji i defosforylacji obrazuje rycina 4. Przy



**Ryc. 4.** Schemat procesu fosforylacji i defosforylacji łańcuchów regulujących miozyny z mięśni szkieletowych szybkich.

stężeniu jonów wapnia bliskim stężenia wymaganego do aktywacji skurczu mięśnia szkieletowego (ok.  $10^{-6}$  M) kalmodulina wiąże cztery jony wapnia i przyłącza się do kinazy lekkich łańcuchów miozyny. Powstały kompleks wykazuje w obecności jonów magnezu aktywność fosfotransferazy wobec lekkich łańcuchów regulujących miozyny. Białka miofibrilarnie ulegające fosforylacji, jak i enzymy biorące udział w procesie fosforylacji i defosforylacji białek aparatu kurczliwego mięśni zostały szerzej opisane w „Postęпах Biochemii” (22).

Od momentu odkrycia przez Perrie i Perry (86) dwóch form łańcucha regulującego i wykazania, że różnią się one obecnością reszty fosforylowej, usiłowano wyjaśnić ich rolę w skurczu mięśni. W mięśniach gładkich fosforylacja łańcuchów regulujących jest czynnikiem niezbęd-



nym do aktywacji miozyny przez aktynę (12a, 12b, 87). Wynika to z badań regulacji skurczu w różnych typach mięśni gładkich (87—92). W przypadku tych mięśni postuluje się system regulacji wykorzystujący fosforylację łańcucha regulującego, jako czynnik inicjujący skurcz, natomiast defosforylację jako czynnik rozkurczający. Dane z badań *in vitro* jak i *in vivo* nie potwierdzają takiego efektu w przypadku mięśnia szkieletowego. Rola fosforylacji łańcucha regulującego miozyny mięśni szkieletowych jest jeszcze wciąż niejasna. Należałoby oczekiwać, że wprowadzenie silnie ujemnie naładowanej grupy fosforylowej w strukturę białka powinno wpływać na jego konformację. Biorąc pod uwagę położenie łańcucha regulującego w cząsteczce miozyny w miejscu łączenia się główki z resztą ciężkiego łańcucha, zmiana jego konformacji może wpływać na centrum aktywne miozyny znajdujące się w główce, jak również na ułożenie główki miozyny względem powierzchni grubego filamentu i oddziaływanie z aktyną. Istnieje szereg dowodów na występowanie zmian w strukturze łańcucha regulującego, a także całej cząsteczki miozyny pod wpływem jego fosforylacji (63, 64). Warta podkreślenia jest różna podatność zagregowanej w filamenty miozyny ufosforylowanej i zdefosforylowanej mięśni szkieletowych na trawienie enzymami proteolitycznymi (93). Fosforylacja łańcucha regulującego osłabia działanie chymotrypsyny i papainy, enzymów proteolitycznych na lekki łańcuch, a także w miejscu łączącym subfragmenty 1 i 2 (por. Ryc. 3). Łańcuch regulujący zatem w formie ufosforylowanej osłania przed enzymami proteolitycznymi miejsce, od którego zależy ruch główki, równocześnie sam staje się bardziej odporny na działanie enzymów proteolitycznych. Z drugiej strony w obecności ufosforylowanego łańcucha regulującego ułatwione jest powstawanie ciężkiej meromiozyny.

Syntetyczne filamenty utworzone z oczyszczonej miozyny ufosforylowanej i zdefosforylowanej wykazywały odmienną strukturę w obrazach z mikroskopu elektronowego (K. Kasman — dane niepublikowane). Różniły się one również stopniem rozpuszczalności w roztworach o zwiększającym się stężeniu soli adenozyntroójfosforanu, pirofosforanu. Filamenty utworzone z miozyny ufosforylowanej są wprawdzie trudniej rozpuszczalne w roztworach zawierających stężenie soli zbliżone do fizjologicznych, natomiast w obecności ATP i  $PP_i$  rozpuszczają się łatwiej niż filamenty miozyny zdefosforylowanej. Wskazuje to na różnicę w oddziaływaniach stabilizujących strukturę filamentów obu form miozyny.

Badano również wpływ fosforylacji na właściwość wiązania kationów wapnia przez łańcuchy regulujące. Holroyde i in. (94) nie uzyskali różnic w wiązaniu jonów wapnia z miozyną ufosforylowaną i zdefosforylowaną, co jest niezgodne z prezentowanymi wyżej wynikami (41) uzyskanymi na izolowanych łańcuchach, jak również z badaniami miozyny z wbudowanym łańcuchem regulującym z przyłączonym do niego znacznikiem spinowym (64). Obserwowane różnice wynikają z odmienności

metod zastosowanych do oznaczania wiązania wapnia. Zmiany konformacyjne miozyny pod wpływem fosforylacji, jakkolwiek ich charakter nie jest dobrze poznany można uznać za udowodnione. Zmiany te przenoszą się także na strukturę filamentu miozynowego. Wpływ fosforylacji łańcuchów regulujących na aktywność enzymatyczną miozyny mięśni szkieletowych budzi wiele kontrowersji. Początkowo nie obserwowano wyraźnego wpływu fosforylacji na aktywność ATPazy aktomiozynowej i ATPazy akto-HMM (19, 95). P e m r i c k (96) jednakże wykazała znaczny wzrost aktywności ATPazy aktomiozynowej w układzie zawierającym czystą aktynę, a także aktynę z tropomiozyną i troponiną oraz ufosforylowaną miozyną w porównaniu do takiego samego układu, w którym miozyna występowała w formie nieufosforylowanej. Ufosforylowana miozyna wykazywała wyższe powinowactwo wobec aktyny. Wyniki hamowania ATPazy miozynowej stymulowanej jonami potasu w obecności aktyny, jak również wpływ aktyny na aktomiozynową ATPazę wskazywały również na zwiększone powinowactwo aktyny do miozyny ufosforylowanej (97). Dotyczyło to zarówno miozyny monomerycznej jak i miozyny zagregowanej w filamenty. Stwierdzono ponadto znaczne zmiany w przebiegu superprecypitacji aktomiozyny naturalnej, którą uprzednio poddano procesom fosforylacji i defosforylacji łańcuchów regulujących miozyny (98). Aktomiozyna naturalna zawierająca miozynę ufosforylowaną wykazywała znaczne opóźnienie superprecypitacji w porównaniu z aktomiozyną defosforylowaną. W przeciwieństwie do wyników Pemrick (96) fosforylacja miozyny prowadziła do znacznego obniżenia aktywności ATPazy aktomiozynowej (97, 98). Inne stanowisko prezentują Cook i Stull, którzy na podstawie własnych doświadczeń oraz doświadczeń Morgana i in. (17) uważają, że brak jest różnic zarówno w powinowactwie aktyny wobec obu form miozyny jak i w aktywności aktomiozynowej ATPazy. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika (Stępkowski i in. dane niepublikowane), że w zależności od warunków (stężenie ATP soli, aktyny), w których porównuje się aktywność ATPazy obu form miozyny występującej w kompleksie z aktyną uzyskuje się różne wyniki. Przy oznaczaniu aktywności ATPazy bowiem mierzy się ilość fosforanu uwalnianego z reakcji rozkładu ATP przez aktomiozynę. Proces ten jest złożony i w różnych etapach reakcji przebiega z odmienną szybkością (100). W warunkach siły jonowej roztworu zbliżonej do fizjologicznej ( $\mu \geq 0,120$ ) reakcja zachodzi w dwóch fazach. Pierwsza — tzw. przejaśnienie (*ang. clearing*) — polega na oddysocjowaniu cząsteczek miozyny od filamentów aktynowych i jednoczesnym tworzeniu agregatów miozynowych. Druga — właściwa superprecypitacja, wzrost zmętnienia żelu aktomiozynowego po podaniu ATP — zachodzi w wyniku spadku stężenia ATP pod wpływem działania ATPazy aktomiozynowej. W drugiej fazie następuje ponowne połączenie aktyny z miozyną. Aktywność ATPazy zmienia się, jak wspomniano wyżej, na poszczególnych etapach reakcji. Fosforylacja łańcucha regulującego wpły-

wa na długość fazy pierwszej (98), a przez to przypuszczalnie na mierzoną w reakcji ilość uwolnionego fosforanu. Opóźnienie superprecypitacji aktomiozyny z ufosforylowanymi lekkimi łańcuchami można tłumaczyć większą trudnością w tworzeniu w obecności ATP filamentów ufosforylowanych niż nieufosforylowanych (98). Oddziaływania miozyna-miozyna są, jak wiadomo niezbędnym czynnikiem sprzyjającym aktywacji ATPazy aktomiozynowej. Powinno to w efekcie prowadzić do opóźnienia superprecypitacji i obniżenia aktywności ATPazy aktomiozynowej miozyny ufosforylowanej. Obniżenie siły jonowej roztworu powoduje skrócenie fazy pierwszej i w ten sposób sprzyja powstawaniu agregatów miozyny, tym samym następuje zmniejszenie różnicy w czasie powstawania filamentów miozyny ufosforylowanej i nieufosforylowanej. Przy bardzo niskiej sile jonowej w środowisku superprecypitacja rozpoczyna się już w momencie zainicjowania reakcji przez dodanie ATP tak, że okres przejaśnienia jest niezauważalny. W takich warunkach nie może być mowy o opóźnieniu tworzenia filamentów miozynowych a więc i o omawianym hipotetycznym efekcie obniżania aktywności ATPazy. Wspomniano już, że miozyna ufosforylowana wykazuje większe powinowactwo wobec aktyny (96, 97). Przy założeniu, że jest to czynnik stymulujący działanie ATPazy w stosunku do miozyny nieufosforylowanej, można sobie wyobrazić występowanie dwóch konkurencyjnych efektów. Jednego sprzyjającego wzrostowi aktywności ATPazy aktomiozyny ufosforylowanej w związku z większym powinowactwem tej formy miozyny wobec aktyny; drugiego (obniżenie aktywności ATPazy aktomiozyny ufosforylowanej) wynikającego z właściwości filamentów miozyny ufosforylowanej, co omówiono wyżej. Pierwszy z efektów nie zależy od siły jonowej roztworu, w którym prowadzona jest reakcja, natomiast występuje wyraźniej przy niedoborze aktyny niż przy jej nadmiarze. Drugi zaś zależy zarówno od stężenia soli w środowisku jak i stężenia ATP. Pemrick np. przeprowadzała hydrolizę ATP w roztworze o niskiej sile jonowej ( $\mu = 0,030$ ) i przy niskim stężeniu ATP (0,6 mM) i uzyskała prawie dwukrotnie wyższą aktywność ATPazy aktomiozyny ufosforylowanej w porównaniu do aktywności ATPazy aktomiozyny nieufosforylowanej (96).

Badano również zmiany ilości ufosforylowanych łańcuchów regulujących miozyny w czasie drażnienia izolowanych żywych mięśni. Stwierdzono, że przedłużone stymulowanie prowadzące do skurczu tężcowego w warunkach izometrycznych wpływa na ilość reszt fosforylowych inkorporowanych do łańcuchów regulujących. Badano mięśnie królika (101), żaby (102), szczura (103), myszy (104—106) i kurczęcia (107). We wszystkich przypadkach mięśni szkieletowych szybkich, przedłużony skurcz tężcowy powodował zwiększenie stopnia ufosforylowania łańcuchów regulujących. Mięśnie szkieletowe wolne myszy badane w warunkach analogicznych jak mięśnie szybkie nie wykazywały wzrostu fosforylacji łańcuchów regulujących miozyny w czasie drażnienia (104, 105). W mięśniach wolnych

kurczenia obserwowano jednakże przyrost ilości ufosforylowanego łańcucha ale po znacznie dłuższym czasie drażnienia niż w mięśniach szybkich (107). Wskazuje to na wolniejszy przebieg fosforylacji w tego typu mięśniach. Stull i in. (108) badając aktywności kinaz lekkich łańcuchów z różnych mięśni zauważyli, że w mięśniach wolnych są one około dwa razy niższe niż w szybkich. Również zawartość kinazy na gram tkanki jest o połowę mniejsza w mięśniach wolnych. Dane te tłumaczą wolniejszy przyrost ilości ufosforylowanych łańcuchów regulujących w czasie pracy mięśnia wolnego. Przez analogię z mięśniami gładkimi oczekiwano zbieżności stopnia fosforylacji łańcuchów regulujących i cyklu skurczu i rozkurczu mięśni szkieletowych. Zaobserwowany wzrost ilości ufosforylowanych łańcuchów regulujących nie pokrywa się czasowo z przebiegiem cyklu skurcz-rozkurcz, ani tym bardziej z cyklem tworzenia się mostku poprzecznych miozyna-aktyna (102, 103). Ostatnio Klug i in. (109) drażniąc mięsień szkieletowy szczura prądem o niskiej częstotliwości (5 Hz), co pozwalało na pełny cykl skurczu i rozkurczu między dwoma impulsami, stwierdzili przyrost fosforylacji analogiczny do skurczu tężcowego. Wskazuje to na przedłużoną w stosunku do czasu skurczu aktywność kinazy i małą aktywność fosfatazy pracującej w fazie rozkurczu. Zespół Stulla wykazał zbieżność stopnia fosforylacji miozyny i wzmocnienia pojedynczego skurczu po uprzedniej stymulacji tężcowej mięśnia (103) oraz wzmocnienia pojedynczego skurczu przy drażnieniu prądem o niskiej częstotliwości (109). Może to sugerować wpływ fosforylacji łańcucha regulującego na mechaniczne parametry pracy mięśnia takie jak siła i szybkość skurczu. W procesie przemiany energii chemicznej w mechaniczną zachodzącym w mięśniach zużywane przez ATPazę aktomiozynową ATP stanowi około 70% ogólnej ilości związku wysokoenergetycznych fosforu. Crow i Kushmeric (104, 105) zaobserwowali zależność między fosforylacją łańcucha regulującego miozyny a zużyciem energii i szybkością skurczu. Podczas izometrycznego skurczu tężcowego mięśnia szkieletowego szybkiego myszy wraz z przyrostem ilości reszt fosforylowych w lekkich łańcuchach miozyny, obniżeniu ulegała szybkość rozkładu związków wysokoenergetycznych fosforu. Jednocześnie przy mniejszym zużyciu energii, mięsień utrzymywał nie zmienione napięcie skurczu izometrycznego. W warunkach izotonicznej pracy mięśnia fosforylacja łańcuchów regulujących powodowała znaczne obniżenie szybkości skurczu, co wyjaśnia rolę fosforylacji jako czynnika regulującego zużycie energii przez mięsień szybki przy przedłużającym się czasie pracy (104—106). Mięśnie szybkie są przystosowane do wytwarzania dużej mocy w krótkim okresie czasu. Przy przedłużającym się obciążeniu mięśnia fosforylacja powoduje zmniejszenie zużycia ATP bez obniżenia napięcia mięśnia kosztem spadku jego sprawności motorycznej, której miernikiem jest szybkość skurczu. W tych samych warunkach eksperymentalnych mięśnie szkieletowe wolne nie wykazywały takiego efektu. Takie zachowanie moż-

na tłumaczyć odmienną w stosunku do mięśni szybkich funkcją spełnianą w organizmie zwierzęcia przez mięśnie wolne, które są przystosowane do pracy przy stałych obciążeniach.

Omówione powyżej badania dotyczące fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny mięśni szkieletowych wydają się potwierdzać jej regulującą rolę w procesie skurczu mięśnia. Jednakże nie można porównywać działających tu mechanizmów z mechanizmami działającymi w regulacji skurczu mięśni gładkich.

Chociaż zarówno z badań *in vivo* jak i *in vitro* wynika, że forma łańcucha regulującego miozyny z mięśni szkieletowych wpływa na współdziałanie tego białka z aktyną, to jednak trudno porównać te wpływy, ponieważ badane są w zupełnie odmiennych warunkach. Obniżenie aktywności ATPazy aktomiozynowej w wyniku fosforylacji łańcuchów regulujących miozyny *in vitro* spowodowane jest, jak posulowano wyżej, inną trwałością w obecności ATP filamentów ufosforylowanej miozyny niż filamentów miozyny nefosforylowanej. Czy i jakim zmianom konformacyjnym miozyny wywołanym ATP i dokonującym się w pełnej strukturze miofibryli odpowiadają różnice trwałości filamentów miozynowych i w jaki sposób wpływają na aktywność aktomiozynowej ATPazy w pracującym mięśniu? Na to pytanie nie można jeszcze udzielić odpowiedzi. Innym zagadnieniem oczekującym wyjaśnienia jest wpływ zwiększonego powinowactwa aktyny do miozyny ufosforylowanej na szybkość łączenia się i rozdzielania miozyny i aktyny poprzez poprzeczne mostki w mięśniu.

#### IV. Uwagi końcowe

Kendrick-Jones i in. (13) wyodrębnili grupę lekkich łańcuchów miozyny i nazwali je regulującymi tylko na podstawie ich zdolności zastępowania łańcuchów miozyny mięczaków w regulacji oddziaływania tego białka z aktyną. Do tej grupy zaliczono również lekkie łańcuchy miozyny z mięśni szkieletowych szybkich o ciężarze cząsteczkowym 18 000.

Wydaje się jednak, że łańcuchy te mogą również wpływać na oddziaływanie miozyny z aktyną w mięśniu szkieletowym obok istniejącego systemu regulacji tego oddziaływania przez zmiany konformacyjne tropomiozyny i troponiny, składników cienkiego filamentu, wywołane zwiększeniem stężenia wolnych jonów wapnia w komórce mięśniowej.

Łańcuchy regulujące miozyny z mięśni szkieletowych mogą ulegać zmianom konformacyjnym pod wpływem wiązania jonów wapnia (39, 41, 64) jak i fosforylacji w wyniku aktywacji kinazy lekkich łańcuchów (16).

W dotychczasowych badaniach nie stwierdzono wpływu jonów wapnia na wzajemne oddziaływanie miozyny z mięśni szkieletowych i aktyny bez tropomiozyny i troponiny (11). Haselgrove jednak zaobserwował ruchy główek miozyny wywołane zwiększeniem stężenia jonów wapnia na tak

rozciągniętych włóknach mięśni szkieletowych, że kontakt aktyny z miozyna nie był możliwy (33). Ruchy te zależne od jonów wapnia mogą być spowodowane wpływem fosforylacji lekkich łańcuchów zachodzącej w tych warunkach (16). Modyfikacja oddziaływania aktyny z miozyna *in vitro* (98) i *in vivo* (104—106) poprzez fosforylację łańcucha regulującego wydaje się to potwierdzać.

W mięśni szkieletowym, fosforylacja łańcuchów regulujących ma ścisły związek z wydajnością pracy i funkcjonalnym przeznaczeniem mięśnia. Fosforylacja spełnia rolę regulacyjną poprzez zmianę oddziaływań miozyna-aktyna dostosowując je do możliwości energetycznych mięśnia i wymogów organizmu. Dzieje się to być może poprzez sprzężenie regulacji aktywności kinazy lekkich łańcuchów z układem humoralnym (110, 111).

Zaakceptowano 20 maja 1983

#### PIŚMIENNICTWO

1. Huxley A. F., (1957), *Prog. Biophys.*, **7**, 255—313.
2. Huxley A. F., (1974), *J. Physiol. (Lond.)*, **243**, 1—43.
3. Huxley A. F., Simons R. M., (1971), *Nature*, **233**, 533—538.
4. Squire J., (1981), *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York and London.
5. Weeds A. G., (1969), *Nature*, **223**, 1362—1364.
6. Lowey S., Risby D., (1971), *Nature*, **234**, 81—85.
7. Frank G., Weeds A. G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **44**, 317—334.
8. Huxley H. E., Brown W., (1967), *J. Mol. Biol.*, **30**, 383—434.
9. Squire J. M., (1975), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 137—163.
10. Haselgrove J. C., Stewart M., Huxley H. E., (1976), *Nature*, **261**, 606—608.
11. Ebashi S., Kodama A., (1966), *J. Biochem.*, **59**, 425—426.
12. Sobieszek A., Small J. V., (1976), *J. Mol. Biol.*, **102**, 75—92.
- 12a. Walsh M. P., Hartshorne D. J., (1982), *Calcium and Cell Function*, t. 3, 223—269.
- 12b. Adelstein R. S., Eisenberg E., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 921—955.
13. Kendrick-Jones J., Lehman W., Szent-Györgyi A. G., (1970), *J. Mol. Biol.*, **54**, 313—326.
14. Kendrick-Jones J., Szentkiralyi E. M., Szent-Györgyi A. G., *J. Mol. Biol.*, **104**, 747—775.
15. Pires E. M. V., Perry S. V., Thomas M. A. W., (1974), *FEBS Lett.*, **41**, 292—296.
16. Pires E. M. V., Perry S. V., (1977), *Biochem. J.*, **167**, 137—146.
17. Morgan M., Perry S. V., Ottaway J., (1976), *Biochem. J.*, **151**,
18. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 405—420.
19. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
20. Kasman K., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 77—91.
21. Dąbrowska R., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 467—481.
22. Dąbrowska R., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 125—145.
23. Collins J. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 303—308.

24. Weeds A. G., McLachlan A. D., (1974), *Nature (Lond.)*, **252**, 646—649.
25. Tufty R. M., Kretsinger R. H., (1975), *Science*, **187**, 167—169.
26. Collins J. H., (1976), *Nature (Lond.)*, **259**, 699—700.
27. Wagner P. D., Giniger E., (1981), *Nature (Lond.)*, **292**, 560—562.
28. Silberstein L., Lowey S., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4403—4407.
29. Werber M. M., Oplatka A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 823—830.
30. Morimoto K., Harrington W. F., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 693—709.
31. Bagshaw C. R., Reed G. H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1975—1983.
32. Lehman W., (1978), *Nature (Lond.)*, **274**, 80—81.
33. Haselgrove J. C., (1975), *J. Mol. Biol.*, **92**, 113—143.
34. Bagshaw C. R., Kendrick-Jones J., (1979), *J. Mol. Biol.*, **130**, 317—337.
35. Kendrick-Jones J., Szentkiralyi E. M., Szent-Györgyi, (1976), **104**, 747—775.
36. Kendrick-Jones J., (1975), w: *Molecular Basis of Motility*. Wyd. Heilmeyer L., Rüegg J. C., Wieland T., Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 122—135.
37. Kendrick-Jones J., Jakes R., (1976), w: *Intern. Symposium on Myocardial Failure*. Wyd. Requier G., Weber A., Goodwin J., München, Tergensee, 28—40.
38. Stafford W. F., Szentkiralyi E. M., Szent-Györgyi A. G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 5273—5280.
39. Werber M. M., Gaffin S. L., Oplatka A., (1972), *J. Mechanochem. Cell Motil.*, **1**, 91—96.
40. Kuwayama H., Yagi K., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 25—33.
41. Alexis M. N., Gratzer W. B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2319—2325.
42. Chantler P. D., Szent-Györgyi A. G., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5440—5448.
43. Kasman K., Kąkol I., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 509—514.
44. Wikman-Coffelt, J., (1980), *Biochem. J.*, **185**, 265—268.
45. Strivastava S., Cooke R., Wikman-Coffelt J., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 1—7.
46. Weeds A. G., (1969), *Nature (Lond.)*, **223**, 1362—1364.
47. Gazith J., Himmelfarb S., Harrington W. F., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 15—22.
48. Kąkol I., Kasman K., Michnicka M., (1978), w: *7th Eur. Conf. on Muscle and Motility*, Warszawa, 77.
49. Kąkol I., Kasman K., Michnicka M., (1981), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* (w druku).
50. Weeds A. G., Lowey S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 701—725.
51. Pemrick S. M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4047—4054.
52. Holt J. C., Lowey S., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4609—4620.
53. Bagshaw C. R., (1980), *J. Muscle Research and Cell Motility*, **1**, 255—277.
54. Hozumi T., Hotta K., (1978), *J. Biochem.*, **83**, 671—676.
55. Kasman K., (1978), praca doktorska — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa, 1—135.
56. Grabarek Z., Kuźnicki J., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 209—224.
57. Kretsinger R. H., Nockolds C. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313—3326.
58. Moeews P. C., Kretsinger R. H., (1975), *J. Mol. Biol.*, **91**, 201—228.
59. Kretsinger R. H., Barry C. D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 40—52.

60. Vogt H. P., Strassburger W., Wollmer A., Fleischauer J., Bullard B., Mercola D., (1979), *J. Theor. Biol.*, **76**, 297—310.
61. Kłoczewiak M., Grabarek Z., Boguta G., Stępkowski D., Drabikowski W., W: XVII Zjazd PTBioch., Warszawa, 1980, 118.
62. Weeds A. G., Pope B., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 129—157.
63. Cardinaud R., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **122**, 527—533.
64. Okamoto Y., Yagi K., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 111—120.
65. Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H., (1969), *J. Mol. Biol.*, **42**, 1—29.
66. Yamamoto K., Sekine T., (1979), *J. Biochem.*, **86**, 1855—1862.
67. Bagshaw C. R., (1977), *Biochemistry*, **16**, 59—67.
68. Balint M., Szilagyi L., Feketa G. Y., Blazso M., Biro N. A., (1968), *J. Mol. Biol.*, **37**, 317—330.
69. Balint M., Sréter F. A., Wolf I., Nagy B., Gergely J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6168—6177.
70. Manuel H., Zobel C. R., Siemankowski R. F., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **626**, 88—96.
71. Hozumi T., Morales M. F., Botts J., (1979), *Anal. Biochem.*, **95**, 133—138.
72. Mornet D., Bertrand R., Pantel P., Audemard E., Kassab R., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2110—2120.
73. Elzinga M., Collins J. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**, 4281—4284.
74. Shukla K. K., Ramirez F., Marecek J. F., Levy H. M., (1979), *J. Theor. Biol.*, **76**, 359—367.
75. Barany M., Barany K., (1972), w: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **37**, 153—156.
76. Schaub M. C., Watterson J. G., (1972), w: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **37**, 153—156.
77. Kameyama T., Sekine T., (1973), *J. Biochem. (Tokyo)*, **74**, 1283—1285.
78. Duke J., Takashi R., Ue K., Morales M. F., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **73**, 302—306.
79. Kameyama T., Katori T., Sekine T., (1977), *J. Biochem., (Tokyo)*, **81**, 709—714.
80. Kameyama T., (1980), *J. Biochem., (Tokyo)*, **87**, 581—585.
81. Watterson J. G., Kohler L., Schaub M. C., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6470—6477.
82. Srivastava S., Wikman-Coffelt J., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 1383—1388.
83. Winkelman J., Lowey S., (1983), w: Materiały Rob. Konf. Mięśniowej, Alpbach.
84. Yazawa K., Kuwayama H., Yagi K., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 1253—1258.
85. Blumenthal D. K., Stull J. T., (1980), *Biochemistry*, **19**, 5608—5614.
86. Perrie W. T., Perry S. V., (1970), *Biochem. J.*, **119**, 31—38.
87. Sobieszek A., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 477—483.
88. Górecka A., Aksoy M. O., Hartshorne D. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 325—331.
89. Chacko S., Conti M. A., Adelstein R. S., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 129—133.
90. Mrwa U., Troschka M., Gross C., Katzinski L., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 415—419.
91. Katzinski L., Mrwa U., (1980), *Experientia*, **36**, 282—283.



92. Di Salvo J., Gruenstein E., Schmidt C., (1979), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **162**, 337—341.
93. Ritz-Gold C. J., Cooke R., Blumenthal D. K., Stull J. T., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 209—214.
94. Holroyde M. I., Potter J. D., Solaro R. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6478.
95. Perry S. V., Cole H. A., Frearson N., Noir A. G., Nairn A. C., Solaro R. J., (1978), w: Proc. 12th FEBS Meeting, Dresden, **54**, 147—159.
96. Pemrick S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8836—8841.
97. Michnicka M., Kasman K., Kąkol I., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 470—475.
98. Kąkol I., Kasman K., Michnicka M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 437—443.
99. Cook R., Stull J. T., (1982), w: Cell and Muscle Motility 1. Wyd. Dowben R. M., Shay I. W., Plenum Press, New York, London.
100. Maruyama K., Gergely J., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1100—1106.
101. Stull J. T., High C. W., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 209—214.
102. Barany K., Barany M., Gillis J. H., Kushmerick M. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3617—3623.
103. Manning D. R., Stull J. T., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 164—170.
104. Crow M. T., Kushmerick M. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2121—2124.
105. Crow M. T., Kushmerick M. J., (1982), *Science*, **217**, 835—837.
106. Kushmerick M. J., Crow M. T., (1983), *Federation Proc.*, **42**, 14—20.
107. Hager S. R., Barany M., Barany K., Homa F. L., (1982), *Mol. Physiol.*, **2**, 121—132.
108. Stull J. T., Blumenthal D. K., Miller J. R., Di Salvo J., (1982), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **3**, 105—110.
109. Klug G. A., Botterman B. R., Stull J. T., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4688—4690.
110. Cavadore J.-C., Le Pench Ch. J., Walsh M. P., Vallet B., Molla A., Damaille J. G., (1981), *Biochimie*, **63**, 301—306.
111. Edelman A. M., Krebs E. G., (1982), *FEBS Lett.*, **138**, 293—298.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be clearly documented and supported by appropriate evidence. This includes receipts, invoices, and other relevant documents that can be used to verify the accuracy of the records.

The second part of the document focuses on the process of reconciling accounts. It explains how to compare the records maintained by the organization with the statements provided by banks and other financial institutions. This process is crucial for identifying any discrepancies and ensuring that the books are balanced.

The third part of the document addresses the issue of budgeting and financial planning. It discusses how to set realistic goals and allocate resources effectively. This involves analyzing past performance and projecting future needs based on current trends and market conditions.

The fourth part of the document covers the topic of financial reporting. It outlines the requirements for preparing financial statements and provides guidance on how to present the information in a clear and concise manner. This includes the preparation of the balance sheet, income statement, and cash flow statement.

The fifth and final part of the document discusses the importance of internal controls. It explains how to design and implement a system of checks and balances to prevent fraud and errors. This involves establishing clear policies and procedures, as well as conducting regular audits to ensure compliance.

ANNA JANECKA \*

## Metody otrzymywania nukleozydotrifosforanów znakowanych izotopem fosforu [<sup>32</sup>P] w pozycji alfa i gamma

### Methods of Preparation of Nucleosidetriphosphates Labeled with Phosphorus-32 in Alfa and Gamma Position.

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Metody otrzymywania  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P] nukleozydotrifosforanów.
  - III-1. Metody enzymatyczne.
  - III-2. Metody chemiczne.
- III. Metody otrzymywania  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] nukleozydotrifosforanów.
  - III-1. Metody enzymatyczne.
  - III-2. Metody chemiczne.
    - III-2-1. Otrzymywanie 5'-[<sup>32</sup>P] nukleozydomonofosforanów.
    - III-2-2. Synteza  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] nukleozydotrifosforanów z [<sup>32</sup>P] nukleozydomonofosforanów.
  - III-3. Chemiczno-enzymatyczne metody syntezy  $\alpha$ -znakowanych nukleozydotrifosforanów.

#### Contents

- I. Introduction
- II. Methods of preparation of  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P] nucleosidetriphosphates
  - II-1. Enzymatic methods
  - II-2. Chemical methods
- III. Methods of preparation of  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] nucleosidetriphosphates
  - III-1. Enzymatic methods
  - III-2. Chemical methods
    - III-2-1. Preparation of 5'-[<sup>32</sup>P] nucleosidemonophosphates
    - III-2-2. Synthesis of  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] nucleosidetriphosphates from [<sup>32</sup>P] nucleosidemonophosphates
  - III-3. Chemico-enzymatic methods of preparation of  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] nucleosidetriphosphates

Wykaz stosowanych skrótów:  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]NTP — nukleozydo-5'-trifosforan znakowany izotopem fosforu [<sup>32</sup>P] w pozycji  $\gamma$ ;  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]NTP — nukleozydo-5'-trifosforan znakowa-

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

ny izotopem fosforu [ $^{32}\text{P}$ ] w pozycji  $\alpha$ ; pN — nukleozydo-5'-monofosforan; Np — nukleozydo-3'-monofosforan; \*pNp — 5'-[ $^{32}\text{P}$ ] nukleozydo 5',3'-difosforan; NpN' — dinukleozydomonofosforan; DMF — N,N-dimetyloamid kwasu mrówkowego; DMSO — dimetylosulfotlenek; DCC — dicykloheksylokarbodiimid; TEA — trietyloamina.

## I. Wstęp

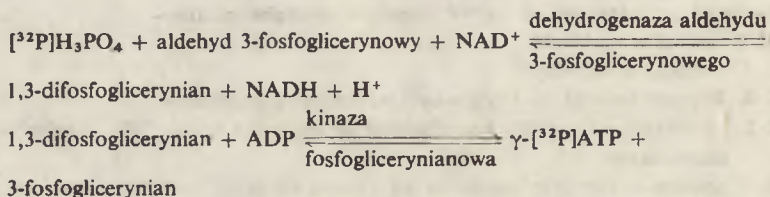
Niniejszy przegląd poświęcony jest używanym w badaniu metabolizmu komórkowego  $\alpha$ - i  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ] nukleozydotrifosforanom. Ich stosowanie w warunkach laboratoryjnych stało się koniecznością, toteż wielu badaczy podjęło próby ich otrzymania bądź na drodze chemicznej, bądź enzymatycznej.

## II. Metody otrzymywania $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ] nukleozydotrifosforanów

### II-1. Metody enzymatyczne

Enzymatyczne metody otrzymywania NTP sprowadzają się głównie do syntezy ATP. Początkowo związek ten otrzymywano na drodze fosforylacji ADP, w obecności odpowiedniej kinazy, przez znakowane izotopem [ $^{32}\text{P}$ ] donory reszt fosforanowych takie jak: acetylofosforan (1), karbamylfosforan (2, 3, 4), fosfoenolpirogrotonian (5, 6) lub kwas pirofosforowy (7). Wszystkie te metody wymagały z jednej strony znakowanych substratów, które otrzymywano w wyniku skomplikowanych reakcji chemicznych, z drugiej zaś w miarę oczyszczonych kinaz, toteż szybko zostały zarzucone.

Dużym krokiem naprzód w otrzymywaniu  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP było zastosowanie enzymów szlaku glikolitycznego: dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (EC 1.2.1.12) i kinazy fosfoglicerynianowej (EC 2.7.2.3) (8) (Ryc. 1). Aldehyd 3-fosfoglicerynowy reaguje w obecności dehydrogenazy



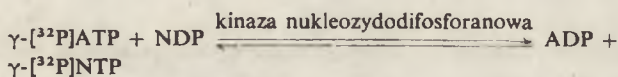
**Ryc. 1.** Schemat reakcji syntezy  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP przy użyciu enzymów szlaku glikolitycznego (9).

aldehydu 3-fosfoglicerynowego (Ryc. 1.1) z [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dając 1[ $^{32}\text{P}$ ], 3-difosfoglicerynian, który jest donorem znakowanej reszty fosforanowej w reakcji z ADP w obecności kinazy fosfoglicerynianowej (Ryc. 1.2). Szcze-

góły dotyczące tej reakcji można znaleźć w kolejno publikowanych przez różnych autorów pracach (9—12). Aktywność właściwa  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP zarówno w tej, jak i we wszystkich dalej opisanych reakcjach jest równa aktywności właściwej używanego [ $^{32}\text{P}$ ]. Aktywność właściwa tzw. „bezośnikowego” [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> wynosi teoretycznie 370 giga Bq/ $\mu\text{mol}$  (10 000 mCi/ $\mu\text{mol}$ ), ale w praktyce jest zawsze niższa. Osiągnięcie dużej aktywności właściwej  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP zależy więc od możliwości pracy z bardzo małymi ilościami substratów, co najłatwiej osiągnąć w reakcjach enzymatycznych, lub z bardzo dużymi dawkami radioaktywności.

W 1964 r. Glyn n i Chappell (13) opracowali enzymatyczną metodę syntezy  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP, która do chwili obecnej jest uznawana za najprostszą i najszybszą. Autorzy wykorzystali reakcję wymiany pomiędzy fosforanem nieorganicznym i końcową grupą fosforanową ATP, w obecności kinazy fosfoglicerynianowej (EC 2.7.2.3) i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (EC 1.2.1.12). NAD niezbędny w reakcji jest wprowadzany w formie związanej z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Równowaga reakcji jest przesunięta w kierunku syntezy ATP tak, że ADP w mieszaninie reagującej występuje tylko w śladowych ilościach. Substratami reakcji są więc ATP, [ $^{32}\text{P}$ ] oraz 3-fosfoglicerynian. Gdy po godzinie inkubacji osiągnięty zostaje stan równowagi 87% ATP jest wyznakowane i to wyłącznie w pozycji  $\gamma$ . Po zastosowaniu niewielkich modyfikacji, metodę tę stosuje się obecnie w wielu laboratoriach otrzymując  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP o aktywności właściwej około 74 giga Bq/ $\mu\text{mol}$  (14). Metodę tę można wykorzystać również do otrzymania  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]UTP,  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]CTP i  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]GTP, chociaż wydajność tych syntez jest dużo niższa.

Inną drogą prowadzącą do powstawania znakowanego w pozycji  $\gamma$  UTP, CTP i GTP jest reakcja polegająca na przeniesieniu reszty fosforanowej z ATP znakowanego w pozycji  $\gamma$  na odpowiedni NDP (Ryc. 2) przy użyciu

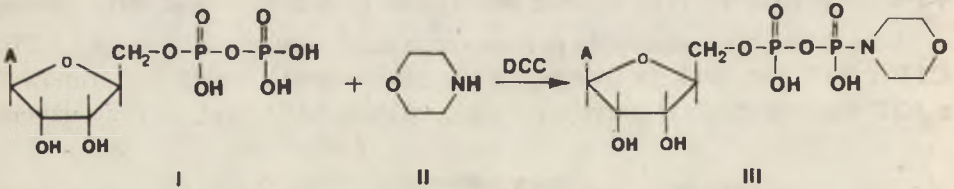


**Ryc. 2.** Schemat reakcji syntezy  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP z NDP i  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP wykorzystanej w metodzie Keenan'a i wsp. (15).

kinazy nukleozydodifosforanowej (EC 2.7.4.6) (15, 16). Ponieważ w reakcji tej ustala się stan równowagi pomiędzy NDP i NTP spodziewano się, że w obecności dużego nadmiaru NDP ilość powstałego NTP znacznie wzrośnie. Okazało się jednak, że wszystkie NDP obecne w środowisku w nadmiarze działają jako inhibitory kinazy nukleozydodifosforanowej. Wydajność reakcji zatem jest ograniczona i waha się w zależności od użytego NDP od 68 do 76%. Zachodzi ponadto konieczność oddzielania nieprereagowanego  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP, co przeprowadza się w reakcji z glukozą i heksokinazą (EC 2.7.1.1).

## II-2. Metody chemiczne

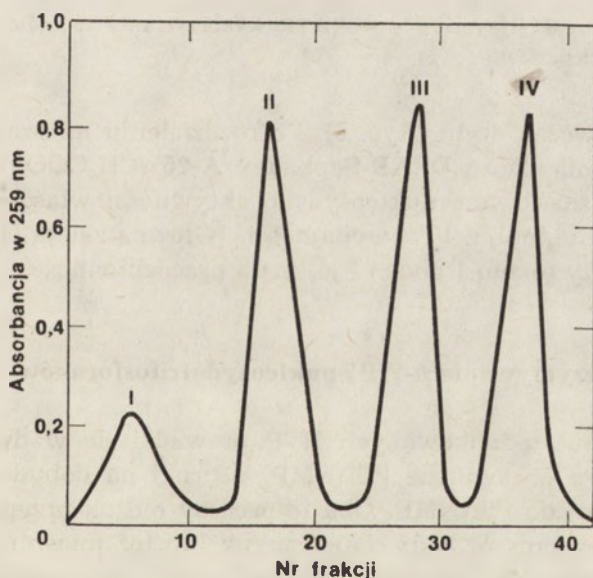
Próby otrzymania  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP na drodze chemicznej sięgają wprawdzie lat pięćdziesiątych, jednak efekty metod chemicznych nie mogły początkowo konkurować z efektami metod enzymatycznych. Usiłowano co prawda otrzymać nukleozydotrifosforany znakowane w pozycji  $\gamma$  przez kondensację [ $^{32}\text{P}_i$ ] z NDP w obecności dicykloheksylokarbodiimidu; ten ostatni jednak działa niespecyficznie i w wyniku reakcji otrzymywano trudną do rozdzielenia mieszaninę różnych produktów (17, 18, 19). W późniejszych pracach oparto syntezę wiązania bezwodnikowego na reakcji aktywnego amidu z ortofosforanem lub monopodstawionym fosforanem w środowisku bezwodnym (20). Wcześniej już wykazano, że monoestry kwasu fosforowego łatwo przechodzą w dwupodstawione pochodne w reakcji z alkoholami lub aminami w obecności dicykloheksylokarbodiimidu. Natomiast dwuestry kwasu fosforowego nie dają się na tej drodze przeprowadzić w fosforany trójalkilowe lub dwualkilofosforowe amidy. Na tej podstawie Wehrli i wsp. (23, 24) założyli, że adenozyνο-5'-difosforan powinien reagować z aminami i dicykloheksylokarbodiimidem wyłącznie w swojej końcowej, monopodstawionej grupie fosforanowej, dając amid fosforowy. Grupa fosforanowa w pozycji  $\alpha$ , jako dwupodstawiona nie powinna w tych warunkach reagować. Doświadczenie potwierdziło słuszność tych założeń. W reakcji ADP(I) z morfoliną (II) i dicykloheksylokarbodiimidem w warunkach używanych zwykle do syntezy fosfomorfolidów nukleozydów powstawał z 75% wydajnością  $\text{P}^1$ -(adenozyνο-5')- $\text{P}^2$ -(4-morfolino) pirofosforan (ADP-morfolid, III) (Ryc. 3) wyodrębniany na



Ryc. 3. Schemat reakcji syntezy ADP-morfolidu wykorzystanej w metodzie Wehrli'ego i wsp. (24).

drodze chromatografii jonowymiennej. Jedynym ubocznym produktem był adenozyνο-5'-fosfomorfolid (17%), który powstawał w reakcji AMP (pochodzącego z częściowego rozkładu ADP) z morfoliną i dicykloheksylokarbodiimidem. Jak należało się spodziewać ADP-morfolid (III) był całkowicie odporny na działanie alkalicznej fosfatazy (EC 3.1.3.1), co potwierdzało nieobecność monopodstawionej grupy fosforanowej. Był on jednak dobrym substratem fosfodiesterazy I (EC 3.1.4.1), która rozkładała go do AMP i morfolidu kwasu fosforowego. Wehrli i wsp. (24) badali następnie warunki bezpośredniej kondensacji ADP-morfolidu z ortofosforanem dającej jako produkt ATP. Stwierdzili oni, że w reakcji prowadzonej w bezwodnej pirydynie powstający ATP ulega szybko degradacji

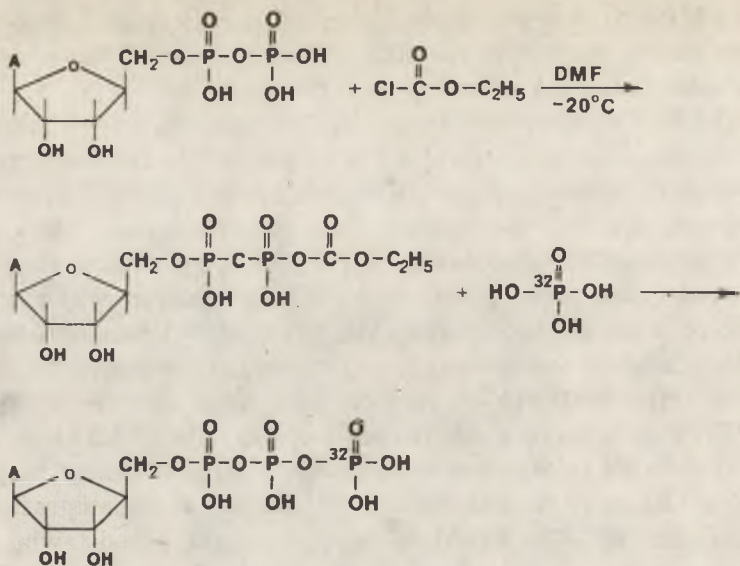
do ADP i AMP (25). Już wcześniej ci sami autorzy wykazali, że bezwodny DMSO jest bardzo dogodnym rozpuszczalnikiem stosowanym w syntezach pirofosforanów (26) i nie powoduje reakcji dysmutacji (27). Otrzymywanie  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP w wyniku kondensacji ADP-morfolidu z [ $^{32}\text{P}$ ] ortofosforanem tributylamoniowym prowadzili więc autorzy w bezwodnym DMSO w ciągu 45 godz. Mieszaninę rozdzielali następnie metodą jonowymiennej chromatografii na DEAE-celulozie ( $\text{HCO}_3^-$ ). Wydajność otrzymanego  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP sięgała 65% w stosunku do [ $^{32}\text{P}_i$ ]. Pozycję znakowanego atomu fosforu potwierdzali przez przeniesienie grupy fosforanowej z pozycji  $\gamma$  na glukozę przy udziale heksokinazy (28, 29). Wehrli i wsp. opracowali też inną metodę analizy znakowanych NTP nie ograniczającą się, tak jak poprzednia, tylko do [ $^{32}\text{P}$ ]ATP. Metoda ich polega na częściowej degradacji [ $^{32}\text{P}$ ]NTP przy użyciu alkalicznej fosfatazy (EC 3.1.3.1), w wyniku czego otrzymuje się mieszaninę nukleozydu, NMP, NDP oraz nieprzereagowanego NTP, które to składniki rozdziela się chromatograficznie na DEAE-celulozie ( $\text{HCO}_3^-$ ). Profil takiego rozdziału przedstawia Ryc. 4.



**Ryc. 4.** Enzymatyczna degradacja [ $^{32}\text{P}$ ]ATP. Rozdział produktów powstałych w wyniku częściowej hydrolizy ATP przy udziale alkalicznej fosfatazy. Szczyty I, II, III i IV odpowiadają kolejno: adenzynie, AMP, ADP i ATP (24).

Aktywność właściwa NMP wyznacza zawartość izotopu w pozycji  $\alpha$  badanego NTP, a różnica wartości aktywności właściwej NDP i NMP — ilość izotopu w pozycji  $\beta$ . Stosując tę metodę Wehrli i wsp. (24) ustalili, że 99,1% izotopu w syntezowanym  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP było w pozycji  $\gamma$ .

Koziółkiewicz i wsp. (30) oraz Janecka i wsp. (31) opisali metodę syntezy  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP, w której czynnikiem kondensującym NDP z [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>,



Ryc. 5. Schemat reakcji syntezy  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ATP wykorzystanej w metodzie Koziołkiewicza i wsp. (30).

jest chloromrówczan etylu (Ryc. 5). Po rozdzieleniu mieszaniny reakcyjnej na jonowymieniaczu DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) (32) autorzy otrzymali  $\gamma$  — znakowane nukleotydy o aktywności właściwej 370 mega  $\text{Bq}/\mu\text{mol}$  ( $10 \text{ mCi}/\mu\text{mol}$ ) z 40% wydajnością. Główną zaletą tej metody jest szybkość syntezy (około 1 godz.) i jej mała pracochłonność.

### III. Metody otrzymywania $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ nukleozydotrifosforanów

Otrzymywanie  $\alpha$ -znakowanych NTP prowadzi się w dwóch etapach. Pierwszy polega na syntezie  $^{32}\text{P}$ NMP, a drugi na dobudowaniu reszty pirofosforanowej do  $^{32}\text{P}$ NMP. Oba te procesy można przeprowadzić metodami enzymatycznymi bądź chemicznymi lub też mieszanymi chemiczno-enzymatycznymi. W tych ostatnich fosforylacja nukleozydu odbywa się na drodze chemicznej, a dobudowanie reszty pirofosforanowej — na drodze enzymatycznej.

#### III-1. Metody enzymatyczne

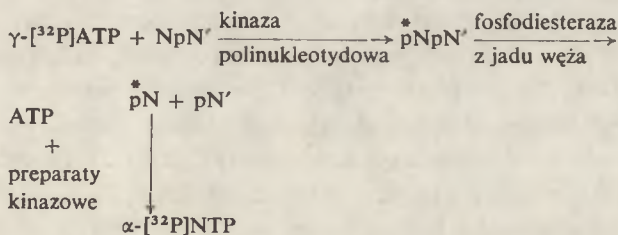
W latach pięćdziesiątych  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ dNTP i  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ NTP otrzymywano przez degradację kwasów nukleinowych, wyodrębnianych z bakterii hodowanych na pożywkach z radioaktywnym fosforem. Lehman i wsp. (33) izolowali DNA z komórek *E. coli* namnażanych na podłożu zawierającym



[ $^{32}\text{P}$ ] ortofosforan; DNA degradowali do polidezoksyrybonukleotydów za pomocą krystalicznej DN-azy trzuskowej (EC 3.1.4.5). Do otrzymania 5'-monoklueotydów stosowali oczyszczoną fosfodiesterazę z jadu węża (EC 3.1.4.1), wolną od monokleotyduzy (EC 3.1.3.5). Uzyskaną mieszaninę [ $^{32}\text{P}$ ] dezoksynukleozydomonofosforanów rozdzielali na drodze chromatografii jonowymiennej, otrzymując po około 1,5 mikromola każdego [ $^{32}\text{P}$ ]dNMP o aktywności właściwej 11 mega Bq/mmol (0.3 mCi/mmol). Zamianę ich w  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]dNTP autorzy przeprowadzali przy użyciu częściowo oczyszczonych kinaz z *E. coli*, a dawcą reszt fosforanowych był ATP. Wydajność otrzymywanych  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]dNTP wahała się w granicach 60—75%. W podobny sposób inni autorzy (34, 35) izolowali i degradowali [ $^{32}\text{P}$ ]RNA otrzymując  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP.

Opisane powyżej biosyntetyczno-enzymatyczne metody otrzymywania znakowanych NTP przez degradację kwasów nukleinowych są ogromnie pracochłonne. Korzyści wynikające z takiej drogi syntezy są jednak bezsporne w przypadkach, gdy potrzebny jest jednocześnie cały szereg znakowanych nukleotydów.

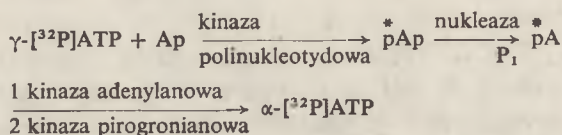
Dalsze badania i poszukiwania dogodnej metody syntezy  $\alpha$ -znakowanych NTP poszły w kierunku otrzymania [ $^{32}\text{P}$ ]NMP poprzez fosforylację nukleozydów (enzymatyczną bądź chemiczną). W 1968 r. Murray i Wu (36) opracowali metodę polegającą na reakcji przeniesienia znakowanej reszty fosforanowej z  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP na grupę hydroksylową w pozycji 5' odpowiedniego substratu, przy użyciu kinazy polinukleotyduowej ze szczepu *E. coli* zakażonego bakteriofagiem T<sub>4</sub> (Ryc. 6). Akceptorami tej grupy



Ryc. 6. Schemat reakcji syntezy  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP wykorzystanej w metodzie Murray'a i Wu (36).

fosforanowej mogą być jakiegokolwiek di- lub oligo-nukleotydy, a także 3'-mononukleotydy i to zarówno serii rybo- jak i dezoksy-. Autorzy używali jako substratów asymetrycznych dinukleozydomonofosforanów. Powstałe po reakcji 5'-dinukleotydy hydrolizowali do 5'-mononukleotydów fosfodiesterazą z jadu węża otrzymując jeden radioaktywny NMP (ten z końca 5'-substratu). Jego aktywność właściwa była praktycznie równa aktywności używanego  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP. Dobudowanie reszty pirofosforanowej autorzy przeprowadzali chemicznie (37) lub enzymatycznie (38).

Kihara i wsp. (39) zastąpili dinukleozydomonofosforany 3'-AMP, który jest tak samo efektywnym akceptorem fosforanu jak 5' (OH) oligonukleotydy (40) (Ryc. 7). 3'-AMP fosforylowali w pozycji 5' przy użyciu kinazy polinukleotydydowej (41) i  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP (13), otrzymując 5'-znakowany adenozyno-5',3'-difosforan (\*pAp), na który działali nukleazą P<sub>1</sub> (EC 3.1.3.6)



Ryc. 7. Schemat reakcji syntezy  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]ATP wykorzystanej w metodzie Kihary i wsp. (39).

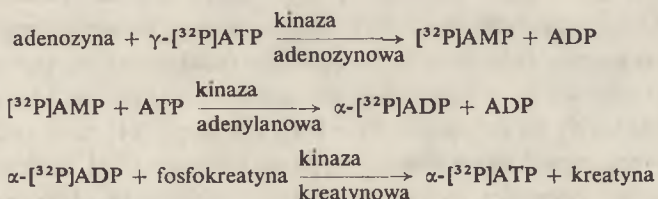
(42). Nukleaza P<sub>1</sub> jest specyficzna w stosunku do estrów 3'-fosforanowych (43), hydrolizuje więc produkt \*pAp do 5'-[<sup>32</sup>P]AMP i P<sub>1</sub>. Ten sam enzym hydrolizuje nieprzereagowany 3'-AMP do adenozyliny oraz P<sub>1</sub>. Oczyszczony elektroforetycznie [<sup>32</sup>P]AMP (44) autorzy przeprowadzali w  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]ATP przez inkubację z fosfoenolopirogronianem w obecności kinazy adenylnowej (EC 2.7.4.3) i kinazy pirogronianowej (EC 2.7.1.40). Zaletą tej metody jest możliwość użycia taniego 3'-AMP i nukleazy P<sub>1</sub>, której preparaty są bardzo aktywne, trwałe i dostępne w handlu. Metoda ta nadaje się też do otrzymywania trzech pozostałych  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]NTP, jeżeli zastąpi się 3'-AMP innym 3'-rybonukleotydem, ponieważ nukleaza P<sub>1</sub> hydrolizuje wszystkie 3',5'-difosfonukleozydy.

Dalszą modyfikacją opisanej metody jest enzymatyczna synteza  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]NTP i  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dNTP, nie wymagająca oczyszczania produktów pośrednich (45). W metodzie tej wykorzystano również, katalizowaną przez kinazę polinukleotydydową z bakteriofaga T<sub>4</sub>, wymianę pomiędzy  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP i nukleozydo-3'-monofosforanami (rybo- bądź dezoksy-). Nadmiar  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP usuwano działaniem glukokinazy (EC 2.7.1.2). Powstałe nukleozydo-3',5'-[<sup>32</sup>P] difosforany przeprowadzano nukleazą P<sub>1</sub> w 5'-[<sup>32</sup>P] nukleotydy, a po unieczynnieniu heksokinazy fosforylowano je do  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]NTP przy użyciu kinazy monofosforanowej (EC 2.7.4.4) i kinazy pirogronianowej (EC 2.7.1.40) oraz dATP (lub ATP) jako dawcy reszt fosforanowych. Otrzymany  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]ATP (lub  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dATP) uwalniano od glukozy-6-[<sup>32</sup>P] fosforanu i P<sub>1</sub> stosując DEAE-Sephadex, a następnie od dATP (lub ATP) stosując Affigel 601. Metoda ta jest obecnie uważana za najlepszą spośród enzymatycznych metod otrzymywania  $\alpha$ -znakowanych dezoksy- i rybonukleozydotrifosforanów.

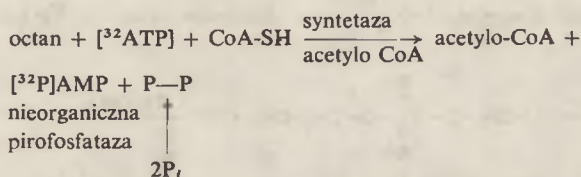
Zupełnie inne reakcje enzymatyczne wykorzystali Martin i Voorheis (46) w syntezie  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]ATP. W opisanej przez nich metodzie (Ryc. 8) można wyróżnić trzy etapy:

— syntezę  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP według Glynn'a i Chappell'a (13)

- otrzymywanie [ $^{32}\text{P}$ ]AMP w reakcji katalizowanej przez kinazę adenylozynową (EC 2.7.1.20)
- syntezę  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP z [ $^{32}\text{P}$ ]AMP w reakcjach katalizowanych przez kinazę adenylozynową (EC 2.7.4.3) i kinazę kreatynową (EC 2.7.3.2).



Ryc. 8. Schemat reakcji syntezy  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP wykorzystanej w metodzie Martin'a i Voorheis'a (46).



Ryc. 9. Ustalenie pozycji znakowanego atomu fosforu w cząsteczce ATP (46).

Końcowy produkt autorzy oczyszczali na drodze chromatografii jonowymiennej. Fakt, że znakowany atom fosforu znajduje się wyłącznie w pozycji  $\alpha$  potwierdzali za pomocą reakcji katalizowanych przez syntetazę acetylo-CoA (EC 6.2.1.1) i nieorganiczną pirofosfatazę (EC 3.6.1.1), co przedstawia Ryc. 9. Cały [ $^{32}\text{P}$ ] z ATP był po reakcji obecny w AMP.

### III-2. Metody chemiczne

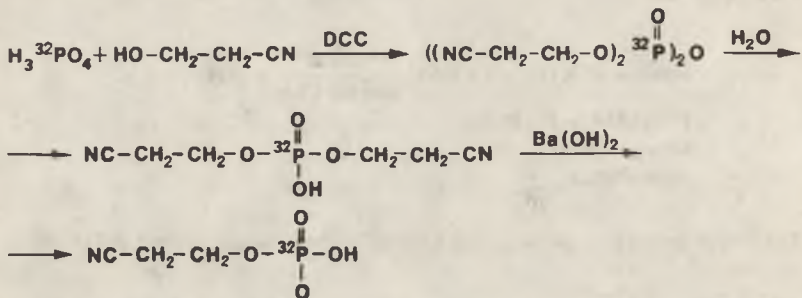
#### III-2-1. Otrzymywanie 5'-[ $^{32}\text{P}$ ] nukleozydomonofosforanów.

Estryfikacja grup hydroksylowych resztami kwasu fosforowego jest prostą, od dawna znaną reakcją. W odniesieniu do syntezy znakowanych nukleotydów należy ją jednak rozpatrywać z dwójakiego punktu widzenia. Po pierwsze — substratem w tej reakcji może być tylko kwas ortofosforowy, jako że jest to jedyna dostępna postać izotopu fosforu [ $^{32}\text{P}$ ]; po drugie — w cząsteczce rybozy występują trzy a w cząsteczce dezoksyrybozy dwie podatne na fosforylację grupy hydroksylowe, z których tylko grupa w pozycji C-5 cukru powinna zostać zestryfikowana. Można to osiągnąć bądź przez używanie do syntezy blokowanych nukleozydów, bądź też przez rozdział produktów ufosforylowanych w różnych pozycjach.

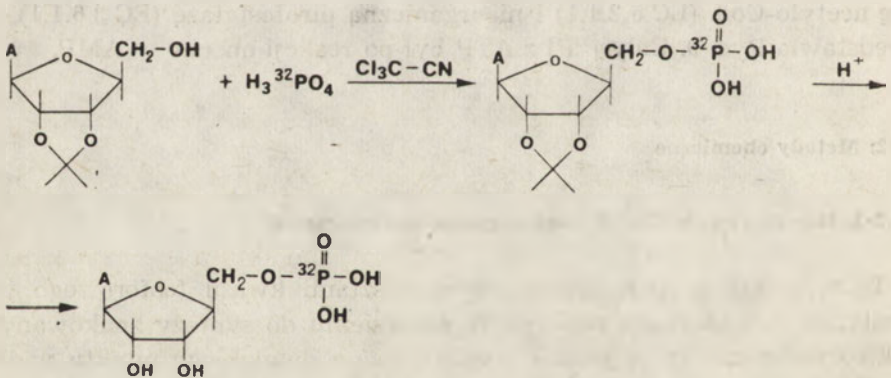
Początkowo do fosforylacji używano kwasu polifosforowego (47, 48, 49) otrzymanego przez stapianie [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> z P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Mieszanie powsta-

łych nukleozydo-2',-3' i -5' monofosforanów rozdzielano chromatograficznie (chromatografia bibułowa) wydzielając pochodną 5' z 50% wydajnością.

W 1961 r. T e n e r (50, 51) zastosował do fosforylacji monofunkcyjny odczynnik wykluczający możliwość tworzenia się mieszaniny różnych związków. Odczynnikiem tym był fosforan β-cyanoetylowy (Ryc. 10). Nadaje się on szczególnie dobrze do syntezy nukleotydów, ponieważ grupę blokującą usuwa się w środowisku słabo alkalicznym, na którego oddziaływanie nukleotydy są odporne. W e h r l i i wsp. (24) w wyniku fosforylacji 2',3'-O-izopropylidenoadenozyny przy pomocy [<sup>32</sup>P] fosforanu β-cyanoetylowego w obecności dicykloheksylokarbodiimidu otrzymali, po usunięciu grup ochronnych, [<sup>32</sup>P]AMP o aktywności właściwej 370 mega



Ryc. 10. Schemat reakcji syntezy [<sup>32</sup>P] fosforanu β-cyanoetylowego wykorzystanej w metodzie T e n e r ' a (50).

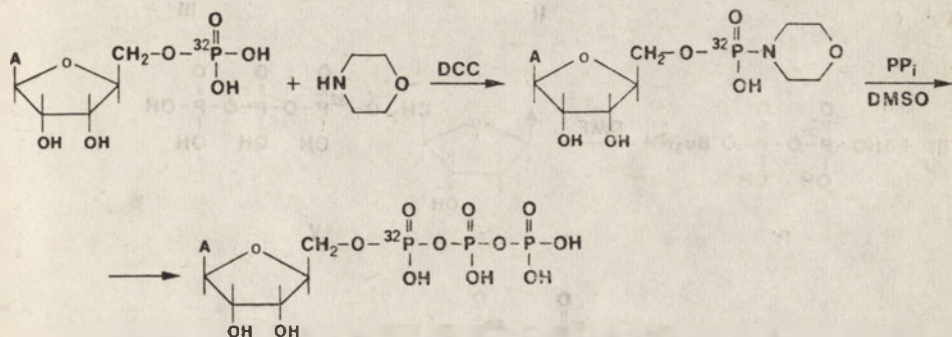


Ryc. 11. Schemat reakcji syntezy [<sup>32</sup>P]AMP wykorzystanej w metodzie W e h r l i e g o i w s p. (24).

Bq/mmol (10 mCi/mmol) z wydajnością 75% (Ryc. 11). Pewne uproszczenie (52) polegające na przeprowadzeniu całej syntezy w jednym naczyniu, bez wyodrębniania [<sup>32</sup>P] fosforanu β-cyanoetylowego, doprowadziło do otrzymania [<sup>32</sup>P]NMP o aktywności 30 giga Bq/mmol (800 mCi/mmol).

Inną chemiczną metodę syntezy znakowanych fosforem rybo- i deoksyrybonukleozydo-5'-monofosforanów opisał w serii prac S y m o n s

(53—57). Polega ona na reakcji  $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$  z blokowaniem nukleozydem przy użyciu trichloroacetonitrylu jako środka kondensującego i DMSO jako rozpuszczalnika (Ryc. 12). Aktywność właściwa otrzymywanych tą drogą  $[^{32}\text{P}]\text{NMP}$  sięgała 700 giga Bq/mmol (19 mCi/ $\mu\text{mol}$ ).

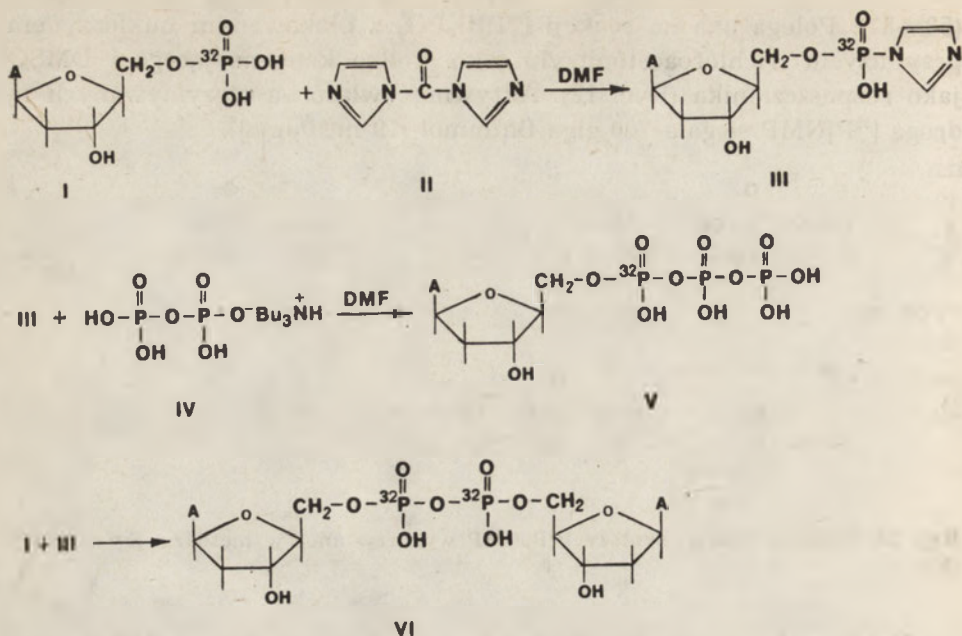


Ryc. 12. Schemat reakcji syntezy  $[^{32}\text{P}]\text{AMP}$  wykorzystanej w metodzie Symon's'a (57).

Nukleozydy można też fosforylować przez stapianie z mieszaniną mocznika i nieorganicznego fosforanu (58). Tę właśnie metodę Biebricher (59) zastosował do otrzymywania różnych, znakowanych fosforem, pochodnych nukleozydów.  $5'-[^{32}\text{P}]\text{NMP}$  otrzymywał przez stapianie nukleozydu z  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (zawierającym  $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ ) i z mocznikiem. Powstałą mieszaninę 2',3'- i 5'-NMP rozdzielał na drodze chromatografii jonowymiennej, otrzymując pochodne 5' z wydajnością 15% do 30%.

### III-2-2. Synteza $\alpha$ - $[^{32}\text{P}]$ nukleozydotrifosforanów z $[^{32}\text{P}]$ nukleozydomonofosforanów

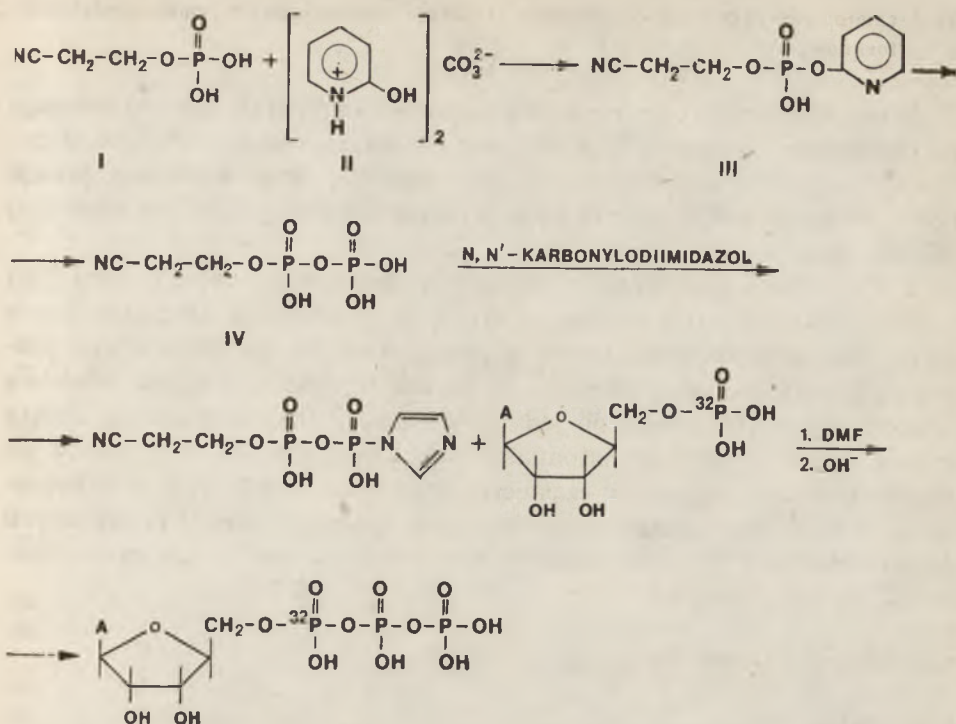
Monoestry fosforowe łatwo reagują z 1,1'-karbonyldiimidazolem dając amidy, aktywne przy tworzeniu wiązań pirofosforanowych. Reakcję tę wykorzystali Hoard i Ott (37) do konwersji mono- i oligodeoksyrybonukleotydu w 5'-trifosforany. Jeżeli substratem w tej reakcji jest znakowany  $[^{32}\text{P}]\text{NMP}$ , to jako produkt syntezy otrzymuje się  $\alpha$ - $[^{32}\text{P}]\text{NTP}$  (Ryc. 13). Powstawanie amidu (III) z nukleotydu (I) i 1,1'-karbonyldiimidazolu (II) zachodzi w ciągu 1 godziny w temperaturze pokojowej. Nieprzereagowany 1,1'-karbonyldiimidazol (II) rozkłada się metanolem przed dodaniem pirofosforanu (IV), aby zapobiec tworzeniu się nieorganicznych polifosforanów. Fosforylacja trwa 24 godziny. Głównym produktem syntezy jest  $\alpha$ - $[^{32}\text{P}]\text{NTP}$  (50—70%). W czasie fosforylacji zachodzi jednak częściowa hydroliza amidu (III), w wyniku której odtwarza się pewna ilość NMP (I); ten z kolei reagując z niezhydrolizowanym amidem (III) tworzy symetryczny pirofosforan (VI), który trzeba oddzielać chromatograficznie.



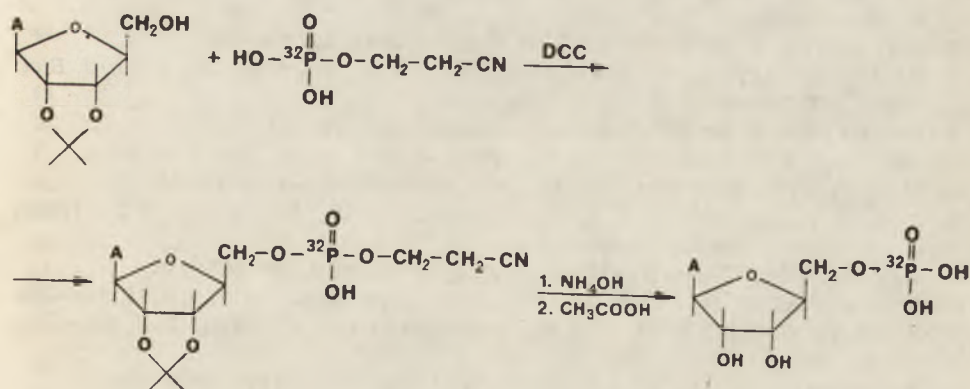
**Ryc. 13.** Schemat reakcji syntezy  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]dNTP wykorzystanej w metodzie Hoard'a i Ott'a (37).

Na użyciu 1,1'-karbonyldiimidazolu jako środka kondensującego opiera się również metoda otrzymywania  $\alpha$ -znakowanych NTP opisana przez Symon's'a (60) (Ryc. 14). Fosforan  $\beta$ -cyanoetylowy (I) reaguje z węglanem di- $\alpha$ -pirydylowym (II) dając aktywny fosforan  $\beta$ -cyanoetylo- $\alpha$ -pirydylowy (III), który wobec nadmiaru ortofosforanu przechodzi w pirofosforan  $\beta$ -cyanoetylowy (IV), wydzielany na kolumnie jonowymiennej w postaci soli cykloheksyloamoniowej. Z soli tej powstaje następnie w reakcji z 1,1'-karbonyldiimidazolem aktywny imidazolid (V), wypadający w postaci oleju i używany bez dalszego oczyszczania w reakcji ze znakowanym NMP. Po hydrolizie grupy ochronnej otrzymuje się  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP z wydajnością 35—50% w stosunku do NMP.

Moffatt (61), opierając się na wcześniejszych pracach na temat zastosowania morfoliny do syntezy aktywnych amidów (24), opisał inną metodą otrzymywania  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP (Ryc. 15). [ $^{32}\text{P}$ ]AMP przeprowadzał w AMP-morfolid (II) (62). 10,5% [ $^{32}\text{P}$ ]AMP (I) pozostawało w niezmienionej postaci, mimo to autor nie wydelał morfolidu (II) lecz dodawał do niego 4-krotny nadmiar pirofosforanu tributylamoniowego w bezwodnym DMSO. Produkty syntezy rozdelał na DEAE-celulozie, otrzymując  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP o aktywności właściwej 260 mega Bq/mmol (7 mCi/mmol) z wydajnością 70%. Obecność izotopu wyłącznie w pozycji  $\alpha$  potwierdzał przez degradację ATP fosfodiesterazą (63), która powodowała ilościowe przejście [ $^{32}\text{P}$ ]ATP w [ $^{32}\text{P}$ ]AMP i pozbawiony radioaktywności pirofosforan.



Ryc. 14. Schemat reakcji syntezy  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP wykorzystanej w metodzie Symons'a (60).



Ryc. 15. Schemat reakcji syntezy  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]NTP wykorzystanej w metodzie Moffatt'a (61).

### III-3. Chemiczno-enzymatyczne metody syntezy $\alpha$ -znakowanych nukleozydotrifosforanów.

Mieszane metody otrzymywania  $\alpha$ -znakowanych NTP (64, 65) polegają na chemicznej syntezie [ $^{32}\text{P}$ ]NMP oraz na dobudowie reszty pirofosforanowej na drodze enzymatycznej. Nie stanowią więc właściwie jakiejś nowej grupy metod, a jedynie wykorzystują metody opisane już wcześniej (57, 64, 65).

Jak wynika z niniejszego przeglądu znakowane izotopem fosforu [ $^{32}\text{P}$ ] nukleozydotrifosforany można otrzymać w warunkach laboratoryjnych na różnych drogach w zależności od posiadanych odczynników i typu pracowni. Należy jednak podkreślić, iż bardzo wysoką aktywność właściwą znakowanych NTP osiąga się jedynie metodami enzymatycznymi. Zaletą metod chemicznych jest natomiast brak specyficzności w stosunku do zasady azotowej, obecnej w cząsteczce syntetyzowanego NTP, a w konsekwencji możliwość zastosowania każdej z opisanych metod chemicznych do otrzymania NTP, zawierających dowolną — naturalną lub zmodyfikowaną — zasadę azotową.

Zaakceptowano 5 kwietnia 1983

#### PISMIENICTWO

1. Kornberg A., Kornberg S. R., (1956), *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 215—227.
2. Jones M. E., Spector L., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 819—24.
3. Mokrasch L. C., Caravaca J., Grisolia S., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 442—447.
4. Tanaka R., (1960), *J. Biol. Chem.*, (Tokyo), **47**, 207—211.
5. Tanaka R., Mano Y., Shimazono N., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 642—643.
6. Tanaka R., Mano Y., Shimazono N., (1959), *Biochim. Biophys. Acta*, **36**, 262—263.
7. Kornberg S. R., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 294—300.
8. Penefsky H. S., Pullman M. E., Datta A., Racker E., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 3330—3336.
9. Penefsky H. S., (1967), *Methods Enzymol.*, **10**, 702—703.
10. Schendel P. F., Wells R. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8319—8321.
11. Miller J. S., Burgess R. R., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2054—59.
12. Calva E., Rosenvald E. C., Szybalski W., Burgess R. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11011—11016.
13. Glynn J. M., Chappell J. B., (1964), *Biochem. J.*, **90**, 147—149.
14. Maxam A. M., Gilbert W., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 560—564.
15. Keenan R. W., Zishka M. K., Nishimura J. S., (1972), *Anal. Biochem.*, **47**, 601—608.
16. Agarwal R. P., Parks R. E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2258—2264.
17. Hall R. H., Khorana H. G., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5056—5063.
18. Khorana H. G., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3517—3527.
19. Lowenstein J. M., (1960), *Biochem. Prep.*, **7**, 5—13.



20. Khorana H. G., (1961), Some recent developments in the chemistry of phosphate esters of biological interest, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1961.
21. Moffatt J. G., Khorana H. G., (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 649—58.
22. Smith M., Moffatt J. G., Khorana H. G., (1958), *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6204—6212.
23. Verheyden D. L. M., Wehrli W. E., Moffatt J. G., (1964), *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1253—1254.
24. Wehrli W. E., Verheyden D. L. M., Moffatt J. G., (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2265—2277.
25. Wehrli W. E., Verheyden D. L. M., Moffatt J. G., (1964), *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1254—1255.
26. Moffatt J. G., (1964), *Can. J. Chem.*, **42**, 599—604.
27. Verheyden D. L. M., Wehrli W. E., Moffatt J. G., (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2257—2265.
28. Avron M., (1961), *Anal. Biochem.*, **2**, 535—543.
29. Littauer U. Z., Kimhi Y., Avron M., (1964), *Anal. Biochem.*, **9**, 85—93.
30. Koziółkiewicz W., Pankowski J., Janecka A., (1978), *Prep. Biochem.*, **8**, 471—478.
31. Janecka A., Panusz H., Pankowski J., Koziółkiewicz W., (1980), *Prep. Biochem.*, **10**, 27—35.
32. Caldwell J. C., (1969), *J. Chromat.*, **44**, 331—341.
33. Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 163—170.
34. Bollum F. J., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2399—2403.
35. Hurlbert R. B., Furlong N. B., (1967), *Methods Enzymol.*, **12**, 193—202.
36. Murray K., Wu R., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 42—43.
37. Hoard D. E., Ott D. G., (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1785—1788.
38. Bessman M. J., Herriott S. T., Orr M. J. V. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 439—445.
39. Kihara K., Nomiya H., Yukuhiro M., Mukai J. I., (1976), *Anal. Biochem.*, **75**, 672—673.
40. Richardson C. C., (1971), *Proced. Nucleic Acids Res.*, **2**, 815—828.
41. Murray K., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 569—578.
42. Lillehang J. R., Kleppe K., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1225—1230.
43. Fujimoto M., Kuninaka A., Yoshino H., (1974), *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1555—1561.
44. Sanger F., Brownlee G. G., Barrell G., (1965), *J. Mol. Biol.*, **13**, 373—398.
45. Reeve A. E., Huang R. C. C., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 81—90.
46. Martin B. R., Voorheis H. P., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 555—559.
47. Chambers R. W., (1959), *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3032—3035.
48. Hall R. H., Khorana H. G., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1871—1875.
49. Hurwitz J., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2351—2358.
50. Tener G. M., (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 159—168.
51. Tener G. M., (1962), *Biochem. Prep.*, **9**, 5—11.
52. Greenless A. W., Symons R. H., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **119**, 241—248.
53. Symons R. H., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 872—873.
54. Symons R. H., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 609—610.
55. Symons R. H., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 548—550.
56. Symons R. H., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 807—810.

57. Symons R. H., (1974), *Meth. Enzymol.*, **29**, 102—115.
58. Lohrmann R., Orgel L. E., (1971), *Science*, **171**, 490—494.
59. Biebricher C. K., (1979), *Anal. Biochem.*, **95**, 429—432.
60. Symons R. H., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **209**, 296—305.
61. Moffatt J. G., (1967), *Meth. Enzymol.*, **12**, 182—192.
62. Moffatt J. G., Khorana H. G., (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 649—658.
63. Razzell W. E., Khorana H. G., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2105—2113.
64. Symons R. H., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4347—4355.
65. Nakai C., Brooker G., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 222—239.

## NOWE W BIOCHEMII

JOLANTA SKANGIEL-KRAMSKA \*)

### Nowe narzędzie w badaniach neurochemicznych — Autoradiografia ilościowa receptorów

Ostatnio ukazały się prace (J. B. Penney i wsp., *Science* 214, str. 1036, 1981 oraz J. R. Unnerstall i wsp., *J. Neurosci. Methods* 6, str 59, 1982), w których opisano metodę autoradiografii ilościowej w zastosowaniu do badań rozmieszczenia i właściwości receptorów różnych neurotransmiterów. Daje to możliwość określenia parametrów kinetycznych w próbkach tkanki mózgowej o objętości zaledwie 0.01 mm<sup>3</sup>, tj. o wadze 10μg.

Dotychczas jedyną metodą badania kinetycznych parametrów wiązania ligandów przez receptory neurotransmiterów było stosowanie homogenatów tkanki mózgowej albo preparatów błon synaptycznych. Wymaga to użycia przynajmniej kilku miligramów materiału wyjściowego, a więc wyklucza możliwość powiązania badanych właściwości receptora u danego osobnika z określoną lokalizacją anatomiczną. Problem ten staje z całą jaskrawością jeśli uzmysłowimy sobie, że niektóre struktury mózgu są bardzo małe, np. jądro przyśrodkowe uzdeczki (*habenula*) szczura waży zaledwie 0.2 mg a jądro czerwienne (*nucleus ruber*) około 0.6 mg.

Do badania topografii receptorów w różnych obszarach mózgu stosuje się autoradiografię. Radioaktywny znacznik można podawać bądź *in vivo* bądź *in vitro* inkubując skrawki z radioaktywnym ligandem. Następnie na podstawie obserwacji w mikroskopie świetlnym można określić względne różnice w gęstości występowania receptorów pomiędzy różnymi obszarami mózgu. Ilościowe ujęcie danych jest jednak trudne. Otrzymuje się je poprzez żmudne liczenie zaczernionych ziaren emulsji czulej na promieniowanie β. Porównanie ilościowe wyników, uzyskanych nawet z poszczególnych preparatów skrawków z tego samego mózgu, nastęrcza wiele problemów ze względu na trudności ze standaryzacją wyników.

W nowo wprowadzonej metodzie autoradiografii ilościowej zastosowano czuły na promieniowanie trytu [<sup>3</sup>H] Ultrafilm produkcji LKB zamiast emulsji. Skrawki tkanki mózgowej o grubości np. 20 μm inkubuje się ze znakowanym [<sup>3</sup>H]ligandem (może to być radioaktywny neurotransmiter bądź substancja agonistyczna lub antagonistyczna). Jedynym wymogiem omawianej techniki jest to, aby stosowany ligand wiązał się z receptorem w sposób nieodwracalny, w przypadku zaś gdy jego wiązanie jest odwra-

\*) Dr, Zakład Neurofizjologii Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

calne to, by powinowactwo liganda do receptora było dostatecznie duże  $K_d \leq 10\text{nM}$ . Spełnienie tego warunku gwarantuje, że przed nałożeniem [ $^3\text{H}$ ]Ultrafilmu nie zachodzi dysocjacja kompleksu radioligand-receptor. Po określonym czasie ekspozycji, wywołaniu i utrwaleniu [ $^3\text{H}$ ]Ultrafilmu można badać w mikroskopie świetlnym rozmieszczenie receptorów. Dane ilościowe otrzymuje się poprzez mikrodensytometryczny pomiar filmów sprzężony z komputerową analizą obrazu. Krzywe kalibracyjne uzyskuje się eksponując równocześnie z badanymi skrawkami mózgu standardy o znanej radioaktywności. Standardy te przygotowuje się z homogennej pasty tkanki mózgowej zmieszanej z określoną ilością, np. [ $^3\text{H}$ ]ornityny. Wykres zależności  $\ln$  gęstości optycznej od  $\ln$  radioaktywności jest liniowy. Daje to możliwość przekształcenia pomiaru gęstości optycznej, przepuszczalności, względnie też odbicia, na ilość związanego liganda wyrażoną w molach na miligram białka tkanki. Molarne ilości związanego radioliganda określa następująca zależność:

$$[^3\text{H}] \text{ ligand} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{mg białka}} \right) = \text{OD}_A \times \frac{(\text{DPM}/\text{mg białka})}{(\text{OD}) B} \times \frac{\text{mmol}}{(\text{Ci}) C} \times \frac{(\text{ICi})}{2.22 \times 10^{12} \text{DPM}}$$

gdzie: współczynnik A odpowiada gęstości optycznej tła; współczynnik B odpowiada nachyleniu krzywej standartowej, zaś C odpowiada aktywności właściwej radioliganda.

Przedstawiony powyżej sposób pomiaru wywodzi się z badań, w których w celu określenia szybkości zużycia glukozy w różnych częściach mózgu zastosowano jako znacznik podawaną *in vivo* [ $^{14}\text{C}$ ]dwudezoksyglukozę. Technika ta opracowana przez zespół kierowany przez Sokoloffa (N. I. M. H., Bethesda) w drugiej połowie lat siedemdziesiątych, zrobiła niezwykłą karierę i stała się podstawowym narzędziem w badaniach neuroanatomii funkcjonalnej.

Ilościowa autoradiografia z zastosowaniem [ $^3\text{H}$ ]Ultrafilmu okazała się owocna przy badaniu właściwości receptora gabaergicznego w różnych strukturach mózgu szczura (określono wartości  $B_{\text{max}}$  i  $K_d$ ) oraz przy ilościowym ujęciu zmian aktywności tego receptora w substancji czarnej wywołanych chemicznym uszkodzeniem innych struktur mózgu szczura. Technikę tę zastosowano również z powodzeniem do badania różnych klas receptorów benzodwuzepinowych w mózgu szczura.

Opisana metoda może mieć znacznie szersze zastosowanie, na przykład do badań białek przy użyciu znakowanych trytem specyficznych przeciwciał lub do badań właściwości enzymów przy użyciu znakowanych, wybiórczo działających inhibitorów. Wydaje się również, że znajdzie ona zastosowanie do pomiaru dynamicznych procesów, takich jak pobieranie neurotransmiterów. Co więcej technika ta pozwala na równoczesne określenie zapotrzebowania na glukozę (metodą podawania *in vivo* znakowanej dwudezoksyglukozy) w danych obszarach mózgu i badania *in vitro* rozmieszczenia i aktywności receptorów. Analog glukozy bowiem łatwo

można wymyć z części skrawków i zbadać w nich następnie wiązanie [ $^3\text{H}$ ]ligandów.

Teoretycznie dokładność autoradiografii ilościowej z zastosowaniem [ $^3\text{H}$ ]Ultrafilmu zależy od czułości stosowanych densytometrów. Jednakże oprócz niewątpliwych zalet, przedstawiona technika ma również pewne minusy. Trzeba zaznaczyć, że wykres zależności reakcji wywołanej na filmie od czasu ekspozycji nie jest liniowy i autoradiogramy tych samych skrawków mogą różnić się gęstością optyczną w zależności od czasu ekspozycji. Należy zatem ustalić zależność pomiędzy stężeniem radioaktywności, czasem ekspozycji i uzyskiwaną gęstością optyczną, aby dobrać optymalne warunki doświadczeń, niemożliwe natomiast jest porównanie ilościowe preparatów skrawków tkanki przy stosowaniu różnego czasu ekspozycji. Słabą stroną autoradiografii przy użyciu [ $^3\text{H}$ ]Ultrafilmu jest znacznie mniejsza rozdzielczość w porównaniu z autoradiografią konwencjonalną. [ $^3\text{H}$ ]Ultrafilm bowiem, pomimo że jest około 10 krotnie czulszy na promieniowanie, ma znacznie większe rozmiary ziaren (około 1.8  $\mu\text{m}$ ) niż emulsje stosowane w badaniach autoradiograficznych. Uzyskane zatem obrazy zawierają znacznie mniej szczegółów anatomicznych. Pomimo tych zastrzeżeń opisana metoda autoradiografii ilościowej, która jest około 1000 razy czulsza niż metoda oznaczania wiązania radioligandów przez receptory w homogenatach tkankowych, ma niezwykle obiecującą przyszłość.

## KOMUNIKAT

Druga Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki odbędzie się w Warszawie w dniach 18—20 września 1985 r.

Program Konferencji będzie obejmował referaty plenarne, doniesienia plakatowe i dyskusje okrągłego stołu z wszystkich specjalności biologii komórki.

Organizatorami Konferencji są: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, prezydium problemu MR.II.1. i Komitet Cytobiologii PAN.

Osoby zainteresowane Konferencją proszone są o przesłanie wstępnego zgłoszenia na adres:

Leszek Kuźnicki,  
Instytut im. M. Nenckiego,  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3.

Zgłoszenie powinno zawierać:

1. Imię i nazwisko autora(autorów) plakatu
2. Adres uczelni(placówki)
3. Tytuł(temat) plakatu

Osoby, które prześlą wstępne zgłoszenie otrzymają kolejne komunikaty drogą pocztową.

## SŁOWNICTWO BIOCHEMICZNE

### Słownictwo witamin D

Opracowano na podstawie dokumentu wspólnej Komisji Słownictwa Biochemicznego IUPAC-IUB: „Nomenclature of vitamin D, Recommendations 1981”, opublikowanego w Eur. J. Biochem. (1982), 124, 223—227 i innych czasopismach biochemicznych.

Tłumaczyła J. Kwiatkowska

#### Spis treści

#### Wstęp

1. Nazwa klasy
2. Nazwy półsystematyczne
3. Związki stereochemiczne pokrewne
4. Numeracja
5. Modyfikacja układu trienowego
6. Modyfikacja łańcucha bocznego
7. Pochodne dihydro
8. Inne modyfikacje
9. Zestawienia przedrostków
10. Dodatkowe grupy hydroksylowe
  - a) oznaczone za pomocą przyrostka
  - b) oznaczone za pomocą przedrostka
11. Inne podstawniki
  - a) modyfikacja przyrostka
  - b) oznaczone za pomocą przedrostka

#### Piśmiennictwo

Zestawienie potocznych nazw związków grupy witamin D.

#### Wstęp

W dokumentach Komisji Słownictwa Biochemicznego IUPAC i IUB z 1960 r. (1) i 1966 r. (2), ogłoszonych w „Polskim Słownictwie Biochemicznym” w 1974 r. (3), zalecano na określenie witamin D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> nazwy zwyczajowe: „ergokalcyferol” i „cholekalcyferol” odpowiednio. Wynikający z rozwoju wiedzy o przemianach i roli witamin D wzrost zaintereso-

wania ich analogami spowodował, że używanie dawnych terminów stało się niedogodne i prowadziło do stosowania w piśmiennictwie niewłaściwych skrótów, takich jak np.  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ . Zaszła zatem potrzeba opracowania nowego, uproszczonego i rozszerzonego systemu słownictwa zwyczajowych nazw metabolitów witamin D. Obecne zalecenia są oparte na propozycjach H. F. DeLuca, opracowanych po konsultacjach z innymi badaczami z tej dziedziny i przekazanych Wspólnej Komisji Słownictwa Biochemicznego IUPAC-IUB i Międzynarodowej Unii Nauk o Odżywianiu. Zalecenia rozszerzają zakres rozdziału M-2 Reguł z 1966 r. (2), a w polskiej wersji punktu 15-2 (3) i zalecają użycie nowych, krótkich nazw zwyczajowych. Z biochemicznego punktu widzenia największe znaczenie mają nazwy *kalcy-ol*, *kalcydiol* i *kalcytriol* na określenie: cholekalcyferolu, 25-hydroksycholekalcyferolu i 1,25-dihydroksycholekalcyferolu, odpowiednio.

Nazwy „kalcy-ol” i „cholekalcyferol” można uznać za równorzędne, ale pochodne hydroksylowe należy określać wyłącznie przy użyciu nowych nazw, zestawionych na stronie 406.

## 1. Nazwa klasy

Termin „*witamina D*” należy stosować jako ogólne określenie wszystkich steroidów, wykazujących biologiczną aktywność kalcy-olu. Wyrażenia tego używa się też w pochodnych określeniach, takich jak „aktywność witaminy D”, „niedobór witaminy D”, „antagonista witaminy D” (6).

Termin „*witamina D<sub>3</sub>*” można używać jako synonim kalcy-olu, ale nie należy go skracać do „D<sub>3</sub>” i dalej modyfikować do postaci typu  $1,25-(OH)_2D_3$ . Taki sposób oznaczania metabolitów witaminy D<sub>3</sub> jest wysoce niewskazany.

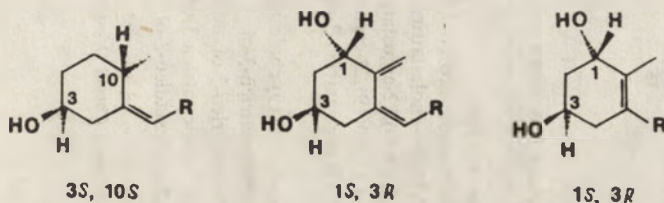
## 2. Nazwy półsystematyczne

Wszystkie związki wykazujące aktywność witamin D można określać za pomocą nazw półsystematycznych (4, 6), ale w powszechnym użyciu nazwy te są uciążliwe. Rozważano możliwość znalezienia nowej, krótkiej nazwy na określenie (5*R*,10*R*)-9,10-sekokocholestanu jako macierzystej części, zdecydowano jednak, że nie przyniosłoby to spodziewanego pożytku. Stosowanie Reguły 2S-8.1 (4, 5) do pochodnych witamin D może być mylące, ponieważ określniki  $\alpha$  i  $\beta$  można stosować jedynie wtedy, gdy orientacja pierścienia A jest taka jak w macierzystym steroidzie, witaminy D natomiast przedstawia się często w ich alternatywnej konfiguracji (porównaj wzory (1) i (2), (3) i (4), oraz (8) i (9)). Zalecamy, aby nigdy nie stosować określników  $\alpha$  i  $\beta$  do pierścienia A, ani też do atomów C-6 i C-7



związków klasy witamin D. Centra chiralności należy określać symbolami *R* lub *S*, zaś podwójne wiązania *E* lub *Z* (7, 8). Przykłady podano w tabeli 1.

Ze względu na reguły kolejności nie zezwala się na przenoszenie symboli *R* i *S* z danego związku na jego pochodne. Przykłady skutków tego podaje Ryc. 1.

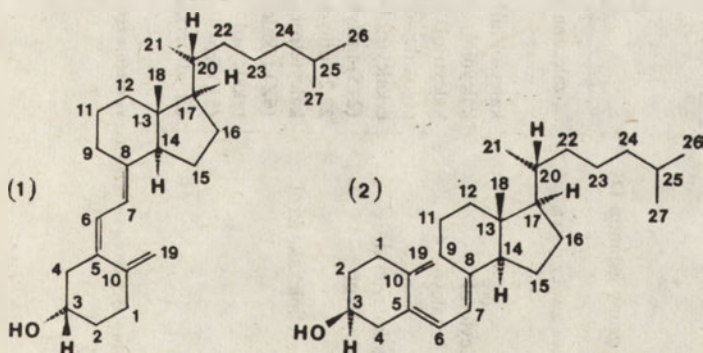


Ryc. 1. Przykłady stereochemii pierścienia A. Uwaga: we wzorach (1) do (6) grupa hydroksylowa jest 3*S*.

Powyższe zalecenia nie dotyczą związków, w których pierścień B nie uległ otwarciu. Tak więc lumisterol określa się nadal jako (22*E*)-9β,10α-ergosta-5,7,22-trien-3β-ol (Reguła Steroidów 2*S*-5.2 w (4, 5)).

### 3. Związki stereochemicznie pokrewne

Wielu badaczy stosowało modyfikacje nazw zwyczajowych celem wykazania pokrewieństwa między związkami. Modyfikacje można stosować, jeśli na określenie cholekalcyferolu użyje się skróconej nazwy „kalcy-ol” (Wzór 1, to samo co 2 Ryc. 2).



Ryc. 2. Kalcy-ol.

Cholekalcyferol proponuje się jako nazwę alternatywną, nie można jej jednak stosować przy nazywaniu metabolitów. Kalcy-ol jest nazwą macierzystą serii witamin D, i można ją dalej modyfikować, inne jednak

Tab. 1

## Słownictwo związków grupy witamin D

potoczna nazwa zwyczajowa	zalecana nazwa zwyczajowa	systematyczna nazwa steroidu <sup>a</sup>
cholekalcyferol	kalcy-ol lub cholekalcyferol	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> )-(3 <i>S</i> )-9,10(19)-cholestatrien-3-ol
25-hydroksycholekalcyferol	kalcydioł	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> )-(3 <i>S</i> )-9,10-seko-5,7,10(19)-cholestatrien-3,25-diol
1 $\alpha$ ,25-dihydroksycholekalcyferol	kalcytriol	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> )-(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-9,10-seko-5,7,10(19)-cholestatrien-1,3,25, triol
ergokalcyferol	ergokalcy-ol lub ergokalcyferol	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> ,22 <i>E</i> )-(3 <i>S</i> )-9,10-seko-5,7,10(19),22-ergostatetraen-3-ol <sup>b</sup>
1 $\alpha$ ,25-dihydroksyergokalcyferol	erkalcyttriol	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> ,22 <i>E</i> )-(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> )-9,10-seko-5,7,10(19),22-ergostatetraen-1,3,25-triol <sup>a</sup>
22,23-dihydroergokalcyferol	(24 <i>S</i> )-metylokalcy-ol lub 22,23-dihydroerkalcycy-ol	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> )-(3 <i>S</i> )-9,10-seko-5,7,10(19)-ergostatrien-3-ol
1 $\alpha$ ,24 <i>R</i> ,25-trihydroksycholekalcyferol	kalcytetrol	(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> )-(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,24 <i>R</i> )-9,10-seko-5,7,10(19)-cholestatrien-1,3,24,25-tetrol
prowitamina D <sub>3</sub>	(6 <i>Z</i> )-takalcy-ol	(6 <i>Z</i> )-(3 <i>S</i> )-9,10-seko-5(10),6,8-cholestatrien-3-ol
tachysterol <sub>3</sub>	takalcy-ol	(6 <i>E</i> -3 <i>S</i> )-9,10-seko-5(10),6,8-cholestatrien-3-ol
izowitamina D <sub>3</sub>	(5 <i>E</i> )-izokalcy-ol	(5 <i>E</i> ,7 <i>E</i> )-(3 <i>S</i> )-9,10-seko-1(10),5,7-cholestatrien-3-ol
dihydrotachysterol <sub>3</sub>	dihydroerkalcycy-ol	(5 <i>E</i> ,7 <i>E</i> )-(3 <i>S</i> ,10 <i>S</i> )-9,10-seko-5,7-cholestadien-3-ol

a lokanty wiązań podwójnych cytuję się przed nazwą rdzenia zgodnie z konwencją stosowaną w Regulach Steroidów (4,5) i Nomenklaturą Chemii Organicznej IUPAC (7).

b konfiguracja 24*R*-

c konfiguracja 24*S*-

pokrewne macierzyste węglowodory nie zostały dotąd nazwane. Dlatego termin kalcy-ol można stosować jedynie na określenie związków zawierających grupę 3-hydroksylową oraz układ trzech sprzężonych wiązań podwójnych (lub wywodzących się z nich). Jeśli nie zaznaczy się tego specjalnie, określenie grupa 3-hydroksylowa oznacza, że ma ona pozycję taką jak 3 $\beta$ -hydroksylowa grupa macierzystego steroidu tetracyklicznego, to znaczy przy braku podstawienia przy atomach 2 i 4, jeśli pozycja C-1 nie jest podstawiona jest to 3S, a jeśli w pozycji C-1 jest też grupa hydroksylowa jest to 3R. Układ trienowy jest to 5,7,10(19) — ze stereochemią 5Z,7E, jeśli nie wskazano inaczej.

#### 4. Numeracja

Zachowuje się numerację macierzystego steroidu, jak pokazano we wzorach (1) i (2) (Ryc. 2).

#### 5. Modyfikacja układu trienowego

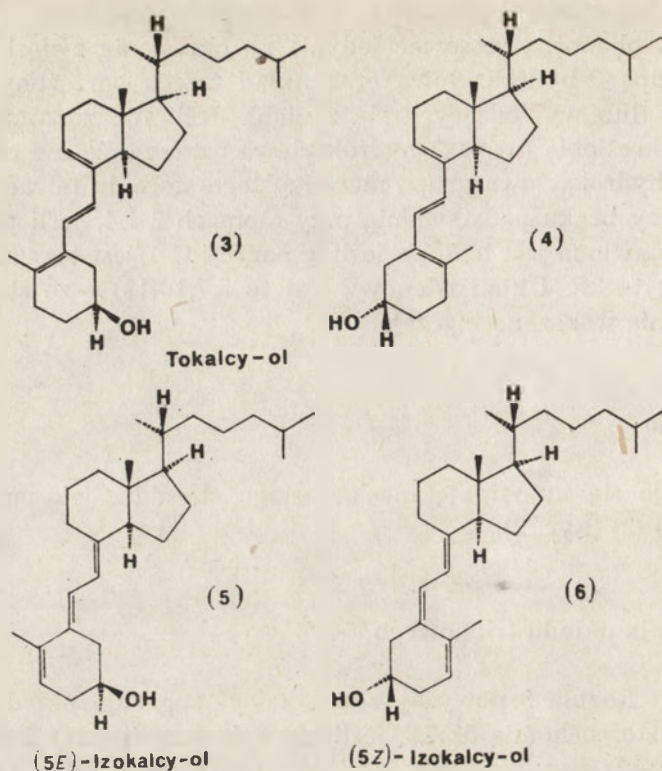
Jak mówi Reguła 3 powyżej, rdzeń kalcy- sugeruje układ 5,7,10(19)-trienowy ze stereochemią 5Z,7E, jeśli nie wskazano inaczej. Poprzedzenie nazwy kalcy-ol przedrostkiem „ta” oznacza zmianę lokacji trienu na 5(10),6,8 z sugerowaną konfiguracją 6E (patrz tabela 2), na przykład „takalcy-ol” (wzór (3), to samo co (4), na Ryc. 3).

Tabela 2

Modyfikacje nazw zwyczajowych

rdzeń lub przedrostek	pochodzenie	skutek
kalcy	kalcyferol	oznacza 9,10-seko-5,7,10(19)-cholestatrien o konfiguracji 5Z, 7E
ta	tachysterol	zmienia trien kalcy-olu na 5(10),6,8 o konfiguracji 6E
izo	izowitamina D <sub>3</sub>	zmienia trien kalcy-olu na 1(10),5,7 o konfiguracji 7E
er	ergosterol	wprowadza wiązanie podwójne 22(23) o konfiguracji 22E, oraz grupę metylową w konfigurację 24R, jeśli nie poczyniono innych zmian

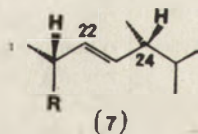
Przedrostek „izo”, dodany do nazwy kalcy-ol oznacza zmianę lokacji trienu na 1(10),5,7, z sugerowaną konfiguracją 7E. Przy tym przedrostku należy określić stereochemię w pozycji 5, na przykład 5E-izokalcy-ol (wzór 5).



Ryc. 3. Takalcy-ol i izokalcy-ole.

## 6. Modyfikacja łańcucha bocznego

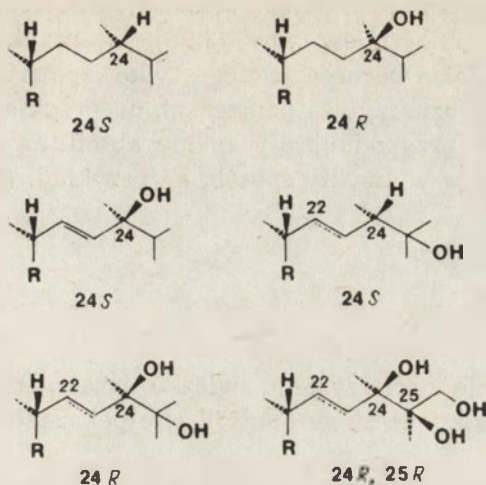
Przedrostek „er” oznacza boczny łańcuch serii witamin  $D_2$ , jak we wzorze 7 (patrz Ryc. 4), na przykład *erkalcy-ol* (Tab. 2).



Ryc. 4. Boczny łańcuch erkalcy-oli.

Przedrostek ten obejmuje konfigurację  $22E, 24R$ , pokazaną w (7), jeśli nie wskazano inaczej. Alternatywną zwyczajową nazwą *erkalcy-olu* pozostaje ergokalcyferol, ale nie można tej nazwy stosować przy nazywaniu metabolitów.

Uwaga: Ze względu na reguły kolejności nie zezwala się na przeniesienie symboli R lub S ze związku na jego pochodne. Skutki tego pokazano w Ryc. 5.

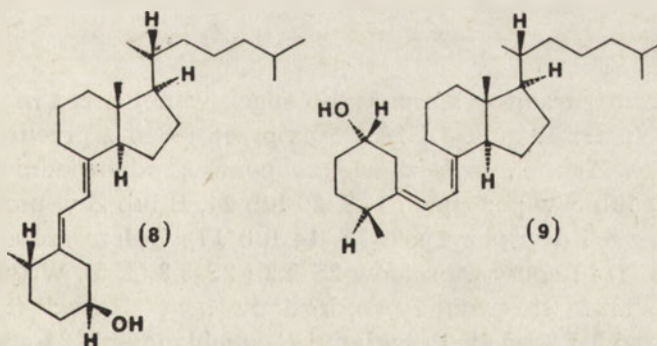


Ryc. 5. Przykłady stereochemii w pozycji 24 (i 25) w serii witamin D<sub>2</sub>.

Zauważ, że obecność lub brak wiązania podwójnego 22 (23) w trzech przykładach u dołu nie zmienia oznaczeń w pozycji 24 (i 25).

## 7. Pochodne dihydro

Dihydotachysterol jest ważnym przedstawicielem rodziny witamin D. Należy go nazywać *dihydrokalcy-ol*, chociaż bardziej systematyczną nazwą byłoby: (5*E*)-(10*S*)-10,19-dihydrokalcy-ol (wzór (8), to samo co (9) na Ryc. 6).



Ryc. 6. (5*E*)-(10*S*)-10,19-dihydrokalcy-ol.

Uwaga 1. Wprawdzie związek ten jest pochodną otrzymaną z *kalcy-olu* przez uwodornienie podwójnego wiązania 10(19) można go też uważać za pochodną *takalcy-olu*, utworzoną przez 1,6-addycję wodoru do układu 5(10),6,8-trienowego, to znaczy w pozycje 9 i 10.

Uwaga 2. W pozycji 10 występuje nowe centrum chiralności. Jeśli syntetyczna próbka zawiera mieszaninę obu izomerów, niekoniecznie w

równomolowych proporcjach, można stosować przedrostek „*ambo*”, oznaczający obecność takiej mieszaniny (3, 9), na przykład (5*E*)-10-*ambo*-10,19-*dihydrokalcy-ol*. Obecność jednego tylko izomeru, lecz o nieznannej stereochemii można oznaczyć za pomocą *xi*, na przykład (5*E*)-(10*ξ*)-10,19-*dihydrokalcy-ol*. W przypadku, gdy znamy absolutną stereochemię przy C-10, wykazuje się ją w zwykły sposób, na przykład: (5*E*)-(10*S*)-10,19-*dihydrokalcy-ol*.

## 8. Inne modyfikacje

Inne modyfikacje macierzystego związku oznacza się za pomocą odpowiedniego przedrostka. Możliwe modyfikacje pokazano w Tab. 3.

Tabela 3

Przedrostki modyfikujące związki macierzyste. Dalsze szczegóły stosowania tych przedrostków można znaleźć w odpowiednich punktach Reguł F (7), wskazanych w 3-ciej kolumnie

przedrostek	s k u t e k	reguła
cyklo	dodatkowy pierścień	F-4.1
didehydro	dodatkowe wiązanie podwójne	F-3.3
homo	dodatkowa grupa metylenowa	F-4.5
dihydro	redukcja wiązania podwójnego	F-3.1, patrz punkt 7 powyżej
nor	usunięcie grupy metylenowej	F-4.2, F-4.4
aza	zastąpienie węgla azotem	F-4.11
oksa	zastąpienie węgla tlenem	F-4.11

Zmianę konfiguracji w stosunku do sugerowanej przez nazwę rdzenia i przyrostka (patrz Reguła 3 i 10a) oraz przez jeden z przedrostków wymienionych w Tab. 2, oznacza się za pomocą odpowiedniego lokantu i symbolu (*R* lub *S* w pozycjach 1, 3, 20 lub 24, *E* lub *Z* w pozycjach 5, 6, 7 lub 22, oraz  $\alpha$  i  $\beta$  w pozycjach 13, 14 lub 17). Dalsze szczegóły podaje Reguła F-6.3 (7) i Reguły Steroidów 2*S*-5.2 i 2*S*-5.3 (4, 5). W tych odnośnikach podano także stosowanie przedrostków „*ent*” i „*rac*” (F-6.4, F-6.5, F-6.6 oraz 2*S*-5.3 i 2*S*-5.4). Przykłady: *D-homokalcy-ol*, 24-*azaerkalcy-ol*, (3*R*)-*kalcy-ol* i (22*Z*)-*erkalcy-ol*.

## 9. Zestawienia przedrostków

Modyfikujące przedrostki można zestawiać. Podaje się je w kolejności:

- stereochemia wiązań podwójnych, wymagająca symboli *E* lub *Z*
- stereochemia centrów chiralności, wymagająca symboli *R* lub *S*

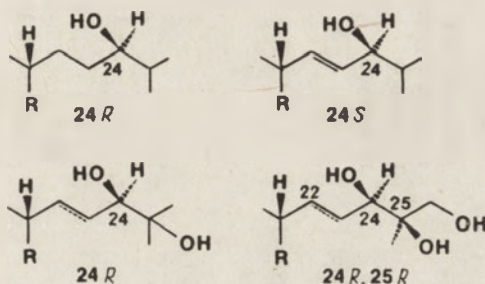
c) przedrostki oddzielone (patrz punkt 10a i 11b poniżej)

d) modyfikujące przedrostki, w kolejności podanej w Tab. 3

e) zmiany konfiguracji przy pozycjach 13, 14 lub 17

f) modyfikujące przedrostki, podane w Tab. 2, w porządku alfabetycznym.

Przykład: (24*S*)-24-hydroksy-22,23-didehydrotakalcy-ol (porównaj drugi przykład w Ryc. 7).



Ryc. 7. Przykłady stereochemii w pozycji 24 i 25 serii witamin D<sub>3</sub>.

## 10. Dodatkowe grupy hydroksylowe

### a) Oznaczone za pomocą przyrostka

Nazwę kalcydiol zarezerwowano na określenie 3,25-diolu, nazwę kalcytriol na określenie 1,3,25-triolu, a kalcytetrol — dla 1,3,24,25-tetrolu. Konfiguracja grupy (grup) hydroksylowej/ych odpowiada tetracyklicznym steroidom z grupą 3β-hydroksy-, lub 1α,3β-dihydroksy- (patrz Ryc. 1), lub 24*R*-hydroksy-.

### b) Oznaczone za pomocą przedrostka

Każdą grupę hydroksylową nie objętą nazwą przyrostka (patrz punkt 3 i 10a) należy oznaczać za pomocą przedrostka hydroksy, dihydroksy itp wraz z odpowiednim lokantem i określeniem stereochemii podstawnika (jeśli zachodzi taka potrzeba). Przykłady: (1*S*)-1-hydroksykalcy-ol, 16β-hydroksykalcy-ol i 26-hydroksykalcy-ol (lub, jeśli znamy stereochemię, (25*R*)-26-, lub (25*S*)-26-hydroksykalcy-ol).

Uwaga: Ze względu na reguły kolejności nie można przenosić symboli *R* lub *S* z określonego związku na jego pochodne. Przykłady skutków tego pokazano w Ryc. 5 i Ryc. 7.





## 11. Inne podstawniki

### a) Modyfikacja przedrostka

Estry grup hydroksylowych, oznaczonych za pomocą przyrostka (punkt 3 i 10a) oznacza się poprzedzając nazwę związku nazwami(a) grup(y) acyloksylowych(ej) w ich (jej) postaci anionowej, jeśli to potrzebne wraz z lokantem (patrz Reguły Steroidów 2S-4 (4, 5)). Keton odpowiadający *kalcy-olowi* można nazywać *kalcy-on*, ale nazwę tę zastrzega się dla 3-ketonu. Utlenienie kalcydiolu daje hydroksyketon, który winien nosić nazwę: 25-hydroksykalcy-on. Przykłady: octan kalcy-olu, 1-octan 3-mrówczan kalcytriolu.

Uwaga: Związek z grupy witamin D, w którym grupa metylowa uległa utlenieniu do karboksylowej (lub pochodnej) należy nazwać za pomocą odpowiedniego przyrostka. W tym przypadku nie należy używać nazwy *kalcy-ol*, ponieważ jej przyrostek wskazuje na grupę tlenową przy C-3. Z tego względu zaleca się oznaczanie kwasów karboksylowych jako pochodnych 9,10-sekcholestanu lub 9,10-sekoergostanu. Przykład: (5Z,7E)-(3S,23R,25S)-3 $\beta$ ,25-dihydroksy-9,10-seko-5,7,10(19)-cholestatrieno-26,23-lakton.

### b) Oznaczanie za pomocą przedrostka

Podstawniki, nie określone przez nazwę związku macierzystego i odpowiednie przyrostki (punkt 3, 10a i 11a) powinno się oznaczać za pomocą przedrostka wraz z odpowiednim lokantem, określając stereochemię przy pomocy określnika, jeśli zachodzi potrzeba. Analogi witamin D, w których przy C-3 nie występuje grupa hydroksylowa, lub została zastąpiona przez aminową, nazywa się stosując przedrostek 3-deoksy- (patrz reguły węglowodanów, punkt 14 (10), w polskiej wersji punkt 8.14 (3)). Przykłady: 25-fluorokalcy-ol, (3S)-3-amino-3-deoksykalcy-ol i 11 $\alpha$ -acetoksykalcy-ol.

## PIŚMIENNICTWO

1. International Union of Pure and Applied Chemistry (1960). Definitive rules for the nomenclature of vitamins. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5581—5583.
2. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Tentative rules, section on trivial names of miscellaneous compounds of importance in biochemistry (1967). *Eur. J. Biochem.* **2**, 1—2.
3. Polskie Słownictwo Biochemiczne. Red. A. Morawiecki (1974). PWN, Warszawa.
4. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The Nomenclature of Steroids (1969). *Eur. J. Biochem.* **10**, 1—19 i (1972) **25**, 1—3.

5. PTChem. Nomenklatura Związków Organicznych. Steroidy i cyklitole (zalecenia) (1978). PWN, Warszawa-Łódź.
6. International Union of Nutritional Sciences, Committee 1/I, Nomenclature (1978). *Nutr. Abstr. Rev.* **48A**, 831—835.
7. International Union of Pure and Applied Chemistry (1979). Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F and H. Pergamon Press, Oxford.
8. PTChem. Nomenklatura Związków Organicznych. Część E, Stereochemia (1979), PWN, Warszawa-Łódź.
9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of tocopherols and related compounds, Recommendations 1973 (1974). *Eur. J. Biochem.* **46**, 217—219.
10. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNO) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Tentative rules for carbohydrate nomenclature (1971). *Eur. J. Biochem.* **21**, 455—476 i (1972), *Eur. J. Biochem.* **25**, 4.

## JEDNOSTKI AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Zalecenia z 1978 r.

Opracowano na podstawie dokumentu Komitetu Nomenklatury Międzynarodowej Unii Biochemicznej (NC-IUB, opublikowanego w Eur. J. Biochem. 1979, 97, 319—320).

(tłum. M. K. Kołaczkowska)

Obecność enzymu rozpoznaje się dzięki zachodzeniu reakcji chemicznej, którą on katalizuje, a jego ilość można określić przez pomiar szybkości tej reakcji. W zaleceniach Międzynarodowej Unii Biochemicznej (1) w rozdziale 4 (Enzyme Units) zdefiniowano standardową jednostkę aktywności enzymatycznej jako ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 mikromola substratu w ciągu 1 minuty w warunkach standardowych; ta definicja została zaproponowana w Raporcie Komisji Enzymatycznej w 1961 (2). Komisja Nomenklatury Biochemicznej w zaleceniach z 1972 r. (3) proponuje wyrażać szybkość reakcji w molach na sekundę zgodnie z układem SI. Jednocześnie zaproponowano definicję i nazwę nowej jednostki aktywności enzymatycznej „katal”, w zgodzie z międzynarodowym systemem. Jednostka katal odniesiona do sekundy jako jednostki czasu bardziej odpowiada stałym szybkości używanym w kinetyce chemicznej, niż dawniej używana jednostka enzymatyczna. Wersja z 1972 r. utożsamiała aktywność enzymatyczną z szybkością reakcji, obecnie zaś rozróżnia się te wielkości.

Katalityczna aktywność i jednostka katal.

Wielkość:

Miarą katalitycznej aktywności enzymu jest przyrost szybkości swoistej reakcji chemicznej<sup>\*)</sup>, którą wywołuje dodanie enzymu w specyficznych warunkach testu.

---

<sup>\*)</sup> Stosowana tu nazwa „szybkość reakcji” zgodnie z definicją zaproponowaną w punkcie (4) oznacza wielkość wyrażoną stosunkiem: ilość substancji/czas, a w jednostkach jako:  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ . Należy zwrócić uwagę, że nazwę tę stosuje się często na określenie wielkości wyrażonej stosunkiem: stężenie substancji/czas, a w jednostkach jako:  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ta rozbieżność podobnie jak i propozycja nazwania pierwszej (ekstensywnej) wielkości „szybkością konwersji” a drugiej (intensywnej) wielkości „szybkością reakcji”, jest przedmiotem rozważań przez Podkomitet Symboliki i Terminologii w Kinetyce Chemicznej w IUPAC.

## Jednostka:

Jednostka katal (symbol: kat) jest taką aktywnością katalityczną, która powoduje przyrost szybkości reakcji<sup>1)</sup> o 1 mol na sekundę w specyficznych warunkach testu.

## Komentarz

1. Jednostka katal oznacza aktywność katalityczną, którą określa się jako przyrost szybkości reakcji w warunkach testu. Nie stosuje się jej jednak na określenie szybkości reakcji, które wyraża się w  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ .
2. Katalityczną aktywność enzymu definiuje się jako potencjalną możliwość jego działania w specyficznych warunkach testu. W ten sposób sformułowana definicja uzasadnia stosowanie takich wyrażań jak aktywna forma czy aktywne centrum.
3. Komitet Międzynarodowego Słownictwa nie widzi przeszkód w wyrażaniu aktywności katalitycznej w  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ . Uzasadnia on jednak dla czego stosowanie jednostki katal może być bardziej przydatne: jednostka 1 kat wyraża coś więcej niż  $1 \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$ , gdyż wskazuje, że ta wielkość odnosi się do katalitycznej aktywności, podobnie jak „Hz” oznacza częstotliwość, podczas gdy  $\text{s}^{-1}$  nie.
4. Komitet stwierdza, że jednostka 1 katal, odpowiadająca szybkości przereagowania 1 mola w ciągu sekundy, jest zwykle za duża w praktycznym stosowaniu. W wielu przypadkach katalityczną aktywność należy wyrażać w mikrokatalach ( $\mu\text{kat}$ ), nanokatalach (nkat) lub pikokatalach (pkat), co odpowiada przereagowaniu 1 mikromola, nanomola lub pikomola w ciągu sekundy.
5. Dawną jednostkę enzymatyczną (U) można przekształcić w obecnie zaproponowaną jednostkę katal w sposób następujący:  
1 U katalizuje przemianę 1  $\mu\text{mola}/\text{min}$  czyli  $1/60 \mu\text{mol}/\text{s}$  to jest 16,67 nmol/s; 16,67 nkat katalizuje przemianę 16,67 nmol/s. A więc 1 U odpowiada 16,67 nkat.
6. Szybkość reakcji można określić jako szybkość zmiany ilości któregośkolwiek z substratów lub produktów reakcji podzieloną przez liczbę cząsteczek wybranej substancji, która wchodzi w reakcję lub powstaje w jednym cyklu reakcji (4). Tak więc, nie ma trudności w opisie reakcji, w których bierze udział różna liczba cząsteczek produktów i substratów. Na przykład w reakcji  $2A \rightarrow B + C$  szybkość przemiany 1 mola w ciągu sekundy odpowiada szybkości znikania 2 moli substratu A w ciągu sekundy.
7. Definicja aktywności katalitycznej zgodna jest z zaleceniami specjalistów z chemii klinicznej z 1978 r. (5).
8. Zaleca się aby oznaczenia aktywności enzymu, jeśli to tylko jest możliwe, opierały się na pomiarach szybkości początkowej, a nie na pomiarze ilości przereagowanego substratu w czasie kończącym okres reakcji,

chyba że szybkość reakcji jest stała. Jeśli szybkość reakcji spada znacząco w trakcie pomiarów to wówczas ilość przereagowanego substratu nie jest proporcjonalna do ilości enzymu, na przykład z powodu powstawania produktów hamujących reakcję, a w reakcjach odwracalnych ze względu na szybkość reakcji przeciwnej, której nie można już pomijać.

Wartości wyprowadzone z katalitycznej aktywności:

Jedną z takich wartości jest specyficzna katalityczna aktywność enzymu lub preparatu enzymu, którą można wyrazić jako:  $\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Inną z kolei jest molarna katalityczna aktywność wyrażana jako:  $\text{kat} \cdot \text{mol}^{-1}$ . W warunkach wysycenia enzymu substratem molarna aktywność katalityczna (określenie zastępujące dawniej stosowaną „liczbę obrotów”) liczbowo równa jest stałej szybkości, a wyraża się jako  $\text{s}^{-1}$  w przypadku rozkładu kompleksu enzym-substrat na enzym i produkty. Niemniej interpretacja pojęcia aktywności katalitycznej nie jest łatwa z powodu niespecyficznych oddziaływań oraz występowania więcej niż jednego centrum katalitycznego w cząsteczce enzymu.

#### PIŚMIENNICTWO

1. International Union of Biochemistry (1965) *Enzyme Nomenclature, Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam.
2. International Union of Biochemistry (1961) *Report of the Commission on Enzymes*, Pergamon Press, Oxford.
3. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1973) *Enzyme Nomenclature, Recommendations 1972*, Elsevier, Amsterdam.
4. International Union of Pure and Applied Chemistry (1979) *Manual of symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units*, 1973 edn, revised 1979, Pergamon Press, Oxford.
5. International Union of Pure and Applied Chemistry and International Federation of Clinical Chemistry. *Quantities and Units in Clinical Chemistry, Recommendations 1978*, Clin. Acta, w druku.

KOMUNIKAT KOMISJI SŁOWNICTWA POLSKIEGO TOWARZYSTWA  
BIOCHEMICZNEGO

## Wybrane symbole wielkości i jednostek

	wielkość	jednostka
<i>wielkości czasu, przestrzeni i pokrewne</i>		
l	długość	m, mm, $\mu\text{m}$ (nie $\mu$ ), nm itp <sup>a)</sup>
A	powierzchnia	$\text{m}^2$ , $\text{cm}^2$ , $\text{mm}^2$ itp
V	objętość	$\text{m}^3$ , $\text{dm}^3$ (lub l), $\text{cm}^3$ (lub ml), $\text{nm}^3$ (lub $\mu\text{l}$ )
$\lambda$	długość fali	nm (nie $\text{m}\mu$ , nie $\text{Å}$ )
$\nu$ , f	częstotliwość	Hz
<i>wielkości mechaniczne i pokrewne</i>		
m	masa	kg, g, mg, $\mu\text{g}$ (nie $\gamma$ ), itp
$\rho$	gęstość	$\text{g}/\text{cm}^3$
d	gęstość względna	bezwymiarowa
F	siła	$\text{N}(\text{kg} \times \text{m}/\text{s}^2)$
E	energia	J nie cal
p, P	ciśnienie	Pa ( $\text{N}/\text{m}^2$ ) 1 bar = $10^5$ Pa 1 atm = 101 325 Pa 1 mm Hg = 133,2 Pa
s	współczynnik sedymentacji	$S = 10^{-13} \text{ s rad}^{-2}$
<i>wielkości molekularne</i>		
m	masa cząsteczkowa	Da = 1/12 nuklidu $^{12}\text{C}$
n	ilość substancji	mol, mmol, $\mu\text{mol}$ , nmol itp.
M	masa molowa	$\text{g}/\text{mol}$ , $\text{kg}/\text{mol}$
$M_r$	względna masa cząsteczkowa	bezwymiarowa
$c_B$ , [B]	stężenie molowe substancji B	M (mol/l), mM (mmol/l), itp raczej niż $10^{-3}$ M itp
<i>wielkości termodynamiczne i pokrewne</i>		
T	temperatura termodynamiczna	K
t, $\Theta$	temperatura Celsjusza	$^{\circ}\text{C}$
q, Q	ciepło	J nie cal
I	siła jonowa	M (mol/l), mM itp
<i>elektryczność i magnetyzm</i>		
I	prąd elektryczny	A
H	natężenie pola magnetycznego	T
R	opór	$\Omega$
<i>światło i promieniowanie elektromagnetyczne</i>		
I	natężenie światła	cd
T	przepuszczalność	bezwymiarowa
A	absorbancja ( $-\log T$ ) (nie należy używać określeń: gęstość optyczna, ekstynkcyjna)	bezwymiarowa

<sup>a)</sup> przedrostki jednostek: T, tera  $10^{12}$ , G, giga  $10^9$ , M, mega  $10^6$ , K, kilo  $10^3$ , d, deci  $10^{-1}$ , c, centi  $10^{-2}$ , m, mili  $10^{-3}$ ,  $\mu$ , mikro  $10^{-6}$ , n, nano  $10^{-9}$ , p, piko  $10^{-12}$ , fe, femto  $10^{-15}$ , a, atto  $10^{-18}$

$\epsilon$	molowy współczynnik absorpcji	$M^{-1}cm^{-1}$
—	radioaktywność	$Bq = 1 \text{ dis } s^{-1}$ lub $Ci = 37 \text{ GBq}$

*reakcje chemiczne*

K	stała równowagi	
$K_m$	stała Michaelisa	M, mM itp (raczej niż $10^{-3}$ M) it
$K_i$	stała inhibitorowa	M, mM itp raczej niż $10^{-3}$ M it
k	stała szybkości	$s^{-1}$ , lub $M^{-1}s^{-1}$
v	szybkość konwersji (przetworzenia)	mol/s, mmol/s, $\mu\text{mol/s}$ itp, raczej niż $\mu\text{mol/min}$
V nie $V_{max}$	szybkość reakcji katalizowanej przy stężeniu substratu <i>at infinite</i>	
—	aktywność enzymatyczna	kat
h	współczynnik Hilla	

## Standardowe skróty nazw. nie wymagające definicji

AMP, ADP, ATP <sup>a</sup>	5'-mono-, di-, i trifosforan adenozyne
cAMP, cykliczny AMP <sup>b</sup>	3'-5'-monofosforan adenozyne
CMP, CDP, CTP <sup>a</sup>	5'-mono-, di-, i trifosforan cytydyny
CaA lub CoASH	koenzym A
CoASAc	acetylo-koenzym A
DNA, mtDNA, nDNA, cDNA	kwas deoksyrybonukleinowy, mitochondrialny DNA, jądrowy DNA, komplementarny DNA
FAD	dinukleotyd flawino-adeninowy
FMN	5'-fosforan ryboflawiny
GMP, GDP, GTP <sup>a</sup>	5'-mono-, di-, i trifosforan guanozyne
Hb, HBCO, HBO <sub>2</sub>	hemoglobina (odtlenowana), karboksyhemoglobina, oksyhemoglobina
IgA, itp	immunoglobulina A, itp
IMP, IDP, ITP <sup>a</sup>	5'-mono-, di-, i trifosforan inozyne
Mb, MbCO, MbO <sub>2</sub>	mioglobina, karboksymioglobina, oksymioglobina
NAD, NAD <sup>+</sup> , NADH	dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy, jego forma utleniona i zredukowana
NADP, NADP <sup>+</sup> , NADH	fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego, jego forma utleniona i zredukowana
NMN	mononukleotyd nikotynoamidowy
NMP, NDP, NTP <sup>a</sup>	5'-mono-, di-, i trifosforan nieokreślonego nukleotydu
NMR	jądrowy rezonans magnetyczny
poly(A), itp	(3'-5')poli(kwas adenyłowy), itp
RNA, hnRNA, mRNA, mtRNA, nRNA, rRNA, tRNA <sup>c</sup>	kwas rybonukleinowy, heterogeny jądrowy RNA, informacyjny RNA, mitochondrialny RNA, jądrowy RNA, rybosomalny RNA, transportujący RNA
TMP, TDP, TTP <sup>a</sup>	5'-mono-, di-, i trifosforan rybozyłotyminy
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
UDPGlc, UDPGal	urydyno(5'-disosfo)1-D-glukoza i-galaktoza
XMP, XDP, XTP <sup>a</sup>	5'-mono-, di-, i trifosforan ksantozyny

<sup>a</sup> na określenie odpowiedniego fosforanu deoksynukleozydu używa się przedrostka d, np dAMP, dTTP. Różne izomery NMP mogą być oznaczane: 2'-AMP, 3'-AMP itp.

<sup>b</sup> podobnie określa się inne 3'-5'-cykliczne nukleotydy.

<sup>c</sup> transportujące RNA, swoiste względem określonych aminokwasów oznacza się jako np. tRNA<sup>Ala</sup>. Gdy dwie lub więcej cząstek tRNA przyłącza ten sam aminokwas, oznacza się je wskaźnikiem u dołu, np. tRNA<sup>Ala</sup><sub>1</sub>. Aminoacylo-tRNA można oznaczać jako np. alanylo-tRNA<sup>Ala</sup><sub>1</sub>, lub Ala-tRNA.

KOMUNIKAT  
KOMISJI SŁOWNICTWA BIOCHEMICZNEGO

W wyniku szybkiego rozwoju genetyki molekularnej z zastosowaniem nowych technik, w piśmiennictwie anglosaskim pojawiła się i nadal pojawia wielka liczba nowych określeń, nazw i zwrotów. Wiele z nich ma krótki żywot, inne jednak wchodzi na dobre do słownictwa z tej dziedziny wiedzy. Nazwy te powinny mieć swe odpowiedniki w języku polskim, tym bardziej, że nie podlegają one ogólnie przyjętym zasadom słownictwa chemicznego czy enzymologicznego.

W *Science* (1980, 109, 1435) podano przygotowane *ad hoc* propozycje słownika terminów z dziedziny genetyki molekularnej. Polską wersję ogłoszono w *Postęпах Biologii Komórki* (1982, t. 9, z. 2, str. 335—340). Obie propozycje budzą pewne zastrzeżenia u specjalistów.

Z uwagi na duże znaczenie zagadnienia, Komisja Słownictwa Biochemicznego powołała zespół, przygotowujący słownik terminologii z dziedziny genetyki molekularnej. Pracą zespołu kieruje prof. dr hab. Aleksandra Putrament. Zawiadamiając o tym, Komisja prosi o nadsyłanie haseł anglosaskich, oraz ewentualnych propozycji polskich określeń, na adres:

Prof. dr hab. Aleksandra Putrament  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa



## SPRAWOZDANIA

### KRONIKA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

#### **Nowi Członkowie**

Na Plenarnym Posiedzeniu Zarządu Głównego Towarzystwa w dniu 24 marca 1983 r. w poczet członków Towarzystwa zostali przyjęci: Sławomir Bartkowiak z Poznania, Ksenia Bykowska, Ewa Sikora, Jan Sosiński i Waldemar Przybyszewski z Warszawy.

#### **„Mini” Sympozja**

W ubiegłym roku Towarzystwo zapoczątkowało organizację specjalistycznych sympozjów z Biochemii i dziedzin pokrewnych. Do tej pory zorganizowano trzy sympozja i tak w dniu 29 listopada 1982 r. odbyło się sympozjum pt. „Wybrane zagadnienia z biochemii wrodzonych wad metabolicznych”, którego organizatorem była Barbara Czartoryska.

W dniu 31 marca 1983 r. odbyło się sympozjum pt. „Metody inżynierii enzymatycznej i genetycznej w biosyntezie i konwersji penicyliny”, organizatorem była doc. dr Lidia Paś.

W dniu 14 kwietnia 1983 r. odbyło się sympozjum pt. „Interferon”, którego organizatorem była doc. dr Magdalena Fikus.

#### **Zebranie Zarządu Głównego Towarzystwa**

W dniu 24 marca 1983 r. odbyło się posiedzenie Zarządu Głównego Towarzystwa, na którym omawiano sprawy organizacji XIX Zjazdu w Szczecinie w 1983 r. i XX Zjazdu w Olsztynie w 1984 r. Zaproponowano skład komisji do spraw nagród im. J. K. Parnasa i B. Skarżyńskiego, omówiono szczegółowo sytuację finansową Towarzystwa oraz możliwości współpracy z innymi Towarzystwami Biochemicznymi. Po-  
stanowiono wystąpić z konkretnymi propozycjami w tych sprawach na Walnym Zebraniu Towarzystwa w Szczecinie.

**Konferencja naukowa „Chemia i biologia kwasów nukleinowych” 20—21 kwiecień, 1983, Poznań.**

W dniach 20—21 kwietnia br odbyła się w Poznaniu konferencja naukowa nt. „Chemii i biologii kwasów nukleinowych”. Podobnie jak w roku ubiegłym, organizatorem Konferencji był Zakład Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, tym jednak razem przy współudziale Komisji Genetyki i Biologii Molekularnej Oddziału PAN w Poznaniu, Międzyuczelnianego Instytutu Biochemii i Instytutu Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

Tegoroczna konferencja poświęcona była głównie dwóm zagadnieniom:

- najnowszym kierunkom rozwojowym w chemii i biologii kwasów nukleinowych,
- inżynierii genetycznej, ze szczególnym uwzględnieniem inżynierii genetycznej roślin.

Konferencja w Poznaniu pomyślana była jako jedno z działań umożliwiających dobre przygotowanie się środowiska naukowego do podjęcia badań w przyszłej pięcioletce, oraz jako próba stworzenia otwartego systemu informacji krajowej w szeroko pojętych badaniach nad chemią, strukturą i biologią kwasów nukleinowych.

Na konferencji przedstawiono 17 referatów plenarnych, przeważnie przeglądowych (zgrupowanych w 6 sesjach), do wygłoszenia których organizatorzy zaprosili szereg wybitnych specjalistów również z poza Poznania. Jedna sesja była poświęcona także krótkim komunikatom z badań własnych.

Sesję pierwszą poświęconą inżynierii genetycznej (przewodniczący M. Wiewiórowski) otworzył referat J. Szweykowskiego p.t. „Teoria ewolucji a biologia molekularna”, który stanowił interesującą próbę lepszego powiązania biologii klasycznej z biologią molekularną, a przez to stanowił dobre tło dla licznych problemów poruszanych na konferencji. W ramach tej sesji przedstawiono referaty prezentujące różnorodne aspekty: (a) inżynierii genetycznej u roślin (J. Augustyniak), (b) nowej techniki badawczej jaką jest ukierunkowana mutagenesa (J. Stawiński), (c) zagadnień związanych z wyodrębnianiem i ekspresją genów kodujących hormony (P. Węgleński), oraz (d) spraw dotyczących chemicznej syntezy genów strukturalnych (A. Kraśzewski).

Sesja druga (przewodnicząca Z. Zielińska) była poświęcona molekularnym podstawom niektórych chorób genetycznych i chemoterapii. Wygłoszono cztery referaty dotyczące: (a) thalassemi (A. Horst), (b) organizacji benomu onkogennych wirusów (J. Szala), (c) onkogenów ludzkich (M. Chorąży), (d) syntezy i wykorzystania w terapii jako środków antywirusowych analogów komponentów kwasów nukleinowych (T. Kulikowski).

Pierwszy dzień konferencji zakończyła sesja (przewodniczący Z. Lorkiewicz) poświęcona omówieniu: (a) postępu w badaniach nad transferowymi kwasami rybonukleinowymi (J. Barciszewski), (b) zagadnień związanych z niezwykle ciekawym i nie w pełni jeszcze poznanym procesem dojrzewania RNA (splicing) (J. Pawełkiewicz). Sesję zakończył referat M. Zenkteleira omawiający potencjalne możliwości i ograniczenia hodowli komórek i tkanek roślinnych.

Drugi dzień konferencji poświęcony był w całości postępom w badaniach strukturalnych DNA i RNA. W trzech referatach pierwszej sesji (przewodniczący K. Wierzchowski) omówiono: (a) osiągnięcia w badaniach struktury DNA na podstawie danych rentgenograficznych monokryształów (D. Adamiak), (b) badania biologiczne dotyczące tzw. struktur Z DNA (J. Kłysik), (c) oddziaływanie DNA i RNA z interkalatorami i wynikające z nich implikacje strukturalne i farmakologiczne (R. Adamiak). W ostatniej sesji (przewodniczący E. Gąsior) wygłoszono dwa referaty dotyczące oddziaływania fragmentów DNA z niskocząsteczkowymi ligandami. W trakcie tej sesji omówiono: (a) oddziaływania jonów metali z nukleozydami i nukleotydami oraz potencjalne i praktyczne zastosowania terapeutyczne takich kompleksów (B. Jeżowska-Trzebiatowska), oraz (b) oddziaływanie amin biogennych z kwasami nukleinowymi (M. Wiewiórowski).

W czasie 2 godzinnej sesji poświęconej doniesieniom z prac własnych (przewodniczący J. Barciszewski i J. Stawiński), wygłoszono 12 komunikatów prezentujących wybrane problemy badawcze z chemii i biologii kwasów nukleinowych, realizowane w laboratoriach krajowych. M.in. poruszane tu były zagadnienia kompleksów tRNA syntetaz w organizmach zwierzęcych (T. Borkowski), problemy regulacji transkrypcji polimeraz RNA (A. Kijewska), oddziaływanie niskocząsteczkowych ligandów z enzymami (A. Guranowski), z fragmentami DNA (Z. Prasał) i z DNA (M. Gniazdowski), synteza analogów nukleozydów (K. Felczak) i działanie 5'-nukleotydaz (P. Lassota). Dyskutowano także sprawy stabilności wiązań glikozydowych w kwasach nukleinowych (E. Zielonacka-Lis), udziału egzogenego DNA w proliferacji limfocytów (K. Szyfter) oraz strategii sekwencjonowania RNA (T. Zwierzyński). Bardzo interesujące były również komunikaty dotyczące molekularnych podstaw wiązania azotu atmosferycznego przez rośliny (A. Skorupska, A. Wolański) — problemów bardzo ważnych ze względów poznawczych i praktycznych.

Konferencja w Poznaniu potwierdziła w pełni odczucia indywidualne każdego z nas, zajmujących się chemią i biologią kwasów nukleinowych, że olbrzymi postęp jaki w ostatnich dwóch latach nastąpił w tej dziedzinie przeszedł wszelkie oczekiwania. Eksperymenty, które uważano za możliwe do wykonania dopiero na początku lat 2000-ych, są realizowane obecnie, przy czym wszystko wskazuje na to, że znajdujemy się na początku nowej ery badań organizmów żywych, których dalszy postęp będzie uwarunkowany ścisłym współdziałaniem biologii klasycznej z biologią i genetyką molekularną i naukami fizyko-chemicznymi.

Szczególnie duży postęp odnotowano w następujących dziedzinach:

1. Badania struktury i organizacji materiału genetycznego.
2. Badania molekularnych podstaw raka i chorób genetycznych.
3. Inżynieria genetyczna roślin.
4. Przemysłowe wytwarzanie związków biologicznie czynnych o znaczeniu farmakologicznym.

Uważam, że wszystkie te kierunki badawcze mogą i powinny być rozwijane w Polsce, biorąc pod uwagę ich doniosłą wartość poznawczą i użytkową, oraz względnie niskie nakłady finansowe wymagane na ich prowadzenie (w stosunku do badań jądrowych i zbrojeniowych). Konferencja wykazała także, że w naszym kraju istnieje liczna, dobrze wyszkolona i bardzo kompetentna kadra pracowników nauki, a co szczególnie cieszy, wśród nich jest dużo młodych, entuzjastycznie zapalonych naukowców.

W konferencji wzięło udział ok. 150 osób i muszę przyznać, że zainteresowanie konferencją przeszło nasze oczekiwania, tym bardziej, że organizując ją w pośpiechu, za co wszystkich przepraszam, na pewno nie powiadomiłmy o niej wszystkich zainteresowanych. Naszym zdaniem, świadczy to dobitnie o dużym zapotrzebowaniu na bardzo szybką wymianę informacji dotyczących badań związanych z chemią i biologią kwasów nukleinowych, stąd proponowałbym, aby tego rodzaju spotkania

naukowe można było organizować każdego roku mniej więcej w tym samym czasie, niekoniecznie w Poznaniu. W dyskusjach kulwarowych mówiono, że odbyta konferencja uzupełnia w istotny sposób sympozja sprawozdawcze organizowane przez koordynatorów programów rządowych, problemów węzłowych i międzyresortowych, w których szeroko pojęta chemia i biologia kwasów nukleinowych jest uprawiana i dyskutowana.

Konferencja miała oczywiście słabe punkty. Dla niektórych była zbyt heterogenna (choć inni uważali to za zaletę), dla wszystkich natomiast program konferencji był zbyt przeładowany i za mało czasu zostało na dyskusję. Mam nadzieję, że organizatorzy przyszłorocznej konferencji unikną tych niedociągnięć.

M. Wiewiórowski

### 6th European Cell Cycle Workshop „Progress in Cell Cycle Controls”

Praga, Czechosłowacja, 4—8.IV.1983 r.

Kolejne spotkanie osób zajmujących się biologią cyklu komórkowego miało miejsce w Pradze. Organizatorem konferencji był Instytut Mikrobiologii Czechosłowackiej Akademii Nauk a pracą komitetu organizacyjnego kierował dr A. Kotyk. W konferencji wzięło udział 114 osób z 18 krajów, w tym 5 uczestników z Polski. Najbardziej znaną grupę stanowili prof. Mitchison i jego uczniowie. Ośrodek kierowany przez M. Mithisona (Zakład Zoologii Uniwersytetu w Edynburgu, Szkocja) ma od lat opinię wiodącej placówki w dziedzinie badań nad cyklem komórkowym. Można dodać, że wielu spośród uczestników konferencji odnotowało w swej drodze naukowej pobyty badawcze w Edynburgu.

W wykładzie inauguracyjnym, zatytułowanym „Paradoksy i tajemnice cyklu komórkowego”, M. Mithison dokonał pobieżnego przeglądu ustaleń z ostatnich lat, skupiając się na nierozwiązanych problemach. Należą do nich przyczyny rozdziału chromosomów, budowa nowej błony dzielącej komórki potomne a nade wszystko znaczenie biologiczne faz G1 i G2. Nie ma wątpliwości, że podczas fazy G1 zachodzą czynności przygotowawcze do wzrostu komórki i duplikacji materiału genetycznego a mimo to istnieją komórki, w których cyklu nie stwierdzono absolutnie fazy G1. Należą do nich *Physarum*, o których mówił W. Sachsenmaier (Innsbruck). Odnośnie fazy G2 zakłada się, że wówczas ma miejsce reparacyjna synteza DNA, bowiem warunkiem rozdziału chromosomów jest nie tylko ich duplikacja ale również pełna reparacja. Nawiązał do tego P. Fantès (Edynburg) omawiając cykl komórkowy drożdży. Fazy S i G2 stanowią w tym przypadku 50% cyklu a łączny czas ich trwania jest stały i determinuje wystąpienie mitozy. Różnice w czasie trwania fazy G2 pozwalają spekulować na temat intensywności syntezy reparacyjnej. W wykładzie P. Fantesa wspomniano także o dwóch genach regulacyjnych cyklu komórkowego, oznaczonych symbolami *wee-* i *cdc2*.

Zagadnienie genów regulacyjnych podjęto w kilku dalszych wykładach. S. Reed (Santa Barbara) przedstawił izolację genu odpowiedzialnego za podział komórki *Saccharomyces cerevisiae*. Produktem wyizolowanego genu było silnie hydrofobowe, bogate w prolinę białko. Oznaczono sekwencję aminokwasową tego białka a w trakcie jest praca nad sekwencjonowaniem genu. W. D. Donachie (Edynburg) omówił geny regulacyjne cyklu komórkowego *E. coli*. Zlokalizowano kilka genów regulacyjnych (czynnik wzrostu, represor, proteazy, inhibitor podziału) w postaci zespołu genów w określonym miejscu genomu. Na temat regulacji cyklu komórkowego wypowiedzieli się ponadto: I. Šetlik (Třeboň) na podstawie prac nad cyklem alg, S. Howell

(San Diego) zajmujący się *Clamydomona reinhardi*, G. Cleffmann (Giessen) pracujący na *Tetrahymena* oraz V. Ivanov (Moskwa) odnośnie komórek roślinnych. W. Donachie i I. Šetlik postulowali przy okazji zastąpienie terminu „cykl komórkowy” przez „komórkowy cykl reprodukcyjny”.

Druga grupa zagadnień dotyczyła punktów krytycznych w poszczególnych fazach. Należy do nich np. sygnał „start”, występujący pod koniec fazy G1 u drożdży lub punkt w fazie S, od którego synteza DNA jest niewrażliwa na inhibitory. W przypadku komórek ssaczych zlokalizowanie punktów krytycznych jest trudnym zadaniem. W tej serii referaty prezentowali: G. J. Johnston (Halifax), P. C. L. John (Belfast), J. Campisi (Boston) i D. W. Rønning (Oslo). Z problemem tym wiązały się informacje o periodycznych zmianach materiału wewnątrzkomórkowego, zachodzących podczas cyklu komórkowego, głównie zmian aktywności niektórych enzymów i syntezy mRNA. Więcej danych można było odnaleźć na posterach, z których na szczególną uwagę zasługiwał komunikat J. Creanora (Edynburg) postulujący przypisanie charakteru enzymów schodkowych enzymom uczestniczącym w metabolizmie DNA.

Oprócz kilkudziesięciu posterów program uzupełniały trzy dyskusje okrągłego stołu, podczas których omówiono protoplasty jako układy modelowe w badaniach cyklu komórkowego, udział chloroplastów i mitochondriów w cyklu komórkowym oraz rolę cytoszkieletu we wzroście i podziale komórek.

Na osobną wzmiankę zasługują próby stworzenia generalnego modelu procesu prowadzącego do podziału komórki, przedstawione przez L. Alberghinę (Mediolan) oraz na niektórych posterach.

Organizatorzy przewidują wydanie materiałów konferencji. Warto podkreślić zabiegi organizatorów o zapewnienie możliwości nieformalnych dyskusji poza salą obrad. Temu celowi służył bogaty program towarzyski. Jedynie zwiedzanie Pragi stanowiło pełne oderwanie się od biochemii ale przyjęte chętnie, gdyż większość uczestników zwiedzała Pragę ze świadomością przyjazdu do miasta o niezaprzeczalnym pięknem.

*Krzysztof Szyfter*

## RECENZJA

### Jadwiga Bryła Regulacja metabolizmu komórki

Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1981, str. 596, ISBN 83-01-02861-0, cena 120 zł.

Recenzowana książka jest nowoczesnym napisanym podręcznikiem biochemii. Dla czytelnika polskiego jest to specjalnie interesująca pozycja, gdyż od wielu lat na krajowym rynku księgarskim odczuwa się brak pozycji przedstawiających nowoczesne problemy biochemiczne.

Autorka opracowała problemy regulacji procesów biochemicznych w komórce dla dobrze przygotowanego z biochemii czytelnika. Zebrany materiał jest cyklem wykładów monograficznych dla studentów wyższych lat studiów kierunku biologii molekularnej. Niemniej podręcznik zawiera przegląd najważniejszych problemów z biochemii i uważnie studiujący czytelnik jest bardzo starannie i przystępnie wprowadzany przez autorkę do najbardziej zawiłych spraw. Wprowadzanie czytelnika jest cierpliwe i prowadzi różnymi drogami. W pierwszej części autorka przedstawia sprzężenie metabolizmu z mechanizmami regulacyjnymi. Obszerna część druga omawia nowoczesne metody badań metabolizmu. Następnie w części trzeciej opisane są problemy regulacji na poziomie aktywności katalitycznej enzymów. Część czwarta przedstawia sprawy transportu przez błony w obrębie komórek i między komórkami. Część piąta omawia regulację szlaków metabolicznych i współzależności między nimi. Ostatnia część przedstawia problemy różnicowania osobniczego organizmów żywych wraz z patologią związaną z transformacją nowotworową.

Książka jest starannie opracowana przez autorkę. Schematy reakcji ilustrujące wszystkie przedstawiane problemy są przejrzyste oraz dobrze włączone w tekst. Zastosowany system podziału tekstu ułatwia szybkie odszukanie poszczególnych problemów. Na końcu książki jest dodatek zawierający wzory używanych inhibitorów. Każdy z rozdziałów ma obszernie zestawienie piśmiennictwa rozszerzającego omawianą problematykę.

Recenzowana książka jest cenną pozycją biochemiczną, która wypełni olbrzymią lukę wśród poprzednio wydawanych z dużym opóźnieniem publikacji i przyczyni się do rozpowszechnienia najbardziej aktualnych zagadnień z regulacji procesów biochemicznych nie tylko wśród specjalistów.

Zdzisław Żak

## Addendum

Addendum do art. „Komórkowe geny transformujące”.

W okresie jaki upłynął między złożeniem maszynopisu a korektą dokonano dalszych odkryć. U drożdży w sąsiedztwie genu aktyny i tubuliny odkryto gen YP2, który jest homologiem ludzkiego proto-onkogenu z rodziny *c-ras* (D. Gallwitz i in., *Nature*, 306, 704—707, 1983; D. DeFeo-Jones i in., *Nature*, 306, 707—709, 1983). Odkrycia te wskazują na wielki konserwatyzm genów *onc* w ewolucji. Lista genów *onc* powiększyła się o gen *ets* zidentyfikowany obok genu *myb* w retrowirusie E26, oraz gen *mil* (lub *mht*) znaleziony w nowoodkrytym retrowirusie Mill Hill 2 (MH2) indukującym białaczkę i raki u kurcząt. Blisko spokrewniony z genem *mil/mht* gen *raf* wykryto w retrowirusie mysim 3611—MSV, który indukuje włókniako-mięsaki u noworodków myszy (*Nature*, 306, 426, 1983). Odkryto homologię sekwencji między białkiem p28<sup>118</sup> — domniemany białkiem transformującym wirusa SiSV — a ludzkim czynnikiem wzrostowym pochodzącym z płytek krwi (*platelet-derived growth factor* — PDGF), co wskazuje, że mechanizm transformacji wirusem SiSV może polegać na ekspresji czynnika mitogennego (M. D. Waterfield i in., *Nature*, 304, 35—39, 1983; K. C. Robbins i in., *Nature*, 305, 605—608, 1983; por. też *Nature* 304, 12, 1983; *Nature* 305, 470—471, 1983). Fragment sekwencji wtrąconych u końca 5' genu *rc-mos* w szpiczakach myszy (por. Ryc. 5) zidentyfikowano jako homolog sekwencji LTR wirusowych cząsteczek A, zawierający sekwencje typu „enhancer”, przy czym LTR miał odwróconą w stosunku do genu *c-myc* orientację (G. Rechavi i in., *Eur. J. Cancer Clin. Onc.*, 19, 1311, 1983). W innym typie szpiczaka (NSI) integracja LTR z genem *c-mos* zaszła w 30 kodonie *c-mos*, a orientacja włączonego LTR jest taka sama jak genu *c-mos* (J. B. Cohen i in., *Nature*, 306, 797—799, 1983). Oprócz amplifikacji genu *c-myc* w ostrej białaczce promielocytarnej (por. str. 280) stwierdzono amplifikację i ekspresję *c-myc* w linii komórek raka okrężnicy (K. Alitalo i in., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1707—1711, 1983) oraz linii raka oskrzela (C. D. Little i in., *Nature*, 306, 194—196, 1983). W guzie nadnerczy myszy liczba kopii genu *c-Ki-ras* zwiększa się od 30 do 60 razy (M. Szwab i in., *Nature*, 303, 497—501, 1983). Gen *c-Ki-ras* w linii komórkowej ludzkiego raka płuc oraz raka okrężnicy — podobnie jak gen *c-Ha-ras* (por. rozdz. VI) — jest aktywowany poprzez mutację punktową (K. Schimizu i in., *Nature*, 304, 497—500, 1983; D. J. Capon i in., *Nature*, 304, 507—513, 1983). Liczne, następne geny *onc* zmapowano w chromosomach człowieka por. Tab. 2): gen *n-ras* w chromosomie 1, *sk1* w ch. 2, *fos* w ch. 2, *raf-1* w ch. 3, *raf-2* w ch. 4, *fms* w ch. 5, *Ki-ras1* w ch. 6, *erb B* w ch. 7, *Ki-ras2* w ch. 12, *erb A1* w ch. 17, *src* w ch. 20, *Ha-ras2* w ch. X (por. *Nature*, 306, 223—224, 1983; J. J. Yunis, *Science*, 221, 227—236, 1983). Analiza translokacji i delecji chromosomalnych w nowotworach człowieka i zwierząt pozwoliła na dokładniejszy wgląd w zmiany struktury genów *onc* objętych tymi aberacjami. Gen *c-myc* w szpiczakach myszy i chłoniakach pochodzących z komórek B u człowieka ulega w trakcie swoistych translokacji głębokim uszkodzeniom. Miejsce pęknięcia w locus *c-myc* są rozmieszczone na dużym odcinku DNA i obejmują rejon od sekwencji poprzedzających pierwszy ekson do pierwszego intronu włącznie (S. Cory i in., *EMBO J.*, 2, 697—703, 1983). Gen *c-myc* rekombinuje nie tylko z rejonem S<sub>α</sub> stałego segmentu (C) ciężkiego łańcucha immunoglobuliny lecz także z rejonem S<sub>μ</sub> genu C<sub>μ</sub> oraz z rejonem

$S_{\gamma}$  poprzedzającym  $C_{\gamma 1}$ . Opisano także translokację *c-myc* do sąsiedztwa genu  $C_{\gamma 2b}$ . Orientacja genu *c-myc* w stosunku do genu  $C$  jest najczęściej odwrócona (5' *c-myc* do 5'  $C$ ).

W intronie oddzielającym gen  $V-D-J$  od genu  $C_{\mu}$  zidentyfikowano sekwencje wzmacniające transkrypcje (*enhancer* —  $En$ ), (T. H. Rabbitts i in., *Nature*, 306, 806—809, 1983). Ponieważ sekwencje  $En$  leżą na lewo od rejonu  $S_{\mu}$ , a integracja *c-myc* w guzach Burkitta i szpiczakach następuje najczęściej w rejonie  $S_{\mu}$ , gen *c-myc* po translokacji nie może być pod wpływem sekwencji  $En$ . Znana jest jednak jedna linia chłoniaka Burkitta (linia Manca), w której gen *c-myc* został zintegrowany na lewo od sekwencji  $En$ , które w tym przypadku mogą być aktywatorem genu. Pierwszy ekson *c-myc* w trakcie translokacji może ulec całkowitej eliminacji, bez szkody dla treści informacji kodowanej przez *c-myc*, gdyż ekson pierwszy posiada kodony stop we wszystkich trzech fazach odczytu i najpewniej nie ulega translacji. Istotnym dla kodowania peptydu *myc* jest ekson drugi, który w przypadku translokacji do  $C_{\mu 1}$  wykazuje akumulację licznych mutacji punktowych (T. H. Rabbitts i in., *Nature*, 306, 760—765, 1983). Rejon obejmujący sekwencje  $LyR$  i  $NIARD$  (por. str. 291 i 292) jest złożony z sekwencji poprzedzających *c-myc* i sekwencji niekodujących, oddzielających  $V-D-J$  od  $C$ .



## SPIS TREŚCI

### Z historii biochemii

W. Ostrowski — Zarys rozwoju badań nad metaloporfirynami . . . . .	247
J. Barciszewski — Transferowe kwasy nukleinowe — dwadzieścia pięć lat badań . . . . .	255

### Artykuły

M. Chorąży, S. Szala — Komórkowe geny transformujące . . . . .	261
C. Janion — Enzymy naprawiające modyfikowane zasady w DNA: DNA-glikozydazy, DNA-transmetylaza O <sup>6</sup> -metyloguaniny . . . . .	299
W. Przybyszewski — Kompleks reduktazy rybonukleotydowej . . . . .	321
A. Barańczyk - Kuźma — Metabolizm siarczanów . . . . .	335
D. Stępkowski, I. Kąkol — Łańcuchy regulujące miozyny z mięśni szkieletowych . . . . .	355
A. Janecka — Metody otrzymywania nukleozydotrifosforanów znakowanych izotopem fosofru <sup>32</sup> P w pozycji alfa i beta . . . . .	377

### Nowe w biochemii

J. Skangiel-Kramska — Nowe narzędzie w badaniach neurochemicznych — Autoradiografia ilościowa receptorów . . . . .	393
--	-----

### Słownictwo biochemiczne

Słownictwo witamin D (tłum. J. Kwiatkowska) . . . . .	397
Jednostki aktywności enzymatycznej (tłum. M. K. Kołaczkowska) . . . . .	409
Komunikat Komisji Słownictwa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	412

### Sprawozdania

Kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	415
Sprawozdanie z konferencji nt. „Chemia i biologia kwasów nukleinowych 20—21 kwiecień 1983, Poznań (M. Wiewiórowski) . . . . .	416
Sprawozdanie z konferencji nt. „Progress in Cell Controls”, 4—8 kwiecień 1983 Praga, Czechosłowacja (K. Szyfter) . . . . .	418

### Recenzja książki

Regulacja metabolizmu komórki, J. Bryła (rec. Z. Żak) . . . . .	420
Addendum do art. „Komórkowe geny transformujące” . . . . .	421

# POSTĘPY BIOCHEMII

September 1983

## ARTICLES IN POLISH

Volume 29

Number 3—4

### History of Biochemistry

- W. Ostrowski—Development of Studies on Metal—porphyrines (Inst. of Medical Biochemistry, School of Medicine, Kraków) . . . . . 247
- J. Barciszewski—Transfer Ribonucleic acids—twenty five years of studies (Inst. of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences, Poznań) . . . . . 255

### Articles

- M. Chorąży, S. Szala—Cellular Transforming Genes (Inst. of Oncology, Gliwice) . . . . . 261
- C. Janion—Enzymes Correcting the Modified Bases in DNA: DNA-glycosylases, O<sup>6</sup>-methylguanine, DNA-transmethylase (Inst. of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Warszawa) . . . . . 299
- W. Przybyszewski—Complex of Ribonucleotide Reductase (Dept of Biochemistry Inst. of Hematology, Warszawa) . . . . . 321
- A. Barańczyk-Kuźma—Sulfate Metabolism (Dept of Biochemistry Institut of Biopharmacy Warsaw Medical Schol, Warszawa) . . . . . 335
- D. Stępkowski, I. Kąkol—Regulatory Ligh Chains of Skeletal Muscle Myosin (Dept of Cellular Biochemistry Nencki Inst. of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa) . . . . . 355
- A. Janecka—Methods of Preparation of Nucleosidetriphosphates Labeled with Phosphorus—32 in Alfa and Gamma Position (Inst. of Physiology and Biochemistry Medical Academy in Łódź) . . . . . 377

### News in Biochemistry

- J. Skangiel-Kramaska—New Method in Neurochemistry—Quantitative Autoradiography of Labelled Ligant Binding, Reports of Polish Biochemical Society (Dept of Neurophysiologie, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, Warszawa) . . . . . 393
- MEETING REPORTS . . . . . 415
- BOOK REVIEW . . . . . 421

## POSTĘPY BIOCHEMII

SPIS TREŚCI — TOM 29, 1983

### ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

J. Duszyński—Regulacja funkcjonowania szlaku metabolicznego . . . . .	3
J. Duszyński—Regulacja oddychania mitochondrialnego . . . . .	17
A. Kozik—Chromatograficzne i elektroforetyczne metody wyznaczania parametrów oddziaływania białko—ligand . . . . .	33
L. Bielecka, R. S. Lorenz—Białko wiążące witaminę D . . . . .	53
P. T. Szymański—Receptory adrenergiczne . . . . .	67
J. Zborowski—Cytoplazmatyczne białka transportujące fosfolipidy (mini-review)	101
P. Masłowski, H. Masłowska—Niektóre właściwości, struktura i funkcja chloroplastowego czynnika sprzęgającego (CF <sub>1</sub> ) . . . . .	111
E. Kaczmarewicz—Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa . . . . .	125
J. Łomako—Glikogenosomy . . . . .	149
B. Grzelakowska-Sztabert—Molekularne mechanizmy oporności komórek na antyfoliany . . . . .	167
K. Dziewanowska—Naturalne związki cyjanogenne . . . . .	191
K. Dziewanowska—Rola biologiczna związków cyjanogennych i cyjanowodoru . . . . .	227
M. Chorąży, S. Szala—Komórkowe geny transformujące . . . . .	261
C. Janion—Enzymy naprawiające modyfikowane zasady w DNA: DNA-glikozydazy, DNA—transmetylaza O <sup>6</sup> -metyloguaniny . . . . .	299
W. Przybyszewski—Kompleks reduktazy rybonukleotydu . . . . .	321
A. Barańczyk-Kuźma—Metabolizm siarczanów . . . . .	335
D. Stępkowski, I. Kąkol—Łańcuchy regulujące miozyny z mięśni szkieletowych . . . . .	355
A. Janecka—Metody otrzymywania nukleozydotrifosforanów znakowanych izotopem fosforu <sup>32</sup> P w pozycji alfa i gamma . . . . .	377

### NOWE W BIOCHEMII

J. Skangiel-Kramska—Nowe narzędzie w badaniach neurochemicznych—Autoradiografia ilościowa wiązania znakowanych ligandów . . . . .	393
J. Barciszewski—Transferowe kwasy nukleinowe—Dwudziestopięcioletnie badań . . . . .	255

### RECENZJE KSIĄŻEK

I. Kąkol—Biosynthese niedermolekular Naturstoffe. Red. H. R. Schütte. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982 . . . . .	93
J. Kączkowski—Biochemisches Praktikum. Red. H. P. Kleber, D. Schlee, W. Schöpp. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982 . . . . .	241
Z. Zak—Regulacja metabolizmu komórki. J. Bryła, PWN, 1981 . . . . .	420

### KRONIKA I INNE

Sprawozdanie z Międzynarodowej Szkoły Letniej Biologii Molekularnej i Komórkowej, Spetsai, Grecja (T. Jakubowicz) . . . . .	239
Z historii biochemii—Zarys rozwoju badań nad metaloporfirynami (W. Ostrowski) . . . . .	247

## SŁOWNICTWO BIOCHEMICZNE

Słownictwo witamin D (tłum. J. Kwiatkowska) . . . . .	397
Jednostki aktywności enzymatycznej (tłum. M. K. Kołaczkowska) . . . . .	409
Kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	415
Sprawozdanie z konferencji nt. „Chemia i biologia kwasów nukleinowych, Poznań, 1983 (M. Wiewiórowski) . . . . .	416
Sprawozdanie z konferencji nt. „Progress in Cell Cycle Controls” Praga, Czechosłowacja, 1983 (K. Szyfter) . . . . .	418

## INDEKS AUTORÓW — TOM 29, 1983

### B

Barańczyk-Kuźma A.—Metabolizm siarczanów . . . . .	335
Barciszewski J.—Transferowe kwasy nukleinowe — Dwudziestopię- ciolecie badań . . . . .	255
Bielecka L., Lorenc R. S.—Białko wiążące witaminę D . . . . .	53

### C

Choraży M., Szala S.—Komórkowe geny transformujące . . . . .	261
--	-----

### D

Duszyński J.—Regulacja funkcjonowania szlaku metabolicznego . . . . .	3
Duszyński J.—Regulacja oddychania mitochondrialnego . . . . .	17
Dziewanowska K.—Naturalne związki cyjanogenne . . . . .	191
Dziewanowska K.—Rola biologiczna związków cyjanogennych i cyja- nowodoru . . . . .	227

### G

Grzelakowska-Sztabert B.—Molekularne mechanizmy oporności komórek na antyfoliany . . . . .	167
---	-----

### J

Jakubowicz T.—Sprawozdanie z Międzynarodowej Szkoły Letniej Bio- logii Molekularnej i Komórkowej, Spetsai, Grecja, 1982 . . . . .	239
Janecka A.—Metody otrzymywania nukleozydotrifosforanów znakowa- nych izotopem fosforu <sup>32</sup> P w pozycji alfa i gamma . . . . .	377
Janion C.—Enzymy naprawiające modyfikowane zasady w DNA: DNA- glikozydazy, DNA-transmetylaza O <sup>6</sup> -metyloguaniny . . . . .	299

### K

Kaczmarewicz E.—Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa . . . . .	125
Kączkowski J.—Recenzja książki Biochemisches Praktikum. Red. H. P. Kleber, D. Schlee, W. Schöpp. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982 . . . . .	241

Kąkol I. — Recenzja książki Biosynthese niedermolekular Naturstoffe. Red. H. R. Schütte. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982 . . . . .	93
Kąkol I. — (patrz Stępkowski D., Kąkol I.) . . . . .	355
Kołaczkowska M. K. — Słownictwo biochemiczne: Jednostki aktywności enzymatycznej . . . . .	409
Kozik A. — Chromatograficzne i elektroforetyczne metody wyznaczania parametrów oddziaływania białko—ligand . . . . .	33
Kwiatkowska J. — Słownictwo biochemiczne: Słownictwo witamin D	397
<b>L</b>	
Lorenc R. S. — (patrz Bielecka L., Lorenc R. S.) . . . . .	53
<b>Ł</b>	
Łomako J. — Glikogenosomy . . . . .	149
<b>M</b>	
Masłowski P., Masłowska H. — Niektóre właściwości, struktura i funkcja chloroplastowego czynnika sprzęgającego (CF <sub>1</sub> ) . . . . .	111
Masłowska H. — (patrz Masłowski P., Masłowska H.) . . . . .	111
<b>O</b>	
Ostrowski W. — Z historii biochemii — Zarys rozwoju badań nad metaloporfirynami . . . . .	247
<b>P</b>	
Przybyszewski W. — Kompleks reduktazy rybonukleotydowej . . . . .	321
<b>S</b>	
Skangiel-Kramska J. — Nowe narzędzie w badaniach neurochemicznych — Autoradiografia ilościowa wiązania znakowanych ligandów . . . . .	393
Stępkowski D., Kąkol I. — Łańcuchy regulujące miozyny z mięśni szkieletowych . . . . .	355
Szala S. — (patrz Chorąży M., Szala S.) . . . . .	261
Szyfter K. — Sprawozdanie z konferencji nt. „Progress in Cell Cycle Controls”, Praga, Czechosłowacja, 1983 . . . . .	418
Szymański P. T. — Receptory adrenergiczne . . . . .	67
<b>W</b>	
Wiewiórowski M. — Sprawozdanie z konferencji nt. „Chemia i biologia kwasów nukleinowych”, Poznań, 1983 . . . . .	416
<b>Z</b>	
Zborowski J. — Cytoplazmatyczne białka transportujące fosfolipidy (minireview) . . . . .	101
<b>Ż</b>	
Żak Z. — Recenzja książki — Regulacja metabolizmu komórki. J. Bryła, PWN, 1981 . . . . .	420



## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwu lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 25 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych, interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawdziwość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co., London;  
Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1–58; Academic Press, London.

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

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

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczony do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

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



## CENTRALNY KATALOG ZAGRANICZNYCH CZASOPISM I WYDAWNICTW CIĄGŁYCH

Centralny katalog zagranicznych czasopism i wydawnictw ciągłych znajdujących się w bibliotekach Polskiej Akademii Nauk i towarzystw naukowych dotowanych przez PAN dostarcza informacji bibliograficznych o ponad 18 000 tytułów wydawnictw z różnych dziedzin i dyscyplin naukowych.

Katalog jest prowadzony przez Bibliotekę Polskiej Akademii Nauk w Warszawie w formie kartoteki od 1961 roku. Biblioteka udziela informacji na podstawie katalogu na miejscu (Pałac Kultury i Nauki, VI piętro, pokój 607), telefonicznie (20-02-11 wew. 26) lub za pośrednictwem teleksu 815360.

Katalog jest aktualizowany bieżąco na podstawie opisów bibliograficznych nadsyłanych z ok. 120 bibliotek Akademii.

Opis katalogowy zawiera dane o tytule (ewentualnie i podtytule) wydawnictwa, miejscu wydawania, częstotliwości, zasobach w obrębie tytułu (rocznik, zeszyty, numery), sposobie nabycia (prenumerata, kupno, wymiana, dar), jego lokalizacji w danej placówce (bibliotece), a także informuje, czy wydawnictwo zostało zmikrofiszowane.

Pewna liczba czasopism zagranicznych posiadanych przez biblioteki PAN jest dostępna również w postaci mikrofisz znajdujących się w Ośrodku Informacji Naukowej PAN, który publikuje wykazy czasopism zmikrofiszowanych oraz udostępnia kopie mikrofisz, a także odbitki czytelne gołym okiem na życzenie użytkowników.

Centralny katalog zagranicznych czasopism i wydawnictw ciągłych jest źródłem informacji o bieżących wpływach oraz informacji retrospektywnej za okres ponad 20 lat.



## SPIS TREŚCI

## Z historii biochemii

W. Ostrowski — Zarys rozwoju badań nad metaloporfirynami . . . . .	247
J. Barciszewski — Transferowe kwasy nukleinowe — dwadzieścia pięć lat badań . . . . .	255

## Artykuły

M. Chorąży, S. Szala — Komórkowe geny transformujące . . . . .	261
C. Janion — Enzymy naprawiające modyfikowane zasady w DNA: DNA-glikozydazy, DNA-transmetylaza O <sup>6</sup> -metyloguaniny . . . . .	299
W. Przybyszewski — Kompleks reduktazy rybonukleotydowej . . . . .	321
A. Barańczyk-Kuźma — Metabolizm siarczanów . . . . .	335
D. Stępkowski, I. Kąkol — Łańcuchy regulujące miozyny z mięśni szkieletowych . . . . .	355
A. Janicka — Metody otrzymywania nukleozydotrifosforanów znakowanych izotopem fosforu <sup>32</sup> P w pozycji alfa i beta . . . . .	377

## Nowe w biochemii

J. Skangiel-Kramska — Nowe narzędzie w badaniach neurochemicznych — Autoradiografia ilościowa receptorów . . . . .	393
--	-----

## Słownictwo biochemiczne

Słownictwo witamin D (tłum. J. Kwiatkowska) . . . . .	397
Jednostki aktywności enzymatycznej (tłum. M. K. Kołaczowska) . . . . .	409
Komunikat Komisji Słownictwa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	412

## Sprawozdania

Kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	415
Sprawozdanie z konferencji nt. „Chemia i biologia kwasów nukleinowych 20—21 kwiecień 1983, Poznań (M. Wiewiórowski) . . . . .	416
Sprawozdanie z konferencji nt. „Progress in Cell Controls”, 4—8 kwiecień 1983 Praga, Czechosłowacja (K. Szyfter) . . . . .	418

## Recenzja książki

Regulacja metabolizmu komórki, J. Bryła (rec. Z. Żak) . . . . .	420
Addendum do art. „Komórkowe geny transformujące” . . . . .	421