

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 32 (1-2)
(1-240) (1986)

1986

tom 32 nr 1-2

PL ISSN 0032-5422



<http://rcin.org.pl>

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

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 dwóch lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 20 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 innych czasopismach, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska: poprawki wynikające z błędów drukarni nanosimy ołówkiem; niezbędne zmiany autorskie nanosimy niebieskim atramentem. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 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) Zakład(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 przedstawionych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1. Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku, np. kwas glutaminowy (I).

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 32 ZESZYT 1-2
1986

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 32 (1-2)
(1-240) (1986)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)
Zastępca przewodniczącego: I. Szumieli (Warszawa)
Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)
Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), E. Czuryło (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. Pawelkiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), L. Wojtczak (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

SEKRETARZ REDAKCJI

J. Tępińska

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), A. Jerzmanowski (Warszawa), J. Skangiel-Kramaska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1986

Nakład 1720 egz.	Oddano do składania 7.II.1986 r.
Ark. wyd. 16,75, ark. druk. 15,0	Podpisano do druku w grudniu 1986 r.
Papier offset. spec. kl. III, 70 g 70×100	Druk ukończono w styczniu 1987 r.
Zam. 2158/12/86	Cena zł 280,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

W osiemdziesiątą rocznicę urodzin

profesor

IRENY CHMIELEWSKIEJ

Członka Rzeczywistego Polskiej Akademii Nauk

Członka Honorowego i Założyciela

Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Twórcy Instytutu Biochemii

Uniwersytetu Warszawskiego

Wieloletniego Redaktora Naczelnego

„Postępów Biochemii”

Podwójny zeszyt

dedykuje

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Z HISTORII BIOCHEMII

ELWIRA LISOWSKA *)

Przeciwciała monoklonalne i ich zastosowania w badaniach biochemicznych

Monoclonal antibodies and their applications in biochemical studies

Nagrodę Nobla w dziedzinie nauk medycznych w 1984 r. otrzymali trzej immunolodzy: C. Milstein, G. Köhler i N. K. Jerne za opracowanie techniki otrzymywania przeciwciał monoklonalnych. Nie każdego roku istnieje możliwość przyznania tej nagrody za osiągnięcia, które wywarłyby tak ogromny wpływ na rozwój badań, nie tylko w dziedzinie immunologii, ale także w wielu innych dziedzinach biologii. Metodę otrzymywania przeciwciał monoklonalnych opracowali Köhler i Milstein, ich pierwsza o historycznym już dziś znaczeniu praca na ten temat ukazała się w 1975 r. (1). Jerne, którego badania wywarły decydujący wpływ na rozwój immunologii komórkowej, został włączony do nagrodzonego zespołu za stworzenie teoretycznych podstaw dla idei Köhlera i Milsteina.

Klasyczna metoda otrzymywania przeciwciał polega na immunizacji zwierząt obcymi makrocząsteczkami i wykorzystaniu przeciwciał wydzielanych do osocza. Swoistą surowicę przeciw określonemu antygenowi można otrzymać albo przez szczepienie wysoce oczyszczonym antygenem, albo przez immunizację materiałem heterogennym i absorpcję niepożądanych przeciwciał z uzyskanej nieswoistej surowicy. Chociaż metody te były stosowane już od wielu lat są one obarczone licznymi niedogodnościami. Niewiele bowiem antygenów można uzyskać w stanie oczyszczonym. Otrzymanie monoswoistej surowicy przez szczepienie materiałem heterogennym i absorpcję wymaga dysponowania odpowiednim materiałem kontrolnym, zawierającym wszystkie antygeny obecne w próbce użytej do immunizacji, z wyjątkiem tego, wobec którego chcemy otrzymać przeciwciała. Absorpcja prowadzi do strat przeciwciał docelowych i uzyskania surowicy pozornie swoistej, ale o niskiej aktywności. Jeżeli nawet dysponujemy homogenym preparatem antygeny do immunizacji otrzymuje się

*) Prof. dr hab., Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Czerna 12, 53-114 Wrocław

wysoce heterogenną populację przeciwciał. Wspólną cechą tych przeciwciał jest zdolność do reakcji z danym antygenem, ale rozpoznają one różne fragmenty tej samej cząsteczki (determinant antygenowy ma rozmiar rzędu kilku reszt aminokwasowych), różnią się powinowactwem, klasą i podklasą immunoglobulin. Zakłada się, że antygen białkowy może spowodować powstanie nawet kilku tysięcy różnych przeciwciał. Są one produkowane w różnych ilościach, a o właściwościach surowicy odpornościowej decydują przeciwciała obecne w najwyższych stężeniach. W związku z tym surowice otrzymane przez szczepienie tym samym antygenem różnych zwierząt nawet tego samego gatunku wykazują nieraz duże różnice jakościowe z powodu obecności w nich różnych przeciwciał dominujących. Ponadto w odpowiedzi na śladowe nawet zanieczyszczenia obecne w preparacie danego antygeny mogą powstawać znaczne ilości przeciwciał, jeśli substancja zanieczyszczająca ma silne właściwości immunogenne.

Badania Jerne'go przyczyniły się w decydującym stopniu do wyjaśnienia mechanizmów biosyntezy przeciwciał w komórkach, czyli na etapie wyprzedzającym pojawienie się ich w krążeniu. Jest on współtwórcą teorii selektywnego powstawania przeciwciał, wg której w organizmie istnieje zakodowana genetycznie informacja odnośnie biosyntezy całego możliwego repertuaru przeciwciał w odpowiadającym mu repertuarze komórek je produkujących (limfocyty B). Jerne wykazał bowiem, że indywidualna komórka produkuje tylko jedno przeciwciało. Tak więc immunoglobuliny obecne w surowicy nieimmunizowanego organizmu (pomijając dla uproszczenia procesy tzw. „naturalnej” immunizacji) są niezwykle złożoną mieszaniną różnych przeciwciał, z których żadne nie jest wykrywalne z powodu zbyt małego stężenia. Wprowadzenie antygeny stymuluje wybiórczo proliferację tych klonów komórkowych, które produkują przeciwciała charakterystyczne dla podanego antygeny. Przeciwciała te stają się dominujące w osoczu i osiągają stężenia umożliwiające widoczną reakcję z antygenem. W efekcie stymulacji licznych klonów komórkowych przez jeden antygen humoralna odpowiedź immunologiczna ma charakter poliklonalny.

Pomysł Köhlera i Milsteina oparty był na następujących znanych wcześniej faktach: 1) komórki nie transformowane, m.in. również komórki produkujące przeciwciała są zdolne do przeżycia najwyżej kilku dni w hodowli *in vitro*; 2) komórki nowotworowe zdolne są do nieograniczonej replikacji *in vitro*; 3) możliwa jest fuzja komórek tych dwóch typów, przy czym powstała komórka-hybryd zawiera materiał genetyczny pochodzący z obu komórek. Köhler i Milstein przeprowadzili fuzję komórek produkujących przeciwciała z myszy immunizowanych krwinkami owczymi oraz komórek szpiczaka mysiego, aby „unieśmiertelnić” te pierwsze i uzyskać komórki-hybrydoma zdolne do nieograniczonych podziałów i nieograniczonej produkcji przeciwciał (1). Możliwość selekcji *in vitro* klonów pochodzących z jednej komórki stworzyła możliwość uzyskania

linii hybrydoma produkujących tylko jedno przeciwciało nazwane monoklonalnym. Technika ta również nie była wolna od różnych problemów i trudności metodycznych i po opublikowaniu pierwszych prac przez Köhlera i Milsteina (1, 2) była przedmiotem dalszych badań w licznych laboratoriach. Doprowadziło to do opracowania wielu modyfikacji i ulepszeń każdego z etapów tej metody (3—9). Tutaj ograniczę się jedynie do podania podstawowych zasad produkcji przeciwciał monoklonalnych metodą hybrydoma w wersji najczęściej stosowanej.

Pierwszym etapem jest szczepienie antygenem myszy szczepu wsobnego, najczęściej BALB/c. Następnie sporządza się zawiesinę komórek śledziony immunizowanej myszy (bogata w komórki produkujące przeciwciała) i komórki te poddaje się fuzji z komórkami szpiczaka mysiego w obecności glikolu polietylenowego (najczęściej stosowany jest PEG-1000 lub PEG-1500). Procedura fuzji jest bardzo prosta: komórki śledziony miesza się z komórkami szpiczaka i po odwirowaniu zawiesza się je w 30—50⁰/o PEG. Zawiesinę tę miesza się łagodnie i po krótkim odwirowaniu przy niskich obrotach komórki zawiesza się w odpowiedniej pożywce zapewniającej selektywny wzrost hybrydów. Jest to warunkiem koniecznym, ponieważ fuzji ulega tylko bardzo mała część komórek, które w zwykłej pożywce szybko zostają przerosnięte przez komórki nowotworowe. W związku z tym istotnym problemem jest dobór odpowiedniej linii szpiczaka. Komórki jej przede wszystkim nie powinny produkować własnych immunoglobulin, muszą też spełniać pewne kryteria metaboliczne umożliwiające selekcję wzrostu hybrydów po fuzji.

Główne drogi biosyntezy puryn i pirymidyn w komórce są blokowane przez aminopterynę, antagonistę kwasu foliowego. Jednakże komórka może syntezować DNA w obecności aminopteryny przez tzw. „szlak ratunkowy”, umożliwiającą wykorzystanie dostarczonych gotowych zasad purynowych i pirymidynowych, z udziałem dwóch kluczowych enzymów: kinazy tymidynowej (TK) i fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HGPRT). A zatem komórki zawierające oba wymienione enzymy mogą syntezować DNA w środowisku zawierającym aminopterynę, pod warunkiem jednoczesnego dostarczenia im tymidyny i hipoksantyny (pożywka HAT), natomiast komórki, które nie posiadają choćby jednego z wymienionych enzymów giną w pożywce HAT. Takie defektywne komórki mogą być z kolei „uratowane” przez fuzję z komórką posiadającą brakujący enzym. Jeżeli więc komórki immunizowanych myszy (zawierające TK i HGPRT, ale nietrwałe *in vitro*) ulegną fuzji z komórkami szpiczaka nie zawierającymi TK lub HGPRT (nietrwałymi w pożywce HAT), to jedynie powstałe hybrydy spełniają warunki niezbędne do wzrostu w pożywce HAT. Stosunkowo łatwo można uzyskać mutanty komórek szpiczaka nie zawierające HGPRT przez selekcję w obecności tioguaniny lub azaguaniny. Związki te są wcielane do DNA za pomocą HGPRT, co prowadzi do „śmierci” komórek zawierających ten enzym i selektywnego namnażania ko-

mórek HGPRT-negatywnych. Obecnie do produkcji przeciwciał monoklonalnych stosuje się powszechnie kilka ustalonych linii szpiczaka mysiego spełniających wymagane kryteria: brak produkcji własnych immunoglobulin, wrażliwość na pożywkę HAT. Najczęściej stosowane są linie X63-Ag-8.653 i Sp2/0-Ag-14.

Namnażane początkowo w pożywce HAT nowopowstałe hybrydoma są w pierwszych pasażach niestabilne, mają między innymi tendencję do utraty chromosomów. Dlatego też zostały opracowane różne metody ich traktowania, pozwalające na wydajny wzrost hybrydoma produkujących przeciwciała. Uzyskane hybrydoma stanowią początkowo pulę poliklonalną, tzn. składają się z komórek produkujących różne przeciwciała oraz z dużej ilości komórek nie będących producentami przeciwciał. W celu selekcji tych pierwszych hoduje się komórki w małych porcjach na płytkach plastikowych przeznaczonych do hodowli komórkowych i testuje się supernatanty z tych mikrokultur na obecność przeciwciał. Niezwykle ważnym zagadnieniem przy otrzymywaniu przeciwciał monoklonalnych jest dysponowanie czułym i prostym w wykonaniu testem, który umożliwi szybkie sprawdzenie kilkudziesięciu, czy nawet kilkuset próbek. Jest to bardzo istotne, gdyż komórki rosną nie czekając na rozwiązanie ewentualnych problemów testowych i trzeba szybko (w ciągu kilku godzin) podjąć decyzje co do dalszych kroków. Najczęściej stosowanymi testami są hemaglutynacja (przy otrzymywaniu przeciwciał przeciw antygenom erytrocytarnym), immunofluorescencja komórkowa, testy radioimmunologiczne i immunoenzymatyczne w stałej fazie.

Po wstępnym wydzieleniu komórek produkujących przeciwciała przeprowadza się selekcję klonów wywodzących się z pojedynczych komórek. Wykonuje się to najczęściej na takich samych płytkach, stosując tzw. „graniczne rozcieńczenie” zawiesiny komórek, tzn. rozcieńczenie zapewniające, że liczba zdolnych do wzrostu komórek obecnych w jednym wgłębieniu nie jest większa od 1. Wyselekcjonowane klony produkujące przeciwciała o interesującej nas swoistości poddaje się dalszemu subklonowaniu w celu upewnienia się o ich monoklonalnym charakterze, po czym przystępuje się do ich namnażania na dużą skalę. Wykonuje się to albo w hodowli *in vitro*, lub przez wzrost klonu *in vivo* w myszach zgodnych antygenowo (tego samego szczepu) z myszami użytymi do immunizacji. Komórki podaje się myszom dootrzewnowo i pozwala się na wzrost nowotworu, czemu często towarzyszy powstanie wysięku. Jako źródła przeciwciał używa się wysięku, lub przy jego braku — surowicy tych myszy. Produkcja przeciwciał monoklonalnych *in vivo* jest mniej kosztowna (nie trzeba stosować drogich pożywek i płodowej surowicy cielęcej) i bardziej wydajna. Ilości przeciwciał otrzymywane w supernatantach z hodowli *in vitro* wynoszą 10—100 µg/ml, podczas gdy 1 ml płynu wysiękowego zawiera zwykle kilka do kilkunastu miligramów przeciwciał. Klony komórek hybrydoma produkujących przeciwciała przy prawidłowym ich traktowaniu są „nieśmiertelne”, można je

pasażować w sposób nieograniczony, a również przechowywać w stanie zamrożonym.

Rutynowa charakterystyka przeciwciał monoklonalnych obejmuje nie tylko określenie ich swoistości immunologicznej, ale też oznaczenie typu ich łańcuchów ciężkich (IgM, IgG1, IgG2, IgA) i lekkich (κ , λ) za pomocą swoistych mysich przeciwciał anty-immunoglobulinowych. Znajomość klasy przeciwciała monoklonalnego jest ważna, gdyż często jego wiązanie z antygenem wykrywa się pośrednio, stosując odczynnik reagujący z tym przeciwciałem, np. przeciwciało anty-mysie IgG lub anty-mysie IgM, albo białko A ze *Staphylococcus aureus* reagujące z fragmentem Fc immunoglobulin klasy IgG, ale nie IgM. Ponadto, stwierdzenie tylko jednego typu łańcucha ciężkiego i lekkiego jest świadectwem monoklonalności przeciwciała. Przeciwciała zawarte w płynie wysiękowym lub w supernatancie z hodowli *in vitro* można w razie potrzeby oczyścić za pomocą znanych metod oczyszczania immunoglobulin lub przez chromatografię powinowactwa na unieruchomionych antygenach. Popularną metodą oczyszczania przeciwciał monoklonalnych klasy IgG jest chromatografia powinowactwa na wspomnianym już białku A sprzężonym z *Sepharose 4B*.

Technika otrzymywania przeciwciał monoklonalnych stanowi przełom w badaniach biologicznych. Rewelacją tej metody jest możliwość otrzymania przeciwciała wobec jednego określonego determinantu antygenowego bez potrzeby oczyszczania antygeny. W przypadku wielu wyprodukowanych dotąd przeciwciał monoklonalnych sprecyzowano już dokładnie strukturę, jaką one rozpoznają, ale w przypadku jeszcze większej ich liczby znana jest jedynie makrocząsteczka, z którą one reagują, lub tylko komórki na których jest obecny nie scharakteryzowany dotąd antygen. Przy stosowaniu przeciwciała monoklonalnego ważne jest uświadomienie sobie, że nie jest ono swoiste wobec makrocząsteczki antygeny w takim sensie jak swoista jest surowica poliklonalna zawierająca wiele przeciwciał specyficznych dla różnych determinantów antygeny, ale jest to jedno z przeciwciał obecnych w surowicy poliklonalnej, swoiste tylko wobec małego fragmentu makrocząsteczki danego antygeny.

Przeciwciało monoklonalne nie precypituje antygeny posiadającego jeden determinant antygenowy w cząsteczce, precypitacja może zajść jedynie w przypadku „poliwartościowego” antygeny, tzn. zagregowanego lub spolimeryzowanego. Z tego powodu do testowania przeciwciał monoklonalnych nie stosuje się powszechnych dotąd licznych metod opartych na precypitacji w żelu czy w roztworze. Najczęściej stosowanymi metodami jest śledzenie ich reakcji z antygenem związanym ze stałą fazą.

W badaniach biochemicznych najkorzystniejsze jest stosowanie przeciwciał monoklonalnych o zdefiniowanej swoistości. Podkreślić przy tym należy, że zidentyfikowanie w cząsteczce antygeny determinantów specyficznych dla indywidualnych przeciwciał monoklonalnych jest łatwiejsze i znacznie precyzyjniejsze niż w przypadku surowicy poliklonalnej. Dyspo-

nowanie homogennym układem antygen-przeciwciało monoklonalne pozwala też na bardziej dokładne dalsze badania immunochemiczne, między innymi możliwe jest wyznaczanie ilościowych parametrów reakcji antygen-przeciwciało, stałej powinowactwa, liczby determinantów w cząsteczce antygeny. Stwierdzenie wiązania dwóch lub więcej cząsteczek przeciwciała monoklonalnego z jedną cząsteczką antygeny wskazuje na strukturę podjednostkową antygeny lub homologię strukturalną między różnymi fragmentami jego cząsteczki. Za pomocą przeciwciał monoklonalnych można też śledzić zmiany konformacyjne cząsteczki antygeny zachodzące pod wpływem czynników fizycznych, chemicznych, lub też allosterycznych efektów.

Częste było stosowanie surowic poliklonalnych do określania stopnia podobieństwa immunologicznego, będącego wyrazem podobieństwa strukturalnego między różnymi makrocząsteczkami, np. tego samego enzymy pochodzącego z różnych źródeł. Stosowane metody pozwalały z mniejszą lub większą dokładnością określić, jak duża część przeciwciał z surowicy przeciw jednemu antygenowi reaguje z drugim antygenem. Wnioskowanie o podobieństwie różnych antygenów na podstawie reakcji z przeciwciałem monoklonalnym jest inne niż w przypadku surowicy poliklonalnej. Przeciwciało monoklonalne anty-X może nie wykazać żadnej reakcji z antygenem Y o bardzo zbliżonej budowie, jeżeli różni się on od X jednym nawet tylko determinantem antygenowym, co może stanowić różnicę jednej reszty aminokwasowej lub być efektem różnej potranslacyjnej modyfikacji. Z drugiej strony, identyczna reakcja przeciwciała monoklonalnego z dwoma antygenami może zachodzić w sytuacji odwrotnej, kiedy te antygeny są niemal całkowicie różne i mają tylko mały fragment cząsteczki jednakowy. Przykładem sytuacji pierwszej mogą być przeciwciała monoklonalne anty-M i anty-N, reagujące swoiście z glikoforyną A erytrocytów ludzkich grupy M lub N, przy czym oba typy glikoforyny A różnią się tylko dwiema resztami aminokwasowymi (10). Interesującą ilustracją drugiej sytuacji są przeciwciała monoklonalne otrzymane przez immunizację myszy oczyszczonym receptorem naskórkowego czynnika wzrostu. Receptor ten jest glikoproteidem wydzielonym z komórek linii A431 ludzkiego nowotworu skóry. Okazało się, że kilka przeciwciał monoklonalnych otrzymanych w różnych laboratoriach reagowało z tym receptorem na zasadzie rozpoznawania różnych struktur oligosacharydowych typowych dla poszczególnych determinantów układu grupowego krwinek AB0-Lewis (11). Ponieważ te łańcuchy oligosacharydowe nie mają związku z funkcją receptora a są obecne i wykrywalne przez przeciwciała anty-receptor w wielu innych glikoproteidach i glikolipidach, otrzymane przeciwciała monoklonalne nie są swoiste dla receptora. Jednakże ściśle zdefiniowanie swoistości tych przeciwciał pozwoliło na wykrycie określonych struktur oligosacharydowych w cząsteczkach receptora. Przykład powyższy ilustruje, że przeciwciało monoklonalne reagujące z makrocząsteczką może roz-

poznawać w niej fragment, który nie jest charakterystyczny dla danego antygeny.

Z wymienionych wyżej powodów stosowanie jednego przeciwciała monoklonalnego do oczyszczania, wykrywania lub oznaczania antygeny w materiale biologicznym jest czasem niewystarczające, gdyż można nie wykryć antygeny, o który nam chodzi, jeśli ma on zmieniony mały szczegół budowy, lub też można wykryć antygen niezależny, który zawiera determinant antygenowy charakterystyczny dla użytego przeciwciała. Z tych względów często sporządza się preparaty zawierające mieszaninę kilku przeciwciał monoklonalnych skierowanym przeciwko różnym determinantom danego antygeny.

Oprócz dużych usług, jakie oddają przeciwciała monoklonalne w oczyszczaniu, wykrywaniu, oznaczaniu ilościowym i charakterystyce strukturalnej antygenów znanych i częściowo lub nawet całkowicie chemicznie scharakteryzowanych, jeszcze większa jest chyba rola tych przeciwciał w badaniach antygenów dotąd nieoczyszczonych i o nieznannej budowie, lub w wykrywaniu i charakterystyce nowych antygenów.

Często zdarza się sytuacja, kiedy wiemy o obecności w błonie komórkowej lub innym materiale biologicznym interesującej nas substancji, której z różnych przyczyn nie możemy oczyścić i chemicznie scharakteryzować. Dotyczy to najczęściej substancji występujących w małych ilościach, np. niektórych antygenów grupowych, receptorów hormonalnych itp. Otrzymanie przeciwciała monoklonalnego swoistego wobec takiej substancji stwarza możliwość nie tylko jej wykrycia lub oznaczenia, ale też jej oczyszczenia przez immunopowinowactwo i charakterystykę strukturalną. Jednakże, immunizacja myszy heterogennym materiałem (np. całymimi komórkami) daje największe prawdopodobieństwo otrzymania przeciwciał monoklonalnych przeciw antygenom obecnym w największych ilościach, czy też najbardziej immunogennych i próby wydzielenia linii hybrydoma produkującej przeciwciała o pożądanej swoistości kończą się niejednokrotnie niepowodzeniem. Dlatego też dla zwiększenia szansy otrzymania przeciwciała specyficznego wobec określonego składnika mieszaniny stosuje się jego częściowe oczyszczenie, dające zwiększenie „stężenia” tego składnika w próbce i częściowe przynajmniej oddzielenie od antygenów immunodominujących. W tym celu zaproponowano też tzw. „metodę kaskadową” (12). Polega ona na szczepieniu myszy np. pełnym ekstraktem błon komórkowych, wyczerpującej absorpcji tego ekstraktu przy użyciu otrzymanych przeciwciał monoklonalnych oraz kolejnym szczepieniu myszy wyabsorbowanym ekstraktem. Procedurę tę można powtarzać kilkakrotnie. Stosując ją otrzymano przeciwciała monoklonalne specyficzne dla kilku antygenów występujących w małych ilościach w błonach makrofagów.

Przykładem wykrywania nieznanych dotąd antygenów za pomocą przeciwciał monoklonalnych mogą być badania nad komórkami nowotwo-

rowymi. Wiadomo, że transformacja nowotworowa prowadzi do zmian w składnikach powierzchniowych komórki, lub też przez komórkę wydzielanych. Poszukiwania antygenów nowotworowych, tzn. substancji pojawiających się lub produkowanych w zwiększonych ilościach w wyniku transformacji nowotworowej prowadzone były od wielu lat i doprowadziły do wykrycia różnych markerów tej transformacji. Badania te zaczęły jednak być prowadzone na nieporównywalnie większą skalę za pomocą przeciwciał monoklonalnych (13). Najczęściej stosowane podejście metodyczne polega na immunizacji myszy komórkami określonego nowotworu i testowaniu przeciwciał wobec odpowiednio dobranego zestawu komórek nowotworowych i normalnych. Z otrzymanych przeciwciał wybiera się do produkcji i badań te, które wykazują interesujący profil aktywności, np. reagują tylko z komórkami jednego typu nowotworu, lub z większością komórek nowotworowych, przy braku reakcji z komórkami normalnymi. Następnym etapem jest zwykle próba identyfikacji antygeny, jaki dane przeciwciało rozpoznaje. Przeprowadza się to różnymi metodami, najczęściej frakcjonuje się błony komórek nowotworowych przez elektroforezę w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS, lub rozdziela się składniki lipidowe przez chromatografię cienkowarstwową, po czym lokalizuje się antygen za pomocą przeciwciała, stosując technikę radioimmunologiczną lub immunoenzymatyczną. Badania tego typu doprowadziły do wykrycia wielu nowych markerów nowotworowych, zwłaszcza charakterystycznych dla czerniaka i nowotworów przewodu pokarmowego. Wiele przeciwciał monoklonalnych rozpoznawało struktury oligosacharydowe glikolipidów komórek nowotworowych, niektóre z nich dotąd nieznanne, a inne znane, ale nie nietypowe dla tkanki, w której jest zlokalizowany nowotwór, lub występujące w znacznie większej ilości w tkance nowotworowej niż normalnej. Możliwość oczyszczania antygenów za pomocą przeciwciał monoklonalnych pozwala oczekiwać, że lista strukturalnie scharakteryzowanych markerów nowotworowych będzie się zwiększać. Podobne podejście metodyczne stosuje się do identyfikacji antygenów różnicowania komórek, np. markerów limfocytów T i B, granulocytów, subpopulacji komórek o różnych funkcjach, czy też o różnym stopniu dojrzałości (14).

Dla pełniejszego obrazu należy dodać, że użyteczność przeciwciał monoklonalnych nie ogranicza się do badań nad antygenami, ale stwarzają one też nowe perspektywy badań struktury immunoglobulin. Badania takie były dotąd ograniczone przez heterogenność tych białek. Technika hybrydoma daje możliwość otrzymania nieograniczonych ilości homogennego preparatu immunoglobuliny, w którym wszystkie cząsteczki mają taką samą budowę, nie tylko w części stałej (ten sam typ łańcucha ciężkiego i lekkiego), ale i w części zmiennej, wiążącej antygen. Otrzymywanie wielu takich preparatów z określoną swoistością wobec antygenów różnego typu stwarza szczególnie korzystne warunki do badania budowy miejsca

wiązającego przeciwciał i zależności jego struktury od charakteru determinantu antygenowego, jaki dane przeciwciało rozpoznaje.

Oprócz ogromnego znaczenia przeciwciał monoklonalnych dla rozwoju badań podstawowych nie mniej ważne jest ich szerokie stosowanie praktyczne w diagnostyce klinicznej, serologii i innych dziedzinach. Technika hybridoma ożywiła wcześniejsze idee terapeutycznego stosowania przeciwciał i ich używania do diagnostyki *in vivo*. W związku z tym czynione są ciągle usiłowania opracowania skutecznych metod produkcji ludzkich przeciwciał monoklonalnych, z wykorzystaniem komórek produkujących przeciwciała od pacjentów z różnymi schorzeniami lub po nie zamierzonej immunizacji (15). Liczba publikacji, w których opisuje się otrzymywanie lub wykorzystywanie przeciwciał monoklonalnych rośnie w sposób gwałtowny, powstało też czasopismo im poświęcone pt. *Hybridoma*. W tej sytuacji trudno jest nawet wymienić wszystkie aktualne zagadnienia związane z tym tematem w zaprezentowanym tu krótkim przeglądzie, którego celem było jedynie bardzo ogólne naszkicowanie zasad, na których oparta jest produkcja przeciwciał monoklonalnych, oraz możliwości, jakie ich stosowanie stwarza w badaniach biochemicznych.

Zaakceptowano do druku 11 czerwca 1985 r.

PIŚMIENICTWO

1. Köhler G., Milstein C., (1975), *Nature* (London), **256**, 495—497.
2. Köhler G., Milstein C., (1976), *Eur. J. Immunol.* **6**, 511—519.
3. Fazekas de S., Groth S., Scheidegger D., (1980), *J. Immunol. Meth.* **35**, 1—21.
4. Goding J. W., (1980), *J. Immunol. Meth.* **39**, 285—308.
5. Yelton D. E., Scharff M. D., (1981), *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 657—680.
6. Galfré G., Milstein C. (1981), *Methods in Enzymology*, red. Langone J. J. i Van Vunakis H., str. 1—46, Academic Press.
7. Redding C. L., (1982), *J. Immunol. Meth.* **53**, 261—291.
8. Lefkovits I., Waldmann H., (1984), *Immunology To-Day*, **5**, 265—268.
9. Westerwoudt R. J., (1985), *J. Immunol. Meth.* **77**, 181—196.
10. Waśniowska K., Reichert C. M., McGinnis M., Schroer K. R., Zopf D., Lisowska E., Messeter L., Lundblad A., Glycoconjugate J., w druku.
11. Childs R. A., Gregorin M., Scudder P., Thorpe S. J., Rees A. R., Feizi T., (1984), *EMBO J.* **3**, 2227—2233.
12. Springer T. A., (1981), *J. Biol. Chem.* **256**, 3833—3839.
13. Reisfeld R. A., Harper J. R., Bumol T. F., (1984), *CRC Crit. Rev. Immunol.* **5**, 27—54.
14. Eisenbarth G. S., (1981), *Analyt. Biochem.* **111**, 1—16.
15. Kozbor D., Roder J. C., (1983), *Immunology To-Day*, **4**, 72—79.

JACEK KUŹNICKI *

Fosforylacja miozyny *in vivo* i *in vitro*

Myosin phosphorylation *in vivo* and *in vitro*

Spis treści

Część 1. Miozyna komórek niemięśniowych

- I. Wstęp
- II. Budowa i właściwości miozyny
- III. Metodyka badań fosforylacji miozyny
- IV. Fosforylacja miozyny izolowanej z niektórych Protista
 - IV-1. Miozyna z *Acanthamoeba castellani*
 - IV-2. Miozyna z *Physarum polycephalum*
 - IV-3. Miozyna z *Dictyostelium discoideum*
- V. Fosforylacja miozyny izolowanej z komórek niemięśniowych ssaków
 - V-1. Miozyna z komórek białaczki szpikowej
 - V-2. Miozyna z limfocytów, makrofagów i mózgu
 - V-3. Miozyna z grasicy, tarczycy i płytek krwi
- VI. Podsumowanie

Contents

Part 1. Myosin of nonmuscle cells

- I. Introduction
- II. Myosin structure and properties
- III. Methods
- IV. Phosphorylation of myosin isolated from some Protista
 - IV-1. Myosin from *Acanthamoeba castellani*
 - IV-2. Myosin from *Physarum polycephalum*
 - IV-3. Myosin from *Dictyostelium discoideum*
- V. Phosphorylation of myosin isolated from mammalian nonmuscle cells
 - V-1. Myosin from myeloid leukaemia cell line (M1)
 - V-2. Myosin from lymphocytes, macrophages and brain
 - V-3. Myosin from thyroid, thymus and platelets
- VI. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: γ -S-ATP — adenozyνο-5-O-(tiotrójfosforan).

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

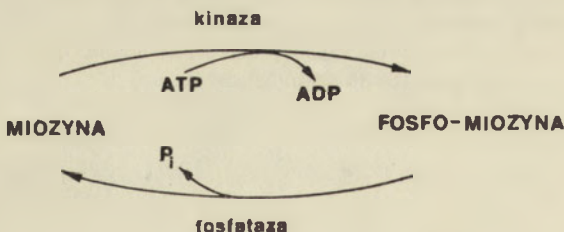
I. Wstęp

Różnorodność zjawisk ruchowych organizmów jednokomórkowych i tkankowych sprowadza się na poziomie molekularnym do działania kilku zaledwie układów (art. przegląd. 1—3). Dwa z nich mają największe znaczenie: układ tubuliny z dyneiną i aktyny z miozyną.

Układ aktomiozynowy występuje powszechnie, a aktyna stanowi główny składnik białkowy komórek eukariotycznych (art. przegląd. 1, 4—6). Jej struktura pierwszorzędowa i właściwości są tak bardzo podobne niezależnie od pochodzenia, że uważa się aktynę za jedno z bardziej konserwatywnych białek (art. przegląd. 7, 8). Miozyna natomiast wykazuje duże zróżnicowanie pod względem sekwencji aminokwasów, jednakże zasadnicze właściwości i cechy struktury są podobne (9, art. przegląd. 10—12).

Współdziałanie aktyny z miozyną warunkuje ruchy amebowe, przepływ cytoplazmy i inne ruchy wewnątrzkomórkowe, cytokinezę oraz skurcz mięśni (art. przegląd. 1, 4, 13). Interakcja tych białek jest pod kontrolą układów regulujących wrażliwych na zmiany stężenia jonów wapnia (art. przegląd. 6, 14—16). Ze względu na miejsce przyłączenia i oddziaływania rozróżnia się dwa rodzaje układów regulujących: związane z aktyną lub związane z miozyną (art. przegląd. 14, 16—20). Najbardziej rozpowszechnionym układem w grupie pierwszej jest kompleks troponina-tropomiozyna, a w drugiej — układ kinazy i fosfatazy miozyny, który kowalencyjnie i odwracalnie fosforyluje miozynę. Fosforylacja miozyny ma miejsce we wszystkich komórkach z wyjątkiem mięśni niektórych mięczaków. W zależności od organizmu i rodzaju komórek fosforylacji ulegają różne podjednostki miozyny, a bezpośredni wpływ takiej modyfikacji na miozynę jest niejednakowy (Ryc. 1).

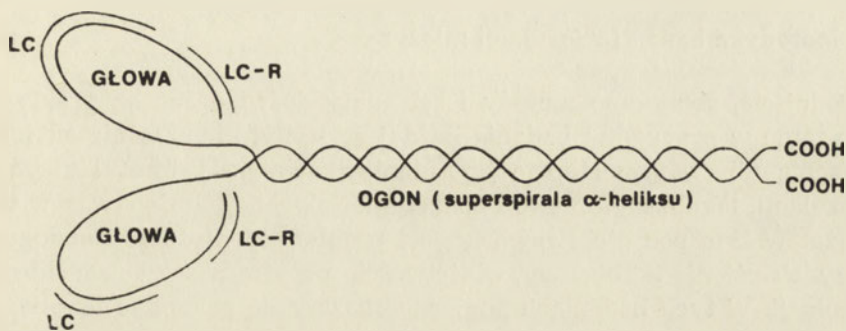
Moim zamierzeniem jest zebranie, uporządkowanie i synteza dostępnych danych na temat wpływu fosforylacji na strukturę i funkcję miozyny komórek niemięśniowych eukariontów. W następnym artykule, w podobnym ujęciu, przedstawiona zostanie fosforylacja miozyny mięśniowej. Głównym celem obu opracowań syntetycznych jest sformułowanie ogólnej hipotezy na temat roli fosforylacji w regulacji aktywności układów aktomiozynowych.



Ryc. 1. Fosforylacja miozyny.

II. Budowa i właściwości miozyny

Miozyna jest heksamerem, składającym się z dwóch polipeptydów o masie cząsteczkowej 180 000 * do 250 000 każdy i dwóch par tzw. lekkich łańcuchów — polipeptydów o masach od 14 000 do 27 000 (Ryc. 2). Jedna



Ryc. 2. Budowa cząsteczki miozyny. LC-R — lekkie łańcuchy regulatorowe; LC — lekkie łańcuchy nieregulatorowe; COOH — karboksylowe końce ciężkich łańcuchów.

para z nich to tzw. łańcuchy regulatorowe, które mogą ulegać fosforylacji i wiązać kationy dwuwartościowe. Lekkie łańcuchy drugiej pary nie mają tych właściwości (art. przegl. 10, 12). Natywna cząsteczka miozyny ma masę około 500 000 oraz kształt asymetryczny. Strukturalnie można wyróżnić w niej: dwie główki o budowie globularnej i część pałeczkowatą, zwaną ogonem. Ogon miozyny zbudowany jest z C-końcowych odcinków obu ciężkich łańcuchów, znajdujących się w konformacji α -heliksu, skręconych wokół siebie. W roztworach zawierających niskie stężenie soli, części ogonowe miozyny mają tendencję do bocznej agregacji, dzięki czemu powstają wielocząsteczkowe bipolarnie ** agregaty zwane filamentami. Takie same filamenty występują *in vivo*.

Główka miozyny zbudowana jest z N-końcowego odcinka ciężkiego łańcucha i dwóch lekkich łańcuchów: regulatorowego i nieregulatorowego. W główkach znajdują się miejsca hydrolizy ATP oraz miejsce wiązania aktyny. Niska aktywność Mg^{2+} -ATPazy miozyny wzrasta wielokrotnie w obecności filamentów aktyny. Mówi się wtedy o stymulacji ATPazy miozynowej przez aktynę, lub o aktywności ATPazy aktomiozynowej. Aktywność ta wyznacza poziom interakcji miozyny z aktyną i odzwierciedla proces zachodzący *in vivo* w czasie aktywności skurczowej.

* Z wyjątkiem wyszczególnionych przypadków, podawane masy cząsteczkowe obliczone zostały na podstawie elektroforetycznej ruchliwości białek w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS.

** Bipolarnie filamenty to podłużne agregaty cząsteczek miozyny ułożonych w taki sposób, że główki znajdują się na obu końcach filamentu.

Miozyna ma również wysokie aktywności Ca^{2+} - i K^{+} -ATPazy, które nie mają znaczenia fizjologicznego, ale są niezmiernie przydatne w badaniach biochemicznych. Umożliwiają bowiem identyfikację miozyny i ocenę aktywności centrum aktywnego w sytuacji, gdy ATPaza aktomiozynowa jest zahamowana.

III. Metodyka badań fosforylacji miozyny

Podejście, stosowane metody i schematy doświadczeń są praktycznie takie same w przypadku badania każdej miozyny, nie zależnie od jej pochodzenia. Pierwszym etapem jest identyfikacja podjednostki ulegającej fosforylacji, lokalizacja miejsc i oznaczenie sekwencji aminokwasów w ich pobliżu. W tym podejściu zawarty jest problem identyfikacji endogennej kinazy, określenie jej budowy, właściwości, specyficzności wobec substratu i regulacji. W tych badaniach pomocne okazały się pochodne fenotiazyny, które specyficznym hamują aktywność kinaz miozynowych, zależnych od kalmoduliny (art. przegl. 21, 21a). Kolejnym etapem jest badanie wpływu fosforylacji na strukturę i funkcję miozyny, najczęściej z użyciem jej form maksymalnie zdefosforylowanych i maksymalnie ufosforylowanych. Jako wyznaczniki interakcji miozyny z aktyną stosowane są pomiary aktywności ATPazy aktomiozynowej oraz zjawisko superprecypitacji. Ta ostatnia metoda to spektroskopowa analiza wzrostu zmętnienia, zachodzącego w miarę zużywania ATP przez aktomiozynę. Superprecypitacji nie obserwuje się w przypadku stosowania rozpuszczalnych fragmentów miozyny, pozbawionych części ogonowej. Fragmenty te stosowano do oznaczania stałych wiązania miozyny z aktyną, co w przypadku użycia całych cząsteczek daje niejednoznaczne wyniki ze względu na ich agregację. Zdolność miozyny do tworzenia filamentów badano przy pomocy analitycznego wirowania i mikroskopii elektronowej. W przypadku filamentów stosowano najczęściej metodę negatywowego barwienia, natomiast w przypadku monomerów i małych oligomerów — metodę napyłania obracanych preparatów.

Zmiany konformacyjne cząsteczki miozyny pod wpływem fosforylacji charakteryzuje się i lokalizuje przy użyciu metod spektroskopowych (np. pomiaru wewnętrznej fluorescencji tryptofanu), analitycznego wirowania (wyznaczanie współczynników sedimentacji i mas cząsteczkowych), pomiarów lepkości roztworów miozyny, podatności miozyny na proteolizę oraz wiązania kationów dwuwartościowych. Donorem reszt fosforanowych w procesie fosforylacji miozyny jest ATP, ale w pewnych sytuacjach korzystne jest użycie jego analogu γ -S-ATP. Związek ten dostarcza reszt tiofosforanowych przenoszonych przez kinazę na miozynę, ale tak zmodyfikowana miozyna nie może być zdefosforylowana przez fosfatazę. W ten sposób cząsteczka jest ufosforylowana nieodwracalnie.

Równoległą tematyką badań jest oznaczanie fosforylacji miozyny *in situ* i wyjaśnienie, czy proces ten jest sprzężony z cyklem skurczowym. W tym celu inkubuje się żywe komórki w obecności ^{32}P , izoluje miozynę i oznacza radioaktywność podjednostek.

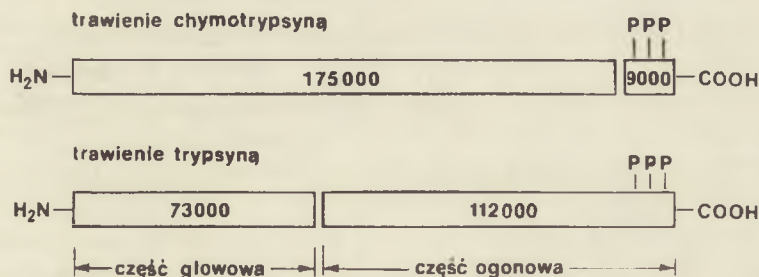
Według powyższego schematu badań opracowałem dotychczasowe wyniki o fosforylacji miozyny izolowanej z niektórych *Protista* i z różnych komórek mięśniowych, z tym, że tylko w przypadku *Acanthamoeba* liczba danych wystarczyła do pełnego omówienia wszystkich zagadnień.

Fosforylacja miozyny izolowanej z niektórych *Protista*

IV-1. Miozyna z *Acanthamoeba castellani*

W amebie *Acanthamoeba castellani* znaleziono trzy białka o właściwościach enzymatycznych, charakterystycznych dla miozyny. Dwa z nich, zwane miozyną IA i IB, mają jednak nietypową budowę i z tego względu nie będą omówione, mimo że ich ciężki łańcuch ulega fosforylacji (22, 23). Trzecie białko odkryte w kilka lat po wyizolowaniu miozyny IA i IB, to typowa miozyna, zwana miozyną II (24, 25). Częsteczkę jej tworzą: para ciężkich łańcuchów 185 000 i dwie pary lekkich łańcuchów 17 500 i 17 000. Ciężkie łańcuchy miozyny II ulegają fosforylacji, natomiast nikomu nie udało się stwierdzić fosforylacji lekkich łańcuchów, ani przy użyciu różnych frakcji z *Acanthamoeba*, ani przy użyciu kinazy lekkiego łańcucha z mięśni gładkich (25—28).

Maksymalnie ufosforylowana cząsteczka miozyny II ma 6 reszt fosforanowych, przyłączonych do reszt serynowych, po 3 na każdym ciężkim łańcuchu (28). W wyniku kontrolowanej proteolizy chymotrypsyną uzyskuje się dwa fragmenty ciężkiego łańcucha (Ryc. 3). Jeden o masie czą-



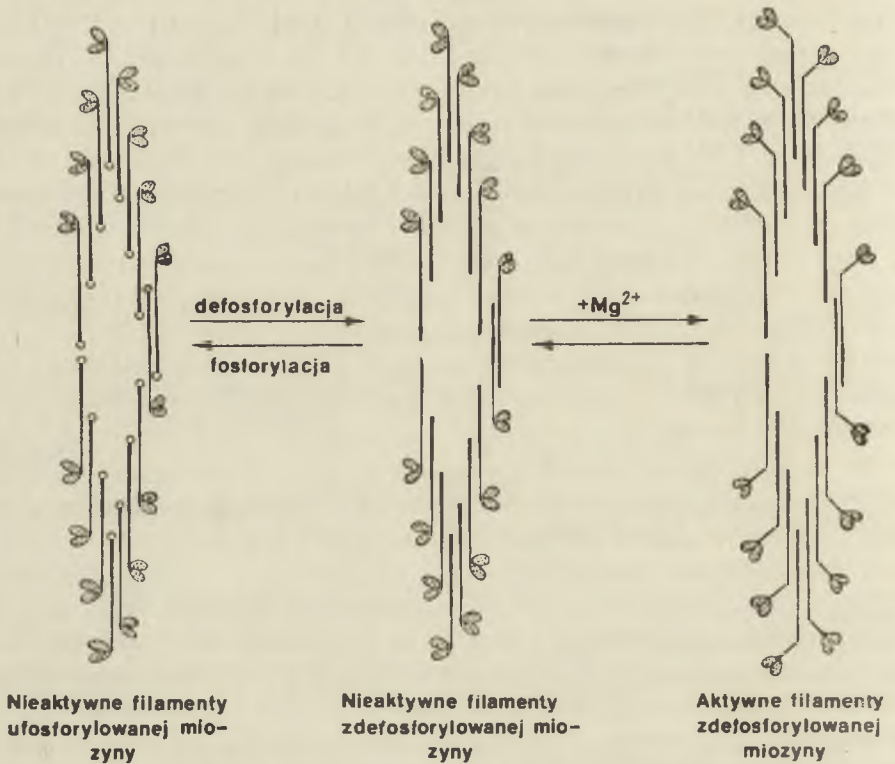
Ryc. 3. Schemat trawienia ciężkiego łańcucha miozyny II *Acanthamoeba*. P — miejsca fosforylacji (wg 29).

steczkowej około 9000, który zawiera wszystkie miejsca fosforylacji i drugi o masie 175 000, nieulegający fosforylacji. Kontrolowane trawienie trypsyną prowadzi do powstania dwóch innych fragmentów: jednego o masie 73 000, zawierającego część głowową oraz fragmentu 112 000, zawierają-

i siłę jonową. Optymalne warunki pomiaru, takie jak pH, stężenie soli i jonów magnezu, zmieniają się w zależności od stopnia ufosforylowania ciężkiego łańcucha (35). I tak np. zdefosforylowana miozyna II ma najwyższą aktywność w obecności 3 mM Mg^{2+} , podczas gdy miozyna ufosforylowana w 50% ma najwyższą aktywność dopiero w obecności 6 mM Mg^{2+} , a przy niższych stężeniach jest w ogóle nieaktywna. Innymi słowy, forma zdefosforylowana ma nie tylko wyższą specyficzną aktywność ATPazy aktomiozynowej, ale również potrzebuje niższych stężeń jonów magnezu. Stwierdzono, że wyższa aktywność zdefosforylowanej miozyny II polega na zmianie szybkości maksymalnej, a nie zmianie powinowactwa do aktyny (33). Wyniki te wskazują, że fosforylacja ciężkiego łańcucha wpływa na kinetykę procesów hydrolizy ATP, a nie na wiązanie miozyny II z aktyną.

W warunkach, w których wykonuje się pomiar aktywności ATPazy aktomiozynowej, ufosforylowana i zdefosforylowana miozyna II są w postaci filamentów różnej wielkości, nieznacznie większe są filamety nieufosforylowanej miozyny (34), które w obecności wyższych stężeń jonów magnezu różnią się bardziej. W takich warunkach ufosforylowana miozyna tworzy nadal małe filamety o stałej sedymentacji 30S, natomiast nieufosforylowana miozyna tworzy duże filamety o stałej sedymentacji ponad 100S. Nie stwierdzono jednak żadnej zależności między wielkością filamentów, a aktywnością ATPazy aktomiozynowej, gdyż małe filamety zdefosforylowanej miozyny były tak samo aktywne, jak duże (34). Filamety zbudowane ze zdefosforylowanej miozyny są mniej podatne na depolimeryzujące działanie KCl i ATP niż filamety ufosforylowanej miozyny (33). W warunkach jonowych zbliżonych do fizjologicznych, tj. w obecności 100—150 mM KCl i 1 mM $MgATP$, nieufosforylowana miozyna II tworzy małe filamety o stałej sedymentacji około 16S, natomiast ufosforylowana miozyna jest zdepolimeryzowana i ma 8S (36). Monomer miozyny II ma 5S i dotychczas nie wyjaśniono, czy struktura 8S odpowiada dimerowi, czy też monomerowi ze zgiętym ogonem, tj. konformacji tworzonej przez inne miozyny w podobnych warunkach.

Opisane powyżej właściwości miozyny II *Acanthamoeba*, nie tłumaczą, w jaki sposób ufosforylowane reszty serynowe na końcu ogona regulują aktywność ATPazy, zlokalizowaną na przeciwnym końcu cząsteczki, oddalonym o co najmniej 100 nm. Ten pozorny paradoks wyjaśnia hipoteza Korna i w s.p. o regulacji ATPazy aktomiozynowej *Acanthamoeba* na poziomie filamentów (34—38). Autorzy ci uważają, że regulacja dokonuje się poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe wewnątrz filamentów, a nie w wyniku oddziaływań w obrębie pojedynczej cząsteczki (Ryc. 5). Hipoteza ta zakłada, że filament uzyskuje aktywną, albo nieaktywną konformację, w zależności od liczby reszt fosforanowych i warunków środowiska. Punktem wyjścia hipotezy są następujące dwie przesłanki. Po pierwsze, w warunkach pomiaru ATPazy aktomiozynowej, miozyna II jest



Ryc. 5. Model regulacji ATPazy aktomiozynowej *Acanthamoeba* na poziomie filamentów wg (34—38). Kółka oznaczają ufosforylowane reszty serynowe, znajdujące się na końcach ogonów miozyny. Strukturę filamentów przedstawiono schematycznie; rzeczywiste ułożenie cząsteczek w filamencie oraz istota postulowanych zmian konformacyjnych nie są znane.

zawsze w postaci filamentów co wyklucza bezpośredni kontakt między główką a ogonem tej samej cząsteczki (34). Po drugie, cząsteczki ufosforylowane hamują aktywność cząsteczek zdefosforylowanych i to tylko wtedy, gdy znajdują się wewnątrz jednego filamentu, co wskazuje na oddziaływanie między nimi (34, 35, 37). Dodatkowych argumentów na rzecz powyższej hipotezy dostarcza analiza właściwości miozyny II, pozbawionej przy pomocy chymotrypsyny odcinka ciężkiego łańcucha, zawierającego miejsca ulegające fosforylacji (por. ryc. 3) (38). Miozyna taka wiąże aktynę z normalną stałą powinowactwa, ma niestrawione lekkie łańcuchy i nieknięte centrum aktywne, co wyraża się między innymi tym, iż aktywność Ca^{2+} - i K^{+} -ATPazy są na niezmiennym poziomie. Mimo to, Mg^{2+} -ATPaza takiej miozyny nie jest aktywowana przez aktynę i, jak się okazało, równoległe z utratą aktywności ATPazy aktomiozynowej zanika zdolność do tworzenia filamentów. W obecności jonów magnezu fragment miozyny otrzymany w wyniku trawienia chymotrypsyną tworzy małe jednopolarne oligomery. Obserwacje te wskazują, że końcowy fragment części ogonowej

ciężkiego łańcucha miozyny II, zawierający miejsca fosforylacji, jest niezbędny zarówno dla polimeryzacji, jak i aktywności ATPazy aktomiozynowej. Sugeruje to, że zdolność miozyny do tworzenia filamentów i aktywność ATPazowa są ze sobą sprzężone (38). Obserwacje te zostały potwierdzone przez Kieharta i Pollarda (39), którzy wykazali, że depolimeryzacja filamentów miozyny II za pomocą przeciwciał monoklonalnych, wiążących się z końcową częścią ogona miozyny, prowadzi do zahamowania aktywacji ATPazy miozynowej przez aktyne.

IV-2. Miozyna z *Physarum polycephalum*

Miozyna izolowana z plazmodium śluzowca *Physarum polycephalum* składa się z pary ciężkich łańcuchów o masie cząsteczkowej 250 000 i dwóch par lekkich łańcuchów (40). Ciężkie łańcuchy tej miozyny ulegają fosforylacji, natomiast lekkie łańcuchy nie są fosforylowane ani przez frakcje białkowe z *Physarum* ani przez kinazę z mięśni gładkich (41). Preparaty aktomiozyny z *Physarum* zawierają kalmodulinę (42, 43), oraz kinazę fosforylującą ciężki łańcuch miozyny (41). Przy użyciu ATP uzyskano włączenie 0.2—0.3 mola fosforanu na mol ciężkiego łańcucha, a przy użyciu γ -S-ATP około 1 mola/mol łańcucha. Niepełna fosforylacja w obecności ATP jest wynikiem rozkładania go w czasie inkubacji przez ATPazę aktomiozynową lub defosforylacji miozyny przez endogenną fosfatazę. Większość badań została wykonana przy użyciu tiofosforylowanej miozyny — nie stwierdzono jednak różnic we właściwościach cząsteczek tiofosforylowanych i ufosforylowanych. Zdefosforylowaną miozynę otrzymywano przy użyciu kwaśnej fosfatazy ziemniaka. Stopień ufosforylowania ciężkiego łańcucha miozyny *Physarum* wpływa na aktywność ATPazy aktomiozynowej, przebieg superprecypitacji oraz zdolność tworzenia filamentów (41). Forma zdefosforylowana jest praktycznie nieaktywna i niezdolna do superprecypitacji, natomiast aktywność formy tiofosforylowanej jest prawie 8-krotnie aktywowana przez aktyne i winosi 0.06 μ mola/min i mg białka. Obie formy miozyny (41) miały taką samą aktywność Ca^{2+} -ATPazy. W roztworach o wysokiej sile jonowej (0.5 M KCl) ufosforylowana i zdefosforylowana miozyna *Physarum* występuje w postaci monomerów. W trakcie filtracji na sitach molekularnych monomery tiofosforylowanej miozyny i ufosforylowanej miozyny migrują szybciej niż monomery zdefosforylowanej miozyny, co sugeruje, że te ostatnie mają bardziej zwartą strukturę. Potwierdzeniem tego są obrazy w mikroskopie elektronowym, z których wynika, że część ogonowa cząsteczki zdefosforylowanej jest bardziej giętka, niż ogon cząsteczki tiofosforylowanej (i ufosforylowanej) (44). Większa giętkość przejawia się w tym, że więcej cząsteczek ma zgięte części ogonowe w 1/3 długości od końca oraz w tym, że kąt wygięcia jest znacznie większy (Ryc. 6). Na ogół części ogonowe zdefosforylowanych monomerów są wygięte pod kątem większym od 120°. W roztworach za-



Ryc. 6. Wpływ fosforylacji ciężkiego łańcucha miozyny *Physarum* na jej polimeryzację. Ogon monomerów jest zgięty w 1/3 długości najczęściej pod kątem ponad 120° . W dimerach, oligomerach i filamentach ogon jest wyprostowany (wg 44).

wierających jony magnezu i niskie stężenie KCl, tylko tiofosforylowana i ufosforylowana miozyna tworzy bipolarnie filamenty. W tych samych warunkach środowiska zdefosforylowana miozyna występuje w 75% w postaci monomerów i dimerów, a w pozostałej części — oligomerów (44). Dimery i oligomery zdefosforylowanej miozyny są jednopolarne, tzn. wszystkie głowy znajdują się na jednym końcu, a ogony na drugim i wyglądają tak, jak bukiet kwiatów. W dimerach i oligomerach części ogonowe cząsteczek miozyny są wyprostowane, natomiast w monomerach są zgięte w charakterystyczny sposób (44). Powyższe obserwacje wskazują, że strukturalne i enzymatyczne właściwości zdefosforylowanej miozyny są różne od właściwości ufosforylowanej miozyny *Physarum*. Na szczególną uwagę zasługuje to, iż w warunkach pomiaru ATPazy aktomiozynowej tylko forma aktywna (ufosforylowana) tworzy filamenty (Ryc. 6). W tych warunkach zdefosforylowana miozyna nie może utworzyć przeciwrównoległych połączeń między cząsteczkami, co jest warunkiem powstania bipolarnych filamentów (por. właściwości miozyny II *Acanthamoeba* trawionej chymotrypsyną, str. 22). Sugeruje to, iż fosforylacja zachodzi w miejscu ciężkiego łańcucha, które uczestniczy w takich połączeniach, a więc blisko końca ogona, brak jest jednak danych na ten temat.

IV-3. Miozyna z *Dictyostelium discoideum*

Miozyna izolowana z ameby *Dictyostelium discoideum* składa się z pary ciężkich łańcuchów o masie cząsteczkowej 210 000 i dwóch par lekkich łańcuchów — 18 000 i 16 000 (art. przegl. 45). Zarówno ciężki łańcuch, jak i łańcuch 18 000, ulegają fosforylacji *in vivo*, co stwierdzono hodując amebę na pożywce, zawierającej radioaktywny fosforan (46, 47). Wyizolowana z takiej hodowli miozyna ma około 0.25 mola fosforanu na mol ciężkiego łańcucha i 0.1 mola fosforanu na mol lekkiego łańcucha. W ekstraktach *Dictyostelium* zidentyfikowano kinazy odpowiedzialne za fosforylację obu rodzajów łańcuchów.

Stosując preparaty częściowo oczyszczonej kinazy ciężkiego łańcucha otrzymano miozynę zawierającą 2 mole fosforanu na mol miozyny, a przy użyciu bakteryjnej fosfatazy alkalicznej otrzymano maksymalnie zdefosforylowaną miozynę. W obu przypadkach stopień ufosforylowania lekkiego łańcucha pozostawał bez zmian.

Fosforylacja ciężkiego łańcucha miozyny *Dictyostelium* wpływa na aktywność Mg^{2+} -ATPazy aktomiozynowej oraz na stabilność filamentów. Aktywność Ca^{2+} -ATPazy obu form miozyny jest podobna, natomiast aktywność Mg^{2+} -ATPazy aktywowanej aktyną miozyny zdefosforylowanej jest prawie 3-krotnie wyższa niż aktywność formy ufosforylowanej i wynosi 0.25 μ mola/min. i mg białka (47). W roztworach zawierających 25—75 mM KCl zdefosforylowana miozyna jest spolimeryzowana prawie w 100% podczas gdy ufosforylowana — tylko w 60%, nie badano jednak szczegółowo tego zjawiska (47). Nie wyjaśniono więc, czy niejednakowa rozpuszczalność wynika z różnej wielkości filamentów, tworzonych przez obie formy miozyny, czy też z depolimeryzacji ufosforylowanej miozyny.

Przy użyciu chymotrypsyny przecięto w połowie ciężki łańcuch miozyny *Dictyostelium* i otrzymano dwa różne fragmenty o podobnej masie cząsteczkowej — około 105 000 (48, art. przegl. 49) (Ryc. 7). Jeden z nich



Ryc. 7. Schemat trawienia ciężkiego łańcucha miozyny *Dictyostelium* trypsyną. P? oznacza miejsce fosforylacji, którego dokładna lokalizacja we fragmencie nie jest znana (48).

pochodzi z części ogonowej cząsteczki i tworzy w roztworach o niskiej sile jonowej, agregaty podobne do filamentów miozyny ale nie zawierające wypustek głowowych. Fragment ten zawiera resztę serynową, która ulega fosforylacji *in vivo* i *in vitro* (48). Drugi fragment ciężkiego łańcucha połączony jest z lekkimi łańcuchami i zawiera centrum aktywne i miejsce

wiązania aktywy. Fragment ten wykazuje aktywność ATPazy aktomiozynowej tylko nieznacznie niższą od aktywności natywnej miozyny. Aktywność tę obserwowano jednak w obecności 12-krotnie wyższych stężeń aktywy, niż w przypadku nietrawionej cząsteczki.

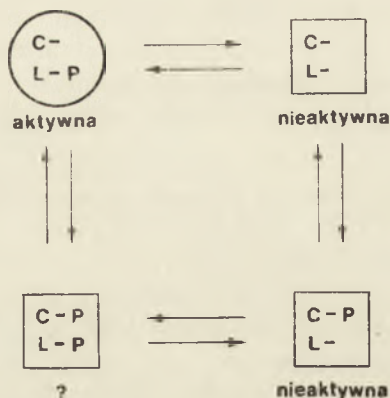
Mechanizm regulacji aktywności ATPazy aktomiozynowej przez fosforylację ciężkiego łańcucha miozyny *Dictyostelium* jest nieznan. Może on, tak jak w przypadku miozyny z *Acanthamoeba* również polegać na oddziaływaniach międzycząsteczkowych wewnątrz filamentów, ponieważ miejsce fosforylacji znajduje się w części ogonowej. Dopóki jednak nie zostanie poznany wpływ fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny z *Dictyostelium* i dopóki miejsce fosforylacji ciężkiego łańcucha nie będzie dokładnie zlokalizowane, dopóty problem mechanizmu regulacji nie może zostać rozwiązany.

Dodanie cAMP do komórek *Dictyostelium* powoduje pojawienie się zdolności do agregacji. Na poziomie biochemicznym objawia się to m.in. wzrostem stężenia jonów wapnia w cytoplazmie oraz defosforylacją ciężkich łańcuchów miozyny (46, 50). Według niektórych autorów (50, 51) defosforylacja ta zachodzi po zahamowaniu aktywności kinazy ciężkiego łańcucha przez jony wapnia, połączone z kalmoduliną. Na razie jednak pogląd ten nie został potwierdzony przez innych autorów. Kinaza *Dictyostelium*, zależna od kalmoduliny, fosforyluje również ciężki łańcuch miozyny *Physarum*.

V. Fosforylacja miozyny izolowanej z komórek niemięśniowych ssaków

V-1. Miozyna z komórek białaczki szpikowej

Miozyna izolowana z hodowanych *in vitro* komórek białaczki szpikowej myszy (linia M1, komórki przekształcające się w odpowiednich warunkach w makrofagi) ma trzy rodzaje lekkich łańcuchów, różniących się masą cząsteczkową (L_1 , L_2 i L_3). Łańcuchy L_1 i L_2 są fosforylowane *in vitro* przez endogenną kinazę. W wyciągach z komórek M_1 zidentyfikowano również kinazę ciężkiego łańcucha miozyny (52, 53). Miozyna izolowana z tych komórek inkubowanych w obecności $^{32}P_i$ nie wykazywała aktywności ATPazy aktomiozynowej i miała wyznakowane jedynie ciężkie łańcuchy. Fosforylacja lekkich łańcuchów była w tych warunkach niewidoczna. Przy użyciu alkalicznej fosfatazy przeprowadzono defosforylację ciężkich łańcuchów, a otrzymany preparat miozyny był jednak nieaktywny. Dopiero fosforylacja lekkich łańcuchów przez endogenną kinazę powodowała kilkakrotny wzrost aktywności ATPazy aktomiozynowej, do poziomu 0.12 $\mu\text{mola/min}$ i mg białka (52, 53). Na podstawie tych wyników, S a g a r a i w s p. stawiają hipotezę, że regulacja ATPazy aktomiozynowej przez fosforylację jest dwustopniowa (Ryc. 8). Według tych autorów miozyna



Ryc. 8. Dwupoziomowa regulacja ATPazy aktomiozynowej komórek białaczki szpikowej przez fosforylację ciężkiego (C) i lekkiego (L) łańcucha. Znak zapytania oznacza niezidentyfikowaną formę miozyny; zakłada się, że będzie ona nieaktywna (wg 53).

może występować w czterech formach różniących się stopniem i rodzajem ufosforylowania podjednostek. Tylko ta miozyna, której ciężki łańcuch jest nieufosforylowany, a lekkie łańcuchy ufosforylowane, wykazuje wysoką aktywność ATPazy. Miozyna z nieufosforylowanym lekkim łańcuchem jest nieaktywna, niezależnie od stopnia ufosforylowania ciężkiego łańcucha. Wysunięto przypuszczenie, że miozyna, która miałaby lekkie i ciężkie łańcuchy ufosforylowane (forma dotychczas niezyskana) byłaby również nieaktywna (53).

Powyższe prace stanowią pierwsze, i jak dotąd jedyne, doniesienia opisujące wpływ fosforylacji ciężkich łańcuchów na właściwości miozyny z komórek mięśniowych ssaków. Do tej pory znano jedynie efekty takiej fosforylacji na przykładzie miozyny komórek Protista (por. rozdz. IV). Nie znane jest jednak miejsce fosforylacji, co uniemożliwia zaproponowanie mechanizmu regulacji.

V-2. Miozyna z limfocytów, makrofagów i mózgu

Miozynę izolowaną z limfocytów (54, 55), makrofagów (56—58), mózgu (59—63) oraz fibroblastów (64) cechuje to, że zarówno ciężkie łańcuchy, jak i lekkie łańcuchy mogą być fosforylowane przez endogenne kinazy. Miozyna z tych komórek podobna jest do opisanej wcześniej miozyny z komórek białaczki szpikowej, ale ze względu na niewyjaśnione znaczenie fosforylacji ciężkiego łańcucha, omówienie jej wyodrębniono w osobny podrozdział. Ustalono, że fosforylacja lekkich łańcuchów stymuluje aktywność ATPazy aktomiozynowej: w przypadku miozyny limfocytów 7-krotnie, do poziomu 0.06 $\mu\text{mola/min}$ i mg białka (54), w przypadku makrofagów do poziomu 0.2 (56), a w przypadku miozyny mózgowej 10-krotnie, do poziomu 0.05 $\mu\text{mola/min}$ i mg białka (62). Stwierdzono, że ciężki łańcuch miozyny makrofagów jest fosforylowany w części ogonowej (56, 58). Reszta serynowa, ulegająca fosforylacji, znajduje się na końcu ogona, w odcinku nie większym niż 10 000 kDa (58). W podobnym miejscu fosforylowana jest miozyna II *Acanthamoeba* (por. ryc. 3).

Badano zmiany poziomu ufosforylowania miozyny w limfocytach *in situ*. Stwierdzono, że stymulacja limfocytów przez przeciwciała wiążące się z białkami powierzchniowymi powoduje zwiększoną o około 33% fosforylację lekkiego łańcucha i o 12% ciężkiego łańcucha (55).

V-3. Miozyna z grasicy, tarczycy i płytek krwi

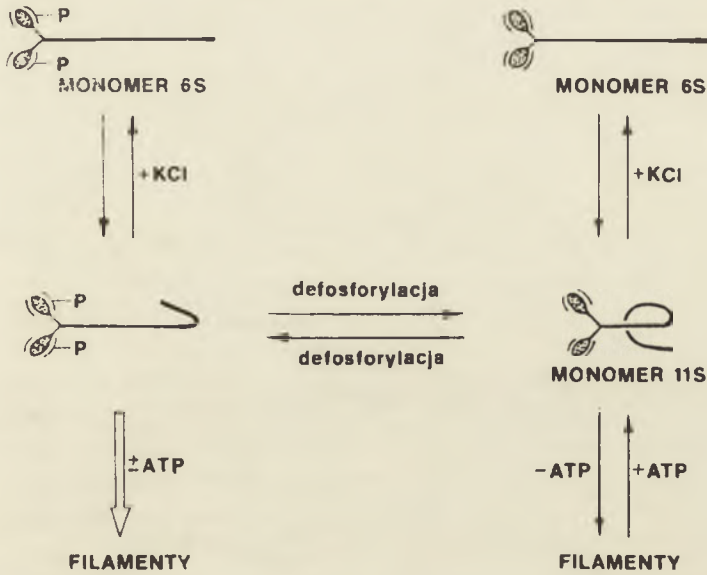
Wspólną właściwością miozyny z grasicy (65), tarczycy (66, 67), płytek krwi (68) oraz miozyny z astrocytów (69), myoblastów (70) oraz hodowanych *in vitro* komórek BHKC₂ (71), jest wyłącznie fosforylacja ich lekkich łańcuchów.

Trzy pierwsze przypadki omówione zostaną szczegółowo. Miozyna izolowana z tarczycy i grasicy, ma tylko połowicznie ufosforylowane lekkie łańcuchy. Przy użyciu kinazy z mięśni gładkich uzyskuje się dodatkowe włączenie 0.5 mola fosforanu na mol lekkiego łańcucha, po inkubacji zaś z fosfatazą, zawartość fosforanu obniża się do około 0.1 mola/mol (65, 66). Stwierdzono, że fosforylacja lekkiego łańcucha stymuluje aktywność ATPazy aktomiozynowej i, że wpływa na stabilność filamentów. Specyficzna aktywność ATPazy miozyny z grasicy, w obecności aktyny, wynosiła 0.14 μ mola/min i mg białka (11-krotna stymulacja), a miozyny z tarczycy 0.1 (32-krotna stymulacja).

W roztworach o niskiej sile jonowej, zawierających jony magnezu, miozyna z grasicy i tarczycy tworzy filamenty o różnej stabilności w zależności od stopnia ufosforylowania lekkiego łańcucha (65—67). K e n d r i c k - J o n e s i w s p. pokazali, że po dodaniu ATP ufosforylowana miozyna nie ulega depolimeryzacji, natomiast zdefosforylowana miozyna depolimeryzuje do monomerów o charakterystycznej konformacji (66, 67) (Ryc. 9). Miozyna w tej konformacji jest podwójnie zgięta w taki sposób, że zgięcie bliższe końca pałeczki znajduje się w pobliżu połączenia główki z ogonem. Kształt cząsteczki staje się bardziej zwarty w porównaniu z cząsteczką z wyprostowaną częścią ogonową, co objawia się podwyższeniem stałej sedymentacji z 6S na około 11S. Dodanie kinazy, jonów wapnia i kalmoduliny do monomerów 11S powoduje prostowanie się części ogonowej miozyny (konformacja 6S) i polimeryzację, zachodzącą równolegle z fosforylacją lekkiego łańcucha. Dodanie fosfatazy i ATP do filamentów miozyny powoduje ich depolimeryzację, równoległą z defosforylacją.

Kinaza lekkiego łańcucha miozyny płytek krwi jest aktywna tylko w obecności jonów wapnia i zawiera kalmodulinę jako podjednostkę regulatorową (72—73). We wcześniejszych pracach opisywano niewrażliwą na jony wapnia kinazę (74), która okazała się być fragmentem natywnego enzymu, powstałym w wyniku proteolizy.

A d e l s t e i n i w s p. pokazali, że fosforylacja reszty serynowej lekkiego łańcucha reguluje aktywność ATPazy aktomiozynowej płytek krwi (75). Była to pierwsza praca, w której pokazano, że współdziałanie aktyny



Ryc. 9. Wpływ fosforylacji lekkiego łańcucha na konformację i polimeryzację miozyny grasicy. Monomery z wyprostowanymi ogonami mają stałą sedimentacji 6S, monomery z podwójnie zgiętymi ogonami około 11S. P-ufosforylowany łańcuch regulatorowy (wg 67, 83).

z miozyną może być regulowane przez fosforylację miozyny. Nieufosforylowana forma ma niską aktywność, niezależnie od obecności aktyny, natomiast aktywność ATPazowa ufosforylowanej miozyny jest aktywowana 6-krotnie przez aktynę i osiąga wartość $0.17 \mu\text{mola/min}$ i mg białka. Ufosforylowana i zdefosforylowana miozyna ma takie same aktywności Ca^{2+} - i K^{+} -ATPazy (75).

Fosforylacja lekkiego łańcucha wpływa również na zdolność miozyny płytek krwi do polimeryzacji (76). Filamenty zbudowane z nieufosforylowanej miozyny są depolimeryzowane przez MgATP w stężeniu stechiometrycznym z miozyną. Depolimeryzacji nie obserwowano w przypadku filamentów ufosforylowanej miozyny. Agregaty zbudowane z fragmentów miozyny pozbawionych części główowej są również stabilne, co sugeruje, że depolimeryzujące działanie ATP odbywa się po związaniu go z główką.

Stwierdzono ponadto, ścisłą zależność pomiędzy stopniem ufosforylowania miozyny płytkowej, a naprężeniem wytworzonym przez otrzymane *in vitro* nici aktomiozyny (77), i że tylko ufosforylowana miozyna jest zdolna do superprecypitacji.

Oprócz typowych badań biochemicznych miozyny z płytek krwi prowadzi się zaawansowane prace, zmierzające do wyjaśnienia udziału fosforylacji miozyny w funkcjonowaniu tych komórek. Aktywacja płytek przez różne czynniki przebiega wieloetapowo i polega m.in. na zmianie kształtu,

agregacji i wydzielaniu granul. Wykazano, że zmiana kształtu płytki oraz fosforylacja lekkiego łańcucha do poziomu 1 mol/mol zachodzą w ciągu kilku sekund po aktywacji, po czym następuje powolna defosforylacja miozyny do poziomu wyjściowego (78—80). Mimo tej defosforylacji komórka zachowuje swój zmieniony kształt. Na tej podstawie sugerowano, że fosforylacja miozyny jest potrzebna tylko do zainicjowania zmiany kształtu, a nie do jego utrzymania (80). Stwierdzono ścisłą zależność pomiędzy ilością trombiny użytej do aktywacji płytek, a zawartością reszty fosforanowej w lekkim łańcuchu (78). Zaobserwowano, że równoległe z fosforylacją, indukowaną przez trombinę, zwiększała się ilość miozyny w cytoszkielecie komórki, czyli frakcji nierozpuszczalnej w Tritonie X-100 (79). I przeciwnie stwierdzono, że zahamowanie fosforylacji lekkiego łańcucha, przy użyciu pochodnych fenotiazyny, zmniejszało ilość miozyny we frakcjach cytoszkieletu. Opisane zjawisko może sugerować, że fosforylacja stabilizuje połączenie miozyny ze strukturami kurczliwymi (78, 79), ale może też być efektem zmniejszonej rozpuszczalności miozyny po ufosforylowaniu lekkiego łańcucha (76).

Badano również fosforylację miozyny w płytkach krwi *in vivo* pod wpływem związków stymulujących syntezę cAMP. Zarówno prostaglandyna D₂, jak i forskolin, hamowały fosforylację lekkiego łańcucha po aktywacji płytek przez trombinę (81), a dodane przed aktywacją, zapobiegały fosforylacji. Mechanizm działania cAMP polega przypuszczalnie na hamowaniu kinazy lekkiego łańcucha albo przez aktywację kinazy zależnej od cAMP (82), albo przez aktywację transportu jonów wapnia na zewnątrz komórki (81).

VI. Podsumowanie

Z zestawienia w tabeli 1 wynika, że możliwe są trzy rodzaje fosforylacji miozyny komórek niemięśniowych. Pierwszy, który wydaje się być pierwotny ewolucyjnie, występuje u niektórych *Protista*, jak *Acanthamoeba* i *Physarum*. Jest to wyłącznie fosforylacja ciężkich łańcuchów. Drugi rodzaj to fosforylacja ciężkich i lekkich łańcuchów tej samej cząsteczki miozyny. Prawdopodobnie jest to etap przejściowy, występujący zarówno w komórkach *Protista*, jak i w niektórych komórkach niemięśniowych wyższych organizmów. Trzeci rodzaj polega na fosforylacji tylko lekkich łańcuchów i charakteryzuje komórki mięśniowe (por. II część artykułu), ale występuje również w niektórych komórkach niemięśniowych kręgowców.

Strukturalne i enzymatyczne właściwości miozyny zależą od stopnia ufosforylowania jej podjednostek. Fosforylacja ciężkiego łańcucha może stymulować lub hamować aktywność ATPazy aktomiozynowej, a fosforylacja lekkiego łańcucha ma zawsze efekt stymulujący.

Tabela 1.

Fosforylacja miozyny komórek niemięśniowych

Rodzaj komórek	Fosforylacja łańcucha		Efekt fosforylacji na	
	ciężkiego	lekkiego	aktywność ATPazy aktomiozynowej	trwałość filamentów
PROTISTA				
1. <i>Acanthamoeba</i>	+	—	inhibicja	destabilizacja
2. <i>Physarum</i>	+	—	aktywacja	stabilizacja
3. <i>Dictyostelium</i>	+	+	(C) inhibicja (L) ?	destabilizacja ?
KOMÓRKI SSAKÓW				
1. Białaczka szpikowa	+	+	(C) inhibicja (L) aktywacja	? ?
2. Limfocyty	+	+	(C) ? (L) aktywacja	? ?
3. Makrofagi	+	+	(C) ? (L) aktywacja	? ?
4. Mózg	+	+	(C) ? (L) aktywacja	? ?
5. Tarczycyca	—	+	aktywacja	stabilizacja
6. Grasicyca	—	+	aktywacja	stabilizacja
7. Płytki krwi	—	+	aktywacja	stabilizacja

C — ciężki łańcuch; L — lekki łańcuch

W przypadku fosforylacji ciężkiego łańcucha miejsca fosforylacji znajdują się w części ogonowej cząsteczki. Stopień ich ufosforylowania wpływa na zdolność do polimeryzacji i stabilność filamentów, a ponadto — mimo znacznego oddalenia od centrum aktywnego — na aktywność ATPazy aktomiozynowej. Tłumaczy to hipoteza o regulacji ATPazy aktomiozynowej *Acanthamoeba* na poziomie filamentów (33—38). Autorzy hipotezy uważają, że dzięki oddziaływaniom międzycząsteczkowym fosforylacja reguluje konformację filamentów, a ta z kolei określa reaktywność główek. Hipoteza ta może się również odnosić do innych miozyn, których ciężkie łańcuchy ulegają fosforylacji w części ogonowej.

W przypadku fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny np. z grasicy obserwuje się podobne powiązanie aktywności ATPazowej i struktury filamentów. Łańcuchy lekkie są elementem główki, jednakże stopień ich ufosforylowania determinuje nie tylko aktywność ATPazową, ale także zdolność do agregacji oraz stabilność filamentów (83).

W każdym przypadku, niezależnie od tego, która podjednostka jest fosforylowana, ta postać miozyny, która ma wysoką aktywność ATPazy, tworzy stabilne filamety. Natomiast forma nieaktywna tworzy filamety nietrwałe, które depolimeryzują w obecności ATP do monomerów z podwójnie zgiętym ogonem. Wynika z tego, że aktywność miozyny zależy

od konformacji filamentów. Przez tę konformację rozumieć należy sposób ułożenia główek miozynowych i ich ruchliwość, ale szczegółowa charakterystyka tego stanu nie została dotychczas opisana dla miozyny komórek niemięśniowych.

Zaakceptowano do druku 29 kwietnia 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Pollard T. D., Weihing R. R., (1974), *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **2**, 1—65.
2. Wohlfarth-Bottermann K. E., (1982), *Acta Protozool.*, Special Congress Volume, **P. I**, 113—116.
3. Drabikowski W., Kuźnicki J., (1985), w: *Horyzonty Współczesnej Biologii*, red. Ostrowski W., Wiedza Powszechna, w druku.
4. Clarke M. A., Spudich J. A., (1977), *Ann., Rev. Biochem.*, **46**, 797—822.
5. Korn E. D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 588—599.
6. Kuźnicki L., Kuźnicki J., (1979), *Acta Protozool.*, **18**, 91—107.
7. Korn E. D., (1982), *Physiol. Rev.*, **62**, 672—737.
8. dos Remedios C. G., Barden J. A. (red.) (1983), w: *Actin Structure and Function in Muscle and Nonmuscle Cells*, str. 336, Academic Press, Sydney.
9. Hinssen H., D'Haese J., Small J. V., Sobieszek A., (1978), *J. Ultrastr. Res.*, **64**, 282—302.
10. Strzelecka-Gołaszewska H., Piwowar U., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 517—557.
11. Stępkowski D., Kąkol I., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 355—375.
12. Harrington W. F., Rodgers M. E., (1984), *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 35—73.
13. Pollard T. D., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 156—165.
14. Dąbrowska R., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 467—481.
15. Hitchcock S., (1977), *J. Cell Biol.*, **74**, 1—15.
16. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1979), *Zeszyty Naukowe UJ., Prace z Biol. Mol.*, **6**, 9—22.
17. Adelstein R. S., Eisenberg E., (1980), *Ann., Rev. Biochem.*, **1980**, **49**, 921—956.
18. Cooke R., Stull J. T., (1981), w: *Cell and Muscle Motility*, red. Dowben R. M., Shay J. W., t. 1, str. 99—133; Plenum Press, New York.
19. Dąbrowska R., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 125—145.
20. Kendrick-Jones J., Scholey J. M., (1981), *J. Muscle Res. and Cell Motility* **2**, 347—372.
21. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 265—290.
- 21a. Weiss B., Prozialeck W. C., Wallace T. L., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2217—2226.
22. Maruta H., Gadasi H., Collins J. H., Korn E. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3624—3630.
23. Maruta H., Gadasi H., Collins J. H., Korn E. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3631—3636.
24. Maruta H., Korn E. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6501—6509.
25. Pollard T. D., Stafford W. F., Porter M. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4798—4808.

26. Collins J. H., Korn E. D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8011—8014.
27. Collins J. H., Korn E. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2586—2595.
28. Cote G. P., Collins J. H., Korn E. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 12811—12816.
29. Collins J. H., Cote G. P., Korn E. D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4529—4534.
30. Cote G. P., Robinson E. A., Appella E., Korn E. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 12781—12787.
31. Hammer J. A., Korn E. D., Patterson B. M., (1985), *J. Cell Biol.*, **29**, 33a.
32. McClure J. A., Korn E. D., (1985), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14570—14575.
33. Collins J. H., Kuźnicki J., Bowers B., Korn E. D., (1982), *Biochemistry* **21**, 6910—6915.
34. Kuźnicki J., Albanesi J. P., Cote G. P., Korn E. D., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 6011—6014.
35. Kuźnicki J., Korn E. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9302—9307.
36. Kuźnicki J., Bowers B., Korn E. D., niepublikowane.
37. Kuźnicki J., Atkinson M. A. L., Korn E. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9308—9313.
38. Kuźnicki J., Cote G. P., Bowers B., Korn E. D., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1967—1972.
39. Kiehart D. P., Pollard T. D., (1984), *Nature*, **308**, 864—866.
40. Nachmias V. T., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 408—414.
41. Ogiwara S., Ikebe M., Takahashi K., Tonomura Y., (1983), *J. Biochem.*, **93**, 205—223.
42. Kuźnicki J., Kuźnicki L., Drabikowski W., (1979), *Cell Biol. Inter. Rep.*, **3**, 17—23.
43. Kuźnicki J., nieopublikowane.
44. Takahashi K., Ogiwara S., Ikebe M., Tonomura Y., (1983), *J. Biochem.*, **93**, 1175—1183.
45. Kuczmariski E. R., Pardee J. D., (1983) w: *Cell and Muscle Motility*, red. Dowben R. M., Shay J. W., t. 4, str. 269—316; Plenum Press, New York.
46. Rahmsdorf H. J., Malchow D., Gerisch G., (1978), *FEBS Lett.*, **88**, 322—326.
47. Kuczmariski E. R., Spudich J. A., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7292—7296.
48. Peltz G., Kuczmariski E. R., Spudich J. A., (1981), *J. Cell Biol.*, **89**, 104—108.
49. Spudich J. A., Spudich A., (1982), w: *The development of Dictyostelium of discoideum*, red., Loomis W. F., str. 169—194; Academic Press, New York.
50. Malchow D., Böhme R., Ramsdorf H. J., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **117**, 213—218.
51. Maruta H., Baltés W., Dieter P., Marme D., Gerisch G., (1983), *EMBO J.*, **2**, 535—542.
52. Sagara J., Nagata K., Ichikawa Y., (1982), *J. Biochem.*, **92**, 1845—1851.
53. Sagara J., Nagata K., Ichikawa Y., (1983), *Biochem. J.*, **214**, 839—843.
54. Fechheimer M., Cebra J. J., (1982), *J. Cell Biol.*, **93**, 261—268.
55. Fechheimer M., Zigmond S. H., (1983), *Cell Motility*, **3**, 349—361.
56. Trotter J. A., Adelstein R. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8781—8785.
57. Trotter J. A., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 1071—1077.
58. Trotter J. A., Nixon C., Johnson M., (1985), *Biophys. J.*, **47**, 302a.

59. Matsumura S., Murakami N., Yasuda S., Kumon A., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1595—1600.
60. Matsumura S., Murakami N., Yasuda S., Kumon A., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 683—688.
61. Matsumura S., Murakami N., Tashiro Y., Yasuda S., Kumon A., (1983), *Arch. Biochem., Biophys.*, **227**, 125—135.
62. Baryłko B., Sobieszek A., (1983), *EMBO J.*, **2**, 369—374.
63. Murakami N., Matsumura S., Kumon A., (1984), *J. Biochem.*, **95**, 651—660.
64. Muhlard A., Oplatka A., (1977), *FEBS Lett.*, **77**, 37—40.
65. Martin F., Gabrion J., Cavadore J.-C., (1981), *FEBS Lett.*, **131**, 235—238.
66. Scholey J. M., Smith R. C., Drenckhahn D., Gröschel-Stewart U., Kendrick-Jones J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7737—7745.
67. Craig R., Smith R., Kendrick-Jones J., (1983), *Nature*, **302**, 436—439.
68. Adelstein R. S., Conti M. A., Anderson W., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3115—3119.
69. Scordilis S. P., Adelstein R. S., (1977), *Nature*, **268**, 558—560.
70. Scordilis S. P., Anderson J. L., Pollack R., Adelstein R. S., (1977), *J. Cell Biol.*, **74**, 940—949.
71. Yerna M. J., Dąbrowska R., Hartshorne D. J., Goldman R. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 184—188.
72. Dąbrowska R., Hartshorne D. J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1352—1359.
73. Adelstein R. S., (1982), *Cell*, **30**, 349—350.
74. Daniel J. L., Adelstein R. S., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2370—2377.
75. Adelstein R. S., Conti M. A., (1975), *Nature*, **256**, 597—598.
76. Scholey J. M., Taylor K. A., Kendrick-Jones J., (1980), *Nature*, **287**, 233—235.
77. Lebovitz E. A., Cooke R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5443—5447.
78. Daniel J. L., Molish I. R., Holmsen H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7510—7514.
79. Fox J. A., Philips D. R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4120—4126.
80. Daniel J. L., Molish I. R., Rigmaiden M., Gwendolyn S., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9826—9831.
81. Feinstein M. B., Egan J. J., Opas E. E., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 1260—1267.
82. Conti M. A., Adelstein R. S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3178—3181.
83. Scholey J. M., Taylor K. A., Kendrick-Jones J., (1981), *Biochimie*, **63**, 255—271.

JACEK KUŹNICKI *

Fosforylacja miozyny *in vivo* i *in vitro*

Myosin phosphorylation *in vivo* and *in vitro*

Spis treści

Część II. Miozyna mięśniowa

- I. Wstęp
- II. Mięśnie kręgowców
 - II-1. Miozyna mięśni gładkich
 - II-2. Miozyna mięśni szkieletowych
 - II-3. Miozyna mięśnia sercowego
- III. Mięśnie bezkręgowców
- IV. Zmiany roli fosforylacji miozyny w toku ewolucji
- V. Hipoteza filamentowej regulacji ATPazy aktomiozynowej za pośrednictwem fosforylacji

Contents

Part II. Muscle Myosin

- I. Introduction
- II. Vertebrates muscle
 - II-1. Smooth muscle myosin
 - II-2. Skeletal muscle myosin
 - II-3. Cardiac muscle myosin
- III. Invertebrates muscle
- IV. Changes in the function of myosin phosphorylation during evolution
- V. Hypothesis: Phosphorylation regulates actomyosin ATPase activity at the filament level

I. Wstęp

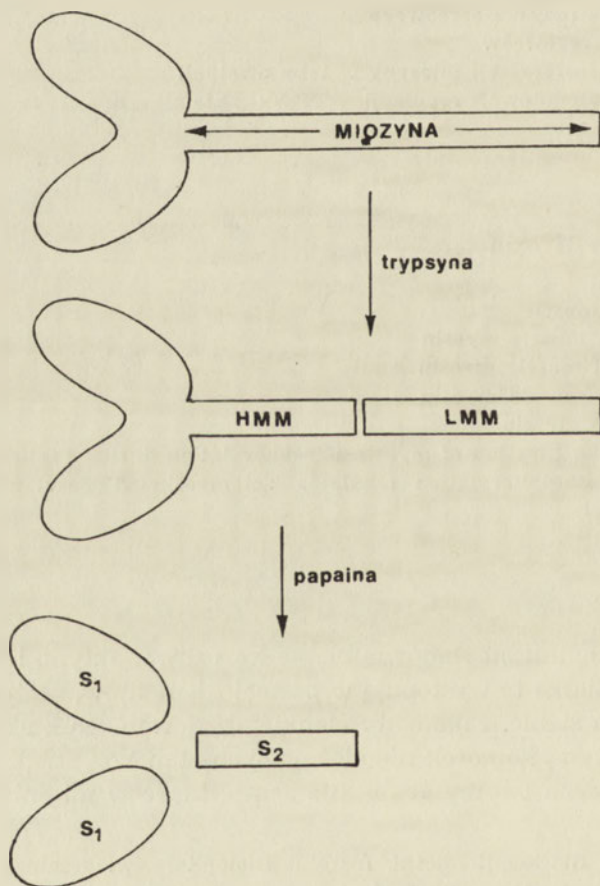
Główną masę mięśni stanowią białka kurczliwe: aktyna i miozyna (art. przegl. 1—6). Białka te występują w postaci filamentów, ułożonych równolegle względem siebie. Filamenty cienkie zbudowane są z aktyny i w porównaniu z aktyną komórek niemięśniowych stanowią struktury stabilne. Natomiast miozyna tworzy grube filamenty, które w mięśniach szkieleto-

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

Wykaz stosowanych skrótów: HMM — ciężka meromiozyna, LMM — lekka meromiozyna, S₁ — główka miozyny, S₂ — fragment ogona miozyny.

wych i serca są również trwałe, ale ich stabilność w mięśniach gładkich nie jest jeszcze jednoznacznie wyjaśniona (art. przegląd. 7—9).

Skurcz mięśni polega na wzajemnym przesuwaniu się obu rodzajów filamentów względem siebie, co sprzężone jest z hydrolizą ATP (art. przegląd. 10—12). Powstała w tej reakcji energia zostaje wykorzystana do pracy mechanicznej. Przesuwanie się filamentów zachodzi dzięki przyłączaniu się główek miozyny i ich odłączaniu od aktyny. Te cyklicznie powstające połączenia to tzw. mostki poprzeczne (*cross-bridges*). Od ich liczby zależy napięcie mięśni w czasie izometrycznego skurczu, natomiast czas trwania cyklu przyłączania się i odłączania ich wyznacza szybkość skurczu izotonicznego. Ruchliwość mostków poprzecznych jest możliwa dzięki plastyczności dwóch rejonów cząsteczki miozyny: tzw. zawiasów (połączenia główki z ogonem) oraz specyficznej części ogonowej miozyny (art. przegląd. 13—16). Rejony te w miozynie mięśniowej są szczególnie podatne na proteolizę, co umożliwia uzyskanie charakterystycznych fragmentów (Ryc. 1). W wyniku



Ryc. 1. Proteoliza miozyny mięśni szkieletowych. Na schemacie zaznaczono powstające fragmenty, ale nie zaznaczono lekkich łańcuchów.

działania trypsyną na miozynę mięśni szkieletowych otrzymuje się dwa produkty: ciężką meromiozynę (HMM), składającą się z dwóch główek i części ogona — utrzymującej je razem, oraz lekką meromiozynę (LMM), czyli pozostałą część ogona. Trawienie HMM papainą powoduje powstanie dwóch fragmentów S_1 , będących pojedynczymi główkami oraz części pałeczki, zwanej fragmentem S_2 .

Interakcja aktyny z miozyną jest pod kontrolą układów regulujących, wrażliwych na zmiany stężenia jonów wapnia. Rozróżnia się układy działające na aktynę i na miozynę (art. przegląd. 17—20). W pierwszym przypadku, układ troponina-tropomiozyna, znajdujący się w mięśniach szkieletowych i sercowych, blokuje w nieobecności jonów wapnia w aktynie miejsca oddziaływania z miozyną. W drugim przypadku, białka regulujące oddziałują na miozynę w obecności jonów wapnia w ten sposób, że może ona reagować z aktyną. Przykładem takiej regulacji jest odwracalna fosforylacja miozyny w mięśniach gładkich (art. przegląd. 11, 21—24). W mięśniach niektórych mięczaków funkcję białek regulujących pełni lekki łańcuch regulatorowy miozyny (por. rozdz. III).

W dalszej części artykułu zostaną przedstawione efekty fosforylacji miozyny izolowanej z mięśni kręgowców i bezkręgowców oraz wpływ fosforylacji na cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni. Na tej podstawie, uwzględniając jednocześnie dane dotyczące miozyny z pierwotniaków i z komórek niemięśniowych zwierząt (25), przedstawione będą prawidłowości i hipotezy na temat roli fosforylacji w regulacji systemów aktomiozynowych eukariontów.

II. Mięśnie kręgowców

II-1. Miozyna mięśni gładkich

Prace dotyczące roli fosforylacji w skurczu mięśni gładkich stanowią obecnie zbiór kilkuset pozycji piśmiennictwa (art. przegląd. 23, 24, 24a). Z tej ogromnej literatury wybrałem trzy ważniejsze zagadnienia: wpływ fosforylacji na 1) aktywność ATPazy aktomiozynowej, 2) strukturę miozyny oraz 3) udział miozyny w cyklu skurczowo-rozkurczowym.

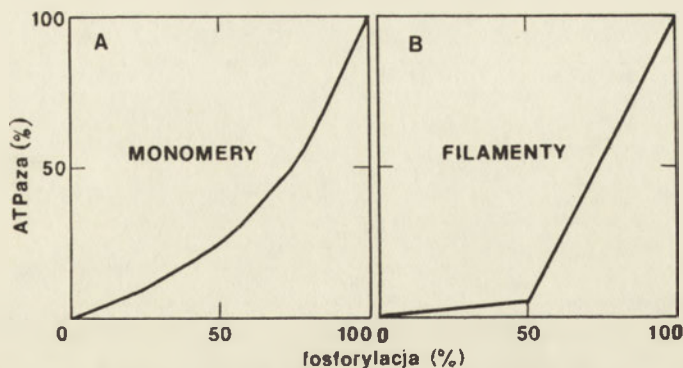
W miozynie mięśni gładkich fosforylacji ulega wyłącznie lekki łańcuch regulatorowy (26—28), znajdujący się w pobliżu połączenia główki z częścią ogonową. Przyłączenie fosforanu do reszty serynowej lekkiego łańcucha katalizuje specyficzna kinaza zależna od jonów wapnia i kalmoduliny (29). W niektórych mięśniach gładkich podjednostka katalityczna kinazy lekkiego łańcucha może być fosforylowana przez kinazę zależną od cAMP, co obniża aktywność tego enzymu (30—32). W ten sposób poziom ufosforylowania lekkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich może być pod kontrolą zarówno cAMP jak i jonów wapnia (por. art. przegląd. 21, 23, 33).

Na przełomie roku 1976 i 1977 stwierdzono, że ufosforylowana forma miozyny mięśni gładkich ma wysoką aktywność ATPazy aktomiozynowej, a nieufosforylowana — niską (28, 34, 35). W tym samym czasie inna grupa badaczy potwierdziła to wykazując, że tylko aktywna postać miozyny jest zdolna do superprecypitacji (36). We wspomnianych pracach używano preparaty, które zawierały niecałkowicie oczyszczone białka, nie można więc było wykluczyć udziału innych procesów niż fosforylacja. W późniejszych pracach używano homogenne białka: miozynę z mięśni gładkich, aktywną (najczęściej z mięśni szkieletowych), podjednostkę katalityczną kinazy lekkiego łańcucha oraz kalmodulinę. W układach rekonstruowanych z takich składników badano szczegółowo zależność aktywności ATPazy aktomiozynowej od poziomu fosforylacji lekkiego łańcucha. Do tych badań stosowano miozynę w postaci filamentów i w postaci rozpuszczalnej (monomeru lub fragmentu HMM).

Mechanizm przyłączania fosforanu do lekkiego łańcucha miozyny w różnym stopniu spolimeryzowanej był badany w trzech laboratoriach, gdzie uzyskano podobne wyniki (37—40). Zaobserwowano, że w przypadku monomeru fosforylacja obu główek w cząsteczce jest przypadkowa. W filamentach natomiast proces ten przebiega w sposób uporządkowany: najpierw fosforylowany jest jeden łańcuch w każdej cząsteczce, a dopiero potem fosforylowany jest drugi łańcuch i to z mniejszą szybkością. W efekcie filamenty miozynowe zawierające połowę maksymalnej ilości fosforanu, składają się z jednorodnej populacji cząsteczek, z których każda ma ufosforylowany tylko jeden łańcuch. Persechini i Hartshorne (38) tłumaczą uporządkowaną fosforylację asymetrią główek, wynikającą z ułożenia cząsteczek w filamentach. Inną interpretację zaproponowała Merkel i wsp. (41) stwierdzając, że to brak tropomiozyny powoduje powstanie takiej asymetrii.

Zaobserwowano, że aktywność ATPazy aktomiozynowej pojawia się dopiero po fosforylacji obu lekkich łańcuchów miozyny mięśni gładkich (37, 38, 40). Dlatego też, krzywe wzrostu aktywności ATPazy w wyniku przyłączenia fosforanu do lekkiego łańcucha są różne w zależności od stopnia agregacji miozyny (37—41). W przypadku monomerów aktywność ATPazy wzrasta wykładniczo wraz ze wzrostem ufosforylowania cząsteczek. W przypadku filamentów miozyna mięśni gładkich ufosforylowana do 50% w ogóle nie jest aktywna, natomiast po dodatkowej fosforylacji jej aktywność ATPazowa rośnie liniowo wraz ze wzrostem ufosforylowania lekkiego łańcucha. W opisanych warunkach *in vitro* stwierdzono więc bezpośrednią zależność stopnia ufosforylowania miozyny a jej aktywnością ATPazową. Wykazano również, że reaktywność główek miozynowych jest różna w filamentach i w monomerach, co potwierdziły obserwacje wskazujące, że aktywność ATPazy aktomiozynowej filamentów jest kilka razy mniejsza od aktywności fragmentu HMM (42, 43).

Opisane powyżej wyniki nie wyjaśniają, w jaki sposób fosforylacja



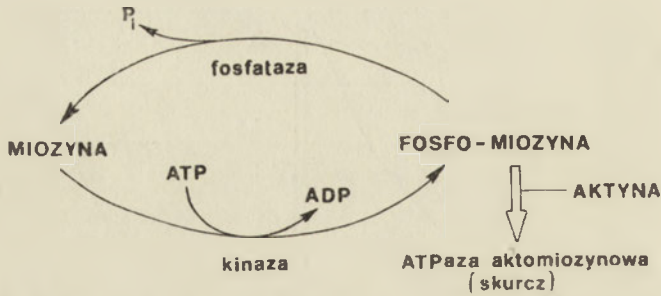
Ryc. 2. Wpływ fosforylacji lekkiego łańcucha na aktywność ATPazy aktomiozynowej mięśni gładkich w zależności od stopnia agregacji miozyny.

A — Monomery miozyny; B — Filamenty miozyny.

wpływa na szybkość hydrolizy ATP. Na pytanie to próbowali znaleźć odpowiedź Sellers i wsp. (44). Oznaczali oni wiązanie ufosforylowanej i nieufosforylowanej HMM z aktyną i stwierdzili, że podczas gdy szybkość maksymalna ATPazy tych fragmentów różniła się 25-krotnie, to stała wiązania z aktyną — tylko 4-krotnie. Z drugiej strony oba fragmenty HMM okazały się mieć jednakowe stałe szybkości hydrolizy ATP mierzone na podstawie początkowego uwolnienia fosforanu (*initial phosphate burst*). Zdaniem Sellersa i wsp. (44) obserwacje te wykluczają mechanizm, w którym nieufosforylowany łańcuch regulatorowy miałby blokować bezpośrednio wiązanie aktyny z miozyną. Autorzy ci twierdzą, że fosforylacja lekkiego łańcucha reguluje jeden z etapów cyklu hydrolizy ATP, najprawdopodobniej — uwalnianie fosforanu.

Dodatkowych argumentów na rzecz fosforylacji łańcuchów lekkich miozyny — jako głównego mechanizmu regulującego skurcz mięśni gładkich — dostarczyły badania, w których użyto kinazy innego pochodzenia. Stwierdzono, że kinaza ciężkiego łańcucha miozyny I *Acanthamoeba* (43) i kinaza aktywowana proteazą z retikulocytów królika (45), fosforylują tę samą resztę serynową co endogenna kinaza mięśni gładkich, ale w przeciwieństwie do niej, oba enzymy są aktywne niezależnie od obecności jonów wapnia i kalmoduliny. W wyniku fosforylacji katalizowanej przez te kinazy, aktywność ATPazy aktomiozynowej wzrastała do tego samego poziomu, co w obecności endogennej kinazy, ale niezależnie od stężenia jonów wapnia. Opisane wyniki wydają się wykluczać bezpośredni udział jonów wapnia w aktywacji ATPazy — wbrew sugestiom niektórych autorów (46—50).

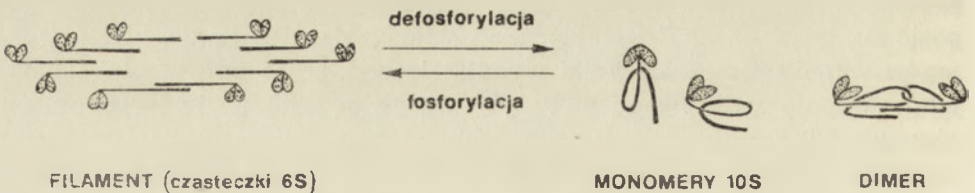
Hipoteza o naczelnej roli fosforylacji łańcuchów lekkich miozyny w regulacji interakcji aktyny z miozyną w mięśniach gładkich jest obecnie powszechnie akceptowana (Ryc. 3). Należy jednak zaznaczyć, że nie zostały wyjaśnione doniesienia wskazujące na to, że wzrost aktywności ATPazy aktomiozynowej może mieć miejsce bez fosforylacji lekkiego łańcucha



Ryc. 3. Rola fosforylacji lekkiego łańcucha w regulacji ATPazy aktomiozynowej mięśni gładkich.

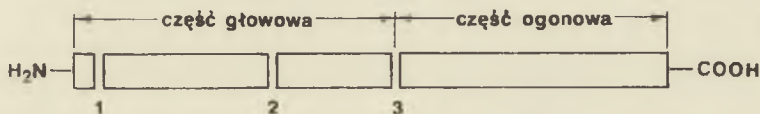
(50—55). Np. ostatnio okazało się, że w obecności bardzo wysokich stężeń $MgCl_2$ (30 mM) nieufosforylowana miozyna ma wysoką aktywność ATPazy (51) i że w tych warunkach zdolna jest do superprecypitacji (52). Podobny efekt miały jony magnezu na nieaktywną formę miozyny II *Acanthamoeba* (56).

W obecności 0.6 M KCl, niezależnie od stężenia ATP, jonów magnezu i stopnia ufosforylowania lekkich łańcuchów, miozyna występuje w postaci monomeru z wyprostowaną częścią ogonową (57, 58). Taką konformację określa się jako 6S od wartości stałej sedymentacji miozyny w tych warunkach (58—60). W roztworach zawierających niższe stężenie KCl, np. 0.15 M, obie formy miozyny — ufosforylowana i nieufosforylowana — tworzą podobnie wyglądające filamenty. Różnica między nimi uwidacznia się po dodaniu ATP, który depolimeryzuje filamenty zdefosforylowanej miozyny (57, 59, 61, 62), ale nie ma wpływu na filamenty ufosforylowanego białka (Ryc. 4). Produktami tej depolimeryzacji są monomery o stałej sedymentacji około 10S, które z tego względu brano początkowo za dimery miozyny (58—60). Stwierdzono, że depolimeryzacja filamentów z utworzeniem monomerów 10S zachodzi po związaniu się ATP z główką miozyny (59, 62, 63) i polega najprawdopodobniej na rozluźnieniu połączeń między rejonem S_2 , a trzonem filamentów w czasie hydrolizy ATP. Częsteczka, w konformacji 10S ma ogon zgięty w dwóch miejscach, mniej więcej w 1/3 i 2/3 długości w taki sposób, że zgięcie pierwsze znajduje się w pobliżu



Ryc. 4. Wpływ fosforylacji lekkiego łańcucha na strukturę miozyny mięśni gładkich w obecności MgATP. Defosforylacja sprzyja powstawaniu monomerów 10S i dimerów z podwójnie zgiętymi ogonami. Fosforylacja powoduje prostowanie się części ogonowej cząsteczek i polimeryzację (wg. 58—60).

końca części ogonowej, a drugie w pobliżu połączenia główki z ogonem. Częsteczka jest więc krótsza, bardziej zwarta i dlatego ma wyższą stałą sedimentacji (57, 58, 60, 61, 64). Opisane zjawisko wskazuje, że fosforylacja łańcucha regulatorowego wpływa na strukturę całej cząsteczki, nie wyłączając odległych rejonów ogona. Gdy po dodaniu kinazy, jonów wapnia i kalmoduliny lekki łańcuch zostaje ufosforylowany, cząsteczki miozyny zmieniają konformację z 10S na 6S i polimeryzują tworząc normalne filamenty (60). Oprócz stałej sedimentacji, konformacje 10S i 6S różnią się innymi cechami, jak np. lepkość, intensywność fluorescencji, aktywność ATPazowa i podatność na proteolizę. Aktywność Ca^{2+} -ATPazy miozynowej i Mg^{2+} -ATPazy aktomiozynowej w konformacji 6S jest większa niż w konformacji 10S (65, 66). Papaina przecina ciężki łańcuch miozyny w konformacji 6S w trzech miejscach, natomiast w przypadku, gdy miozyna występuje w konformacji 10S, tylko jedno miejsce jest podatne na działanie tej proteazy (Ryc. 5). Pozostałe dwa miejsca — w tym rejon łą-



Ryc. 5. Miejsca trawienia papainą ciężkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich w konformacji 6S. Miejsca 2 i 3 nie są trawione w konformacji 10S (wg. 63, 67, 68).

czący główkę z częścią ogonową — są w cząsteczce w tej konformacji niedostępne dla papainy (63, 67, 68). Fosforylacja wpływa również na ułożenie główek (68). W cząsteczce w konformacji 6S są one ustawione w kierunku przeciwnym do końca ogona. Natomiast w miozynie w konformacji 10S, główki są zgięte pod pewnym kątem i skierowane ku ogonowi. Takie ich ułożenie jest nawet zachowane w dimerach formy 10S (64, 68) (por. ryc. 4).

W zależności od stopnia ufosforylowania lekkiego łańcucha oraz obecności ATP, KCl i jonów magnezu obie formy miozyny mogą tworzyć nie tylko filamenty i monomery 6S, ale również monomery 10S. Należy jednak zaznaczyć, że w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, tj. w obecności MgATP i 0.15 M KCl, ufosforylowana miozyna występuje w postaci filamentów, natomiast zdefosforylowana miozyna — w postaci monomerów 10S (59, 64, 69). Nie wiadomo jednak, czy taka sytuacja ma miejsce *in situ*.

W dalszej części artykułu przedstawione zostaną wyniki o fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich, uzyskane na podstawie badań skrawków żywych mięśni lub odbłonionych miofibryli, zdolnych do odwracalnego skurczu. Celem tych badań było wyjaśnienie roli fosforylacji miozyny w cyklu skurczowo-rozkurczowym mięśni gładkich. Jeśli zakłada się, że zależna od jonów wapnia fosforylacja stanowi jedyny mechanizm, decydujący o aktywności i o ilości aktywnych mostków poprzecznych, to

wówczas należy oczekiwać spełnienia następujących warunków. Po pierwsze, poziom ufosforylowania lekkiego łańcucha powinien być niski w czasie rozkurczu. Po drugie, należało się spodziewać, że po stymulacji mięśnia, lekki łańcuch będzie fosforylowany przed lub równolegle ze skurczem. Po trzecie, szybkość defosforylacji powinna przebiegać równolegle lub wyprzedzać rozkurcz. Po czwarte, można było oczekiwać, że ostateczne napięcie mięśnia (siła skurczu) będzie proporcjonalne do ufosforylowania lekkiego łańcucha. Zebrane poniżej wyniki uporządkowano pod kątem tych założeń.

Pierwszy warunek nie jest spełniony, gdyż w żadnym przypadku nie stwierdzono, by miozyna izolowana z mięśni gładkich w stanie rozkurczu była całkowicie zdefosforylowana. Poziom fosforylacji lekkiego łańcucha wahał się od 0.05 do 0.4 mola P_i /mol łańcucha regulatorowego (70—74). Nie wydaje się jednak, by taki poziom fosforylacji *in vivo* podważał jej rolę w regulacji skurczu mięśni gładkich. Niecałkowitą defosforylację miozyny można bowiem wytłumaczyć np. napięciem rozkurzonego mięśnia, utrzymywanym przez ufosforylowane cząsteczki czy też negatywną kooperatywnością główek (ufosforylowanie jednego łańcucha w cząsteczce nie wystarcza by wykazywała ona aktywność ATPazy aktomiozynowej).

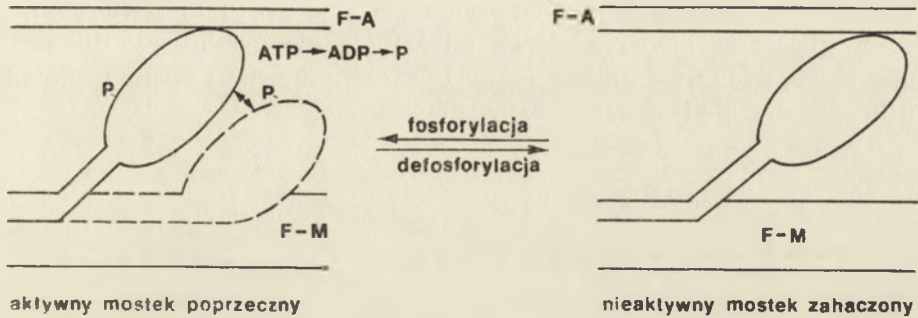
Drugi warunek wydaje się być spełniony, gdyż po stymulacji odbłonionych miofibryli lub skrawków mięśni obserwuje się fosforylację miozyny równoległą do narastającego napięcia mięśnia (70, 75, 76). Wykazano również, że pochodne fenotiazyny lub białka wiążące kalmodulinę, hamując fosforylację lekkiego łańcucha, hamowały równocześnie powstawanie napięcia skurczowego mięśni gładkich (71, 77—79). Dodanie kalmoduliny przywracało obydwie właściwości, tj. zdolność do fosforylacji i skurczu (77, 78).

Wyniki prac z kilku laboratoriów przyniosły dodatkowe informacje, które wskazują, że zależna od jonów wapnia fosforylacja jest czynnikiem koniecznym do wywołania skurczu — a nie jony wapnia wiążące się z miozyną i aktywujące ją bezpośrednio. Pokazano np., że tiofosforylacja miozyny wywołuje wzrost napięcia mięśni utrzymującego się nawet w nieobecności jonów wapnia (75, 81, 82), miozyna taka nie jest bowiem defosforylowana przez fosfatazę. Inni autorzy dodawali do odbłonionych miofibryli niewrażliwy na jony wapnia i kalmodulinę aktywny fragment kinazy i uzyskiwali — w nieobecności lub obecności jonów wapnia — taki sam skurcz i poziom fosforylacji (83—85).

Stwierdzono, że rozkurcz mięśni gładkich zachodzi po uprzedniej defosforylacji (70, 76, 79). Okazało się jednak, że proporcjonalność siły skurczu do stopnia ufosforylowania miozyny — nie zawsze jest zachowana. Stosując cienkie skrawki ułatwiające dyfuzję zaobserwowano, że ufosforylowana w wyniku stymulacji mięśni gładkich prądem miozyna jest szybko defosforylowana, chociaż mięsień znajduje się nadal w stanie skurczu (86—88). Obserwacje te zostały potwierdzone przez innych autorów

(72, 89). W początkowej fazie skurczu oba parametry — napięcie i szybkość zachodzą równolegle ze wzrostem poziomu ufosforylowania lekkiego łańcucha. W dalszej fazie następuje z jednej strony spadek szybkości skurczu, zachodzący równolegle z odłączaniem fosforanu, z drugiej — wzrost napięcia mięśnia. A zatem z poziomem fosforylacji jest zbieżna szybkość skurczu (86, 90).

Próbie wyjaśnienia braku zależności między poziomem fosforylacji a siłą skurczu podjęli Murphy i wsp. (87, 91, 92) (Ryc. 6). Autorzy ci



Ryc. 6. Hipoteza mostków zahaczonych miozyny z mięśni gładkich (wg. 87). Ufosforylowana miozyna łączy się cyklicznie z aktyną tworząc mostki poprzeczne. Jest to sprzężone z hydrolizą ATP. Gdy miozyna jest defosforylowana w postaci kompleksu z aktyną powstaje mostek zahaczony, niehydrolizujący ATP, ale tworzący napięcie mięśnia. Pokazano tylko jedną główkę miozyny, bez lekkich łańcuchów. F-A — filament aktynowy, F-M — filament miozynowy, P — fosforan przyłączony do lekkiego łańcucha.

uważają, że miozyna może ulegać defosforylacji nie tylko w stanie wolnym, ale również w połączeniu z aktyną. W pierwszym przypadku powstają nieaktywne mostki poprzeczne niehydrolizujące ATP, w drugim — tzw. mostki zahaczone (*latch bridges*), czyli połączenia miozyny z aktyną, utrzymujące napięcie mięśni bez hydrolizy ATP. Hipoteza mostków zahaczonych tłumaczy zatem, w jaki sposób, mimo zachodzącej defosforylacji miozyny może utrzymywać się, a nawet rosnąć, napięcie skurczowe.

Brak zależności między poziomem fosforylacji a siłą skurczu można również wytłumaczyć inaczej, mianowicie działaniem dodatkowych czynników regulujących, takich jak np. białka wiążące aktynę, zdolne do modulowania aktywności ATPazy aktomiozynowej (93), czy nawet jony magnezu, których wysokie stężenie wywołuje skurcz odbłonionych miofibryli w nieobecności jonów wapnia i bez fosforylacji (51).

Reasumując, badania *in vivo* potwierdzają tezę, że fosforylacja lekkiego łańcucha inicjuje skurcz mięśni gładkich, ale jednocześnie podtrzymują przypuszczenia o obecności innych układów regulujących (por. art. przegląd. 23, 93a). Badania przyżyciowe przeprowadzone na skrawkach mięśni lub na odbłonionych miofibrylach miały również odpowiedzieć na pytanie, czy

nieufosforylowana miozyna depolimeryzuje *in vivo* — na co wskazują wyniki analiz biochemicznych. Problem ten nie wydaje się być rozwiązany do końca. Jedni autorzy (94) przedstawili dane, wskazujące na obecność w rozkurczonych mięśniach gładkich filamentów zbudowanych z nieufosforylowanej miozyny. Możliwe jednak, że jest to właściwość charakterystyczna tylko dla niektórych typów mięśni gładkich. Inni autorzy podali bowiem, że filamenty miozynowe *in situ* są niestabilne (95—98). Zaobserwowano np. dezintegrację filamentów w skrawkach mięśni inkubowanych w nieobecności jonów wapnia. Po dodaniu tych jonów filamenty polimerizowały ponownie (95). Ostatnio C a n d e i w s p. (98) stwierdzili, że skurcz glicerynowanych komórek mięśni gładkich stabilizuje filamenty miozynowe, i że w warunkach rozkurczowych miozyna jest nie tylko zdefosforylowana, ale i zdepolimeryzowana.

II-2. Miozyna mięśni szkieletowych

Miozyna mięśni szkieletowych ssaków zawiera dwa rodzaje lekkich łańcuchów, z których jeden ulega fosforylacji (99, art. przegl. 100) i wiąże kationy dwuwartościowe (101). Reszta serynowa ulegająca fosforylacji oraz miejsce wiązania jonów wapnia i magnezu znajdują się na N-końcu cząsteczki (por. art. przegl. 14). Wyniki badań uzyskane dzięki zastosowaniu różnych metod wskazują, że lekki łańcuch regulatorowy miozyny mięśni szkieletowych znajduje się — tak, jak w innych cząsteczkach, w pobliżu połączenia główki z częścią ogonową (15, 102).

Fosforylację lekkiego łańcucha katalizuje kinaza zależna od jonów wapnia i kalmoduliny (103—106), natomiast defosforylację katalizuje fosfataza (107). Wykazano, że ufosforylowanie łańcucha regulatorowego zmienia konformację miozyny (108). I tak stwierdzono, że chymotrypsyna trawiła wolniej cząsteczki ufosforylowanej, niż zdefosforylowanej miozyny. Produktami trawienia w pierwszym przypadku były równe ilości HMM i S₁, w drugim zaś — prawie wyłącznie HMM, co wskazuje, że odcinek łączący główkę z częścią ogonową jest niedostępny dla chymotrypsyny (108).

W kilku laboratoriach badano wpływ fosforylacji lekkiego łańcucha na jego zdolność wiązania jonów wapnia i magnezu i uzyskano rozbieżne wyniki. Jedni autorzy stwierdzili, że ufosforylowany łańcuch ma niższe powinowactwo do jonów wapnia (101, 109, 110). Natomiast inni autorzy (111) nie znaleźli różnic powinowactwa ufosforylowanej i zdefosforylowanej miozyny do tego kationu.

Na podstawie analizy spektralnej i analitycznego wirowania P e r s e c h i n i i R o w e (112) stwierdzili, że w zależności od stężenia jonów magnezu zmienia się ułożenie mostków poprzecznych w filamentach miozynowych. Autorzy ci postulują, że podobne zmiany konformacji filamentów mogą zachodzić w warunkach *in vivo*, ale pod wpływem innych czynników. Z kolei M r a k o v c i c - Z e n i c i R e i s l e r (113) przedstawili

wyniki badań wskazujące na to, że po fosforylacji lekkiego łańcucha fragment S_2 miozyny (por. ryc. 1) oddala się od osi filamentów i że podobny efekt dawało zwiększenie ujemnego ładunku na powierzchni cząsteczki miozyny, uzyskane dzięki podwyższeniu pH środowiska (114). Różna konformacja filamentów powoduje ich niejednakową rozpuszczalność w roztworach KCl (115). Nie wszyscy autorzy zgadzają się jednak z tym, że fosforylacja wpływa na polimeryzację miozyny i stabilność filamentów (110, 113).

Kąkol i wsp. obserwowali strukturę kompleksów HMM z aktyną zwanych grotami strzał (116). Zdefosforylowana HMM tworzyła szersze struktury o średnicy około 24 nm, natomiast ufosforylowana HMM węższe — o średnicy około 19 nm, co może potwierdzać możliwość powstawania różnej konformacji filamentów w zależności od zawartości fosforanu w lekkim łańcuchu. Kompleks ufosforylowanej HMM z aktyną (116) był podobny do kompleksu aktyny z fragmentem S_1 , pozbawionym łańcucha regulatorowego (117). Obserwacja ta może sugerować, że usunięcie z miozyny łańcucha regulatorowego wywołuje podobne zmiany konformacyjne, jak w przypadku fosforylacji.

Mimo rozbieżności wyników i ich interpretacji zaznacza się pełna zgodność poglądów co do tego, że nie tylko ufosforylowany, ale także nieufosforylowany enzym z mięśni szkieletowych ma wysoką aktywność ATPazową. Jest to najistotniejsza różnica we właściwościach miozyny mięśni szkieletowych a miozyny mięśni gładkich. Niektórzy autorzy twierdzą jednak, że aktywność ATPazy aktomiozynowej w ogóle nie zależy od stopnia ufosforylowania lekkiego łańcucha (22, 107), natomiast inni przedstawiają dane wskazujące, że w pewnych warunkach poziom tej aktywności zależy od fosforylacji 118—122).

I tak Pemrick wykazała, że fosforylacja lekkiego łańcucha zwiększa dwukrotnie aktywność ATPazy aktomiozynowej przy niższych stężeniach aktyny, chociaż maksymalna aktywność ufosforylowanej i zdefosforylowanej miozyny jest taka sama (121a). Kąkol i wsp. potwierdzili wyniki Pemrick, a ponadto pokazali, że fosforylacja wpływa różnie na aktywność miozyny w zależności od warunków środowiska — takich, jak stężenie KCl, jonów magnezu, ATP i pH (119, 120, 121). Autorzy ci stwierdzili, że np. w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, ufosforylowana miozyna miała mniejszą aktywność ATPazy i tworzyła filamety mniej stabilne od miozyny zdefosforylowanej.

Stwierdzono, że niezależnie od stopnia agregacji miozyny fosforylacja główek zachodzi w sposób nieuporządkowany (123), natomiast, że aktywność ATPazowa główek jest inna w filamentach, a inna w przypadku pojedynczej cząsteczki (123a, 124). Nasuwa to przypuszczenie, że obecność oddziaływań między cząsteczkami filamentu ma wpływ na reaktywność główek miozyny.

W celu zbadania roli fosforylacji w skurczu mięśni szkieletowych ozna-

czano zmiany zawartości fosforanu w miozynie, zachodzące w wyniku stymulacji prądem izolowanych mięśni. W każdym przypadku stwierdzono wzrost ufosforylowania lekkiego łańcucha miozyny: w mięśniach królika z 0.5 mola P_i przed skurczem do 0.9 mola P_i /mol łańcucha po stymulacji (125), w mięśniach szczura z 0.1 do 0.75 mola P_i (126), dwukrotną w mięśniach kurczęcia (127), w mięśniach żaby o 0.4 mola P_i (128) i o 0.5 mola P_i w mięśniach myszy (129). Jakkolwiek w czasie skurczu zachodzi wzrost poziomu ufosforylowania łańcucha regulatorowego, nie wyjaśniono jednoznacznie, jakie są następstwa tego procesu. Wyniki prac, w których próbowano to wyjaśnić, nie tworzą spójnego obrazu, a w niektórych przypadkach wręcz zaprzeczają sobie, tak jak to przedstawiono powyżej przy omawianiu wyników badań *in vitro*. I tak, niektórzy autorzy (126, 130) zaobserwowali zależność między wzmocnieniem siły skurczu a ufosforylowaniem lekkiego łańcucha. Natomiast inni nie znaleźli takiej zależności (131). Autorzy ci stwierdzili również, że pochodne fenotiazyny, hamujące skurcz mięśni gładkich, nie miały żadnego wpływu na wzrost napięcia w mięśniach szkieletowych. Ponadto, wykazano brak zależności między stopniem ufosforylowania łańcucha regulatorowego miozyny w izolowanych mięśniach szybkich myszy a szybkością skurczu i zużyciem energii chemicznej (132, 133). Jeszcze inne wyniki zaprezentowali Crow i Kushmerick (129), wskazując, że zużycie energii potrzebnej do utrzymania izometrycznego skurczu zmniejsza się równoległe ze wzrostem ufosforylowania lekkiego łańcucha. Może to świadczyć o obniżonej aktywności mostków poprzecznych i sugeruje, że fosforylacja miozyny może zmniejszać szybkość i siłę skurczu miofibryli szybkich w czasie wydłużonej pracy. Taka interpretacja jest zgodna ze stwierdzoną przez Kąkol i wsp. (118, 119) obniżoną aktywnością ATPazy ufosforylowanej miozyny w warunkach zbliżonych do fizjologicznych.

Obecność w mięśniach szkieletowych aktywnego systemu zdolnego do defosforylacji i zależnej od jonów wapnia fosforylacji lekkiego łańcucha sugeruje, że ta odwracalna modyfikacja miozyny ma znaczenie fizjologiczne. Nie udało się jednak dotychczas stwierdzić jednoznacznie, w jaki sposób uczestniczy ona w cyklu skurczowo-rozkurczowym mięśni szkieletowych. Omówione powyżej wyniki badań *in vitro* i *in vivo* wskazują, że fosforylacja nie bierze udziału w inicjacji skurczu, ale że może modulować siłę i napięcie kurczącego się mięśnia.

II-3. Miozyna mięśnia sercowego

Miozyna izolowana z mięśnia sercowego zawiera dwie pary lekkich łańcuchów, z których jedna ulega fosforylacji katalizowanej przez endogenną kinazę (134). Wcześniejsze doniesienie o fosforylacji ciężkiego łańcucha (135) nie zostało potwierdzone przez innych autorów (136, 137). Aktywność kinazy lekkiego łańcucha zależy od kalmoduliny i jonów wapnia (138).

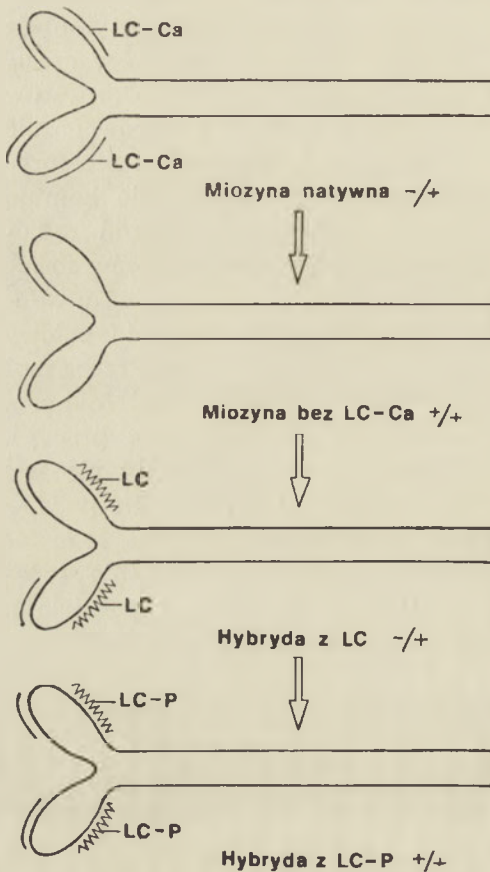
Stężenie tego enzymu w sercu jest kilkaset razy niższe niż w mięśniach szkieletowych i gładkich, chociaż stężenie fosfatazy wydaje się być podobne we wszystkich rodzajach mięśni (139). Poziom ufosforylowania miozyny *in situ* w sercu różnych ssaków wynosi około 0.5 P_i /mol lekkiego łańcucha i nie ulega zmianie pod wpływem adrenaliny, która stymuluje aktywność skurczową (136, 136a, 137). Poziom ten zmienia się w czasie pracy serca żółwia (137) oraz w sercu trenowanych ruchowo szczurów (137a). Ostatnio stwierdzono, że odblonione fibryle mięśnia sercowego nie wykazują zależności między napięciem skurczowym a stopniem ufosforylowania lekkich łańcuchów, oraz że pochodne fenotiazyny nie hamują skurczu tych mięśni. Perfuzja serca roztworami zawierającymi radioaktywny P_i umożliwiła obliczenie szybkości wypadkowej procesów fosforylacji i defosforylacji miozyny. W warunkach, w których stopień ufosforylowania lekkiego łańcucha pozostawał na tym samym poziomie, połowa reszt serynowych wymieniała fosforan w ciągu 3 minut (140). Proces modyfikacji miozyny jest więc znacznie wolniejszy od skurczu mięśnia sercowego, a zatem nie może mieć znaczenia w regulacji tego procesu. W warunkach *in vitro* fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny nie jest konieczna dla aktywności ATPazy aktomiozynowej (141, 142). Na podstawie obserwacji zebranych powyżej uznawany jest obecnie pogląd, że fosforylacja nie ma znaczenia w cyklu skurczowo-rozkurczowym mięśnia sercowego, chociaż nie wszyscy autorzy, np. (137, 137a, 142a) go podzielają.

III. Mięśnie bezkręgowców

Wiadomości na temat fosforylacji miozyny bezkręgowców są bardzo fragmentaryczne i ograniczone do mięśni kilku organizmów. Ustalono, że jeden z lekkich łańcuchów miozyny z *Limulus* ulega fosforylacji, i że proces ten jest bezwzględnie potrzebny do aktywacji ATPazy aktomiozynowej (143). Wykazano też, że odpowiedzialna za ten proces kinaza lekkiego łańcucha zawiera kalmodulinę jako podjednostkę regulatorową (143). Stwierdzono ponadto, że ufosforylowanie miozyny skrzypłocza *Limulus* powoduje skracanie się filamentów miozynowych, a defosforylacja — ich wydłużanie (144). O miozynie z szarańczy wiadomo jedynie, że jej lekki łańcuch ulega fosforylacji, ale nie jest znany efekt tego procesu na aktywność ATPazy aktomiozynowej (145).

Miozyna izolowana z mięśni małża przegrzebka (*Scallop*) stanowi, jak dotąd, jedyny dobrze udokumentowany przypadek cząsteczki nie ulegającej w ogóle fosforylacji — ani *in vivo*, ani *in vitro*. W nieobecności jonów wapnia lekki łańcuch regulatorowy tej miozyny hamuje centrum aktywne. Aktywacja ATPazy aktomiozynowej polega na bezpośrednim wiązaniu się jonów wapnia z tym łańcuchem (146—148, art. przegl. 17). Stwierdzono, że łańcuch regulatorowy miozyny przegrzebka — zlokalizowany w pobliżu

połączenia główki z ogonem — można usunąć z cząsteczki bez jej denaturacji (148) (Ryc. 7). W efekcie aktywność ATPazy takiej miozyny staje się wysoka nawet w nieobecności jonów wapnia. Na miejsce usuniętego łań-



Ryc. 7. Regulacja ATPazy aktomiozynowej przegrzebka (Scallop) i hybrydu zawierającego łańcuch miozyny mięśni gładkich. LC-Ca — łańcuch regulatorowy miozyny przegrzebka, LC i LC-P — zdefosforylowany i ufosforylowany łańcuch regulatorowy miozyny mięśni gładkich. -/+ oznacza niską aktywność ATPazy w nieobecności jonów wapnia i wysoką w obecności; +/+ oznacza wysoką aktywność niezależnie od stężenia jonów wapnia (wg. 146—148).

cucha można wprowadzić egzogenne łańcuchy regulatorowe innych miozyn, które determinują właściwości powstałego hybrydu. Cząsteczki zawierające łańcuch regulatorowy miozyny z mięśni szkieletowych, mają — niezależnie od stopnia ufosforylowania — takie same właściwości, jak miozyna przegrzebka pozbawiona łańcucha, tzn. aktywność ATPazy jest niewrażliwa na jony wapnia. Natomiast właściwości hybrydu zawierającego łańcuch z miozyny mięśni gładkich żołądka indyka zależą od stopnia ufosforylowania. Zdefosforylowany łańcuch hamuje aktywność ATPazy aktomiozynowej w nieobecności jonów wapnia. Natomiast fosforylacja tego łańcucha lub dodanie tych jonów odblokowuje to hamowanie. Powyższe wyniki wskazują, że w hybrydzie zawierającym łańcuch miozyny mięśni gładkich, podobnie jak w natywnej cząsteczce z tych mięśni, fosforylacja znosi hamujące działanie łańcucha regulatorowego. Na tej podstawie su-

geruje się, że rola jonów wapnia, polegająca na bezpośredniej aktywacji ATPazy aktomiozynowej przegrzebka, zanikła w toku ewolucji, a na jej miejsce pojawiła się fosforylacja zależna od jonów wapnia.

IV. Zmiany roli fosforylacji miozyny w toku ewolucji

1. System aktomiozynowy jest powszechnym i uniwersalnym mechanizmem ruchowym eukariontów, natomiast fosforylacja miozyny — najczęstszym sposobem regulującym aktywność tego systemu. Miozyna jest fosforylowana we wszystkich badanych komórkach eukariotycznych, z wyjątkiem mięśni małża przegrzebka. Fosforylacji ulegają albo ciężkie łańcuchy, albo lekkie łańcuchy regulatorowe lub też oba rodzaje łańcuchów jednocześnie. U pierwotniaków (*Protista*) fosforan jest zawsze przyłączany do ciężkiego łańcucha, a w niektórych przypadkach, również do łańcucha lekkiego (25). W komórkach zwierząt (*Animalia*) fosforylowany jest na ogół lekki łańcuch miozyny, a czasem również ciężki, jak np. w makroflagach, mózgu i komórkach białaczki szpikowej. W mięśniach bezkręgowców i kręgowców modyfikowane są w ten sposób wyłącznie lekkie łańcuchy. Na tej podstawie wysuwam przypuszczenie, że ewolucja procesu regulacji polegała między innymi na przeniesieniu miejsca fosforylacji z ciężkiego łańcucha na lekki łańcuch regulatorowy.

2. Regulatorowe reszty serynowe lekkiego łańcucha znajdują się w pobliżu połączenia główki z ogonem. We wszystkich badanych pod tym kątem przypadkach reakcję przyłączania do nich fosforanu katalizowała specyficzna kinaza zawierająca kalmodulinę jako podjednostkę regulatorową. Natomiast miejsca fosforylacji ciężkiego łańcucha znajdują się na końcu ogona miozyny. Nie wiele wiadomo o mechanizmach regulujących enzymy odpowiedzialne za ten proces. Jedyne w przypadku kinazy ciężkiego łańcucha miozyny *Dictyostelium* wykazano, że jako podjednostkę zawiera ona również kalmodulinę. Mając to na uwadze można zaryzykować przypuszczenie, że we wszystkich komórkach eukariotycznych poziom ufosforylowania miozyny zależy od jonów wapnia i kalmoduliny.

3. Fosforylacja wpływa na interakcję aktyny z miozyną, co objawia się różną aktywnością ATPazy aktomiozynowej. I tak, przyłączenie fosforanu do ciężkiego łańcucha stymuluje aktywność miozyny z *Physarum*, ale hamuje aktywność miozyny z *Acanthamoeba* i *Dictyostelium*. W obu przypadkach zmiana poziomu ufosforylowania ciężkiego łańcucha wydaje się być niezbędna dla zainicjowania zjawisk ruchowych tych organizmów.

Przyłączenie fosforanu do lekkiego łańcucha jest bezwzględnie konieczne do aktywacji ATPazy aktomiozynowej komórek niemięśniowych, mięśni bezkręgowców i mięśni gładkich kręgowców. W komórkach niemięśniowych zwierząt fosforylacja warunkuje zmiany kształtu i inne przejawy aktywności ruchowej. Podobne zjawisko zachodzi w mięśniach gładkich,

gdzie fosforylacja inicjuje skurcz. O ile jednak w mięśniach szkieletowych pełni ona funkcje modulujące cykl skurczowo-rozkurczowy, o tyle w mięśniu sercowym może nie mieć żadnego znaczenia. Z powyższych obserwacji wynika, że w czasie ewolucji naczelną rolę fosforylacji w regulacji ATPazy aktomiozynowej i zjawisk skurczowych ulegała ograniczeniu — aż do całkowitego jej zaniku.

4. Poziom ufosforylowania ciężkiego i lekkiego łańcucha określa konformację i stabilność filamentów. Np. aktywna forma miozyny mięśni gładkich czy grasicy tworzy stabilne filanty, w których cząsteczki są w konformacji 6S, natomiast forma nieaktywna (nieufosforylowana) depolimeryzuje w obecności ATP do monomerów 10S. W miozynie w tej konformacji zachodzą oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe, które umożliwiają utworzenie filamentów i które obniżają aktywność ATPazową. Jeśli nawet filanty zdefosforylowanej miozyny nie depolimeryzują *in situ*, to takie same oddziaływania mogą zachodzić pomiędzy różnymi cząsteczkami filamentu i w podobny sposób mogą wpływać na aktywność miozyny. Identyczne właściwości wykazują cząsteczki izolowane z takich komórek niemięśniowych, jak płytki krwi, komórki grasicy i tarczycy, których lekki łańcuch ulega fosforylacji. Przyłączenie fosforanu do ciężkiego łańcucha miozyny *Physarum*, *Acanthamoeba* i *Dictyostelium* wpływa w podobny sposób na konformację i zdolność do polimeryzacji, z tym jednak, że miozyna *Acanthamoeba* i *Dictyostelium* tworzy stabilne filanty w formie zdefosforylowanej, tj. tej, która wykazuje wysoką aktywność ATPazy, natomiast miozyna *Physarum* — ma te same własności — w formie ufosforylowanej. W mięśniach szkieletowych miozyna tworzy stabilne filanty o wysokiej aktywności ATPazy, niezależnie od formy łańcucha. Wszystkie te wyniki wskazują, że aktywność ATPazy i tworzenie filamentów są ze sobą sprzężone. Ta forma miozyny, która ma wysoką aktywność ATPazy tworzy stabilne filanty. Filanty formy nieaktywnej są nietrwale i depolimeryzują w obecności ATP. Prawidłowości te są niezależne od modyfikowanej podjednostki oraz bezpośredniego efektu fosforylacji na miozynie.

5. Opisane powyżej zjawisko wiąże się, jak sądzę, z różną specyfiką molekularnych mechanizmów skurczu, zależną od stabilności filamentów. Lokomocja ameb i śluzowców oraz ruch cytoplazmy w komórkach niemięśniowych zwierząt polegają na ciągłym odnawianiu się filamentów miozynowych (i aktynowych) w miejscach aktywnych ruchowo i depolimeryzacji tych filamentów w pozostałych rejonach komórki. Aktywność skurczowa zachodzi dzięki interakcji obu rodzajów filamentów i dlatego w komórkach niemięśniowych fosforylacja reguluje jednocześnie polimeryzację miozyny i jej zdolność do interakcji z aktyną. Wiele danych wskazuje na to, że w mięśniach gładkich ma miejsce podobna sytuacja, ale nie jest to wyjaśnione jednoznacznie, gdyż niejasne są zmiany stopnia agregacji miozyny *in situ* na różnych etapach cyklu skurczowo-rozkurczo-

wego. W mięśniach szkieletowych i sercowych fosforylacja traci natomiast funkcje procesu regulującego, gdyż filamenty miozynowe stają się stabilne i nie depolimeryzują w czasie rozkurczu (po defosforylacji). W mięśniach tych rolę regulującą pełni układ nieenzymatycznych białek połączonych z filamentem aktynowym: troponina i tropomiozyna.

6. We wszystkich przypadkach, z wyjątkiem mięśni szkieletowych i sercowych, poziom fosforylacji określał aktywność ATPazy aktomiozynowej, ale nie miał zasadniczego wpływu na powinowactwo miozyny do aktyny. Na tej podstawie proponuje się kinetyczny model regulacji zamiast modelu sterycznego, według którego zdefosforylowana podjednostka miałaby blokować wiązanie miozyny z aktyną. Inne systemy regulujące, np. układ troponina-tropomiozyna mięśni szkieletowych i sercowych, oddziałują również na kinetykę hydrolizy ATP, a nie na wiązanie między aktyną a miozyną. W związku z tym sądzę, że niektóre pierwotne mechanizmy regulujące współdziałanie aktyny z miozyną, zostały zachowane, mimo iż w toku ewolucji układ kurczliwy stawał się coraz bardziej zorganizowany i stabilny.

VI. Hipoteza filamentowej regulacji ATPazy aktomiozynowej za pośrednictwem fosforylacji

Opisane powyżej prawidłowości, a w szczególności wykazany związek między strukturą filamentów a aktywnością enzymatyczną pozwala rozszerzyć hipotezę o regulacji ATPazy aktomiozynowej z *Acanthamoeba* (25, 53, 149—151) na miozyny innych organizmów, niezależnie od podjednostki ulegającej fosforylacji. Sugeruje to, że filamentowa regulacja ATPazy może być mechanizmem uniwersalnym. Sposób jego działania mógłby być następujący. Fosforylowane miejsca regulatorowe na ciężkim lub na lekkim łańcuchu mogłyby wpływać na konformację połączeń zawiasowych miozyny. Zmiana konformacji rejonów zawiasowych mogłaby ograniczać lub umożliwiać ruch główek miozynowych i regulować szybkości cyklu przyłączania się ich i odłączania od aktyny. Dlatego też można sądzić, że utworzenie i właściwa konformacja bipolarnych filamentów miozynowych są niezbędne, nie tylko ze względu na mechanikę procesów skurczu, ale również na kinetykę hydrolizy ATP.

W przypadku fosforylacji części ogonowej miozyny oddziaływania między miejscami fosforylacji a rejonem zawiasowym dotyczą dwóch różnych częścieczek. Dlatego też powstanie stabilnych filamentów jest warunkiem niezbędnym dla ujawnienia się aktywności ATPazy aktomiozynowej i regulacji. Tylko w filamentach mogą bowiem zachodzić opisane oddziaływania międzycząsteczkowe. Natomiast miejsca fosforylacji lekkich łańcuchów mogą oddziaływać na zawiasy między głową a ogonem dwojako — w zależności od stopnia agregacji miozyny. Gdy miozyna jest

w postaci filamentów, oddziaływania te mogłyby zachodzić między różnymi cząsteczkami, natomiast w przypadku monomeru, oddziaływania zachodzić by mogły wewnątrz tej samej cząsteczki. Dzięki takiej możliwości obserwuje się regulację ATPazy aktomiozynowej przez fosforylację nie tylko w przypadku spolimeryzowanej miozyny, ale również dla jej form rozpuszczalnych (monomerów i fragmentu HMM).

Zaakceptowano do druku 29 kwietnia 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 405—420.
2. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
3. Mannherz H. G., Goody R. S., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 427—465.
4. Franzini-Armstrong C., Peachey L. D., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 166—186.
5. Huxley H. E., (1983), w: *Muscle and Nonmuscle Motility*, red. Stracher A., t. 1, str. 2—104, Academic Press, New York.
6. Drabikowski W., Kuźnicki J., (1985), w: *Horyzonty Współczesnej Biologii*, red. Ostrowski W., Wiedza Powszechna, w druku.
7. Kasman K., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 77—91.
8. Hinssen H., D'Haese J., Small J. V., Sobieszek A., (1978), *J. Ultrstr. Res.*, **64**, 282—302.
9. Pepe F. A., (1983), w: *Muscle and Nonmuscle Motility*, red. Stracher A., t. 1, str. 105—149, Academic Press, New York.
10. Eisenberg E., Greene L. E., (1980), *Ann. Rev. Physiol.*, **42**, 293—309.
11. Adelstein R. S., Eisenberg E., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 921—956.
12. Goody R. S., Holmes K. C., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 13—39.
13. Harvey S. C., Cheung H. C., (1982), w: *Cell and Muscle Motility*, red. Dowben R. M., Shay J. W., t. 2, str. 279—302, Plenum Press, New York i London.
14. Stępkowski D., Kąkol I., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 355—375.
15. Harrington W. F., Rodgers M. E., (1984), *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 35—73.
16. McLachlan A. D., (1984), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13**, 167—189.
17. Dąbrowska R., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 467—481.
18. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1979), *Zeszyty Naukowe UJ., Biol. Mol.* **6**, 9—22.
19. Kuźnicki L., Kuźnicki J., (1979), *Acta Protozool.*, **18**, 19—107.
20. Kendrick-Jones J., Scholey J. M., (1981), *J. Muscle Res. and Cell Motil.*, **2**, 347—372.
21. Dąbrowska R., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 125—145.
22. Cooke R., Stull J. T., (1981), w: *Cell and Muscle Motility*, red. Dowben R. M., Shay J. W., t. 1, str. 99—133, Plenum Press, New York i London.
23. Strzelecka-Gołaszewska H., (1982), *Post. Biol. Kom.*, **9**, 373—400.
24. Hartshorne D. J., (1982), *Cell and Muscle Motility*, red. Dowben R. M., Shay J. W., t. 2, str. 185—220, Plenum Press, New York i London.

- 24a. Walsh M. P., Hartshorne D. J., (1982) w: Calcium and Cell Function, red. Cheung W. Y., t. 3, str. 223—269, Academic Press, Inc., New York.
25. Kuźnicki J., (1985), *Post. Biochem.*, 32, 15—34.
26. Frearson N., Focant B. W. W., Perry S. V., (1976), *FEBS Lett.*, 63, 27—32.
27. Jakes R., Northrop F., Kendrick-Jones J., (1976), *FEBS Lett.*, 70, 229—234.
28. Sobieszek A., (1977), w: The Biochemistry of Smooth Muscle, red. Stephens N. L., str. 413—443, University Park Press, Baltimore.
29. Dąbrowska R., Sherry J. M. F., Aromatorio D. K., Hartshorne D. J., (1978), *Biochemistry*, 17, 253—258.
30. Adelstein R. S., Conti M. A., Hathaway D. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 8347—8350.
31. Silver P. J., DiSalvo J., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 9951—9954.
32. Bhalla R. C., Sharma R. V., Gupta R. C., (1982), *Biochem. J.*, 203, 583—592.
33. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1980), *Post. Biochem.*, 26, 265—290.
34. Górecka A., Aksoy M. O., Hartshorne D. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 71, 325—331.
35. Small J. V., Sobieszek A., (1977), *Eur. J. Biochem.*, 76, 521—530.
36. Ikebe M., Onishi H., Watanabe S., (1977), *J. Biochem.*, 82, 299—302.
37. Persechini A., Hartshorne D. J., (1981), *Science*, 213, 1383—1385.
38. Persechini A., Hartshorne D. J., (1983), *Biochemistry*, 22, 470—476.
39. Ikebe M., Ogiwara S., Tonomura Y., (1982), *J. Biochem.*, 91, 1809—1812.
40. Sellers J. R., Chock P. B., Adelstein R. S., (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 14181—14188.
41. Merkel L., Meisheri K. D., Pfitzer G., (1984), *Eur. J. Biochem.*, 138, 429—434.
42. Adelstein R. S., Sellers J. R., Conti M. A., Pato M. D., de Lanerolle P., (1982), *Fed. Proc.*, 41, 2873—2878.
43. Hammer J. A. III, Sellers J. R., Korn E. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 3224—3229.
44. Sellers J. R., Eisenberg E., Adelstein R. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 13880—13883.
45. Tuazon P. T., Traugh J. A., (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 541—546.
46. Chacko S., Conti M. A., Adelstein R. S., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 129—133.
47. Mrwa U., Troschka M., Gros C., Katziński L., (1980), *Eur. J. Biochem.*, 103, 415—419.
48. Chacko S., Rosenfeld A., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 292—296.
49. Frederiksen D. W., (1982), w: Cell and Muscle Motility, red. Dowben R. M., Shay J. W., t. 2, str. 239—243, Plenum Press, New York i London.
50. Kaminski E. A., Chacko S., (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 9104—9108.
51. Ikebe M., Barsotti R. J., Hinkins S., Hartshorne D. J., (1984), *Biochemistry*, 23, 5062—5068.
52. Kasai M., Watanabe S., (1982), *J. Biochem.*, 91, 1907—1915.
53. Ebashi S., (1983), w: Cell and Muscle Motility, red. Dowben R. M., Shay J. W., t. 3, str. 79—87, Plenum Press, New York i London.
54. Mikawa T., Nonomura Y., Ebashi S., (1977), *J. Biochem.*, 82, 1789—1791.

55. Ebashi S., Nonomura Y., Nakamura S., Nakasone H., Kohama K., (1982), *Fed. Proc.*, **41**, 2863—2867.
56. Kuźnicki J., Korn E. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9302—9307.
57. Onishi H., Wakabayashi T., (1982), *J. Biochem.*, **92**, 871—879.
58. Trybus K. M., Huiatt T. W., Lowey S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6151—6155.
59. Suzuki H., Onishi H., Takahashi K., Watanabe S., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 1529—1542.
60. Craig R., Smith R., Kendrick-Jones J., (1983), *Nature*, **302**, 436—439.
61. Suzuki H., Suzuki S., Watanabe S., (1981), *J. Biochem.*, **89**, 871—878.
62. Onishi H., (1982), *J. Biochem.*, **91**, 157—166.
63. Kumon A., Yasuda S., Murakami N., Matsumura S., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **140**, 265—271.
64. Trybus K. M., Lowey S., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8564—8571.
65. Ikebe M., Hinkins S., Hartshorne D. J., (1983), *Biochemistry*, **22**, 4580—4587.
66. Ikebe M., Hartshorne D. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11639—11647.
67. Onishi H., Wakabayashi T., (1984), *J. Biochem.*, **95**, 903—905.
68. Onishi H., Watanabe S., (1984), *J. Biochem.*, **95**, 899—902.
69. Ikebe M., Hinkins S., Hartshorne D. J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14770—14773.
70. Janis R. A., Barany K., Barany M., Sarmiento J. G., (1981), *Mol. Physiol.*, **1**, 3—11.
71. Silver P. J., Stull J. T., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6145—6150.
72. de Lanerolle P., Condit J. R. jr., Tanenbaum M., Adelstein K. S., (1982), *Nature*, **298**, 871—873.
73. Aksoy M. O., Murphy R. A., Kamm K. E., (1982), *Am. J. Physiol.*, **242**, C109—C116.
74. Butler T. M., Siegman M. J., Mooers S. U., (1983), *Am. J. Physiol.*, **243**, C234—C242.
75. Hoar P. E., Kerrick W. G. L., Cassidy P. S., (1979), *Science*, **204**, 503—506.
76. Janis R. A., Moats-Staats B. M., Gualtieri R. T., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **96**, 265—270.
77. Cassidy P. S., Hoar P. E., Kerrick W. G. L., (1980), *Pflügers Arch.*, **387**, 115—120.
78. Cassidy P. S., Kerrick W. G. L., Hoar P. E., Malencik D. A., (1981), *Pflügers Arch.*, **392**, 115—120.
79. Silver P. J., Stull J. T., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6145—6150.
80. Silver P. J., Stull J. T., (1983), *Mol. Pharmacol.*, **23**, 665—670.
81. Cassidy P., Hoar P. E., Kerrick W. G. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11148—11153.
82. Kerrick W. G. L., Hoar P. E., Cassidy P. S., (1980), *Fed. Proc.*, **39**, 1558—1563.
83. Walsh M. P., Brindenbaugh R., Hartshorne D. J., Kerrick W. G. L., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5987—5990.
84. Walsh M. P., Brindenbaugh R., Kerrick W. G. L., Hartshorne D. J., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 45—50.
85. Gagelmann M., Mrwa U., Bostrom S., Rüegg J. C., Hartshorne D., (1984), *Pflügers Arch.*, **401**, 107—109.

86. Driska S. P., Aksoy M. O., Murphy R. A., (1981), *Am. J. Physiol.*, **240**, C222—C233.
87. Dillon P. F., Aksoy M. O., Driska S. P., Murphy R. A., (1981), *Science*, **211**, 495—497.
88. Dillon P. F., Murphy R. A., (1982), *Am. J. Physiol.*, **242**, C102—C108.
89. Anderson J. M., Gimbrone M. A., jr, A. R. Wayne, (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4693—4696.
90. Murphy R. A., (1982), *Hypertension* (Supp. II), **4**, II-3—II-7.
91. Murphy R. A., Aksoy M. O., Dillon P. F., Gerthoffer W. T., Kamm K. E., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 51—56.
92. Aksoy M. O., Murphy R. A., Kamm K. E., (1982), *Am. J. Physiol.*, **242**, C109—C116.
93. Sobue K., Morimoto K., Inui M., Kanda K., Kakiuchi S., (1982), *Biom. Res.*, **3**, 188—196.
- 93a. Marston S. B., (1982), *Prog. Biophys., mol. Biol.*, **41**, 1—41.
94. Somlyo A. V., Butler T. M., Bond M., Somlyo A. P., (1981), *Nature*, **294**, 567—569.
95. Fay F. S., Cooke P. H., (1973), *J. Cell Biol.*, **56**, 399—411.
96. Schoenberg C. F., (1973), *Phil. Trans.*, **265**, 197—202.
97. Ohashi M., Nonomura Y., (1979), *Cell Struct. Function*, **4**, 325—329.
98. Cande W. Z., Tooth P. J., Kendrick-Jones J., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 1062—1071.
99. Perrie W. T., Smillie L. B., Perry S. V., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 151—164.
100. Strzelecka-Gołaszewska H., Piwowar U., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 517—557.
101. Alexis M. N., Gratzner W. B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2319—2325.
102. Kendrick-Jones J., Jakes R., (1976), *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 281—284.
103. Pires E., Perry S. V., Thomas M. A. W., (1974), *FEBS Lett.*, **41**, 292—296.
104. Yagi K., Yazawa M., Kakiuchi S., Ohshima M., Uenishi K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1338—1340.
105. Baryko B., Kuźnicki J., Drabikowski W., (1978), *FEBS Lett.*, **90**, 301—304.
106. Nairn A. C., Perry S. V., (1979), *Biochem. J.*, **179**, 89—97.
107. Morgan M., Perry S. V., Ottaway J., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 687—697.
108. Ritz-Gold C. J., Cooke R., Blumenthal D. K., Stull J. T., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 204—214.
109. Okamoto Y., Yagi K., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 111—120.
110. Kardami E., Gratzner W. B., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1186—1191.
111. Holroyde M. J., Potter J. D., Solaro R. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6478—6482.
112. Persechini A., Rowe A. J., (1984), *J. Mol. Biol.*, **172**, 23—39.
113. Mrakovčić-Zenic A., Reislner E., (1983), *Biochemistry*, **22**, 525—530.
114. Ueno H., Harrington W. F., (1981), *J. Mol. Biol.*, **149**, 619—640.
115. Kąkol I., Stępkowski D., Szczesna D., (1984), *Post. Biol. Kom.*, **11**, 561—563.
116. Stępkowski D., Osińska H., Szczesna D., Wrotek M., Kąkol I., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **830**, 337—340.

117. Craig R., Szent Györgyi A. G., Beese L., Flicker P., Vibert P., Cohen C., (1980), *J. Mol. Biol.*, **140**, 35—55.
118. Stępkowski D., Szczesna D., Wrotek M., Kąkol I., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **831**, 321—329.
119. Stępkowski D., Szczesna D., Kąkol I., (1984), *Postępy Biol. Kom.*, **11**, 559—560.
120. Michnicka M., Kasman K., Kąkol I., (1982), *Biochim., Biophys. Acta*, **704**, 470—475.
121. Cardinaud R., Kąkol I., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **832**, 80—88.
- 121a. Pemrick S. M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8836—8841.
122. Kąkol I., Kasman K., Michnicka M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 437—443.
123. Persechini A., Stull J. T., (1984), *Biochemistry*, **23**, 4144—4150.
- 123a. Maruyama K., Gergely J., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1095—1099.
124. Bechet J.-J., d'Albis A., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **146**, 117—123.
125. Stull J. T., High Ch. W., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1078—1083.
126. Manning D. R., Stull J. T., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 164—170.
127. Hager S. R., Barany M., Barany K., Homa F. L., (1979), *Mol. Physiol.*, **2**, 121—132.
128. Barany K., Barany M., Gillis J. M., Kushmerick M. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3617—3623.
129. Crow M. T., Kushmerick M. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2121—2124.
130. Klug G. A., Botterman B. R., Stull J. T., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4688—4690.
131. Kerrick W. G. L., Hoar P. E., Cassidy P. S., (1980), *Fed. Proc.*, **39**, 1558—1563.
132. Butler T. M., Siegman M. J., Moores S. U., Barsotti R. J., (1983), *Science*, **220**, 1167—1169.
133. Barsotti R. J., Butler T. M., (1984), *J. Muscle Res. Cell Mot.*, **5**, 45—64.
134. Frearson N., Perry S. V., (1975), *Biochem. J.*, **151**, 99—107.
135. McPherson J., Fenner C., Smith A., Mason D. T., Wikman-Coffelt J., (1974), *FEBS Lett.*, **47**, 149—154.
136. Jeacocke S. A., England P. J., (1980), *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 364—365.
- 136a. Holroyde M. J., Small D. A. P., Howe E., Solaro R. J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 628—637.
137. Sayers S. T., Barany K., (1983), *FEBS Lett.*, **154**, 305—310.
- 137a. Resink T. J., Gevers W., Noakes T. D., (1981), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **13**, 753—765.
138. Walsh M. P., Vallet B., Autric F., Demaille J. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 12136—12144.
139. Stull J. T., Blumenthal D. K., Miller J. R., DiSalvo J., (1982), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **14**, Suppl. 3, 105—110.
140. England P. J., Jeacocke S. A., Huggins J. P., Mills D., Pask H. T., (1983), *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 153.
141. Winegrad S., McClellan G., Horowitz R., Tucker M., Liner-Lin, Weisberg A., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 39—44.
142. Perry S. V., Cole H. A., Frearson N., Moir A. J. G., Nairn A. C., Solaro R., (1978), *Proc. XII FEBS Meeting, Dresden* **54**, 147—159.

- 142a. Zimmer M., Göbel C., Hofmann F., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **139**, 295—301.
143. Sellers J. R., Harvey E. V., (1984), *Biochemistry*, **23**, 5821—5826.
144. Brann L., Dewey M. M., Baldwin E. A., Brink P., Walcott B., (1979), *Nature*, **279**, 256—257.
145. Winkelman L., Bullard B., (1980), *J. Muscle Res. Cell. Motility*, **1**, 221—222.
146. Sellers J. R., Chantler P. D., Szent-Györgyi A. G., (1980), *J. Mol. Biol.*, **144**, 223—245.
147. Kendrick-Jones J., Cande W. Z., Tooth P. J., Smith R. C., Scholey J. M., (1983), *J. Mol. Biol.*, **165**, 139—162.
148. Kendrick-Jones J., Lehman W., Szent-Györgyi A. G., (1970), *J. Mol. Biol.*, **54**, 313—326.
149. Kuźnicki J., Albanesi J. P., Cote G. P., Korn E. D., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 6011—6014.
150. Kuźnicki J., Atkinson M. A. L., Korn E. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9308—9313.
151. Kuźnicki J., Cote G. P., Bowers B., Korn E. D., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1967—1972.

Addendum

Na str. 36, 41, 44 i 50 dyskutowano problem różnej stabilności filamentów miozynowych w mięśniach gładkich, *in situ*, w zależności od stopnia ufosforylowania miozyny. Obecnie przeważa pogląd, iż filanty te nie depolimeryzują *in vivo*, po defosforylacji miozyny.

W artykule Review Retter-Hypothesis „Phosphorylation of myosin in non-muscle and smooth muscle cells. Possible rules and evolutionary trends” — (1986) *FEBS Lett.* **204**, 169—176, opisałem niektóre problemy dotyczące procesu fosforylacji miozyny.

ZDZISŁAW A. WOJCIECHOWSKI *

Białkowe aktywatory biosyntezy i metabolizmu cholesterolu

Protein activators of cholesterol biosynthesis and metabolism

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Występowanie i właściwości cytosolowych białek aktywujących biosyntezę cholesterolu
 - II-1. Białko przenoszące skwalen i sterole
 - II-2. Białko₁ i białko₂ przenoszące sterole
 - II-3. Inne cytosolowe aktywatory biosyntezy cholesterolu
 - II-4. Występowanie białek przenoszących sterole w różnych tkankach
- III. Funkcje biologiczne
 - III-1. Modulowanie przekształcenia skwalenu w cholesterol
 - III-2. Aktywacja metabolizmu cholesterolu do pregnenolonu
 - III-3. Udział białek przenoszących sterole w innych procesach
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Distribution and properties of cytosolic protein activators of cholesterol biosynthesis
 - II-1. Squalene and sterol carrier protein
 - II-2. Sterol carrier protein₁ and sterol carrier protein₂
 - II-3. Other cytosolic activators of cholesterol biosynthesis
 - II-4. Occurrence of sterol carrier proteins in various tissues
- III. Biological functions
 - III-1. Modulation of cholesterol biosynthesis from squalene
 - III-2. Activation of cholesterol interconversion to pregnenolone
 - III-3. Role of sterol carrier proteins in other processes
- IV. Final remarks

I. Wprowadzenie

Wiadomo już od stosunkowo dawna (1—10), że przemiana skwalenu w cholesterol, katalizowana przez błonowe enzymy retikulum endoplazmatycznego, zachodzi efektywnie w warunkach *in vitro* jedynie w obecności frakcji białek rozpuszczalnych cytosolowych. Białka tej frakcji, choć same

*) Prof. dr hab., Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, 02-089 Warszawa, al. Żwirki i Wigury 93.

nie katalizują żadnej z reakcji szlaku skwalen \rightarrow cholesterol, wybitnie wzmagają szybkość syntezy cholesterolu przez izolowane mikrosomy.

Przekształcenie skwalenu w cholesterol jest złożonym, wieloetapowym procesem, w którym uczestniczy około 20 białek enzymatycznych i w którym można wyróżnić kilka ważnych etapów (11, 12):

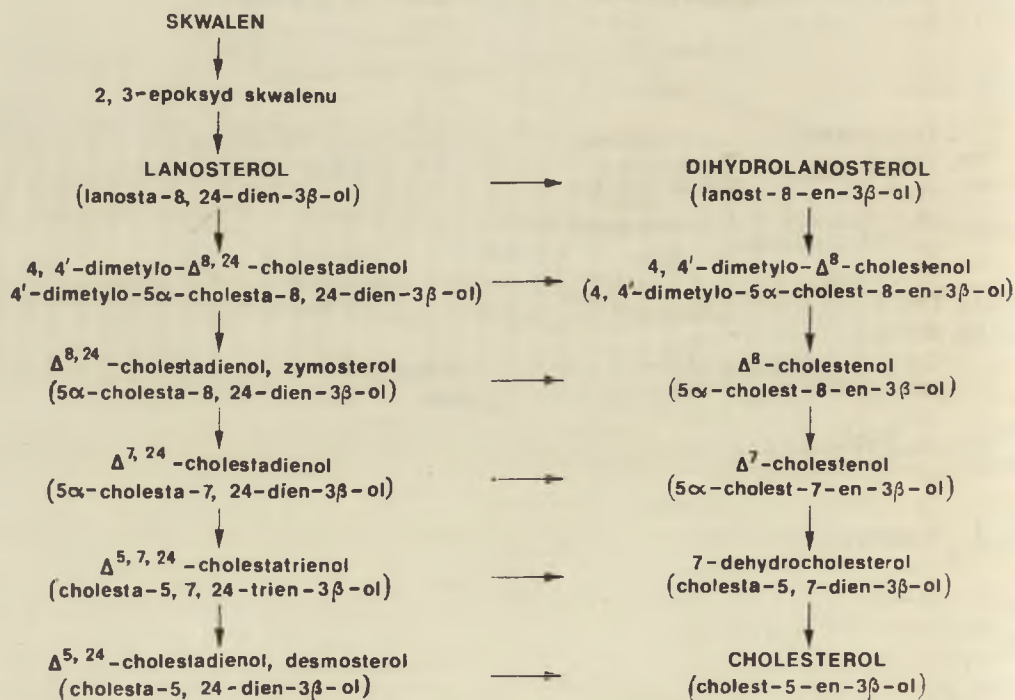
— utlenienie acyklicznego prekursora — skwalenu do 2,3-epoksydu i cyklizacja tego produktu utlenienia do lanosterolu (C_{30}).

— kolejne usunięcie trzech grup metylowych (grupy metylowe w pozycji 14 α , 4 α i 4 β cząsteczki lanosterolu) poprzez ich utlenienie i następną dekarboksylację w wyniku czego powstają związki o szkielecie cholesterolu (C_{27}).

— izomeryzacja a następnie uwodornienie wiązania podwójnego występującego pierwotnie w cząsteczce lanosterolu w pozycji Δ^8 i odwodornianie prowadzące do wytworzenia nowego wiązania podwójnego w pozycji Δ^5 .

— uwodornienie wiązania podwójnego Δ^{24} występującego w łańcuchu bocznym pierwotnego produktu cyklizacji, tj. lanosterolu.

Uproszczony schemat biosyntezy cholesterolu ze skwalenu, przedstawiający najbardziej prawdopodobną sekwencję zachodzących reakcji enzymatycznych (11, 12), podany jest na Ryc. 1.



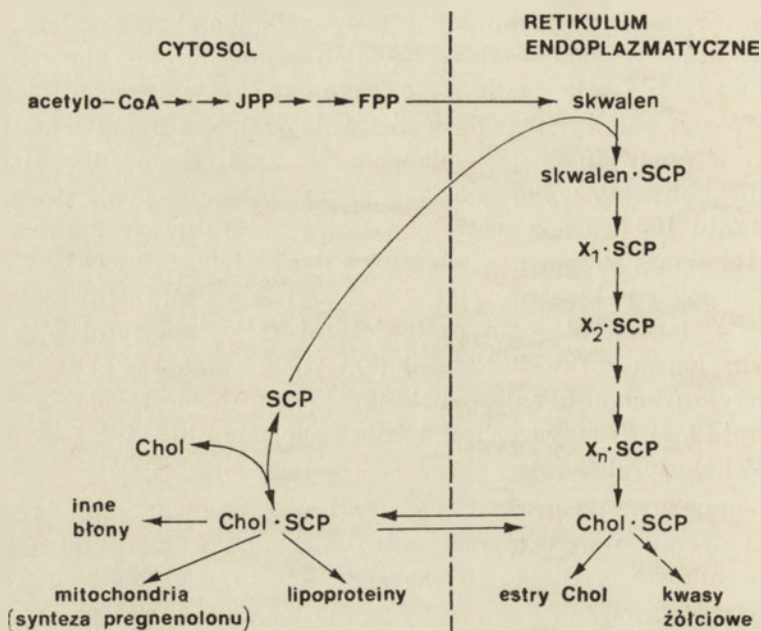
Ryc. 1. Biosynteza cholesterolu ze skwalenu w błonach retikulum endoplazmatycznego komórek wątroby. Uwzględniono postulowaną wielotorowość zachodzących reakcji (12). W nawiasach podano zalecane nazwy poszczególnych metabolitów.

Przeprowadzone w kilku laboratoriach badania zmierzające do wyjaśnienia, które z reakcji szlaku skwalen \rightarrow lanosterol \rightarrow cholesterol wymagają współdziałania białkowego czynnika cytosolowego (białkowych czynników cytosolowych) doprowadziły do wniosku o uniwersalnej jego (ich) roli w omawianych przemianach. Stosując odpowiednie, izotopowo znakowane substraty wykazano m.in. znaczne stymulowanie przez frakcję supernatantu 105 000 g z wątroby szczura katalizowanych przez mikrosomy z tej samej tkanki przemian: skwalen \rightarrow lanosterol (13—17), skwalen \rightarrow 2,3-epoksyd skwalenu (17—18), 2,3-epoksyd skwalenu \rightarrow lanosterol (3, 19—22), lanosterol \rightarrow dihydrolanosterol (21), lanosterol \rightarrow C₂₇-sterole (5), dihydrolanosterol \rightarrow cholesterol (7), Δ^8 -cholestenol \rightarrow cholesterol (22), 4,4'-dimetylo- Δ^8 -cholestenol \rightarrow cholesterol (7), Δ^7 -cholestenol \rightarrow 7-dehydrocholesterol (3, 4), 7-dehydrocholesterol \rightarrow cholesterol (3, 4, 23, 24) i desmosterol \rightarrow cholesterol (3, 5).

Omówione wyżej dane doprowadziły do sformułowania hipotezy (9—11) o występowaniu wśród rozpuszczalnych białek komórki specyficznego białka nośnikowego. Białko to określane często jako białko przenoszące sterole (*sterol carrier protein*, SCP) pełnić ma, w procesie przekształcania skwalenu w cholesterol funkcję podobną do funkcji białka przenoszącego reszty acylowe (*acyl carrier protein*, ACP) w procesie biosyntezy kwasów tłuszczowych, katalizowanym przez enzymatyczny kompleks syntetazy kwasów tłuszczowych. Uważano, że białko przenoszące sterole zawiera:

- domenę hydrofobową zdolną do niekowalencyjnego wiązania skwalenu, cholesterolu i metabolitów pośrednich szlaku skwalen \rightarrow cholesterol;
- rejon hydrofilowy umożliwiający tworzenie kompleksu z błoną retikulum endoplazmatycznego;
- ewentualne miejsca wiążące nukleotydy nikotynoamidoadeninowe lub inne niezbędne kofaktory, co umożliwiłoby właściwe usytuowanie przestrzenne wbudowanego w błonę enzymu, substratu (substratów) i niezbędnego kofaktora (kofaktorów), a także bezpośrednie przekazywanie hydrofobowego produktu reakcji na centrum aktywne enzymu katalizującego kolejną przemianę (9—11).

Podjęte w ostatnich latach próby wyizolowania białek przenoszących sterole i ich bliższego scharakteryzowania przyniosły wiele interesujących danych. Mimo istniejących nadal niejasności i kontrowersji badania te potwierdzają istotną rolę tych białek w regulowaniu mikrosomalnego szlaku syntezy cholesterolu. Co więcej, szereg danych wskazuje na ich bardziej uniwersalną rolę w metabolizmie cholesterolu do kwasów żółciowych (25, 26) i hormonów sterydowych (27—32), w procesie estryfikowania cholesterolu kwasami tłuszczowymi (33—36), a być może również w wewnątrzkomórkowym transporcie cholesterolu (36, 37). Hipotetyczną rolę białka przenoszącego sterole w biosyntezie i metabolizmie cholesterolu przedstawia Ryc. 2.



Ryc. 2. Hipotetyczne funkcje białek przenoszących sterole (SCP) w biosyntezie, transporcie i przemianach cholesterolu (Chol). X₁, X₂, X_n — metabolity pośrednie na drodze skwalen → cholesterol, IPP — pirofosforan izopentenyli, FPP — pirofosforan farnezyli.

II. Występowanie i właściwości cytosolowych białek aktywujących biosyntezę cholesterolu

Równoległe prace kilku laboratoriów, mimo, że prowadzone w większości przypadków na tym samym materiale, tj. komórkach wątroby szczura, doprowadziły do wyodrębnienia kilku białek cytosolowych o dość odmiennych właściwościach, z których każde wykazywało zdolność stymulowania co najmniej niektórych reakcji na szlaku przemian skwalen → cholesterol katalizowanych przez enzymy frakcji mikrosomalnej. Ważniejsze z nich zostaną omówione kolejno niżej. W Tabeli 1 zebrano podstawowe informacje odnośnie ich właściwości.

II-1. Białko przenoszące skwalen i sterole

Białko przenoszące skwalen i sterole (*squalene and sterol carrier protein*, SCP), wyodrębnione przez Dempsey i współpracowników (2, 10, 38, 39), było pierwszym z bliżej poznanych białek cytosolowych aktywujących mikrosomalną syntezę cholesterolu ze skwalenu. Nadana mu nazwa odzwierciedla zdolność do niekowalencyjnego wiązania

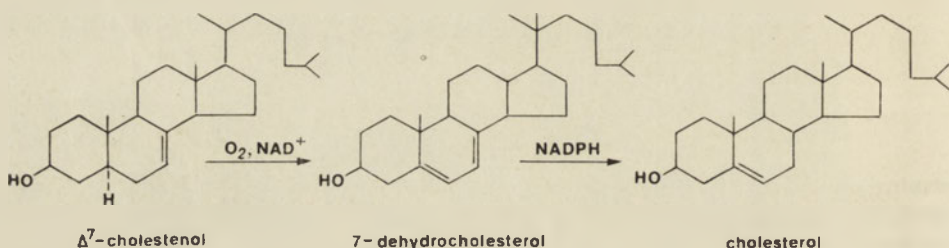
Tabela 1.

Białka cytosolowe z wątroby szczura aktywujące katalizowaną przez frakcję mikrosomalną przemianę skwalenu do cholesterolu

Nazwa i przyjęte oznaczenie literowe	Oczyszczenie (x)	Masa cząsteczkowa	Stymulowana reakcja	Wybrane piśmiennictwo
Białko przenoszące skwalen i sterole (<i>squalene and sterol carrier protein, SCP</i>)	10,5	14 000 (pojedynczy łańcuch)	Δ^7 -cholestenol \rightarrow 7-dehydrocholesterol, 7-dehydrocholesterol \rightarrow cholesterol	2,10,38—40
Białko ₁ przenoszące sterole (<i>sterol carrier protein₁, SCP₁</i>)	575	26 000 (dwie jednostki)	skwalen \rightarrow lanosterol	6,14,59—61
Białko ₂ przenoszące sterole (<i>sterol carrier protein₂, SCP₂</i>)	1 326	13 500—15 000 (pojedynczy łańcuch)	4,4'-dimetylo- Δ^8 -cholestenol \rightarrow C ₂₇ -sterole, 7-dehydrocholesterol cholesterol	23,24,62
Cytosolowy czynnik białkowy (<i>supernatant protein factor, SPF</i>)	11 000	47 000	skwalen \rightarrow 2,3-epoksyd skwalenu, 2,3-epoksyd skwalenu \rightarrow lanosterol	17,18,20,64
Cytosolowy modulator mikrosomalnej oksydazy 4-metylosteroli	192	20 600 (dwie podjednostki)	4,4'-dimetylo- Δ^7 -cholestenol \rightarrow 4 α -metylo- Δ^7 -cholestenol, 4 α -metylo- Δ^7 -cholestenol \rightarrow Δ^7 -cholestenol	8,25,36,65—67
Białko przenoszące lipidy (niespecyficzne)	10 000	12 300 (pojedynczy łańcuch)	Δ^7 -cholestenol \rightarrow 7-dehydrocholesterol, 7-dehydrocholesterol \rightarrow cholesterol	36

skwalenu, cholesterolu i licznych metabolitów pośrednich. Białko to o m. cz. około 14 000 (pojedynczy łańcuch polipeptydowy), łatwo tworzące agregaty o m. cz. $> 150\ 000$, oczyszczono do elektroforetycznej homogenności. Występuje ono w cytosolu wątroby szczura w dużej ilości stanowiąc nawet do 8—10% ogółu białek rozpuszczalnych (38, 40). Stężenie SCP w komórkach wątroby szczura podlega jednak dość znacznym wahaniom przebiegającym w rytmie okołodobowym (41, 42).

Natywne SCP zawiera na mol białka 2 mole kwasów tłuszczowych (kwasy stearynowy i palmitynowy), z których co najmniej połowa związana jest z białkiem kowalencyjnie. Białko to wybitnie aktywuje enzymy uczestniczące w końcowych przemianach na szlaku skwalen \rightarrow cholesterol a mianowicie enzymy katalizujące reakcje odwodorowania Δ^7 -cholestenolu do 7-dehydrocholesterolu i redukcji tego ostatniego do cholesterolu (Ryc. 3)



Ryc. 3. Mechanizm katalizowanej przez frakcję błon mikrosomalnych przemiany Δ^7 -cholestenolu w cholesterol.

nie ma natomiast, jak się wydaje, istotnego wpływu na cyklizację skwalenu i proces demetylowania lanosterolu (2, 38, 43—47).

Najnowsze badania (38, 40, 48—50), wskazują na tożsamość SCP z wyodrębnionym z wątroby szczura przez innych autorów (48, 51) tzw. białkiem wiążącym kwasy tłuszczowe (*fatty acid binding protein*, FABP). Białku FABP, które znane jest także pod nazwą białka Z (52, 53), przypisuje się udział w regulowaniu licznych procesów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych (54, 55, 56). Białko to stymuluje m.in. mikrosomalną acylotransferazę acylo-CoA: glicerofosforan (55) i zachodzącą w mitochondriach β -oksydację kwasów tłuszczowych (56). Uważa się także, że pełni ono funkcję białka nośnikowego w odwracaniu hamowania karboksylazy acetylo-CoA przez palmitylo-CoA (54). Oprócz zdolności wiązania skwalenu, cholesterolu i innych steroli (44, 46, 57) białko SCP ma zdolność wiązania wolnych kwasów tłuszczowych, acylowych pochodnych koenzymu A, bilirubiny, organicznych anionów i szeregu innych związków drobnocząsteczkowych. Przeprowadzone ostatnio badania przy zastosowaniu sterolowych sond fluorescencyjnych w postaci dehydroergosterolu (ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol) i cholestatrienolu (cholesta-5,7,9(11)-trien-3 β -ol) wykazały, że 1 mol SCP wiąże maksymalnie 1 mol

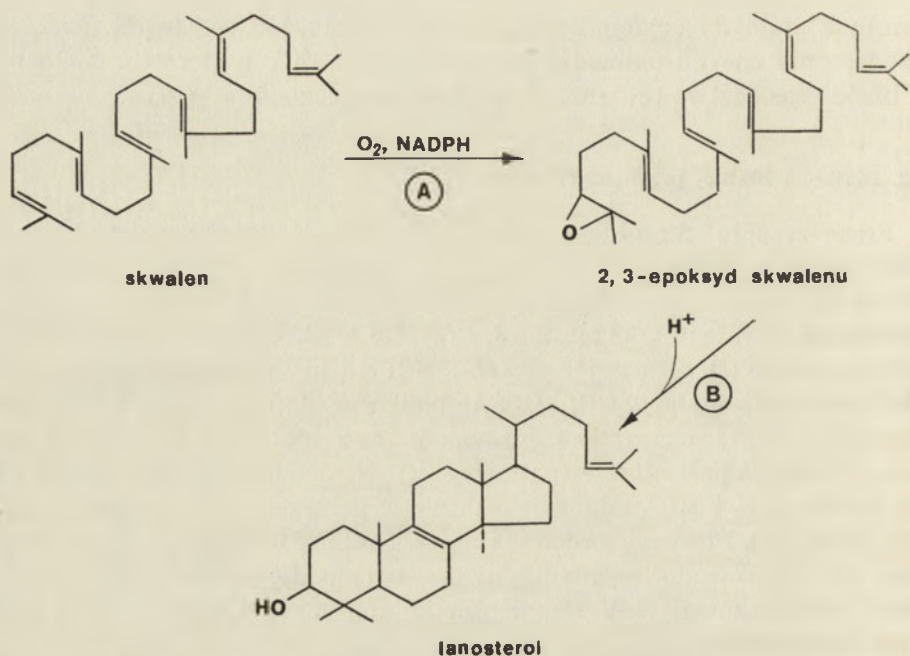
sterolu a stała dysocjacji kompleksu ma wartość 0.5—0.9 μM . Badania przenoszenia energii pomiędzy resztą tyrozyny SCP a sterolem wskazują na bliskie sąsiedztwo tej reszty i miejsca wiążącego sterol (57).

II-2. Białko₁ i białko₂ przenoszące sterole

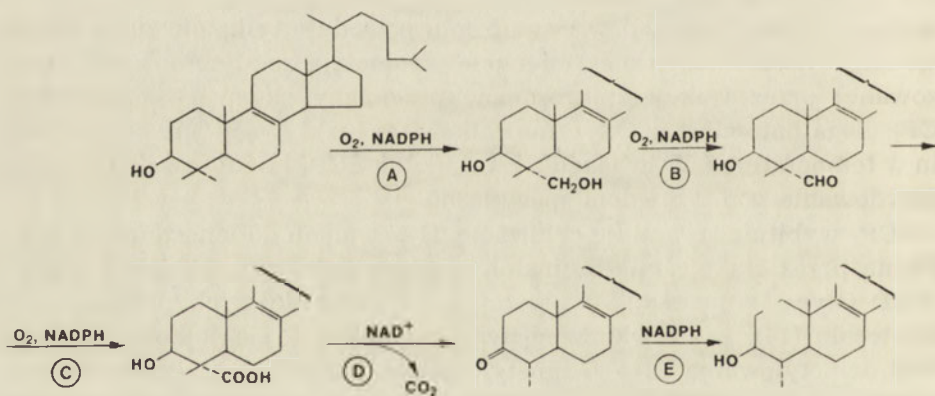
Prace zespołu Scallena (3, 9, 22, 59—61) doprowadziły do konkluzji, że w wątrobie szczura występują co najmniej 2 różne białka cytosolowe niezbędne dla katalizowanego przez frakcję mikrosomalną przekształcenia skwalenu w cholesterol. Przyjęto je określać jako białko₁ przenoszące sterole (*sterol carrier protein₁*, SCP₁) i białko₂ przenoszące sterole (*sterol carrier protein₂*, SCP₂). Oba te białka występują, w odróżnieniu od wyodrębnionego i scharakteryzowanego przez zespół Dempsey białka przenoszącego skwalen i sterole (patrz wyżej), w niewielkich ilościach (9, 14, 24). Białka SCP₁ i SCP₂ udało się ostatnio w pełni oddzielić i wysoko oczyścić (14, 23, 24). Pierwsze z nich ma m. cz. około 26 000 i dysocjuje w obecności 6M chlorowodoru guanidyny na dwie podjednostki o identycznej masie cząsteczkowej (14). Drugie białko ma masę cząsteczkową 13 500 i jest zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (23, 24). Białka SCP₁ i SCP₂ różnią się dość znacznie wrażliwością na podwyższoną temperaturę, co zresztą wykorzystano dla ich pełnego oddzielenia (24). Białko SCP₂ jest stosunkowo termostabilne, szczególnie po oczyszczeniu. Ogrzewanie w temperaturze 90° w ciągu 5 min powoduje tylko ok. 20% spadek jego aktywności biologicznej, mierzonej zdolnością do stymulowania katalizowanej przez frakcję mikrosomów przemiany skwalen → cholesterol. SCP₁ ulega natomiast praktycznie całkowitej inaktywacji już przy ogrzaniu w temperaturze 55° w ciągu 5 min. Białka SCP₁ i SCP₂ różnią się także zdecydowanie pod względem specyficzności.

SCP₁ wybitnie stymuluje cyklizację ³H-skwalenu do lanosterolu katalizowaną przez frakcję mikrosomalną w obecności tlenu, NADPH, NAD⁺ i FAD (Ryc. 4) nie mając wpływu na szybkość dalszych przekształceń lanosterolu (14). Nie stwierdzono w obecności SCP₁ jakiegokolwiek aktywacji demetylowania ³H-4,4'-dimetylo- Δ^6 -cholesterolu lub przekształcenia ³H-7-dehydrocholesterolu w cholesterol. SCP₁ nie ma również wpływu na enzymatyczną dimeryzację pirofosforanu farnezyli do skwalenu (15). Obserwowano, że szybkość cyklizacji skwalenu do lanosterolu, w obecności SCP₁, ulegała dodatkowemu zwiększeniu w obecności fosfatydyloseryny. Stechiometria dodawanego do mieszanin inkubacyjnych SCP₁ i wytworzonego produktu (lanosterol) wskazywała na nie zużywanie się SCP₁ w trakcie aktywowanej reakcji, co jest w zgodzie z postulowaną nośnikową funkcją tego białka (14, 15).

Z kolei SCP₂, nie mając praktycznie wpływu na utlenienie skwalenu i cyklizację produktu utlenienia do lanosterolu, silnie wzmacnia demetylowanie w pozycji 4 (Ryc. 5) oraz przekształcenie 7-dehydrocholesterol →



Ryc. 4. Powstawanie lanosterolu z acyklicznego prekursora — skwalenu. Reakcję A katalizuje oksydaza skwalenu, reakcję B — cyklaza 2,3-epoksydu skwalenu.



Ryc. 5. Mechanizm demetylacji w pozycji C-4 na szlaku przemian lanosterol → cholesterol (wg. 91). Reakcje A—C katalizuje oksydaza 4-metylosteroli, reakcję D — dekarboksylaza steroidowych kwasów 4 α -karboksylowych a reakcję E — reduktaza 3-ketosteroidów. Usunięcie drugiej grupy metylowej z C-4 zachodzi w identycznym ciągu reakcji.

cholesterol. Na kolejnych etapach oczyszczania SCP₂ stosunek zdolności do aktywowania obu wymienionych reakcji pozostaje wartością stałą co dodatkowo świadczy, że aktywacja zarówno demetylacji w pozycji 4 jak i redukcji 7-dehydrocholesterolu do cholesterolu związana jest z tym samym białkiem (23, 24).

Niektóre właściwości SCP₂ przypominają właściwości białka przenoszącego skwalen i sterole (SCP) wyodrębnionego przez Dempsey i współpracowników (2, 10, 38, 39). Dotyczy to m.in. wyznaczonej masy cząsteczkowej, dość podobnego składu aminokwasowego, względnej stabilności w podwyższonej temperaturze, a przede wszystkim aktywowania przez oba białka tej samej reakcji tj. konwersji 7-dehydrocholesterolu do cholesterolu (23, 24, 62). SCP₂, w odróżnieniu od SCP, nie wykazuje jednak zdolności aktywowania przekształcenia 7-dehydrocholesterolu w 7-dehydrocholesterol (9). Ponadto, SCP₂, o czym była już mowa wyżej, występuje w komórkach wątroby w wielokrotnie mniejszej ilości. Ewentualna identyczność SCP₂ i SCP wydaje się więc wątpliwa. Rozważana jest natomiast możliwa tożsamość SCP₂ z białkiem przenoszącym fosfolipidy wyizolowanym i scharakteryzowanym przez Zilversmita i współpracowników (63) i oznaczonym symbolem CM₂. Dla preparatów SCP₂ i CM₂ wyznaczono wysoki współczynnik korelacji składu aminokwasowego wynoszący 0.992, identyczny punkt izoelektryczny, identyczny, w granicach błędów metody oznaczania, ciężar cząsteczkowy i bardzo podobną wrażliwość na podwyższoną temperaturę (24).

II-3. Inne cytosolowe aktywatory biosyntezy cholesterolu

Poza białkami opisanymi wyżej, w wyniku prac prowadzonych w kilku innych laboratoriach (8, 17, 18, 20, 25, 36, 64), z supernatantu 105 000 g homogenatu wątroby szczura uzyskano jeszcze kilka białek o bardziej lub mniej odmiennych właściwościach, z których każde wykazywało zdolność aktywowania w warunkach *in vitro* mikrosomalnego szlaku biosyntezy cholesterolu. Białka te poznano w stosunkowo mniejszym stopniu i nie można wykluczyć, że niektóre z nich okażą się, po dokładniejszym zbadaniu, identyczne z opisanymi w p. II-1 i II-2.

Jednym z lepiej poznanych jest tzw. białkowy czynnik cytosolowy (*supernatant protein factor, SPF*) wyodrębniony przez Blocha i współpracowników (17—20, 64). Białko to oczyszczono ok. 11 000× stosując kolejno wytrącanie acetonem, chromatografię jonowymienną na DEAE-celulozie, sączenie molekularne na Sephadex G-75 i preparatywne ogniskowanie elektroforetyczne (17). Analiza elektroforetyczna w żelu poliakryloamidowym w obecności siarczanu dodecyłu wykazała ok. 95% jednorodność uzyskanego preparatu. Wykazano, że SPF aktywuje cyklizację skwalenu do lanosterolu. Reakcja ta, jak wiadomo, jest katalizowana przez 2 odrębne enzymy: oksydazę skwalenu i cyklazę 2,3-epoksydu skwalenu (Ryc. 4). Przy zastosowaniu specyficznego inhibitora cyklazy 2,3-epoksydu skwalenu — AMO-1618 (chlorek kwasu 2-izopropylu, 4-trimetyloamino, 5-metylofenylo-1-piperidynokarboksyłowego) i ¹⁴C-skwalenu bądź ¹⁴C-2,3-epoksydu skwalenu jako substratów stwier-

dzono, że SPF aktywuje zarówno enzymatyczne utlenienie skwalenu do 2,3-epoksydu (17) jak również cyklizację tego ostatniego związku do lanosterolu (20). SPF nie ma natomiast wpływu na dalsze przekształcenia lanosterolu na drodze do cholesterolu. Aktywujący wpływ SPF na katalizowaną przez frakcję mikrosomalną przemianę skwalen \rightarrow lanosterol znacznie się wzmacnia w obecności niektórych fosfolipidów (17, 20, 64). Co więcej, okazało się, że krótka preinkubacja oczyszczonego preparatu SPF z fosfolipazą A_2 prowadzi do utraty zdolności do stymulowania przemiany (20). Interesujące, że maksymalne aktywowanie oksydazy skwalenu przez SPF obserwuje się jedynie w obecności ujemnie naładowanych fosfolipidów takich jak fosfatydyloglicerol, fosfatydyloinozytol lub fosfatydyloseryna (17), podczas gdy maksymalna aktywacja cyklazy 2,3-epoksydu skwalenu charakteryzuje się wyraźnie odmienną specyficznością i ma miejsce tylko w obecności fosfatydyloglicerolu lub fosfatydyloetanoloaminy (20). Pomimo trudnych do wyjaśnienia rozbieżności w oznaczonych ciężarach cząsteczkowych SPF i SCP_1 (patrz Tabela 1) nie wykluczano ewentualnej identyczności obu białek (17).

Prace Gaylora i współpracowników (8, 25, 36, 48, 51, 68) doprowadziły do wyodrębnienia z wątroby szczura 2 cytosolowych białek aktywujących *in vitro* biosyntezę cholesterolu.

Pierwsze z nich, określane jako cytosolowy modulator mikrosomalnej oksydazy 4-metylosteroli, oczyszczono ok. 192-krotnie stosując kolejno wytrącanie siarczanem amonu (30—85% nasycenia), denaturację cieplną białek towarzyszących w temperaturze 80°, adsorpcję na żelu fosforanu wapnia i sączenie molekularne na Sephadex G-75. Uzyskany preparat był jednorodny podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu (8, 25). Białko to znacznie stymuluje obie kolejno zachodzące demetylacje prekursorów cholesterolu w pozycji C-4, co wykazano stosując jako substraty znakowane ^{14}C w grupach metylowych przy C-4: 4,4-dimetylo- Δ^7 -cholestenol lub 4 α -metylo- Δ^7 -cholestenol i śledząc uwalnianie $^{14}CO_2$ (8).

Oczyszczony preparat cytosolowego modulatora 4-metylosteroli zawiera nie kowalencyjnie związany hem. Usunięcie hemu prowadzi do całkowitej utraty zdolności aktywowania demetylacji prekursorów cholesterolu (51). Wiadomo, że aktywność mikrosomalnej oksydazy 4-metylosteroli jest w warunkach *in vitro* hamowana w obecności wolnego cholesterolu, jego estrów, a także niektórych produktów utlenienia cholesterolu. Okazało się, że hamowanie to silnie się wzmacnia w obecności omawianego białka (54, 65—67). Wyniki te sugerują więc, że cytosolowy modulator oksydazy 4-metylosteroli może, w zależności od warunków panujących w komórce, aktywować bądź hamować oksydazę 4-metylosteroli.

Drugie z otrzymanych przez Gaylora i współpracowników białek, określane jako niespecyficzne białko przenoszące lipidy z uwagi na zdolność

do przyspieszania międzybłonowej wymiany szeregu lipidów (np. fosfatydyloetanolaminy), aktywoowało przemiany: Δ^7 -cholestenol \rightarrow 7-dehydrocholesterol i 7-dehydrocholesterol \rightarrow cholesterol, a także znacznie stymulowało aktywność mikrosomalnej acylotransferazy acylo-CoA:cholesterol (36). Interesujące, że wykazuje ono również zdolność przyspieszania transportu cholesterolu, np. pomiędzy zawierającymi ^{14}C -cholesterol mitochondriami a liposomami zbudowanymi z fosfatydylocholino. Z uwagi na aktywowanie podobnych procesów a także zbliżoną masę cząsteczkową i dość znaczne podobieństwo oznaczonego składu aminokwasowego postulowano jego ewentualną identyczność z SCP₂ (36, 50).

II-4. Występowanie białek przenoszących sterole w różnych tkankach

Wszystkie opisane wyżej białkowe aktywatory mikrosomalnego szlaku biosyntezy cholesterolu wyodrębniono z komórek wątroby. Specjalne zainteresowanie tym właśnie organem jest zrozumiałe jeśli wziąć pod uwagę szczególną rolę wątroby w biosyntezie i metabolizowaniu steroli. Nie ulega jednak wątpliwości, że także inne tkanki aktywnie uczestniczące w syntezie i przekształceniach steroli zawierają podobne białka (31, 32, 69—71). Białka typu SCP znaleziono m.in. w śluzówce jelita (72), w komórkach kory nadnerczy (22, 31, 69, 71), jądrach (69) i jajnikach (69). O ile w wątrobie białka te występują głównie w cytosolu a jedynie niewielka ich część związana jest z frakcją mikrosomalną, to w nadnerczach ok. 1/3 SCP występuje w mitochondriach (31, 71). Lefevre i współpracownicy (69) wyizolowali z nadnerczy, jąder i jajników i częściowo scharakteryzowali tzw. białko wiążące cholesterol (*cholesterol binding protein*, CBP). Wykazano, że białko to wiąże cholesterol i inne sterole z nie naruszonym łańcuchem bocznym nie wykazuje natomiast powinowactwa w stosunku do metabolitów cholesterolu pozbawionych łańcucha bocznego, takich jak pregnenolon, estradiol, kortizon, testosteron lub progesteron. Dość prawdopodobna jest tożsamość CBP z białkiem przenoszącym skwalen i sterole (SCP) z wątroby (69, 71, 73), tym bardziej, że udowodniono ostatnio występowanie w nadnerczach białka immunologicznie identycznego z SCP z wątroby (29).

W piśmiennictwie można również znaleźć doniesienia o występowaniu białek o właściwościach zbliżonych do omówionych wyżej w niektórych organizmach niższych np. w drożdżach (74) a także w niektórych pierwotniakach (75, 76). Lepiej poznane białko przenoszące sterole z komórek pierwotniaków ma ciężar cząsteczkowy zbliżony do SCP z wątroby szczura i jest w stanie w pełni zastąpić SCP wykazując identyczny efekt aktywacyjny na katalizowany przez frakcję mikrosomalną z wątroby szczura ciąg reakcji: Δ^7 -cholestenol \rightarrow 7-dehydrocholesterol \rightarrow cholesterol (75, 76).

III. Funkcje biologiczne

III-1. Modulowanie przekształcenia skwalenu w cholesterol

Cechą wspólną wszystkich omówionych wyżej białek jest ich zdolność aktywowania różnych etapów enzymatycznych przemian skwalenu w cholesterol przebiegających w błonach retikulum endoplazmatycznego. Nasuwa się pytanie, jaki jest mechanizm tej aktywacji. Nasuwa się również pytanie, w jakim stopniu obserwacje poczynione w warunkach *in vitro* odpowiadają rzeczywistym funkcjom białek przenoszących sterole w żywych komórkach. Znaczne wzmaganie metabolizowania przez frakcję mikrosomalną, w obecności białek przenoszących sterole, dodawanych z zewnątrz (egzogennych) prekursorów cholesterolu można tłumaczyć wyłącznie ułatwianiem wnikania do błon mikrosomalnych substratów silnie hydrofobowych, praktycznie nie rozpuszczalnych w roztworach wodnych. Gdy produkt reakcji katalizowanej przez jeden enzym mikrosomalny może być natychmiast wykorzystany w reakcji katalizowanej przez kolejny enzym, zjawisko to może nie odgrywać żadnej istotniejszej roli.

Wyniki uzyskane w kilku laboratoriach (6, 14, 16, 82) wskazują jednak, że białka wiążące sterole aktywują także metabolizowanie endogennych, wytwarzanych *in situ* w błonach retikulum endoplazmatycznego, prekursorów cholesterolu. Wykazano np., że SCP₁ wzmaga cyklizację do lanosterolu endogenego ¹⁴C-skwalenu wytworzonego w błonach *in situ*, w wyniku uprzedniej inkubacji z ¹⁴C-pirofosforanem farnezyli w warunkach anaerobowych zapobiegających dalszym przekształceniom powstałego skwalenu (6, 16). Wyniki z innego laboratorium (64) doprowadziły do wniosku, że także SPF stymuluje utlenienie i cyklizację mikrosomalnego, endogenego skwalenu. Postulowano, że SPF w warunkach *in vivo* ułatwia transport skwalenu z enzymatycznie nieaktywnych lecz „naładowanych” skwaleniem błon mikrosomalnych do błon „akceptorowych” zawierających aktywne enzymy przekształcające skwalen, lecz nie zawierających większych ilości substratu (64).

Jak się wydaje, efekt aktywacji przez białka przenoszące sterole objawia się tylko wtedy, gdy błony są względnie nienaruszone (20, 64). Traktowanie frakcji mikrosomalnej dezoksychohanem lub fosfolipazami (20) prowadzi do praktycznie całkowitej niewrażliwości na dodatek białka przenoszącego sterole. Do podobnego wniosku prowadzą wyniki eksperymentów z solubilizowaną i następnie rekonstruowaną oksydazą skwalenu (64).

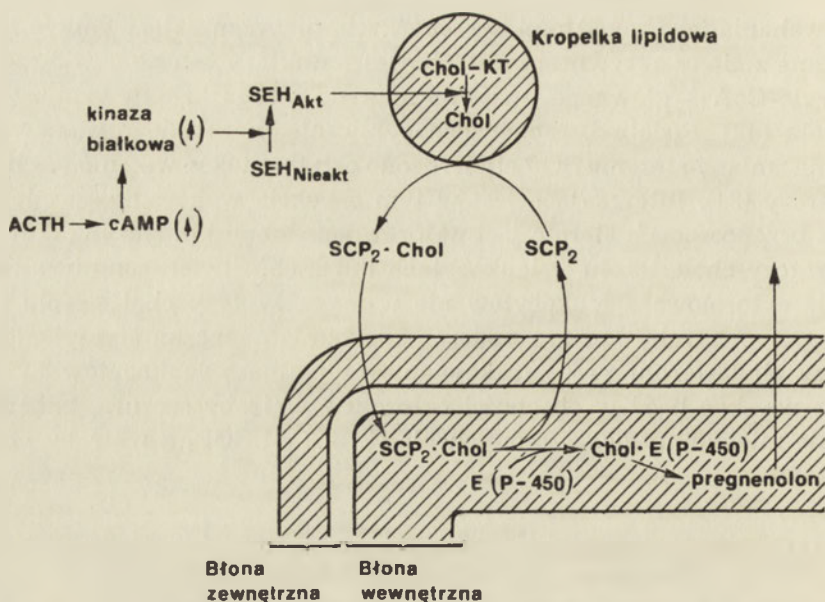
Obecnie przyjmuje się na ogół, że również w warunkach *in vivo* białka przenoszące sterole spełniają istotną rolę modulatorową w regulacji mikrosomalnego szlaku syntezy cholesterolu. Donoszono ostatnio (41, 42), że SCP w wątrobie szczura podlega bardzo szybkiemu metabolizmowi. Okres połowicznego rozpadu tego białka wynosi mniej niż 2 godziny. Obserwowano ponadto znaczne (około 10-krotne), zachodzące w cyklu okołodob-

wym wahania jego zawartości w komórkach, przypominające dobrze znane, cykliczne zmiany aktywności wątrobowej reduktazy 3-hydroksy,3-metyloglutarylo-CoA — głównego enzymu regulatorowego szlaku syntezy cholesterolu (42). Podobne, zachodzące cyklicznie w rytmie okołodobowym znaczne zmiany stężenia SCP stwierdzono ostatnio także w komórkach kory nadnerczy (31). Interesujące jest w tym aspekcie wykazanie, że niedobór białek przenoszących sterole jest najprawdopodobniej przyczyną dość wolnej syntezy cholesterolu w leukocytach ludzkich. Stwierdzono bowiem, że frakcja cytosolowa z leukocytów nie wzmaga syntezy cholesterolu przez mikrosomy wątroby szczura podczas gdy bardzo znaczną stymulację biosyntezy cholesterolu przez frakcję mikrosomalną z leukocytów ludzkich można uzyskać bądź w obecności cytosolu z wątroby szczura, bądź przez dodanie mieszaniny oczyszczonych białek SCP₁ i SCP₂ z wątroby szczura (77).

III-2. Aktywacja metabolizmu cholesterolu do pregnenolonu

W zachodzącej w komórkach kory nadnerczy sterydogenezie etapem ograniczającym szybkość całego procesu jest reakcja przekształcenia cholesterolu w pregnenolon. Reakcję tę katalizuje tzw. układ enzymatyczny rozszczepiający łańcuch boczny cholesterolu w skład którego wchodzi cytochrom P—450. Układ ten jest zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (78, 79). Pregnenolon powstaje głównie z cholesterolu uwalnianego z estrów cholesterolu z kwasami tłuszczowymi, które przechowywane są na terenie cytoplazmy w postaci kropelek lipidowych (*cytoplasmic inclusion droplets*) (79, 80). W odpowiedzi na podwyższony poziom kortykotropiny (ACTH) estry te ulegają hydrolizie pod działaniem hydrolazy estrów steroli, a uwolniony cholesterol przemieszcza się do wewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie ulega przemianie w pregnenolon (81, 82). Hydrolaza estrów steroli z komórek kory nadnerczy jest enzymem aktywowanym na drodze fosforylacji katalizowanej przez zależną od cAMP kinazę białkową (83, 84). Uproszczony schemat opisanych wyżej reakcji prowadzących do syntezy pregnenolonu przedstawia Ryc. 6.

Wielokrotnie obserwowano, że synteza pregnenolonu z endogenego cholesterolu w izolowanych mitochondriach z kory nadnerczy znacznie się wzmaga, gdy mitochondria inkubuje się z cytosolem z tych samych komórek (27—29, 85), lub z częściowo oczyszczonymi frakcjami białkowymi z cytosolu (28, 71, 73, 86, 87). Ostatnie prace Scallena i współpracowników (30, 32, 62) w dużym stopniu wyjaśniły rolę białek cytoplazmatycznych w mitochondrialnej przemianie cholesterol → pregnenolon. Okazało się mianowicie w doświadczeniach *in vitro*, że czysty preparat SCP₂ z wątroby szczura ma zdolność bardzo znacznego wzmaganie transportu uwalnianego działaniem hydrolazy estrów steroli cholesterolu z kropelek lipidowych do mitochondriów. W układzie zawierającym izolowane kropelki lipidowe



Ryc. 6. Udział SCP_2 w przekształceniu cholesterolu w pregnenolon w mitochondriach komórek kory nadnerczy szczura (wg. 32 i 62). SEH — hydrolaza estrów steroli, E(P-450) — układ enzymatyczny rozszczepiający łańcuch boczny cholesterolu, Chol — cholesterol, Chol-KT — estry cholesterolu z kwasami tłuszczowymi.

zawierające $4\text{-}^{14}\text{C}$ -cholesterol i izolowane mitochondria z komórek nadnerczy szczura obserwowano bardzo powolne przekształcanie znakowanego cholesterolu w pregnenolon. Proces ten ulegał gwałtownemu przyspieszeniu w obecności SCP_2 z wątroby szczura. Okazało się ponadto, że w nieobecności mitochondriów SCP_2 wiąże cholesterol z kropelek lipidowych w stosunku molowym 1:1. Zahamowanie mitochondrialnej syntezy pregnenolonu za pomocą aminoglutetimidu (silny inhibitor wiązania cholesterolu z kompleksem enzymatycznym rozszczepiającym łańcuch boczny) powodowało akumulację SCP_2 i wolnego cholesterolu w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Z kolei usunięcie inhibitora powodowało gwałtowne wzmożenie przekształcania znakowanego cholesterolu w pregnenolon (30, 62). Wiadomo, że traktowanie szczurów cykloheksimidem powoduje bardzo znaczne nagromadzenie się cholesterolu w zewnętrznej błonie mitochondriów kory nadnerczy przy równocześnie bardzo zwolnionym tempie przekształcania go w pregnenolon (81). Okazało się, że preparaty mitochondriów ze szczurów traktowanych uprzednio cykloheksimidem znacznie wzmagają wytwarzanie pregnenolonu w obecności SCP_2 (32, 62). Z kolei SCP_2 , jak się wydaje, nie ma żadnego wpływu na samo wiązanie cholesterolu przez układ enzymatyczny rozszczepiający łańcuch boczny o czym świadczą eksperymenty z solubilizowanym, a następnie rekonstruowanym kompleksem enzymatycznym (32).

Wyniki omówionych wyżej eksperymentów wskazują na istotną rolę SCP₂ w zachodzącej w mitochondriach kory nadnerczy przemianie cholesterol → pregnenolon. SCP₂ uczestniczy jako nośnik w transporcie cholesterolu z kropelek lipidowych do mitochondriów, a także ułatwia przemieszczenie się tego sterolu z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej przyspieszając w ten sposób wykorzystanie cholesterolu przez układ enzymatyczny rozszczepiający łańcuch boczny cholesterolu. Końcowy produkt, tj. pregnenolon opuszcza mitochondria przy czym wiadomo, że przemieszczenie to jest również stymulowane przez frakcję białek cytosolowych (88, 89). Najprawdopodobniej jednak uczestniczy tu już inne białko nośnikowe, gdyż są doniesienia o występowaniu wśród białek cytosolowych kory nadnerczy świnki morskiej (88) i szczura (89) białka specyficznie wiążącego pregnenolon, nie mającego jednak powinowactwa do cholesterolu i innych steroli z nie naruszonym łańcuchem bocznym. Białko to różni się od SCP₂ wieloma właściwościami, m.in. masą cząsteczkową (88).

Jakkolwiek większość omówionych wyżej eksperymentów nad stymulowaniem syntezy pregnenolonu w mitochondriach kory nadnerczy wykonano używając białko SCP₂ pochodzące z wątroby, nie ulega wątpliwości w świetle uzyskanych ostatnio danych, że SCP₂ występuje również w komórkach kory nadnerczy. Wpływ na mitochondrialną syntezę pregnenolonu, który obserwowano stosując oczyszczone SCP₂ z wątroby stwierdzono również stosując surowe preparaty uzyskane z cytosolu komórek kory nadnerczy szczura. Co więcej, zastosowanie w tym przypadku oczyszczonych przeciwciał anti-SCP₂ prowadziło do praktycznie całkowitego zahamowania stymulacji przekształcenia cholesterol → pregnenolon. Obecność SCP₂ w komórkach kory nadnerczy szczura potwierdzono także przez wyizolowanie białka elektroforetycznie identycznego z SCP₂ z wątroby, które wykazywało zdolność aktywowania redukcji 7-dehydrocholesterolu do cholesterolu przez frakcję mikrosomalną z komórek wątroby w stopniu identycznym jak wątrobowe SCP₂ (32).

III-3. Udział białek przenoszących sterole w innych procesach

Część syntetyzowanego w komórkach wątroby cholesterolu jest estryfikowana wyższymi kwasami tłuszczowymi. Syntezę estrów katalizuje występująca w błonach retikulum endoplazmatycznego acylotransferaza acylo-CoA : cholesterol. Aktywność tego enzymu również znacznie wzrasta się, przynajmniej w warunkach *in vitro*, w obecności nie katalitycznych białek cytosolowych. Donoszono (33, 34), że wysoko oczyszczony preparat SCP₂ powoduje ok. 5-krotne zwiększenie szybkości estryfikowania 4-¹⁴C-cholesterolu katalizowanego przez frakcję mikrosomów z wątroby szczura w obecności oleilo-CoA jako źródła kwasu tłuszczowego. Żadnego efektu nie obserwowano natomiast w przypadku użycia białka SCP₁. Stymulację mikrosomalnej acylotransferazy acylo-CoA : cholesterol obserwowano

również w innym laboratorium (35) w obecności nie specyficznego białka przenoszącego lipidy. O rozważanej możliwości tożsamości tego białka z SCP₂ była już mowa wyżej (p. II-3).

Podnoszono również możliwy udział białek przenoszących sterole w modulowaniu szlaku syntezy kwasów żółciowych (10, 25, 44). Synteza tych kwasów zapoczątkowywana jest hydroksylacją cholesterolu w pozycji 7 α a powstająca 7 α -hydroksy pochodna ulega, na szlaku prowadzącym do kwasu cholowego, kolejnej hydroksylacji w pozycji 12 α . Wymienione reakcje katalizują umiejscowione w błonach retikulum endoplazmatycznego 7 α i 12 α -hydroksylazy. Wykazano, że białko przenoszące skwalen i sterole (SCP) ma zdolność wiązania szeregu metabolitów pośrednich szlaku cholesterol \rightarrow kwasy żółciwe, m.in. 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-onu, 7 α -hydroksy-5 β -cholestan-3-onu, kwasu 3 α ,7 α -dihydroksy-5 β -cholestano-26-karboksyłowego i kwasu 3 α ,7 α ,12 α -trihydroksy-5 β -cholestano-26-karboksyłowego, choć nie wykazuje zdolności wiązania końcowych produktów, tj. kwasów cholowego i chenodezoksycholowego a także, że obecność SCP jest niezbędna dla osiągnięcia maksymalnej aktywności 12 α -hydroksylazy w preparacie mikrosomów z wątroby szczura (26, 90). Donoszono również o aktywowaniu mikrosomalnej 7 α -hydroksylazy przez bliżej niezidentyfikowane termolabilne białko cytosolowe (25).

IV. Uwagi końcowe

Badania przeprowadzone w ostatnich latach w pełni potwierdziły wcześniejsze sugestie o obecności we frakcji białek rozpuszczalnych specyficznych aktywatorów mikrosomalnego szlaku biosyntezy cholesterolu, które, nie posiadając same żadnej aktywności katalitycznej, w istotnym stopniu wpływają na szybkość syntezy cholesterolu w błonach retikulum endoplazmatycznego. Kilka takich białek udało się w znacznym stopniu oczyścić i określono ich podstawowe właściwości fizykochemiczne. Nie można obecnie wykluczyć, że niektóre z nich okażą się przy bliższym poznaniu identyczne. W świetle uzyskanych wyników pierwotna koncepcja (10, 11, 46) istnienia jednego, uniwersalnego białka nośnikowego, którego rolą byłoby wiązanie nierozpuszczalnych w wodzie prekursorów cholesterolu, począwszy od skwalenu, i przekazywanie produktu jednej reakcji enzymatycznej na centrum katalityczne enzymu katalizującego kolejną przemianę, aż do wytworzenia cząsteczki cholesterolu, jest mało prawdopodobna. Istniejące dane doświadczalne wskazują raczej na występowanie w komórkach zwierzęcych kilku białek nie katalitycznych o różnej specyficzności wobec poszczególnych etapów przemiany skwalen \rightarrow cholesterol. Większość autorów jest zgodna, że białka te mogą spełniać rolę subtelných modulatorów syntezy i wykorzystania cholesterolu w komórce. Z przytoczonych w niniejszym artykule danych wynika, że przynajmniej niektóre z omawianych białek, oprócz działania na aktywność określonych błono-

wych enzymów uczestniczących w syntezie i metabolizmie cholesterolu wykazują również zdolność wpływania na aktywność enzymów związanych z biosyntezą i przemianami innych związków lipidowych lub zdolność międzybłonowego przenoszenia lipidów. W obecnym stanie badań nie można więc wykluczyć bardziej uniwersalnej funkcji tych białek w równoległej regulacji przemian różnych klas związków lipidowych w komórkach.

Zaakceptowano do druku 15 września 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Scallen T. J., Dean W. J., Schuster M. W., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5202—5206.
2. Ritter M. C., Dempsey M. E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1536—1539.
3. Scallen T. J., Schuster M. W., Dharr A. K., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 224—230.
4. Dempsey M. E., (1968), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **148**, 631—646.
5. Johnson R. C., Shah S. N., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 502—510.
6. Scallen T. J., Srikantaiah M. V., Seetharam B., Hansbury E., Gavey K. L., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1733—1746.
7. Gibbons G. F., (1974), *Biochem. J.*, **144**, 59—68.
8. Gaylor J. L., Delwiche C. V., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6638—6645.
9. Scallen T. J., Seetharam B., Srikantaiah M. V., (1975), *Life Sci.*, **16**, 853—874.
10. Dempsey M. E., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 967—990.
11. Gaylor J. L., (1974), w MTP International Review of Science, Biochemistry Series 1, red. Goodwin T. W., t. 4, str. 1—37; Butterworths, London.
12. Gibbons G. F., Mitropoulos K. A., Myant N. B., (1982), *Biochemistry of Cholesterol*, str. 131—188, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
13. Tchen T. T., Bloch K., (1957), *J. Biol. Chem.*, **226**, 921—930.
14. Srikantaiah M. V., Hansbury E., Longhran E. D., Scallen T. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5496—5504.
15. Gavey K. L., Scallen T. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5470—5475.
16. Gavey K. L., Scallen T. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5476—5483.
17. Ferguson J. B., Bloch K., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5381—5385.
18. Tai H. H., Bloch K., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3767—3773.
19. Saat Y. A., Bloch K., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5155—5160.
20. Caras J. W., Bloch K., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11816—11821.
21. Avigan J., Goodman D. S., Steinberg D., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1283—1286.
22. Seetharam B., Hansbury E., Srikantaiah M. V., Scallen T. J., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1573—1574.
23. Arabelo R. E., Noland B. J., Hansbury E., Red W. L., Scallen T. J., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1448.
24. Noland B. J., Arabelo R. E., Hansbury E., Scallen T. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4282—4289.
25. Spence J. T., Gaylor J. L., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5852—5857.
26. Grabowski G. A., McCoy K. E., Williams G. C., Dempsey M. E., Hanson R. F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **441**, 380—390.

27. Ray P., Strott C. A., (1981), *Life Sci.*, **28**, 1529—1534.
28. Warne P. A., Greenfield W. J., Liberman S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1877—1881.
29. Pedersen R. C., Brownie A. C., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1882—1886.
30. Chanderbhan R., Noland B. J., Scallen T. J., Vahouny G. V., (1980), *Fed. Proc.*, **40**, 417.
31. Conneely O. M., Headon D. R., Olson C. D., Ungar F., Dempsey M. E., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2970—2974.
32. Vahouny G. V., Chanderbhan R., Noland B. J., Irvin D., Dennis P., Lambeth J. D., Scallen T. J., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11731—11737.
33. Gavey K. L., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 785.
34. Gavey K. L., Noland B. J., Scallen T. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2993—2999.
35. Poorthuis B. J. H. M., Wirtz K. W. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **710**, 95—105.
36. Trzaskos J. M., Gaylor J. L., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **751**, 52—65.
37. Trzaskos J. M., (1980), *Fed. Proc.*, **39**, 2035.
38. Dempsey M. E., McCoy K. E., Baker H. N., Dimitriadou-Vafiadou A., Lorsbach T., Howard J. B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1867—1873.
39. Ritter M. C., Dempsey M. E., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 265—269.
40. Gordon J. I., Alpers D. H., Ockner R. K., Strauss A. W., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3356—3363.
41. Dempsey M. E., Rucker R. D., Olson C. D., Buchwald H., (1981), *Circulation*, **62**, III-78.
42. McGuire D. M., Olson C. D., Towle H. C., Dempsey M. E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5368—5371.
43. Olson C. D., Dempsey M. E., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**, 283—287.
44. Dempsey M. E., (1984), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **24**, 63—86.
45. Dempsey M. E., Conneely O. M., Olson C. D., McGuire D., Towle H. C., (1982), *Arteriosclerosis*, **2**, 427—428.
46. Dempsey M. E., (1975), w: *Subunit Enzymes*, red. Ebner K., str. 267—306; Dekker, New York.
47. Song M. G., Dempsey M. E., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 523—529.
48. Grinstead J. M., Trzaskos J. M., Billheimer J. T., Gaylor J. L., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **751**, 41—51.
49. Oeckner R. K., Manning J. A., Kane J. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7872—7878.
50. Van der Krift T. P., Lennissen J., Teerlink T., Van Heusden G. P. H., Verkleij A. J., Wirtz K. W. A., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 387—392.
51. Billheimer J. T., Gaylor J. L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8128—8135.
52. Takahashi K., Odani S., Ono T., (1982), *FEBS Lett.*, **140**, 63—66.
53. Ketterer B., Tipping E., Hackney J. F., (1976), *Biochem. J.*, **155**, 511—521.
54. Lunzer M. A., Manning J. A., Oeckner R. K., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5483—5487.

55. Mishin S., Turcotte R., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 376—381.
56. Fournier N., Deshusses J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **533**, 457—464.
57. Schroeder F., (1984), *Prog. Lipid Res.*, **23**, 97—113.
58. Fleischner G. M., Arias J. M., (1976), w: *Progress in Liver Disease*, red. Popper H., t. 5, str. 172—182; Grune and Stratton, New York.
59. Scallen T. J., Srikantaiah M. V., Skrdlant H. B., Hansbury E., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 1159.
60. Scallen T. J., Srikantaiah M. V., Skrdlant H. B., Hansbury E., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 429.
61. Scallen T. J., Srikantaiah M. V., Skrdlant H. B., Hansbury E., (1972), *FEBS Lett.*, **25**, 227—233.
62. Chanderbhan R., Noland B. J., Scallen T. J., Vahouny G. V., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8928—8934.
63. Bloj B., Hughes M. E., Wilson D. B., Zilversmit D. B., (1978), *FEBS Lett.*, **96**, 87—89.
64. Chin J., Bloch K., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11735—11738.
65. Friedlander E. J., Caras J. W., Liu L. F. H., Bloch K., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8042—8045.
66. Koijma Y., Friedlander E. J., Bloch K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7235—7239.
67. Caras J. W., Friedlander E. J., Bloch K., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3575—3578.
68. Gaylor J. L., Billheimer J. T., Longino M. A., Trzaskos J. M., (1979), *J. Lipid Res.*, **20**, 1045—1049.
69. Lefevre A., Morera A. M., Saez J. M., (1978), *FEBS Lett.*, **89**, 287—292.
70. Haddad J. G., Chyu K. J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **248**, 471—481.
71. Kan K. W., Ungar F., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2868—2875.
72. McCoy K. E., Koehler D. F., Carlson J. P., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 519.
73. Kan K. W., Ritter M. C., Ungar F., Dempsey M. E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 423—429.
74. Rilling H. C., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 470—475.
75. Calimbas T., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 430.
76. Calimbas T., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 519.
77. Burns C. P., Welshman J. R., Scallen T. J., Spector A. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **713**, 519—528.
78. Churchill P. F., Kimura T., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10433—10448.
79. Garren L. D., Gill G. N., Masui H., Walton G. M., (1971), *Recent Prog. Horm. Res.*, **27**, 433—478.
80. Vahouny G. V., Chanderbhan R., Hinds R., Hodges V. A., Treadwell C. R., (1978), *J. Lipid Res.*, **19**, 570—577.
81. Privalle C. T., Crivello J. F., Jefcoate C. R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 702—706.
82. Conneely O. M., Greene J. M., Headon D. R., Hsiao J., Ungar F., (1983), *Biochem. J.*, **214**, 561—568.
83. Naghshineh S., Treadwell C. R., Gallo L. L., Vahouny G. V., (1978), *J. Lipid Res.*, **19**, 561—569.
84. Beckett G. J., Boyd G. S., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **72**, 223—233.
85. Mahaffee D., Reitz R. C., Ney R. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 227—233.

86. Simpson E. R., (1979), *Mol. Cell. Endocrinol.*, **13**, 213—228.
87. Crivello J. F., Jefcoate C. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8144—8151.
88. Strott C. A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 464—470.
89. Kream B. E., Sauer L. A., (1977), *Endocrinology*, **101**, 1318—1324.
90. Grabowski G. A., Dempsey M. E., Hanson R. F., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 520.
91. Trzaskos J. M., Bowen W. D., Shafiee A., Fischer R. T., Gaylor L. J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 13402—13412.

WIRGINIA JANISZOWSKA *

Biosynteza tokoferoli

Biosynthesis of tocopherols

Spis treści

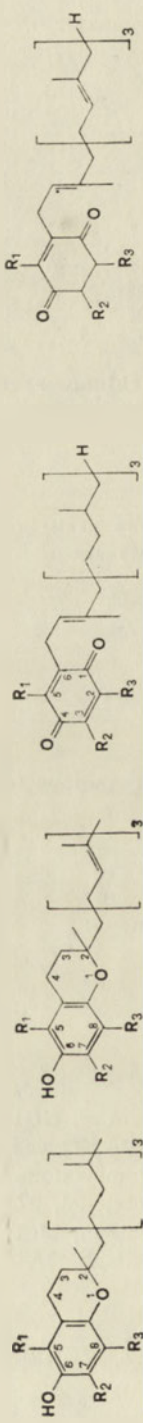
- I. Budowa oraz występowanie tokochromanoli i ich form chinonowych
- II. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie tokoferoli
- III. Biosynteza tokoferoli
 - III-1. Biosynteza prenylowego łańcucha bocznego
 - III-2. Biosynteza pierścienia aromatycznego
 - III-3. Kondensacja pierścienia aromatycznego i łańcucha prenylowego
 - III-4. Cyklizacja oraz metylowanie pierścienia aromatycznego
 - III-5. Rola tokotrienoli w biosyntezie tokoferoli
- IV. Regulacja biosyntezy tokoferoli
- V. Lokalizacja biosyntezy tokoferoli

Contents

- I. Structure and distribution of tocochromanols and their quinone forms
- II. Intracellular distribution of tocopherols
- III. Biosynthesis of tocopherols
 - III-1. Biosynthesis of prenyl chain
 - III-2. Biosynthesis of aromatic ring
 - III-3. Condensation of aromatic ring and prenyl chain
 - III-4. Cyclization and methylation of aromatic ring
 - III-5. Role of tocotrienols in tocopherol biosynthesis
- IV. Regulation of tocopherol biosynthesis
- V. Localization of biosynthesis of tocopherols

Wykaz stosowanych skrótów: ATP — adenylozotrójfosforan, GGPP — pirofosforan geranylogeranylu, IPP — pirofosforan izopentenyłu, MVA — kwas miewalonowy, MVAP — kwas fosfomiewalonowy, MVAPP — kwas pirofosfomiewalonowy, Me — grupa metylowa, MeT — metylotokol, T — tokoferol, T₃ — tokotrienol, TQ — tokoferylochinon, TQH₂ — tokoferylohydrochinon, MeTQ — fitylochinon, MeTQH₂ — fitylohydrochinon, PP — pirofosforan, SAM — E-adenozylometionina, HA — kwas homogentyzynowy.

* Dr, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa



tokol I

- 5-metylotokol,
- 7-metylotokol,
- 8-metylotokol = δ -tokoferol,
- 5, 7-dimetylotokol = β -tokoferol,
- 5, 8-dimetylotokol = γ -tokoferol,
- 7, 8-dimetylotokol = δ -tokoferol,
- 5, 7, 8-trimetylotokol = α -tokoferol.

tokotrienol II

- $R_1 = \text{Me}, R_2 = R_3 = \text{H}$
- $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Me}$
- $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Me}$
- $R_1 = R_2 = \text{Me}, R_3 = \text{H}$
- $R_1 = R_2 = \text{Me}, R_3 = \text{H}$
- $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{Me}$
- $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Me}$
- 5, 7, 8-trimetylotokotrienol = α -tokotrienol.

fitylochinon (tokoferylochinon)

- 5-metylofitylochinon,
- 3-metylofitylochinon,
- 2-metylofitylochinon = δ -tokoferylochinon,
- 3, 5-dimetylofitylochinon = β -tokoferylochinon,
- 2, 3-dimetylofitylochinon = γ -tokoferylochinon,
- 2, 3, 5-trimetylofitylochinon = α -tokoferylochinon.

geranylogeranylochinon (tokotrienylochinon)

- $R_1 = \text{Me}, R_2 = R_3 = \text{H}$
- $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Me}$
- $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Me}$
- $R_1 = R_2 = \text{Me}, R_3 = \text{H}$
- $R_1 = R_2 = \text{Me}, R_3 = \text{H}$
- $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{Me}$
- $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Me}$
- 5-metylogeranylogeranylochinon,
- 3-metylogeranylogeranylochinon,
- 2-metylogeranylogeranylochinon = δ -tokotrienylochinon,
- 3, 5-dimetylogeranylogeranylochinon,
- 2, 5-dimetylogeranylogeranylochinon = β -tokotrienylochinon,
- 2, 3-dimetylogeranylogeranylochinon = γ -tokotrienylochinon,
- 2, 3, 5-trimetylogeranylogeranylochinon = α -tokotrienylochinon.

Ryc. 1. Wzory i nazewnictwo tokoferoli, tokotrienoli oraz ich form chinonowych

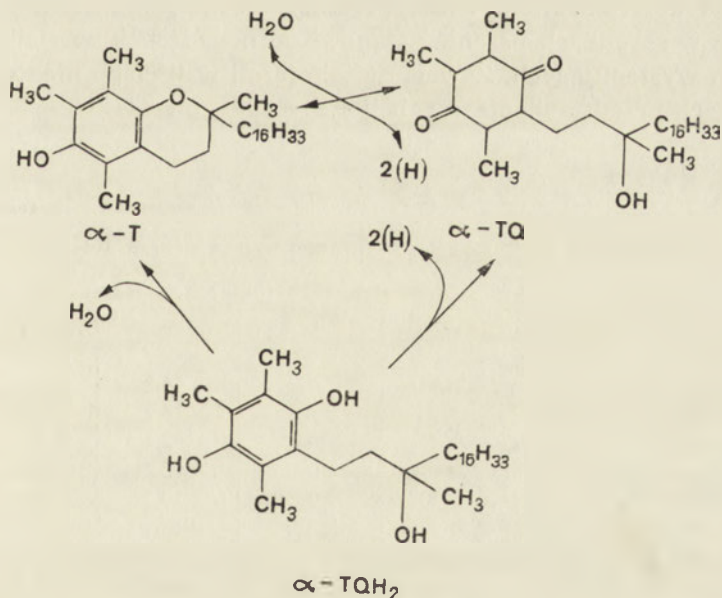
Słownictwo — wyjaśnienie:
 Ostatnio przyjęto nazwę fitylochinony i geranylogeranylochinony dla pochodnych tokoferoli i tokotrienoli z odpowiednio jednym lub czterema wiązaniami podwójnymi w łańcuchu bocznym, natomiast nazwy tokoferylochinony i tokotrienylochinony pozostawiono jedynie dla pochodnych z grupą hydroksylową przy węglu C₃ łańcucha bocznego.

W 1972 roku w „Postęпах Biochemii” ukazał się artykuł J e r z m a - n o w s k i e g o (1) pt. „Występowanie i biosynteza poliprenylowych chinonów roślinnych” omawiający najważniejsze benzo- i naftochinony. Wyniki ówczesnych badań pozwoliły na dokładne opisanie budowy, biosyntezy i funkcji plastochinonu i ubichinonu, natomiast dane dotyczące witaminy K, i tokoferoli były niekompletne i wymagały dalszych studiów.

W niniejszym artykule zostaną przedstawione opublikowane w ostatnich latach dane o występowaniu tokoferoli i tokoferylochinonów, ich biosyntezie oraz lokalizacji tego procesu na terenie komórki.

I. Budowa oraz występowanie tokochromanoli i ich form chinonowych

Tokoferole są metylowymi pochodnymi tokolu (I) różniącymi się między sobą ilością oraz położeniem grup metylowych w pierścieniu benzenowym. Są one zaliczane do tokochromanoli, ponieważ układ pierścieni w cząsteczce jest pochodny 6-hydroksychromanu. Do tej samej grupy związków są zaliczane tokotrienole (II) różniące się od tokoferoli nienasyconym łańcuchem bocznym (Ryc. 1). Zarówno tokoferole jak i tokotrienole występują nie tylko w formie chromanolowej, ale również w formie chinonowej jako tokoferylochinony i tokotrienylochinony (Ryc. 1) i będącej z nią w równowadze formie hydrochinonowej. Wzajemne przekształcenia tych trzech form polegają na reakcjach utleniania, redukcji i cyklizacji (Ryc. 2).



Ryc. 2. Wzajemne przekształcenia α -tokoferolu, α -tokoferylochinonu i α -tokoferylohydrochinonu

Tokochromanole są produktami typowo roślinnymi i chociaż α -tokoferol występuje w znacznych ilościach w pokarmie — w rybach, jajach czy mięsie, to jednak nie ma żadnego dowodu wskazującego na to, że może on być syntetyzowany w jakiegokolwiek tkance zwierzęcej (2). Natomiast uważa się, że jest on dostarczany wraz z pokarmem i może nagromadzać się w niektórych tkankach.

Tokoferole znaleziono we wszystkich badanych roślinach fotosyntetyzujących tj. glonach (sinicach, brunatnicach, krasnorostach i zielenicach), mszakach i roślinach wyższych. Sprzeczne są dane co do występowania tokoferoli w grzybach, natomiast nie wykryto ich w bakteriach. Co prawda w 1980 roku Hughes i Tove (3) stwierdzili, że w bakterii *Butyrivibrio fibrisolvens* występują α -TQ i α -TQH₂, natomiast nie występuje ich forma chromanolowa — α -T.

Najbardziej rozpowszechniony i występujący w największych ilościach w roślinach fotosyntetyzujących jest α -tokoferol, który nagromadza się głównie w liściach. W mniejszych ilościach występuje γ -T, w śladowych δ -T i bardzo rzadko β -T. W 1976 roku wykryto po raz pierwszy w liściach fasoli (2), a w 1982 roku w liściach nagietka drugi monometylotokol — 7-MeT.

W innych częściach rośliny, takich jak łodyga, korzenie, owoce czy nasiona, α -T występuje również, ale często w mniejszych ilościach niż γ -T. Zdarza się, że w pewnych częściach rośliny nagromadza się tylko jeden rodzaj tokoferolu. Takim przykładem są nasiona grochu, gdzie występuje jedynie γ -tokoferol. Z kolei istnieją rośliny zawierające duże ilości β -tokoferolu np. w zarodkach pszenicy stanowi on ponad 30% wszystkich tokoferoli tam występujących. Zawartość tokoferoli w liściach niektórych roślin wyższych przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1.

Zawartość tokoferoli w liściach niektórych roślin wyższych (wg 2, 16)

Roślina	Tokoferol ($\mu\text{g/g}$ świeżej masy)			
	α	β	γ	δ
Szpinak	24,3	0	4,2	+
Szczaw	16,9	+	6,9	2,9
Kukurydza	2,4	0	2,1	0,13
Rdest	28,4	0	12,2	2,7
Liguster	41,4	0	10,3	0
Kauczukowiec	71,2	1,0	18,4	2,3
Jęczmień	15,7	0	8,3	0
Fasola	39,7	0	29,4	8,1
Nagietek	16,0	0	6,0	4,5

+ — śladowe ilości

Tokoferolom towarzyszą zwykle odpowiednie tokoferylochinony, przy czym najczęściej stanowią one od kilku do kilkunastu procent formy chromanolowej. Dotychczas stwierdzono, że w największych ilościach nagromadza się α -TQ (5, 6). Ciekawych spostrzeżeń dokonały Janiszowska i Rygiér (7) badając skład tokoferoli i ich form chinonowych oraz zmiany poziomów tych związków w czasie rozwoju nagietka od nasion do roślin przekwitających. Okazało się, że w napęczniałych nasionach tej rośliny w największych ilościach występują monometylofitylochinony, a nie formy chromanolowe tak jak to jest zazwyczaj.

Tokotrienoli nie znaleziono w liściach roślin wyższych ani glonach lecz w olejach nasion zbóż i lateksie kuczukowca (2, 8, 9, 10).

II. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie tokoferoli

Zdecydowana większość α -tokoferolu jest zlokalizowana w plastydach (chloroplastach, chromoplastach czy etioplastach), a niewielka część poza nimi (2, 11—17). Istnieją doniesienia, że α -T występuje w mitochondriach (18—20), jednak nie można wykluczyć zanieczyszczenia tej frakcji niewielką ilością plastydów, ponieważ wszystkie cytowane tu prace były prowadzone na nieoczyszczonych frakcjach komórkowych.

Z kolei γ - i δ -tokoferole występują zarówno w plastydach jak i postplastydowym supernatancie (14, 21). Niektórzy autorzy stwierdzili ich obecność we frakcji mitochondrialnej, mikrosomalnej i cytosolu (11, 18, 20).

Do tej pory ukazała się tylko jedna praca dotycząca wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia wszystkich tokoferoli występujących w danej tkance w oczyszczonych i scharakteryzowanych subfrakcjach komórkowych. Mianowicie Janiszowska i Korczak (16) otrzymały frakcje: chloroplastową, mitochondrialną, błon aparatu Golgiego, mikrosomalną i cytosol z liści nagietka i wykazały, że praktycznie cały α -T występuje w chloroplastach, a γ - i δ -T we frakcjach chloroplastowej, mitochondrialnej i mikrosomalnej. Nie wykryto tokoferoli we frakcji błon aparatu Golgiego. Wcześniej wykazano, że związki te nie występują również w jądrze komórkowym (22).

III. Biosynteza tokoferoli

Badania nad biosyntezą tokoferoli wykazały, że ich pochodzenie jest heterogenne, gdyż pierścień aromatyczny 1,4-benzochinonu i dwudziestowęglowy łańcuch prenylowy powstają oddzielnie na różnych szlakach metabolicznych. Następnie zachodzi ich kondensacja (prenylacja) oraz cyklizacja do formy chromanolowej i metylowanie pierścienia aromatycznego.

III-1. Biosynteza prenylowego łańcucha bocznego

Badania wielu autorów (23—26) z podawaniem różnym roślinom radioaktywnych prekursorów takich jak octan, kwas mewalonowy czy IPP wykazały, że łańcuch boczny tokoferoli, pochodny fitolu, powstaje według ustalonego schematu biosyntezy związków izoprenoidowych (Ryc. 3). Szlak ten rozpoczynający się kondensacją dwóch cząsteczek acetyloCoA, poprzez kwas mewalonowy prowadzi do pirofosforanu izopentenylu, rozgałęzionej jednostki pięciowęglowej, która ulega izomeryzacji do drugiej jednostki pięciowęglowej — pirofosforanu dimetyloallilu. Następnie obie jednostki kondensują do pirofosforanu geranylu. Po kolejnym dołączeniu dwóch reszt IPP powstaje pirofosforan geranylogeranylu.

Wiadomo, że acetyloCoA powstaje z octanu lub pirogronianu w plastydach (27), ale po podaniu radioaktywnego octanu lub acetyloCoA preparatom chloroplastów lub chromoplastów, radioaktywność odnajdywana była głównie w kwasach tłuszczowych, a nie plastydowych związkach prenylowych (28—30). Z kolei Kreuz i Kleinig (31) wykazali, że zarówno chloroplasty liści szpinaku jak i chromoplasty kwiatów żonkili nie przekształcają MVA, MVAP i MVAPP do IPP. Natomiast dodanie do tych preparatów odpowiedniej frakcji cytosolowej zawierającej kinazy mewalonianu i fosfomewalonianu oraz dekarboksylazę pirofosfomewalonianu powoduje przekształcenie wszystkich trzech prekursorów do IPP i dalej do związków prenylowych. Z drugiej strony Beyer i wsp. (32) wykazali, że izolowane chromoplasty z kwiatów żonkila włączają bardzo aktywnie [$1-^{14}\text{C}$] IPP do plastydowych związków izoprenoidowych. Na podstawie tych wyników Kreuz i Kleinig (31) uważają, że IPP powstaje w cytoplazmie, a następnie jest przekazywany do różnych przedziałów komórkowych i kierowany na różne szlaki metaboliczne np. w endoplazmatycznym reticulum do biosyntezy sterydów, a w plastydach do izoprenoidów. Z kolei inni autorzy ciągle nie wykluczają istnienia zaproponowanej wcześniej (33) drogi biosyntezy IPP z acetyloCoA w plastydach, aczkolwiek nie została ona jeszcze udowodniona.

Soll i wsp. (34) wykazali, że enzymy katalizujące syntezę GGPP z IPP występują w osłonce i stromie chloroplastów, przy czym dodanie do stromy błon chloroplastowych czy to otoczki czy tylakoidów wyraźnie zwiększa aktywność tych enzymów. Późniejsze badania tych autorów (35, 36) wykazały, że wydłużanie łańcucha prenylowego z IPP do GGPP zachodzi w otoczce chloroplastowej, lecz wydawało się, że GGPP nie jest tam redukowany do fityloPP czy fitolu (35, 37). Dopiero ostatnie badania Soll i wsp. (36, 38) udowodniły, że reakcja redukcji GGPP do fityloPP jest katalizowana przez enzymy zlokalizowane również w otoczce chloroplastowej.

III-2. Biosynteza pierścienia aromatycznego

Istnieje kilka szlaków biosyntezy pierścienia aromatycznego w roślinach; główny poprzez kwas szikimowy powstały z erytrozo-4-P i fosfoenolopirogronianu oraz rzadziej spotykana aromatyzacja różnych pierścieniowych związków terpenoidowych, czy wreszcie kondensacja acetyloCoA na szlaku poliketydowym.

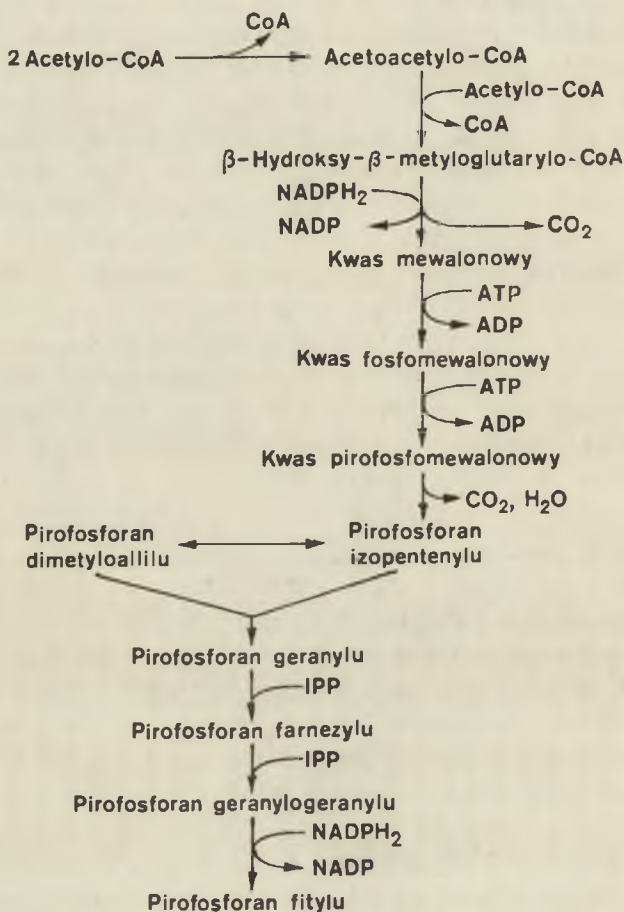
Wykazano, że biosynteza pierścienia aromatycznego tokoferoli prowadzi przez kwas szikimowy, ponieważ po podaniu zarówno liściom jak i izolowanym z nich chloroplastom znakowanego kwasu [1,6-¹⁴C] szikimowego odnajdywano radioaktywność w pierścieniach aromatycznych fenyloalaniny i tyrozyny oraz w γ - i α -tokoferolach i α -tokoferylchinonie (39, 40, 41). W dalszych badaniach podawano glonom (*Chlorella pyrenoidosa*, *Euglena gracilis*, *Anacystis nidulans*), a także liściom roślin wyższych (sałata, szpinak) i izolowanym z nich chloroplastom [U-¹⁴C] D,L-tyrozynę, kwas p-hydroksyfenylo-[3,4-¹⁴C]pirogronowy, kwas [U-¹⁴C]fenylopirogronowy, kwas [U-¹⁴C] lub [U-³H]homogentyzynowy i stwierdzono, że wszystkie te związki są prekursorami tokoferoli, a wśród nich najbardziej wydajny jest ten ostatni. Na podstawie tych oraz podobnych doświadczeń przeprowadzonych przez innych autorów (42, 43) zaproponowano schemat biosyntezy kwasu homogentyzynowego najbliższego prekursora części aromatycznej tokoferoli w komórce roślinnej (Ryc. 4).

III-3. Kondensacja pierścienia aromatycznego i łańcucha prenylowego

Po zsyntetyzowaniu pierścienia aromatycznego i dwudziestowęglowego łańcucha prenylowego zachodzi kondensacja tych dwóch składników. Obecnie uważa się, że kwas homogentyzynowy jest tym związkiem do którego dołącza się łańcuch boczny w formie pirofosforanu (37). Wykazano, że radioaktywny fitol czy geranylogeraniol mogą kondensować z kwasem homogentyzynowym jedynie w obecności ATP oraz kinazy fosforylującej te związki.

Ponieważ przez wiele lat sądzono, że w roślinach występuje tylko jeden monometylotokol — δ -T, wydawało się logiczne, iż dołączenie łańcucha bocznego następuje zawsze w pozycji meta do grupy metylowej w pierścieniu aromatycznym, a pochodzącej z łańcucha bocznego kwasu homogentyzynowego. Dopiero w 1976 roku Janiszowska i Pennock (2) po raz pierwszy wyizolowali z liści fasoli dwa izomery monometylofitylochinonów: 2-MeTQ i 3-MeTQ oraz ich chromanolowe pochodne: 8-MeT (δ -T) i 7-MeT, natomiast nie wykryli trzeciego, ostatniego z możliwych, izomeru czyli 5-MeT i 5-MeTQ. Autorzy uważają więc, że w roślinach wyższych prenylacja może zachodzić w różnych pozycjach w stosunku do grupy metylowej pochodzącej z łańcucha bocznego kwasu homogentyzynowego. Podobne wyniki uzyskała Janiszowska (44), która po podaniu

radioaktywnego fitolu protoplastom liści nagietka zaobserwowała, po 1 godzinie od momentu podania prekursora, wysokie włączenie do obu monometylotokoferylochinonów: 2-MeTQ i 3-MeTQ, ale nie do 5-MeTQ. Wyniki te potwierdziły sugestię o możliwości przyłączania łańcucha prenylowego w różną pozycję pierścienia aromatycznego oraz, że w wyniku prenylacji jako pierwsze powstają formy chinonowe będące w równowadze z formą hydrochinonową (Ryc. 5).

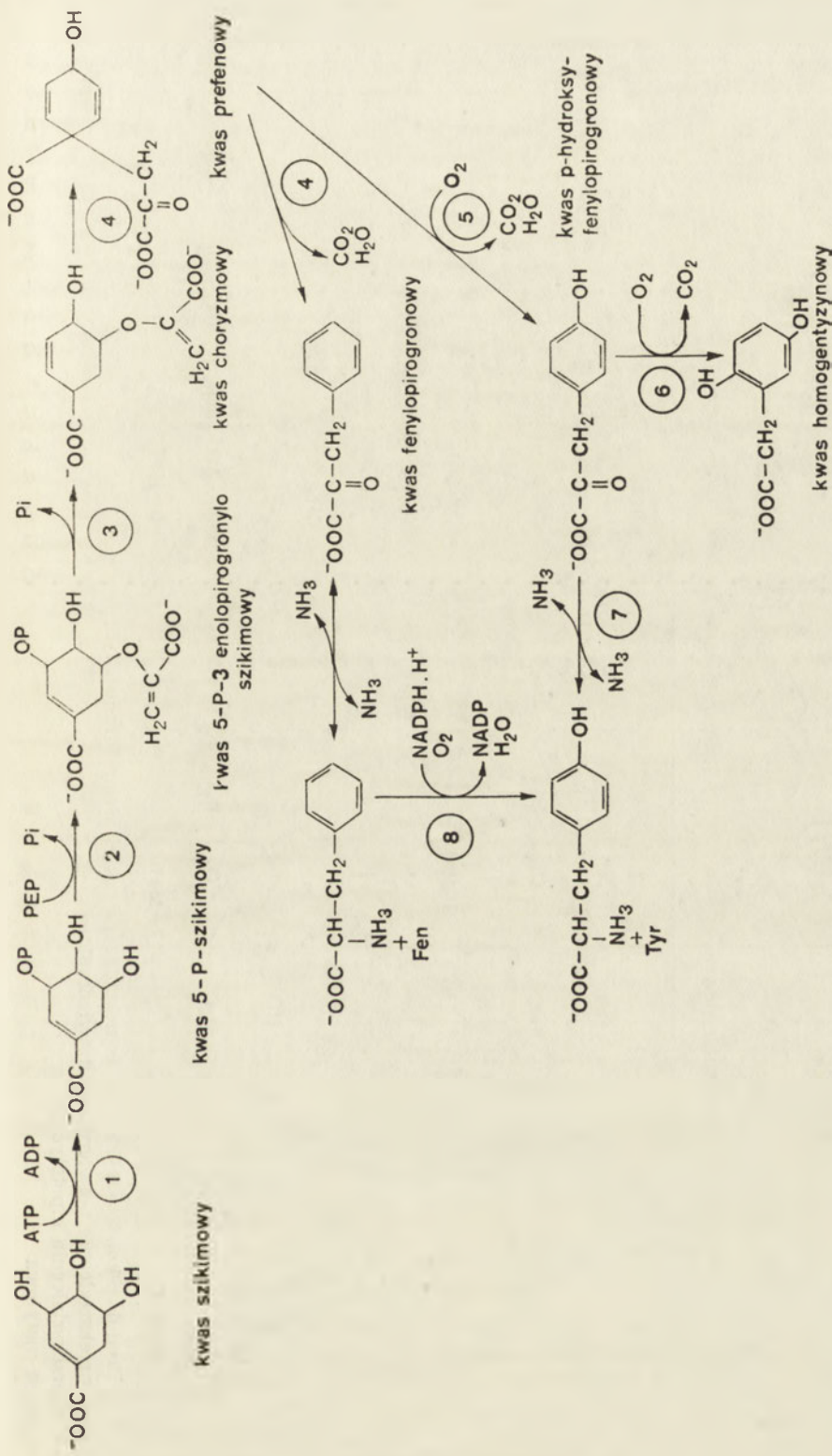


Ryc. 3. Szlak biosyntezy pirofosforanu fityly

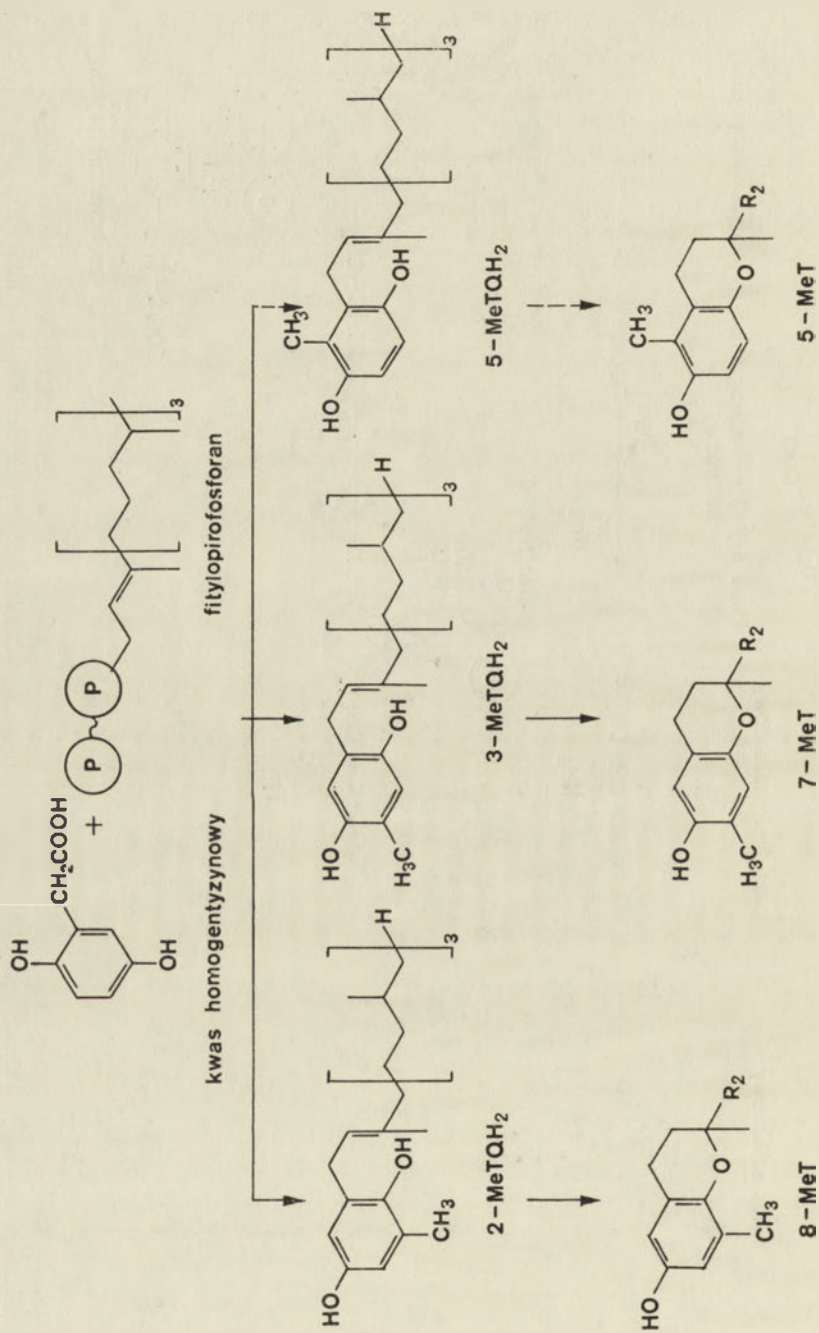
III-4. Cyklizacja oraz metylowanie pierścienia aromatycznego

Przeprowadzone dotychczas badania nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie na którym etapie biosyntezy tokoferoli zachodzi cyklizacja i metylowanie pierścienia aromatycznego.

Janiszowska i Pennock (2) podawali radioaktywne izomery monometylofitylhydrochinonów: 2-MeTQH₂, 3-MeTQH₂ i 5-MeTQH₂ liściom fasoli i wykazali, że związki te przekształcają się w odpowiednie

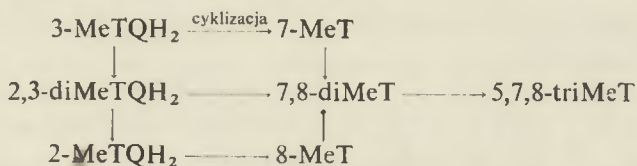


Ryc. 4. Drogi biosyntezy kwasu homogentyzynowego (wg. 42, 43) 1 — kinaza szikimianowa, 2 — syntaza 5-P-3-enolpirogonyloszikimianowa, 3 — enzym niescharakteryzowany, 4 — mutaza choryzmianowa-dehydrataza preferianowa, 5 — dehydrogenaza preferianowa, 6 — oksydaza p-hydroksyfenylopirogonianowa, 7 — transaminaza, 8 — 4-hydroksylaza fenylalaninowa

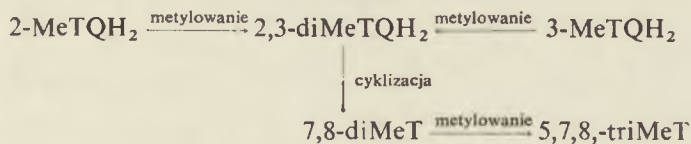


Ryc. 5. Produkty kondensacji kwasu homogentyzynowego i pirofosforanu fitylu
 —→ przekształcenia potwierdzone doświadczalnie
 - - -> przekształcenia hipotetyczne
 — grupa metylowa

monometylotokole, dimetylotokole i α -tokoferol. Wyniki te wskazują, że w fasoli po kondensacji najpierw zachodzi cyklizacja monometylofitylohydrochinonu do monometylotokolu, a następnie kolejne metylowanie. Z drugiej strony autorzy ci zauważyli, że po podaniu radioaktywnego 3-MeTQH₂ powstaje nie tylko 7-MeT, ale także 2,3-diMeTQ, co wskazuje, że wprowadzenie grupy metylowej w pozycję 8 tokoferolu czy pozycję 2 metylofitylohydrochinonu może zachodzić zarówno na poziomie chinonu jak i chromanolu. W dalszych doświadczeniach, gdy podawano radioaktywne izomery monometylotokoli: 5-MeT, 7-MeT i 8-MeT, stwierdzono, że przekształcają się one w dimetylopo pochodne i α -tokoferol, co potwierdziło wcześniejszą sugestię, iż raczej forma chromanolowa, a nie chinonowa ulega kolejnemu metylowaniu. W doświadczeniu tym najwięcej radioaktywności po 24 godzinach od momentu podania prekursora odnaleziono w 7,8-diMeT, który był dalej metylowany do α -T. Ustalono również, że z trzech podawanych radioaktywnych izomerów najefektywniej metabolizowany był 7-MeT. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano następującą drogę biosyntezy tokoferoli w fasoli:



Stwierdzono także, że egzogenny 5-MeTQH₂ i 5-MeT mogą być chociaż w małym stopniu, substratami wykorzystywanymi w biosyntezie α -T w liściach fasoli. Ponieważ w tej roślinie nie występuje ani 5-MeTQ ani 5-MeT ani 5,7-diMeT, to wydaje się, że związki te nie są syntetyzowane *in vivo*, natomiast metylotransferaza występująca w liściach fasoli wykazuje małą specyficzność w stosunku do położenia grupy metylowej w pierścieniu aromatycznym. Z kolei Soll i Schultz (34, 45, 46) inkubując chloroplasty z liści szpinaku, z [Me-¹⁴C]SAM wskazali, że metylowanie zachodzi na poziomie monometylofitylohydrochinonu i dopiero jego dimetylopo pochodna ulega cyklizacji do tokoferolu i końcowemu metylowaniu. Autorzy ci proponują następującą drogę przekształceń badanych związków:



Ustalono, że w przypadku liści szpinaku najlepszym prekursorem w reakcji metylowania jest 2-MeTQH₂. Podobne wyniki uzyskano także w przypadku siewek pszenicy, owsa i jęczmienia, stwierdzając, że w nich 2-MeTQH₂ ulegał metylowaniu do 2,3-diMeTQH₂ i 2,5-diMeTQH₂. Powstałe hydrochinony ulegały cyklizacji odpowiednio do 7,8-diMeT i 5,8-diMeT

i nagromadzały się w badanych roślinach, ponieważ nie ulegały dalszemu metylowaniu do α -T.

Szlaki biosyntezy zaproponowane przez Janiszowską i Penocka oraz Solla i Schultza różnią się między sobą etapem, na którym zachodzi cyklizacja. Ci pierwsi proponują cyklizację do formy chromanolowej przed wprowadzeniem drugiej grupy metylowej do pierścienia aromatycznego, natomiast ci drudzy po wprowadzeniu tej grupy. Różnica ta może być spowodowana specyficznością gatunkową roślin. Ponadto jest również możliwe funkcjonowanie obu tych szlaków w tej samej roślinie, z tym, że jeden z nich byłby znacznie bardziej aktywny metabolicznie. Należy także pamiętać, iż badania Solla i Schultza przeprowadzone zostały z użyciem izolowanych chloroplastów i fakt ten mógł wpłynąć na otrzymane wyniki, bowiem *in vitro* mogą być lepiej wykorzystywane jako substraty do metylowania prenylohydrochinony niż formy chromanolowe. Nie należy również wykluczyć możliwości dwóch miejsc biosyntezy tokoferoli w komórce roślinnej i nieco różnych jej szlaków.

Interesujące są spostrzeżenia dotyczące metylotransferazy wprowadzającej grupę metylową do pierścienia aromatycznego tokoferoli. Doświadczenia z użyciem liści fasoli, poprzedzone przez Threlfalla, (2) wykazały, że podany im radioaktywny tokol nie ulegał przekształceniu do żadnego tokoferylochinonu czy tokoferolu. Zatem substratem metylotransferazy jest związek z przynajmniej jedną grupą metylową w pierścieniu aromatycznym, a różnice w specyficzności w stosunku do związków z różnie rozmieszczoną grupą metylową są małe, ponieważ wszystkie trzy izomery MeTQH₂ i MeT ulegały metylowaniu w tej roślinie. Z kolei metylotransferaza z liści szpinaku wykazuje dużą specyficzność w stosunku do położenia grupy metylowej w pierścieniu, gdyż metyluje głównie izomer 2-MeTQH₂ (45). Kiedy nieuszkodzonym chloroplastom z tychże liści szpinaku podawano jako substraty MeTQH₂ i jako przekaźnik grupy metylowej [Me-¹⁴C] SAM, znakowany atom ¹⁴C był wbudowywany do α -T. Gdy zamiast SAM podawano radioaktywną metioninę i ATP, nie obserwowano metylowania, ponieważ chloroplasty w tych warunkach nie były zdolne do wytworzenia SAM. Z kolei, kiedy podawano substraty utlenione tj. MeTQ i [Me-¹⁴C] SAM reakcja metylowania również praktycznie nie zachodziła. Na podstawie tych danych można twierdzić, że donorem grup metylowych jest SAM i że reakcja podstawienia zachodzi tylko w obecności zredukowanych substratów zawierających co najmniej jedną grupę metylową, pochodzącą z kwasu homogentyzynowego.

III-5. Rola tokotrienoli w biosyntezie tokoferoli

Opisane wcześniej prace dotyczyły biosyntezy α -tokoferolu. Badania biosyntezy tokotrienoli występujących w dużych ilościach w lateksie kaczukowca brazylijskiego wykazały, że 8-MeT₃ powstaje w wyniku konden-

sacji kwasu homogentyzynowego i GGPP (47). Następnie, doświadczenia z podawaniem $[Me-^{14}C]$ SAM potwierdziły, że 8-MeT₃ jest prekursorem γ -T₃ i α -T₃. Ponieważ lateks zawiera obok tokotrienoli niewielkie ilości α -T, autorzy sugerowali możliwość uwodorowania α -tokotrienolu do α -tokoferolu najprawdopodobniej przy współudziale NADPH₂ (48). W e l l b u r n (49) potwierdził tę hipotezę inkubując liście i lateks figi sprężystej z δ -T₃ i $[^3H]$ NADPH₂. Otrzymał znakowane trytem zarówno γ -T jak i α -T, co wskazuje, że w tej roślinie zachodzi przekształcenie tokotrienoli do tokoferoli już na etapie dimetylopoходnej.

S o l l i S c h u l t z (46) obserwując włączanie $[MeT-^{14}C]$ SAM do 2-MeTQH₂ i 2-MeT₃QH₂ w chloroplastach liści szpinaku stwierdzili, że poziom zmetylowanego 2-MeT₃QH₂ jest 4,5 raza większy niż zmetylowanego 2-MeTQH₂. Wyniki rozkładu znakowania wszystkich związków pośrednich w biosyntezie α -tokoferolu sugerują, że w tychże chloroplastach oprócz postulowanego wcześniej szlaku tokoferolowego: 2-MeTQH₂ → 2,3-diMeTQH₂ → γ -T → α -T istnieje drugi szlak tokotrienolowy: 2-MeT₃QH₂ → 2,3-diMeT₃QH₂ → γ -T₃ → α -T₃, chociaż do tej pory nie wykryto tokotrienoli w tej roślinie. Ponadto ci sami autorzy (37) stwierdzili, że prenylotransferaza w liściach szpinaku wykazuje *in vitro* preferencję 3:1 w wykorzystaniu jako donora prenylowego łańcucha bocznego GGPP w porównaniu do fityloPP. Jednak w czasie inkubacji rozbitych chloroplastów z $[^3H]$ kwasem homogentyzynowym bez dodania jakiegokolwiek prenyloPP, otrzymano tylko znakowany 2-MeTQH₂, co wskazuje, że *in vivo* w liściach szpinaku są syntetyzowane jedynie tokoferole. Z drugiej strony wyniki uzyskane przez S o l l a i S c h u l t z a wskazują na małą specyficzność w stosunku do stopnia nasycenia dwudziestowęglowego łańcucha prenylowego prenylotransferazy występującej w badanej roślinie.

IV. Regulacja biosyntezy tokoferoli

Do tej pory nie wiele wiadomo o czynnikach regulujących biosyntezę tokoferoli. Z nielicznych badań, przeprowadzonych na różnym materiale roślinnym, wynika, że poziom tokoferoli i tokoferylochinonów zależy od oświetlenia i temperatury hodowli. Dlatego też uznano, że oba te czynniki, dostarczające roślinie różnego rodzaju energię, regulują biosyntezę omawianych związków.

L i c h t e n t h a l e r (6) badał zawartość lipidów plastydowych w oświetlanych ciągle światłem białym wypłoniętych siewkach jęczmienia rosnących w temperaturze 20°C. Kontrolę stanowiły siewki rosnące w warunkach 14-to godzinnego dnia. Rośliny wypłonięte zawierały 7,5 raza mniej α -T i α -TQ niż rośliny zielone, a po naświetleniu następował wzrost poziomu tych związków. Podobne obserwacje poczyniono na siewkach nagietka, w których po okresowym zaciemnieniu, a następnie wystawieniu

na światło o dużym natężeniu ($780 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) następował znaczny wzrost ilości α -T w porównaniu z roślinami kontrolnymi rosnącymi na świetle o natężeniu $58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (50). Prowadzono także badania na roślinach oświetlanych światłem o różnej długości fali. Zauważono, iż światło niebieskie wywołuje podobny efekt jak światło białe, czyli wzrost poziomu α -T i α -TQ, natomiast światło czerwone, podobnie jak zaciemnienie, powoduje obniżenie ilości tych związków (5, 51). Badania dynamiki znakowania [^{14}C] tyrozyną tokoferoli w subfrakcjach komórkowych liści nagietka na świetle i w ciemności wykazały, że proces kondensacji pierścienia aromatycznego i reszty fitylowej jest niezależny od światła, natomiast proces metylowania zarówno monometylotokoli jak i γ -tokoferolu jest stymulowany światłem (4).

Jedyną pracę nad wpływem temperatury na poziom tokoferoli przeprowadzono na roślinach nagietka (7). Wykazano, że rośliny hodowane w temperaturze 29°C (dzień) i 21°C (noc) zawierają 10-ciokrotnie większe ilości α -T i γ -T oraz 7-krotnie większe δ -T niż rośliny kontrolne hodowane w warunkach standartowych (21°C w dzień i 12°C w nocy). Wyniki te wskazują, że podwyższenie temperatury w czasie wegetacji roślin stymuluje biosyntezę tokoferoli.

Zbadano także wpływ fitohormonów na biosyntezę α -T i α -TQ. Okazało się, że zarówno auksyny jak i cytokininy hamują indukowane światłem tworzenie się obu form α -tokoferolu (5). Wiadomo, że auksyny i cytokininy mają głównie działanie stymulujące wzrost roślin, a co za tym idzie i poziom różnych związków. Ponieważ w tym samym czasie gdy następowało zahamowanie biosyntezy tokoferolu pod wpływem obu typów fitohormonów wzrastał poziom chlorofilu i witaminy K_1 , wydaje się więc, że powstały fitol jest najpierw kierowany do syntezy zarówno chlorofilu jak i witaminy K_1 , a dopiero później do tokoferoli.

V. Lokalizacja biosyntezy tokoferoli

Z przedstawionych wcześniej badań (III-1) wiadomo, że IPP powstały w cytoplazmie przenika do chloroplastów i w otoczkę ulega dalszym przekształceniom do fityloPP. Do tej pory nie stwierdzono, aby reszta fitylowa powstawała poza chloroplastami, aczkolwiek wiadomo, że np. prenylowy łańcuch boczny ubichinonu może być syntetyzowany w mitochondriach. Nadal także nie wiadomo, czy MVA powstaje w chloroplastach i ulega dalszym przekształceniom do IPP, czy też nie.

Badania wielu autorów z podawaniem radioaktywnego MVA i CO_2 różnym roślinom wykazały, iż CO_2 , znakujący zarówno pierścień aromatyczny jak i łańcuch boczny tokoferoli, jest wbudowywany do różnych plastydowych poliprenoidów tj. karotenoidów, chlorofili i α -T, natomiast MVA, będący prekursorem łańcuchów prenylowych, znakuje głównie mitochon-

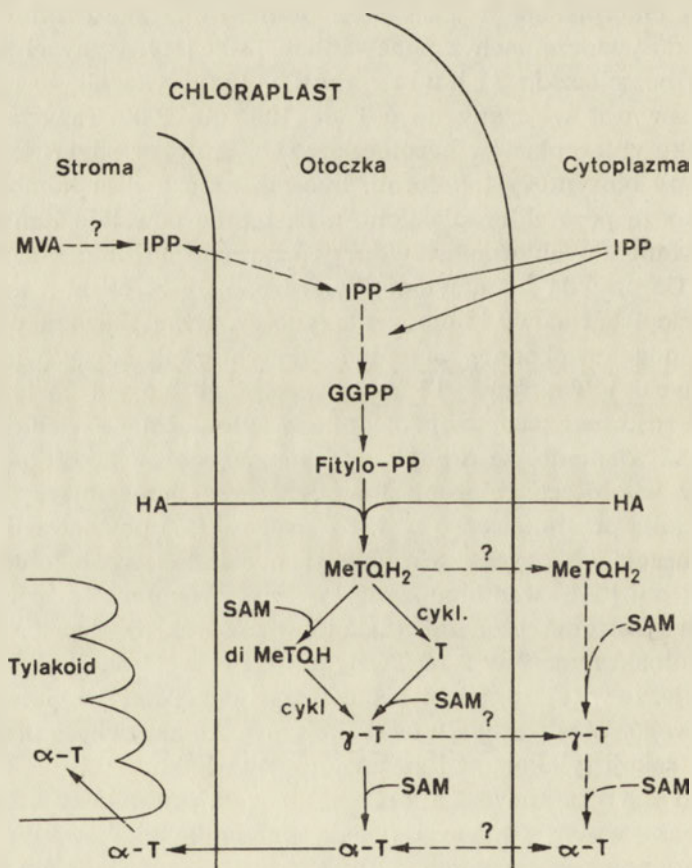
drialny ubichinon. Na podstawie tych wyników autorzy stwierdzili, że otoczka chloroplastowa jest nieprzepuszczalna dla kwasu mewalonowego (1). Z kolei po podaniu [^{14}C] CO_2 izolowanym chloroplastom, okazało się, iż znakował on dobrze karotenoidy i chlorofile, a bardzo słabo α -T, co wskazuje, że do biosyntezy tokoferoli niezbędne są także inne organelle komórkowe (52). Po podaniu radioaktywnego MVA kulturom tkankowym tkanki kallusowej *Kalanchoe crenata* zaobserwowano w supernatancie postchloroplastowym niewielką ilość α -T o wysokiej radioaktywności specyficznej, a we frakcji chloroplastowej α -T o niskiej radioaktywności specyficznej. Wydaje się więc, że biosynteza α -T, lub przynajmniej niektóre końcowe jej etapy, mogą zachodzić częściowo poza chloroplastami. Podobnie Janiszowska i Jasińska (4) po podaniu [$\text{U-}^{14}\text{C}$] tyrozyny będącej prekursorem części aromatycznej tokoferoli pędem nagietka i zbadaniu dynamiki znakowania tych związków w subfrakcjach komórkowych uzyskanych z tych pędów, stwierdziły, że biosynteza tokoferoli może zachodzić zarówno w chloroplastach jak i poza nimi we frakcji mikrosomalnej. Z kolei w doświadczeniach z podawaniem [$3\text{-}^{14}\text{C}$] tyrozyny chloroplastom z otoczką i bez otoczki, Schultz i w s p. (52) wykazali, że radioaktywny prekursor jest włączany do α -T od 100 do 1000 razy efektywniej w przypadku chloroplastów bezotoczkowych. Autorzy sugerują, że wcześniejsze etapy biosyntezy tokoferoli, być może do kwasu homogentyzynowego, zachodzą poza chloroplastami, a następnie powstałe tam związki są transportowane do chloroplastów przy czynnym udziale otoczki chloroplastowej. Co prawda już dawniej stwierdzono, że tyrozyna i kwasy p-hydroksyfenylopirogronowy i homogentyzynowy, syntetyzowane poza chloroplastami, mogą swobodnie przenikać do chloroplastów. Tym niemniej Whistance i Threlfall (53) uważają, że biosynteza tych kwasów w komórce roślinnej zachodzi oddzielnie w cytoplazmie i w chloroplastach.

Ponieważ wiadomo, że prenylowy łańcuch boczny tokoferoli jest syntetyzowany w otoczce chloroplastowej, a kwas homogentyzynowy może łatwo przez nią przenikać, Soll i Schultz (37) postanowili sprawdzić czy kondensacja obu tych związków zachodzi na terenie chloroplastów. Inkubowali oni [^3H] kwas homogentyzynowy z różnymi frakcjami chloroplastowymi tj. stromą, błonami tylakoidów i otoczki w obecności fityloPP. Wysoka radioaktywność w 2-MeTQH₂ uzyskana we frakcji otoczki wyraźnie wskazuje, że w tej części chloroplastu zachodzi prenylacja kwasu homogentyzynowego. W odróżnieniu od frakcji otoczki, aktywność prenylotransferazy we frakcji tylakoidów i stromy jest niewielka.

Ostatnio Janiszowska (44) inkubowała protoplasty z liści nagietka z radioaktywnym fitolem i badała dynamikę znakowania tokoferoli i fitylochionów w różnych subfrakcjach komórkowych. Uzyskane wyniki wskazują, że włączenie fitolu do badanych związków zachodzi w chloroplastach, gdzie również ma miejsce dołączanie kolejnych grup metylowych do pierścienia aromatycznego. Z drugiej strony, we frakcji

mikrosomalnej również zaobserwowano radioaktywne monometylotokole i monometylofitylochinony, które ulegały metylowaniu do γ - i α -T. Nasuwa się pytanie, czy we frakcji mikrosomalnej zachodzi biosynteza tokoferoli, chociaż do tej pory nie wykryto nigdzie poza chloroplastami fitolu lub fityloPP, czy też w tej frakcji występują niespecyficzne prenylotransferazy, które przenoszą dostarczony z zewnątrz fitol na kwas homogentyzynowy, czy też monometylofitylochinony powstałe w chloroplastach przechodzą do frakcji mikrosomalnej i tu ulegają dalszym przekształceniom do α -T, który z kolei wracałby do chloroplastów. Niestety, na obecnym etapie badań trudno dać jednoznaczną odpowiedź na te pytania. Jedno wydaje się być możliwe we frakcji mikrosomalnej, mianowicie dołączanie grup metylowych do pierścienia aromatycznego tokoferoli. Już wcześniej Botham i Pennock (2) wykazali, że γ -tokoferol jest metylowany do α -tokoferolu poza chloroplastami.

Późniejsze badania przeprowadzone na nieuszkodzonych chloroplastach



Ryc. 6. Schemat lokalizacji biosyntezy tokoferoli na terenie komórki roślinnej
 —→ szlak udowodniony, - - -→ szlak hipotetyczny; skrót diMeTQH występujący
 w schemacie winien być diMeTQH₂.

oraz subfrakcjach chloroplastowych wykazały, że wbudowanie dwóch grup metylowych z SAM do pierścienia aromatycznego tokoferoli zachodzi w otoczce chloroplastowej, a więc w miejscu gdzie zachodzi zarówno biosynteza fityloPP jak i prenylacja kwasu homogentyzynowego.

Dane dotyczące lokalizacji poszczególnych etapów biosyntezy tokoferoli zostały schematycznie przedstawione na Ryc. 6.

Na podstawie prac opublikowanych do tej pory i przedstawionych w niniejszym artykule, wydaje się, że w komórce roślinnej biosynteza tokoferoli zachodzi w chloroplastach, co zostało dobrze udokumentowane, oraz w cytoplazmie, co jednak jest nadal tylko hipotezą roboczą.

Zaakceptowano do druku 11 czerwca 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Jerzmanowski A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 273—284.
2. Janiszowska W., Pennock J. F., (1976), *Vitam. Horm.*, (N. Y.), **34**, 77—105.
3. Hughes P. E., Tove S. B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4447—4452.
4. Janiszowska W., Jasińska R., (1982), *Acta Biochim. Pol.*, **29**, 37—44.
5. Lichtenthaler H. K., (1977) w: *Lipids and lipid polymers in higher plants*, red. Tevini M., Lichtenthaler H. K., str. 231—258; Springer-Verlag, Berlin.
6. Lichtenthaler H. K., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 164—172.
7. Janiszowska W., Rygier J., (1985), *Physiol. Plant.*, **63**, 425—490.
8. McHale D., Green J., Marcinkiewicz S., Feeney J., Sutcliffe L. H., (1963), *J. Chem. Soc.* 784—787.
9. Pennock J. F., Hemming F. W., Kerr J. D., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 542—548.
10. Dunphy P. J., Whittle K. J., Pennock J. F., Morton R. A., (1965), *Nature, Lond.* **207**, 521—528.
11. Newton R. P., Pennock J. F., (1971), *Phytochemistry*, **10**, 2323—2328.
12. Booth V. H., (1963), *Phytochemistry*, **2**, 421—427.
13. Bucke C., (1968), *Phytochemistry*, **7**, 693—700.
14. Dilley R. A., Crane F. L., (1963), *Plant Physiol.*, **38**, 452—456.
15. Lichtenthaler H. K., (1966), *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **79**, 111—117.
16. Janiszowska W., Korczak G., (1980), *Phytochemistry*, **19**, 1391—1392.
17. Lichtenthaler H. K., (1968), *Z. Pflanzenphysiol.*, **59**, 195—210.
18. Threlfall D. R., Goodwin T. W., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 573—588.
19. Hughes C. T., Gaunt J. K., Laidman D. L., (1958), *Biochem. J.*, **124**, 9P.
20. Janiszowska W., Michalski W., Kasprzyk Z., (1976), *Phytochemistry*, **15**, 125—127.
21. Barr R., Crane F. L., (1977), *Plant Physiol.*, **59**, 433—437.
22. Newton R. P., Pennock J. F., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 21P.
23. Costes C., (1966), *Phytochemistry*, **5**, 311—324.
24. Wellburn A. R., Stone K. J., Hemming F. W., (1966), *Biochem. J.*, **100**, 23C.
25. Watts R. B., Kekwick R. G. O., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 469—475.

26. Benz J., Rüdiger W., (1981), *Z. Pflanzenphysiol.* **102**, 95—100.
27. Kuhn D. N., Knauf M., Stumpf P. K., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 441—450.
28. Kleinig H., Liedvogel B., (1978), *Eur. J. Biochem.* **83**, 499—505.
29. Kleinig H., Liedvogel B., (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 339—342.
30. Kleinig H., Liedvogel B., (1979), *Planta*, **144**, 473—477.
31. Kreuz K., Kleinig H., (1981), *Planta*, **153**, 578—581.
32. Beyer P., Kreuz K., Kleinig H., (1980), *Planta*, **150**, 435—438.
33. Rogers L. J., Shah S. P. J., Goodwin T. W., (1967), w: *Biochemistry of chloroplasts*, red. Goodwin T. W., t. 2, str. 283—292; Academic Press, London.
34. Soll J., Douce R., Schultz G., (1980), *FEBS Lett.*, **112**, 243—246.
35. Block M. A., Joyard J., Douce R., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **631**, 210—219.
36. Soll J., Schultz G., Rüdiger W., Benz J., (1983), *Plant Physiol.*, **71**, 849—854.
37. Soll J., Kemmerling M., Schultz G., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 544—550.
38. Soll J., Schultz G., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 907—912.
39. Whistance G. R., Threlfall D. R., (1971) w: *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*, red. Goodwin T. W., str. 357—397; Academic Press, London.
40. Bickel H., Palme L., Schultz G., (1978), *Phytochemistry*, **17**, 119—124.
41. Whistance G. R., Threlfall D. R., (1970), *Phytochemistry*, **10**, 1533—1538.
42. Bishop N. I., Wong I., (1974), *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **87**, 359—371.
43. Baszyński T., Tukurndorf A., (1975), *FEBS Lett.*, **57**, 104—106.
44. Janiszowska W., (1986), *Phytochemistry*, w druku.
45. Soll J., Schultz G., (1980), *Phytochemistry*, **19**, 215—218.
46. Soll J., Schultz G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 715—720.
47. Whistance G. R., Threlfall D. R., (1970), *Biochem. J.*, **117**, 593—600.
48. Peake J. R., Audley B. G., Pennock J. F., (1970), *Biochem. J.*, **109**, 58P.
49. Wellburn A. R., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 743—748.
50. Janiszowska W., Mirkiewicz E., Kasprzyk Z., (1978), *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* **26**, 355—358.
51. Grumbach K. H., Lichtenthaler H. K., (1975), *Z. Naturforsch.*, **30c**, 337—340.
52. Schultz G., Huchzermeyer Y., Reupke B., Bickel H., (1976), *Phytochemistry*, **15**, 1381—1386.
53. Whistance G. R., Threlfall D. R., (1968), *Biochem. J.* **109**, 577—592.

ANDRZEJ JERZMANOWSKI *

Rola histonu H1 w strukturze chromosomów

The role of histone H1 in the structure of chromosomes

Spis treści:

Wstęp

- I. Budowa histonów typu H1 i sposób ich oddziaływania z DNA
- II. Miejsce histonu H1 w strukturze chromosomu i mechanizm kondensacji zależnej od H1
- III. Mikroheterogenność sekwencyjna histonu H1 i jej możliwe znaczenie
- IV. Modyfikacje postsyntetyczne histonu H1
 - IV-1. Fosforylacja
 - IV-2. Metylacja
 - IV-3. Poli(ADP-rybo)zylacja
- V. Histon H1 a transkrypcja DNA w chromosomach
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

Introduction

- I. Structure and mode of interaction with DNA of the H1-type histones
- II. Place of histone H1 in the structure of chromosome and the mechanism of H1-dependent condensation
- III. Sequence microheterogeneity of histone H1 and its possible significance
- IV. Postsynthetic modifications of histone H1
 - IV-1. Phosphorylation
 - IV-2. Methylation
 - IV-3. Poly(ADP-ribosyl)ation
- V. Histone H1 and the transcription of chromosomal DNA
- VI. Concluding remarks

Wstęp

Histony są białkami zasadowymi występującymi uniwersalnie w jądrach komórkowych *Eukaryota*. Tworzą z DNA kompleksy nukleoproteinowe o wspólnym dla komórek wszystkich rodzajów typie budowy. Kompleksy te tworzą podstawowy zrąb chromosomów i umożliwiają upakowanie znacz-

* Dr, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, 02-089 Warszawa, al. Żwirki i Wigury 93, Polska.

nych ilości DNA w jądrze komórkowym o stosunkowo niewielkiej średnicy. Podczas gdy histony H2A, H2B, H3 i H4 (rdzeniowe) grają fundamentalną rolę w organizacji podstawowej jednostki strukturalnej — nukleosomu (1, 2), histon H1 odpowiedzialny jest za powstawanie i stabilizację struktur wyższego rzędu w chromosomie. W nukleosomie H1 stabilizuje dwa lewoskrętne, superhelikalne zwoje DNA owinięte wokół kompleksu 8 cząsteczek histonów rdzeniowych (po dwie z każdego rodzaju) (3, 4). Stabilizacja ta polega na umiejscowieniu obu końców DNA, wchodzącego i schodzącego, po tej samej stronie nukleosomu (Rys. 1a), a tym samym na wymuszeniu ułożenia nukleosomów w podstawowym, nukleosomowym włóknie chromosomów w konfiguracji zygzaka (Ryc. 1b).

Obecność H1 w chromatynie niezbędna jest do powstawania pośrednich struktur wyższego rzędu z włókna podstawowego (5), jak również dla osiągnięcia jeszcze wyższego stopnia upakowania w tak zwanym włóknie grubym (solenoidzie) o średnicy 25—30 nm (6, 7, 8). Również agregacja i precipitacja włókien grubych obserwowana *in vitro* pod wpływem soli (9), jak i kondensacja chromosomów w jądrze komórkowym (10) zależą od obecności H1. Do tej pory nie zaproponowano zadawalającego mechanizmu, który tłumaczyłby sposób w jaki H1 generuje wyższego rzędu struktury podstawowego włókna nukleosomowego. W dalszej części artykułu dokonamy przeglądu aktualnych badań w tej dziedzinie. Właściwości H1 będziemy też rozpatrywać w kontekście jego ewentualnej roli ogólnego regulatora aktywności transkrypcyjnej DNA w chromosomach.

Wśród licznych subfrakcji histonu H1 wyróżnić można kilka klas. Nie obowiązuje wprawdzie dotychczas żadna jednolita klasyfikacja, ale dla potrzeb tego artykułu wygodnie będzie posługiwać się podziałem przedstawionym poniżej:

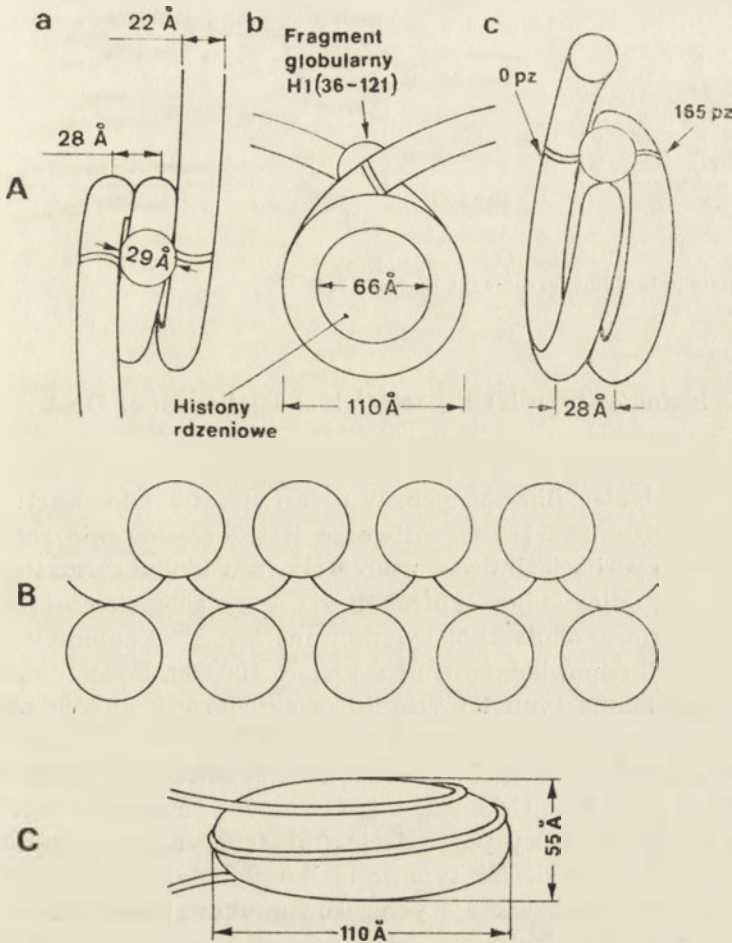
Klasa A. Histon H1 z męskich komórek rozrodczych. Typowym przykładem jest H1 z plemników jeżowca (11).

Klasa B. Histony typu H1 z grasicy cielęcej. Stanowią główny histon typu H1 w chromatynie większości tkanek zwierzęcych, występują często w postaci bliskich wariantów sekwencyjnych (11, 12).

Klasa C. Histon H5 z jądrzastych erytrocytów ptasich (13), występuje również w jądrzastych erytrocytach ryb. Różni się od H1 z grasicy cielęcej nie tylko punktowymi mutacjami (którymi różnią się od siebie poszczególne rodzaje H1 w klasie B), ale również zawartością aminokwasów zasadowych i wielkością cząsteczki. W erytrocytach występuje on obok histonu H1 z klasy B.

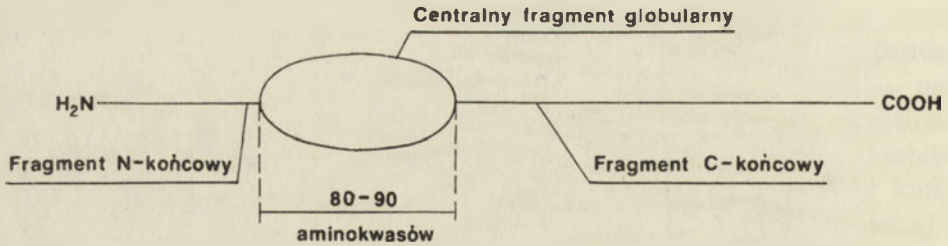
Klasa D. Histon H1^o (13), bardziej podobny do H5 niż do H1 z grasicy cielęcej. Występuje w tkankach ssaków i niższych kręgowców obok występującego tam w przewodzie H1 z klasy B. Wydaje się, że zarówno H1^o jak i H5 mogą w czasie rozwoju zastępować część pierwotnie skompleksowanego z DNA H1 z klasy B.

Wspólne wszystkim histonom H1 (z klas: A, B, C i D) cechy strukturalne



Ryc. 1. Histon H1 w chromatinie. A. Histon H1 umieszczony jest na zewnątrz białkowego rdzenia nukleosomu, wokół którego owinięte są prawie dwa pełne zwoje DNA. H1 stabilizuje pozycje końców nukleosomowego DNA powodując, że DNA „wchodzi” i „schodzi” po tej samej stronie powierzchni nukleosomu. B. Ułożenie nukleosomów w chromatinie w konfiguracji zygzaka wymuszone jest przez stabilizację pozycji końców DNA przez H1 po jednej stronie nukleosomu. C. Zewnętrzne wymiary nukleosomu.

ralne wskazują, że oddziałują one ze składnikami chromaty w bardzo podobny, jeśli nie identyczny, sposób. Cząsteczki wszystkich H1 składają się z trzech wyraźnie rozgraniczonych domen: a) niezestrukturalizowanego, zasadowego fragmentu N-końcowego, b) zestrukturalizowanej części centralnej skupiającej większość aminokwasów hydrofobowych i c) długiego, niezestrukturalizowanego i silnie zasadowego fragmentu C-końcowego (Ryc. 2).

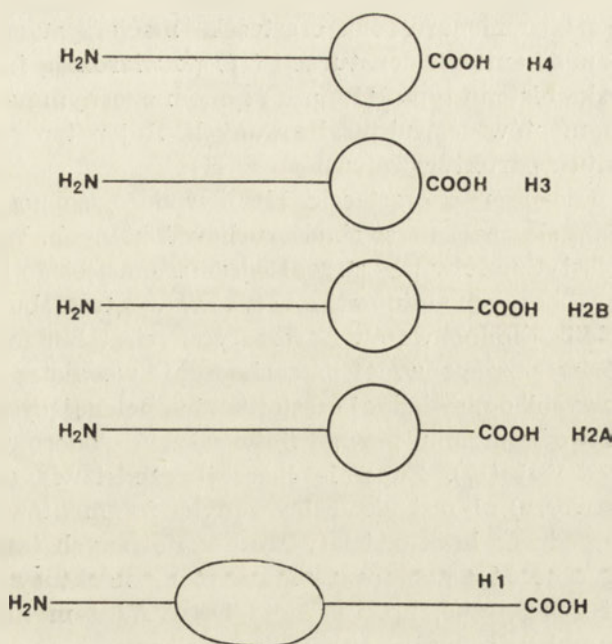


Ryc. 2. Schemat budowy cząsteczki histonu H1.

I. Budowa histonów typu H1 i sposób ich oddziaływania z DNA

Cząsteczki histonu H1 nie można zaklasyfikować ani do białek globularnych ani do białek fibrylarnych. W przeciwieństwie do zwartych białek globularnych struktura H1 w roztworze jest zdecydowanie rozciągnięta, o czym świadczy chociażby zachowanie się tego białka w czasie sączenia molekularnego. Mieszanina subfrakcji H1 z grasicy cielejącej o średniej masie cząsteczkowej około 21 500 wymywana jest np. z kolumny Sephadex G-100 w pozycji odpowiadającej masie około 100 000. Podobnie anomalnie zachowują się białka typu H1 w czasie elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu (SDS). Przyczyną tego zachowania jest obecność długich, niezestrukturalizowanych odcinków polipeptydowych przy N- i C-końcu. Cząsteczka H1 zawiera jednak również centralny fragment, który po odcięciu (np. trypsyną) odcinków N- i C-końcowych zachowuje się jak typowe białko globularne. Należy zatem H1 do białek mieszanych, zawierających zarówno ukształtowaną przez oddziaływanie wewnętrzne strukturę globularną, jak i niezestrukturalizowane, dość długie fragmenty N- i C-końcowe. W gruncie rzeczy tego typu mieszana struktura przestrzenna jest charakterystyczna dla wszystkich histonów z tym, że tylko w przypadku H1 pojawia się aż tak długi, niezestrukturalizowany fragment C-końcowy (Ryc. 3).

N-końcowe fragmenty niezestrukturalizowane histonów H2A, H2B, H3 i H4 zawierają większość aminokwasów zasadowych znajdujących się w całej cząsteczce (np. aż 70% wszystkich lizyn). Silnie zasadowe są również krótkie odcinki C-końcowe występujące w cząsteczkach H2A i H2B. Z kolei centralne odcinki H2A i H2B oraz centralne i C-końcowe odcinki H3 i H4 zawierają większość występujących w cząsteczkach tych białek aminokwasów niepolarnych, kwaśnych oraz argininy. W H1 ze spermatocytów (klasa A), H1 z grasicy, H5 i H1^o i we wszystkich dotąd poznanych ich odmianach — fragment N-końcowy jest zasadowy i bogaty w aminokwasy destabilizujące α -heliks, globularny fragment centralny zawiera niemal wszystkie aminokwasy hydrofobowe, a długi fragment C-końcowy jest bogaty w lizynę, alaninę i prolinę. Wygląda na to, że sekwencje amino-



Ryc. 3. Porównanie budowy histonów rdzeniowych i histonu H1. Struktura mieszana składająca się z zestruturalizowanego obszaru globularnego i niezestruturalizowanych, silnie zasadowych fragmentów N-końcowych jest charakterystyczna dla wszystkich histonów rdzeniowych.

kwasowe we fragmentach N- i C-końcowych histonów typu H1, H2A i H2B oraz we fragmentach N-końcowych H3 i H4 zostały przez dobór naturalny ukształtowane w ten sposób, by skutecznie uniemożliwić strukturalizację tych odcinków w roztworze lub tworzenie kompleksów międzyłańcuchowych.

Zdenaturowane po ekstrakcji kwasem z chromatyny cząsteczki histonów typu H1, po dodaniu soli, już od $\text{pH} \geq 6$ renaturują szybko, odtwarzając 100% pierwotnie istniejącej struktury α -helikalnej i całą strukturę trzeciorzędową. Trzeba jednak pamiętać, że w histonie H1 w stanie maksymalnego zestruturalizowania tylko 7–8% cząsteczki tworzy α -heliks. Strukturalizację można łatwo śledzić przez obserwację zmian widma dichroizmu kołowego (CD) lub zmian położenia sygnałów grup metyloowych w widmie jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). Trawienie zrenaturowanego białka trypsyną prowadzi do powstania fragmentu zawierającego 80–90 aminokwasów, stanowiącego końcowy produkt trawienia. Ten odporny na trypsynę fragment zawiera w sobie całość struktury α -helikalnej H1 (obserwowanej w roztworze przez pomiar CD) i wykazuje te same zmiany w sygnale NMR w czasie odwracalnego przejścia denatura-

cja — renaturacja co nienaruszona cząsteczka macierzysta (14, 15). Inne metody, np. pomiar entalpii denaturacji (16) potwierdzają fakt, że w roztworze cząsteczka histonu typu H1, poza rejonem opornym na trypsynę nie ma innych fragmentów zestrukturalizowanych. Rejon ten zatem zawiera całość fragmentu zestrukturalizowanego w H1.

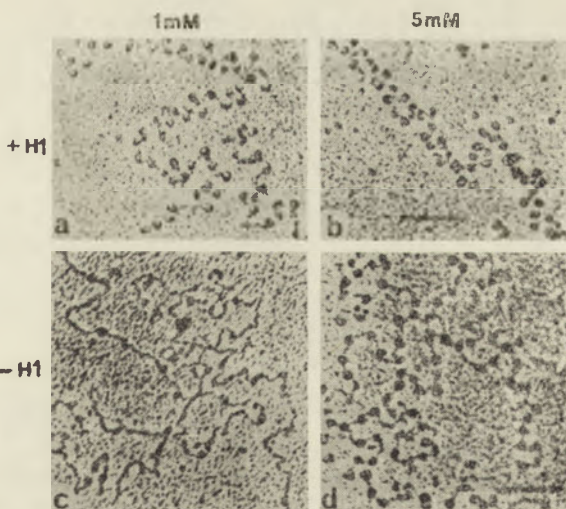
Struktura przestrzenna cząsteczki H1 powoduje, że poszczególne jej fragmenty różnią się znacznie swobodą ruchów lokalnych. We fragmencie globularnym elastyczność w przestrzeni ograniczona jest do lokalnych ruchów łańcuchów bocznych aminokwasów oraz wewnątrzglobularnych przesunięć pierścieni aminokwasów aromatycznych. Badania wymiany *deuter* — wodór wskazują również na zachodzenie wewnątrz „globuli” ruchów „oddechowych” o niewielkiej częstotliwości, polegających na miejscowym zrywaniu i odtwarzaniu pewnej ilości wiązań wodorowych w strukturze drugorzędowej (17). Zupełnie inaczej przedstawia się możliwość ruchów (w roztworze) niezestrukturalizowanych fragmentów N- i C-końcowych. Ze względu na brak oddziaływań wewnętrznych fragmenty te są mobilne i elastyczne. Mogą one przyjmować różne struktury podyktowane przez warunki zewnętrzne, np. obecność DNA. W tym miejscu trzeba zwrócić uwagę na bardzo ważną sprawę indukcji struktury drugorzędowej w tych fragmentach. Fakt, iż są one pozbawione struktury drugorzędowej w roztworze nie oznacza, że pod wpływem odpowiednio oddziaływującej matrycy nie mogą tworzyć trwałej (w obecności tej matrycy) struktury α -helikalnej w rejonach, w których nie występują duże skupiska aminokwasów przeciwdziałających tworzeniu się α -heliksu. Badania modelowe nad sekwencjami aminokwasowymi w odcinkach niezestrukturalizowanych histonów typu H1 (ze spermatocytów, H5 i grasicowego H1) wykazały, że istnieją w nich rejony, które mogą przyjmować strukturę α -heliksu wtedy, gdy zaniknie przeciwdziałające temu odpychanie między ładunkami. Analiza teoretyczna wskazuje, że heliksy takie, niewystępujące w roztworze, mogą się tworzyć w obecności DNA jednocześnie silnie z nim oddziaływując (18).

Warto zauważyć, że elastyczność łańcuchów polipeptydowych oraz możliwość indukcji struktury drugorzędowej występują także w innych białkach oddziaływujących z kwasami nukleinowymi. Białko płaszcz wirusa mozaiki tytoniowej zawiera fragment (od aminokwasu 88 do aminokwasu 114), który jest niezestrukturalizowany i mobilny w trakcie tworzenia kompleksu białkowego płaszcz (*assembly*), ale ulega przejściu kłębek \rightarrow heliks pod wpływem związania z RNA (19). Elastyczny, niezestrukturalizowany łącznik występuje między zestrukturalizowanym fragmentem N-końcowym a zestrukturalizowanym fragmentem C-końcowym w każdej z czterech identycznych podjednostek białka represora Lac z *Escherichia coli* (20, 21). Dzięki temu domeny N-końcowe represora uzyskują znaczną mobilność w stosunku do tetrametrycznego rdzenia złożonego z domen C-końcowych.

II. Miejsce H1 w strukturze chromosomu i mechanizm kondensacji zależnej od H1

Podstawowy problem nurtujący tych wszystkich, którzy zajmują się strukturą chromatyny można sformułować następująco: jak ułożony jest w podstawowym włóknie nukleosomowym histon H1 i na skutek jakich oddziaływań między jego cząsteczką a resztą składników chromatyny dochodzi do kondensacji całego kompleksu chromatynowego? Jest oczywiste, że rozwiązanie powyższego zagadnienia umożliwiłoby również odpowiedź na pytanie o wpływ na proces kondensacji rozmaitych modyfikacji histonu H1, czy to w postaci zmienionego składu aminokwasowego, czy to modyfikacji postsyntetycznych poszczególnych aminokwasów. W poprzednim punkcie staraliśmy się naszkicować ogólne własności cząsteczki typu H1 po to, by móc teraz swobodniej rozpatrywać znaczenie różnych faktów doświadczalnych dotyczących mechanizmu kondensacji. Trzeba jednak zacząć od bliższego określenia tego, co rozumie się przez kondensację.

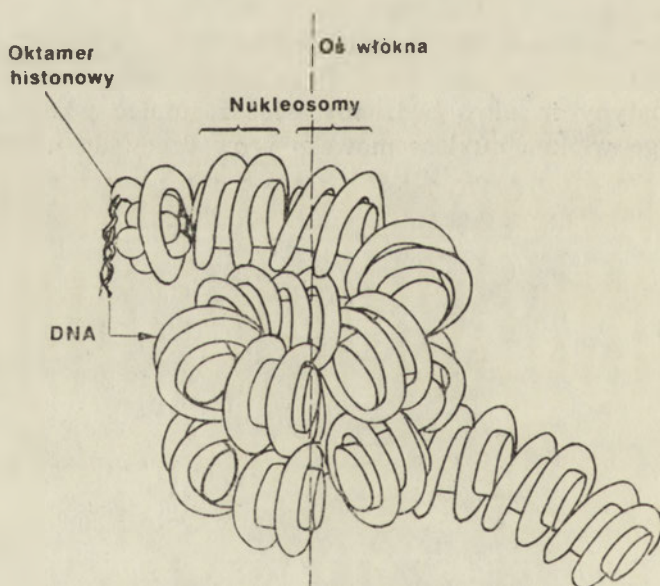
Stosunkowo łatwo jest określić co rozumiemy przez kondensację *in vitro*. Jeżeli wydzieloną z jąder komórkowych, rozpuszczalną chromatynę umieszcza się w roztworach o wzrastającym stężeniu NaCl (poczynając od stężenia zerowego) obserwuje się w preparatach pod mikroskopem elektronowym, postępujące wraz ze wzrostem stężenia soli, fałdowanie podstawowego, 10 nm włókna nukleosomowego. Włókno nukleosomowe przechodzi przez kolejne pośrednie struktury wyższego rzędu by osiągnąć maksymalnie zwartą strukturę przy około 40 mM NaCl (Ryc. 4). Przez kondensację chromatyny *in vitro* będziemy więc rozumieć wzrost fałdowania podstawowego włókna nukleosomowego prowadzący do wzrostu stopnia



Ryc. 4. Wpływ stężenia soli (NaCl) na strukturę chromatyny zawierającej (+H1) i selektywnie pozbawionej (-H1) histonu H1. Według (4), za zgodą.

upakowania DNA (ilość DNA przypadająca na jednostkę długości włókna). Powyżej 80 mM NaCl (dokładniej między 100 a 150 mM NaCl) dochodzi do agregacji i precypitacji sfaldowanych włókien. Ryc. 4 pokazuje, że zjawisko kondensacji indukowanej przez wzrost stężenia soli, łącznie z końcową agregacją i precypitacją, wymaga obecności w chromatynie histonu H1.

Kondensacja chromatyny *in vitro*, pod wpływem soli, doprowadza przy około 40 mM NaCl do wytworzenia tak zwanego „włókna grubego” zwanego również „solenoidem”. Badanie tego włókna metodami takimi jak mikroskopia elektronowa (4), rozpraszanie światła laserowego (23), rozpraszanie promieni X i neutronów (24, 25), pomiar parametrów hydrodynamicznych (26) wskazuje, że średnica jego wynosi około 30 nm. Grube włókno chromatynowe stabilizowane jest przez histony typu H1 bądź H1 i H5 (6, 7, 24, 5, 8, 4). Podstawowe włókno nukleosomowe (10 nm) wydaje się w nim zwinięte w postaci solenoidu tak, że 6 ± 1 nukleosomów przypada na 11 nm długości włókna grubego (4, 28, 29, 30). Nukleosomy są nieco nachylone swymi powierzchniami twarzowymi ku osi solenoidu (4, 24, 29, 30). Schematyczny obraz solenoidu przedstawia Ryc. 5. Solenoid można traktować jako dość regularną strukturę powstałą przez superspiralizację 10 nm włókna nukleosomowego. W artykule tym celowo nie rozpatrujemy konkurencyjnej w stosunku do solenoidu koncepcji tak zwanych „superglobul”, która zakłada istnienie, jako wyższego rzędu struktury



Ryc. 5. Schematyczny obraz solenoidu (chromatynowego włókna 30 nm). Nukleosomy w solenoidzie stykają się węższymi krawędziami (5,5 nm) a ich powierzchnie twarzowe (11 nm) są lekko nachylone w kierunku osi pionowej włókna. Dokładna pozycja H1 (wewnątrz, na zewnątrz lub na przemian) w tej strukturze nie jest znana. Według Notbohm H., Hollandt H., Meissner J., (1979), *Int. J. Biol. Macromol.* 1, 180—184, za zgodą.

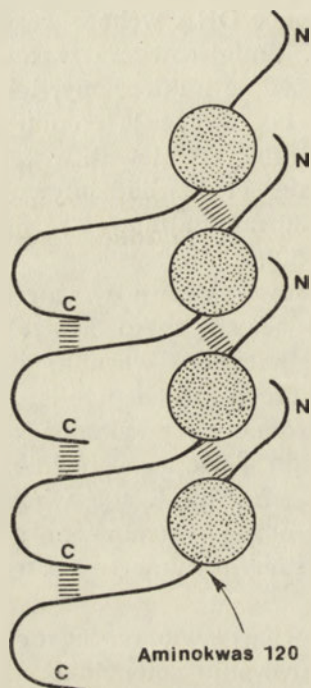
włókna podstawowego, dużych, globularnych agregatów skupiających 7—8 nukleosomów (7, 31). W przeciwieństwie do solenoidu koncepcja superglobul nie tłumaczy szeregu faktów doświadczalnych (33).

Co się tyczy solenoidu, wiele szczegółów jego budowy jest wciąż niejasnych. Jednym z nich jest rozmieszczenie histonu H1 w stosunku do osi solenoidu. Na poziomie nukleosomu H1 „spina” końce DNA wchodzącego i schodzącego z powierzchni białkowego rdzenia. Umiejscowiony w ten sposób oddziałuje również z DNA łączącym sąsiednie nukleosomy, tak zwanym „linkerem” (zob. przegląd w (29), który, jak wykazują pomiary dichroizmu elektrycznego, ma strukturę superspiralną. Ponieważ w tej samej chromatynie występują linkery o różnej długości (32) oddziałujący z nimi H1 może, po kondensacji we włókno 30 nm, zajmować różne pozycje w stosunku do osi podłużnej włókna (29, 30).

Istnieje szereg dowodów na to, że włókno 30 nm występuje w jądrze komórkowym (33). Jest to więc struktura występująca nie tylko *in vitro*, pod wpływem soli, lecz również *in vivo*. Ponieważ naturalne warunki jonowe w komórce odpowiadają około 100 mM roztworowi soli (w przeliczeniu na sól kationu jednowartościowego) całość chromatyny powinna występować w postaci silnie skondensowanego solenoidu a być może również wyższego rzędu struktur powstających przez dalszą strukturalizację włókna 30 nm. (Problemy związane z kondensacją chromatyny omówione są szczegółowo w artykule K. Staronia, w tym samym numerze Postępów Biochemii).

Czy H1 umieszczony jest wewnątrz, czy na zewnątrz włókna 30 nm? Jakie znaczenie mają jego różne domeny w generowaniu solenoidu pod wpływem wzrostu stężenia soli? W r. 1979 Thomas i wsp. (4) zaproponowali, że oddziaływania między cząsteczkami H1 w chromatynie prowadzą do powstania homopolimerów tego białka. Główną funkcją takiego homopolimeru miałyby być tworzenie i utrzymywanie superstruktury włókna nukleosomowego, to jest solenoidu. Istotnie, badania rozmieszczenia cząsteczek H1 w chromatynie za pomocą różnych, chemicznych czynników sprzęgających wykazały, iż ulegają one bardzo łatwo sprzęganiu przy czym tendencja do sprzęgania między H1 a H1 jest większa niż między H1 a histonami rdzeniowymi (34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42). Silnie zaznaczona tendencja do sprzęgania się H1 między sobą wskazuje, że cząsteczki tego histonu leżą w chromatynie w ścisłym sąsiedztwie. Ponieważ mostki H1—H1 w chromatynie powstają również w niskim stężeniu soli, gdy włókno nukleosomowe nie jest skondensowane, lecz rozciągnięte, Thomas i Khabaza (41) postulowali, że oddziaływania między H1 zachodzą raczej wzdłuż włókna nukleosomowego aniżeli na przykład pomiędzy sąsiadującymi zwojami solenoidu. Ostatnie dane Ringa i Cola (42) pokazują, iż miejsca sprzęgnięć leżą: a) między początkiem fragmentu C-końcowego jednego H1 a rejonem między fragmentem globularnym a N-końcowym drugiego i b) między końcem fragmentu C-końcowego

jednego H1 a środkowym rejonem fragmentu C-końcowego drugiego (Ryc. 6). Jak widać ze schematu na Ryc. 6 oddziaływania między sąsiadującymi w chromatynie H1 dotyczą przede wszystkim fragmentów C-końcowych. Według Ringa i Cola (42) odcinki H1 ulegające sprzęganiu



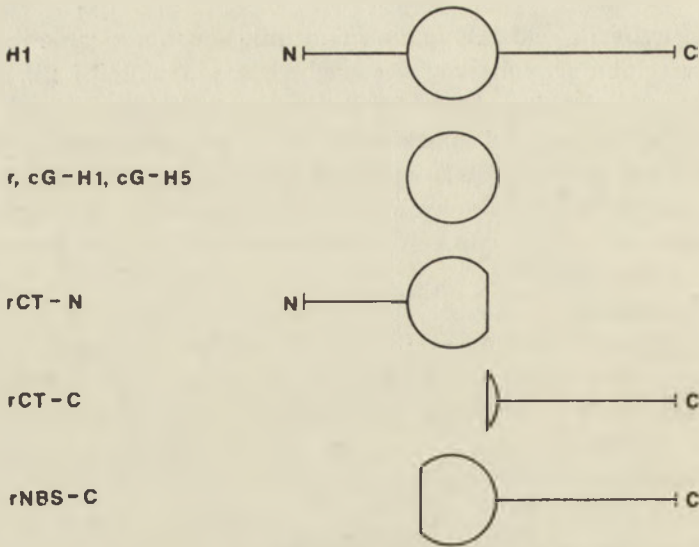
Ryc. 6. Miejsca sprzęgania między cząsteczkami H1 w chromatynie. Rejony sprzęgania zaznaczono poziomymi kreskami. Pozycje w pobliżu rejonu globularnego określono z dużym przybliżeniem. Według (42), za zgodą.

muszą znajdować się w chromatynie w odległości nie większej niż 2 Å. Brak sprzężeń między fragmentami N-końcowymi wskazuje, że nie leżą one w bliskim sąsiedztwie.

Czy fakt bliskiego sąsiedztwa H1 w chromatynie wynika z istnienia specyficznych oddziaływań między cząsteczkami H1 w roztworze? Wiadomo przecież, że specyficzne oddziaływania między histonami rdzeniowymi w roztworze są przyczyną tworzenia oktameru rdzeniowego w nukleosomie. Thomas i Khabaza (41) stwierdzili, że H1 oddysocjowany od chromatyny (w której ulega łatwo sprzęganiu) za pomocą 0,5 M NaCl, a następnie sprzęgany w roztworze, przy zachowaniu tego samego stężenia, w którym występował w chromatynie (0,04 mg/ml) nie wytwarza multimerów. Już jednak przy stężeniu 4 mg/ml wolny H1 w roztworze ulega łatwo sprzęganiu dając multimery (39). Russo i wsp. (43) badali, czy sprzęganie obserwowane w roztworze przy wyższych stężeniach H1 jest wynikiem oddziaływań specyficznych. Autorzy ci rozumowali następująco: ponieważ zarówno N-, jak i C-końcowy fragment H1 występuje w roztworze w konformacji nieuporządkowanej, tylko zestrukturalizowany fragment globularny może być miejscem oddziaływań specyficznych. Jeśli-

by takie specyficzne oddziaływania miały miejsce, sprzężanie izolowanych fragmentów globularnych powinno zachodzić nie wolniej niż sprzężanie całych cząsteczek. Ponieważ tak nie jest i sprzężanie izolowanych fragmentów globularnych zachodzi znacznie wolniej niż sprzężanie całych cząsteczek H1 autorzy wnioskuje, że sprzężanie nie jest specyficzne, jest natomiast wynikiem przypadkowych zderzeń cząsteczek, a jego szybkość w odniesieniu do poszczególnych fragmentów jest wprost proporcjonalna do ilości występujących w nich lizyn (lizyna jest substratem w reakcji sprzężania). Autorzy wykazują, że sprzężanie w roztworze, w przypadku rzeczywistych oddziaływań specyficznych, na przykład między histonami rdzeniowymi: H2A i H2B, zachodzi około 360 razy szybciej niż w przypadku cząsteczek H1. Z powyższych stwierdzeń wynika ważny fakt, iż domeny globularne H1 nie są zdolne do oddziaływań specyficznych, zatem nie mogą również tworzyć struktury homopolimerycznej sugerowanej przez *Thoma i w sp.* (4). Wniosek ten jest zgodny z wynikami wcześniejszych badań nad oddziaływaniami H1 w roztworze (44). O ile homopolimer H1 oparty na specyficznych oddziaływaniach niekowalencyjnych prawdopodobnie nie może być centralną strukturą osiową utrzymującą solenoid, wnioski przytoczonych autorów (43) nie wykluczają w żadnym razie możliwości, iż oddziaływania między globularnymi częściami H1 w chromatynie zachodzą i mogą w istotny sposób kształtować jej konformację.

Kwestią rozmieszczenia H1 i udziału poszczególnych jego domen w generowaniu struktur wyższego rzędu zajmowali się ostatnio intensywnie *Thoma i Koller*. Autorzy ci stosowali jako główne narzędzia w swych badaniach, enzymy proteolityczne. Używając chromatyny, z której uprzednio selektywnie usunięto histon H1, *Thoma i Koller* badali jej zdolność do kondensacji pod wpływem dodawanych z zewnątrz: a) nienaruszonego H1 (lub H5) i b) różnych fragmentów H1 (lub fragmentów H5). Ryc. 7 przedstawia schematycznie wygląd fragmentów używanych w tych doświadczeniach. Fragmenty CT-N i CT-C uzyskano przez działanie na H1 chymotrypsyną, która przy ograniczonym czasie trawienia i niskim stosunku enzym: substrat przecina selektywnie wiązanie peptydowe położone we fragmencie globularnym blisko początku fragmentu C-końcowego. Fragment globularny (G—H1, G—H5) to końcowy produkt trawienia H1 (H5) trypsyną. Fragment NBS-C uzyskano przez rozczepienie cząsteczki H1 N—bromoimidem kwasu bursztynowego. Efekt kondensacyjny H1 i poszczególnych fragmentów badano w funkcji stężenia soli (NaCl), analizując utrwalone preparaty w mikroskopie elektronowym (45). Dość nieoczekiwanym wynikiem tych badań było stwierdzenie, że praktycznie każdy z analizowanych fragmentów H1 jest zdolny do powodowania kondensacji, a przy wyższym stężeniu soli (ok. 100 mM NaCl) również precypitacji chromatyny pozbawionej uprzednio H1. Różnice są wyłącznie ilościowe. Fragmenty zawierające odcinek C-końcowy kondensują i precypitują chromatynę pozbawioną H1 przy niższym stosunku wagowym:



Ryc. 7. Histon H1 oraz fragmenty H1 i H5 dodawane do chromatyny pozbawionej selektywnie H1 w celu stwierdzenia wpływu na proces kondensacji. Według (45). Oznaczenia: N, G, C — fragmenty odpowiednio N-końcowy, globularny i C-końcowy, CT — fragment uzyskany przez działanie chymotrypsyną, NBS — fragment uzyskany przez rozczepienie cząsteczki H1 N-bromoimidem kwasu bursztynowego, r — histon z wątroby szczura, c — histon z erytrocytów kurczęcia.

peptyd:nukleosom, niż fragmenty: globularny lub N-końcowy. Nie kondensuje natomiast chromatyny pozbawionej H1 dodana z zewnątrz poli-L-lizyna. Ten ostatni fakt świadczy, że kondensacja chromatyny pozbawionej H1 nie jest prostym efektem równoważenia ładunków DNA, lecz sumą zrównoważenia ładunków (większa gęstość ładunków we fragmencie C-końcowym jest prawdopodobnie przyczyną kondensacji przy niższym stosunku: peptyd:nukleosom) i jeszcze jakiegoś, niezidentyfikowanego czynnika. Ten ostatni tkwi niewątpliwie w strukturze H1 i to niezależnie, w każdej z jego domen. Nie wyklucza to możliwości, że w całej cząsteczce efekt tego czynnika potęguje się w porównaniu z izolowanymi fragmentami. Trzeba w tym miejscu podkreślić, że kondensacji chromatyny pozbawionej H1 nie powodują także, dodane z zewnątrz, inne niż H1 białka zasadowe.

Jakiego rodzaju oddziaływania między H1 a innymi białkami lub między H1 a DNA mogłyby być odpowiedzialne za jego szczególny efekt kondensacyjny? Stosując chymotrypsynę, jako próbnik dostępności H1 w chromatynie Losa i w sp. (46) stwierdzili, że miejsce podatne na chymotrypsynę we fragmencie globularnym jest dostępne tylko w chromatynie nieskondensowanej (w roztworze o niskim stężeniu soli). W roztworze o stężeniu soli powodującym kondensację chromatyny miejsce chymotrypsynowe jest niedostępne dla enzymu. Udostępnia się ono w tych warunkach dopiero po potraktowaniu chromatyny roztworem 4 M mocznika

(a więc po likwidacji oddziaływań hydrofobowych) lub w pH 10, w którym konformacja H1 ulega daleko posuniętym zmianom (44). Autorzy wnioskują na tej podstawie, że fragmenty globularne cząsteczek H1 w skondensowanej chromatynie pozostają w ścisłym kontakcie za pośrednictwem oddziaływań hydrofobowych, które z kolei stabilizowane są przez silnie polarne otoczenie włókien chromatynowych z DNA owiniętym superspiralnie wokół rdzeni nukleosomowych. Drugim wnioskiem, który wynika z doświadczeń z chymotrypsyną (oraz z nieopisanych tu doświadczeń nad podatnością na ten enzym H1 dodawanego z zewnątrz do zawierającej już H1 chromatyny) jest, iż fragmenty globularne być może z przedłużeniem o fragment N-końcowy tworzą strukturę umieszczoną ściśle wewnątrz włókna 30 nm i biegnącą blisko jego osi. Autorzy sądzą, że ta właśnie struktura będąca odpowiednikiem postulowanego wcześniej homopolimeru globularnej części H1 (ewentualnie z fragmentem N-końcowym) jest podstawą utrzymującą solenoid. Sterczące na zewnątrz niej fragmenty C-końcowe, oddziaływując z długim fragmentem nukleosomowego DNA, jakgdyby przytwierdzają nukleosomy do centralnej struktury homopolimeru białkowego.

Interpretacja powyższa nasuwa szereg pytań w związku z wcześniej ustalonymi faktami. Po pierwsze sprzężanie chemiczne między H1 zachodzi również w zdekondensowanym włóknie, a oddziaływania między fragmentami globularnymi H1 nie wykazują żadnej specyficzności (zob. cytowane już 43). Czy zatem siła oddziaływań hydrofobowych między niespecyficznymi powierzchniami, nawet zakładając znaczną ich stabilizację przez zewnętrzne środowisko polarne, jest dostateczna, by współosiowy, białkowy polimer utrzymał dość regularną strukturę włókna 30 nm? Po drugie dlaczego fragment globularny zachowuje zdolność do samodzielnego kondensowania DNA, jeśli jego główną funkcją miałyby być tworzenie wspomnianego polimeru?

Zdolność szczególnie ukształtowanych powierzchni α -helikalnych białka do zmiany geometrii cząsteczki DNA (22) nasuwa inną możliwość wytłumaczenia efektu kondensacyjnego H1. Odcinki α -helikalne, wykazane i istniejące potencjalnie we wszystkich trzech domenach H1 mogłyby być elementem indukującym superspiralizację międzynukleosomowych odcinków DNA (linkerów), ta zaś z kolei indukowałaby fałdowanie się włókna nukleosomowego w regularny solenoid (włókno 30 nm). Tego rodzaju hipoteza koresponduje z obserwacjami Vogel'a i Singera (47, 48), którzy wykorzystując metodę wiązania do sączków (*filter binding*) i analizę sedymentacyjną stwierdzili, że histon H1 wiąże się preferencyjnie z DNA superspiralnym (w porównaniu z DNA zrelaksowanym) i tylko w tym wypadku wiązanie ma charakter kooperatywny. Ten ostatni fakt ma szczególne znaczenie w zestawieniu z obserwacją Renz'a i Day'a (49), że zależna od H1 kondensacja chromatyny (zachodząca powyżej 30 mM stężenia NaCl) jest procesem kooperatywnym. Co ciekawsze, wiązanie super-

spiralnego DNA z H1, badane metodą wiązania na sączkach (9), wykazuje optimum w okolicach fizjologicznego stężenia soli (ok. 100 mM) to jest w tych samych warunkach jonowych, w których następuje maksymalna kondensacja chromatyny.

Można rozszerzyć powyższą hipotezę zakładając, że kondensacja chromatyny prowadzi istotnie do wzrostu ilości oddziaływań białko—białko, choćby między globularnymi fragmentami H1, jednak głównym ich efektem nie jest tworzenie stabilizującego homopolimeru, lecz indukcja dodatkowych rejonów α -helikalnych (np. w N- i C-końcowych fragmentach H1), które oddziaływując z DNA zwiększają stopień jego superspiralizacji. Tego rodzaju mechanizm tłumaczyłby efekty kooperatywne w wiązaniu H1 do superspiralnego DNA i kooperatywność procesu kondensacji chromatyny. Oczywiście szereg elementów przedstawionej hipotezy wymaga weryfikacji doświadczalnej.

III. Mikroheterogenność sekwencyjna histonu H1 i jej możliwe znaczenie

Uniwersalność nukleosomowej struktury chromatyny znajduje swe podłoże w zasadniczo podobnym składzie, budowie i oddziaływaniach (wzajemnych i z DNA) pięciu głównych klas histonów: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Jednakże uniwersalność ta zawiera w sobie również pewien zakres zmienności strukturalnej wykrywanej już na poziomie budowy chromatyny. Podłożem tej zmienności jest prawdopodobnie w dużej mierze, wykryta wśród histonów wszystkich klas (za wyjątkiem H4) heterogenność sekwencyjna. Heterogenność ta, spośród histonów wszystkich klas, jest zdecydowanie największa (zarówno co do ilości frakcji jak i zakresu dzielących je różnic) wśród H1. K i n k a d e i C o l e (50) stosując wysokorozdzielczą chromatografię na kolumnach z *Amberlitu* wymywanych gradientem chlordoworku guanidyny, rozdzielili frakcję H1 z grasicy cielęcej na cztery główne składniki. Później zidentyfikowano wśród nich jeszcze dwa dodatkowe składniki występujące w mniejszej ilości (44, 51). Różnice między poszczególnymi składnikami nie wynikały z różnych ilości postsyntetycznych modyfikacji cząsteczek, lecz z różnic w składzie aminokwasowym (51). W chromatynie grasicy mamy więc do czynienia z sześcioma różniącymi się sekwencją subfrakcjami histonu H1. Taka mniej więcej ilość wariantów sekwencyjnych H1 występuje w chromatynach z tkanek ssaczy (52, 53). Szczegółowe badania sekwencji subfrakcji H1 wykazały, że wszystkie zachowują ten sam, znany nam już, trójdomenowy typ budowy (zob. p. I). Sekwencja fragmentu globularnego jest w zasadzie identyczna we wszystkich subfrakcjach H1 pochodzących z jednej tkanki. Sekwencja części globularnej jest również bardzo zbliżona w H1 z różnych gatunków (54, 55, 56, 57) a różni się wyraźniej tylko w przypadku wyspecjali-

zowanych klas H1, jak H1^o czy H5 (zob. p. I). W dalszej części tego rozdziału rozważać będziemy tylko warianty H1 typu wspomnianych wyżej 6 subfrakcji grasicy, nie będziemy się natomiast zajmować różnicami międzygatunkowymi ani wyspecjalizowanymi klasami histonów H1.

Różnice w sekwencji aminokwasowej wariantów H1 pochodzących z organizmów jednego gatunku nie dotyczą zatem części globularnej, lecz niezestrukturalizowanych fragmentów końcowych (51, 52). Jakie znaczenie dla funkcjonowania H1 w chromatynie mogą mieć zmiany w sekwencjach fragmentów niezestrukturalizowanych? Z analizy dokonanej w p. I i II wynika, że wszystkie trzy domeny H1 mają zdolność do kondensowania DNA. Zmiana sekwencji fragmentów niezestrukturalizowanych (w roztworze) może wpłynąć na zdolność całej cząsteczki H1 do kondensowania chromatyny co najmniej trojako: a) poprzez modyfikację odcinka oddziaływającego z DNA w fragmencie niezestrukturalizowanym (choćby przez zmianę potencjalnej zdolności tworzenia α -heliksu), b) przez likwidację (lub wprowadzenie) możliwości modyfikacji enzymatycznej danego miejsca w łańcuchu polipeptydowym, na przykład przez fosforylację seryny lub treoniny i c) przez wpływ na strukturę drugorzędową domeny globularnej. Możliwości wymienione w punktach a) i b) są oczywiste. Co do ostatniej, opiera się ona przede wszystkim na obserwacji Smerdona i Isenberga (44). Autorzy ci, badając metodą dichroizmu kołowego i anizotropii fluorescencji procent α -heliksu tworzonego w różnych wariantach sekwencyjnych H1 grasicy stwierdzili, że w roztworze o identycznym stężeniu soli (150 mM NaCl) wariant oznaczony 3b był zestrukturalizowany w 75% (całkowitej zawartości α -heliksu), podczas gdy warianty oznaczone jako 1 i 2 zestrukturalizowane były tylko w 60%. Z kolei Cole i wsp. w swoich ostatnich pracach, posługując się metodami wiązania do sączków, analizą sedymentacyjną i pomiarem lepkości wykazali, że poszczególne warianty sekwencyjne H1 z grasicy różnią się zdolnością do kondensowania DNA (58, 59, 60). Wariant, który wykazywał zdecydowanie najsilniejszą zdolność do kondensowania DNA charakteryzował się jednocześnie największym powinowactwem do DNA superspiralnego. Co ciekawsze, był to ten sam wariant, który wykazał najwyższy stopień strukturalizacji w pośrednim stężeniu soli (150 mM NaCl), w przytoczonych wyżej doświadczeniach Smerdona i Isenberga (44). Korelacja ta jest zgodna z sugestią, iż odcinki α -helikalne H1 odgrywają kluczową rolę w generowaniu struktur wyższego rzędu w chromatynie (zob. uwagi w końcowych akapitach pkt. II).

Singer i Singer (61) wykazali, że w przypadku H1 szczególnie ważny w rozróżnianiu DNA superspiralnego od zrelaksowanego jest odcinek od aminokwasu 72 do aminokwasu 106, a więc rejon leżący w zestrukturalizowanym fragmencie globularnym. Ponieważ jest to sekwencja konserwatywna i zachowana we wszystkich wariantach H1, efekt zmienności sekwencyjnej fragmentów niezestrukturalizowanych mógłby się przeja-

wić tylko poprzez wpływ na stopień strukturalizacji tego odcinka. Co do pozostałego rejonu globularnego wraz z przyległym doń fragmentem C-końcowym (106—212) wiąże się on silnie z DNA, lecz nie rozróżnia między formą liniową a superspiralną. Dodany z zewnątrz do chromatyny pozabawionej H1 fragment ten wywiera silny wpływ kondensujący. Kwestię tę, w powiązaniu z rozkładem ładunków w poszczególnych fragmentach H1, omówiono w pkt. II.

Dodatkowym potwierdzeniem znaczenia obszaru rozpoznającego strukturę superspiralną w DNA są badania *F a s m a n a i w s p.* (62), którzy wykazali, że widmo dichroizmu kołowego DNA jest silniej zakłócone, (co odpowiada większemu odkształceniu DNA) przez peptyd 72—212 niż przez całą cząsteczkę H1. Peptyd 1—72 występując w nienaruszonej cząsteczce H1 wpływa więc moderująco na oddziaływanie peptydu 72—212. Ale jednocześnie mieszanina peptydów 1—72 i 72—212 zakłóca widmo dichroizmu kołowego DNA bardziej niż sam peptyd 72—212. Ostatnio *C o l e i w s p.* (58, 63, 64) potwierdzili raz jeszcze, że warianty sekwencyjne H1 różnią się w zdolności do kondensowania zrelaksowanego, a jeszcze bardziej — superspiralnego DNA, mierzonej jako stopień zmiany widma dichroizmu kołowego DNA. Wszystkie wyżej przytoczone dane świadczą o istnieniu subtelnych i trudnych jeszcze do dokładnego uchwycenia, relacji konformacyjnych między poszczególnymi domenami w cząsteczce H1.

Szczególnie interesująca jest sprawa różnic metabolicznych między wariantami sekwencyjnymi H1. Podobnie jak w przypadku pozostałych histonów okres najintensywniejszej syntezy H1 przypada w fazie S cyklu komórkowego, to jest w okresie syntezy DNA (65). Jednakże pewna część H1 podobnie jak i innych histonów, syntetyzowana jest również poza fazą S (66, 67). Stwierdzono, że poszczególne warianty H1 syntetyzowane są z niejednakową szybkością (dotyczy to zarówno syntezy w fazie S jak i poza nią) oraz mają niejednakowe okresy półtrwania w chromatynie (68, 69, 66, 70). Powyższe różnice zaznaczają się szczególnie wyraźnie w czasie różnicowania i w tkankach poddanych działaniu hormonów. *C o h e n i w s p.* (71, 72, 73) wykazali istnienie szczegółowego programu zmian obecnych w chromatynie wariantów H1 w czasie rozwoju embrionalnego jeźowca. Podobne zmiany wykazano w zarodkach kurczęcia (74), myszy (75) oraz w czasie spermatogenezy u szczura (76, 77). Nie ma w tej chwili wątpliwości co do tego, że zestaw wariantów H1 obecny w chromatynie jest charakterystyczny dla stopnia zróżnicowania komórki (51).

Ostatnio *L e n n o x i C o h e n* (67) donieśli, że w chromatynie spermatocytów myszy w okresie prepachyteny występują tylko dwa (H1a i H1c) z pięciu wariantów sekwencyjnych H1 myszy. Badania chromatyny z tego stadium w mikroskopie elektronowym wykazały, że nie ma ona struktury wyższego rzędu to jest nie występuje w niej włókno 30 nm (solenoid) (78, 79). Głównie na podstawie powyższej obserwacji *L e n n o x i C o h e n* (67) sugerują, że obecne w prepachytenie, niestabilne metabolicznie wa-

rianty H1a i H1c mogą być niezdolne do kondensacji chromatyny. Ich funkcją, według cytowanych autorów, mogłoby być utrzymywanie rozluźnionej struktury DNA, niezbędnej do prawidłowego zajścia rekombinacji mejotycznej. W tym ostatnim procesie kluczowe znaczenie ma dokładne sparowanie homologicznych odcinków DNA, czemu prawdopodobnie przeszkadzałyby struktury wyższego rzędu w chromatynie. Gdyby przytoczone sugestie dotyczące H1a i H1c myszy były prawdziwe struktura i własności konformacyjne tych wariantów mogłyby stać się kluczem do zrozumienia mechanizmu działania H1. Jak zwykle podstawowy problem tkwi w trudności wydzielenia dostatecznej ilości tych unikalnych białek do badań fizyko-chemicznych.

Co do wspomnianych wyżej efektów hormonów *H o h m a n n i C o l e* (68, 69) wykazali już dość dawno, że wzór wariantów H1 w chromatynie komórek kultur tkankowych można zmienić przez dodanie hormonów w sposób, który przypomina efekty hormonów *in vivo*.

Fakty poznane dotychczas wskazują coraz wyraźniej na to, że wzór wariantów sekwencyjnych H1 oraz sposób ich zmian w trakcie różnicowania są co najmniej zbliżone w gatunkach należących do jednej grupy systematycznej takiej, jak np. ssaki (80).

IV. Modyfikacje postsyntetyczne histonu H1

Modyfikacje chemiczne białek (fosforylacje, acetylacje, metylacje, glikozylacje, poli(ADP-ryboz)ylacje i inne) zachodzące po ich syntezie są zjawiskiem powszechnym w komórkach. Dokonują ich wyspecjalizowane enzymy, a efektem ich jest mniej lub bardziej głęboka zmiana struktury i będąca jej konsekwencją zmiana funkcji białka (jako elementu struktury wyższego rzędu, enzymu bądź czynnika regulatorowego). Wszystkie histony ulegają modyfikacjom postsyntetycznym, a procesy te i ich znaczenie dla struktury i funkcji chromatyny są przedmiotem intensywnych badań (81, 82). Histon H1 ulega fosforylacji, poli(ADP-ryboz)ylacji i w jednym, dotąd stwierdzonym przypadku (83) również metylacji.

IV-1. Fosforylacja

Fosforylacje są najpowszechniejszą i najlepiej dotąd poznaną z modyfikacji H1. W zbadanych dotąd pod tym względem komórkach enzymy fosforylujące fosforylują w H1 tylko serynę i treoninę. Donoszono również o obecności kwaso-labilnych pochodnych fosforanowych lizyny (fosfo-estry seryny i treoniny są kwaso-stabilne) (84) problem ten jednak nie był dotąd szczegółowo badany. Do tej pory nie wykryto w histonach H1 fosforylowanej tyrozyny. Wyróżniamy dwa główne typy specyficzności kinazowej w stosunku do H1. W dzielących się komórkach kinaza niezależna od

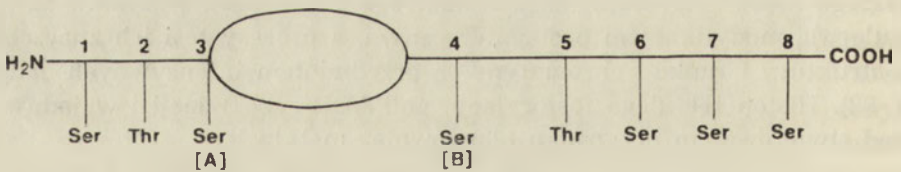
cAMP wydaje się rozpoznawać w H1 sekwencję: —Lys—Ser—Pro—Lys—
 (Thr)
 ⋮
 PO₄

(54). Natomiast zależna od cAMP kinaza działająca w komórkach spoczynkowych fosforyluje (zarówno *in vivo* jak i *in vitro*) miejsce położone w peptydzie: —Lys—Ala—Ser—Gly—Pro—Pro—Val—Ser—Glu—Leu—
 ⋮
 PO₄

Ile—Thr—Lys— (85, 86). Warto zwrócić uwagę na obecność proliny w bezpośrednim sąsiedztwie miejsc fosforylowanych w H1. Wskazuje to, że miejsca te mogą leżeć w okolicach zgięć w strukturze drugorzędowej, a więc w rejonach szczególnie eksponowanych.

Jaki efekt wywiera fosforylacja na konformację cząsteczki H1 i sposób jej oddziaływania z DNA chromatyny? Tabela I i Ryc. 8 pokazują miejsca fosforylacji w cząsteczkach histonu H1 z niektórych organizmów.

Szereg danych wskazuje, że fosforylacja prowadzi do niewielkich, ale dających się zaobserwować zmian w konformacji cząsteczki H1. Jedną z metod najczęściej stosowanych do badania oddziaływań H1 z DNA i chromatyną jest wspomniany już w tym artykule dichroizm kołowy (CD). Pomiary CD są w stanie wykazać zmiany w stopniu kondensacji chromatyny indukowane zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (89, 90). Ogólnie, obniżenie maksimum wartości eliptyczności w rejonie odpowiadającym DNA w widmie CD obserwuje się wtedy, gdy chromatyna przyjmuje strukturę bardziej zwartą (89, 91). Wynika to prawdopodobnie ze zmiany kąta zwinienia heliksu DNA owiniętego wokół cząstek rdzeniowych nukleosomów (92). Badając metodą CD H1 ufosforylowany enzymatycznie w miejscu A lub w miejscu B (ryc. 8) Adler i wsp. (93) wykazali, że zarówno jedna



Ryc. 8. Miejsca fosforylacji w cząsteczkach H1. Nie wszystkie miejsca fosforylowane są we wszystkich H1. Numery miejsc (1—8) nie mają związku z numerem aminokwasu w cząsteczce. Według (87), za zgodą.

jak i druga forma usfosforylowana H1 deformuje DNA mniej niż nieufosforylowany H1, przy zachowaniu tego samego stosunku DNA—białko. Różnicę tę można było zniwelować przez zwiększenie stosunku: ufosforylowany H1:DNA. Efekt H1 usfosforylowanego jednocześnie w obu miejscach: A i B był jakościowo inny. Podwójnie usfosforylowany H1 powodował wyraźnie mniejszą deformację DNA niż mono- lub nieufosforylowany

H1, przy czym różnicy tej nie dało się zniwelować przez zwiększanie stosunku białko:DNA. Zatem, o ile nie ma większych różnic w oddziaływaniu na konformację DNA histonu H1 usfosforylowanego w miejscu A lub B, ufosforylowanie obu miejsc powoduje wyraźną zmianę jakościową w oddziaływaniu H1 z DNA.

Tabela 1.

Miejsca fosforylacji w H1, według (87), za zgodą

Miejsce fosforylacji wg. oznaczenia na Ryc. 8	Stymulator fosforylacji	Lokalizacja w strukturze pierwszorzędowej	Uwagi
1	Podział komórki	Ser-15 ¹ , 16 ²	Nie wszystkie cząsteczki H1 mają oba miejsca (1 i 2). W szeregu liniach komórkowych fosforylacja tych miejsc zachodzi najintensywniej w mitozie.
2	Podział komórki	Thr-17 ^{3,4} , 19 ¹ , 20 ²	
3	Cykliczny AMP	Ser-37 ¹ , 38 ²	Miejsce A. Ser zastępowana jest przez Ala w RTL-3.
4	Nie znaleziono <i>in vivo</i>	Ser-103 ⁵	Miejsce B. Fosforylacja tego miejsca <i>in vitro</i> powoduje zmianę konformacyjną.
5	Podział komórki	Thr-153 ⁵	Lokalizacja miejsca 5—8 zależy od rodzaju H1.
6	Podział komórki	Ser-145 ⁶ (Thr-136 ⁵)	Nie wszystkie H1 są fosforylowane w tych miejscach. Czasami Thr zastępuje Ser.
7	Podział komórki	Ser-161 ⁶ , 173 ⁵	
8	Podział komórki	Ser-180 ⁵ , 182 ⁶	

Indeksy: 1 — Grasicia królika: RTL-4 H1 (86)

2 — Grasicia cielęcja: CTL-1 H1 (86)

3 — Grasicia królika: RTL-2 H1 (86)

4 — HeLa: H1 B (88)

5 — Grasicia królika: RTL-3 H1 (86)

6 — Pstrąg: H1 (54)

Oznaczenia: RTL-2, RTL-3, RTL-4, CTL-1. H1 B odpowiadają wariantom sekwencyjnym H1.

Badania metodami spektroskopowymi w roztworze ufosforylowanych *in vivo* cząsteczek H1 nie wskazują na żadne znaczne zmiany konformacyjne (np. w procencie α -heliksu w części globularnej) powstające w wyniku fosforylacji (94). Badano przy tym zwykle efekt maksymalnego ufosforylowania, to jest wprowadzenia około 5—6 grup fosforanowych na cząsteczkę. Jednakże czułość metod spektroskopowych może tu być niedostateczna. Zachowanie się ufosforylowanych form H1 w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym zawierającym SDS (siarczan dodecylu) (w tym typie elektroforezy neutralizowany jest efekt ładunku elektrycznego rozdzielanych cząsteczek) wskazuje na wyraźny wpływ fosforylacji na konformację cząsteczki H1 (95, 83).

Ostatnio szczegółowe badania nad efektem ufosforylowanego H1 na

strukturę chromatyny przeprowadzili Kaplan i wsp. (96). Porównywali oni efekt wiązania do chromatyny uprzednio selektywnie pozbawionej H1, enzymatycznie ufosforylowanego oraz nieufosforylowanego H1, analizując dwie podstawowe cechy tak zrekonstruowanej chromatyny: a) widmo dichroizmu kołowego i b) profil denaturacji termicznej DNA w niskiej sile jonowej. Ten ostatni odzwierciedla stabilność struktury chromatyny. Stosując do doświadczeń rekonstrukcyjnych histon H1, do którego wprowadzono enzymatycznie 4—5,3 fosforanów na cząsteczkę (jest to poziom bliski maksymalnemu stanowi ufosforylowania histonu H1 kręgowców, *in vivo*), cytowani autorzy stwierdzili brak jakichkolwiek znaczących różnic w widmie CD chromatyny zrekonstruowanej z ufosforylowanego H1 w stosunku do tej, którą zrekonstruowano z udziałem H1 bez fosforanów. W świetle przytoczonej uprzednio charakterystyki metody CD świadczy to, że fosforylacja H1 (nawet bliska maksymalnej fosforylacji zachodzącej *in vivo*) *per se* nie indukuje poważniejszych zmian strukturalnych w chromatynie, a w szczególności nie zwiększa stopnia jej skondensowania. Wynik ten jest zgodny z ostatnimi rezultatami D'Anna i wsp. (94), którzy badali metodą dichroizmu kołowego oddziaływanie z DNA H1 izolowanego z komórek mitotycznych to jest w stanie maksymalnego ufosforylowania. Stwierdzili oni brak zauważalnego efektu fosforylacji w niskich siłach jonowych. W pośredniej sile jonowej ufosforylowany H1 wykazywał natomiast mniejszą niż nieufosforylowanych H1 zdolność do indukowania zmian w DNA.

Porównanie profili denaturacji termicznych chromatyn zrekonstruowanych z ufosforylowanym i nieufosforylowanym H1 wykazało pewną destabilizację, rozluźnienie struktury chromatyny zawierającej ufosforylowany H1 (przesunięcie szczytu o 1° w stronę niższych temperatur) (96). Wynikać ono musi ze słabszego wiązania się ufosforylowanego H1 do DNA.

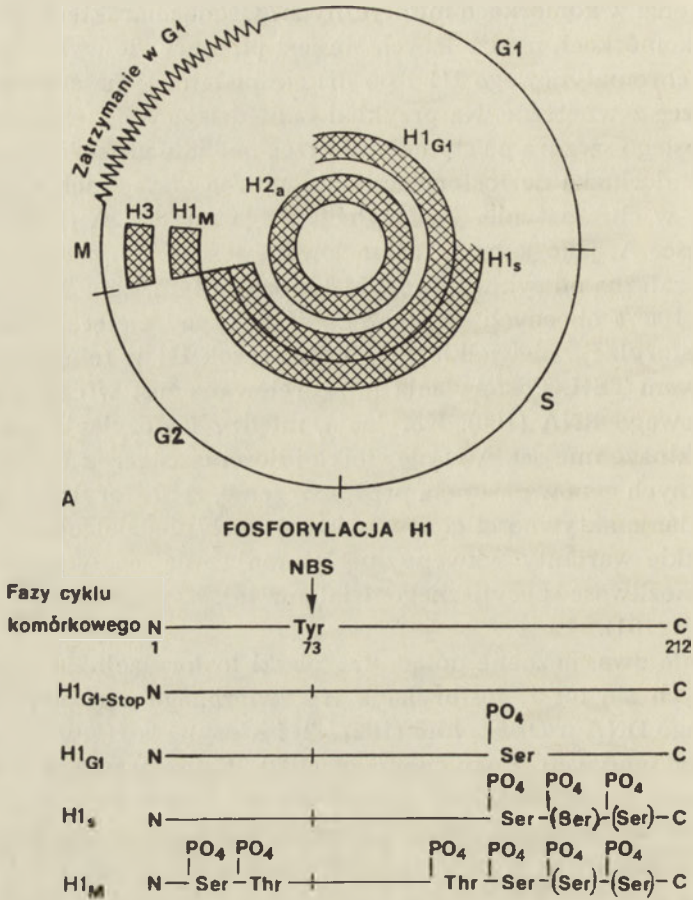
Powyższe rezultaty nie podtrzymują koncepcji udziału fosforylacji H1 w procesie mitotycznej kondensacji chromatyny, przedstawionej przez Bradbury'ego i wsp. (97). (Szersze omówienie argumentów za i przeciw tej koncepcji znajduje się w odn. (98)). Są natomiast zgodne z propozycją Gurley'a i wsp. (99), że fosforylacja H1 może być procesem odblokowującym, który usuwa pewne ograniczenia strukturalne nakładane przez H1 i być może umożliwia w ten sposób mitotyczną kondensację chromosomów powodowaną przez inne czynniki jądrowe. Zmniejszona zdolność do wiązania DNA przez ufosforylowany H1 (zgodna z ogólnym bilansem ładunków) może mieć również znaczenie w interfazie cyklu komórkowego, jako czynnik ułatwiający dostęp do DNA różnych enzymów i białek regulatorowych (replikacja, transkrypcja). Według tego rozumowania rola fosforylacji H1 w interfazie i w mitozie byłaby zasadniczo ta sama i polegałaby na ułatwianiu oddziaływań chromatyny z innymi efektorami działającymi w danym etapie cyklu komórkowego (96).

Czym różni się fosforylacja H1 w komórkach niedzielących się od tej,

która zachodzi w komórkach mitotycznych? Cechą charakterystyczną fosforylacji w komórkach dzielących się jest po pierwsze wybiórczość w stosunku do chromatynowego H1 i po drugie podatność na stymulację przez różne bodźce zewnętrzne. Na przykład w dzielących się komórkach wątroby dorosłego szczura po stymulacji przez podanie glukagonu lub cyklicznego AMP dochodzi do fosforylacji 1% spośród wszystkich cząsteczek H1 zawartych w chromatynie. Fosforylacji ulega miejsce A (Ryc. 8) (85). To samo miejsce A, jako jedyne, fosforylowane jest w H1 *in vitro* (w roztworze) przez zależną od cyklicznego AMP kinazę z tym, że w tych warunkach obejmuje 100% obecnych cząsteczek. W tarczycy cielęcej podobna, wybiórcza fosforylacja niewielkiej ilości cząsteczek H1 w miejscu A zachodzi pod wpływem TSH. Fosforylacja ta skorelowana jest w czasie z indukcją syntezy nowego RNA (100). Korelacja, między fosforylacją przez zależną od cAMP kinazę miejsca A w niewielkiej ilości cząsteczek H1, a aktywacją poszczególnych genów nasunęła przypuszczenie, że fosforylacja ta ma związek z regulacją aktywności genów w komórkach dzielących się. Fakt, iż nie wszystkie warianty sekwencyjne H1 mają miejsce A jeszcze bardziej zwiększa możliwość specyficznego działania tej, stymulowanej przez cAMP fosforylacji (101).

Pozostałe dwa, poznane dotąd, przypadki fosforylacji H1 w komórkach dzielących się to: 1. fosforylacja H1 związanego z różnymi frakcjami satelitarnego DNA u *Drosophila* (102) i 2. fosforylacja H1 w jądrach *Tetrahymena* pod wpływem szoku cieplnego (103). W obu przypadkach nie dokonano jeszcze tak szczegółowej analizy miejsc fosforylacji ani charakteru enzymu, jak w przypadku dzielących się komórek ssaczy.

Poza omówionymi wyżej, wszystkie pozostałe, znane fosforylacje H1 zachodzą w komórkach aktywnie dzielących się. Fosforylacja H1 związania z podziałem komórkowym jest zjawiskiem uniwersalnym wśród *Eukaryota*. Najlepiej do tej pory proces ten scharakteryzowano w komórkach ssaczy: CHO (chomik) i HeLa (człowiek) (99, 88), a spośród niższych *Eukaryota* w śluzowcu *Physarum polycephalum* (104, 83). Ryc. 9 przedstawia schemat fosforylacji H1 w trakcie cyklu komórkowego komórek CHO. Warianty sekwencyjne H1 w CHO (główny stanowi ok. 87% a pomniejszy ok. 13% całości H1) ulegają fosforylacji w fazie G1, około 2 godziny przed wejściem komórki w fazę S (syntezy DNA). Fosforylacji tej ulegają cząsteczki H1 zsyntetyzowane jeszcze w poprzednim cyklu komórkowym. Nie dotyczy ona miejsca A, lecz seryny w C-końcowym rejonie cząsteczki. Miejsce A w ogóle nie jest fosforylowane w cyklu komórkowym CHO co świadczy, że jego fosforylacja nie ma związku z podziałem komórki. W fazie G1 około 50% wszystkich cząsteczek H1 zawiera przynajmniej 1 grupę fosforanową. W fazie S rozpoczyna się synteza nowego histonu H1. W tym czasie, obok kontynuacji fosforylacji zachodzącej w G1 pojawia się również fosforylacja dodatkowej seryny, położonej także w C-końcowym fragmencie H1. Ta druga fosforylacja obejmuje jednak nie więcej niż



Ryc. 9. Fosforylacja histonów w cyklu komórkowym CHO. Według (99), za zgodą.

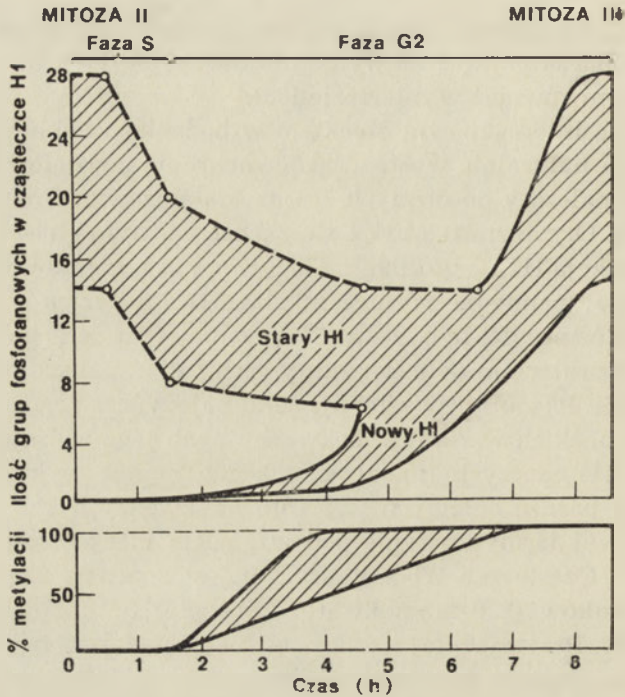
10% wszystkich cząsteczek H1. Gdy komórka wchodzi w fazę G2 wzrasta ilość cząsteczek H1 zawierających co najmniej 2 grupy fosforanowe. Wejście komórki w fazę mitozy i postępująca kondensacja chromosomów zachodzą równocześnie z superfosforylacją H1. Proces ten obejmuje 100% cząsteczek H1 w chromatynie. W komórkach CHO rezultatem superfosforylacji mitotycznej jest fosforylacja 6 miejsc w głównym i 4 miejsc w pomniejszonym wariantcie H1. Fosforylacja mitotyczna, której maksimum przypada na okres maksymalnego skondensowania chromosomów w metafazie, różni się jakościowo od fosforylacji interfazalnej tym, że we fragmencie C-końcowym fosforylowana jest oprócz seryny również treonina oraz tym, że fosforylacji ulegają również seryna i treonina w N-końcowym fragmencie H1 (99). Badania fosforylacji wariantów sekwencyjnych H1 w cyklu komórkowym HeLa potwierdzają obserwację, że warianty ulegają fosforylacji w różnicowany sposób (88). Doświadczenia na komórkach HeLa wskazują jednak równocześnie, że w przeciwieństwie do komórek CHO, ani

fosforylacja N-końcowego fragmentu H1, ani treonina jako akceptor fosforanu nie są charakterystyczne wyłącznie dla fosforylacji mitotycznej, występują bowiem również w interfazie (88).

Szczególnie interesującym obiektem w badaniach cyklu komórkowego, ze względu na naturalnie występującą synchronię podziałów jąder komórkowych, jest należący do niższych *Eukaryota* śluzowiec *Physarum polycephalum* (105). Organizm ten może się okazać ważnym elementem w badaniach nad funkcją H1 i jego zmiennością w cyklu komórkowym ze względu na szczególnie znamienne różnice między H1 *Physarum* a H1 wyższych *Eukaryota*. Różnice te były ostatnio przedmiotem szczegółowych badań w naszym laboratorium (83). Rezultaty tych badań pokazują, że histon H1 w chromatynie *Physarum* występuje jako pojedyncza forma molekularna, nie ma więc bliskich wariantów sekwencyjnych tego rodzaju jakie występują wśród H1 ssaczy (nadal jednak nie można wykluczyć istnienia pewnej ilości bardzo odległych wariantów sekwencyjnych, różniących się od podstawowej formy znacznie pod względem masy cząsteczkowej bądź konformacji). Cząsteczka H1 z *Physarum* jest znacznie większa niż cząsteczka H1 ssaków (220 aminokwasów, średnio) liczy bowiem około 300 aminokwasów. Przyczyną tej różnicy jest najprawdopodobniej występowanie niezwykle długiego fragmentu C-końcowego w H1 z *Physarum*.

W cyklu komórkowym H1 w *Physarum* ulega nie tylko fosforylacji, ale i metylacji, przy czym istnieje między tymi dwoma modyfikacjami ustalona relacja: fosforylacji może ulegać tylko H1 uprzednio zmetylowany (83). Zarówno fosforylacja jak i metylacja dotyczy w przeważającej mierze C-końcowego fragmentu cząsteczki (83). Fosforylacja H1 w cyklu komórkowym *Physarum* charakteryzuje się, podobnie jak w innych organizmach eukariotycznych, występowaniem cyklicznej superfosforylacji mitotycznej. Jednakże zupełnie niespotykana jest ilość grup fosforanowych wprowadzanych do cząsteczki H1 *Physarum*. Jak to zobrazowano na Ryc. 10 cząsteczka H1 z *Physarum* w stanie maksymalnego ufosforylowania w metafazie mitozy zawiera około 25 grup fosforanowych. Ze względu na to, że po mitozie nie następuje całkowita defosforylacja „starego” histonu H1, *Physarum* umożliwia porównanie losów starego (syntetyzowanego w poprzednim cyklu) i nowego histonu H1 (Ryc. 10). Ze schematu na Ryc. 10 widać, że po metylacji nowosyntetyzowany H1 jest stopniowo fosforylowany, aż w połowie fazy G2 ilość fosforanów w starym i nowym histonie H1 wyrównuje się. Od tego momentu cała pula histonu H1 ulega superfosforylacji mitotycznej, aby po mitozie w fazie G2 następnego cyklu, wrócić ponownie do pośredniego stopnia ufosforylowania charakterystycznego dla starego H1 w okresie interfazy. Przedstawiony na Ryc. 10 obraz fosforylacji nowego H1 poprzedzony jego nieodwracalną metylacją narzuca wrażenie, że odbywa się tu proces dojrzewania nowej chromatyny.

Do jakiego stopnia obraz modyfikacji H1 w *Physarum* jest zgodny z przedstawioną przedtem koncepcją Gurley'a (99) znajdującą po-



Ryc. 10. Modyfikacje postsyntetyczne histonu H1 w cyklu mitotycznym *Physarum polycephalum*. Według (83), za zgodą.

parcie w danych Kaplan'a i wsp. (96)? W cyklu komórkowym *Physarum*, w odróżnieniu od cyklu komórek ssaczych, nie ma fazy G1 a synteza DNA (faza S) rozpoczyna się zaraz po metafazie. Nie jest więc wykluczone, że silnie ufosforylowany, mitotyczny H1 istotnie umożliwia odblokowanie DNA po metafazie, np. w celu umożliwienia dostępu enzymom zaangażowanym w proces replikacji. Co do transkrypcji, która u *Physarum* odbywa się wkrótce po replikacji, w naszym laboratorium prowadzi się aktualnie badania, czy zachodzi ona tylko w rejonach DNA skompleksowanych ze starym (ufosforylowanym), czy również z nowosyntetyzowanym (niezmodyfikowanym) H1.

Ryc. 10 pokazuje, że praktycznie w żadnym okresie cyklu komórkowego *Physarum* histon H1 nie stanowi homogenicznie ufosforylowanej populacji. Przeciwnie, we wszystkich okresach reprezentowany jest przez cząsteczki zawierające różną ilość fosforanów, np. od 7 do 16 w fazie G2 lub od 14 do 28 w metafazie. Badanie ufosforylowanych populacji H1 w różnych miejscach cyklu komórkowego za pomocą wysokorozdzielczej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, zawierającym SDS ujawniło, że składają się one zwykle z kilku (3—4), wyraźnie różniących się ruchliwością w żelu klas, które mogą odpowiadać wariantom konformacyjnym (83). Na podstawie tego faktu wysunięto sugestię, że szczególnie duża ilość wprowadzanych fosforanów i bardzo długi fragment C-końcowy w H1 *Physarum*

mogą służyć do formowania zróżnicowanych wariantów konformacyjnych opartych o pojedynczą sekwencję aminokwasową białka (83). Rola tych wariantów mogłaby być analogiczna do roli wariantów sekwencyjnych H1 w komórkach ssaków.

Ostatnio interesujące prace dotyczące znaczenia fosforylacji H1 opublikował Hohmann i w s.p. (106). Badali oni hybrydy komórek mysich i chomiczych, stabilne w trakcie długotrwałej hodowli. Komórki hybrydowe zawierały po 68 chromosomów: 46 mysich i 22 chomicze, replikujących się stabilnie w ciągu ponad rocznej hodowli w laboratorium. Ekspresji ulegały zarówno mysie, jak i chomicze enzymy, jednakże hybryd wytwarzał wyłącznie mysie histon H1. O ile zatem nie wiadomo, czy genom chomiczy w hybrydach funkcjonował tak samo jak w normalnych komórkach chomika, to można przyjąć za udowodnione, że rodzaj H1 nie ma znaczenia dla prawidłowego podziału komórkowego (replikacja DNA, mitoz). Hohmann i w s.p. (106) sugerują na tej podstawie, zgodnie z wcześniej przytoczoną koncepcją Gurley' a (99), że fosforylacja H1 związana z podziałem komórki jest procesem doraźnym i mało specyficznym, służącym przede wszystkim odblokowaniu DNA i umożliwieniu sterowania procesom replikacji i kondensacji mitotycznej przez inne czynniki. Natomiast za długofalową organizację strukturalną DNA w chromatynie odpowiedzialne jest przede wszystkim zróżnicowanie sekwencyjne H1.

IV-2. Metylacja

Jak już wspomniano metylację opisano dotychczas tylko w jednym przypadku histonu H1 z *Physarum polycephalum* (83). Modyfikacja ta dotyczy wszystkich (100%) cząsteczek H1 i rozpoczyna się wkrótce po syntezie H1 w fazie S. Trwa ona aż do około 1/3 fazy G2. W H1 dotyczy grupy ϵ -NH₂ lizyny (powstaje ϵ -N-metylolizyna). W H1 *Physarum* metylacja dotyczy około 10—15% wszystkich lizyn i zlokalizowana jest w C-końcowym fragmencie cząsteczki. Jest to modyfikacja nieodwracalna. Interesujące jest, że w H1 *Physarum* metylacja cząsteczki poprzedza jej fosforylację. Nie wiemy, czy jest to odzwierciedleniem ustalonej sekwencji zmian w strukturze H1 pozostających w związku przyczynowo-skutkowym, czy też odbija raczej sekwencję zmian struktury chromatyny pociągających za sobą pewną kolejność eksponowania miejsc akceptorowych dla modyfikacji w H1. Nie ma do tej pory żadnych danych o wpływie metylacji na oddziaływanie H1 z DNA lub chromatyną.

IV-3. Poli(ADP-rybo)zylacja

W chromatynie komórek ssaczych występuje enzym: polimeraza poli(ADP-rybozy), który katalizuje kondensację fragmentów ADP-rybozylowych pochodzących z NAD* (z jednoczesnym uwolnieniem nikotyn-

amidu) i przyłączanie ich do różnych białek (107). Poli(ADP-ryboza) jest homopolimerem jednostek ADP-rybozylowych połączonych wiązaniem glikozydowym między dwoma pierścieniami rybozy (1"-2'). Homopolimer może osiągać długość do 50 jednostek poli(ADP-rybo)zylowych połączonych liniowo lub z rozgałęzieniem (108). Przebadań wpływu na poziom syntezy polimeru z NAD* różnych stanów fizjologicznych i bodźców zewnętrznych wykazało, że najbardziej stymulujące jest działanie czynników powodujących uszkodzenia DNA. Wyciągnięto stąd wniosek, że poli(ADP-rybo)zylacja białek chromosomowych jest w jakiś sposób związana z ułatwianiem procesu naprawy DNA w chromatynie (109). Wśród histonów, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* najlepszym akceptorem poli(ADP-rybozy) jest H1 (110). Obok serii hyperpoli(ADP-rybo)zylowanych H1 jednym z produktów reakcji polimerazy poli(ADP-rybozy) w chromatynie jest dimer utworzony przez połączenie dwóch cząsteczek H1 przez mostek złożony z 15 jednostek poli(ADP-rybozy). W H1 przyłączone są do homopolimeru (przez resztę kwasu glutaminowego) N- i C-końcowe fragmenty cząsteczki. Ilość dimeru sięga zaledwie 1—5% całego H1 w chromatynie (111). Ostatnio jednak doniesiono (112), iż wykrywany w chromatynie dimer H1 może być artefaktem związanym z procedurą izolacyjną.

Dotychczasowe badania nie udzieliły jednoznacznej odpowiedzi co do funkcji poli(ADP-rybo)zylacji H1. Ostatnio Aubin i wsp. (113) donieśli o wykryciu korelacji między hyperpoli(ADP-rybo)zylacją H1 w chromatynie a pojawianiem się lokalnie zrelaksowanych odcinków chromatyny. Autorzy ci sugerują, że rozluźnianie struktury chromatyny przez poli(ADP-rybo)zylację H1 może mieć związek z udostępnianiem DNA w procesach naprawczych. Koncepcja ta przeciwstawia się zdecydowanie poprzednim interpretacjom efektów poli(ADP-rybo)zylacji sugerującym udział tej modyfikacji H1 w procesie kondensacji chromatyny (114).

V. Histon H1 a transkrypcja DNA w chromosomach

W pkt. I i II przytoczyliśmy dane wykazujące, że zdolność do kondensowania włókna chromatynowego jest szczególną cechą histonów klasy H1. Z drugiej strony zmienność zarówno sekwencji aminokwasowej jak i stopnia modyfikacji postsyntetycznych przez fosforylację, metylację i poli(ADP-rybo)zylację cząsteczek H1 znajduje odbicie w zróżnicowanej zdolności do kondensowania chromatyny przez różne H1. Oba fakty: zdolność do kondensacji i możliwość modulacji efektu kondensacyjnego sugerują, że histon H1 obok umożliwiania, generalnie, upakowania DNA w jądrze, może również pełnić rolę regulatora dostępności DNA dla różnych efektorów.

Badania struktury chromatyny aktywnie transkrybującej wskazują, że jest ona znacznie bardziej rozluźniona niż struktura chromatyny nie-

aktywnej. Obok zmniejszenia gęstości nukleosomów przypadających na jednostkę długości DNA i znacznego zwiększenia dostępności DNA dla nukleaz, charakterystyczną cechą chromatyny aktywnej transkrypcyjnie jest brak struktury solenoidowej (włókna grubego, 30 nm) (115). Analiza zdjęć z mikroskopu elektronowego wydaje się wskazywać, że rozwinięcie zwartej struktury solenoidowej jest warunkiem *sine qua non* aktywnej transkrypcji w chromatynie. Uzasadnione jest zatem przypuszczenie, że odwracalne zmiany konformacyjne włókna 30 nm pełnią kluczową rolę zarówno w aktywacji genów jak i umożliwianiu samego procesu transkrypcji.

Dotychczasowe badania, wykonane na różnych tkankach zgodnie wskazują, że rejony aktywnej transkrypcyjnie chromatyny są znacznie zubożone w histon H1 w porównaniu z pozostałą, nieaktywną chromatyną (116, 117, 118, 119, 120, 121, 122). Nie ma natomiast zbyt przekonujących danych co do tego, jakiego rodzaju mechanizmy mogłyby być odpowiedzialne za usuwanie (całkowicie lub częściowo) H1 z rejonów aktywnej chromatyny. Sugerowano, że czynnikiem takim mogłaby być zwiększona w aktywnej transkrypcyjnie chromatynie ilość białek niehistonowych, szczególnie z grupy tak zwanych białek HMG (123) oraz hyperacetylacja lizyn w N-końcowych fragmentach histonów rdzeniowych, zmniejszająca siłę oddziaływań między histonami a DNA oraz między poszczególnymi histonami i zapoczątkowująca „otwieranie” struktury nukleosomu (29, 30, 117, 124, 125). Procesy zapoczątkowujące rozluźnianie struktury solenoidu mogą mieć istotne znaczenie dla przejściowego usunięcia H1 między innymi dlatego, że włókno 30 nm jest w zasadzie strukturą dynamiczną, w której histon H1 może wymieniać się (w fizjologicznym stężeniu soli) między różnymi odcinkami chromatyny (126, 127). Ostatnio *Weintraub* (129) wykazał, że nieaktywne geny w chromatynie erytrocytów ptasich zorganizowane są w superstruktury zawierające około 20—30 tysięcy par zasad DNA. Trawienie tych struktur nukleazą mimo nacięć w DNA między-nukleosomowym nie powoduje ich rozkładu. Podobne struktury zawierające aktywne transkrypcyjnie geny, po trawieniu nukleazą rozpadają się (129). *Weintraub* sugeruje, że za różną trwałość obu struktur odpowiedzialny jest różny sposób związania H1 i H5 (występują one w obu typach struktur). *Schlissel* i *Brown* wykazali również ostatnio, że w chromatynie *Xenopus leavis* aktywna transkrypcyjnie chromatyna chroniona jest przed wiązaniem H1 przez wiązanie z kompleksem transkrypcyjnym (128).

VI. Uwagi końcowe

Przedstawione w niniejszym artykule dane dotyczące histonu H1 uzasadniają wniosek, że białko to jest kluczowym czynnikiem w generowaniu wyższego rzędu struktur chromosomowych. Stopień, w jakim te wyższego

rzędu struktury ograniczają zdolność DNA do ulegania transkrypcji określa znaczenie H1, jako generalnego elementu ustalającego (na zasadzie represji) profil transkrypcyjny DNA w jądrze. Jest oczywiste, że zarówno synteza poszczególnych rodzajów H1, ich modyfikacje i prawdopodobnie rozmieszczenie w chromatynie — pozostają pod kontrolą genetyczną. Stąd regulacyjną rolę H1 w chromatynie przyrównać można, za Hohmannem, do roli grup SH w strukturze trzeciorzędowej białek.

Zaakceptowano do druku 15 września 1985 r.

PISMIENICTWO

1. Finch J. T., Brown R. S., Rhodes D., Richmond T., Rushton B., Lutter L. C., Klug A., (1981), *J. Mol. Biol.*, **145**, 757—769.
2. Klug A., Rhodes D., Smith J., Finch J., Thomas J. O., (1980), *Nature*, **287**, 509—516.
3. Simpson R. T., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5524—5531.
4. Thoma F., Koller Th., Klug A., (1979), *J. Cell Biol.*, **83**, 403—427.
5. Thoma F., Koller Th., (1977), *Cell*, **12**, 101—107.
6. Finch J. T., Klug A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1897—1901.
7. Renz M., Nehls P., Hozier J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1879—1883.
8. Thoma F., Koller Th., (1981), *J. Mol. Biol.*, **149**, 709—733.
9. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W. E., (1973), *Nature*, **241**, 123—126.
10. Littau V. C., Burdok C. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1204—1212.
11. Von Holt C., Strickland W. N., Brandt W. F., Strickland M. S., (1979), *FEBS Lett.*, **100**, 201—218.
12. Hohmann P., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 198—205.
13. Smith B. J., Harris M. R., Sigourney C. M., Mayers E. L. V., Bustin H., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 309—317.
14. Hartman P. G., Chapman G. E., Moss T., Bradbury E. M., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **77**, 45—51.
15. Aviles F. J., Chapman G. E., Kneale G. G., Crane-Robinson C., Bradbury E. M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 363—371.
16. Crane-Robinson C., Privalov P. L., (1983), *Biopolymers*, **22**, 113—118.
17. Kossiakoff A. A., (1982), *Nature*, **296**, 713—721.
18. Van Helden P. D., (1982), *J. theor. biol.*, **96**, 327—336.
19. Jardetzky O., Akasaka K., Vogel R., Morris S., Holmes K. C., (1978), *Nature*, **273**, 564—566.
20. Wade-Jardetzky N. G., Bray R. P., Conover W. W., Jardetzky O., Giesler N., Weber K., (1979), *J. Mol. Biol.*, **128**, 259—264.
21. Pilz J., Goral K., Kratky V., Bray R. P., Wade-Jardetzky N. G., Jardetzky O., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4087—4090.
22. Taillandier E., Fort L., Liquier J., Couppez M., Sautier P., (1984), *Biochemistry*, **23**, 2644—2650.
23. Campbell A. M., Cotter R. L., Pardon J. F., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 1571—1580.

24. Suau P., Bradbury E. M., Baldwin J. P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **97**, 593—602.
25. Hollandt H., Notbohm H., Riedel F., Harbes E., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 2017—2027.
26. Lee K. S., Mandelkern M., Crothers D. M., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1438—1445.
27. Brasch K., (1976), *Exp. Cell Res.*, **101**, 396—410.
28. Butler P. J. G., Thomas J. O., (1980), *J. Mol. Biol.*, **140**, 505—529.
29. McGhee J., Felsenfeld G., (1980), *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 1115—1156.
30. McGhee J., Nickol J. M., Felsenfeld G., Rau D. C., (1983), *Cell*, **33**, 831—841.
31. Hozier J., Renz M., Nehls P., (1977), *Chromosoma* (Berlin), **62**, 301—317.
32. Kornberg R. D., (1977), *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 931—954.
33. Klug A., Butler P. J. G., (1983), w: *Genes, Structure and Expression*, red. Kroon A. M., str. 1—41; John Wiley and Sons, Chichester, New York.
34. Bonner W. M., Pollard H. B., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 282—288.
35. Chalkley R., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 587—594.
36. Olins D., Wright E. B., (1973), *J. Cell Biol.*, **59**, 304—317.
37. Glotov B. O., Nikolaev L. G., Severin E. S., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 2587—2605.
38. Itkes A. V., Glotov B. O., Nikolaev L. G., Preen S. R., Severin E. S., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 507—527.
39. Ring D., Cole R. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11688—11695.
40. Nikolaev L. G., Glotov B. O., Itkes A. V., Severin E. S., (1981), *FEBS Lett.*, **125**, 20—24.
41. Thomas J. O., Khabaza A. J. A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **112**, 501—511.
42. Ring D., Cole R. D., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 15361—15364.
43. Russo E., Giancotti V., Crane-Robinson C., Geraci G., (1983), *Int. J. Biochem.*, **15**, 487—483.
44. Smerdon M. J., Isenberg I., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4233—4242.
45. Thoma F., Losa R., Koller Th., (1983), *J. Mol. Biol.*, **167**, 619—640.
46. Losa R., Thoma F., Koller Th., (1984), *J. Mol. Biol.*, **175**, 529—551.
47. Vogel T., Singer M. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 796—798.
48. Vogel T., Singer M. F., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2334—2338.
49. Renz M., Day L. A., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3220—3228.
50. Kinkade J. M., Cole R. D., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 5790—5797.
51. Cole R. D., (1984), *Analyt. Biochem.*, **136**, 24—30.
52. Rall S. C., Cole R. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7175—7190.
53. Lennox R. W., Cohen L. H., (1984), *Develop. Biol.*, **103**, 80—84.
54. Macleod A. R., Wong N. C., Dixon G. H., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 281—291.
55. Schaffner W., Kauz G., Daetwyler H., Telford J., Smith H. O., Biernstiel M. L., (1978), *Cell*, **14**, 665—672.
56. Strickland W. N., Strickland M., Brandt W. F., Von Holt C., Lehman A., Wittman-Liebold B., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 567—578.
57. Liao L. W., Cole R. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3024—3029.
58. Welch S. L., Cole R. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 662—665.
59. Welch S. L., Cole R. D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4516—4518.

60. Liao L. W., Cole R. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11145—11148.
61. Singer D. S., Singer M. F., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 2531—2547.
62. Fasman G. D., Schaffhausen B., Goldsmith L., Adler A., (1970), *Biochemistry*, **9**, 2814—2822.
63. Liao L. W., Cole R. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6751—6755.
64. Liao L. W., Cole R. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10124—10128.
65. Robbins E., Borun T. W., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 409—416.
66. Pehrson J. R., Cole R. D., (1982), *Biochemistry*, **21**, 456—460.
67. Lennox R. W., Cohen L. H., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 262—268.
68. Hohmann P., Cole R. D., (1969), *Nature*, **223**, 1064—1066.
69. Hohmann P., Cole R. D., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 533—540.
70. Sizemore S. R., Cole R. D., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 415—419.
71. Cohen L. H., Newrock K. M., Zweidler A., (1975), *Science*, **109**, 994—997.
72. Newrock K. M., Alfageme C. R., Narch R. V., Cohen L. H., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 421—431.
73. Brandt W. F., Strickland W. N., Strickland M., Carlisle L., Woods D., Von Holt C., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **94**, 1—10.
74. Urban M. K., Zweidler A., (1983), *Dev. Biol.*, **95**, 421—428.
75. Zweidler A., (1980), *Dev. Biochem.*, **15**, 47—54.
76. Kistler W. S., Geroch M. E., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 378—384.
77. Seyedin S. M., Kistler W. S., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1371—1375.
78. Grell F. R., Oakberg E. F., Generoso E. E., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **37**, 183—199.
79. Rasmussen S. W., Holm P. B., (1978), *Carlsberg Res. Commun.*, **43**, 275—327.
80. Lennox W. R., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 669—772.
81. Isenberg I., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 159—191.
82. Sperling R., Wachtel E. J., (1981), *Adv. Prot. Chem.*, **34**, 1—60.
83. Jerzmanowski A., Maleszewski M., (1985), *Biochemistry*, **24**, 2360—2367.
84. Chen C. C., Smith P. L., Bruegger B. B., Holtz S. L., Halpern R. M., Smith R. A., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3785—3789.
85. Langan T. A., (1971), *Ann. NY. Acad. Sci.*, **185**, 166—180.
86. Cole R. D., (1977), w: *The Molecular Biology of Mammalian Genetic Apparatus*, red. Tso P. O. P., str. 93—104; Elsevier/North Holland Biomedical Press.
87. Hohmann P., (1983), *Molec. and Cellul. Biochem.*, **57**, 81—92.
88. Ajiro K., Borun T. W., Shulman S. D., McFadden G. M., Cohen L. H., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1454—1464.
89. Fasman G. D., Cowraan M. K., (1978) w: *The Cell Nucleus*, red. Busch H., t. 5, str. 55—97, Academic Press, New York.
90. Nicolini C., Ajiro K., Borun T. W., Baserga R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3381—3385.
91. Dolby T. W., Ajiro K., Borun T. W., Gilmour R. S., Cohen L., Miller P., Nicolini C., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1333—1334.
92. Baase W. A., Johnson W. C. Jr., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 797—813.
93. Adler A. J., Langan T. A., Fasman G. D., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.* **153**, 769—777.

94. D'Anna J. A., Strniste G. F., Gurley L. R., (1979), *Biochemistry*, **18**, 943—951.
95. Billings P. C., Orf J. W., Palmer D. K., Talmage D. A., Pau C. G., Blumenfeldt M., (1979), *Nucl. Acids Res.*, **6**, 2151—2164.
96. Kaplan J. K., Baner R., Morrison E., Langan T. A., Fasman G. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8777—8785.
97. Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R., (1974), *Nature*, **247**, 257—261.
98. Jerzmanowski A., Staroń K., (1981), *J. theoret. biol.*, **89**, 191—194.
99. Gurley L. R., Tobey R. A., Walters R. A., Hildebrandt C. E., Hohmann P. G., D'Anna J. A., Barham S. S., Deaven L. L., (1978) w: Cell Cycle Regulation, red. Jeter J. R., Cameron J. L., Padilla G. M., Zimmerman A. M., str. 37—60, Academic Press, New York.
100. Lamy F., Lecocq R., Dumont J. E., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 529—535.
101. Langan T. A., Rall S. C., Cole R. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1942—1944.
102. Blumenfeld M., Orf J. W., Sina B. J., Kreber R. A., Callahan M. A., Mullins J. I., Snyder L. A., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 886—890.
103. Glover C. V. C., Vavra K. J., Guttman S. D., Gorovsky M. A., (1981), *Cell*, **23**, 73—77.
104. Fischer S. G., Laemlli U. K., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2240—2246.
105. Staroń K., Jerzmanowski A., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 359—368.
106. Hohmann P., He D., Shows T. D., (1983), *Exp. Cell Res.*, **143**, 207—216.
107. Hayashi O., Ueda K., (1977), *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 95—116.
108. Miwa M., Saikawa N., Yamaisumi X., Nishimura S., Sugimura T., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 595—599.
109. Berger N. A., Sikorski G. W., (1981), *Biochemistry*, **20**, 3610—3614.
110. Riquelme P. T., Bruzio L. O., Koide S. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3018—3028.
111. Wong M., Allan J., Smulson M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 7963—7969.
112. Smith B. J., Harris M. R., Sigournay C. M., Wood J. N., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **791**, 50—56.
113. Aubin R. J., Frechette A., de Murcia G., Mandel P., Lord A., Groudin G., Poirier G. G., (1983), *The EMBO J.*, **2**, 1685—1693.
114. Butt T. R., Smulson M. E., (1980), *Biochemistry*, **19**, 5235—5242.
115. Reeves R., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **782**, 343—393.
116. Weisbrod S., (1982), *Nature*, **297**, 289—295.
117. Mathis D., Oudet P., Chambon P., (1980), *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, **24**, 1—55.
118. Cartwright I. L., Keene M. A., Howard G. C., Abmayr S. M., Fleischmann G., Lowenhaupt K., Elgin S. C. R., (1982), *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **13**, 1—86.
119. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1682—1686.
120. Sanders M. M., (1978), *J. Cell Biol.*, **79**, 97—109.
121. Davie J. R., Saunders C. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 12574—12580.
122. Djondjurov L., Ivanova E., Tsanev R., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **97**, 133—139.
123. Johns E. W., (red.) (1982) *The HMG Proteins*, Academic Press, New York.

124. Allen J., Harborne N., Rau D. C., Gould H., (1982), *J. Cell Biol.*, **93**, 285—297.
125. Chahal S. S., Matthews H. R., Bradbury E. M., (1980), *Nature*, **287**, 76—79.
126. Caron F., Thomas J. O., (1981), *J. Mol. Biol.*, **46**, 513—537.
127. Lastsers I., Muyldermans S., Wyns L., Hamers R., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1104—1110.
128. Schlissel M. S., Brown D. D., (1984), *Cell*, **37**, 903—913.
129. Weintraub H., (1984), *Cell*, **38**, 17—27.

KRZYSZTOF STAROŃ *)

Mitotyczna kondensacja chromosomów

Mitotic condensation of chromosomes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Struktura chromatyny interfazowej i chromosomów metafazowych
 - II-1. Struktura podstawowa: nukleosom i włókno 30 nm
 - II-2. Struktura chromatyny w jądrze interfazowym
 - II-3. Struktura chromosomów metafazowych
- III. Zmiany białek chromosomowych towarzyszące mitotycznej kondensacji chromosomów
 - III-1. Skład białek niehistonowych
 - III-2. Stopień ufosforylowania białek chromosomowych
 - III-3. Deacetylacja histonu H4
 - III-4. Odłączenie ubikwityny od histonu H2A
 - III-5. Poli-ADP-rybozylacja histonu H1
 - III-6. Kurezliwe białka chromosomowe
- IV. Rola środowiska jonowego w kondensacji chromosomów
 - IV-1. Wpływ środowiska jonowego na stopień skondensowania chromatyny
 - IV-2. Zmiany środowiska jonowego towarzyszące mitotycznej kondensacji chromosomów
- V. Czynniki indukujące kondensację chromosomów w oocytach i w somatycznych komórkach interfazowych
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Structure of interphase chromatin and metaphase chromosomes
 - II-1. Basic structure: nucleosome and 30 nm chromatin fiber
 - II-2. Structure of chromatin in the interphase nucleus
 - II-3. Structure of metaphase chromosomes
- III. Changes of chromosomal proteins during the mitotic condensation of chromosomes
 - III-1. Non-histone proteins composition
 - III-2. Phosphorylation of chromosomal proteins
 - III-3. Deacetylation of histone H4
 - III-4. Release of ubiquitin from histone H2A

*) Dr. Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

- III-5. Poly(ADP-ribosylation) of histone H1
- III-6. Contractile chromosomal proteins
- IV. Role of ionic milieu in the condensation of chromosomes
 - IV-1. Influence of ionic milieu on the condensation of chromatin
 - IV-2. Changes of ionic milieu during the mitotic condensation of chromosomes
- V. Factors inducing condensation of chromosomes in oocytes and somatic interphase cells
- VI. Concluding remarks

I. Wstęp

Przekształcenie rozproszonej w jądrze komórkowym chromatyny interfazowej w skondensowane chromosomy metafazowe o określonej morfologii zaobserwowano po raz pierwszy w połowie XIX wieku (cyt. wg 1). Przez następne ponad sto lat mitotyczna kondensacja chromosomów była przedmiotem intensywnych badań. Jak dotychczas, badania te nie doprowadziły do wyjaśnienia mechanizmu kondensacji chromosomów. Jednakże, dzięki rozwojowi precyzyjnych metod biochemicznych, fizycznych metod badania struktur oraz mikroskopii elektronowej, ostatnie lata stworzyły możliwości eksperymentalnego sprawdzania licznych hipotez. Mający miejsce w połowie lat siedemdziesiątych przełom w poglądach na strukturę chromatyny, związany z wykryciem nukleosomu (por. poz. 2), również dostarczył nowego impulsu do badań nad kondensacją chromosomów. W rezultacie ostatnie lata przyniosły wiele prac na ten temat. Niniejszy artykuł jest próbą uporządkowania uzyskanych informacji i przedstawienia tendencji w badaniach nad mitotyczną kondensacją chromosomów.

Mówiąc o kondensacji chromosomów rozumiemy, że oznacza ona zwiększenie ilości kontaktów między poszczególnymi nukleosomami. Z takiego określenia kondensacji chromosomów wynikają w sposób naturalny dwa pytania: jakie struktury umożliwiają zwiększenie ilości oddziaływań między nukleosomami w chromosomach metafazowych oraz jakie zmiany powodują powstanie takich struktur. Pytania te wyznaczają dwa podstawowe kierunki badań nad mitotyczną kondensacją chromosomów. Zostaną one kolejno omówione w dalszej części artykułu.

II. Struktura chromatyny interfazowej i chromosomów metafazowych

II-1. Struktura podstawowa: nukleosom i włókno 30 nm

Podstawowa struktura chromatyny była przedmiotem dwóch artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii” (2, 3). Odwołując się do powyższych artykułów ograniczam zakres tego podrozdziału wyłącznie do tych aspektów podstawowej struktury, które wiążą się bezpośrednio ze stopniem skondensowania chromatynowego DNA.

Cienka nić chromatynowa o średnicy ok. 10 nm jest zbudowana z nukleosomów, których rdzeniowe części są płaskimi cylindrami o wymiarach $11 \times 11 \times 5,5$ nm (4). Obecność cząsteczki histonu H1 w nukleosomie powoduje, że DNA wchodzi i wychodzi z rdzenia nukleosomu po jednej jego stronie (5, 6). W rezultacie ułożenie nukleosomów w natywnej cienkiej nici chromatynowej nie jest liniowe, lecz zygzakowate (5, 6). Owinięcie cząsteczki DNA wokół rdzenia nukleosomu powoduje, że zwiększa się współczynnik jej upakowania. Pojęcie to określa stosunek długości rozwiniętej cząsteczki DNA do długości struktury, w której cząsteczka ta została upakowana (7). Współczynnik upakowania cząsteczki DNA w cienkiej nici chromatynowej wynika z wymiarów nukleosomu i wynosi 6—7.

Cienka nić chromatynowa tworzy strukturę wyższego rzędu, tj. grube włókno chromatynowe o średnicy 25—30 nm, w którym cząsteczka DNA ulega dalszemu, 6—7-krotnemu upakowaniu (5, 8). Formowanie grubego włókna bezwzględnie zależy od obecności histonu H1. Gruba nić nie powstaje w chromatynie, z której usunięto ponad 10% histonu H1 (6).

Budowa grubego włókna budzi do dziś pewne kontrowersje. Istnieją co najmniej trzy hipotezy na temat struktury włókna. Pierwsza, najpowszechniej akceptowana, zakłada spiralizację cienkiej nici w solenoid, zawierający ok. 6—7 nukleosomów na skręt (8, 9), ułożonych swymi płaskimi powierzchniami równolegle do osi solenoidu (10). Jednakże obrazy z mikroskopu elektronowego często pokazują zmienną średnicę poszczególnych odcinków grubego włókna, a czasem położone obok siebie, gruzełkowate skupienia nukleosomów (11, 12). Skupienia te, zawierające 8—12 nukleosomów (tzw. *superbeads*), reprezentują według drugiej hipotezy natywną strukturę grubego włókna (13, 14, 15). Trzecia hipoteza sugeruje, że grube włókno ma strukturę podwójnego heliksu, wynikającą z zygzakowatego ułożenia nukleosomów w cienkiej nici o średnicy 10 nm (16).

Podstawowa struktura nukleosomu i grubego włókna chromatynowego o średnicy 30 nm jest wspólna dla chromatyny interfazowej i chromosomów metafazowych (17, 18, 19, 20, 21).

II-2. Struktura chromatyny w jądrze interfazowym

Chromatyna interfazowa otoczona jest przez trzy struktury, zanikające w ogromnej większości komórek w czasie mitozy. Struktury te, to otoczka jądrowa, pory jądrowe i blaszka (22). Spośród nich tylko blaszka pozostaje w bezpośrednim kontakcie z peryferyjną warstwą chromatyny w jądrze komórkowym. Jest to dość homogenna struktura o grubości ok. 80—300 nm, ułożona w jądrach komórek somatycznych między otoczką jądrową a chromatyną. Blaszka jest strukturą białkową, zbudowaną z podobnych do siebie polipeptydów o masie cząsteczkowej ok. 65 000—75 000 (22).

Wiele danych wskazuje na to, że włókna chromatynowe dołączone są do

blaszki, która w ten sposób stanowi szkielet białkowy, odpowiedzialny za przestrzenne ułożenie DNA w jądrze interfazowym. Białka o masie cząsteczkowej identycznej z masą cząsteczkową polipeptydów blaszki znajdują się w preparatach nukleoproteinowych wydzielanych z jąder komórkowych po oddysocjowaniu histonów (macierz jądrowa, jądra pozbawione histonów). Białka te stanowią zwykle dominującą grupę, czasem zaś są jedynymi składnikami białkowymi tak otrzymanych preparatów (23, 24, 25, 26). Skład białkowy preparatów macierzy jądrowej, jak również ich wygląd mikroskopowy, zależą w znacznej mierze od zastosowanej procedury wydzielania (27). Jak dotąd, trudno jest rozstrzygnąć, czy preparaty zawierające białka inne niż białka blaszki są artefaktami, czy też — przeciwnie — zachowują bardziej labilne elementy struktury szkieletu białkowego (22). Za udziałem w szkielecie białkowym chromatyny białek innych niż białka blaszki przemawia znajdywanie szkieletu białkowego w chromosomach metafazowych, w których białka blaszki nie występują (24, 26, 28, 29). Również wśród białek macierzy jądrowej niższych eukariontów dominują polipeptydy różne od białek blaszki (30).

Sposób formowania przestrzennej struktury chromatynowego DNA przez szkielet białkowy widać na wykonanych w mikroskopie elektronowym zdjęciach nienaruszonych cząsteczek DNA, uwolnionych z jąder przez delikatną lizę połączoną z całkowitym lub częściowym oddysocjowaniem histonów (25, 31, 32). Podobne informacje uzyskuje się przez badanie właściwości sedymentacyjnych takich preparatów (33, 34, 35, 36). Z badań tych wynika, że szkielet białkowy spina włókna chromatynowe w pętłę (domeny) o długości ok. 50—100 tysięcy par zasad (33, 37, 38, 39).

Na niektórych zdjęciach z mikroskopu elektronowego widać, że ilość rejonów skondensowanej chromatyny pozostającej w kontakcie z otoczką jądrową jest taka sama, jak ilość chromosomów (40). Sugeruje to, że w architekturze jądra interfazowego zachowane są elementy strukturalne pochodzące z chromosomów metafazowych.

II-3. Struktura chromosomów metafazowych

W największym chromosomie ludzkim cząsteczka DNA o długości 7,3 cm umieszczona jest w strukturze o długości ok. 10 μm (7). Oznacza to, że współczynnik upakowania DNA w skondensowanych chromosomach metafazowych wynosi ok. 8000. Pozorne skrócenie DNA rzędu 40 \times jest wynikiem owinięcia DNA wokół nukleosomu oraz kolejnej spiralizacji cienkiej nici w grube włókno chromatynowe o średnicy 30 nm (zob. pkt. II-1). Oznacza to, że mitotyczna kondensacja chromosomów związana jest z wytworzeniem struktur umożliwiających pozorne skrócenie grubego włókna chromatynowego rzędu 200 \times . Dotychczasowe badania, oparte głównie na interpretacji zdjęć z mikroskopu elektronowego, pozwoliły na sformułowanie dwóch różnych hipotez dotyczących takich struktur.

Pierwsza hipoteza zakłada, że kondensacja mitotyczna wiąże się z helikalnym skręceniem grubej nici chromatynowej. Struktury tego typu, nazwane supersolenoidem, obserwowane były przez B a k a i w s p. (7, 41) w chromosomach metafazowych człowieka, myszy i *Drosophila*. Średnicę supersolenoidu oznaczono na ok. 400 nm (7, 41). Odpowiada to 30—40-krotnemu pozornemu skróceniu grubego włókna chromatynowego obecnego w supersolenoidzie. B a k i w s p. (41, 42) zakładają, że ostateczne upakowanie cząsteczki DNA w chromosomie metafazowym następuje w efekcie kolejnej spiralizacji supersolenoidu.

Powyższej hipotezie, według której skondensowany chromosom jest zbudowany z hierarchicznych heliksów, przeciwstawia się inna, postulująca istnienie rdzenia białkowego, ułożonego centralnie wzdłuż osi chromosomu, od którego promieniście rozchodzą się pętle grubych włókien chromatynowych (19, 43, 44, 45). Hipoteza ta, zaproponowana przez L a e m m l i e g o i w s p. (43), zakłada, że centralnie ułożony rdzeń białkowy chromosomu powstaje z białkowego szkieletu chromatyny interfazowej przez zbliżenie się do siebie podstaw poszczególnych pętli grubych włókien chromatynowych (19). W obrębie pętli grube włókna chromatynowe o średnicy 30 nm są dodatkowo okręcane wokół siebie. W efekcie, pętle te są widoczne w preparatach chromosomów metafazowych oglądanych w mikroskopie elektronowym jako bardzo grube włókna o średnicy ok. 50 nm (19, 21, 46).

Szkielet białkowy chromosomu metafazowego pozostaje w kompleksie z DNA po usunięciu histonów i części białek niehistonowych. Na zdjęciach prezentowanych przez L a e m m l i e g o i w s p. (43, 47, 45) preparaty takie zachowują wiele cech morfologicznych chromosomów metafazowych.

Skład białkowy szkieletu chromosomu metafazowego różni się od szkieletu chromatyny interfazowej brakiem białek blaszki (26, 28, 29), która ulega depolimeryzacji w początkowych stadiach mitozy (48), tracąc w ten sposób kontakt z chromatyną. Z drugiej strony obraz elektroforetyczny pozostałych białek szkieletu chromatyny interfazowej jest podobny do obrazu białek chromosomów metafazowych izolowanych tą samą techniką (23, 26, 28). Sugeruje się więc, że istnieją dwa poziomy strukturalne szkieletu białkowego (28). Pierwszy jest wynikiem dołączenia chromosomowego DNA do blaszki i występuje tylko w chromatynie interfazowej. Drugi, tworzony przez pozostałe białka szkieletu, ulega przeorganizowaniu w czasie przejścia komórki z fazy G2 do mitozy, prowadząc w ten sposób do kondensacji chromosomów.

Jak dotychczas, nie ma danych, które rozstrzygałyby ostatecznie na korzyść którejkolwiek z opisanych wyżej hipotez na temat budowy chromosomu metafazowego. Przeciwnie, niektóre fakty przemawiają przeciwko pierwszej hipotezie, inne zaś przeciwko drugiej. Z prac L a e m m l i e g o i w s p. (45) wynika, że struktury podobne do supersolenoidu mogą powstawać na skutek działania sił mechanicznych w czasie izolowania chro-

mosomów. Z innych prac wynika, że strukturę chromosomu metafazowego stabilizują wyłącznie oddziaływania między grubymi włóknami chromatinowymi (49, 50, 51), co zaprzecza udziałowi szkieletu białkowego w utrzymywaniu struktury chromosomu.

Ostatnio pojawiły się doniesienia wskazujące na możliwość udziału DNA, a w szczególności jego formy Z, w określaniu struktury skondensowanego chromosomu. Sekwencje poli(dGdT·dCdA), występujące *in vitro* jako forma Z DNA, znaleziono w telomerycznych częściach chromosomów drożdży (52). Inne badania, przeprowadzone przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciw Z-DNA, wykazały szczególnie dużą zawartość Z-DNA na końcach chromosomów politenicznych *Chironomus* i *Drosophila* (53). Jak dotychczas, nie jest jasne czy i jaki związek zachodzi między strukturą DNA w telomerycznych częściach chromosomu a funkcją telomeru, czy też morfologią chromosomu.

III. Zmiany białek chromosomowych towarzyszące kondensacji mitotycznej chromosomów

Mitotycznej kondensacji chromosomów towarzyszą różnorodne zmiany białek chromosomowych. Zmienia się, choć nieznacznie, ich skład oraz pojawia się lub zanika szereg modyfikacji. Wiele hipotez łączy zachodzące podczas mitozy zmiany białek chromosomowych i kondensację chromosomów na zasadzie przyczyny i skutku. Te hipotetyczne mechanizmy kondensacji chromosomów przedstawione zostaną w kolejnych podrozdziałach wraz z opisem tych zmian białek chromosomowych, od których się wywodzą.

III-1. Skład białek niehistonowych

Skład podstawowych białek strukturalnych — histonów — jest praktycznie identyczny w chromatynie interfazowej i chromosomach metafazowych (54). Zmiany składu białkowego, towarzyszące kondensacji mitotycznej, dotyczą wyłącznie niektórych białek niehistonowych (54, 55, 56). Zakres ilościowy tych zmian jest na tyle mały, że nie wpływają one na stosunek wagowy białek niehistonowych do DNA (54). Znaczna część białek niehistonowych występuje w takich samych ilościach w chromatynie interfazowej i chromosomach metafazowych (54, 55). Obserwowane różnice w składzie białek niehistonowych mają częściowo charakter ilościowy (54), częściowo zaś dotyczą występowania pewnych białek wyłącznie w chromatynie interfazowej lub w chromosomach metafazowych (54, 55, 56). Zmiany w zawartości niektórych białek niehistonowych są identyczne w komórkach różnych typów (54). Na tej podstawie wysunięto sugestię, że białka takie mogą pełnić rolę strukturalną w chromosomach metafazowych (54).

Zmiany składu białek niehistonowych obserwuje się również wówczas, gdy kondensację chromosomów indukuje się sztucznie podczas interfazy, wywołując tzw. przedwczesną kondensację chromosomów (PCC — z ang. *premature chromosome condensation*) (56). Obserwowane zmiany są identyczne z zachodzącymi w czasie normalnego przejścia komórki z fazy G2 do mitozy (56).

III-2. Stopień ufosforylowania białek chromosomowych

Zmiany stopnia ufosforylowania mają najbardziej masowy charakter ze wszystkich modyfikacji białek zachodzących w czasie kondensacji chromosomów. Dotyczą one także największej ilości różnych rodzajów białek chromosomowych. W czasie przejścia komórki z fazy G2 do mitozy obserwuje się fosforylację praktycznie wszystkich cząsteczek histonu H1 (57, 58, 59, 60) i histonu H3 (59, 60), fosforylację białek HMG 14 (60, 61) i HMG 17 (61), lecz również ogólną defosforylację innych białek niehistonowych (62) przy jednoczesnym wzroście stopnia ufosforylowania niektórych z nich (62, 63). Fosforylacja histonów H1 i H3 zachodzi również w przypadku zaindukowanej w czasie interfazy przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) (64, 65, 66). W skondensowanych chromosomach metafazowych ufosforylowane histony zawierają w sobie najwięcej fosforu białek chromatynowych. Wynika to zarówno ze wzrostu stopnia ich ufosforylowania, jak i defosforylacji większości białek niehistonowych. W chromatynie interfazowej białka niehistonowe mogą zawierać w sobie do 90% fosforu białek chromatynowych (62).

Choć w czasie przejścia komórki z fazy G2 do mitozy białka niehistonowe ulegają ogólnej defosforylacji, niektóre z tych białek są w tym czasie specyficznie fosforylowane. Odnosi się to m.in. do białka szkieletu chromatynowego o m. cz. 119 000 (62) oraz do grupy białek luźno związanych z chromatyną (ekstrahowanych 0,2 M roztworem NaCl) o m. cz. od 27 500 do 100 000 (63).

W fosforylacji białek chromatynowych często dopatrywano się bezpośredniej przyczyny mitotycznej kondensacji chromosomów. W szczególności mitotyczną kondensację chromosomów łączono z fosforylacją histonu H1. Bradbury i wsp. (57, 67) sugerowali, że mitotyczna fosforylacja histonu H1 umożliwia wytworzenie dodatkowych oddziaływań między włóknami chromatynowymi, prowadząc w ten sposób do kondensacji chromosomu. Hipotezę tę poparto pracami, które poza zbieżnością w czasie fosforylacji histonu H1 i kondensacji chromosomów pokazywały: (1) skrócenie cyklu mitotycznego śluzowca *P. polycephalum* potraktowanego surowym ekstraktem kinazy histonowej (68), (2) wzrost aktywności kinazy histonowej bezpośrednio przed mitozą (69), (3) zahamowanie mitozy u termowrażliwego mutantu z defektem fosforylacji histonu H1 (70), (4) zwiększoną zdolność agregacji kompleksów DNA-ufosforylowany histon H1

w stosunku do kompleksów DNA-zdefosforylowany histon H1 (71). Jednakże wykazano również, że fosforylację histonu H1 i kondensację chromosomów można rozdzielić uzyskując komórki o wysokim stopniu ufosforylowania histonu H1, lecz z zablokowaną kondensacją chromosomów (64) lub też z zachodzącą bez defosforylacji histonu H1 normalną dekonkondensacją (72). Z kolei z prac strukturalnych wynika, że fosforylacja histonu H1 nie powoduje znaczniejszych zmian w strukturze włókna chromatynowego (73), zaś wiązanie ufosforylowanego w czasie mitozy histonu H1 z chromatyną jest słabsze niż analogiczne wiązanie histonu H1 w interfazie (74). Udział histonu H1 w mitotycznej kondensacji chromosomów pozostaje więc sprawą otwartą. Warto zwrócić uwagę, że niektóre hipotezy łączą fosforylację histonu H1 nie z kondensacją chromosomów, lecz z ogólnym wyłączeniem transkrypcji w czasie mitozy (60). Podobną rolę przypisuje się fosforylacji białek HMG (60).

Grupa Rao i w s.p. (63) łączy mitotyczną kondensację chromosomów z fosforylacją białek niehistonowych, tworzących niewielką frakcję białek ekstrahowanych z chromatyny 0,2 M roztworem NaCl. Fosforylacja i defosforylacja białek wchodzących w skład tej frakcji zachodzi dokładnie w tym samym czasie, co przejście komórki z fazy G2 do mitozy i z mitozy do fazy G1 cyklu mitotycznego (63). Za możliwość udziału fosforylacji białek ekstrahowanych z chromatyny 0,2 M roztworem NaCl w mitotycznej kondensacji chromosomów przemawia również to, że białka obecne w ekstrakcie indukują kondensację chromosomów w oocytach *Xenopus laevis* (zob. rozdz. V).

III-3. Deacetylacja histonu H4

Podczas przejścia komórek z fazy G2 do mitozy następuje deacetylacja histonu H4 (75, 76). W przeciwieństwie do masowej fosforylacji mitotycznej histonów H1 i H3, deacetylacja dotyczy tylko pewnej frakcji histonu H4. W komórkach CHO ilość zacytylowanej formy H4 spada z 47% w fazie S do 31% w czasie mitozy (75). Na podstawie powyższych obserwacji wysunięto sugestię, że usunięcie grup acetylowych z części cząsteczek histonu H4 może ułatwiać współdziałanie histonu H4 z ufosforylowanym histonem H1 w formowaniu skondensowanych chromosomów metafazowych (76).

III-4. Odłączenie ubikwityny od histonu H2A

W komórkach interfazowych ok. 10% histonu H2A występuje w formie związanej kowalencyjnie z ubikwityną, tworząc tzw. białko A24 (77). Białko A24 zanika całkowicie w czasie mitozy (78). Rozszczepienie białka A24 zachodzi przy udziale odpowiedniej liazy obecnej w jąderkach (79). Stworzona na podstawie powyższych obserwacji hipoteza przebiegu kondensacji chromosomów zakłada, że usunięcie ubikwityny odsłania zasadowe

aminokwasy C-końcowego odcinka histonu H2A, które oddziałując elektrostatycznie z fosforanami histonu H1 tworzą dodatkowe kontakty między włóknami chromatynowymi (78).

III-5. Poli-ADP-rybozylacja histonu H1

Wśród białek chromosomowych histon H1 oraz liczne białka niehistonowe są akceptorami poli-ADP-rybozy. Ilość poli-ADP-rybozylowanych białek niehistonowych jest drastycznie zmniejszona w chromosomach metafazowych (80). Odmienne wygląda poli-ADP-rybozylacja histonu H1 w cyklu mitotycznym. Wzrost poli-ADP-rybozylacji histonu H1 obserwuje się w fazie G2, zaś maksimum podczas mitozy (81, 82). Doniesienia dotyczące wpływu poli-ADP-rybozylacji histonu H1 na kondensację chromatyny są sprzeczne ze sobą. Pewne prace sugerują, że efektem tej modyfikacji może być wzrost stopnia skondensowania chromatyny (83). Inne prace wskazują, że poli-ADP-rybozylacja histonu H1 prowadzi do relaksacji włókna chromatynowego (84, 85). Niektóre hipotezy sugerują, że poli-ADP-rybozylacja histonu H1, poprzez wytworzenie dimerów H1 połączonych łańcuchem poli-ADP-rybozy, prowadzi bezpośrednio do mitotycznej kondensacji chromosomów (82).

III-6. Kurczliwe białka chromosomowe

Niektóre dane wskazują, że w przekształceniach strukturalnych prowadzących do mitotycznej kondensacji chromosomów mogą brać udział kurczliwe białka chromosomowe. Wprowadzenie do oocytów *Xenopus laevis* przeciwciał skierowanych przeciw aktynie prowadzi do zablokowania kondensacji chromosomów (86).

IV. Rola środowiska jonowego w kondensacji chromosomów

Opisane w poprzednim rozdziale hipotetyczne mechanizmy mitotycznej kondensacji chromosomów opierają się na zachodzących podczas mitozy modyfikacjach białek chromosomowych. Całkowicie odmienną przyczyną kondensacji chromosomów zakładają hipotezy rozważające znaczenie w tym procesie zmian środowiska wewnątrzkomórkowego, a w szczególności zmian środowiska jonowego komórki (87, 88, 89).

IV-1. Wpływ środowiska jonowego na stopień skondensowania chromatyny

Skład jonowy środowiska wewnątrzkomórkowego w znacznym stopniu determinuje stopień skondensowania chromatyny. Działanie środowiska jonowego dotyczy kilku poziomów struktury chromatyny.

Podstawowy efekt środowiska jonowego związany jest z polianionowym charakterem chromatyny (89, 90). Wielkość sił odpychania między ujemnymi ładunkami grup fosforanowych DNA, nie zobojętnionymi przez oddziaływania z histonami i białkami niehistonowymi, zależy od stopnia ekranowania tych ładunków przez kationy, a więc od stężenia kationów w środowisku. W wielu pracach wykazano wzrost stopnia skondensowania wyizolowanej chromatyny zachodzący pod wpływem zwiększenia stężenia kationów. Przejawia się to w zmianach lepkości (91, 92), współczynnika sedymentacji (91, 92, 93, 94), rozpraszania światła (95, 96), promieni rentgenowskich (97) i neutronów (9), w spadku objętości właściwej (98, 99, 100) i wzroście masy na jednostkę długości włókna chromatynowego (16). Stwierdzono również bezpośrednio, że nukleosomy włókna chromatynowego w środowisku o wysokiej sile jonowej znajdują się bliżej siebie niż w środowisku o niskiej sile jonowej (101). Kondensację chromatyny powodują zarówno kationy jedno- jak i dwuwartościowe, w zakresach stężeń wynoszących odpowiednio 10^{-3} — 10^{-1} M oraz 10^{-5} — 10^{-8} M. W zakresach tych mieszczą się komórkowe stężenia Na^+ + K^+ (sumaryczne stężenia ok. 100 mM) (102, 103) oraz Mg^{2+} (ok. 0,5—1 mM) (103, 104). Efekty działania kationów jedno- i dwuwartościowych wynikające z osłabienia sił między ujemnymi ładunkami chromatynowego DNA są addytywne (100).

Kationy jedno- i dwuwartościowe odpowiadają za przekształcenie cienkiej nici chromatynowej o średnicy 10 nm w grube włókno o średnicy 30 nm. Regularne ułożenie histonów w nukleosomach oraz zdolność histonu H1 do tworzenia oddziaływań typu H1—H1 (105) umożliwiają takie przejście w wyniku prostego zobojętnienia ujemnych ładunków. Powstawanie grubego włókna chromatynowego obserwuje się przy stężeniu kationów jednowartościowych powyżej 10 mM (5, 6) i dwuwartościowych powyżej 0,1—0,2 mM (8, 12). Morfologia grubego włókna chromatynowego zależy zarówno od wartościowości, jak i od stężenia kationu. Ogólnie, włókno powstałe w obecności kationów dwuwartościowych jest mniej stabilne niż to sformowane w obecności kationów jednowartościowych (16). Bardziej subtelne różnice to obserwowany w mikroskopie elektronowym przy niskich stężeniach każdego z kationów grubej wygląd grubego włókna, znikający wraz ze wzrostem stężenia kationu (12). Te przekształcenia strukturalne indukowane są niezależnie przez kationy jedno- i dwuwartościowe (12). Podobnie, zmiany stopnia skondensowania chromatyny zachodzące w trakcie formowania grubego włókna są niezależnie powodowane przez kationy jedno- i dwuwartościowe (100).

Kolejnym elementem strukturalnym chromatyny wykazującym wraz z kationami na kationy jest białkowy szkielet zbudowany z białek niehistonowych (zob. rozdz. III). Ekspozycja wyizolowanego szkieletu białkowego na Mg^{2+} powoduje zmniejszenie jego wymiarów o 25 do 40% (45). Można przypuszczać, że kondensacja szkieletu białkowego pod wpływem Na^+ lub

Mg^{2+} ma swój udział w ogólnym stopniu skondensowania chromatyny znajdującej się w obecności kationów. Inną właściwością białkowego szkieletu chromatynowego jest jego specyficzna wrażliwość na Ca^{2+} i Cu^{2+} . Wśród białek szkieletu znajdują się metaloproteiny zawierające Ca^{2+} lub Cu^{2+} (23, 28, 35). Kationy te są związane z białkiem i wymagają do usunięcia silnych chelatorów (23, 28, 35). Usunięcie silnie związanych kationów ze szkieletu białkowego powoduje rozluźnienie oddziaływań między tymi białkami i DNA (23, 28, 35) i w efekcie dekondensację chromatyny prowadzącą do wzrostu jej objętości o ok. 50% (100).

IV-2. Zmiany środowiska jonowego towarzyszące mitotycznej kondensacji chromosomów

Pomiary stężenia wolnych jonów w żyjącej komórce związane są z wieloma trudnościami, często nieprzewyższonymi do dzisiaj. Dlatego też, jak dotychczas, brak jest bezpośrednich danych pokazujących zmiany środowiska jonowego komórki, których zakres i zbieżność czasowa z kondensacją chromosomów mogłaby pozwolić na łączenie obu zjawisk, jako przyczyny i skutku. Brak jest również danych wykluczających taką możliwość.

Najwięcej znanych dotąd faktów dotyczy zmian w stężeniu i rozmieszczeniu jonów wapniowych w czasie cyklu mitotycznego. Wiadomo, że w czasie trwania mitozy występują fluktuacje w pobieraniu Ca^{2+} ze środowiska (106, 107), sekwestracja i zmiany w rozmieszczeniu Ca^{2+} związanego z błonami znajdującymi się przy aparacie mitotycznym (108, 109, 110) oraz przemieszczenia Ca^{2+} wewnątrz komórki (111). Na ogół nie wiąże się zmian w stężeniu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} bezpośrednio z kondensacją mitotyczną chromosomów, lecz raczej ze zmianami strukturalnymi wrzeczona mitotycznego (112, 113, 114). Jednakże jest możliwe, że stężenie jonów wapniowych reguluje poziom fosforylacji histonu H3 podczas kondensacji mitotycznej chromosomów. Wykryta w komórkach HeLa kinaza białkowa fosforylująca histon H3 jest stymulowana przez Ca^{2+} w fizjologicznym zakresie jego stężeń (115).

Niektóre dane pokazują również przemieszczanie się w obrębie komórki podczas mitozy tych kationów, których stężenie bezpośrednio determinuje stopień skondensowania chromatyny. Stwierdzono mianowicie, że podczas mitozy Mg^{2+} przemieszcza się wewnątrz komórki (111) oraz że Mg^{2+} koncentruje się w tym czasie w chromatynie (116). Również jon sodowy przemieszcza się wewnątrz komórki podczas mitozy (117).

W czasie cyklu mitotycznego zmienia się także stężenie jonów wodorowych w komórce, osiągając podczas metafazy swą najniższą wartość (118, 119). Jednakże zmiany pH w cyklu mitotycznym są nieznaczne i wahają się między 7,0 i 7,5 (119). W tym zakresie pH nie wpływa na stopień skondensowania chromatyny (100).

V. Czynniki indukujące kondensację chromosomów w oocytach i w somatycznych komórkach interfazowych

Klasyczne dzisiaj badania z zastosowaniem inhibitorów syntezy RNA i białka wykazały, że do rozpoczęcia kondensacji chromosomów potrzebne są białka, których synteza kończy się około 15—60 minut przed rozpoczęciem mitozy (120, 121). Na obecność czynników indukujących kondensację chromosomów w komórkach mitotycznych wskazuje również zjawisko przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC). Zjawisko to obserwuje się w czasie fuzji komórki mitotycznej z komórką interfazową, czego skutkiem jest kondensacja chromatyny jądra interfazowego połączona z zaniem otoczki jądrowej (122).

Czynniki indukujące kondensację chromosomów, obecne w komórkach mitotycznych i w komórkach w późnej fazie G₂, zostały wyizolowane i częściowo oczyszczone (123, 124, 125, 126). Ekstrakty białkowe z komórek mitotycznych powodują przyspieszenie dojrzewania i kondensację chromosomów w oocytach *Xenopus laevis* (123, 124, 125, 126), jak również kondensację chromosomów w somatycznych komórkach interfazowych (127). Ekstrakty te indukują również powstawanie przeciwciał specyficznych w stosunku do skondensowanych chromosomów bez względu na to, czy te ostatnie znajdują się w komórkach mitotycznych, czy też w komórkach interfazowych poddanych PCC (128). Czynniki indukujące kondensację chromosomów wiążą się preferencyjnie z chromatyną: ich zawartość w chromosomach metafazowych jest trzykrotnie większa niż w cytoplazmie (128, 129). Również do zachowania aktywności antygenowej jest niezbędne, aby czynniki indukujące kondensację chromosomów występowały w kompleksie z DNA (128).

Czynniki indukujące kondensację chromosomów można wyekstrahować z chromosomów mitotycznych 0,2 M roztworem NaCl (129). Analiza elektroforetyczna takich ekstraktów pokazuje obecność kilku silnie ufosforylowanych białek o masach cząsteczkowych między 27 500 a 100 000, których nie ma w analogicznych ekstraktach izolowanych z chromatyny interfazowej (63).

Badania podobne do opisanych wyżej wskazują również na obecność w komórkach inhibitorów czynników indukujących kondensację chromosomów (130, 131). Inhibitory te można sztucznie uaktywnić przez naświetlenie komórek promieniami UV (131).

VI. Uwagi końcowe

Mitotyczna kondensacja chromosomów jest tylko elementem wielu przemian zachodzących w komórce podczas mitozy. Liczne fakty wskazują na to, że między tymi przemianami zachodzą wzajemne powiązania. Jak dotychczas, nasza wiedza nie jest wystarczająca na tyle, aby wyjaśnić, co

dzieje się w komórce w czasie tworzenia wrzeczona mitotycznego, czy też przemieszczania chromosomów (132). Nie mamy więc spójnego i popartego dostateczną ilością faktów obrazu molekularnych przemian zachodzących w czasie mitozy, który mógłby pozwolić na przyjęcie, lub odrzucenie którekolwiek z opisanych hipotetycznych mechanizmów mitotycznej kondensacji chromosomów.

Zaakceptowano do druku 15 września, 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Mazia, D., (1961) w: *The Cell*, red. Brachet, J., Mirsky, A. E., t. 3, str. 77—412, Academic Press, New York—London.
2. Fronk, J., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 77—103.
3. Kańska-Brudzyńska, K., Walter, Z., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 157—173.
4. Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M., Klug, A., (1977), *Nature*, **269**, 29—36.
5. Thoma, F., Koller, T., Klug, A., (1979), *J. Cell Biol.*, **83**, 403—427.
6. Thoma, F., Koller, T., (1981), *J. Mol. Biol.*, **149**, 709—733.
7. Bak, A. L., Zeuthen, J., (1978), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**, 367—377.
8. Finch, J. T., Klug, A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1897—1901.
9. Suau, P., Bradbury, E. M., Baldwin, J. P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **97**, 593—602.
10. McGhee, J. D., Rau, D. C., Charney, E., Felsenfeld, G., (1980), *Cell*, **22**, 87—96.
11. Rattner, J. B., Hamkalo, A., (1979), *J. Cell Biol.*, **81**, 453—457.
12. Azorin, F., Perez-Grau, L., Subirana, J. A., (1982), *Chromosoma*, **85**, 251—260.
13. Renz, M., Nehls, P., Hozier, J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 1879—1883.
14. Strätling, W. H., Müller, U., Zentgraf, H., (1978), *Exp. Cell Res.*, **117**, 301—311.
15. Meyer, G. F., Renz, M., (1979), *Chromosoma*, **75**, 177—184.
16. Woodcock, C. L. F., Frado, L. L. Y., Rattner, J. B., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 42—52.
17. Vogt, V. M., Braun, R., (1976), *FEBS Lett.*, **64**, 190—192.
18. Compton, J. L., Hancock, R., Oudet, P., Chambon, P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 555—568.
19. Marsden, M. P. F., Laemmli, U. K., (1979), *Cell*, **17**, 849—858.
20. Hozier, J. C., Kaus, R., (1976), *Chromosoma*, **57**, 95—102.
21. Adolph, K. W., (1980), *Exp. Cell Res.*, **125**, 95—103.
22. Hancock, R., Boulikas, T., (1982), *Int. Rev. Cytol.*, **79**, 165—214.
23. Lebkowski, J. S., Laemmli, U. K., (1982), *J. Mol. Biol.*, **156**, 325—344.
24. Adolph, K. W., (1980), *J. Cell Sci.*, **42**, 291—304.
25. Hancock, R., Hughes, M. E., (1982), *Biol. Cell.*, **44**, 201—212.
26. Wunderli, H., Westphal, M., Armbruster, B., Labhart, P., (1983), *Chromosoma*, **88**, 241—248.

27. Galcheva-Gargova, Z., Petrov, P., Dessev, G., (1982), *Eur. J. Cell Biol.*, **28**, 155—159.
28. Lewis, C. D., Laemmli, U. K., (1982), *Cell*, **29**, 171—181.
29. Gooderham, K., Jeppesen, P., (1983), *Exp. Cell Res.*, **144**, 1—14.
30. Mitchelson, K. R., Bekers, A. G. M., Wanka, F., (1979), *J. Cell Sci.*, **39**, 247—256.
31. McReady, S. J., Akrigg, A., Cook, P. R., (1979), *J. Cell Sci.*, **39**, 53—62.
32. Mullinger, A. M., Johnson, R. T., (1979), *J. Cell Sci.*, **38**, 369—389.
33. Benyajati, C., Worcel, A., (1976), *Cell*, **9**, 393—407.
34. Cook, P. R., Brazell, J. A., (1976), *J. Cell Sci.*, **22**, 287—302.
35. Lebkowski, J. S., Laemmli, U. K., (1982), *J. Mol. Biol.*, **156**, 309—324.
36. Worcel, A., Benyajati, C., (1978), *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **283**, 407—409.
37. Hancock, R., (1982), *Biol. Cell.*, **46**, 105—122.
38. Mullenders, L. H. F., van Zeeland, A. A., Natarajan, A. T., (1983), *Mutation Res.*, **112**, 245—252.
39. Igo-Kemenes, T., Zachau, H. G., (1978), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**, 109—118.
40. Murray, A. B., Davies, H. G., (1979), *J. Cell Sci.*, **35**, 59—66.
41. Bak, A. L., Zeuthen, J., Crick, F. H. C., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 1595—1599.
42. Jorgensen, A. L., Bak, A. L., (1982), *Exp. Cell Res.*, **139**, 447—450.
43. Laemmli, U. K., Cheng, S. M., Adolph, K. W., Paulson, J. R., Brown, J. A., Baumbach, W. R., (1978), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**, 351—360.
44. Paulson, J. R., Laemmli, U. K., (1977), *Cell*, **12**, 817—828.
45. Earnshaw, W. C., Laemmli, U. K., (1983), *J. Cell Biol.*, **96**, 84—93.
46. Adolph, K. W., Kreisman, L. R., (1983), *Exp. Cell Res.*, **147**, 155—166.
47. Adolph, K. W., Cheng, S. M., Laemmli, U. K., (1977), *Cell*, **12**, 805—816.
48. Gerace, L., Blobel, G., (1980), *Cell*, **19**, 277—287.
49. Labhart, P., Koller, T., Wunderli, H., (1982), *Cell*, **30**, 115—121.
50. Goyanes, V. J., Matsui, S., Sandberg, A. A., (1980), *Chromosoma*, **78**, 123—135.
51. Burkholder, G. D., (1983), *Exp. Cell Res.*, **147**, 287—296.
52. Walmsley, R. M., Szostak, J. W., Petes, T. D., (1983), *Nature*, **302**, 84—86.
53. Arndt-Jovin, D., Robert-Nicoud, M., Zarling, D. A., Greider, C., Weimer, E., Jovin, T. M., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 4344—4348.
54. Wray, V. P., Elgin, S. C. R., Wray, W., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4155—4163.
55. Adolph, K. W., Phelps, J. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9086—9092.
56. Yamashita, K., Nishimoto, T., Sekiguchi, M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4667—4671.
57. Bradbury, E. M., Inglis, R. J., Matthews, H. R., (1974), *Nature*, **247**, 257—261.
58. Gurley, L. R., Walters, R. A., Tobey, R. A., (1974), *J. Cell Biol.*, **60**, 356—364.

59. Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S., Deaven, L. L., Tobey, R. A., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 1—15.
60. Paulson, J. R., Taylor, S. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6064—6072.
61. Bhorjee, J. S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6944—6948.
62. Song, M. K. H., Adolph, K. W., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3309—3318.
63. Sahasrabudde, C. G., Adlakha, R. C., Rao, P. N., (1984), *Exp. Cell Res.*, **153**, 439—450.
64. Krystal, G. W., Poccia, D. L., (1981), *Exp. Cell Res.*, **134**, 41—48.
65. Hanks, S. K., Rodriguez, L. V., Rao, P. N., (1983), *Exp. Cell Res.*, **148**, 293—302.
66. Ajiro, K., Nishimoto, T., Takahashi, T., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 4534—4538.
67. Bradbury, E. M., Inglis, R. J., Matthews, H. R., Langan, T. A., (1974), *Nature*, **249**, 553—556.
68. Inglis, R. J., Langan, T. A., Matthews, H. R., Hardie, D. G., Bradbury, E. M., (1976), *Exp. Cell Res.*, **97**, 418—425.
69. Hardie, D. G., Matthews, H. R., Bradbury, E. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **66**, 37—42.
70. Matsumoto, Y., Yasuda, H., Mita, S., Marunouchi, T., Yamada, M., (1980), *Nature*, **284**, 181—183.
71. Inglis, R. J., Matthews, H. R., Bradbury, E. M., (1976) w: Radiation and Cellular Control Processes, red. Kiefer, J., str. 240—248, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
72. Tanphaichitr, N., Moore, K. C., Granner, D. K., Chalkley, R., (1976), *J. Cell Biol.*, **69**, 43—50.
73. Kaplan, L. J., Bauer, R., Morrison, E., Langan, T. A., Fasman, G. D., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8777—8785.
74. Cruickshank, H. M., Walker, I. O., (1981), *Nucl. Acids Res.*, **9**, 3873—3885.
75. D'Anna, J. A., Tobey, R. A., Barham, S. S., Gurley, L. R., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 187—194.
76. Chahal, S. S., Matthews, H. R., Bradbury, E. M., (1980), *Nature*, **287**, 76—79.
77. Goldknopf, I. L., Busch, H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 864—868.
78. Matsui, S., Seon, B. K., Sandberg, A. A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 6386—6390.
79. Andersen, M. W., Ballal, N. R., Goldknopf, I. L., Busch, H., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1100—1104.
80. Song, M., Adolph, K. W., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 938—945.
81. Tanuma, S., Enomoto, T., Yamada, M., (1978), *Exp. Cell Res.*, **117**, 421—430.
82. Tanuma, S., Kanai, Y., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6565—6570.
83. Butt, T., Smulson, M., (1982) w: ADP-rybosylation reactions, str. 173—191, Academic Press, New York—London.
84. Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Nidergang, C., Mandel, P., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3423—3427.
85. Aubin, R. J., Frechette, A., de Murcia, G., Mandel, P., Lord, A., Grondin, G., Poirier, G. G., (1983), *EMBO J.*, **2**, 1685—1693.
86. Rungger, D., Rungger-Brändle, E., Chaponnier, C., Gabbiani, G., (1979), *Nature*, **282**, 320—321.
87. Anderson, N. G., (1956), *Q. Rev. Biol.*, **31**, 169—185.

88. Leake, R. E., Trench, M. E., Barry, J. M., (1972), *Exp. Cell Res.*, **71**, 17—26.
89. Jerzmanowski, A., Staroń, K., (1980), *J. Theor. Biol.*, **82**, 41—46.
90. Belmont, A., Nicolini, C., (1981), *J. Theor. Biol.*, **90**, 169—179.
91. Lewis, E. A., de Buysere, M. S., Rees, A. W., (1976), *Biochemistry*, **15**, 186—192.
92. Li, H. J., Hu, A. W., Maciewicz, R. A., Cohen, P., Santella, R. M., Chang, C., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3839—3854.
93. Butler, P. J. G., Thomas, T. J. O., (1980), *J. Mol. Biol.*, **140**, 505—529.
94. Ausio, J., Borochoy, N., Seger, D., Eisenberg, H., (1984), *J. Mol. Biol.*, **177**, 373—398.
95. Fulmer, A. W., Bloomfield, V. A., (1982), *Biochemistry*, **21**, 985—992.
96. Campbell, A. M., Cotter, R. I., Pardon, J. F., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 1571—1580.
97. Perez-Grau, L., Bordas, J., Koch, M. H. J., (1984), *Nucl. Acids Res.*, **12**, 2987—2996.
98. Bradbury, E. M., Danby, S. E., Rattle, H. W. E., Giancotti, V., *Eur. J. Biochem.*, **57**, 97—105.
99. Jerzmanowski, A., Staroń, K., Tynieć-Kroenke, B., Toczko, K., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **565**, 356—364.
100. Staroń, K., *Biochim. Biophys. Acta*, (1985), **825**, 289—298.
101. Ruiz-Carrillo, A., Puigdomenech, P., Eder, G., Lurz, R., (1980), *Biochemistry*, **9**, 2544—2554.
102. Century, T. J., Fenichel, I. R., Horowitz, S. B., (1970), *J. Cell Sci.*, **7**, 5—13.
103. Veloso, D., Gynn, R. W., Oskarsson, M., Veech, R. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4811—4819.
104. Flatman, P., Lew, V. L., (1977), *Nature*, **267**, 360—362.
105. Losa, R., Thoma, F., Koller, T., (1984), *J. Mol. Biol.*, **175**, 529—551.
106. Holmes, R. P., Stewart, P. R., (1977), *Nature*, **269**, 592—594.
107. Charp, P. A., Whitson, G. L., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 6a.
108. Wolniak, S. M., Hepler, P. K., Jackson, W. T., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 23—32.
109. Schatten, G., Schatten, H., Simerly, C., (1982), *Cell Biol. Int. Repts.*, **6**, 717—724.
110. Wolniak, S. M., Hepler, P. K., Jackson, W. T., (1982), *J. Cell Biol.*, **96**, 598—605.
111. Staroń, K., Jerzmanowski, A., (1984), *Eur. J. Cell Biol.*, **35**, 17—20.
112. Marcum, J. D., Dedman, J. R., Brinkley, B. R., Means, A. R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3771—3775.
113. Kiehart, D. P., (1981), *J. Cell Biol.*, **88**, 604—617.
114. Izant, J. G., (1983), *Chromosoma*, **88**, 1—10.
115. Whitlock, J. P., Augustine, R., Schulman, H., (1980), *Nature*, **287**, 74—76.
116. Jeter, J. R., Cameron, I. L., Smith, N. K. R., Steffans, W. L., Wille, J. J., (1979), *J. Cell Biol.*, **83**, 8a.
117. DuPre, A. M., Hempling, H. G., (1980), *J. Cell Physiol.* **105**, 389—399.
118. Gerson, D. F., Burton, A. C., (1977), *J. Cell Physiol.*, **91**, 297—303.
119. Morisawa, M., Steinhardt, R. A., (1982), *Exp. Cell Res.*, **140**, 341—351.
120. Rusch, H. P., (1970), *Adv. Cell Biol.*, **1**, 297—327.

121. Petersen, D. F., Tobey, R. A., Anderson, E. C., (1969), *Fed. Proc.*, **28**, 1771—1782.
122. Johnson, R. T., Rao, P. N., (1970), *Nature*, **226**, 717—722.
123. Sunkara, P. S., Wright, D. A., Rao, P. N., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 2799—2802.
124. Sunkara, P. S., Wright, D. A., Rao, P. N., (1979), *J. Supramolec. Struct.*, **11**, 189—195.
125. Wu, M., Gerhart, J. C., (1980), *Dev. Biol.*, **79**, 465—477.
126. Nelkin, B., Nichols, C., Vogelstein, B., (1980), *FEBS Lett.*, **109**, 233—238.
127. Halleck, M. S., Reed, J. A., Lumley-Sapanski, K., Schlegel, R. A., (1984), *Exp. Cell Res.*, **153**, 561—569.
128. Davies, F. M., Rao, P. N., (1982), *Exp. Cell Res.*, **137**, 381—386.
129. Adlakha, R. C., Sahasrabuddhe, C. G., Wright, D. A., Lindsey, W. F., Rao, P. N., (1982), *J. Cell Sci.*, **54**, 193—206.
130. Adlakha, R. C., Sahasrabuddhe, C. G., Wright, D. A., Rao, P. N., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 1707—1717.
131. Adlakha, R. C., Wang, Y. C., Wright, D. A., Sahasrabuddhe, C. G., Bigo, H., Rao, P. N., (1984), *J. Cell Sci.*, **65**, 279—295.
132. Pickett-Heaps, J. D., Tippit, D. H., Porter, K. R., (1982), *Cell*, **29**, 729—744.

Sprostowanie

W zeszycie 3—4, tomu 31 (1985), w artykule pt. „Translokacje chromosomalne a transformacja nowotworowa” (601—615) stosuje autor termin „egzon”. Termin ten, po angielsku „exon”, pochodzi od wyrażenia „expression on” należy zatem w języku polskim stosować pisownię „ekson”.

MACIEJ ZBIGNIEW GARSTKA *

Regulacja cyklu mocznikowego

Regulation of the urea cycle

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Pochodzenie amoniaku do syntezy mocznika
- III. Enzymy cyklu mocznikowego
- IV. Zmiany zawartości enzymów w hepatocytach
- V. Regulacja ureogenezy w wątrobie
 - V-1. Zmiany zawartości metabolitów cyklu mocznikowego
 - V-2. Wpływ N-acetyloglutaminianu
 - V-3. Rola jonów metali
 - V-4. Regulacja hormonalna ureogenezy
- VI. Uwagi końcowe

Contents

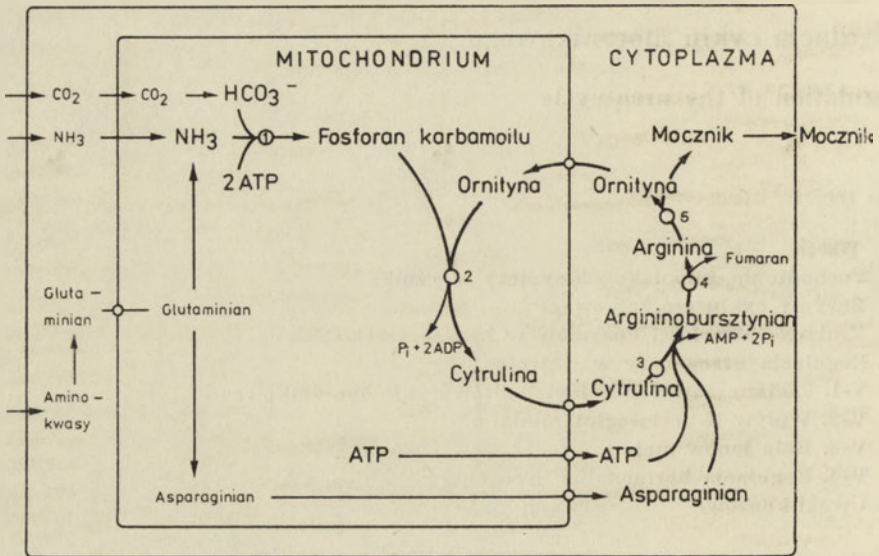
- I. Introduction
- II. Origin of ammonia for urea synthesis
- III. Enzymes of the urea cycle
- IV. Changes in enzyme levels in hepatocytes
- V. Ureogenesis regulation in liver
 - V-1. Changes in concentrations of the urea cycle intermediates
 - V-2. Effect of N-acetylglutamate
 - V-3. Effect of metal ions
 - V-4. Hormonal regulation of ureogenesis
- VI. Concluding remarks

I. Wstęp

Azot pochodzący z procesów katabolicznych jest usuwany z organizmów ssaków w postaci mocznika. U człowieka i szczura stanowi on 60—90% całkowitej puli wydalanego azotu (1, 2). Synteza mocznika przebiega w wątrobie w reakcjach katalizowanych przez pięć enzymów tworzących tzw. cykl mocznikowy. Inne tkanki mimo występowania w nich niektórych enzymów

* Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

cyklu nie odgrywają istotnej roli w produkcji mocznika (3). Substratami tego szlaku metabolicznego są: amoniak i asparaginian (będące donorami azotu), HCO_3^- oraz trzy cząsteczki ATP dostarczające energii (Ryc. 1). Z amoniaku, HCO_3^- i dwóch cząsteczek ATP powstaje w mitochondriach przy udziale syntetazy karbamoilofosforanowej pierwszy metabolit pośred-



Ryc. 1. Cykl mocznikowy w wątrobie ssaków. 1 — syntetaza karbamoilofosforanowa; 2 — transkarbamoilaza ornitynowa; 3 — syntetaza argininobursztynianowa; 4 — liaza argininobursztynianowa; 5 — arginaza

ni cyklu: fosforan karbamoilu. Następnie transkarbamoilaza ornitynowa katalizuje reakcję przeniesienia grupy karbamoilowej na ornitynę z wytworzeniem cytruliny, która jest transportowana do cytoplazmy, gdzie reaguje z asparaginianem przy udziale syntetazy argininobursztynianowej. Argininobursztynian rozkładany jest przez liazę argininobursztynianową z wytworzeniem fumaranu i argininy, która w reakcji katalizowanej przez arginazę ulega rozszczepieniu dając mocznik i ornitynę. Mocznik jest wydalany z komórki wątroby, a ornityna jest transportowana do mitochondriów, gdzie reaguje z następną cząsteczką fosforanu karbamoilu.

W końcu XIX wieku polski uczonej Marceli Nencki wykazał, że mocznik syntetyzowany jest w wątrobie, a substratami do jego wytwarzania są amoniak (odłączany od aminokwasów) i dwutlenek węgla. Przemiany metaboliczne prowadzące do syntezy mocznika czyli cykl mocznikowy wykryli w 1932 roku Krebs i Hansleit (4)*. Od tego czasu proces ten jest przedmiotem intensywnych badań, prowadzonych początkowo w celu poznania pośrednich metabolitów (7), a następnie funkcjonowania izolowa-

*) historia odkrycia patrz (5, 6).

nych enzymów (3) i określenia czynników kontrolujących ich aktywność (8, 9). Wykazano, że wiele schorzeń i wad metabolicznych wynika z zaburzeń funkcjonowania cyklu mocznikowego (3, 10, 11), opisanych również w piśmiennictwie polskim (12).

Podstawową rolą cyklu mocznikowego jest utrzymywanie w wątrobie nietoksycznego poziomu amoniaku oraz jego usuwanie w postaci obojętnej dla organizmu. Kluczowe znaczenie w kontrolowaniu syntezy mocznika mają:

- zawartość poszczególnych enzymów w komórce wątroby,
- stężenia metabolitów cyklu zależne od aktywności innych szlaków metabolicznych,
- występowanie enzymów cyklu w dwóch przedziałach komórkowych — mitochondriach i cytoplazmie,
- transport metabolitów przez błonę mitochondrialną.

Dieta oraz długotrwałe działanie hormonów zmieniają szybkość wytwarzania mocznika dopiero po upływie godzin i dni, wpływając na poziom enzymów w hepatocytach. Natomiast zmiany aktywności cyklu mocznikowego zachodzące w czasie sekund i minut związane są z zawartością substratów i produktów, a także obecnością specyficznych efektorów enzymów (np. N-acetyloglutaminianu).

II. Pochodzenie amoniaku do syntezy mocznika

Synteza mocznika w wątrobie wymaga obecności asparaginianu, powstającego na drodze transaminacji w mitochondriach, oraz amoniaku dostarczanego z innych tkanek lub wytwarzanego w hepatocytach w procesie degradacji aminokwasów. Alanina, ostateczny produkt katabolizmu aminokwasów w mięśniach (13) i degradacji glutaminy w jelicie cienkim (14) jest najprawdopodobniej ilościowo najważniejszym źródłem amoniaku u szczurów głodzonych (15) oraz żywionych wyłącznie węglowodanami (16). W warunkach diety wysokobiałkowej donorami amoniaku mogą być inne aminokwasy: prolina, seryna, lizyna, treonina, asparagina i glicyna (16).

Bezpośrednim źródłem amoniaku używanego w syntezie mocznika jest wg. K r e b s a (17) glutaminian, wytwarzany w wyniku przeniesienia grup aminowych aminokwasów na 2-oksoglutaran. Następnie w reakcji katalizowanej przez obecną w mitochondriach dehydrogenazę glutaminianową uwalniany jest amoniak, używany do syntezy fosforanu karbamoilu (17, 18).

Istniała hipoteza, że amoniak wykorzystywany do syntezy mocznika pochodzi głównie z cyklu nukleotydów purynowych, a nie z deaminacji glutaminianu (19, 20), jednakże późniejsze badania nie potwierdziły tego przypuszczenia (21—23).

Szybkość powstawania amoniaku w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową zależy od stężenia substratów i stanu oksydo-redukcyjnego komórki, w szczególności od stosunku NADPH/NADP w mitochondriach (24—27). Gdy źródłem amoniaku dla cyklu mocznikowego jest egzogeny NH_4Cl obserwuje się spadek poziomu mitochondrialnego NADPH i wzrost syntezy mocznika w wątrobie (20, 24, 25). Kiedy donorem amoniaku jest prolina utleniana do glutaminianu wysoki stopień zredukowania nukleotydów nikotynoamidowych w mitochondriach hamuje syntezę mocznika (23). Ponadto etanol na skutek podwyższenia zawartości NADH ogranicza przemianę i wykorzystanie proliny (28). Pula glutaminianu dostępnego do deaminacji zależy od szybkości jego powstawania w procesie transaminacji katalizowanym przez aminotransferazę alaninową i asparaginianową (26, 29), oraz transportu przez błonę mitochondrialną (30). Stwierdzono także, że ograniczenie syntezy aminokwasów z glutaminianu w wyniku zahamowania jego transaminacji z ketokwasami powoduje wzrost syntezy cytruliny (31, 32).

Amoniak wykorzystywany w syntezie mocznika może pochodzić bezpośrednio z glutaminy, w wyniku jej deamidacji w hepatocytach (Ryc. 2) (33, 34). Ponieważ zawartość glutaminy w komórkach wątroby zależy od wypadkowej aktywności glutaminazy i syntetazy glutaminowej, w pewnych warunkach ureogenezie może towarzyszyć powstawanie glutaminy (20, 23).

III. Enzymy cyklu mocznikowego

Większość wiadomości o kinetyce enzymów cyklu mocznikowego uzyskano przy użyciu oczyszczonych białek w badaniach *in vitro*, w warunkach optymalnych, często różnych od warunków środowiska fizjologicznego. Np. aktywność arginazy badano przy pH 9,5, gdy jej aktywność jest wyższa niż przy pH komórkowym (35). Obecne *in vivo* w środowisku inhibitory enzymów zmieniają ich stałe powinowactwa do substratów, i tak K_m transkarbamoilazy ornitynowej wobec fosforanu karbamoilu zwiększa się pięciokrotnie w mitochondriach ze względu na obecność tam nieorganicznego fosforanu (8). Zmiany stałych kinetycznych wynikają także z innych stężeń enzymów i substratów *in situ*, np. wartość K_m syntetazy karbamoilofosforanowej względem ATP wyznaczona dla enzymu w mitochondriach jest o rząd wielkości niższa niż w przypadku enzymu oczyszczonego (36). Określone *in vitro* parametry kinetyczne (por. Tab. 1) nie informują w pełni o znaczeniu poszczególnych enzymów w regulacji aktywności szlaku metabolicznego, chociaż porównanie maksymalnych szybkości enzymów cyklu, według zasady — najwolniejszy enzym jest enzymem regulatorowym szlaku, prowadzi do wyróżnienia etapów kontrolujących cykl mocznikowy. Najaktywniejszy enzym arginaza katalizuje reakcję dwustukrotnie szybciej niż najwolniejszy enzym szlaku syntetaza

Tabela 1

Właściwości kinetyczne enzymów cyklu mocznikowego.

Wartości stałych Michaelisa oraz stałych aktywacji i inhibicji mM	Wartości szybkości maksymalnych $\mu\text{mol} \times \text{godz}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ tkanki	
Syntetaza karbamoilofosforanowa		
$K_m(\text{NH}_4^-)$ 2,0 (39)	1,3 (44)	322 ± 32 (90)
$K_m(\text{HCO}_3^-)$ 5,0 (39)	2,2 (44)	
$K_m(\text{ATP})$ 1,0 (39)	0,26 (44)	108 ± 42 (192)
$K_a(\text{N-acetylo-glutaminian})$ 0,1 (39)	0,15 (44)	
$K_a(\text{Mg}^{2+})^{1)}$ 0,17 (39)		
$K_i(50\%, \text{fosforan karbamoilu})$ 10—19 (190)		
$K_i(\text{ADP})$ 0,6—1,3 (189, 190)		
$K_i(\text{P}_i)$ 25—75 (190)		
Transkarbamoilaza ornitynowa		
$K_m(\text{ornityna})$ 0,24—1,4 (54);	0,4 (56)	9540 ± 860 (90)
$K_m(\text{fosforan karbamoilu})$ 0,006—0,23 (54);	0,16 (56)	4307 ± 122 (192)
$K_i(\text{P}_i)$ 0,25 (59)		
Syntetaza argininobursztynianowa		
$K_m(\text{cytrulina})$ 0,044 (191);	0,18—2,0 (65)	111 ± 23 (90)
$K_m(\text{asparaginian})$ 0,02 (191);	0,15—1,7 (65)	52 ± 7 (192)
$K_m(\text{ATP})$ 0,15 (191);	0,06—0,42 (65)	
$K_i(\text{ADP})^{2)}$ od 0,3 do 1,0 (65)		
$K_i(\text{AMP})^{2)}$ od 0,3 do 2,0 (65)		
Liaza argininobursztynianowa		
$K_m(\text{argininobursztynian})$ 0,04—0,13 (3)		185 ± 17 (90)
$K_i(\text{mocznik})$ 8,3 (72)		102 ± 29 (192)
Arginaza		
$K_m(\text{arginina})^{3)}$ 6,8 (73)	10 (193)	72 600 ± 20 600 (90)
		4993 ± 52 (192)

¹⁾ wyznaczone przy stężeniu N-acetyloglutaminianu > 1 mM²⁾ wartości wyznaczone przy rosnących stężeniach metabolitów³⁾ K_m wyznaczone w pH 9,5

Zestawione stałe kinetyczne odnoszą się do enzymów wyizolowanych z wątroby człowieka (pozycje 44, 56, 192, 193), wołu (pozycje 3, 54, 65, 189, 190), szczura (pozycje 39, 59, 72, 73, 90, 191).

argininobursztynianowa. Z kolei transkarbamoilaza ornitynowa tylko trzykrotnie ustępuje arginazie a dwa pozostałe enzymy cyklu są od arginazy sto razy mniej aktywne (3).

Syntetaza karbamoilofosforanowa I (zależna od amoniaku)

Syntetaza karbamoilofosforanowa (ligaza dwutlenek węgla:amoniak, fosforylująca karbamoil, E.C.6.3.4.16.) katalizuje wytworzenie fosforanu karbamoilu, pierwszego produktu cyklu mocznikowego, z amoniaku, HCO_3^- i dwóch cząsteczek ATP:



Syntetaza karbamoilofosforanowa I występuje wyłącznie w mitochondriach zwierząt ureotelicznych (3, 37).

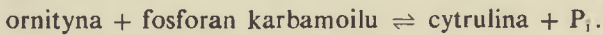
Syntetaza karbamoilofosforanowa może mieć formę dimeru złożonego z identycznych podjednostek (38—40), chociaż forma monomeryczna jest również aktywna i prawdopodobnie przeważa ilościowo (41, 42). Podjednostkę enzymu stanowi jeden polipeptyd o masie cząsteczkowej 155—160 tysięcy (38, 39, 43, 44). Syntetaza z różnych organizmów ureotelicznych ma prawie identyczny skład aminokwasowy (38, 40, 44). Podobne są także stałe powinowactwa wobec substratów i efektorów (por. Tab. 1).

Enzym jest syntetyzowany w cytoplazmie w postaci prekursora większego od białka aktywnego (45, 46), skąd jest transportowany do mitochondriów, gdzie uzyskuje ostateczną formę (47). Syntetaza stanowi około 20% całkowitego białka matriks mitochondrialnej (39, 40, 48).

Synteza fosforanu karbamoilu zachodzi po przyłączeniu do cząsteczki enzymu K^+ i Mg^{2+} (nie związanego z ATP), jednej cząsteczki ATP oraz N-acetyloglutaminianu, będącego allosterycznym efektorom zwiększającym szybkość maksymalną enzymu (42, 49). Związanie N-acetyloglutaminianu powoduje zmiany konformacyjne enzymu umożliwiające wiązanie drugiej cząsteczki ATP, donora grupy fosforanowej dla fosforanu karbamoilu (50, 51). Obie cząsteczki ATP, związane w różnych miejscach centrum aktywnego enzymu, tworzą z HCO_3^- tzw. „aktywny węglan” (ATP- CO_2 -ATP) reagujący następnie z amoniakiem, w wyniku czego powstaje fosforan karbamoilu (41, 52). Po oddysocjowaniu produktów oraz N-acetyloglutaminianu (41, 50—52) enzym może reagować z kolejnymi cząsteczkami substratów. Mechanizm aktywacji izolowanego enzymu został potwierdzony badaniami *in situ* (53).

Transkarbamoilaza ornitynowa *)

Drugi enzym cyklu mocznikowego transkarbamoilaza ornitynowa (ornityno-transkarbamoilaza, fosforan karbamoilu: L-ornityna, E.C.2.1.3.3.) katalizuje reakcję przeniesienia grupy karbamoilowej z fosforanu karbamoilu na δ -aminową grupę ornityny z wytworzenie cytruliny:



Reakcja jest łatwo odwracalna, ale w 37°C równowaga jest przesunięta w kierunku wytwarzania produktu (3, 54).

Enzym ten występuje w mikroorganizmach, roślinach i mitochondriach wątroby zwierząt ureotelicznych (3, 37, 55). Enzym ssaków jest trimerem zbudowanym z identycznych podjednostek (56—60). Podjednostka transkarbamoilazy ornitynowej oczyszczonej z wątroby ssaków jest pojedynczym polipeptydem (57) o masie cząsteczkowej 36—38 tysięcy (56—58,

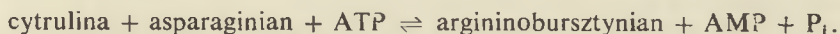
*) stosuje się także nazwę transkarbamylaza ornitynowa

60). Zbliżone są właściwości kinetyczne enzymu z różnych zwierząt ureotelicznych (56, 59). Transkarbamoilaza, kodowana w jądrowym chromosomie X (61), jest syntetyzowana w cytoplazmie w postaci większego o około 4 tysiące daltonów polipeptydu, który jest następnie transportowany do mitochondriów, gdzie ulega ostatecznej obróbce (47, 62, 63). W mitochondriach enzym stanowi od 0,5 do 0,6% całkowitego białka matriksu (59).

Transkarbamoilaza wykazuje typową kinetykę Michaelisa-Menten (54, 59, 64). Enzym jest hamowany współzawodniczo przez nieorganiczny fosforan (por. Tab. 1), co może wpływać *in vivo* na powinowactwo do substratów (9). Transkarbamoilaza jest hamowana *in vitro* przez wiele aminokwasów (21, 35, 54, 59), przy czym *in situ* zaobserwowano hamujące działanie L-leucyny (21).

Syntetaza argininobursztynianowa

Syntetaza argininobursztynianowa (ligaza L-cytrulina: L-asparagina (AMP), E.C.6.3.4.5.), trzeci cytoplazmatyczny enzym cyklu mocznikowego, katalizuje wytwarzanie argininobursztynianu z cytruliny i asparaginanu z udziałem ATP:



Reakcja przebiega dwuetapowo. Produktem pośrednim jest zadenylowana cytrulina (AMP-cytrulina) (3). Katalizowana przez syntetazę reakcja jest przesunięta w prawo wskutek rozkładu pirofosforanu przez nieorganiczną pirofosfatazę.

Syntetaza argininobursztynianowa występuje w cytoplazmie hepatocytów i w mniejszej ilości w pozawątrobowych tkankach zwierząt ureotelicznych (3, 37). Spotykana jest także u wszystkich mikroorganizmów syntetyzujących argininę (3). Jest tetramerem zbudowanym z podjednostek o identycznej masie cząsteczkowej 43—49 tysięcy (65—67), połączonych mostkami dwusiarczkowymi (3, 65). Skład aminokwasowy (67) i własności kinetyczne syntetazy wyizolowanej z wątroby ssaków są podobne (66, 67).

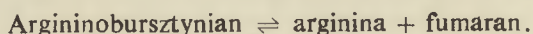
Ten homotropowy *) enzym allosteryczny wykazuje ujemne oddziaływanie ze wszystkimi trzema substratami (65, 67). Ujemne współdziałanie ATP z enzymem jest niezależne od obecności aminokwasów (3, 65), podczas gdy ujemne współdziałanie każdego z aminokwasów zależy od stężenia drugiego i zachodzi tylko wtedy, gdy zawartość drugiego substratu jest wyższa od wartości wysycającej enzym (3, 65). Obniżenie stężeń ATP i aminokwasów powoduje wzrost powinowactwa syntetazy do substratów (3). Współzawodniczymi inhibitorami enzymu są ADP i AMP, przy czym hamowanie maleje wraz ze spadkiem stężeń cytruliny i asparaginanu, pozwalając utrzymać aktywność syntetazy przy niskim ładunku energe-

*) efektor jest jednocześnie substratem enzymu

tycznym i małych stężeniach aminokwasów (65) (Tab. 1). Syntetaza argininobursztynianowa jest również hamowana przez aminokwasy, najsilniej przez alaninę (68).

Liaza argininobursztynianowa

Liaza argininobursztynianowa (argininoliaza L-argininobursztynianu, E.C.4.3.2.1.) występująca w cytosolu hepatocytów oraz podobnie jak syntetaza argininobursztynianowa w innych komórkach ssaków i w drobno-ustrojach (3, 37), katalizuje reakcję rozszczepienia argininobursztynianu na argininę i fumaran:



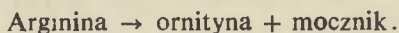
Reakcja ta jest odwracalna, stała równowagi wynosi $11,4 \times 10^{-3}$ M w 38°C w pH 7,5 (9).

Enzym jest tetramerem złożonym z podjednostek o ciężarze cząsteczkowym około 50 tysięcy (3, 69, 70). Cząsteczka liazy zawiera 16 grup sulfhydrylowych, z których 12 utrzymuje strukturę tetrameryczną (3, 69, 70). Liaza wyizolowana z wątroby, nerki i mózgu wołu wykazuje te same właściwości kinetyczne i strukturalne (3, 69).

Liaza jest enzymem allosterycznym o ujemnym oddziaływaniu z reagentami (3, 69, 71). Powinowactwo enzymu do argininobursztynianu znacznie wzrasta przy obniżeniu stężenia substratu (71). GTP jest allosterycznym aktywatorem enzymu zmniejszającym ujemne współdziałanie enzymu z argininobursztynianem (3, 71). Współzawodnicze hamowanie rozpadu argininobursztynianu przez mocznik (por. Tab. 1) może mieć znaczenie fizjologiczne w regulacji cyklu (72).

Arginaza

Arginaza (amidynohydrolaza L-argininy, E.C.3.5.3.1.), ostatni cytoplazmatyczny enzym cyklu mocznikowego, katalizuje reakcję rozszczepienia L-argininy z wytworzeniem mocznika i L-ornityny:



Reakcja jest silnie egzoergiczna, wartość ΔG_0 wynosi — 12,3 kcal/mol (9).

Wysoki poziom arginazy stwierdzono w wątrobie kręgowców i nerce zwierząt urykotelicznych, a także we wszystkich innych tkankach kręgowców i wątrobotrzustce bezkręgowców oraz u roślin i bakterii (3, 37). Enzym z różnych narządów zwierząt ureotelicznych wykazuje zróżnicowanie budowy i właściwości (73).

Arginaza wyizolowana z wątroby ssaków jest glikoproteiną (3—4⁰/0 heksoz) o masie cząsteczkowej 110—115 tysięcy (3, 74, 75). Składa się z czterech identycznych podjednostek (74). Enzym ssaków wiąże cztery atomy manganu stabilizujące enzym i niezbędne do aktywności katalitycz-

nej (3, 74, 75). Aktywność arginazy jest ograniczana przez obecność aminokwasów (35, 76, 77), w tym współzawodniczo przez ornitynę i lizynę (77) oraz L-norwalinę (35).

IV. Zmiany zawartości enzymów w hepatocytach

Wzrost ilości białka w pożywieniu powoduje zwiększenie poziomu wszystkich enzymów cyklu, choć nie w jednakowym stopniu. Np. wzrost zawartości białka w pokarmie z 15 do 60% powoduje trzykrotne zwiększenie poziomu syntetazy karbamoilofosforanowej w wątrobie, podczas gdy zawartość transkarbamoilazy ornitynowej wzrasta niespełna dwukrotnie (78). Proporcjonalnie wzrasta także w komórce zawartość mRNA tych enzymów (79, 80). Zmniejszenie ilości białka w pożywieniu lub dieta bezbiałkowa wywołują z kolei spadek aktywności enzymów (81, 82). Wzrost ilości enzymów obserwowany u zwierząt głodzonych związany jest ze zmniejszeniem w tych warunkach szybkości degradacji białka enzymatycznego (79).

Istotne zwiększenie poziomu enzymów związane ze wzrostem syntezy mocznika obserwuje się w czasie życia płodowego i zaraz po urodzeniu (78, 83, 84). Zawartość syntetazy karbamoilofosforanowej i transkarbamoilazy ornitynowej w wątrobie płodu szczura we wczesnym okresie ciąży jest niewielka i wzrasta tuż przed urodzeniem, by osiągnąć poziom zbliżony do stwierdzonego u osobników dojrzałych mniej więcej w dziesiątym dniu życia (Tab. 2). Poziom mRNA syntetazy karbamoilofosforanowej w czasie

Tabela 2

Zawartość oraz aktywność syntetazy karbamoilofosforanowej i transkarbamoilazy ornitynowej w wątrobie szczura w różnych stadiach rozwojowych

Tabelę opracowano na podstawie wyników McIntyre i wsp. (78)

Enzym	Zawartość enzymu mg × g ⁻¹ tkanki			Aktywność enzymu μmol produktu × min ⁻¹ × g ⁻¹ tkanki				
	15—17 dzień ciąży	Po uro- dzeniu	Osob- nik doj- rzały	Dzień ciąży 15,5 21,5		Dni po urodze- niu 1,5 7,5		Osob- nik doj- rzały
Syntetaza karbamo- ilofosforanowa	0,01	1,60	4,90	0,07	2,66	6,06	14,97	19,09
Transkarbamoilaza ornitynowa	0,04	0,23	0,59	66,2	163,4	214,5	406,1	464,9

życia płodowego jest znikomy a wzrasta raptownie i osiąga maksimum tuż po urodzeniu (80, 85). W okresie płodowym aktywności enzymów cyklu są regulowane przez glukokortykoidy oraz glukagon (83, 86, 87). Stwierdzono, że podniesienie zawartości syntetazy karbamoilofosforanowej w cza-

się rozwoju płodu następuje równocześnie ze wzrostem ilości receptorów sterydowych w cytoplazmie (78), a aktywacja łączy argininobursztynianowej zależy od cAMP (86). Także w czasie przeobrażenia amoniotelicznych larw płazów obserwuje się, uzależniony od poziomu tyroksyny, wzrost aktywności enzymów cyklu mocznikowego w wątrobie kijanki (88, 89).

U dorosłych ssaków długotrwałe podawanie glukagonu powoduje wzrost zawartości wszystkich enzymów cyklu mocznikowego (90, 91). Wpływ glukagonu na zawartość enzymów cyklu, za wyjątkiem transkarbamoilazy ornitynowej i arginazy, obserwuje się także u zwierząt z cukrzycą doświadczalną (92—94), tj. w warunkach, gdy poziom tego hormonu jest wysoki (95). Na zawartość enzymów cyklu mocznikowego w wątrobie mają także wpływ inne hormony odpowiedzialne za równowagę między procesami anabolicznymi i katabolicznymi. I tak podanie hormonu wzrostowego zmniejsza aktywność enzymów mitochondrialnych (96), adrenolektomia obniża, a podanie kortykoidów powoduje wzrost zawartości wszystkich enzymów cyklu (81, 97). Wpływ poszczególnych hormonów zależy od stanu metabolicznego zwierzęcia, np. usunięcie nadnerczy szczurom otrzymującym dietę o zawartości 75% białka powoduje jedynie spadek aktywności arginazy, podczas gdy u szczurów karmionych pokarmem zawierającym 10% białka obserwowano spadek aktywności wszystkich enzymów (81).

V. Regulacja ureogenezy w wątrobie

W obecności małych stężeń amoniaku w hepatocytach (< 1 mM) obserwuje się niski poziom metabolitów ureogenezy, a ilość powstałego mocznika jest równoważna ilości dostarczonego amoniaku (34). Wtedy powstawanie mocznika jest ograniczane przez aktywność syntetazy karbamoilofosforanowej (8, 9). Aktywność drugiego enzymu cyklu, karbamoilofosforanowej jest czterdziestokrotnie większa niż syntetazy karbamoilofosforanowej i najprawdopodobniej nie ogranicza syntezy cytruliny (8, 9). Wartość siły kontrolowania *) syntetazy karbamoilofosforanowej w czasie syntezy cytruliny w mitochondriach z NH_3 , HCO_3^- i ATP wynosi 0,96, podczas gdy w tych samych warunkach wartość siły kontrolowania transkarbamoilazy ornitynowej nie jest większa niż 0,02 (8). Wynik ten potwierdza kluczowe znaczenie syntetazy karbamoilofosforanowej w regulacji syntezy cytruliny. Wydaje się, że synteza cytruliny jest procesem służącym usuwaniu amoniaku z mitochondriów, niezależnym od aktywności enzymów cyklu zlokalizowanych w cytoplazmie (8).

Intensywne wytwarzanie mocznika obserwuje się przy wysokich stężeniach amoniaku, ornityny i prekursorów asparagianu (18, 34, 100—102).

*) współczynnik określający udział enzymu w regulacji przepływu przez szlak metaboliczny w warunkach równowagi dynamicznej (98, 99).

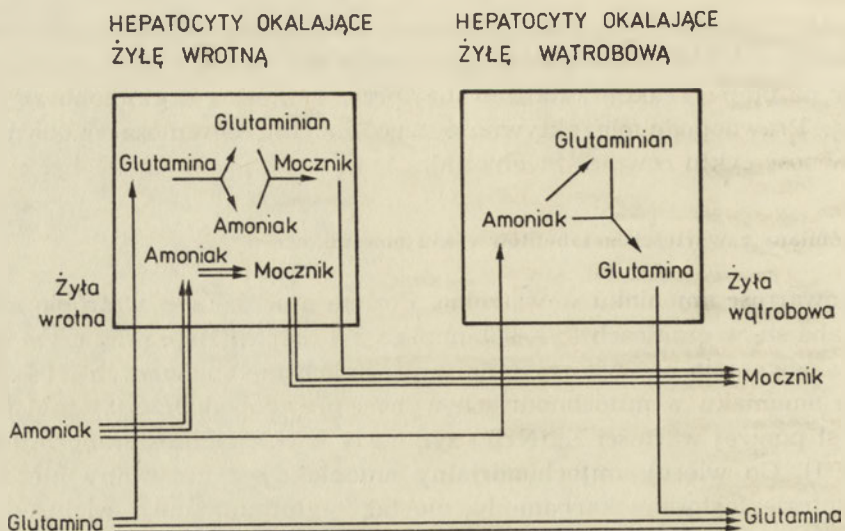
W tych warunkach wewnątrzkomórkowe nagromadzenie cytruliny i asparagianu (34, 100) wskazuje na ograniczenie przepływu przez cykl mocznikowy na etapie reakcji katalizowanej przez syntetazę argininobursztynianową. Prawdopodobnie aktywność tego enzymu ogranicza maksymalną aktywność cyklu również *in vivo* (9).

V-1. Zmiany zawartości metabolitów cyklu mocznikowego

Zawartość amoniaku w wątrobie. Poziom amoniaku w wątrobie szczura waha się w granicach $0,7\text{--}0,9 \mu\text{mola} \times \text{g}^{-1}$ tkanki (103), przy czym część jest z pewnością niewykorzystana w procesach metabolicznych (104). Stężenie amoniaku w mitochondriach wynosi prawdopodobnie $0,1 \text{ mM}$ (105), co jest poniżej wartości $K_m(\text{NH}_4^+)$ syntetazy karbamoilofosforanowej (por. Tab. 1). Co więcej, mitochondrialny amoniak jest zużywany nie tylko w syntezie fosforanu karbamoilu, ale także glutaminianu i wielu aminokwasów.

Utrzymanie stałej zawartości amoniaku w wątrobie jest uzależnione w dużej mierze od współdziałania cykli mocznikowego i glutaminowego (106). Układ syntetaza glutaminowa-glutaminaza wykazuje międzykomórkową przedziałowość. W hepatocytach występujących wokół żyły wrotnej obserwuje się wyższą aktywność glutaminazy i niższą aktywność syntetazy glutaminowej, podczas gdy w komórkach leżących w pobliżu żyły wątrobowej aktywność syntetazy glutaminowej przewyższa znacznie aktywność glutaminazy. Ponieważ glutaminaza podobnie jak syntetaza karbamoilofosforanowa występuje w mitochondriach, zatem w hepatocytach znajdujących się wokół żyły wrotnej zachodzi synteza mocznika z egzogenego amoniaku i glutaminy. W komórkach zaś położonych przy żyły wątrobowej aktywniejszym procesem jest synteza glutaminy z amoniaku niewychwyconego przez komórki występujące wokół żyły wrotnej. Wynika to z faktu, że wartość K_m syntetazy karbamoilofosforanowej wobec amoniaku ($1\text{--}2 \text{ mM}$) jest wyższa niż występującej w cytoplazmie syntetazy glutaminowej ($0,3 \text{ mM}$). Co więcej w cytoplazmie utrzymuje się wyższe stężenie NH_4^- niż w matriks mitochondriów (Ryc. 2). Wzrost stężenia amoniaku we krwi (w granicach fizjologicznych) powoduje jednocześnie zwiększenie aktywności cyklu glutaminowego i mocznikowego, umożliwiając utrzymanie nietoksycznego poziomu amoniaku (106).

Znaczenie CO_2 w syntezie cytruliny. Stężenie dwutlenku węgla w wątrobie jest wyższe niż 1 mM , a poziom HCO_3^- waha się w granicach $15\text{--}20 \text{ mM}$ (107), to jest przekracza znacznie wartość K_m syntetazy karbamoilofosforanowej (por. Tab. 1), która wykorzystuje jedynie HCO_3^- (36). Na podstawie badań z zastosowaniem inhibitora anhidrazy węglanowej — acetazolamidu (108, 109) zaproponowano, że etapem kontrolującym szybkość syntezy cytruliny może być reakcja katalizowana przez anhidrazę węglanową, enzym utrzymujący równowagę między CO_2 a HCO_3^- w mito-



Ryc. 2. Udział cyklu mocznikowego i glutaminowego w usuwaniu amoniaku z wątroby ssaków, według H ä u s s i n g e r a (106). Liczba linii jest proporcjonalna do intensywności przepływu metabolitów przez cykl glutaminowy i mocznikowy

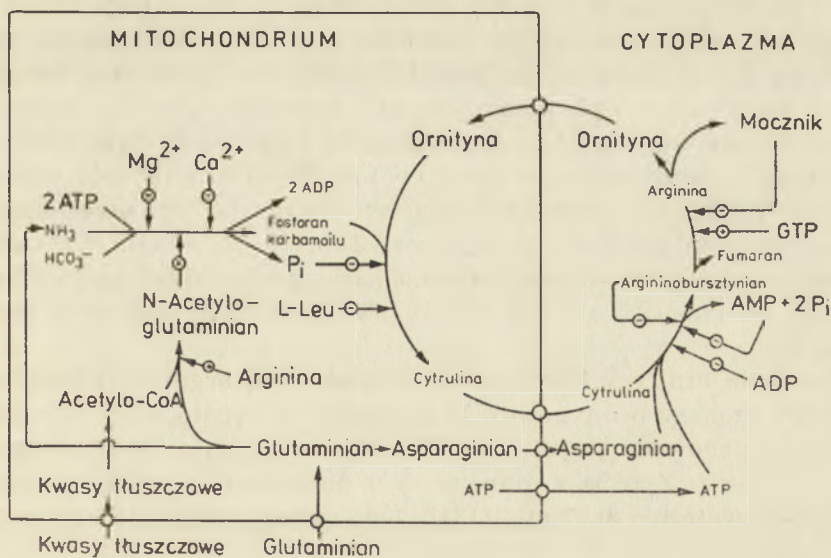
chondriach (110). Jednakże siła kontrolowania anhidrazy w syntezie cytruliny wynosi mniej niż 0,02, co nie potwierdza regulacyjnej roli tego enzymu (8).

Znaczenie poziomu ATP w mitochondriach. Wyniki badań dotyczących zależności między przepływem przez syntetazę karbamoilofosforanową, mierzonym produkcją cytruliny, a zawartością mitochondrialnego ATP i ADP nie są jednoznaczne. W różnych układach doświadczalnych stwierdzono zależność szybkości syntezy cytruliny od ilości mitochondrialnego ATP lub stosunku ATP/ADP, czy raczej $\text{MgATP}^{2-}/\text{MgADP}^-$ (111—113). Aktywność tego procesu równą połowie szybkości maksymalnej obserwuje się przy wewnątrzmitochondrialnym stężeniu ATP wynoszącym 2,5—4,0 mM (112), czyli niewiele przywyższającym wartość K_m izolowanej syntetazy karbamoilofosforanowej dla ATP (por. Tab. 1). Stymulacja syntezy cytruliny w nieuszkodzonych mitochondriach powoduje dwu-trzykrotny wzrost szybkości oddychania (114, 115), przy czym w tych warunkach następuje spadek mitochondrialnego stosunku ATP/ADP (116). Raijman i wsp. (117) uważają, że ADP silnie hamuje syntetazę karbamoilofosforanową w mitochondriach niezależnie od poziomu ATP. Tak więc, zmian aktywności tego enzymu nie można bezpośrednio wiązać ze stężeniem mitochondrialnego ATP (36). Co więcej, na podstawie wyznaczonej wartości siły kontrolowania dla łańcucha oddechowego w czasie syntezy cytruliny ($< 0,02$), oraz wysokiej produkcji ATP w stanie 3 można wnioskować o nieograniczeniu przez oksydacyjną fosforylację syntezy

fosforanu karbamoilu (8). Z drugiej strony jednak stwierdzono podwyższenie wytwarzania cytruliny przy nadmiarze nukleotydów adenylowych (118). Wydaje się także, że regulacja aktywności syntetazy przez ATP wiąże się z kontrolą jej aktywności przez N-acetyloglutaminian (50, 51), gdyż zwiększenie stężenia tego aktywatora przeciwdziała hamującemu wpływowi niskiego stosunku ATP/ADP (112).

W mitochondriach synteza cytruliny współzawodniczy o ATP z innymi procesami wymagającymi dostarczenia energii. Stwierdzono, że transport ATP przez błonę mitochondrialną, wykorzystujący połowę ilości energii potrzebnej do syntezy ATP (119) może skutecznie ograniczać aktywność syntetazy karbamoilofosforanowej (117, 120). Przy niskim poziomie energii w mitochondriach proces syntezy cytruliny ogranicza szybkość karboksylacji pirogronianu (121), podczas gdy zjawiska tego nie obserwuje się przy wysokiej zawartości ATP (101, 102). U świnki morskiej i królika, które charakteryzuje występowanie karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej w mitochondriach, synteza fosfoenolopirogronianu jest intensywniejsza niż wytwarzanie cytruliny, gdy źródłem energii jest fosforylacja substratowa (32). Kwasy tłuszczowe mogą również zmniejszać dostępność ATP w wyniku wykorzystywania go do tworzenia acylo-CoA (31, 122), przy czym ten efekt może być krótkotrwały i w następstwie intensywnego utleniania kwasów tłuszczowych, prowadzącego do zwiększenia poziomu mitochondrialnego ATP, synteza cytruliny może wzrosnąć (31, 123).

Stężenie fosforanu karbamoilu i fosforanu nieorganicznego w mitochondriach. Stężenie mitochondrialnego fosforanu karbamoilu, pierwszego pośredniego metabolitu ureogenezy zostało przez większość badaczy okreś-



Ryc. 3. Regulacja cyklu mocznikowego —⊕ stymulacja; —⊖→ hamowanie; —○→ transport przez błonę mitochondrialną.

lone jako mniejsze niż $1 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$ białka (9, 124), to jest znacznie poniżej odnośnej wartości K_i syntetazy karbamoilofosforanowej (por. Tab. 1). W przypadku syntetazy współczynnik elastyczności *) w odniesieniu do jej produktu wynosi $-0,0114$ i świadczy o małej wrażliwości enzymu na zmianę stężenia fosforanu karbamoilu (8). W świetle tych wyników jest mało prawdopodobne, aby fosforan karbamoilu mógł regulować syntezę cytruliny przez hamowanie pierwszego enzymu cyklu, mimo że w nieobecności ornityny obserwowano podniesienie jego zawartości w matryks mitochondriów do ok. $5\text{--}30 \text{ mM}$ (113, 125). Współczynnik elastyczności wyznaczony dla fosforanu karbamoilu względem transkarbamoilazy ornitynowej wynosi $0,92$, co świadczy o wysokim powinowactwie enzymu do substratu (8). W warunkach fizjologicznych fosforan karbamoilu nie ogranicza aktywności transkarbamoilazy ornitynowej ponieważ jego zawartość w mitochondriach jest wyższa niż K_m izolowanej transkarbamoilazy (por. Tab. 1) i pozorna K_m wyznaczona w mitochondriach w obecności fosforanu — inhibitora enzymu, równa $0,15 \text{ mM}$ (8).

Jedynie odpływ fosforanu karbamoilu do reakcji cytoplazmatycznych mógłby ograniczyć syntezę cytruliny. Związek ten słabo przenika przez błonę mitochondrialną (125, 126), ale gdy nie jest wykorzystywany do produkcji cytruliny, 20% puli fosforanu karbamoilu jest degradowane na zewnątrz mitochondriów (127). Kiedy zaś szybkość syntezy mocznika jest ograniczana przez cytoplazmatyczne enzymy cyklu, mitochondrialny fosforan karbamoilu zużywany jest w syntezie pirymidyn w cytoplazmie (124, 126, 128). Uważa się nawet, że $70\text{--}90\%$ fosforanu karbamoilu wykorzystywanego w hepatocytach do produkcji pirymidyn pochodzi z mitochondriów, ponieważ jest w większej ilości zużywany do syntezy kwasu orotowego niż cytoplazmatycznego pochodzenia fosforan karbamoilu, syntetyzowany przez syntetazę karbamoilofosforanową II (zależną od glutaminy). Na poparcie tego przypuszczenia przemawia również stymulacja syntezy pirymidyn przez NH_3 i ograniczanie jej przez ornitynę (129).

Poziom fosforanu nieorganicznego w mitochondriach (15 mM (130)) jest znacznie niższy od wartości $K_i(\text{P}_i)$ syntetazy karbamoilofosforanowej i transkarbamoilazy ornitynowej (por. Tab. 1). Nieorganiczny fosforan zmienia stałą powinowactwa fosforanu karbamoilu względem transkarbamoilazy ornitynowej, ale nie ma to prawdopodobnie znaczenia regulującego (8).

Znaczenie ornityny. Ornityna jest produktem arginazy i substratem transkarbamoilazy ornitynowej. W izolowanych hepatocytach (17, 26, 30, 100) i perfundowanej wątrobie (34) stwierdzono stymulację ureogenezy przez ornitynę. Zjawisko to może być powodowane niską zawartością ornityny w wątrobie ($0,57 \text{ mM}$ (131)), tego samego rzędu co K_m (ornityna)

*) parametr określający wpływ zmiany stężenia metabolitu na przepływ przez wyodrębnioną reakcję (98, 99)

transkarbamoilazy ornitynowej oraz wykorzystywaniem tego aminokwasu do produkcji proliny, glutaminianu i putrescyny (132).

Aminotransferaza ornitynowa, mitochondrialny enzym odpowiedzialny za degradację ornityny (133), jest hamowana bezpośrednio przez aminokwasy o rozgałęzionym łańcuchu węglowym (134) oraz przez amoniak, który zmniejsza pulę 2-oksoglutaranu, substratu tego enzymu (135). A zatem oba mechanizmy wpływają na zwiększenie zawartości ornityny w komórce. Istotnym czynnikiem ograniczającym przemianę ornityny i syntezę mocznika wydaje się być transport ornityny do mitochondriów (136). Ornityna może być transportowana na zasadzie antyportu z protonami (133, 137), co wymaga współdziałania z nośnikiem przenoszącym fosforan (133), lub przy udziale nośnika umożliwiającego wymianę ornityny z cytruliną (138, 139). Oba nośniki mogą oprócz ornityny przenosić lizynę (139, 140), co tłumaczy hamowanie syntezy cytruliny przez lizynę (101). Palmitynian i oleinian stymulują syntezę cytruliny z fosforanu karbamoilu i ornityny w wyniku zwiększenia szybkości transportu tego aminokwasu do mitochondriów (141). Natomiast jabłczan hamując wnikanie ornityny do mitochondriów wpływa na obniżenie syntezy cytruliny (142).

Rola cytoplazmatycznych metabolitów cyklu mocznikowego. Stężenie cytruliny zależy jedynie od aktywności enzymów mitochondrialnych, przy czym cytrulina nie ogranicza swojej syntezy (8). Jej stężenie w wątrobie jest niskie 0,03—1 $\mu\text{mola} \times \text{g}^{-1}$ tkanki (16, 143), ze względu na precyzyjną regulację aktywności syntetazy argininobursztynianowej (65).

Wykorzystywany przez syntetazę argininobursztynianową asparaginian jest wytwarzany przez mitochondrialną aminotransferazę asparaginianową i transportowany do cytoplazmy (26, 30) na zasadzie wymiany z glutaminianem (26). Zawartość asparaginianu w cytoplazmie zależy nie tylko od szybkości jego transportu z mitochondriów, ale także od aktywności aminotransferazy asparaginianowej, enzymu katalizującego reakcję w stanie równowagi (23, 101). Przy szybkim wykorzystaniu aminokwasów w cyklu mocznikowym aktywność aminotransferazy jest wystarczająca do utrzymania stężenia asparaginianu na stałym poziomie (101). Zawartość asparaginianu w wątrobie wynosi od 0,3 do 3,5 $\mu\text{mola} \times \text{g}^{-1}$ tkanki (144, 145). Do osiągnięcia maksymalnej syntezy mocznika z amoniaku w komórce wątroby jest potrzebne dostarczenie prekursorów asparaginianu (26). Szczawiooctan, substrat aminotransferazy asparaginianowej powstaje w reakcji katalizowanej przez mitochondrialną karboksylazę pirogronianową aktywowaną przez acetylo-CoA (146). Spadek poziomu acetylo-CoA powodowany intensywnym utlenianiem rozgałęzionych kwasów tłuszczowych prowadzi do zmniejszenia syntezy mocznika (147). Obserwowany stymulujący wpływ mleczanu na ureogenezę jest także związany z wytwarzaniem szczawiooctanu za pośrednictwem karboksylazy pirogronianowej (26, 100). Oprócz tego obniżenie utleniania jabłczanu w mitochondriach może ograniczać poziom asparaginianu i syntezę mocznika (26, 30).

Stężenie argininobursztynianu w wątrobie jest niewysokie (0,034 $\mu\text{mola} \times \text{g}^{-1}$ tkanki) (131, 148). Jest to prawdopodobnie wynik niskiej aktywności syntetazy argininobursztynianowej w porównaniu z aktywnością innych enzymów (148). Oprócz tego argininobursztynian hamuje swoją własną syntezę, także przy niskich stężeniach cytruliny i asparaginianu (149), a liaza argininobursztynianowa wykazuje zwiększone powinowactwo wobec tego związku przy jego małych stężeniach (71, 131), uniemożliwiając nagromadzenie tego metabolitu w komórce.

Niskie stężenie argininy w wątrobie (0,05 mM) jest związane z wysoką aktywnością arginazy i wysokim powinowactwem argininy do syntetazy tRNA (131, 148). Arginina może wpływać na syntezę cytruliny poprzez zwiększenie poziomu N-acetyloglutaminianu (patrz rozdz. V-2).

V-2. Wpływ N-acetyloglutaminianu

Aktywność syntetazy karbamoilofosforanowej jest uzależniona od obecności N-acetyloglutaminianu, aktywatora enzymu (50, 51). Wielu autorów wykazało wprost proporcjonalną zależność syntezy cytruliny od zawartości N-acetyloglutaminianu w mitochondriach (124, 145, 150, 151). Obecnie uważa się, że regulacyjna rola N-acetyloglutaminianu wiąże się wyłącznie z usuwaniem amoniaku z mitochondriów i utrzymywaniem niskiego poziomu NH_3 w wątrobie, a nie z regulacją cyklu mocznikowego *per se* (152). Ograniczenia aktywności syntetazy karbamoilofosforanowej w następstwie zmniejszenia zawartości N-acetyloglutaminianu w komórce można zauważyć przy braku aktywności syntazy N-acetyloglutaminianowej (153) i w wielu stanach patologicznych (154).

Schemat regulacji syntetazy karbamoilofosforanowej zakłada, że każda podjednostka enzymu wiąże jedną cząsteczkę efektoru (50). W warunkach fizjologicznych aktywny kompleks enzym-efektor stanowi ok. 1/2 całej puli enzymu w matryks mitochondriów, więc zmiany poziomu N-acetyloglutaminianu mogą spowodować aktywację syntetazy (120). Połowę maksymalnej aktywności syntetazy obserwowano przy stężeniu N-acetyloglutaminianu równym 0,8 $\text{nmola} \times \text{mg}^{-1}$ białka mitochondrialnego (145). N-acetyloglutaminian jest syntetyzowany w mitochondriach (155), a degradowany do glutaminianu i octanu w cytoplazmie na drodze transacylacji i deacylacji (17, 151, 156). Reakcję syntezy N-acetyloglutaminianu z glutaminianu i acetylo-CoA katalizuje syntaza N-acetyloglutaminianowa (N-acetylotransferaza acetylo-CoA:L-glutaminian, E.C.2.3.1.1.). Syntaza występująca w mitochondriach wątroby zwierząt ureotelicznych (157, 158) składa się z trzech podjednostek o masie 57 tysięcy. Cechuje ją wysoka specyficzność w stosunku do substratu, K_m dla L-glutaminianu wynosi 3,0 mM, a dla acetylo-CoA 0,7 mM, oraz jest silnie hamowana przez produkt, K_i równa się 0,07 mM. L-arginina aktywuje enzym zwiększając jego V_{max} (157, 158).

Aktywność syntazy N-acetyloglutaminianowej wzrasta w warunkach obniżonej syntezy białka lub diety wysokobiałkowej, kiedy następuje podniesienie zawartości argininy w hepatocytach (159, 160), oraz po dodaniu egzogennej argininy do zawiesiny hepatocytów czy mitochondriów (161, 162). Zważywszy jednak, że endogenny poziom argininy w wątrobie jest niski, oraz, że jak stwierdzono w przypadku szczura, arginaza jest silnie związana z błoną mitochondrialną (163, 164) aktywacja syntazy przez argininę nie odgrywa istotnej roli w warunkach fizjologicznych. Wytwarzanie N-acetyloglutaminianu wzrasta również przy zwiększeniu stężenia glutaminianu w komórce lub mitochondriach (150, 161, 165). Zjawisko to można wywołać podaniem NH_4Cl , który jest wykorzystywany w produkcji glutaminianu (165), a ten z kolei w syntezie N-acetyloglutaminianu (135, 165, 166). Zwiększenie ilości glutaminianu i jego acetylowanej formy obserwowano także po iniekcji zwierzętom mieszaniny aminokwasów (145). Zmniejszenie puli acetylo-CoA w wyniku działania kwasów pent-4-enolowego (161, 167), izowalerianowego (168), propionowego (162) lub walproinowego (169) powoduje spadek poziomu N-acetyloglutaminianu i zahamowanie syntezy mocznika mimo braku zmian w stężeniu komórkowego ATP. Także inne czynniki ograniczające dostępność acetylo-CoA, jak obecność bursztynianu (162) i jabłczanu (150) utlenianych w cyklu kwasów trikarboksylowych, powodują obniżenie poziomu N-acetyloglutaminianu w wyniku czego następuje zmniejszenie szybkości syntezy cytruliny. Zwiększenie stężenia acetylo-CoA w mitochondriach w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych powoduje wzrost zawartości N-acetyloglutaminianu oraz produkcji cytruliny (31). Badania z użyciem izolowanych mitochondriów wykazały, że transport N-acetyloglutaminianu jest jednokierunkowy i zachodzi jedynie z mitochondriów do cytoplazmy (170, 171). Prawdopodobnie zależy on jedynie od szybkości syntezy N-acetyloglutaminianu w mitochondriach (172).

V-3. Rola jonów metali

Jony metali zmieniają szybkość przepływu przez cykl mocznikowy działając na syntetazę karbamoilofosforanową, aktywną w obecności K^+ oraz Mg^{2+} niezwiązanego z ATP (39, 50, 173). K_a izolowanej syntetazy wobec magnezu wzrasta ze spadkiem stężenia N-acetyloglutaminianu w mieszaninie reakcyjnej, jednocześnie K_a enzymu wobec N-acetyloglutaminianu zmniejsza się, gdy stężenie magnezu rośnie (9). Stwierdzono, że spadek zawartości mitochondrialnego magnezu niezwiązanego z ATP w wyniku chelatującego działania cytrynianu obniża wyraźnie syntezę cytruliny (174). Także współzawodnicze w stosunku do MgATP^{2-} hamowanie enzymu przez CaATP^{2-} ogranicza produkcję cytruliny (175, 176), co ma znaczenie w hormonalnej regulacji tego procesu (175).

V-4. Wpływ hormonów

Działanie hormonów na szybkość wytwarzania mocznika w wątrobie jest wynikiem nie tylko ujawniających się po upływie godzin lub dni zmian zawartości enzymów w komórce (por. rozdz. IV), ale także zmian poziomu metabolitów zachodzących w czasie kilku minut po podaniu hormonu. Glukokortykoidy (177, 178) oraz glukagon (111, 177, 179, 180) stymulują syntezę cytruliny i mocznika na skutek zwiększenia mitochondrialnego oddychania i zawartości ATP. Działanie glukagonu może być również wynikiem zwiększenia poziomu mitochondrialnego N-acetyloglutaminianu (181—183). W cukrzycy doświadczalnej w wątrobie szczurów stwierdzono wzrost zawartości N-acetyloglutaminianu i argininy, podczas gdy w mitochondriach królików poziom N-acetyloglutaminianu nie wzrastał, a obserwowane zwiększenie syntezy cytruliny było następstwem podniesienia stężenia ATP (92—94) (Tab. 3). Jednak doświadczalne zwiększenie zawartości nukleotydów adenylowych w mitochondriach symulujące wpływ glukagonu nie zmieniało szybkości syntezy cytruliny (184). Na podstawie przedstawionych wyników można sądzić o złożonym mechanizmie aktywacji ureogenezy przez glukagon — aktywność syntetazy karbamoilofosforanowej reguluje zarówno ATP jak i N-acetyloglutaminian. Przy wysycających stężeniach jednego czynnika można obserwować wpływ drugiego będącego w suboptymalnych stężeniach.

Tabela 3

Synteza cytruliny oraz wewnątrzmitochondrialny poziom N-acetyloglutaminianu i ATP u królików z cukrzycą alloxanową według Bryły i Garstki (94)

Źródło energii	Synteza cytruliny nmol \times min ⁻¹ \times mg ⁻¹ białka		Poziom N-acetyloglutaminianu nmol \times mg ⁻¹ białka		Poziom ATP nmol \times mg ⁻¹ białka	
	kontrola	cukrzyca	kontrola	cukrzyca	kontrola	cukrzyca
Glutaminian	16,6 \pm 1,6	39,0 \pm 1,5	1,07 \pm 0,08	1,42 \pm 0,06	2,7 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1
Bursztynian + rotenon	22,8 \pm 1,8	32,2 \pm 2,6	0,80 \pm 0,07	1,07 \pm 0,08	4,3 \pm 0,5	6,1 \pm 0,2
ATP + FCCP + oligomycyna + rotenon	39,3 \pm 2,4	59,1 \pm 1,8	0,99 \pm 0,14	1,18 \pm 0,04		

Mitochondria izolowano z wątroby kontrolnych i cukrzycowych królików, a następnie inkubowano w obecności różnych substratów oddechowych. Przedstawione wyniki są średnimi z pięciu-ośmiu doświadczeń.

Wiadomo, że glukagon (185, 186), adrenalina, wazopresyna i angiotensyna (186) powodują wzrost aktywności glutaminazy, wpływający na zwiększenie poziomu glutaminianu i amoniaku, co powoduje stymulację syntezy cytruliny. Oprócz tego w czasie działania glukagonu obserwuje się zwiększoną szybkość innych procesów: stymulację proteolizy, zwiększenie transportu aminokwasów do komórki oraz ich katabolizmu, co powoduje wzrost zawartości substratów i prekursorów cyklu mocznikowego.

VI. Uwagi końcowe

Omawiając mechanizmy regulacji cyklu mocznikowego trzeba pamiętać, aby wyniki odnosić do określonego układu doświadczalnego. W rezultacie, mimo wielu informacji, trudno zbudować ostateczny schemat regulacji syntezy mocznika. Nie jest do końca wyjaśnione kontrolujące znaczenie N-acetyloglutaminianu (33, 152), ornityny czy stężeń ATP (8, 9). Stosowane obecnie w badaniach regulacji metabolizmu metody pozwalające ilościowo ocenić wpływ aktywności enzymów oraz stężeń kofaktorów i metabolitów na aktywność szlaku metabolicznego (98, 99, 187) ułatwią być może stworzenie spójnego, kompleksowego modelu regulacji cyklu mocznikowego.

W przedstawionej pracy zostały pominięte zmiany aktywności cyklu mocznikowego w stanach patologicznych. Badania takie, związane ściśle z potrzebami klinicznymi rozwijają się intensywnie, niezależnie od badań podstawowych (10—12).

Interesującym zagadnieniem są także badania porównawcze cyklu mocznikowego, informujące o jego filogenezie. Na przykład u morskiej ryby chrzęstnoszkieletowej *Squalus acanthias* wydalającej mocznik, cykl mocznikowy przebiega inaczej niż u ssaków. Fosforan karbamoilu powstaje u tych ryb z glutaminy w reakcji katalizowanej przez mitochondrialną syntetazę karbamoilofosforanową II, a mocznik pochodzi z rozkładu argininy przez także mitochondrialną arginazę (188). Wydaje się, że cykl mocznikowy powstał w toku ewolucji z enzymów pełniących we wczesnych etapach filogenezy inne funkcje metaboliczne. Prawdopodobnie obecna organizacja cyklu jest wynikiem ewolucji narządów (to jest powstania wątroby) oraz przystosowania organizmów do środowiska lądowego (37). U przodków prymitywnych ryb występowały najpewniej już wszystkie enzymy cyklu, które u *Placodermi* utworzyły wyodrębniony szlak metaboliczny odziedziczony następnie przez płazy i ssaki. Utrata zdolności do syntezy mocznika u zwierząt pokrewnych ewolucyjnie nastąpiła wskutek zmniejszenia (ryby kostnoszkieletowe) lub utraty (gady, ptaki) aktywności niektórych enzymów (37).

Dziękuję serdecznie Pani profesor Jadwidze Bryle za zachęcenie mnie do napisania niniejszego artykułu i pomoc w nadaniu mu ostatecznego kształtu.

Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach problemu międzyresortowego MR II 1.1.4. oraz MR II 1.1.7.

Zaakceptowano do druku 15 września, 1985 r.

PISMIENNICTWO

1. Jelinek E. M., Looney J. M., (1939), *J. Biol. Chem.*, **128**, 621—630.
2. Schimke R. T., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 459—468.
3. Ratner S., (1973), *Advances in Enzymology*, t. 39, str. 1—90, J. Wiley and Sons, New York.

4. Krebs H. A., Henseleit K., (1932), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **210**, 33—66.
5. Krebs H. A., (1976) w: The Urea Cycle, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 1—12, J. Wiley and Sons, New York.
6. Florkin M., (1977) w: *Comprehensive Biochemistry*, red. Florkin M., Stotz E. H., t. 32, cz. IV, str. 209—229, Elsevier, Amsterdam.
7. Grisolia S., (1976) w: The Urea Cycle, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 13—20, J. Wiley and Sons, New York.
8. Wanders R. J. A., van Roermund C. U. T., Meijer A. J., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **142**, 247—254.
9. Meijer A. J., Hensgens H. E. S. J., (1982) w: *Metabolic Compartmentation*, red. Sies M., str. 259—286, Academic Press, New York.
10. Shih V. E., (1978) w: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, red. Stanbury J. B., Wijngaarden J. B., Frederickson D. S., str. 362—368, McGraw-Hill, New York.
11. Shih V. E., (1976) w: The Urea Cycle, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 367—414, J. Wiley and Sons, New York.
12. Tomaszewski L., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 91—122.
13. Felig P., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 933—955.
14. Windmueller H. G., Spaeth A. E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 107—112.
15. Aikawa T., Matsutaka M., Yamamoto H., Okuda T., Ishikawa E., Kawano T., Matsumura E., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 1003—1017.
16. Rèmesy C., Dèmigüè C., Aufrère J., (1978), *Biochem. J.*, **170**, 321—329.
17. Krebs H. A., Hems R., Lund P., (1973), *Adv. Enz. Regul.*, **11**, 361—377.
18. Chamalaun R. A. F. M., Tager J. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 119—134.
19. McGivan J. D., Chappel J. B., (1975), *FEBS Lett.*, **52**, 1—7.
20. Mendes-Murão J., McGivan J. D., Chappel J. B., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 457—464.
21. Rognstand R., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **496**, 249—252.
22. Krebs H. A., Hems R., Lund P., Halliday D., Read W. W. C., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 733—737.
23. Hensgens H. E. S. J., Meijer A. J., Williamson J. R., Gimpel J. A., Tager J. M., (1978), *Biochem. J.*, **170**, 699—707.
24. Sies H., Summer K. M., Bucher T., (1975), *FEBS Lett.*, **54**, 247—278.
25. Sies H., Akerboom T. P. M., Tager J. M., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **72**, 301—307.
26. Meijer A. J., Gimpel J. A., Deleeuw G. A., Tischler M. E., Tager J. M., Williamson J. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2308—2320.
27. Stubbs M., Krebs H. A., (1975), *Biochem. J.*, **150**, 41—45.
28. Fellemsius E., Corlgrèn H., Kiessling K.-M., (1973), *Life. Sci.*, **13**, 595—599.
29. Groen K. A., Sips H. J., Vervoorn R. C., Tager J. M., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **122**, 87—93.
30. Meijer A. J., Gimpel J. K., Deleeuw G. A., Tager J. M., Williamson J. R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7728—7738.
31. Bryła J., (1974), *FEBS Lett.*, **47**, 60—65.

32. Bryła J., Zaleski J., Kubica A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 411—417.
33. Lund P., Wiggins D., (1984), *Biochem. J.*, **218**, 991—994.
34. Saheki T., Katsunuma N., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 659—666.
35. Saheki T., Sato Y., Takada S., Katsunuma T., (1979), *J. Biochem.*, **86**, 745—750.
36. Cohen N. S., Raijman L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3352—3357.
37. Cohen P. P., (1976), w: *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 21—38, J. Wiley and Sons, New York.
38. Clarke S., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 950—961.
39. Lusty C. J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **85**, 373—383.
40. Raijman L., Jones M. E., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 270—278.
41. Britton M. G., Rubio V., Grisolia S., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **102**, 521—530.
42. Lusty C. J., (1981), *Biochemistry*, **20**, 3665—3675.
43. Mori M., Cohen P. P., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8837—8839.
44. Rubio V., Ramponi G., Grisolia S., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **659**, 150—160.
45. Mori M., Miura S., Tatibana M., Cohen P. P., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5071—5075.
46. Raymond Y., Shore G. C., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2087—2090.
47. Mori M., Morita T., Ikeda F., Amaya Y., Tatibana M., Cohen P. P., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6056—6060.
48. Charles R., de Graaf A., Moorman A. F. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **629**, 36—49.
49. Cohen N. S., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.*, **232**, 38—46.
50. Alonso E., Rubio V., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **135**, 331—337.
51. Rubio V., Britton H. G., Grisolia S., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **134**, 337—343.
52. Rubio V., Britton H. G., Grisolia S., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **93**, 245—256.
53. Lof C., Cohen M., Vermeulen L. P., van Roermund C. W. T., Wanders R. J. A., Meijer A. J., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **135**, 251—258.
54. Marshall M., Cohen P. P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1654—1669.
55. Kleczkowski K., Cohen P. P., (1964), *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 271—278.
56. Kalousek F., Francois B., Rosenberg L. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3939—3944.
57. Clarke S., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1118—1124.
58. Hoogenraad N. J., Sutherland T. M., Howlett G. J., (1980), *Anal. Biochem.*, **101**, 97—102.
59. Lusty C. J., Jilka R. L., Nietsch E. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10030—10036.
60. de Mortinis M. L., McIntyre P., Hoogenraad N., (1981), *Biochem. Int.*, **3**, 371—378.
61. Riccinti F. C., Gelehrter T. D., Rosenberg L. E., (1976), *Am. J. Hum. Genet.*, **28**, 332—338.
62. Conboy J. G., Kelousek F., Rosenberg L. E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5724—5727.

63. Mori M., Miura S., Tatibana M., Cohen P. P., (1980), *J. Biochem.*, **88**, 1829—1836.
64. Marshall M., Cohen P. P., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7301—7305.
65. Rochovansky O., Kodowaki H., Ratner S., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 5287—5294.
66. O'Brien W. E., (1979), *Biochemistry*, **58**, 5353—5356.
67. Saheki T., Sase M., Nakano K., Azuma F., Katsunuma T., (1983), *J. Biochem.*, **93**, 1531—1537.
68. Hansgens H. E. S. J., Meijer A. J., (1980), *Biochem. J.*, **186**, 1—4.
69. Murakami K., Ratner S., (1979), *Anal. Biochem.*, **95**, 139—155.
70. Lusty C. J., Ratner S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7010—7022.
71. Rochovansky O., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7225—7230.
72. Menyhart J., Grof I., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **75**, 405—409.
73. Kaysen G. A., Strecker H. J., (1973), *Biochem. J.*, **133**, 779—788.
74. Vielle-Breitburd F., Orth G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1227—1235.
75. Havell D., Sokolovsky M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 102—108.
76. Pace C. N., Landers R. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 410—412.
77. Kaysen G. A., Strecker H. J., (1973), *Biochem. J.*, **133**, 779—788.
78. McIntyre P., de Mortis M. L., Hoogenraad N., (1983), *Biochem. Int.*, **6**, 365—373.
79. Mori M., Miura S., Tatibana M., Cohen P. P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4127—4132.
80. Ryall J., Rochubinski R. A., Nguyen M., Rozen R., Broglie K. E., Schore G. C., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9172—9176.
81. Christowitz D., Mattheyses F. J., Balinsky J. B., (1981), *Enzyme*, **26**, 113—121.
82. Aebi H., (1976) w: *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 275—296, J. Wiley and Sons, New York.
83. Rähä N. C., (1976) w: *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 261—275, J. Wiley and Sons, New York.
84. Rabier D., Briand P., Coude F.-X., Petit F., Grimber G., Kamoun P. P., Cathelineau L., (1983), *Biochimie*, **65**, 1—6.
85. Raymond Y., Shore G. C., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **656**, 111—119.
86. Husson A., Vailland R., (1982), *Endocrinology*, **110**, 227—232.
87. Husson A., Bonazza M., Boquet C., Vailland R., (1983), *Biochem. J.*, **216**, 281—285.
88. Cohen P. P., (1970), *Science*, **168**, 533—543.
89. Wixon R. L., Reddy M. K., Cohen P. P., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3684—3692.
90. Snodgrass P. J., Lin R. C., Muller W. A., Aoki T. T., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2748—2753.
91. Brebnor L., Phillips E., Balinsky J. B., (1981), *Enzyme*, **26**, 265—270.
92. Jorda A., Gomez M., Cabo J., Grisolia S., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 37—43.
93. Jorda A., Cabo J., Grisolia S., (1981), *Enzyme*, **26**, 240—244.
94. Bryła J., Garstka M., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **839**, 90—95.
95. Muller W. A., Faloona G. R., Unger R. J., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 1992—1999.

96. Palekar A. G., Collipp P. J., Maddaiah V. T., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1604—1610.
97. McLean E., Gurney M. W., (1963), *Biochem. J.*, **87**, 96—104.
98. Duszyński J., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 3—15.
99. Westerhoff H. V., Groen A. K., Wanders R. J. A., (1984), *Biosci. Rep.*, **4**, 1—22.
100. Briggs S., Freedland A., (1976), *Biochem. J.*, **160**, 205—209.
101. Krebs H. A., Lund P., Stubbs M., (1976) w: *Gluconeogenesis its Regulation in Mammalian Species*, red. Hanson R. W., Mehlman M. A., str. 269—291, J. Wiley and Sons, New York.
102. Wojtczak A. B., Wałajtys-Rode I., Geelen M. J., (1978), *Biochem. J.*, **170**, 379—385.
103. Brosnan J. T., (1976) w: *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 443—455, J. Wiley and Sons, New York.
104. Sainsbury G. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **631**, 305—316.
105. Wanders R. J. A., Hoek J. B., Tager J. M., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **110**, 197—202.
106. Häussinger D., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **133**, 269—275.
107. Krebs H. A., (1976) w: *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 149, J. Wiley and Sons, New York.
108. Dogson S. J., Forster R. E., Schwed D. A., Storey B. T., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 7696—7701.
109. Rognstad R., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **222**, 442—448.
110. Vincent S. H., Silverman D. N., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6850—6855.
111. Bryła J., Harris E. J., Plumb J. A., (1977), *FEBS Lett.*, **80**, 443—448.
112. Wanders R. J. A., van Woerkom G. M., Nooteboom R. F., Meijer A. J., Tager J. M., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **113**, 295—302.
113. Williamson J. R., Steinman R., Coll K., Rich T. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7287—7297.
114. Duszyński J., Bogucka K., Letko H. G., Küster U., Wojtczak L., (1979) w: *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport*, red. Quagliariello E., Palmieri F., Papa S., Kingenberg M., str. 309—316, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
115. Duszyński J., Bogucka K., Letko G., Küster U., Kunz W., Wojtczak L., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 217—223.
116. Letko G., Küster U., (1979), *Acta Biol. Med. Germ.*, **38**, 1379—1385.
117. Raijman L., Bartulis T., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 188—197.
118. Goldstein F. G., Aprille J. R., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**, 7—13.
119. Küster U., Letko G., Kunz W., Duszyński J., Bogucka K., Wojtczak L., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **636**, 32—38.
120. Cheung Ch.-W., Raijman L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5051—5057.
121. Bryła J., Niedźwiecka A., (1979), *Int. J. Biochem.*, **10**, 235—239.
122. Cathelineau L., Petit F. P., Coude F. X., Kamoun P. P., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 327—332.
123. O'Connor J. E., Costell M., Grisolia S., (1984), *FEBS Lett.*, **166**, 331—334.
124. Tatibana M., Schigesada K., (1976) w: *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Báguena R., Mayor F., str. 301—319, J. Wiley and Sons, New York.
125. Cohen N. S., Cheung Ch.-W., Raijman L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10248—10255.

126. Natale P. J., Tremblay D. C., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 357—368.
127. Lof C., Wanders R. J. A., Meijer A. J., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 89—94.
128. Hassan A. S., Milner J. A., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 24—29.
129. Wendler Ph. A., Blanding J. H., Tremblay G. C., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 36—48.
130. Akerboom T. P. M., Bookelman M., Zuurendonk P. F., van der Meer R., Tager J. M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 413—420.
131. Raijman L., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 225—232.
132. Shih V. E., (1981), *Enzyme*, **26**, 254—258.
133. McGivan J. D., Bradford N. M., Beans A. D., (1977), *Biochem. J.*, **162**, 147—156.
134. Matsuzawa T., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 601—609.
135. Saheki T., Ohkubo T., Katsunuma T., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 1423—1430.
136. Zollner H., (1984), *Int. J. Biochem.*, **16**, 681—685.
137. Gamble J. G., Lehninger A. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 610—618.
138. Bryła J., Harris E. J., (1976), *FEBS Lett.*, **72**, 331—336.
139. Bradford N. M., McGivan J. D., (1980), *FEBS Lett.*, **113**, 294—297.
140. Houmes F. A., Kitching L., Eller A. G., (1983), *Biochem. Med.*, **30**, 313—321.
141. Bryła J., Niedźwiecka A., (1983), *Int. J. Biochem.*, **15**, 1187—1189.
142. Niedźwiecka A., Bryła J., (1981), *Int. J. Biochem.*, **13**, 495—499.
143. Pennickx N., Simon J.-P., Wiame J.-M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **49**, 429—442.
144. Saheki T., Tsuda M., Tanaka T., Katunuma N., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 671—678.
145. Stewart P. M., Walser M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5270—5280.
146. Utter M. F., Scrutton M. C., (1969), *Curr. Top. Cell Regul.*, **1**, 253—296.
147. Wałajtys-Rode E., Coll K. E., Williamson J. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11521—11529.
148. Ratner S., (1975), *Anal. Biochem.*, **63**, 141—155.
149. Takada S., Saheki T., Igarashi Y., Katsunuma T., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 1309—1314.
150. Meijer A. J., van Woerkom G. M., (1978), *FEBS Lett.*, **86**, 117—121.
151. McGivan J. D., Bradford N. M., Mendes-Mourão J., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 415—421.
152. Meijer A. J., Verhoeven A. J., (1984), *Biochem. J.*, **223**, 559—560.
153. Bachmann C., Krähenbühl S., Colombo J. P., Schubiger G., Jaggi K. H., Tönz O., (1981), *N. Engl. J. Med.*, **304**, 543.
154. van Dijk M., Lund P., (1984), *Biochem. J.*, **222**, 837—838.
155. Shigesada K., Tatibana M., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5588—5595.
156. Reglero A., Rivas J., Mendelson J., Wallace R., Grisolia S., (1977), *FEBS Lett.*, **81**, 13—17.
157. Shigesada K., Tatibana M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 285—291.
158. Ionoda T., Tatibana M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9839—9843.
159. Kawamoto S., Ishida M., Mori M., Tatibana M., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 637—641.

160. Kawamoto S., Tatibana M., (1983), *FEBS Lett.*, **151**, 117—121.
161. Shigesada K., Aoyagi K., Tatibana M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **85**, 385—391.
162. Rabier D., Cathelineau L., Briand P., Kamoun P., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 456—460.
163. Cheung Ch.-W., Raijman L., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 543—549.
164. Świątkowska B., Porębska Z., Szymczyk T., (1970), *Acta Biochim. Polon.*, **17**, 203—208.
165. Zollner H., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **676**, 170—176.
166. O'Connor J. E., Guerri C., Jorda A., Grisolia S., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1508—1516.
167. Aoyogi K., Mori M., Tatibana M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 515—521.
168. Coude F. X., Grinber G., Parvy Ph., Rabier D., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **761**, 13—16.
169. Coude F. X., Grinber G., Parvy Ph., Rabier F., Petit F., (1983), *Biochem. J.*, **216**, 233—236.
170. Meijer A. J., van Woerkom G. M., (1979) w: *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport*, red. Quagliariello E., Palmieri F., Papa S., Kingenber M. str. 365—368, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
171. Meijer A. J., van Woerkom G. M., Wanders R. J. A., Lof C., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 325—330.
172. Meijer A. J., van Woerkom G. M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **721**, 240—246.
173. Lusty C. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4270—4278.
174. Meijer A. J., van Woerkom G. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **500**, 13—26.
175. Meijer A. J., van Woerkom G. M., Steinman R., Williamson J. R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3443—3446.
176. Cerdan S., Lusty C. J., Davis K. N., Jacobson J. A., Williamson J. L., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 323—331.
177. Titheradge M. A., Haynes R. C., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 44—45.
178. Hernandez-Sotomayor S. M. T., Garcia-Sáinz J. A., (1984), *FEBS Lett.*, **166**, 385—388.
179. Yamazaki R. K., Graetz G. S., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **178**, 19—25.
180. Triebwasser K. C., Ferndland R. A., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1159—1165.
181. Rabier D., Briand P., Petit F., Parvy Ph., Kamoun P., Cathelineau L., (1982), *Biochem. J.*, **206**, 627—631.
182. Hensgens H. E. S. J., Verhoeven A. J., Meijer A. J., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 197—205.
183. Verhoeven A. J., Hensgens E. S. J., Meijer A. J., Tager J. M., (1982), *FEBS Lett.*, **140**, 270—272.
184. Hamman H. C., Hayens Jr. R. C., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 85—94.
185. Lecey J. M., Bradford N. M., Joseph S. K., McGivan J. D., (1981), *Biochem. J.*, **194**, 29—33.

186. Corvera S., Garcia-Sainz J. A., (1983), *Biochem. J.*, **210**, 957—960.
187. Westerhoff H. V., Chen Y.-D., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **142**, 425—430.
188. Anderson P. M., Casey C. A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 456—462.
189. Elliot K. R. F., Tipton K. F., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 807—816.
190. Elliot K. R. F., Tipton K. F., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 817—825.
191. Saheki T., Kusumi T., Takada S., Katsunuma T., (1975), *FEBS Lett.*, **58**, 314—317.
192. Matsuda Y., Tsugi A., Katunuma N., Hayashi M., Takahashi Y., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 191—195.
193. Berüter J., Colombo J. P., Bahman C., (1978), *Biochem. J.*, **175**, 449—454.

MINIREVIEW

BOGDAN SIELIWANOWICZ *

Struktura i funkcja 3'-końcowych sekwencji eukariotycznego mRNA

Structure and function of 3'-terminal sequences of eucaryotic mRNA

Spis treści

- I. Struktura 3'-niekodującego fragmentu cząsteczek mRNA *Eukaryota*
- II. Udział poli(A) w regulacji stabilności mRNA
- III. Wpływ poli(A) na aktywność translacji
- IV. Rola poli(A)(+)mRNA we wczesnych etapach rozwoju *Eukaryota*
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Structure of 3'-noncoding fragment of eucaryotic mRNA
- II. The participation of the poly(A) in regulation of mRNA stability
- III. The influence of poly(A) on translation activity
- IV. The role of poly(A)(+)mRNA in the early stages of *Eucaryota* development
- V. Concluding remarks

Od ponad dziesięciu lat wiadomo, że cząsteczki mRNA zawierają oprócz sekwencji kodujących, znacznej długości fragmenty nie niosące żadnej informacji genetycznej o strukturze białka. Z reguły są one zgrupowane na 5' i 3' końcach cząsteczki, a ich łączna długość najczęściej porównywalna jest z długością części kodującej. Inicjujący kodon AUG poprzedzony jest zwykle przez 36—50 nukleotydów z których pierwsze trzy, zmetylowane w pierścieniach zasad tworzą tzw. *cap*. Pośród pozostałych 5'-końcowych, niekodujących sekwencji, u większości mRNA eukariontów wyróżnia się krótki oligonukleotyd komplementarny do 3'-końca rRNA mniejszej podjednostki rybosomalnej.

3'-końcowy fragment cząsteczki mRNA, następujący po kodonach terminujących (u eukariontów trójnukleotydy: UAA, UAG lub UGA) jest znacznie bardziej urozmaicony tak pod względem wielkości, jak i występujących tam sekwencji. Dla przykładu w β -globinowym mRNA królika jest zaledwie 89-nukleotydowy (1), podczas gdy w mRNA reduktazy dihydro-

* Dr, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.

folianu u myszy ma długość 950 nukleotydów (2). W tej części cząsteczki występują często homologiczne sekwencje homo- i heteronukleotydowe o bardzo zróżnicowanych długościach.

Pomimo intensywnych badań nad niekodującymi fragmentami mRNA, funkcja ich poznana jest w bardzo różnym stopniu. 5'-końcowy fragment był już w połowie lat siedemdziesiątych jednoznacznie wiązany z inicjacją procesu biosyntezy białka. Dalsze badania sugestią tą potwierdziły i pozwoliły na bliższe sprecyzowanie jego roli w przyłączeniu rybosomu (3, 4). Równie intensywnie badane były fragmenty 3'-końcowe, a szczególnie występowanie i przemiany, najczęściej występujących i najdłuższych odcinków poliadenylowych. Starsze dane literaturowe na ten temat zostały opisane w opracowaniach obcojęzycznych i polskich (5, 6, 7). Jak dotychczas niewiele jest informacji jednoznacznie świadczących o funkcji odcinków poli(A), niektóre hipotezy na ten temat omówione zostały w pracy Litauera (8).

I. Struktura 3'-niekodującego fragmentu cząsteczek mRNA *Eukaryota*

Po ustaleniu pełnej struktury I-rzędowej β -globinowego mRNA królika, potwierdzono anomalie występujące w składzie nukleotydowym niekodujących fragmentów cząsteczki (9). Zawartość G+C w części kodującej wynosiła 54,2%, a w części 5'-końcowej 41,5%, natomiast w części 3'-końcowej zaledwie 38,9%. Najwięcej zmetylowanych zasad stwierdzono na 5'-końcu. Dalsze badania opisane szczegółowo w opracowaniu Gasaryana (10) pozwoliły na stwierdzenie, że w części 3'-końcowej oprócz wykrytych wcześniej odcinków poliadenylowych, występują podobnie zgrupowane nukleotydy urydylowe. Długość odcinków poli(A), wynosi zależnie od organizmu od kilkudziesięciu do blisko trzystu. Oligonukleotydy urydylowe długości od kilkunastu do kilkudziesięciu, zlokalizowane są pomiędzy kodonem terminującym, a zajmującymi pozycję bezpośrednio 3'-końcową odcinkami poli(A). Jednorodność odcinków poli(A) i poli(U) jest porównywalnie wysoka i wynosi ponad 90%.

Badania wykonane w latach osiemdziesiątych wykazały, że przedstawionego powyżej modelu budowy 3'-końca cząsteczki mRNA nie należy generalizować. Stwierdzono, że w komórkach tego samego szczepu może występować mRNA różniący się 3'-końcowymi homonukleotydami. Dla przykładu w polisomach komórek kultury *HeLa* występują aż cztery różne rodzaje mRNA (11):

poli(A)(+)oligo(U)(-) — zawartość 52% całości mRNA

poli(A)(-)oligo(U)(-) — zawartość 33% całości mRNA

poli(A)(+)oligo(U)(+) — zawartość 4% całości mRNA

poli(A)(-)oligo(U)(+) — zawartość 2% całości mRNA

Łatwo zauważyć, że dwie pierwsze frakcje zawierają 85% całości mRNA,

natomiast pozostałe zaledwie około 6%. Proporcje występowania różniących się homonukleotydami mRNA nie są stałe: w zarodkach pszenicy większość mRNA występuje jako poli(A)(-)oligo(U)(+) i poli(A)(+)oligo(U)(-) (12). Wiele uwagi w badaniach zwrócono na informację genetyczną przenoszoną przez różne rodzaje mRNA. Także i tego zagadnienia nie udało się jednoznacznie rozstrzygnąć, jakkolwiek większość autorów prac przychyliła się do poglądu, że różniące się zawartością homonukleotydów mRNA przenoszą jakościowo różną informację (13, 14). Znane są także i inne przykłady: w komórkach kultury *HeLa* histon H 2B syntetyzowany jest na poli(A)(-)mRNA i na poli(A)(+)mRNA (15).

W przedstawionych powyżej badaniach nie można wykluczyć pewnych niedokładności natury metodycznej. Najczęściej stosowaną metodą różnicowania populacji mRNA jest obecnie chromatografia powinowactwa. Metoda ta jakkolwiek wyjątkowo specyficzna stwarza wiele możliwości uzyskania omyłkowych rozdzielów. Istotny jest w tej metodzie chromatograficznej efekt długości odcinka poli(A) na wydajność wiązania zawierającego go mRNA (11). Przy długości poli(A) do 30 nukleotydów wydajność wiązania jest mniejsza od 50%, przy długości 50—60 nukleotydów wzrasta do 60%, a dopiero przy dłuższych odcinkach wynosi powyżej 95%. Zaobserwowano także utratę powinowactwa do nośnika w wyniku powstawania struktur dwuniciowych typu A—U.

Niekodujący 3'-końcowy fragment mRNA eukariontów zawiera często identyczne, krótkie sekwencje heteronukleotydowe. Na ogół, odcinek poli(A) poprzedzany jest dwunukleotydem —GC—, natomiast około 20 nukleotydów przed nim w kierunku 5'-końca występuje oligonukleotyd —AAUAAA—. Komplementarne do tych sekwencje występują zarówno w transkrybowanym DNA jak i w pierwotnym transkrypcie. Biorąc pod uwagę ich położenie w stosunku do sekwencji strukturalnych można uważać, że sześcionukleotyd pełnił rolę terminatora transkrypcji, natomiast dwunukleotyd był znacznikiem miejsca poliadenylacji w czasie dojrzewania transkrypty (10). Nie stwierdzono jak dotychczas, aby sekwencje te odgrywały jakąkolwiek rolę w metabolizmie i funkcjonowaniu mRNA na terenie cytoplazmy.

Występowanie na 3'-końcu cząsteczki mRNA wzajemnie komplementarnych odcinków homonukleotydowych predestynuje ten fragment do tworzenia struktur II-rzędowych. Najczęściej proponowaną jest tzw. struktura *szpilki do włosów* (1, 16, 17, 18). Fakty te zostały wykorzystane w hipotezie o udziale struktur drugorzędowych w regulacji aktywności translacyjnej mRNA (3). Zakłada ona wytworzenie komplementarnych połączeń pomiędzy odcinkami poli(A) i niskocząsteczkowym, bogatym w reszty urydylowe RNA. Kompleks taki ze względów strukturalnych nie jest zdolny do łączenia się z rybosomami. Przyłączenie do poli(A) specyficznego białka chroni mRNA przed wytworzeniem nieaktywnej struktury, umożliwiając tym samym jego udział w tworzeniu polisomów. Hipoteza ta w nie-

znacznie zmodyfikowanej formie jest aktualna i obecnie. Potwierdzono, że w rybonukleoproteinach zawierających mRNA występuje niskocząsteczkowy RNA o długości 70—90 nukleotydów, połączony z białkami o masie 20—70 kDa (19, 20). Ostatnio wykazano występowanie podobnych kompleksów w rybonukleoproteinach zawierających poli(A)(+)mRNA (21). Niskocząsteczkowy RNA (tzw. iRNA) połączony jest z białkiem o masie 64 kDa, a cały kompleks hamuje szczególnie intensywnie translację poli(A)(+)mRNA.

II. Udział poli(A) w regulacji stabilności mRNA

Regulacja czasu trwania mRNA w cytoplazmie komórki była najwcześniej przypisywaną poli(A) funkcją. Klasyczne już dzisiaj doświadczenia nad potwierdzeniem tej hipotezy, są wielokrotnie cytowane w opracowaniach monograficznych dotyczących tego zagadnienia (5, 6, 8). Do oocytów jeżowca morskiego wprowadzano mikroiniekcyjnie mRNA globiny różniący się długością odcinków poli(A). Stwierdzono, że ulega on translacji tylko wtedy, gdy długość poli(A) jest nie mniejsza niż 30 nukleotydów. Graniczną jest długość 20-tu nukleotydów poniżej której obserwuje się gwałtowny rozpad polisomów, powodowany jak przypuszczano degradacją mRNA. Do podobnych wniosków o funkcji odcinków poli(A) doszli Z e e w i i w s p., badając czas trwania adenowirusa w komórkach traktowanych kordycepiną — inhibitorem procesu poliadenylacji (22, 23). Wykazano, że czas trwania występującego w polisomach tych komórek poli(A)(-)mRNA jest zdecydowanie krótszy, od czasu trwania natywnego poli(A)(+)mRNA. Nie stwierdzono natomiast żadnych różnic w produktach translacji charakterystycznych dla wirusowego RNA. Badania nad interferonowym (24) i α -globinowym mRNA (25) w oocytach jeżowca morskiego, oraz badania translacji kilkudziesięciu rodzajów mRNA *Dictyostelium* różniących się długością poli(A) (26, 27), dostarczyły danych pozwalających na zakwestionowanie poglądu o zależności pomiędzy długością poli(A) i trwałością mRNA. Przytoczone w tych pracach fakty nie przeczą natomiast, że przy pewnej długości poli(A) w mRNA następuje gwałtowny rozpad polisomów. Nowo syntetyzowany mRNA wchodzący w skład polisomów *Dictyostelium* zawiera odcinki poli(A) długości 110—115 nukleotydów. W czasie kolejnych translacji zostają one skrócone do 60—65 nukleotydów, jednak bez żadnej zmiany aktywności i wielkości polisomów. Dopiero przy długości poli(A) 25—30 nukleotydów aktywność i wielkość polisomów maleje, jakkolwiek nie jest to wynikiem degradacji mRNA.

Przedstawione powyżej dane doświadczalne wskazują, że przy skróceniu odcinków poli(A) w mRNA do długości około 20 nukleotydów następuje gwałtowny rozpad polisomów. Wątpliwym jest natomiast wcześ-

niejszy pogląd, że równocześnie następuje degradacja mRNA. Indukowana długością odcinków poli(A) destabilizacja struktury polisomów może być związana jedynie z taką zmianą struktury II-rzędowej mRNA, która umożliwia oddziaływanie z rybosomami.

Omawiając wpływ odcinków poli(A) na stabilność mRNA w polisomach nie można pominąć ich udziału w przyłączeniu specyficznych białek. Pierwsze doniesienia na ten temat pojawiły się jeszcze w połowie lat siedemdziesiątych (28) i rozwinięte zostały w latach późniejszych badaniami postulującymi udział tych białek w stabilizacji przestrzennej struktury mRNA (17, 18). W roku 1978 Preobrazensky i Spirin badając polisomalne rybonukleoproteiny zawierające mRNA stwierdzili, że występujące w nich białka należą pod względem masy cząsteczkowej do dwóch klas: 43—52 kDa tzw. „core” i 72—78 kDa specyficznie oddziaływujących z poli(A) (29). W odróżnieniu od białek „core”, dysocjujących z polisomów w obniżonej mocy jonowej roztworu, białka oddziaływujące z poli(A) otrzymać można tylko przez wyczerpujące trawienie polisomów mieszaniną rybonukleaz A i T₁. Porównując wielkość tych białek z długością odcinka poli(A) stwierdzono, że może on przyłączyć 4—5 cząsteczek białek. Bardziej dokładnie strukturę takich połączeń zbadano w ostatnich latach (30). W polisomach wątroby szczura odcinki poli(A) długości 136 nukleotydów obudowane są białkami o masach od 50 do 90 kDa. Łączna ich masa wynosi około 190 kDa i stanowi 80% masy cząsteczkowej całej rybonukleoproteiny. Prawdopodobnie tylko białko o masie cząsteczkowej 76 kDa oddziałuje bezpośrednio z poli(A), natomiast kontakt pozostałych białek z kwasem nukleinowym jest pośredni. Badania nad kinetyką działania rybonukleaz pozwoliły na stwierdzenie, że ponad połowa długości łańcucha poli(A) ułożona jest na powierzchni cząsteczki, która stabilizowana głównie oddziaływaniami hydrofobowymi nie wykazuje dużej zwartości. Hipoteza o takiej budowie rybonukleoprotein zawierających odcinek poli(A) potwierdzona została badaniami wykonanymi w laboratorium Scherera (31, 32, 33) nad polisomami kaczki, myszy i królika. Wykazano, że białka przyłączone do poli(A) w mRNA badanych zwierząt posiadają zbliżone właściwości fizyczne i chemiczne. Konserwatywność międzygatunkowa budowy tych białek, podobna białkom rybosomalnym i histonom, może sugerować, że pełnią one równie ważną funkcję strukturalną. Badania porównawcze nad rybonukleoproteinami zawierającymi mRNA globiny wykazały, że białko wykazujące powinowactwo do poli(A) o masie 73 kDa, występuje wyłącznie w polisomach. Nie stwierdzono jego obecności w innych cytoplazmatycznych rybonukleoproteinach zawierających mRNA przenoszący tę samą informację genetyczną. Wskazuje to, że ten sam mRNA może występować w połączeniach z jakościowo różnym zestawem białek, w zależności od stanu funkcjonalnego. Działanie rybonukleaz na pozapolisomalne rybonukleoproteiny wskazuje, że białka występujące w ich składzie mogą skutecznie chronić mRNA przed degradacją. Można także

przypuszczać, że funkcja białek przyłączonych do poli(A) w polisomach nie jest czysto strukturalną, ale może wpływać na aktywność translacji. Hipoteza ta zostanie szczegółowiej przedyskutowana w dalszej części artykułu.

Pomimo intensywnych badań nie udało się dotychczas wykazać aktywności enzymatycznej żadnego z białek oddziaływujących z poli(A). Pojawiło się jedynie pojedyncze doniesienie o zgodności antygenowej takiego białka z poli(A)-polimerazą (34).

Jak dotychczas nie wykryto specyficznych nukleaz mogących przeprowadzać w sposób ściśle kontrolowany degradacji odcinków poli(A) na terenie cytoplazmy. Opracowania na temat rybonukleaz biorących udział w metabolizmie mRNA opisują przede wszystkim jądrowe enzymy dojrzewania transkryptu (35, 36). Są to: endorybonukleaza IV (E.C.3.1.26.6) i endorybonukleaza V (E.C.3.1.27.8). Ze względu na specyficzność substratową i wymagania dotyczące struktury II-rzędowej substratu, najbardziej interesująca jest endorybonukleaza V. Enzym ten wykazuje specyficzność w stosunku do struktur jedno i dwuniciowych i jak wykazały badania *in vitro*, może hydrolizować odcinki poli(A) w cząsteczkach mRNA. Nie udało się jednak stwierdzić występowania tego enzymu w cytoplazmie i potwierdzić jego aktywności w stosunku do mRNA w warunkach *in vivo*. W roku 1978 Abraham i Jacob zasugerowali, że polimeraza poliadenylująca w zależności od poziomu ATP może działać także jako rybonukleaza specyficzna w stosunku do poli(A) (37). Ze względu na liczne doniesienia literaturowe o cytoplazmatycznym występowaniu polimeraz poli(A) (38) hipoteza jest niezwykle atrakcyjna, ale niestety jak dotychczas nie potwierdzona dalszymi badaniami.

III. Wpływ poli(A) na aktywność translacji

Bezpośredni wpływ odcinków poliadenylowych mRNA na aktywność biosyntezy białka, był jedną z najwcześniejszych przedstawionych hipotez na temat ich roli (39, 40, 41, 42). Wnioski płynące z tych badań przypuszczenia takiego nie potwierdziły. Usunięcie z mRNA odcinka poli(A), jego modyfikacje i blokowanie pozostawały bez wyraźnego wpływu na aktywność translacji w układach *in vitro*. Należy jednak odnotować, że niemal równolegle pojawiły się doniesienia przeciwne. Badając efektywność translacji poli(A)(+) i poli(A)(-)mRNA owoalbuminy stwierdzono, że układ biosyntezy białka *in vitro* z retikulocytów królika wykorzystuje poliadenylowany mRNA znacznie efektywniej (43). Podobnych danych o wpływie poli(A) na wydajność procesu biosyntezy białka dostarczyły cytowane już badania nad translacją α -globinowego mRNA w oocytach jeżowca morskigo (25). Jeszcze bardziej przekonujących faktów wskazujących na ułatwioną translację poli(A)(+)mRNA dostarczyły prace Palatnika

i w sp. (27) oraz Jacobsona i w sp. (44). Przebadano wpływ dodawanego egzogennie kwasu poliadenylowego na translację mRNA *Dictyostelium* w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika. Hamował on intensywnie, zarówno translację poli(A)(+)mRNA jak i jego rybonukleoprotein. Tak wyraźnego efektu nie powodowały inne homopolinukleotydy dodawane nawet w znacznie większych ilościach. Poziom hamowania uzależniony był od wyjściowej aktywności układu i długości dodawanego kwasu poliadenylowego. Minimalną długością przy której występował już efekt hamowania było 30 nukleotydów. Pomimo znacznie obniżonej wydajności translacji, jej produkt pozostawał niezmieniony. Obserwowano także zmniejszenie wielkości polisomów, ale nie stwierdzono zwiększonej od normalnej degradacji mRNA.

Przytoczonych powyżej faktów nie należy interpretować bezpośrednim wpływem odcinków poli(A) na aparat translacyjny komórki. Bardziej wiarygodny jest ich wpływ na strukturę II-rzędową cząsteczki mRNA. Przyłączenie specyficznego białka do odcinka poli(A) mogłoby nadać i wystabilizować strukturę mRNA, najbardziej odpowiednią dla współdziałania z rybosomami i faktoraми procesu biosyntezy białka. Odłączenie białka, na przykład przez działający współzawodniczo z poli(A)(+)mRNA kwas poliadenylowy mogłoby powodować zmianę struktury II-rzędowej mRNA i mniej wydajny przebieg translacji. Hipoteza ta pozostaje w zgodzie z faktami doświadczałnymi wskazującymi, że występowanie poli(A) w mRNA nie jest warunkiem koniecznym dla jego aktywności tak w układzie *in vitro* jak i *in vivo*. Wskazuje jedynie, że odcinki poli(A) mogą uczestniczyć pośrednio w modulacji aktywności translacyjnej cząsteczek mRNA u eukariontów. Bardziej szczegółowe dane o roli struktury II-rzędowej w cząsteczkach mRNA eukariontów przedstawione zostały w opracowaniu monograficznym (45).

IV. Rola poli(A)(+)mRNA we wczesnych etapach rozwoju Eukaryota

W latach siedemdziesiątych udowodniono, że wczesne etapy rozwoju zarodkowego wielu organizmów zwierzęcych i roślinnych mogą w znacznym stopniu być regulowane potranskrypcyjnie na terenie cytoplazmy. Związane z tym procesem występowanie nieaktywnych, cytoplazmatycznych form mRNA zostało wyczerpująco omówione wcześniej w *Postęпах Biochemii* (46). Niektóre cytowane już prace (25, 26, 27) wskazują na ściśle powiązanie procesów uaktywnienia translacyjnego mRNA i jego poliadenylacji. Potwierdzają to także bardziej bezpośrednie obserwacje.

Podczas wczesnych okresów rozwojowych oocytów jeżowca morskiego intensywnej translacji nagromadzonego tam mRNA towarzyszy jego poliadenylacja (47). Proces starzenia tego mRNA, polegający na skracaniu odcinków poli(A) jest znacznie dłuższy w porównaniu z nowosyntetyzowa-

nym poli(A)(+)mRNA (48). Ostatnio ustalono, że zarodki jeżowca morskigo do stadium 64 blastomerów (uruchomienie transkrypcji) korzystają wyłącznie z informacji genetycznej przechowywanej w cytoplazmatycznym mRNA. Jego poliadenylacja osiąga maksymalne natężenie jeszcze w stadium 8 blastomerów (49).

Podobne badania prowadzone są także na zarodkach nasion wielu gatunków roślin. Dawniejsze prace na ten temat zostały omówione wnikliwie w jednej z monografii P. T. Biochemicznego (50). Podobnie jak i w rozwoju zarodków zwierzęcych, w czasie kiełkowania nasion niektórych roślin (groch, bawełna) biosynteza białka w czasie pierwszych kilku, a nawet kilkudziesięciu godzin kiełkowania warunkowana jest wyłącznie informacją genetyczną przechowywaną w mRNA. W nasionach innych roślin (pszenica, kukurydza) podczas kiełkowania, równoległe z uruchomieniem biosyntezy białka uruchamiana jest także synteza mRNA. Nie neguje się jednak, że i w nasionach tych roślin, część uruchomionej w czasie kiełkowania informacji genetycznej przechowywana była w mRNA, nagromadzonym na terenie cytoplazmy podczas różnicowania zarodka. Wiele faktów doświadczalnych wskazuje także, że uaktywnienie mRNA nasion spoczynkowych połączone jest z jego poliadenylacją (51, 52, 53, 54, 55). Wydajność procesu biosyntezy białka u roślin, podczas wychodzenia ich ze stanu spoczynku jest ściśle skorelowana z ilością poli(A)(+)mRNA w cytoplazmie komórek (56, 57, 58). Zahamowanie procesu poliadenylacji w czasie kiełkowania nasion, powoduje drastyczne zmniejszenie aktywności biosyntezy białka (59). Mechanizmy łączące procesy poliadenylacji mRNA i uruchomienie biosyntezy białka w czasie wychodzenia nasion ze stanu spoczynku, nie zostały dotychczas poznane. Prawdopodobna wydaje się hipoteza, że poliadenylacja mRNA nasion spoczynkowych indukuje takie zmiany w składzie białek zawierających go rybonukleoprotein, które umożliwiają im udział w tworzeniu polisomów (60).

V. Uwagi końcowe

Podstawowe mechanizmy regulujące ekspresję informacji genetycznej u eukariontów działają w jądrze, na poziomie transkrypcji, oraz cięcia i składania transkryptu. Tylko niewielka część przetranskrybowanych sekwencji odnajdywana jest w dojrzałym mRNA na terenie cytoplazmy. Każda cząsteczka dojrzałego mRNA przenosi nie tylko pełną informację strukturalną o białku, lecz także pewien zasób informacji o czasie aktywności translacyjnej.

Zaprezentowane w artykule dane wskazują na udział odcinków poliadenylowych w zabezpieczeniu i regulacji aktywności translacyjnej cząsteczek mRNA. Wydaje się być dostatecznie potwierdzone, że obydwie postulowane funkcje polegają na przyłączeniu specyficznych białek.

Hipoteza o chroniącej przed działaniem rybonukleaz funkcji odcinków poli(A) i przyłączonych białek, jest na obecnym etapie badań najlepiej poparta faktami doświadczalnymi. Wymaga jednak dodatkowych danych, przede wszystkim o cytoplazmatycznych nukleazach mogących w sposób kontrolowany przeprowadzać degradację 3'-końcowego fragmentu cząsteczki mRNA.

Prawdopodobną, co więcej nie wykluczającą funkcji ochronnej, jest hipoteza o wpływie połączonych z odcinkami poli(A) białek na strukturę II-rzędową mRNA, a za jej pośrednictwem na wydajność translacji. Trafność tej hipotezy wydają się potwierdzać przytoczone wcześniej fakty doświadczalne o roli poli(A)(+)mRNA we wczesnych etapach rozwoju zarodków *Eukaryota*. Poliadenylacja nagromadzonego w rybonukleoproteinach cytoplazmy mRNA, może być traktowana jako czynnik powodujący zmiany strukturalne umożliwiające translację. Pełniejsza weryfikacja tej hipotezy wymaga większej ilości danych o białkach przyłączonych do poli(A), oraz bliższego poznania powiązań strukturalno-funkcjonalnych w mRNA.

Zaakceptowano do druku 15 września, 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Proudfoot N. J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **107**, 491—525.
2. Nunberg J. H., Kaufman R. J., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Schimke R. T., (1980), *Cell*, **19**, 355—364.
3. Grankowski N., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 3—28.
4. Hunt T., (1980), *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 178—182.
5. Brawerman G., (1976), *Progress Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **17**, 117—148.
6. Brawerman G., (1981), *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **10**, 1—38.
7. Brysch B., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 459—479.
8. Littauer U. Z., Soreq H., (1982), *Progress Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **27**, 53—83.
9. Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maniatis T., (1977), *Cell*, **10**, 571—585.
10. Gasaryan K. G., Tarantul V. Z., (1979), *Usp. Sovr. Biol.*, **88**, 3—17.
11. Molloy C. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10375—10381.
12. Tomaszewski M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **698**, 35—39.
13. Moffet A. B., Doyle P., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **652**, 177—192.
14. Katianakis P. K., Burdon R. H., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **653**, 27—38.
15. Borun T. N., Aijro K., Zweidler A., Dolby T. N., Stephens R. E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 173—180.
16. Cheng C. C., Brownlee G. G., Carey N. M., Doel M. T., Gillam S., Smith M., (1976), *J. Mol. Biol.*, **107**, 527—547.
17. Kish V. M., Pederson T., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1426—1430.
18. Kish V. M., Pederson T., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5888—5896.
19. Bay J., Hubley M., Sells B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7055—7058.

20. Schmid H. P., Skshyat O., Desa C. M., Duoion F., Koohler K., Scherrer K., (1984), *EMBO J.*, **3**, 29—34.
21. Piot E., Backhovens H., Slegers H., (1984), *FEBS Lett.*, **175**, 16—20.
22. Zeevi M., Nevin J. R., Darnel J. E., (1981), *Cell*, **26**, 39—46.
23. Zeevi M., Nevin J. R., Darnel J. E., (1982), *Mol. Cell Biol.*, **2**, 517—525.
24. Sehgal P. B., Soreq H., Tamm J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5030—5033.
25. Desphande A. K., Chatterjee B., Roy A. K., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8937—8942.
26. Palatnik C. M., Stort R. V., Capone A. K., Jacobson A., (1980), *J. Mol. Biol.*, **141**, 99—118.
27. Palatnik C. M., Wilkins C., Jacobson A., (1984), *Cell*, **36**, 1017—1025.
28. Blobel G., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 924—928.
29. Preobrazensky A. D., Spirin A., (1978), *Progress Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **21**, 1—38.
30. Tomcsanyj T., Komaromy L., Tigyi A., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **114**, 421—428.
31. Standart N., Vincent A., Scherrer K., (1981), *FEBS Lett.*, **135**, 56—60.
32. Vincent A., Goldenberg S., Scherrer K., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **114**, 179—193.
33. Goldenberg S., Scherrer K., (1981), *FEBS Lett.*, **133**, 213—216.
34. Rose K. M., Jacob S., Kumar A., (1979), *Nature*, **279**, 260—263.
35. Blehman T. J., (1983), *Usp. Sovr. Biol.*, **95**, 181—193.
36. Bachman M., Schroder H. C., Messer R., Muller W. E. G., (1984), *FEBS Lett.*, **171**, 25—30.
37. Abraham A. K., Jacob S. T., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2085—2087.
38. Sieliwanowicz B., (1978), *Acta Biochim. Polon.*, **25**, 239—245.
39. Williamson R., Crossley J., Humphrees S., (1974), *Biochemistry*, **13**, 703—707.
40. Soreq H., Nudel U., Salmon R., Revel M., Littauer U. Z., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 233—245.
41. Spector D. H., Villa-Komaroff L., Baltimore D., (1975), *Cell*, **6**, 41—44.
42. Munoz R. F., Darnell J. E., (1974), *Cell*, **2**, 274—252.
43. Doel M. T., Carey N. H., (1976), *Cell*, **8**, 51—58.
44. Jacobson A., Favreau M., (1983), *Nucl. Acid Res.*, **11**, 6353—6368.
45. Vary C. P. H., Vournakis J. N., (1982), *Biochem. Soc. Symp.*, **47**, 61—78.
46. Jachymczyk W., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 119—147.
47. Colot H. V., Rosbash M., (1982), *Develop. Biol.*, **94**, 79—86.
48. Rosenthal E. T., Tansey T. R., Ruderman J. V., (1983), *J. Mol. Biol.*, **166**, 309—327.
49. Prokopenko J. V., Sova V. V., (1984), *FEBS Lett.*, **168**, 161—166.
50. Wasilewska L. D., (1978), Regulacja syntezy RNA w tkankach roślinnych, Monografie Biochemiczne Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Nr 31, str 1—64, PWN, red. W. Ardel.
51. Harris B., Dure III L., (1976), *Progress Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **19**, 113—118.

52. Sieliwanowicz B., Kalinowska M., Chmielewska I., (1977), *Acta Biochim. Polon.*, **24**, 59—64.
53. Martin C., Northcote D. H., (1981), *Planta*, **151**, 189—197.
54. Morton H., Evans J. M., Gatehouse J. A., Boulter D., (1983), *Phytochemistry*, **22**, 807—812.
55. Oliver M. Y., Bewley J. D., (1984), *Plant Physiol.*, **74**, 21—25.
56. Oliver M. Y., Bewley J. D., (1984), *Plant Physiol.*, **74**, 917—922.
57. Oliver M. Y., Bewley J. D., (1984), *Plant Physiol.*, **74**, 923—927.
58. Sieliwanowicz B., (1980), *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol. cl. II*, **28**, 209—214.
59. Lakhani S., Thiru A. N., Sachar R. C., (1983), *Phytochemistry*, **22**, 1561—1567.
60. Sieliwanowicz B., (1984), 16-th Meeting of the FEBS, Abstracts, X-031, str. 277.

- 22. The Government of India, in exercise of the powers conferred by sub-section (1) of section 10 of the Act, hereby directs that the following persons shall be deemed to be persons who have been appointed to the office of the Secretary to Government, and shall be entitled to the benefits of the Act, as if they had been appointed to that office by the Government of India:
- 23. Mr. J. B. ...
- 24. Mr. ...
- 25. Mr. ...
- 26. Mr. ...
- 27. Mr. ...
- 28. Mr. ...
- 29. Mr. ...
- 30. Mr. ...

ARTYKUŁY

EGBERT PIASECKI *

Struktura interferonów

Structure of interferons

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Interferony ludzkie
 - II-1. Geny ludzkich interferonów
 - II-1.1. Geny *HuIFN- α*
 - II-1.2. Geny *HuIFN- β*
 - II-1.3. Gen *HuIFN- γ*
 - II-2. Struktura pierwszorzędowa ludzkich interferonów
 - II-3. Struktura drugorzędowa i trzeciorzędowa ludzkich interferonów
- III. Interferony zwierzęce
 - III-1. Interferony mysie
 - III-2. Inne interferony zwierzęce
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Human interferons
 - II-1. Human interferons genes
 - II-1.1. *HuIFN- α* genes
 - II-1.2. *HuIFN- β* genes
 - II-1.3. *HuIFN- γ* gene
 - II-2. Primary structure of human interferons
 - II-3. Secondary and tertiary structure of human interferons
- III. Animal interferons
 - III-1. Murine interferons
 - III-2. Other animal interferons
- IV. Concluding remarks

Wykaz skrótów: IFN — interferon; HuIFN — interferon ludzki; MuIFN — interferon mysie; RaIFN — interferon szczurzy; BoIFN — interferon bydłący.

* Mgr, Laboratorium Wirusologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław.

I. Wprowadzenie

Minęło ponad ćwierć wieku od opublikowania przez A. Isaacs a i J. Lindenmanna pracy, w której donieśli o odkryciu substancji hamującej namnażanie się wirusów. Substancję tę nazwali interferonem (1).

W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych ustalono, że komórki kręgowców wielu gatunków mogą produkować interferony po indukcji wirusami. Najwięcej danych uzyskano badając komórki ludzkie i mysie. Stwierdzono, iż interferony nie niszczą wirusów, ale uodparniają na nie komórki. Wykazano, że interferony są białkami o masie cząsteczkowej 15 000—70 000. Na podstawie wrażliwości na czynniki redukujące wykazano obecność w ich cząsteczkach mostków dwusiarczkowych. Reoksydacja przywracała interferonom aktywność biologiczną, co pozwalało sądzić, że składają się one z jednego łańcucha polipeptydowego. W niektórych preparatach interferonu stwierdzono obecność cukrów. Oczyszczanie i charakterystyka interferonów przy pomocy takich metod jak elektroforeza żelowa, różne typy chromatografii, ogniskowanie izoelektryczne wykazały heterogenność wielu preparatów interferonów (2, 3).

Przez wiele lat uważano, że charakterystyczną cechą interferonów jest ich stabilność w pH 2. Zakwaszanie preparatów było wygodną procedurą niszczącą wirus użyty do indukcji.

Stwierdzono, że leukocyty i fibroblasty po indukcji wirusem produkują interferony. Wykazano, iż interferony produkowane przez te komórki są antygenowo odrębne. Nazywano je interferonem leukocytarnym, czyli LeIF lub IFL, i fibroblastycznym, czyli FiIF lub IFF (2, 3).

W 1965 r. (4) wykryto, że leukocyty traktowane mitogenami lub antygenami produkują substancję o właściwościach interferonu, ale niestabilną w pH 2. Substancję tę nazywano interferonem immunologicznym (*immune IF*, *IFI*, a także: *antigen-induced*, *mitogen-induced*, *T-cell interferon*). Ze względu na znaczne różnice właściwości tego interferonu i interferonów kwasostabilnych (tzn. leukocytarnego i fibroblastycznego) w 1973 r. zaproponowano oznaczenia: interferon typu I i typu II (5). Typ I obejmował interferony kwasostabilne (pH 2 stable), zaś typ II kwasolabilny interferon immunologiczny (pH 2 labile).

W 1980 r. badacze zajmujący się interferonami powołali Komitet Nomenklaturowy w celu ujednoczenia nazewnictwa interferonów. Wskazania tego komitetu obowiązują obecnie (6). Zgodnie z ustaleniami interferon określa się jako „białko wykazujące niespecyficzną aktywność przeciw-wirusową poprzez oddziaływanie na procesy metabolizmu komórkowego, w tym na syntezę RNA i białka, co najmniej w homologicznych komórkach”. Jako skrót nazwy interferon przyjęto IFN zamiast uprzednio używanego IF aby uniknąć mylenia go z innymi substancjami oznaczanymi literami IF. Wprowadzono symbole IFN- α , IFN- β i IFN- γ na oznaczenie róż-

niących się immunologicznie typów interferonów. IFN- α odpowiada interferonowi leukocytarnemu, IFN- β — fibroblastycznemu, zaś IFN- γ — immunologicznemu. Interferony α i β są kwasostabilne, IFN- γ — kwasolabilny. Jeżeli zostaną odkryte interferony nie dające się zakwalifikować do żadnego ze znanych typów (α , β lub γ), to należy je oznaczać IFN- δ , ϵ ... itd. Podtypami IFN nazwano białka zaliczane do danego typu ale różniące się sekwencją aminokwasów, a więc kodowane przez różne geny. Podtypy oznacza się kolejnymi liczbami np. IFN- α_1 , IFN- β_2 . Dany typ IFN może więc być jednorodny (obejmować 1 podtyp), ale najczęściej stanowi rodzinę pokrewnych białek. Organizm, z którego pochodzi interferon określa się przez dodanie symbolu literowego np. IFN ludzki — HuIFN, myszy — MuIFN, bydłęcy — BoIFN, itd. Tak więc symbol HuIFN- α_2 oznacza drugi podtyp ludzkiego interferonu α .

Nie wszyscy badacze jednak dostosowali się do postanowień Komitetu Nomenklaturowego. Spowodowało to obecną niejednorodność nazewnictwa, głównie w odniesieniu do podtypów IFN- α . W tabeli 1 zestawiono symbole stosowane do oznaczania tych interferonów przez różnych autorów. Szczególnie niefortunne jest oznaczanie frakcji chromatograficznych HuIFN- α literami alfabetu greckiego.

Tabela 1

Porównanie różnych systemów mianownictwa interferonów na przykładzie czterech podtypów HuIFN- α

Podtypy			Fracje chromatograficzne (12-14)
(7-9)	(10-11)	(12-13)	
IFN- α_1	LeIF-D	IFLrD	IFL γ_3
IFN- α_2	LeIF-A	IFLrA	IFL $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$
IFN- α_3	LeIF-F	IFLrF	—
IFN- α_8	LeIF-B	IFLrB	IFL β_3

W nawiasach podano piśmiennictwo.

W 1980 r. podano pełne sekwencje aminokwasowe ludzkich interferonów α_1 (7), α_2 (9, 10) i β_1 (15, 16) oraz sekwencje nukleotydowe odpowiednich genów. W następnym roku poznano sekwencje dalszych interferonów typu α (11, 12). W 1982 r. opublikowano sekwencję nukleotydową ludzkiego genu kodującego IFN- γ oraz określono sekwencję aminokwasową tego białka (17, 18). Obecnie znane są sekwencje aminokwasowe kilkunastu ludzkich interferonów oraz sekwencje nukleotydowe genów je kodujących. Ten szybki postęp jest wynikiem zaangażowania wielu badaczy i przeznaczenia ogromnych środków na wyodrębnienie genów interferonów, wprowadzenie ich do komórek biorców i uzyskanie klonów produkujących duże ilości ludzkiego IFN (7, 9—12, 15—23). Geny ludzkiego IFN wprowa-

dzono do komórek bakterii *Escherichia coli* (7, 9, 10, 17, 19—23) i *Methylophilus methylotrophus* (19), drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (24), a także do komórek małych COS-7 (17).

W latach 1980—1982 uzyskano monoklonalne przeciwciała przeciwko interferonom α (13, 25, 26), β (27, 28) i γ (29, 30), w tym także przeciwciała reagujące selektywnie z białkami różnych podtypów ludzkiego IFN- α (13).

Interferony wywierają bardzo zróżnicowany wpływ na komórki. Oprócz zahamowania namnażania się wirusów (efekt przeciwwirusowy) hamują także wzrost i podziały komórek (efekt antyproliferacyjny), modyfikują reakcje immunologiczne, wywołują zmiany w błonie komórkowej. Ze względu na różnorodność funkcji spełnianych przez interferony ustalenie ich miejsca wśród innych białek w organizmie napotkało na trudności. Usuwa je ostatnio przedstawiona przez Inglo t (31, 32) oryginalna koncepcja dotycząca mechanizmu działania interferonów. Według niej są one „nieklasycznymi” hormonami, tj. czynnikami tkankowymi stanowiącymi integralną część systemu hormonalnego. Interferony działają jako substancje antagonistyczne wobec czynników wzrostu. Główną ich funkcją jest udział w procesach regulacji wzrostu i różnicowania komórek.

Pomiędzy interferonami kwasostabilnymi (α i β), a IFN- γ istnieje synergizm działania zarówno w odniesieniu do aktywności przeciwwirusowej, jak i antyproliferacyjnej. Zjawisko to wykryto w przypadku komórek ludzkich i mysich. I tak np. po zmieszaniu 26 jednostek MuIFN- β i 3 jednostek MuIFN- γ uzyskuje się nie 29 jedn., ale aż 320, tzn. 11 razy więcej niż to wynika z prostego sumowania (33—35).

W 1959 r. Tyrrell (36) otrzymał interferon z komórek nerki cielęcej, które zakażono wirusem grypy. Interferon ten nie był aktywny w komórkach kurzych, w których Isaacs i Lindenmann dwa lata wcześniej odkryli obecność interferonu (1). Kurzy IFN zaś nie był aktywny w komórkach bydlęcych. Dało to podstawę koncepcji, w myśl której IFN otrzymany z komórek danego gatunku nie jest aktywny w komórkach innych gatunków. Okazało się jednak, że w wielu przypadkach preparaty IFN są aktywne w układach heterologicznych. Obecnie wiadomo, że aktywność IFN w komórkach niehomologicznych może być różna, zależna wyłącznie od rodzaju interferonu i komórek. Wskazuje to na istnienie różnic w budowie interferonów z komórek zwierząt różnych gatunków (pokrewieństwo filogenetyczne nie odgrywa tutaj decydującej roli). Często IFN jest bardziej aktywny w komórkach heterologicznych; np. ludzki IFN- α jest bardziej aktywny w komórkach bydlęcych niż w komórkach ludzkich i małych. Zdarza się, że aktywności międzygatunkowe są jednostronne np. IFN bydlęcy wykazuje niewielką aktywność w komórkach ludzkich (2).

Najbardziej specyficznym gatunkowo jest IFN- γ ; tylko w wyjątkowych wypadkach jest on aktywny w układach heterologicznych. IFN- β , chociaż

wykazuje aktywność w układach heterologicznych, to jego miano jest zwykle dużo niższe niż w komórkach homologicznych. Natomiast IFN- α jest aktywny w wielu układach heterologicznych. Ludzki IFN- α działa przeciwwirusowo nie tylko w komórkach zwierzęcych. W 1982 r. doniesiono, że jest on zdolny zahamować namnażanie się wirusa mozaiki tytoniowej (TMV) w komórkach liścia tytoniu — *Nicotiana sp.* (37).

II. Interferony ludzkie

Najlepiej poznanymi interferonami są interferony ludzkie. Obecnie wiadomo już wiele o budowie cząsteczek tych białek oraz o genach je kodujących (tabela 2).

Tabela 2

Ludzkie interferony (wg 38)

Typ IFN	mRNA	Podtyp (gen)	Lokalizacja chromosomalna genów	Obecność intronów w genie	Liczba aminokwasów w cząsteczce IFN (11, 15—18)	Liczba wiązań dwusiarczkowych (20)	Liczba miejsc N-glikozylacji (14, 39, 40)
α	α_s (0,8—1,4 kb)	α_1 — αD α_2 — αA α_3 — αF $\alpha_{4a,4b}$ — αE α_5 — αG α_6 — $\alpha H, H_1$ α_7 — αI α_8 — αB $\psi\alpha_9$ $\psi\alpha_{10}$ — αC $\psi\alpha_{11}$ $\psi\alpha_{12}$	9	—	166*	2	0**
	α_1 (1,6—3,5 kb)						
β	β_1 (0,9 kb)	β_1	9	+	166	1	1
	β_2 (1,3 kb)	β_2	5				
	β_3 (1,8 kb)		2				
	β_4 (0,65 kb)						
	β_5 (0,9 kb)		2				
γ	γ (1,8 kb)	γ	12	+	146	0	2

* — z wyjątkiem α_2 , który ma 165 aminokwasów.** — z wyjątkiem α_6 , który ma 1 miejsce N-glikozylacji.

II-1. Geny ludzkich interferonów

II-1.1. Geny *HuIFN- α*

Znane są dwie grupy genów kodujących ludzkie interferony α . Geny z grupy α_s kodują interferony α_s . mRNA tych genów ma 0,8—1,4 kb. Większość wykrytych genów kodujących IFN- α należy do tej grupy. Wyizolowane geny α_s były użyte jako sondy hybrydyzacyjne. Sekwencje DNA, które hybrydowały z takimi sondami, kodowały wyłącznie interferony z grupy α_s .

Ponadto wyizolowano frakcję mRNA o długości 1,6—3,5 kb niehybrydującą z powyższymi sekwencjami DNA a sterującą syntezą innego IFN- α — IFN- α_L . Interferony tej grupy są kodowane przez geny α_L . Indukcja interferonów α_s i α_L jest regulowana niezależnie. Surowice anty-IFN- α_s neutralizują jednakże interferony obu tych grup. Jak dotychczas tylko geny zaliczane do grupy α_s zostały sklonowane i scharakteryzowane (38, 41).

Wykryto ponadto trzy frakcje mRNA o długości 2,0—2,7, 3,5—4,5 oraz 7,0—8,0 kb sterujące syntezą interferonów α . mRNA tych trzech frakcji hybryduje z genem *HuIFN- α_1* . Są to więc prawdopodobnie transkrypty genów α_s (43).

W genomie ludzkim dotychczas zidentyfikowano około 20 różnych genów i pseudogenów *HuIFN- α* (7, 11, 14). Genom tym i ich produktom nadawano oznaczenia według różnych systemów, co jest uwidocznione w tabeli 2. Część badaczy, zgodnie z ustaleniami Komitetu Nomenklaturowego, oznaczyła geny i podtypy IFN- α literą α i kolejnymi liczbami np. α_1 , α_2 (7—9); inni zaś oznaczyli je symbolami literowymi np. αA , αB (10—13).

Interferony zaliczone do poszczególnych podtypów różnią się co najmniej kilkunastoma aminokwasami. Geny je kodujące nie są alleliczne. Uważa się, że są one zgrupowane w krótszym ramieniu chromosomu 9 (44) i podlegają skoordynowanej ekspresji (45). Stwierdzono ponadto istnienie interferonów różniących się 1—2 aminokwasami np. α_{4a} i α_{4b} (45) albo αH i αH_1 (11). W obu przypadkach pary genów kodujących te interferony stanowią prawdopodobnie formy alleliczne.

Okazało się, że gen αE ma sekwencję zasad bardzo podobną do sekwencji genu α_4 . Gen αE zawiera jednak aż dwa kodony terminacyjne (pozycje aminokwasów — 102 i 155). Zakwalifikowano go więc jako pseudogen (11).

Geny α_s nie zawierają intronów (7, 14, 42).

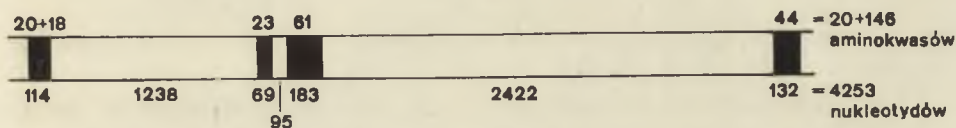
W 1981 r. dokonano syntezy sztucznego genu *IFN- α_1* z pojedynczych nukleotydów. Na podstawie sekwencji aminokwasowej interferonu zaprojektowano sekwencję nukleotydową genu, dokonując zmian w stosunku do naturalnego genu w celu zwiększenia liczby kodonów preferowanych przez bakterie tak, aby uzyskać wysoką wydajność produkcji IFN. Ten syntetyczny gen, nie występujący w przyrodzie, wprowadzono do komórek *Escherichia coli* oraz *Methylophilus methylotrophus*. Otrzymano produkt aktywny, nie różniący się od IFN- α_1 (19, 46).

II-1.2. Geny *HuIFN-β*

Znamy już co najmniej 5 różnych mRNA dla *HuIFN-β* (Tabela 2) różniących się długością (23, 41). Sugeruje to obecność co najmniej pięciu genów kodujących ten typ interferonu. Są one rozmieszczone co najmniej w trzech różnych chromosomach — 2, 5 i 9 (38, 41). Zidentyfikowano jednakże tylko dwa geny, oznaczone β_1 i β_2 . DNA genów β_1 i β_2 nie hybryduje ze sobą, jednakże surowica przeciwko *IFN-β₁* neutralizuje także *IFN-β₂* (23). Gen β_1 nie zawiera intronów (21, 47) i przypuszczalnie znajduje się w krótszym ramieniu chromosomu 9 (44), jednak w pewnym oddaleniu od zgrupowania genów α_s . Prawdopodobnie introny występują w genie β_2 , którego sekwencja nie została jeszcze opublikowana (38). Nie jest wyjaśnione czy pozostałe rodzaje mRNA są transkryptami genów kodujących inne podtypy *IFN-β*.

II-1.3. Gen *HuIFN-γ*

Znany jest tylko jeden gen kodujący *HuIFN-γ* (Ryc. 1). Znajduje się on prawdopodobnie w dłuższym ramieniu chromosomu 12 (43) i zawiera trzy introny (17, 18).



Ryc. 1. Schemat budowy genu *HuIFN-γ*. Odcinek DNA o długości 4253 nukleotydów zawiera 4 eksony (zaczernione) kodujące 166 aminokwasów, w tym 20 aminokwasów peptydu sygnałowego i 146 aminokwasów cząsteczki *IFN-γ* (wg danych z 18).

DNA genu kodującego *IFN-γ* hybryduje tylko z jednym odcinkiem genomowego DNA — tzn. z własną sekwencją, a więc nie ma genów pokrewnych znanemu genowi *IFN-γ*. Nie znaleziono także mRNA odpowiadającego ewentualnym innym rodzajom *IFN-γ*. Wszystko więc wskazuje na to, iż istnieje tylko jeden gen kodujący *HuIFN-γ*, mimo znacznej heterogenności preparatów tego interferonu (18). Zsyntetyzowano jednakże inny, nie występujący w przyrodzie, gen kodujący *HuIFN-γ* (48).

II-2. Struktura pierwszorzędowa ludzkich interferonów

Opublikowano dotychczas pełne sekwencje aminokwasowe kilkunastu interferonów α_s , interferonu β_1 i *IFN-γ* oraz sekwencje nukleotydowe odpowiadających im genów. *IFN-β₁* i prawie wszystkie *IFN-α* zbudowane są ze 166 aminokwasów (7, 11, 15, 16); jedynie *IFN-α₂* ma 165 aminokwasów wskutek delecji trypletu nukleotydów w pozycji 44 (9—11). Natomiast *IFN-γ* zbudowany jest ze 146 aminokwasów (17, 18). Interferony mają N-końcowy peptyd sygnałowy oddzielany w czasie wydzielania z komórki.

Tabela 3

Porównanie 8 podtypów ludzkiego interferonu α i kodujących je genów (% homologii wyliczony wg 11).

HuIFN	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6	α_8	α_{10}	% homologii amino- kwasowej białek
α_1	—	83	83	73	87	81	77	81	
α_2	90	—	82	75	86	83	81	81	
α_3	90	90	—	78	89	83	81	89	
α_4	85	86	88	—	82	75	73	75	
α_5	91	91	91	90	—	86	83	84	
α_6	89	91	91	87	91	—	83	86	
α_8	87	88	89	84	87	88	—	81	
α_{10}	88	89	94	86	90	92	88	—	
% homologii nukleotydowej genów									

Tabela 4

Porównanie ludzkich interferonów α , β i γ oraz kodujących je genów (% homologii wyliczony wg 11, 18, 49). Spośród podtypów IFN- α i IFN- β wybrano najczęściej występujące: HuIFN- α_2 i HuIFN- β_1 .

HuIFN	α_2	β_1	γ	% homologii aminokwa- sowej białek
α_2	—	33	8	
β_1	49	—	13	
γ	27	31	—	
% homologii nukleotydowej genów				

pozostałe odcinki tylko 4—7%. Wysłunięto hipotezę, iż gen *IFN- γ* powstał z genu *IFN- β_1* , poprzez insercję małego fragmentu DNA kodującego IFN- β_1 , do jakiegoś innego genu (50).

W interferonach α_5 , IFN- β_1 i IFN- γ o znanych sekwencjach aminokwasowych tylko 6 aminokwasów (4%) znajduje się w tych samych pozycjach, a mianowicie: Asp 32, Phe 65, Phe 68, Ser 73, Asn 94, Lys 134 (numeracja dla IFN- α_1).

Skonstruowano drzewo genealogiczne ośmiu ludzkich interferonów α_s (αA — αH) szacując, że wspólny gen istniał 26 mln lat temu, a ostateczne ukształtowanie się 8 odrębnych genów nastąpiło 12 mln lat temu (51). Inne obliczenia wskazują, że rozejście się genów α_1 i α_2 nastąpiło 9—35 mln lat temu (9). Uważa się, że geny α i β pochodzą od wspólnego genu istniejącego — w zależności od metody obliczeń — 62—300 (9) lub 500—1000 mln lat temu (49).

Interferony zawierają 2 ($IFN-\gamma$), 3 ($IFN-\beta_1$), 4 (większość $IFN-\alpha$) lub 5 reszt cysteiny ($IFN-\alpha_1$). Cysteiny te tworzą dwa wiązania dwusiarczkowe w $IFN-\alpha$ — pozycje 1—99 oraz 29—139 (Ryc. 2) i 1 wiązanie w $IFN-\beta_1$ — pozycje 31—141 (20). Wiązanie dwusiarczkowe jest niezbędne dla aktywności przeciwwirusowej tych interferonów (52). $IFN-\gamma$ zawiera co prawda dwie cysteiny (pozycje 1 i 3), ale nie tworzą one wiązania dwusiarczkowego (18).

$IFN-\gamma$ zawiera dwie sekwencje zwane sygnałowymi N-glikozylacji (Asn-X-Ser albo Asn-X-Thr). Jedna taka sekwencja występuje w cząsteczkach $IFN-\beta_1$ i $IFN-\alpha_6$, brak ich natomiast w $IFN-\alpha$ pozostałych podtypów (14, 17, 39, 40). Obecność cukrów stwierdzono w oczyszczonych preparatach $IFN-\beta_1$ i $IFN-\gamma$ (14, 52, 53), ale wielkość i skład części cukrowej nie zostały dotychczas w sposób bezsporny ustalone.

Działanie glikozydaz zmniejsza masę cząsteczkową $IFN-\beta_1$ i $IFN-\gamma$, ale nie wpływa na ich aktywność. Podobny efekt wywiera inhibitor N-glikozylacji — tunikamycyna. Interferony zsyntetyzowane przez komórki bakteryjne, do których uprzednio wprowadzono geny ludzkich IFN , są w pełni aktywne, mimo iż bakterie nie dokonują N-glikozylacji. Dane te wskazują, że część cukrowa nie jest konieczna dla aktywności ludzkich interferonów (20, 53).

Interferony α nie są N-glikozylowane, być może zawierają jednak niewielkie ilości cukru na skutek O-glikozylacji (40, 53). Tłumaczyłoby to, dlaczego w niektórych oczyszczonych preparatach naturalnego IFN znajdują się 1—2 cząsteczki glukozaminy lub galaktozaminy na 1 cząsteczkę $IFN-\alpha$ (54).

Masa cząsteczkowa części białkowej ludzkich interferonów α i β obliczona na podstawie sekwencji aminokwasów wynosi 19 000—20 000 (165—166 aminokwasów), a masa $IFN-\gamma$ wynosi 17 110 (146 aminokwasów). Tymczasem w wyniku oczyszczania otrzymuje się szereg aktywnych frakcji o różnych masach cząsteczkowych. I tak $IFN-\alpha$ ma 15 000—26 000, $IFN-\beta$ — 20 000—40 000, a $IFN-\gamma$ — 20 000—70 000. Zwraca uwagę heterogenność $IFN-\gamma$, który jest kodowany tylko przez 1 gen (18).

Występowanie odmian $IFN-\alpha$ o masie mniejszej niż to wynika z sekwencji aminokwasów można wytłumaczyć skróceniem cząsteczki na drodze specyficznych przemian posttranslacyjnych bądź na skutek niespecyficznej proteolizy zachodzącej już po wydzieleniu IFN z komórki (14). Istotnie, znaleziono $IFN-\alpha_2$ zbudowany ze 155 aminokwasów. Stwierdzono, że brakujące 10 aminokwasów zostało odłączone od C-końca — pozycje 156—165 (12).

Trudniej wyjaśnić występowanie form o masie cząsteczkowej większej niż obliczana teoretycznie na podstawie sekwencji aminokwasów. Istnieje kilka możliwości (14). Po pierwsze mogą istnieć geny kodujące interferony o cząsteczkach większych niż 166 aminokwasów. Jest to prawdopodobnie w przypadku $IFN-\alpha$ ($\alpha_L?$) i $IFN-\beta$ ($\beta_2?$). Jednak nawet w razie

wykrycia takich genów nie będzie to równoznaczne z rozwiązaniem problemu. Interferony kodowane przez geny o nieznannej jeszcze sekwencji stanowią zapewne niewielką frakcję puli IFN (np. zbadanie naturalnych preparatów HuIFN- α wykazało, że 42% cząsteczek należy do podtypu α_2 a 27% do podtypu α_1 — wg 45), podczas gdy wykrywa się znaczne ilości IFN o dużym ciężarze. Nie można w ten sposób wytłumaczyć także heterogenności HuIFN- γ , gdyż wykryto tylko jeden gen kodujący ten IFN (18).

Po drugie interferony mogą być glikozylowane. Część cukrową wykryto w IFN- β i IFN- γ . Interferony α (z wyjątkiem α_6) nie są N-glikozylowane, natomiast mogą być O-glikozylowane.

Po trzecie cząsteczki IFN mogą tworzyć z białkami oligomery. Natywny IFN- γ występuje przypuszczalnie w postaci mieszaniny dimerów lub trimerów (55, 56). Oligomery te zbudowane są z dwóch rodzajów podjednostek będących glikoproteidami (o masie cząsteczkowej 20 000 i 25 000). Także masa cząsteczkowa syntetyzowanego w bakteriach HuIFN- γ (32 000) wskazuje na strukturę dimeryczną (57). Interferony mogłyby też agregować z innymi białkami. Wysunięto przypuszczenie, że HuIFN- α jest związany poprzez cukier z adrenokortykotropiną (ACTH). Cząsteczka HuIFN- α -ACTH miałaby masę cząsteczkową 23 000 (58).

A wreszcie po czwarte, różnice w wyznaczonych masach cząsteczkowych mogą wynikać z nietypowego zachowania się niektórych interferonów w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym z siarczanem sodowym dodecyłu (SDS-PAGE). Nie potwierdzono tego jednak doświadczalnie.

Ostatnio uzyskano hybrydowe cząsteczki IFN składające się częściowo z sekwencji IFN- α_1 a częściowo z IFN- α_2 . Dokonano tego działając enzymami restrykcyjnymi Bgl II i Pvu II na geny tych interferonów. Następnie połączono fragmenty DNA pochodzące z różnych genów. Tak uzyskane geny hybrydowe sklonowano w bakteriach i otrzymano IFN. Aktywność takich hybrydowych białek, a w szczególności ich specyficzność gatunkowa, zależy od części N-końcowej cząsteczki: i tak aktywność IFN- α_1/α_2 przypomina IFN- α_1 , zaś IFN- α_2/α_1 — IFN- α_2 . Przypuszczalnie w tej części cząsteczki znajduje się miejsce wiążące się z receptorem na powierzchni komórki (59). Rolę N-końca w wiązaniu z receptorem potwierdza fakt, iż po związaniu IFN z powierzchnią komórki C-koniec pozostaje wolny dla przeciwciała monoklonalnego (60). Wykryto ponadto, że za aktywności przeciwwirusową i antyproliferacyjną są odpowiedzialne różne części cząsteczki IFN (59).

II-3. Struktura drugorzędowa i trzeciorzędowa ludzkich interferonów

Od 1980 r. ukazało się kilka prac dotyczących struktury drugo- i trzeciorzędowej ludzkich interferonów. Badacze opierając się na znajomości sekwencji aminokwasowej, posługując się różnymi metodami, uzyskali różne wyniki. I tak np. stwierdzono (61), że 55% cząsteczki HuIFN- α ma

postać α -heliksu, zaś β -struktura stanowi 16% cząsteczki. W cząsteczce tego IFN występuje 8 odcinków α -heliksu i 4 odcinki β -struktury. Ludzki IFN- β ma mieć niemal jednakową ilość α -heliksu (36%) i β -struktury (33%). W cząsteczce HuIFN- β α -heliks jest rozmieszczony w 6 odcinkach, a β -struktura w 7. W świetle innych wyników (62, 63) nie ma różnic w ilości struktur α i β w różnych typach interferonów. Stwierdzono przy tym, że aż 60—70% cząsteczki ludzkich interferonów α , β i γ ma postać α -heliksu, a tylko 10—20% jest w postaci β -struktury. W cząsteczkach tych IFN występuje 5 odcinków α -heliksu. Zaproponowano w tejże pracy także dwa alternatywne modele struktury trzeciorzędowej IFN, w których aminokwasy obdarzone ładunkiem są skoncentrowane na powierzchni cząsteczki. Opracowano też inny model budowy cząsteczki interferonu (64). Według tego modelu HuIFN- α i HuIFN- β mają 4 odcinki α -heliksu przedzielone β -strukturą, a aminokwasy konserwatywne są rozmieszczone na powierzchni cząsteczki.

Problem struktur wyższego rzędu zostanie zapewne już niedługo rozstrzygnięty dzięki zastosowaniu dyfrakcyjnej analizy rentgenowskiej. Niezbędne jest w tej metodzie otrzymanie substancji w stanie krystalicznym. Pierwszego kroku w tym kierunku dokonano w 1982 r. uzyskując kryształy HuIFN- α_2 (65).

III. Interferony zwierzęce

Stwierdzono, że komórki kręgowców wielu gatunków mogą produkować różne interferony (podobnie, jak u ludzi występują trzy typy antygenowe interferonów — α , β i γ). O ich strukturze i wewnątrzgatunkowym różnicowaniu niewiele wiadomo. Najlepiej poznane spośród nich są interferony mysie.

III-1. Interferony mysie

Zbadano sekwencje N-końcowych fragmentów MuIFN- α (20 aminokwasów) i MuIFN- β (23 aminokwasy). Porównanie ich z analogicznymi fragmentami ludzkich interferonów wykazało, że bardziej są do siebie zbliżone interferony jednego typu obu gatunków (35—50% homologii aminokwasowej) niż interferony α i β tego samego gatunku (15—30% homologii). MuIFN- α ma masę cząsteczkową 22 000, zaś MuIFN- β — 28 000 i 35 000 (66).

Poznano sekwencje 39 i 65 aminokwasów C-końcowych dwóch różnych mysich IFN- β (67). DNA genów kodujących te interferony nie hybrydują ze sobą. Także analiza sekwencji znanych fragmentów wykazuje brak istotnej homologii. Natomiast oba te interferony cechuje pewne (aczkolwiek niewielkie) podobieństwo do HuIFN- β_1 . Masa cząsteczkowa produktów obu badanych genów wynosi 34 000.

Stosując gen *HuIFN-β₁* jako sondę hybrydyzacyjną wykryto mysie gen *IFN-β* (68). Te dwa geny mają około 70% homologii nukleotydowej. Sekwencja 117 aminokwasów C-końcowych tego *MuIFN-β* wykazała 50% homologii aminokwasowej z *HuIFN-β₁*. Stwierdzono natomiast, że interferon ten jest odmienny od dwóch mysich interferonów β wcześniej opisanych (67). Tak więc istnieją co najmniej trzy różne mysie interferony β, w tym jeden podobny do ludzkiego *IFN-β₁*.

Wyizolowano gen *MuIFN-γ* poprzez hybrydyzację z DNA kodującym *HuIFN-γ* (69). Stwierdzono, że w genomie mysim jest tylko 1 gen kodujący *IFN-γ*. Gen mysie ma podobną budowę jak gen ludzki, tzn. występują w nim również 3 introny, zaś długość intronów i eksonów jest analogiczna jak w genie ludzkim. Geny te wykazują 64% homologii nukleotydowej. Mysie *IFN-γ* ma 136 aminokwasów, tj. o 10 mniej niż ludzki *IFN-γ*. Białka te wykazują 40% homologii aminokwasowej. Mysie *IFN-γ*, podobnie jak ludzki odpowiednik, ma również dwa miejsca w łańcuchu ulegające N-glikozytacji, ale w innych miejscach cząsteczki. Masa cząsteczkowa *MuIFN-γ* obliczona na podstawie sekwencji aminokwasów wynosi 15 894, podczas gdy oznaczana w naturalnych preparatach jest znacznie większa (35 000—80 000). Różnica ta prawdopodobnie wynika z glikozytacji oraz tworzenia oligomerów.

Wszystkie mysie interferony są glikoproteidami, przy czym deglikozyłacja zmniejsza znacznie aktywność *MuIFN-β* (70, 71) i *MuIFN-γ* (72).

III-2. Inne interferony zwierzęce

Interferony wykryto w komórkach ssaków, ptaków, gadów, płazów i ryb. O strukturze tych interferonów jeszcze niewiele wiadomo.

Porównano DNA pochodzące z komórek różnych zwierząt pod względem zdolności do hybrydyzacji z DNA genów *HuIFN-α₂* i *HuIFN-β₁*, użytymi jako sondy hybrydyzacyjne (73). Sondy te hybrydyzowały z DNA wszystkich badanych ssaków (szympan, goryl, orangutan, pawian zielony, ponocnica, lemur płowy, antylopa garna, krowa, lew, pies, foka szara, królik, mysz, chomik syryjski). Szczególnie silna hybrydyzacja wystąpiła z DNA naczelnych, zaś słaba z DNA gryzoni i królika. Stwierdzono ponadto bardzo słabą hybrydyzację pomiędzy DNA genu *HuIFN-α₂*, a DNA ptaka (kura) i gada (jaszczurka zielona). Nie udało się uzyskać hybrydyzacji z DNA płazów, ryb i bezkręgowców. DNA kodujący *HuIFN-β₁* hybrydyzował tylko z DNA ssaków. Charakterystyka fragmentów hybrydujących wskazuje, że we wszystkich badanych przypadkach występuje rodzina genów bądź pseudogenów *IFN-α*. U większości ssaków jest tylko jeden gen hybrydujący z DNA genu *HuIFN-β₁*; tylko parzystokopytne (krowa, antylopa garna) mają rodzinę genów β. Dane te są zgodne z wcześniejszymi badaniami (74) stwierdzającymi, że u bydła występują dwie rodziny genów kodujących *IFN-α* (białka mają około 50% homologii aminokwaso-

wej), jedna rodzina genów *IFN-β* oraz pojedynczy gen *BoIFN-γ*. Inne badania wykazały, że w genomie szczura znajduje się rodzina genów i pseudogenów składająca się co najmniej z 13 różnych sekwencji hybrydujących z DNA genu *RaIFN-α* (75).

IV. Uwagi końcowe

Interferony są białkami konserwatywnymi. Stopień homologii między nimi może być więc miernikiem pokrewieństwa pomiędzy różnymi grupami systematycznymi. Można to wyrazić budując drzewo genealogiczne interferonów pochodzących z różnych gatunków, podobnie jak to zrobiono w przypadku podtypów *HuIFN-α* (51). Wymaga to jednak zbadania struktury większej ilości interferonów.

Badania nad interferonami są kontynuowane. Należy się spodziewać, że dalsze stosowanie metod rekombinacji DNA *in vitro* doprowadzi wkrótce do uzyskania wielu nowych danych o strukturze ludzkich i zwierzęcych interferonów. Badania nad hybrydami oraz synteza sztucznych genów, w których można dokonać zmian w sekwencji nukleotydów, stwarzają możliwość określenia znaczenia poszczególnych aminokwasów w aktywności biologicznej interferonów. Powiązanie tych wyników z badaniami struktury drugo- i trzeciorzędowej pozwoli ustalić strukturę przestrzenną cząsteczki składającą o jej oddziaływaniach z innymi makrocząsteczkami; wyjaśnić mechanizmy: indukcji genów interferonu, plejotropowych aktywności wykazywanych przez same interferony, zmian w metabolizmie komórek indukowanych i docelowo zmienianych w obecności interferonu.

Zaakceptowano do druku 1 września 1984 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Isaacs A., Lindenmann J., (1957), *Proc. Roy. Soc. B*, **147**, 258—267.
2. Stewart II W. E., (1979), w: *The Interferon System*, s. 421, Springer Verlag, Wien—New York.
3. Burke D. C., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 1—4.
4. Wheelock E. F., (1965), *Science*, **149**, 310—311.
5. Youngner J. S., Salvin S. B., (1973), *J. Immunol.*, **111**, 1914—1922.
6. *Interferon Nomenclature*, (1980), *Nature*, **286**, 110.
7. Nagata S., Mantei N., Weissmann C., (1980), *Nature*, **287**, 401—408.
8. Lawn R. M., Gross M., Houck C. M., Franke A. E., Gray P. W., Goeddel D. V., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5435—5439.
9. Streuli M., Nagata S., Weissmann C., (1980), *Science*, **209**, 1343—1347.
10. Goeddel D. V., Yelverton E., Ullrich A., Heyneker H. L., Miozzari G., Holmes W., Seeburg P. H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A.,

- Tabor J. M., Gross M., Familletti P. C., Pestka S., (1980), *Nature*, **287**, 411—416.
11. Goeddel D. V., Leung D. W., Dull T. J., Gross M., Lawn R. M., McCandliss R., Seeburg P. H., Ullrich A., Yelverton E., Gray P., (1981), *Nature*, **290**, 20—26.
 12. Levy W. P., Rubinstein M., Shively J., Del Valle U., Lai C. Y., Moschera J., Brink L., Gerber L., Stein S., Pestka S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6186—6190.
 13. Staehelin T., Durrer B., Schmidt J., Takacs B., Stocker J., Miggiano V., Stähli C., Kung H. F., Hobbs D. S., Levy W. P., Moschera J. A., Pestka S., (1981—1982), *Texas Rep. Biol. Med.*, **41**, 43—58.
 14. Rubinstein M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 5—16.
 15. Taniguchi T., Ohno S., Fujiikur Y., Muramatsu M., (1980), *Gene*, **10**, 11—15.
 16. Derynck R., Content J., DeClercq E., Volckaert G., Tavernier J., Devos R., Fiers W., (1980), *Nature*, **285**, 542—547.
 17. Gray P. W., Leung D. W., Pennica D., Yelverton E., Najarian R., Simonsen C. C., Derynck R., Sherwood P. J., Wallace D. M., Berger S. L., Levinson A. D., Goeddel D. V., (1982), *Nature*, **295**, 503—508.
 18. Gray P. W., Goeddel D. V., (1982), *Nature*, **298**, 859—863.
 19. Edge M. D., Markham A. F., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 35—48.
 20. Wetzel R., Perry L. J., Estell D. A., Lin N., Levine H. L., Slinker B., Fields F., Ross M. J., Shively J., (1981), *J. Interferon Res.*, **1**, 381—390.
 21. Derynck R., Degrave W., Gheysen D., Haegeman G., Tavernier J., Remaut E., Stanssens P., Saman E., Leemans R., Fiers W., (1981), w: *The Biology of the Interferon System*, red. De Maeyer E., Galasso G., Schellekens H., 57—62; Elsevier, Amsterdam—New York—Oxford.
 22. Nagata S., Taira H., Hall A., Johnsrud L., Streuli M., Ecsödi J., Boll W., Cantell K., Weissmann C., (1980), *Nature*, **284**, 316—320.
 23. Weissenbach J., Chernajovsky Y., Zeevi M., Shulman L., Soreq H., Nir U., Wallach D., Perricaudet M., Tiollais P., Revel M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7152—7156.
 24. Hitzeman R. A., Hagie F. E., Levine H. L., Goeddel D. V., Ammerer G., Hall B. D., (1981), *Nature*, **293**, 717—722.
 25. Staehelin T., Durrer B., Schmidt J., Takacs B., Stocker J., Miggiano V., Stähli C., Rubinstein M., Levy W. P., Hershberg R., Pestka S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1848—1852.
 26. Secher D. S., Burke D. C., (1980), *Nature*, **285**, 446—450.
 27. Nyari L. J., Tan Y. H., Erlich H. A., (1981), w: *The Biology of the Interferon System*, red. De Maeyer E., Galasso G., Schellekens H., 67—71; Elsevier, Amsterdam—New York—Oxford.
 28. Trapman J., Bosveld I. J., Vonk W. P., Hekman R. A. C. P., De Jonge P., Van Vliet P. W., Van Ewijk W., (1981), w: *The Biology of the Interferon System*, red. De Maeyer E., Galasso G., Schellekens H., 77—80; Elsevier, Amsterdam—New York—Oxford.
 29. Hochkeppel H. K., De Ley M., (1982), *Nature*, **296**, 258—259.

30. Oleszak E., Feickert H. J., Mecs I., (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.
31. Inglot A. D., (1981—1982), *Texas Rep. Biol. Med.*, **41**, 402—410.
32. Inglot A. D., (1983), *Arch. Virol.*, **76**, 1—13.
33. Schwarz L. A., Fleischmann W. R., (1981—1982), *Texas Rep. Biol. Med.*, **41**, 298—306.
34. Zerial A., Hovanessian A. G., Stefanos S., Huygen K., Werner G. H., Falcoff E., (1982), *Antiviral Res.*, **2**, 227—239.
35. Oleszak E. L., Stewart W. E. II, (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.
36. Tyrrell D. A. J., (1959), *Nature*, **184**, 452—453.
37. Orchansky P., Rubinstein M., Sela I., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2278—2280.
38. Sehgal P. B., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 17—33.
39. Rubinstein M., Levy W. P., Moschera J. A., Lai C. Y., Hershberg R. D., Bartlett R. T., Pestka S., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 307—318.
40. Allen G., Fantes K. H., (1980), *Nature*, **287**, 408—411.
41. Sehgal P. B., Sagar A. D., Braude I. A., Smith D., (1981), w: The Biology of the Interferon System, red. De Maeyer E., Galasso G., Schellekens H., 43—46; Elsevier, Amsterdam—New York—Oxford.
42. Yelverton E., Goeddel D. V., (1981—1982), *Texas Rep. Biol. Med.*, **41**, 192—197.
43. Sehgal P. B., May L. T., LaForge K. S., Inouye M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6932—6936.
44. Trent J. M., Olson S., Lawn R. M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7809—7813.
45. Nagata S., Brack C., Henco K., Schamböck A., Weissmann C., (1981), *J. Interferon Res.*, **1**, 333—336.
46. Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuch W., Scanlon D. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F., (1981), *Nature*, **292**, 756—762.
47. Ohno S., Taniguchi T., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5305—5309.
48. Tanaka S., Oshima T., Ohsuye K., Ono T., Mizono A., Ueno A., Nakazato H., Tsujimoto M., Higashi N., Noguchi T., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1707—1723.
49. Taniguchi T., Mantei N., Schwarzstein M., Nagata S., Muramatsu M., Weissmann C., (1980), *Nature*, **285**, 547—549.
50. DeGrado W. F., Wasserman Z. R., Chowdhry V., (1982), *Nature*, **300**, 379—381.
51. Miyata T., Hayashida H., (1982), *Nature*, **295**, 165—168.
52. Tan Y. H., Barakat F., Berthold W., Smith-Johannsen H., Tan C., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8067—8073.
53. Knight E. Jr, Fahey D., (1982), *J. Interferon Res.*, **2**, 421—429.
54. Allen G., (1982), *Biochem. J.*, **207**, 397—408.
55. Yip Y. K., Barrowclough B. S., Urban C., Vilček J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1820—1824.
56. Yip Y. K., Barrowclough B. S., Urban C., Vilček J., (1982), *Science*, **215**, 411—413.
57. Ohshima T., Ohsue K., Nomura M., Tanaka S., Ono T., Ueno J., Mizuno A., Tsujimoto M., Higashi N., Nakasato H., Noguchi

- T., (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.
58. Smith E. M., Blalock J. E., (1981—1982), *Texas Rep. Biol. Med.*, **41**, 350—358.
59. Rehberg E., Kelder B., Hoal E. G., Pestka S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11497—11502.
60. Arnheiter H., Zoon K. C., Ohno M., Smith M., Gutle B., (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.
61. Hayes T. G., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**, 872—879.
62. Zav'yalov V. P., Denesyuk A. I., (1982), *Immunol. Lett.*, **4**, 7—14.
63. Denesyuk A. I., Zav'yalov V. P., (1982), *Immunol. Lett.*, **5**, 223—226.
64. Sternberg M. J. E., Cohen F. E., (1982), *Int. J. Biol. Macromolecules*, **4**, 137—144.
65. Miller D. L., Kung H., Pestka S., (1982), *Science*, **215**, 689—690.
66. Taira H., Broeze R. J., Jayaram B. M., Lengyel P., Hunkapiller M. W., Hood L. E., (1980), *Science*, **207**, 528—530.
67. Skup D., Windass J. D., Sor F., George H., Williams B. R. G., Fukuhara H., DeMaeyer-Guignard J., DeMaeyer E., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3069—3084.
68. Higashi Y., Sokawa Y., Kawade Y., Ohno S., Takaoka C., Taniguchi T., (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.
69. Gray P. W., Goeddel D. V., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5842—5846.
70. Kawade Y., (1981—1982), *Texas Rep. Biol. Med.*, **41**, 219—224.
71. Havell E. A., Carter W. A., (1981), *Virology*, **108**, 80—86.
72. Havell E. A., Spitalny G. L., (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.
73. Wilson V., Jeffreys A. J., Barrie P. A., Boseley P. G., Slocombe P. M., Easton A., Burke D. C., (1983), *J. Mol. Biol.*, **166**, 457—475.
74. Capon D. J., Leung D. W., Hitzeman R. A., Perry L. J., Kohr W. J., Gray P. W., Derynck R., Goeddel D. V., (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.
75. Dijkema R., Pouwels P., De Reus A., Schellekens H., (1982), w: The Third Annual International Congress for Interferon Research, Miami, USA.

Addendum na str. 237.

PAWEŁ P. LIBERSKI *

Struktura czynnika infekcyjnego *scrapie*

The structure of the infectious *scrapie* agent

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Poszukiwania kwasu nukleinowego czynnika *scrapie*
- III. Poszukiwania białka czynnika infekcyjnego *scrapie*
- IV. Wirino czy prion. Wnioski

Contents

- I. Introduction
- II. The search for the nucleic acid of the *scrapie* agent
- III. The search for the protein of the infectious *scrapie* agent
- IV. Virino or prion. Conclusions

I. Wstęp

Scrapie, choroba centralnego układu nerwowego owiec i kóz (1), choroba Creutzfeldta-Jakoba-CJD (2) i kuru (3) u człowieka, oraz transmisyjna encefalopatia nerek (4) określa się jako podostrą transmisyjną encefalopatię gąbczastą. Kilka innych jednostek chorobowych (zespołów), szczególnie zespół Gerstmann-Strausslera (5), choroba Alzheimera (6, 7) oraz choroby neurologiczne północno-amerykańskich jeleni i łosi (8) i białych tygrysów (9) cechuje zbliżona etiologia lub przynajmniej analogiczna patogeniza (10).

* Dr nauk med., Akademia Medyczna w Łodzi. Katedra i Klinika Neurologii, ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź

Praca częściowo subsydiowana przez Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej (MZ 5).

Wykaz stosowanych skrótów:

CJD — Creutzfeldt-Jakob disease — choroba Creutzfeldta-Jakoba; CTAB — detergent — cetyltrimethylammonium bromide; DEP — diethylpyrocarbonate; DOC — sodium deoxycholate; NP-40 — Nonidet 40; PSTV — potato spindle tuber viroid — wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaków; PrP 27—30 — prion protein 27 000—30 000 daltonów — białko „prionu” o c.c. 27—30 000 daltonów; SAF — *scrapie* associated fibrils — włókienka towarzyszące *scrapie*

Wszystkie wymienione jednostki chorobowe charakteryzuje długi okres inkubacji trwający miesiące do dziesiątków lat. Wszystkie wykazują powolny przebieg prowadzący nieuchronnie do śmierci, wszystkie wreszcie z neuropatologicznego punktu widzenia są procesami czysto zwyrodnieniowymi. W obrazie neuropatologicznym występują zaniki (depopulacje neuronalne), glejoza włóknista (astrocytarna) oraz stan gąbczasty lub zmiany gąbczaste i płytki amyloidowe. Topografia procesu oraz nasilenie poszczególnych jego elementów pozostają pod kontrolą genomu gospodarza oraz zależą po części od szczepu czynnika infekcyjnego (11, 23).

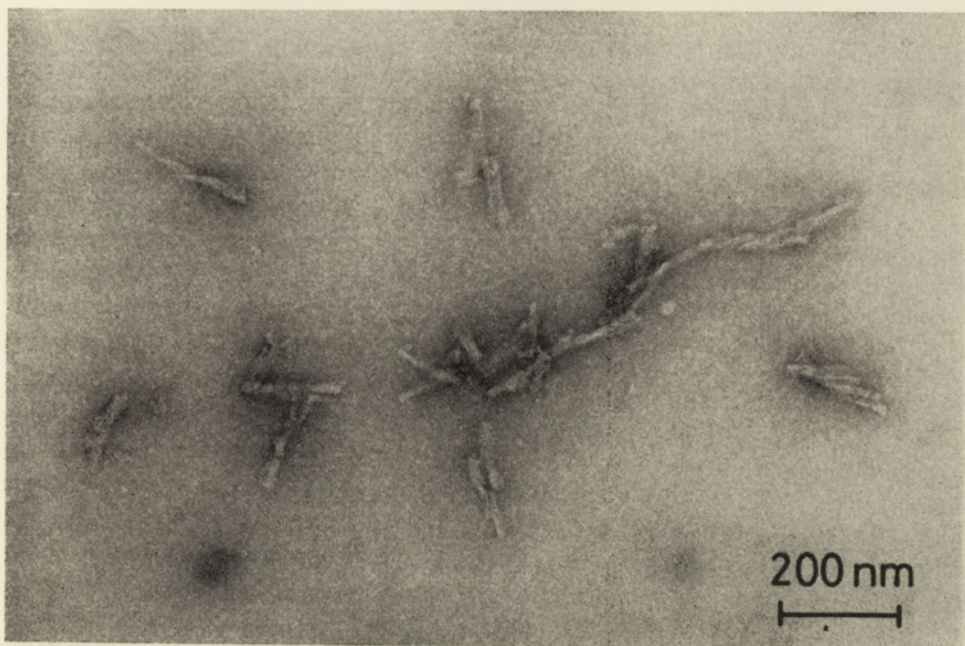
Od lat trzydziestych XX wieku wiadomo, że *scrapie* jest chorobą infekcyjną wywoływaną przez czynnik przesączalny. Infekcyjną naturę kuru i CJD udowodniono dopiero w połowie lat sześćdziesiątych (22, 23). Pomimo wykazania infekcyjnej natury wymienionych chorób czynnika odpowiedzialnego za ten stan nie udało się ani uwidocznić w mikroskopie elektronowym ani go wyizolować, nie udało się tym bardziej ustalić jego fizykochemicznej struktury (24, 25). Nietypowe właściwości czynnika i wywołanych nim procesów (patrz niżej) spowodowały konieczność sklasyfikowania czynników *scrapie*, kuru i CJD jako czynników niekonwencjonalnych, nietypowych (wirusów niekonwencjonalnych czy nietypowych, wirusów powolnych) a ostatnio spowodowały wprowadzenie dwóch neologizmów — tj. wirino (13) i prion (26, 27, 28). Wydaje się jednak, że klasyfikowanie czynników infekcyjnych bez znajomości ich fizykochemicznej struktury jest przedwczesne (29, 30, 31, 32).

Udana transmisja *scrapie* z owiec na myszy (33), a zarówno *scrapie* (34, 35) jak i CJD na chomiki (36, 43) przyspieszyła opracowanie metod oczyszczenia czynnika infekcyjnego, oraz określenia jego chemicznej struktury. Szereg danych prezentowanych w lipcu 1984 na sympozjum EMBO w New Battly Abbey wydaje się wskazywać na pierwsze sukcesy w tym kierunku. Należy się chyba spodziewać, iż pełne określenie chemicznej struktury czynnika *scrapie* (i odpowiednio CJD) zostanie przeprowadzone w ciągu najbliższych kilku lat, i że impas trwający od blisko czterech dziesiątków lat został przełamany.

Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu danych na temat czynnika infekcyjnego *scrapie*, prawdopodobnego występowania w nim białek i kwasów nukleinowych a także przedstawienie hipotez dotyczących replikacji omawianego czynnika. Pozostałe dane dotyczące zwłaszcza neuropatogenezy i neuropatologii chorób wywołanych przez czynniki niekonwencjonalne znajdzie czytelnik w szeregu innych opracowań (1, 14, 28, 25, 47).

II. Poszukiwania kwasu nukleinowego czynnika *scrapie*

Do chwili obecnej brak jest wiarygodnych danych świadczących o obecności DNA lub RNA w cząstkach czynnika *scrapie*, CJD czy kuru. Wyliczona początkowo D37 (tj. dawka pozostawiająca 37% aktywności preparatu,



Ryc. 1. Włókienka towarzyszące scrapie (scrapie associated fibrils-SARs). Szczep 263 scrapie pasażowany przez złote chomiki syryjskie. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego. Materiał kontrastowany negatywowo.

lub zmniejszająca jego aktywność o czynnik e^{-1}) wynosiła 43 k. grejów, co odpowiada wielkości genomu czynnika scrapie równej 1.5×10^5 daltonów (48). Podobne wyniki uzyskano w kolejnym eksperymencie (49), dla którego wielkość D_{37} wynosiła 46 k. grejów. Posługując się Co^{60} jako źródłem promieniowania gamma (50) udało się potwierdzić powyższe wyniki. Jednocześnie z eksperymentami nad scrapie wykonano eksperymenty z materiałem pochodzącym od naczelnych zainfekowanych kuru i CJD (51, 52). Pomimo, iż niewielka liczba dostępnych próbek uniemożliwiła wykreślenie krzywej inaktywacji i wyliczenie D_{37} , wydaje się, że czynnik CJD i kuru są przynajmniej tak samo odporne na promieniowanie jonizujące jak czynnik scrapie (51, 52). Pierwsze badania z użyciem promieniowania UV przy długości fali 254 nm (53) nie wykazały znaczącego spadku miana infekcyjności ze względu na zbyt małą użytą dawkę. W kolejnych eksperymentach z użyciem promieniowania jonizującego lub UV starano się określić wielkość potencjalnego genomu czynnika scrapie, a także budowę chemiczną czynnika.

Wyniki eksperymentów radiacyjnych są trudne do interpretacji (52). Oporność „konwencjonalnych” wirusów na napromieniowanie jest wypadkową wielkości genomu (im genom mniejszy tym odporność większa) oraz wydajności systemów reparacyjnych (47, 52, 55, 57). Minimalna oszacowana

wielkość chromoforu *scrapie* wynosząca 6.5×10^4 sugeruje, iż każda interakcja energii jonizującej z genomem musi być letalna, niemniej oszacowana wielkość nie musi być wielkością genomu. Instruktywnym przykładem jest tutaj różnica pomiędzy wielkością genomu wirusa polyoma (2.4×10^6) a wielkością chromoforu tego wirusa (1.25×10^5), która sugeruje bardzo wydajną aktywność systemów reparacyjnych (reparacja 19 na 20 uszkodzeń). Podsumowując ten ciąg danych autorzy sugerują dwie podstawowe możliwości — po pierwsze czynnik infekcyjny *scrapie* nie zawiera kwasu nukleinowego (58), lub o ile taki kwas nukleinowy występuje — jest on chroniony „płaszczem” o nieznannej budowie.

W roku 1980 wysunięto hipotezę (55, 56, 57), że posługiwanie się teorią tarczy jako teoretyczną podstawą oceny wielkości genomu z D_{37} może być błędne. Stała inaktywacji wirusów „konwencjonalnych” jest zależna od masy ich genomu. Przy założeniu, że czynnik *scrapie* zawiera jednak kwas nukleinowy i uwzględniając uzyskane uprzednio D_{37} , obliczony ciężar cząsteczkowy czynnika wynosiłby 1.7×10^6 (dla dwuniciowego DNA) lub 0.75×10^6 (dla jednoniciowego DNA) (47—56). Jest więc co najmniej jeden rząd wielkości większy niż szacowany uprzednio.

Interpretację krzywych inaktywacji *scrapie* dodatkowo komplikuje obecność agregatów czynnika (47, 55, 56). Wiadomo, że intensywne homogenizacja lub sonikacja materiału zakażonego *scrapie* prowadzi do wzrostu miana infekcyjności (56, 59) co można interpretować jako zjawisko deagregacji spowodowane homogenizacją lub sonikacją. Obecność agregatów czynnika w zasadniczy sposób wpływa na ocenę wielkości genomu (im większe agregaty tym większa dawka niezbędna do zniszczenia wszystkich, wchodzących w skład agregatu podjednostek). Przyjęcie założenia powstawania agregatów czynnika pozostających w równowadze z formami wolnymi pozwala na wyrażenie bimodalnej krzywej inaktywacji maksymalnie zgodnej z pochodzącymi z eksperymentów radiacyjnych (48, 50, 52) oraz na ocenę wielkości genomu czynnika (rzędu genomu wirusa polyoma).

Nietypowe własności *scrapie*, tj. niewrażliwość na wysoką temperaturę, promieniowanie jonizujące i UV, itd. (19, 25) sugerujące nietypową strukturę fizykochemiczną wydają się być również przeinterpretowane. „Miarczkowanie do punktu końcowego” (60), jedyna dostępna metoda pomiaru miana infekcyjności *scrapie* daje możliwość oceny różnicy mian rzędu $10^{0.5}$. W zastosowaniu do jakichkolwiek eksperymentów inaktywacyjnych miano końcowe, odpowiada więc mianu infekcyjności najbardziej odpornej subpopulacji czynnika (47, 61, 62). Na podstawie badań kinetycznych pomiaru inaktywacji *scrapie* przez działanie wysokich temperatur (61, 62) czy podchlorynu sodowego, fenolu, nadtlenku wodoru, formaldehydu, nadmanganianu potasu (57, 62) wysunięto wnioski, o początkowej inaktywacji usuwającej ponad 99% populacji czynnika i pozostawiającej szczątkową subpopulację niewrażliwą na zastosowane procedury wielkości 0.1—0.01%.

Celem oceny ogólnego metabolizmu kwasów nukleinowych oraz polisa-

charydów posłużono się metodą wbudowywania radioaktywnych prekursorów (^3H)-tymidyny, (^{14}C)-UDP glukozy, (^{14}C) kwasu orotowego oraz (^{14}C) glukozaminy, zarówno w mózgu jak i śledzionie (63, 64, 65). Wyniki wskazywały, że inkorporacja (^3H)-tymidyny i (^{14}C)-UDPG i (^{14}C)-glukozaminy (dwa ostatnie są prekursorem polisacharydów) jest wyższa w mózgach i śledzionach myszy zakażanych *scrapie* co interpretowano jako obecność kompleksu DNA polisacharyd. W dalszej pracy potwierdzono powyższe wyniki (64), ale stwierdzono także, że znakowany tryt (^3H) był związany z innymi niż kwasy nukleinowe frakcjami. Autorzy tłumaczą wyniki prawdopodobieństwem wystąpienia redystrybucji trytu z tymidyny. Badania frakcji błonowych (tzw. duża frakcja ziarnista oraz frakcja retikulum endoplazmatycznego) wykazały podobny wzrost inkorporacji znakowanych prekursorów do kwasów nukleinowych i polisacharydów. Należy podkreślić, że stosunek (^3H)-tymidyny do (^{14}C) kwasu orotowego po zadziałaniu moczynikiem we frakcjach postrybosomalnych nie wykazywał istotnych różnic, co zdaje się sugerować, że postulowany kompleks — DNA-polisacharyd jest trwały i zlokalizowany w cytoplazmie. W dalszych badaniach skoncentrowano się nad DNA pochodzącym z frakcji jądrowej otrzymanej z mózgow myszy zainfekowanych *scrapie* (65). Nie wykazano różnic w krzywej topnienia DNA, natomiast aktywność specyficzna (^3H)-tymidyny była wyższa niż w kontroli. Badanie DNA w dużej frakcji ziarnistej wykazały obecność małego szczytu DNA eluującego się z kolumny hydroksyapatytowej przed dwuniciowym DNA a nieobecnego w kontroli. Eksperymenty przeprowadzone około dwa miesiące po inokulacji, a więc poprzedzające pojawienie się objawów klinicznych wykazały podobnie wzmoczoną specyficzną aktywność (turnover) DNA, w tym, że mały szczyt DNA był nieobecny. Obecność małego szczytu w dużej frakcji ziarnistej, eluującego przed dwuniciowym DNA mogła świadczyć, że jest to jednoniciowy DNA o kolistej lub otwartej strukturze.

W 1979 doniesiono o obecności pasma S_2 , charakterystycznego dla frakcji synaptosomalnej otrzymanej z mózgu myszy zainfekowanych *scrapie* poddanej działaniu lizolecycyny, utrawiowaniu i ekstrakcji detergentami (66, 79). Niewielki jednoniciowy DNA został wyizolowany z frakcji S_2 po ekstrakcji fenolem i elektroforezie w żelu poliakryloamidowym. Stała sedymentacji 4.6 S w żelu poliskryloamidowym i gęstość 1.718 g/cm³ w gradiencie chlorku cezu sugerują c.o. rzędu 10⁵ daltonów, a więc zgodną z pierwotną interpretacją danych eksperymentów radiacyjnych. Izolowany DNA nie był jednak infekcyjny, co wiązano z faktem, iż ekstrakcja fenolem, niszczy infekcyjność *scrapie*.

Przeszczepienie *scrapie* na chomiki (34, 35) oraz częściowe oczyszczenie homogenatów mózgowych *scrapie* poprzez wirowanie z przyspieszeniem rzędu 10⁵ G (59) pozwoliło na zastosowanie chromatografii hydroksyapatytowej oraz elektroforezy w żelach poliakryloamidowych, które to metody wykazały obecność frakcji, zawierającej infekcyjność *scrapie* i podatnej

na trawienie DNazą lecz nie ulegające trawieniu RNazami czy proteazami (67). W kolejnych badaniach wykonano elektroforezę w żelu agarozowo-poliakryloamidowym z markerami RNA i DNA o znanych ciężarach cząsteczkowych (rRNA, tRNA, wiroid łuszczycy kory cytrusowej, fragment restrykcyjny faga 174 po trawieniu Hea III). Wykazano (68, 70), że markery RNA o m.c. pomiędzy 25 000 a 70 000 daltonów, oraz DNA rzędu 48 000 i 130 000 daltonów komigrują w rejon o najwyższym mianie infekcyjności *scrapie*. Interpretacja powyższych wyników, zwłaszcza odniesienie otrzymanych frakcji podatnych na trawienie DNAazą, do DNA otrzymanego z chromatografii hydroksypatytywnej (65) jest niełatwa, głównie z powodu niemożliwości ich powtórzenia (71).

Ostatnio zastosowano specyficzną technikę o wysokiej czułości (rzędu 10 bp dwuniciowego DNA) celem odpowiedzi na pytanie, czy w CJD występuje DNA o wielkości wiroidu (72). Aczkolwiek nie ma bezpośrednich danych świadczących, że czynniki infekcyjne *scrapie* i CJD są identyczne, można jednak uważać je za analogiczne (22, 23). W jednym z eksperymentów DNA znaczoney ³²P wielkości 400 bp wytworzył prążek w żelu poliakryloamidowym nieobecny w kontroli. Nie wydaje się, aby uzyskany materiał stanowił istotne DNA specyficzne dla CJD, ponieważ frakcja synaptosomalna, zawierająca od 3 do 8 razy większe miana infekcyjności nie wykazywała wzbogacenia w powyższy materiał. Cytowana praca dała wyniki w pełni negatywne, pod warunkiem, że postulowany DNA posiada dwuniciową strukturę, choćby na tak małym odcinku jak 10 bp. O ile DNA charakterystyczny dla *scrapie* czy CJD byłby całkowicie jednoniciowy pozostawałby poza możliwościami detekcji z użyciem nick-translacji.

Kolejną próbą znalezienia DNA specyficznego dla *scrapie* był eksperyment z transfekowaniem hodowli tkankowych mózgu płodu mysiego oraz hodowli komórek embrionu mysiego (73). Jako kontroli użyto DNA uzyskanych z faga ϕ X194 i wirusa herpes simplex. Wyniki eksperymentu okazały się także całkowicie negatywne.

Podobnie negatywna okazała się próba zastosowania techniki hybrydizacji *in situ* (74), w której jako sondy użyto fragmentu DNA wyizolowanego na podstawie danych literaturowych (67, 68).

Badania z pomocą szeregu psoralenów, trójcyklicznych pochodnych furokumaryny dyfundujących przez osłonki białkowe i tworzących fotoaddukty z kwasami nukleinowymi pod wpływem promieniowania o długości fali 360 nm, okazały się również negatywne (75, 26, 27, 28). Użyto pięć różnych psoralenów o różnej hydrofobowości z jednakowo negatywnym wynikiem. Podobnie hydroksylamina, inaktywująca kwasy nukleinowe nie tylko nie okazała się aktywna w stosunku do częściowo oczyszczonych preparatów *scrapie*, ale także wykazano jej protekcyjne działanie w stosunku do inaktywacji przez użycie DEP (26, 27, 28, 76).

III. Poszukiwania białka czynnika infekcyjnego scrapie

W początku lat siedemdziesiątych poglądy na fizykochemiczną strukturę czynnika *scrapie* zdominowała hipoteza błonowa sformułowana przez Gibbonsa i Huntera (58). Autorzy cytowanej hipotezy zauważyli, że błony komórkowe, rozfragmentowane działaniem sił odśrodkowych i kontaminujące wszystkie frakcje subkomórkowe powinny zachowywać się w sposób analogiczny do stwierdzanego w eksperymentach ze *scrapie*. Autorzy hipotezy założyli, iż kluczowym dla zrozumienia patogenezy i nietypowych właściwości czynnika infekcyjnego jest zaburzenie konformacji błony komórkowej, prawdopodobnie w postaci zmian konformacji bliżej niezidentyfikowanego czynnika cukrowego lub oligosacharydowego. Najbardziej nieortodoksyjną częścią hipotezy błonowej było założenie mówiące, że replikacja czynnika *scrapie* (tj. fragmentu błony komórkowej o zmiennej konformacji) zachodzi niezależnie od replikacji kwasów nukleinowych. Hipoteza ta była w stanie wyjaśnić nie tylko nietypowe właściwości czynnika ale także np. brak immunogenności tak charakterystyczny dla encefalopatii gąbczastych (22, 23).

Stosunkowo szybko okazało się jednak, że obecność błon komórkowych nie jest warunkiem niezbędnym do zachowania infekcyjności *scrapie* (59). W eksperymentach z użyciem wirowania przy przyspieszeniach rzędu 10^5 G uzyskano frakcję zawierającą wysokie miano infekcyjności *scrapie* a praktycznie pozbawioną elementów błonowych. Tak więc hipoteza błonowa tj. zakładająca, że sam czynnik infekcyjny jest błoną okazała się błędna.

Wyniki kolejnego eksperymentu (59), w którym wirowanie z przyspieszeniem rzędu 10^5 G zostało poprzedzone intensywnym homogenizowaniem *in vitro* wykazały dalszy wzrost miana infekcyjności *scrapie* rzędu 1—5 log co sugeruje uwalnianie czynnika z błon.

Zastosowanie kombinacji wirowań różnicowych przy wzrastających przyspieszeniach z zastosowaniem szeregu detergentów stanowiły podstawę metody służącej do oczyszczania czynnika zastosowanej przez grupę Prusiner'a z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco (26, 27, 28). W pierwszej grupie eksperymentów starano się określić właściwości sedymentacyjne czynnika infekcyjnego z śledziony mysiej *scrapie* oraz opracować najwydajniejsze metody uzyskiwania frakcji o maksymalnie wysokim mianie infekcyjności, a pozbawionej białek i kwasów nukleinowych komórki (77, 82). Wykazano, że czynnik *scrapie* pozostaje w supernatancie S_1 przy $\omega^2 t$ rzędu 10^9 rad²/sek, następnie przy wartościach większych niż 10^{11} rad²/sek zaczyna sedymentować. Stwierdzono także, że tzw. profil sedymentacyjny tj. zależność stopnia sedymentacji czynnika *scrapie* od stosowanych przyspieszeń nie ulega zmianie przy zastosowaniu dezoksycholenu sodu (DOC) lub sonikacji. Fakt ten wskazywał na niezależność czynnika infekcyjnego *scrapie* od błon komórkowych, upłynnianych przez

zastosowany detergent. Podwyższenie temperatury do 80°C przez 30 minut powodujące rozpad rybosomów nie zmieniała profilu sedymentacyjnego *scrapie* ani nie obniżało miana infekcyjności. Wyliczony na podstawie profilu sedymentacyjnego współczynnik sedymentacji $S_{20,w}$ wahał się pomiędzy 400—1200 S, osiągając najwyższą wartość w materiale traktowanym detergentami lub poddanemu działaniu ultradźwięków, co wskazuje na możliwość przyłączenia innych cząsteczek (agregacja do bliżej niezidentyfikowanych składników subkomórkowych lub cząstek czynnika pomiędzy sobą). W kolejnych badaniach mózgu jak i śledziony wykazano obecność mniejszych form czynnika być może jego monomerów, o stałej sedymentacji rzędu 70 S. Pięciokrotne zastosowanie wirowania z przyspieszeniem 121 G a następnie naprzemiennie 3.2×10^9 rad²/s i 1.5×10^{11} rad²/s pozwoliło na uzyskanie frakcji P₅ (od pellet). Stopień oczyszczenia czynnika *scrapie* wynosił 16—23 razy (81). Zastosowana procedura usuwała 95% całkowitego białka i DNA, natomiast jedynie 80% RNA komórki. Czynniki *scrapie* nie ulegał inaktywacji pod działaniem dezoksycholanu sodu, lizolecytyny, RNazy w obecności EDTA i puromycyny. W gradiencie sacharozy wysokie miana infekcyjności *scrapie* stwierdzono wzdłuż całego gradientu tj. od 1.08 do 1.30 g/cm³, przy czym większość czynnika sedymentowała przy gęstości większej od 1.21 g/cm³. Preinkubacja z 0.5 M KCL lub 5 mM EDTA w 37°C, mająca za cel rozpad rybosomów pociągała za sobą odzyskiwanie większości czynnika infekcyjnego z dna gradientu co sugeruje współczynnik sedymentacji większy niż 500 S.

Podstawowym wnioskiem płynącym z kilku analizowanych prac jest stwierdzenie heterogenności populacji czynnika *scrapie*, z wysoką zdolnością do agregacji oraz minimalną wielkości S rzędu 40S, tj. mniej niż najmniejsze wirusy „konwencjonalne” (83). Prusiner i jego grupa wysunęli hipotezę (77, 78, 84), że za nietypowe właściwości czynnika jest odpowiedzialny bliżej niescharakteryzowany rodzaj oddziaływań hydrofobowych grup białkowych czynnika *scrapie*. Przyjęcie hipotezy o oddziaływaniach hydrofobowych byłoby w stanie stosunkowo łatwo wyjaśnić wiązanie czynnika *scrapie* z błonami, agregację oraz oporność na wysokie temperatury (stabilizowanie wiązań hydrofobowych). Z kolei spowodowana białkowymi oddziaływaniami hydrofobowymi zdolność czynnika *scrapie* do agregacji tłumaczyłaby szeroki zakres gęstości gradientów z których odzyskiwano czynnik *scrapie*. Hipotetyczne wiązanie lipidów na powierzchni czynnika wyjaśniłoby niską antygenowość czynnika *scrapie*, czy oporność na degradację za pomocą enzymów proteolitycznych czy nukleaz, w założeniu nie penetrujących poprzez ochronny „płaszcz”.

Niejonowe detergenty Triton 100 i Nonidet P40 nie inaktywowały czynnika *scrapie* podobnie jak niedenaturujące jonowe detergenty — dezoksycholan sodowy i sarkosyl. Denurowający, anionowy, detergent SDS wykazywał własności inaktywujące w stosunku do czynnika *scrapie*, zależne od dawki. Wykazano także brak właściwości inaktywujących czynnika DNazy

I i II, RNazy A i T₁, oraz proteazy K w obecności, lub przy jej braku SDS. Cytowane badania są powtórzeniem badań Millsona (24, 85), w których wykazano brak efektu inaktywującego lizolecytyny, DOC oraz DNazy i RNazy, podczas gdy trypsyna, pronaza, SDS i STAB wykazywały efekt inaktywujący w stosunku do czynnika infekcyjnego scrapie. Autorzy cytowanej pracy podkreślają współzależność pomiędzy stopniem upłynnienia błon przez detergent a stopniem inaktywacji czynnika scrapie (np. 5% SDS upłynnia 99% białek błonowych wykazując jednocześnie efekt inaktywacyjny sięgający $5 \log_{10} ID_{50}$).

Zastosowanie elektroforezy w żelu poliakrylamidowo — agarozowym (2,5% i 0,5% odpowiednio) nie było zbyt wydajne, ze względu na brak penetracji żelu przez czynnik. Z kolei elektroforeza przepływową nie zwiększyła możliwości separacji infekcyjności, aczkolwiek 99% infekcyjności migrowała w kierunku anody (82, 86).

Wykreślenie profilu sedymentacyjnego dla frakcji P₅ po ogrzaniu do 80°C wykazało, że około 90% czynnika scrapie sedymentuje przy wartościach w^2t rzędu $10^7 \text{ rad}^2/\text{s}$, co daje współczynnik sedymentacji S rzędu 10 000 (wielkość mitochondrium).

Zastosowanie elektroforezy w obecności 0,2% sarkosylu polepszało nieco wydajność oczyszczania czynnika scrapie, niemniej nadal większość infekcyjności odzyskiwano z górnych partii żelu (86). Należy jednak podkreślić, że około 30% odzyskiwanej infekcyjności komigrowała z fragmentem restrykcyjnym faga lambda o wielkości 2×10^6 daltonów.

Podstawowym osiągnięciem, które znacznie przyspieszyło opracowanie metody oczyszczenia czynnika, było oparcie pomiaru miana infekcyjności na ocenie okresu inkubacji, a nie jak dotychczas na tzw. miareczkowaniu do punktu końcowego (87, 88, 89). Jednocześnie zastosowano metodę analogiczną do tej jaka służyła do otrzymania frakcji P₅ ze śledzion myszy, a obecnie została zastosowana do otrzymania frakcji P₃ z mózgow chomików. Profil sedymentacyjny frakcji P₃ był analogiczny jak frakcji P₅, przy czym większość czynnika scrapie sedymentowała przy wartościach w^2t rzędu $10^{11} \text{ rad}^2/\text{s}$. Czynnik scrapie był stosunkowo łatwo precypitowany przez polietylenoglikol i siarczan streptomycyny (95%) w obecności znacznych stężeń detergentu i etanolu. Niskie pH, rzędu 5 powodowało znaczny spadek miana infekcyjności, co sugeruje punkt izoelektryczny hydrofobowego białka stanowiącego integralną część czynnika wynoszącą około 5. Podobnie jak w wypadku P₅ ze śledzion myszy zastosowanie detergentów Trion X—100, Nonidet P40, Brij 35 i 56, sulfobetainy 12 i 14 oraz Ammonyx LO nie wpływały na miano infekcyjności frakcji P₃. Podobny efekt wywierały jonowe nie denaturujące detergenty — sole sodowe kwasów cholonowego i dezoksyholowego, jak i kationowy detergent CTAB. Analogicznie w stosunku do frakcji P₅ denaturujący detergent SDS (jak i sól litowa siarczanu dodecyłu) wykazywał efekt inaktywujący. Należy podkreślić, że SDS w obecności detergentów niejonowych, jak NP-40 czy

Ammonyx LO nie inaktywował czynnika *scrapie*. Z kolei jony słabo chaotropowe, jak Cl^- , Br^- , CH_3COO^- , $\text{CLCH}_2\text{COO}^-$ nie inaktywowały czynnika *scrapie* w odróżnieniu od jonów silnie chaotropowych jak SCN^- czy Cl_3COO^- (90).

W kolejnej szerokiej serii eksperymentów poszukiwano metod najbardziej wydajnego oddzielenia czynnika *scrapie* od związanych (w założeniu wiązaniami hydrofobowymi) składników subkomórkowych (91). Rozpuszczenie frakcji P_3 w 4% Trionie X-100 lub 2% dezoksyholanie sodu, podobnie jak w 0.1% SDS nie zwiększała penetracji żelu przez czynnik *scrapie*; większość czynnika *scrapie* otrzymywano nadal z górnych odcinków żelu. Podobnie jak w przypadku mysiej *scrapie* (77, 78, 79, 80, 81, 82) wykazano niewrażliwość czynnika na działanie DNazy I i II, RNazy A i T₁, nukleazy mikrokokalnej, fosfolipazą A₂ i C oraz proteinazą K i szeregiem mieszanin enzymów proteolitycznych, nukleaz oraz lipopolisacharydaz z jadów węży. Ostatecznie opracowana metoda składa się z szeregu kolejnych kroków i trawienia frakcji P_3 nukleazą mikrokokalną oraz proteinazą K, oraz elektroforezą w obecności sarkozyłu. W opisywanych warunkach część czynnika *scrapie* migrowało w żelu za fragmentem restrykcyjnym wielkości 2×10^6 daltonów. Uzyskana frakcja była wzbogacona w stosunku do pozostałych białek i DNA 10^2 — 10^3 razy.

Ulepszona metodyka pozwoliła na przeprowadzenie eksperymentów kluczowych dla wyizolowania białka związanego z infekcyjnością *scrapie* oraz sformułowania hipotezy o białkowej strukturze czynnika infekcyjnego (26, 27, 28). Jak już wspomniano jony słabo chaotropowe nie wpływają na miano infekcyjności, natomiast jony silnie chaotropowe działają inaktywująco. Jony SCN^- (90) wykazały efekt inaktywujący przy czym zastąpienie K^+ przez Na^+ , Li^+ lub guanidynę nasila efekt inaktywujący jonu SCN^- . Usunięcie jonów SCN^- w drodze dializy powoduje ponowny wzrost miana infekcyjności *scrapie*, przy czym efekt taki nie był obserwowany przy użyciu guanidyny. Wykazano także odwracalny (działaniem hydroksylamin) efekt dietylopirokarbonatu (-DEP) powodującego spadek miana infekcyjności *scrapie* (76). DEP powoduje szybką karboetoksylację białek, zwłaszcza zawierających reszty histydylowe. Należy podkreślić, że inaktywujący efekt DEP nie jest obserwowany w nieoczyszczonych preparatach mózgowych, oraz że dodanie RNazy A, BSA lub L-histydyny częściowo wywiera efekt ochraniający w stosunku do DEP. Jak wspomniano częściowo oczyszczone preparaty mózgów zwierząt chorych na *scrapie* bądź nieoczyszczone homogenaty są odporne na działanie enzymów proteolitycznych (24, 26, 27). Użycie proteinazy K w stosunku do frakcji E_6 (frakcje otrzymane w wyniku preparatywnej elektroforezy frakcji P_5) w temperaturze 37°C powoduje spadek miana infekcyjności rzędu 10^4 do więcej niż 10^8 log (92). Trypsyna również inaktywuje czynnik *scrapie*. Wykazano także, że inhibitor proteinazy K fenylo-metylo-sulfonylo-fluorek, (PhMeSO_2F) dodany do frakcji E_6 przed trawieniem, zapobiega spadkowi

miana infekcyjności (92). Jednocześnie miano infekcyjności *scrapie* we frakcji E₆ I nie zmienia się pod działaniem RNazy A i DNazy I. (92). Nie wiadomo, czy białko będące substratem proteiny K jest identyczne z białkiem podlegającym działaniu DEP. Proteinaza K nie jest jedynym enzymem proteolitycznym inaktywującym czynnik *scrapie*. Wykazano podobne działanie pronazy (Millson 24, 93, 94). Ostatnio potwierdzono inaktywujące działanie proteiny K w stosunku do czynnika *scrapie* w częściowo oczyszczonych preparatach (95) co potwierdza wyniki uzyskane przez Prusiner a i jego współpracowników.

Dalsza charakterystyka omawianego białka, oznaczonego obecnie jako PrP (prion protein — patrz niżej), została przeprowadzona we frakcji P₅, otrzymanej w wyniku zmodyfikowanej procedury (96). 50% infekcyjności identyfikowano w drugiej frakcji blisko dna gradientu, podczas gdy większość białka komórki lokalizowała się w górnych partiach gradientu. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym próbek gradientu po jego jodynacji I²⁵ wykazała obecność rozciągniętego prążka o c.c. rzędu 27 000—30 000 daltonów. Wyizolowane białko jest wrażliwe na trawienie proteinazą K, ale jedynie o ile uprzednio zostało zdenaturyzowane. Trawienie proteinazą K bez poprzedzającej denaturacji jest bez efektu. Wstępne wyniki wydają się wskazywać na różny skład aminokwasowy PrP i innych białek izolowanych z mózgow niezainfekowanych chomików (97).

Jednocześnie z próbą oczyszczenia białka związanego z infekcyjnością *scrapie* poszukiwano morfologicznego wykładnika czynnika *scrapie*. Ostatnio Merz ze współpracownikami opisała włókienka towarzyszące *scrapie* (SAEs — *scrapie associated fibrils*), (98). Składały się one z podjednostek w formie filamentów, przy czym dwie lub cztery podjednostki tworzyły jedną strukturę typu SAF. SAF I wykazały strukturę helikalną, SAF II były utworzone z filamentów przebiegających równolegle. SAFs zwróciły baczniejszą uwagę (początkowo traktowane jako jeszcze jeden element patologii włókienkowej w *scrapie*, np. przypominający sparowane podwójne filamenty choroby Alzheimera — (99) ponieważ okazało się, że towarzyszą nie tylko *scrapie* ale także chorobie Creutzfeldta-Jakoba (100). Badania elektrono-mikroskopowe frakcji P₅ przez grupę Prusiner a także wykazały obecność tworów pałeczkopodobnych (w nomenklaturze Prusiner a — *flatten rods*) średnicy 25 nm i długości 100—200 nm. (99, 101). Opracowanie metodyki polegającej na kolejnych wirowaniach z maksymalnymi przyspieszeniami rzędu 215 000×G oraz włączonych trawieniach proteinazą K i nukleazą mikrokokalną (102, 103) pozwoliło uzyskać frakcję (tzw. P_{215s}) bardzo znacznie wzbogaconą w SAFs. SAFs otrzymane z frakcji P_{215s} występowały jako pałeczki, sformowane z helikalnie skręconych filamentów o średnicy 4—6 nm (104). Tak uzyskane SAFs były nieco krótsze (50—300 nm) niż pierwotnie opisane (98, 100), co przypisano nieznacznym różnicom metod. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS wykazała, że większość srebrochłonnego materiału (90%)

dawała się odzyskać z dna gradientu. Głównym prążkiem charakterystycznym dla *scrapie* było pasmo komigrujące z alfa-chymotrypsynogenem, co sugeruje wielkości 26 000 (104, 105). Wydaje się, że PrP wykazuje mikroheterogenność podczas elektroforezy w żelu (106, 107). Dane prezentowane na sympozjum EMBO pozwoliły na powiązanie PrP i SAFs. Wykazano obecność SAFs w przypadkach myszy, chomików i małpy wiewiórkowatej zainfekowanej szczepami 139A, ME7, 22A, 87V, 263K i C50G *scrapie* (106). SAFs wyizolowane z różnego materiału (różne szczepy *scrapie* charakteryzowane różnymi obrazami histopatologicznymi oraz odmiennymi okresami inkubacji (wykazują pewne różnice budowy ultrastrukturalnej. Białko, (PrP) powiązane z SAFs ma c.c. rzędu 21 500—31 000, zarówno przy wyizolowaniu z materiału chemicznego jak i myszy. Białko izolowane z mózgow myszy zakażonych szczepem 87V rozdziela się na dwa prążki podczas elektroforezy w żelu, natomiast białka izolowane z mózgow mysich zakażonych szczepami 22A, ME7 i 139A rozdziela się na trzy lub cztery prążki (106). Wykazano także, że działanie proteinazy K, 2% SDS i 6M mocznika powoduje spadek obserwowanej liczby SAFs na jednostkę powierzchni. Zjawiska tego nie wywołuje trypsyna. Prusiner (97) wykazał związek pomiędzy SAFs a PrP (106, 107) sugerując, że każdy SAF jest agregatem do 10^8 PrP o c.c. od 27 do 30 000 daltonów, przy czym na jedną ID_{50} przypadają od 10 do 100 SAFs. Działanie ultradźwięków rozbija SAFs na fragmenty poniżej 100 nm. Wykazano także (97, 106, 107), wiązanie przez SAFs czerwieni kongo, sugerowałyby to, iż SAFs stanowią w istocie włókienka amyloidu.

IV. Wirino czy prion. Wnioski

W 1982 roku wysunięto hipotezę, że czynnik *scrapie* jest w rzeczywistości odmiennym od dotychczas zidentyfikowanych typem patogenu i nadano mu nazwę prion (od *proteinaceous infectious particle* — z przestawionymi samogłoskami). Podstawowymi pośrednimi danymi mającymi świadczyć o białkowej naturze czynnika *scrapie* są:

1. inaktywacja czynnika pod wpływem proteinazy K (90, 101, 106, 107),
2. inaktywacja poprzez modyfikację chemiczną działaniem DEP (26, 27, 28),
3. inaktywacja czynnika przy użyciu detergentu SDS,
4. inaktywacja działaniem jonów silnie chaotropowych (26, 27, 28, 91),
5. inaktywacja pod działaniem fenolu (22, 23, 24) oraz mocznika (22, 23, 24).

Uzyskano także wyniki świadczące o inaktywującym działaniu fenylo-metylo-sulfonylo-fluorku i butanedionu, związku modyfikującego reszty argininowe (101). O białkowej naturze czynnika *scrapie* poza danymi przytoczonymi w pierwotnej wersji hipotezy Prusiner'a świadczą także

nowsze obserwacje nad białkiem (PrP), charakterystycznym dla *scrapie* i wrażliwym na trawienie proteinazą K po uprzednim zdenaturowaniu (97, 106, 197).

Jednocześnie wszystkie przytoczone wyżej dane sugerują brak wrażliwości kwasów nukleinowych na działanie inaktywujące (97, 106, 107) brak też danych świadczących, że czynnik *scrapie* zawiera DNA lub RNA (26, 27, 28, 72). Innym możliwym wyjaśnieniem pewnych niepowodzeń eksperymentalnych jest możliwość, iż metody służące izolowaniu kwasów nukleinowych inaktywują jednocześnie czynnik *scrapie*. Przykładowym tutaj związkiem jest fenol (22, 23, 24). Ostatnio wykonano także szereg eksperymentów porównujących działanie kilku metod inaktywacji wiroidu wrzecionowatości bulw ziemniaków (potato spindle tuber viroid — PSTV) i czynnika *scrapie* (108). PSTV jest jedynie nieznacznie inaktywowany działaniem DEP, natomiast hydroksylamina, która przywraca aktywność inaktywowanych przez DEP preparatów *scrapie*, wywiera w stosunku do PSTV działanie inaktywujące. Podobnie psoraleny, nieaktywne w stosunku do czynnika *scrapie* (73, 76) wykazują działanie inaktywujące w przypadku PSTV. Hydroliza DNA i RNA w podwyższonej temperaturze w obecności jonów Zn^{++} inaktywuje kompletnie PSTV i nie wpływa na aktywność preparatów *scrapie*. Podobnie PSTV jest odporny na inaktywujące działanie „silnych” jonów chaotropowych — np. SCN^- . W konkluzji raz jeszcze wykazano, że czynnik *scrapie* różni się znacznie od struktur zawierających kwasy nukleinowe. Wysłunięcie hipotezy o białkowej naturze czynników *scrapie* (26, 27, 28) pociągnęło natychmiast pytanie o mechanizmy replikacji prionu, o ile taka miałaby być niezależna od DNA lub RNA. Wielkość prionu nie wyklucza jednak obecności małego, ciasno upakowanego oligonukleotydu, mogącego działać jako element regulacyjny, a nie jako matryca. Ale prion może w rzeczywistości nie zawierać DNA lub RNA i replikować się poprzez aktywację preegzystujących w genomie sekwencji. Innymi, również nieortodoksyjnymi możliwościami są odwrotna translacja i synteza białka zależna od białka a nie kwasu nukleinowego.

Hipoteza o białkowej i tylko białkowej naturze czynnika *scrapie* spotkała się z krytyką (29, 30, 32, 31), głównie zresztą z powodu wprowadzenia nazwy „prion” jako przedwczesnej, ale także ponieważ wprowadzała dodatkowe założenia — np. odwrotnej translacji, czy promocji własnej syntezy, co nie ma żadnego odpowiednika w danych eksperymentalnych. Wydaje się obecnie, iż dane świadczące o braku DNA lub RNA, nie są ostateczne. Kimberlin (29, 30) w swojej podstawowej krytyce proponował, specyficzny dla *scrapie* kwas nukleinowy nie podlegający translacji — podobnie jak RNA wiroidów (110, 111), oraz, iż rozwój objawów choroby jest zależny od bliżej nieokreślonej interakcji oligonukleotydu DNA lub RNA z systemami regulacyjnymi genomu gospodarza.

Podstawowym, trudnym do pogodzenia z założeniem o odwrotnej translacji, czy promocji własnej syntezy prionu, jako mechanizmów jego repli-

kacji, jest fakt istnienia szczepów *scrapie*, o stabilnych właściwościach genetycznych (11, 12). Poprzez szczepy rozumiemy odmiany czynnika o ustalonym okresie inkubacji w danym genotypie gospodarza, ustalonym pod względem genu *Sinc* (od *Scrapie incubation period*), charakterystycznej topografii uszkodzeń (16, 17, 18) danej klasie stabilności (112, 113). Szczególnie istotne jest, że pewne szczepy cechuje nieciągła zmienność swoich właściwości — co określa się jako mutację (111), a szereg szczepów wykazuje zjawisko kompetycji pomiędzy sobą (111). Należy jednak zaznaczyć, że stabilność genetyczna szczepów *scrapie* nie jest pełna — znany jest na przykład fakt utraty zdolności infekowania pierwotnego gospodarza po przepasazowaniu przez zwierzę innego gatunku (30, 21, 32). W chwili obecnej trudno przyjąć mechanizm replikujący białko o tak wysokiej specyficzności i powtarzalności, inny niż poprzez translację informacji zawartej sekwencjach DNA lub RNA.

Podstawowym pytaniem jest czy PrP jest integralną częścią czynnika *scrapie*. Nie udało się dotąd wykazać, żeby jedynie PrP było odpowiedzialne za infekcyjność. Zaobserwowano jedynie zbieżność pomiędzy obecnością SAFs (rods) a mianem infekcyjności lecz pomiędzy liczbą SAFs a ilością białka istnieje korelacja odwrotna. Ostatnie badania sugerują, że SAFs (rods) stanowią jedynie formę amyloidu (106, 107, 113) nie infekcyjną *per se*, lecz stanowiącą produkt powstający w czasie procesu chorobowego.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że obecne skąpe i w większości pośrednie dane wskazują, iż istnieje białko powiązane z czynnikiem infekcyjnym *scrapie*. Nie wiadomo jednak czy stanowi ono integralną część czynnika infekcyjnego *scrapie*, czy jest ono infekcyjne jako takie, nieznane są także mechanizmy replikacji ani interakcji prowadzących do rozwoju objawów choroby.

Występowanie SAFs (rods) oraz dane sugerujące, iż nietypowe właściwości czynnika *scrapie* obserwuje się jedynie w części populacji czynnika mogą wskazywać, że czynnik *scrapie* może nie być tak nietypowy jak to się dotychczas wydawało. Być może jego właściwości są pochodną silnie hydrofobowych właściwości białek czynnika *scrapie* zdolnych do oddziaływań z elementami subkomórkowymi i agregacji, które łącznie maskują jego prawdziwe cechy. Prawdopodobnie najbliższe lata odpowiedzą na te zasadnicze pytania.

Zaakceptowano do druku 15 września 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Dickinson A. G., (1976), w: *Slow virus diseases in animals and man*. Kimberlin R. H., 210—241, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—New York.
2. Gibbs J. C., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alper P. M., Daniel P. M., Beck E., Matthews W. B., (1968), *Science*, **161**, 383—389.

3. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers P. M., (1966), *Nature*, **209**, 794—796.
4. Marsh R. F., Hanson R. P. (1979), w: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. vol. 1, Prusiner S. B., Hadlow W. J., 451—461, Academic Press, New York.
5. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., (1981), *Brain*, **104**, 559—588.
6. Rewcastle N. E., Gibbs C. J., Gajdusek D. C., (1978), *J. Neuro-pathol. exp. Neurol.* **87**, 679.
7. Goudsmit G. C., Morrow H., Asher D. M., Yanagihara R. T., Masters C. L., Gibbs J. C., Gajdusek D. C., (1980), *Neurology*, **30**, 945—950.
8. Williams E. S., Young S., (1980), *I. Wildlife D. S.*, **16**, 89—98.
9. Kelly D. F., Pearson H., Wright A. I., Crecnham L., (1980) w: *The comparative pathology of 200 animals*. Montali R. J., str. 183—188, Smithsonian Inst, Press, Washington.
10. Dickinson A. G., Bruce M., Scott J. R., (1983) w: *Banbury Report 15 Biological aspects of Alzheimer's disease* str. 387—398, Cold Spring Harbor Lab, Cold spring Harbor.
11. Dickinson A. G., Fraser H., (1977), w: *Slow virus infections*. ter Meulen V., Katz M., str. 3—14, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
12. Dickinson A. G., Fraser H., (1979), w: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 367—385, Academic Press, New York.
13. Dickinson A. G., Outram G. W., (1979) w: *Slow transmissible disease of the nervous system*. vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 14—31 Academic Press, New York.
14. Outram G. W., (1976), w: *Slow virus infection of animals and man*, Kimberlin R. H., str. 325—357, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—New York.
15. Outram G. W., (1979), w: *Animals model of neurological diseases*. Rose F. C., str. 357—377, Pitman Med, London.
16. Fraser H., (1979), w: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 387—406, Academic Press, New York.
17. Fraser H., (1979), w: *Progress in neurological research with particular reference to motor neuron disease*, Behan P. O., Rose F. C., str. 194—210, Pitman Med, London.
18. Fraser H., w: *Aspects of slow persistent virus infections*. Tyrrell A. J., str. 30—60, Martinus Nijhoff, Hague.
19. Liberski P. P., (1981), *Post. Hig. Med. Dořw.* **35**, 471—493.
20. Liberski P. P., (1982), *Post. Hig. Med. Dořw.* **36**, 133—170.
21. Liberski P. P., (1983), *Post. Hig. Med. Dořw.* **37**, 141—176.
22. Gajdusek D. C., (1976), w: *Les prix Nobel en 1976*, str. 167—216, P. A. Norstedt Soner, Stockholm.
23. Gajdusek D. C., (1977), *Science*, **197**, 943—960.
24. Millson G. C., Hunter G. D., Kimberlin R. H., (1976), w: *Slow virus diseases of animals and man*, Kimberlin R. H., str. 243—266, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—New York.
25. Kimberlin R. H., (1976), *Ser. Prog. Oxf.* **63**, 461—481.
26. Prusiner S. B., (1982), *Science*, **216**, 136—144.
27. Prusiner S. B., (1982), *Neurology*, vol. 4, Appel H., str. 201—222 John Wiley and Sons, Inc, New York.

28. Prusiner S. B., (1983), w: Banbury report 15: biological aspects of Alzheimer's disease, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring.
29. Kimberlin R. H., (1982), *Nature*, **297**, 107—108.
30. Kimberlin R. H., (1982), *Trends in neurol. sci.*, **7**, 392—394.
31. Liberski P. P., (1984), *Neurol. Neurochir. Polska*, **18**, 52—56.
32. Johnson R. T., (1980), *Trends in neurol. Sci.*, **5**, 1—2.
33. Chandler R. L., (1959). *Vet. Res.*, **71**, 58.
34. Kimberlin R. H., Marsh R. F., (1978), *J. Infect. Dis.*, **131**, 97—103.
35. Kimberlin R. H., Walker C. A., (1979), *J. Gen. Virol.*, **42**, 107—117.
36. Manuelidis E., Kim J., Angelo J., Manuelidis L., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 223—227.
37. Manuelidis E. E., Gorgacz E. J., Manuelidis L., (1978), *Nature*, **271**, 778—779.
38. Manuelidis E. E., Manuelidis L., (1979) w: Slow transmissible diseases of the nervous system. vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 147—173, Academic Press, New York.
39. Manuelidis E. E., Manuelidis L., (1979), w: Progress in neuropathology, Zimmerman H. M., str. 1—26, Raven Press, New York.
40. Kim J., Manuelidis E. E., (1983), *Pathol. annual*, **18**, 359—373.
41. Tateishi J., Sato Y., Koga M., Ohta M., Kuroiwa Y., (1979), w: Slow transmissible diseases of the nervous system. vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 175—183, Academic Press. New York.
42. Tateishi J., Sato Y., Koga M., Doi H., Ohta M., (1980), *Acta Neuropathol.* (Berlin), **51**, 127—134.
43. Sato Y., Ohta M., Tateishi J., (1980), *Acta Neuropathol.* (Berlin), **51**, 135—149.
44. Tateishi J., Doi Y., Sato Y., Suetsugu M., Ishii K., Kuroiwa Y., (1981), *Acta Neuropathol.*, **53**, 161—163.
45. Tateishi Y., Sato Y., Ohta M., (1983) w: Progress in neuropathology, vol. 5, Zimmerman H. M., str. 195—222, Raven Press, New York.
46. Liberski P. P., (1984) w: EMBO meeting „Scrapie and related unconventional infections”, New Battley Abbey.
47. Brown P., (1984), w: Targets for design of antiviral agents, de Clercq E., Walker R. T., str. 131—156, Plenum Publ. Corp. New York.
48. Alper T., Haig D. A., Clarke M. C., (1966), *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **22**, 278—284.
49. Field E. J., Famer F., Caspary E. A., Joyce G., (1969), *Nature*, **222**, 90—91.
50. Latarjet R., Muel B., Haig D. A., Clarke M. C., Alper T., (1970), *Nature*, **227**, 1341—1343.
51. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Latarjet R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6268—6270.
52. Latarjet R., (1979), w: Slow transmissible diseases of the nervous system, Prusiner S. B., Hadlow W. J., Academic Press, New York, str. 387—407.
53. Alper T., Cramp W. A., Haig D. A., Clarke M. C., (1967), *Nature*, **214**, 764—766.
54. Alper T., Haig D. A., Clarke M. C., (1978), *J. Gen. Virol.* **41**, 503—516.
55. Rohwer R., Gajdusek D. C., (1980), w: Abstracts of the 9-th Annual ICN-UCLA symposia on molecular and cellular biology, Keystone.
56. Rohwer R., Gajdusek D. C., (1980), w: Search for the cause of multiple sclerosis and other chronic generative disorders of the central nervous system, Boese A., str. 333—355, Verlag Chemie, Weinheim.

57. Rohwer R., (1984), *Nature*, **308**, 658—661.
58. Gibbons R. A., Hunter G. D., (1976), *Nature*, **215**, 1041—1043.
59. Malone T. G., Marsh R. F., Hanson R. P., Semancik J. C., (1978), *J. Virol.* **25**, 933—935.
60. Dougherty R. M., (1964), w: *Techniques in exp. virol.* Harris R. J. C., str. 169—224, Academic Press, New York.
61. Rohwer R., (1984), *Science*, **223**, 600—602.
62. Rohwer R., (1984), w: EMBO meeting „Scrapie and related unconventional infections”, New Battley Abbey.
63. Adams D. H., Caspary E. A., Field E. J., (1969), *J. Gen. Virol.* **4**, 89—100.
64. Adams D. H., Caspary E. A., Field E. J., (1979), *Arch. fur die gesamte Virusforsch.* **30**, 224—237.
65. Adams D. H., (1972), *J. Neurochem.* **19**, 1880—1882.
66. Hunter G. D., (1979), w: *Slow transmissible diseases of the nervous system.* vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 365—385, Academic Press, New York.
67. Marsh R. F., Malone T. G., Semancik J. S., Lancaster W. D., Hanson W. D., (1978), *Nature*, **275**, 146—147.
68. Malone T. G., Marsh R. F., Hanson R. P., Semancik J. S., (1979), *Nature*, **278**, 575—576.
69. Marsh R. F., Malone T. G., Lancaster W. D., Hanson R. P., Semancik J. S., (1978), w: *Persistent viruses*, Stevens J. G., str. 581—590.
70. Marsh R. F., Malone T. G., Semancik J. S., Hanson R. P., (1980), w: *Search for the cause of multiple sclerosis and other degenerative disorders of the central nervous system.* Boese A., str. 314—320, Verlag Chemie, Weinheim.
71. German T. L., Marsh R. F., (1983), w: *Progress in molecular and sub-cellular biology*, vol. 8, Hahn F. E., str. 111—120, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
72. Manuelidis E. E., Manuelidis L., (1981), *Virology*, **109**, 435—443.
73. Borrás M. T., Kingsbury D. T., Gajdusek D. C., Gibbs J. C., (1982), *J. Gen. Virol.* **58**, 263—271.
74. Borrás T., Gibbs C. J., (1981), w: *Abstracts of the 5th Int. congress of virology*, Strassbourg.
75. McKinley M. P., Masiarz F. R., Isaacs S. T., Hearts J. E., Prusiner S. B., (1983), *Photoch. Photobiol.* **37**, 539—545.
76. McKinley M. P., Masiarz F. R., Prusiner S. B., (1981), *Science*, **214**, 1259—1261.
77. Prusiner S. B., Garfin D. E., Baringer J. R., Cochran S. P., w: *Persistent viruses*, Stevens J., Todaro G., Fox C. F., str. 591—613, Academic Press, New York.
78. Prusiner S. B., Garfin D. E., Baringer J. R., Cochran S. P., (1979), w: *Slow transmissible diseases of the nervous system* vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 425—464, Academic Press, New York.
79. Prusiner S. B., Hadlow W. J., Eklund C. M., Race R. E., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4656—4660.
80. Prusiner S. B., Hadlow W. J., Eklund C. M., Race R. E., Cochran S. P., (1978), *Biochem.*, **17**, 4987—4992.
81. Prusiner S. B., Hadlow W. J., Garfin D. E., Cochran S. P., Baringer J. R., Race R. E., Eklund C. M., (1978), *Biochem.*, **17**, 4993—4999.
82. Prusiner S. B., Garfin D. E., Cochran S. P., McKinley M. P.,

- Groth D. F., Hadlow W. J., Race R. E., Eklund C. M., (1980), *J. Neurochem.* **35**, 574—582.
83. Rohwer R., Brown P., Gajdusek D. C., Gibbs C. J., (1979), w: *Slow transmissible diseases of the nervous system*, vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 465—478, Academic Press, New York.
84. Prusiner S. B., Garfin D. E., Cochran S. P., Baringer J. R., (1979), *Trans. Am. Neurol. Sci.* **103**, 1—3.
85. Millson G. C., Manning J., (1979) w: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. bol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 409—424, Academic Press, New York.
86. Prusiner S. B., Groth D. F., Bildstein C., Masiarz F. R., McKinley M. P., Cochran S. P., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2984—2988.
87. Prusiner S. B., Groth D. F., Cochran S. P., Masiarz F. R., McKinley M. P., Martinez H. M., (1980), *Biochem.* **21**, 4883—4891.
88. Prusiner S. B., Cochran S. P., Groth D. F., Downey D. E., Bowman K. A., Martinez H. M., (1981), *Ann. Neurol.* **11**, 353—358.
89. Prusiner S. B., Cochran S. P., Groth D., Hadley D., Martinez H. M., Hadlow W. J., (1980), w: *Aging of the brain and dementia (ageing vol. 13)*. Amaducci L., str. 205—216, Raven Press, New York.
90. Prusiner S. B., Groth D. F., McKinley M. P., Cochran S. P., Bowman K. A., Kaspar K. C., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4606—4610.
91. Prusiner S. B., Groth D. F., Cochran S. P., McKinley M. P., Masiarz F. R., (1980), *Biochem.* **19**, 4892—4898.
92. Prusiner S. B., McKinley M. P., Groth D. F., Bowman K. A., Mock N. I., Cochran S. P., Masiarz F. R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6675—6679.
93. Cho H. I., (1980), *Intervirology*, **14**, 213—216.
94. Cho H. I., (1983), *Can. J. Comp. Med.*, **47**, 494—496.
95. Lax A. J., Millson G. C., Manning E. J., (1983), *Res. vet. Sci.* **34**, 155—158.
96. Bolton D. C., McKinley M. P., Prusiner S. B., (1982), *Science*, **218**, 1309—1311.
97. Prusiner S. B., (1984), w: EMBO meeting „Scrapie and related unconventional infections”, New Battley Abbey.
98. Merz P. A., Sommerbille R. A., Wiśniewski H. M., Iqbal K., (1981), *Acta Neuropath. (Berl.)* **54**, 63—74.
99. Wiśniewski H. M., Merz G. S., Merz P. A., Wen G. Y., Iqbal K., (1983), w: *Progress in Neuropathology*, vol. 5, Zimmerman H. M., str. 139—150, Raven Press, New York.
100. Merz P. A., Somerville R. A., Wiśniewski H. M., Manuelidis E. E., Manuelidis L., (1983), *Nature*, **306**, 474—476.
101. Prusiner S. B., Bolton D. C., Groth D. F., Bowman K. A., Cochran S. P., McKinley M. P., (1982), *Biochem.* **21**, 6942—6950.
102. Diringier H., Hilmert H., Simon D., Werner E., Ehlers B., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **134**, 555—560.
103. Hilmert H., Diringier H., (1984), *Biosci. Rep.* **4**, 165—170.
104. Diringier H., Gelderblom H., Hilmert H., Ozel M., Edelbuth C., Kimberlin R. H., (1983), *Nature*, **306**, 476—478.
105. Diringier H., (1984), w: EMBO meeting „Scrapie and related unconventional infections”, New Battley Abbey.

106. Prusiner S. B., McKinley M. P., Bowman K. A., Bolton D. C., Bendheim P. E., Groth D. F., Glenner G. G., (1983), *Cell*, **35**, 349—358.
107. McKinley M. P., Bolton D. C., Prusiner S. B., (1983), *Cell*, **35**, 57—62.
108. Merz P. A., (1984), EMBO meeting „Scrapie and related unconventional infections”, New Battley Abbey.
109. Rohwer R., (1984), *Lancet*, **36**.
110. Diner T. O., McKinley M. P., Prusiner S. B., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5220—5224.
111. Diener T. O., (1983), *Intervirolog*, **22**, 1—6.
112. Riesner D., Colpan M., Goodman T. C., Nagel L., Schumacher J., Steger G., (1983), *J. Biomol. Str, Dyn.* **1**, 669—688.
113. Bruce M. E., Dickinson A. G., (1979), w: Slow transmissible diseases of the nervous system. vol. 2, Prusiner S. B., Hadlow W. J., str. 71—86. Academic Press, New York.
114. Fraser H., Bruce M. E., (1983), w: Immunology of Nervous system infections, Prog. Brain, Res, vol. 59, Behan P. O., ter Meulen V., Rose C. F., str. 281—290, Elsevier Sci, Publ, Amsterdam.
115. Sommerville R. A., (1984), w: EMBO meeting „Scrapie and related unconventional infections”, New Battley Abbey.

Addendum

Już po oddaniu do druku uzyskano szereg danych całkowicie zmieniających pogląd na znaczenie PrP w biologii molekularnej czynnika *scrapie*. Procedura opracowana dla uzyskania PrP *scrapie* okazała się także przydatna w badaniach nad CJD (1—4). Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym wykazała obecność czterech charakterystycznych dla CJD prążków: o c.c. 18—20, 22—24, 26—29 i 43—46 000 daltonów. Białka te są odporne na trawienie proteinazą K. Relacje pomiędzy PrP o c.c. 27—30 000 daltonów a wyżej wymienionymi białkami nie są znane. Białka CJD i PrP wykazują reaktywność krzyżową przy użyciu surowicy króliczej skierowanej przeciw PrP, przy czym aktywność tej surowicy w stosunku do białek jest dwustukrotnie niższa niż w stosunku do PrP.

PrP i białka CJD są sialkoglikoproteidami (3—5). PrP wykazuje heterogenność ładunku (punkt izoelektryczny ośmiu heteroizomerów pomiędzy pH 4.6 a 7.8). Neuraminidaza redukuje liczbę heteroizomerów PrP do czterech (punkt izoelektryczny pomiędzy pH 6.5 a 7.5). Trawienie endoglikozydazą H wykazuje podobne efekty, z tym, że liczba heteroizomerów ładunku po trawieniu wynosi sześć. Wykazano także wiązanie PAS przez PrP, co przemawia za obecnością reszt oligocukrowych w cząsteczce PrP. W analogiczny sposób należy interpretować wiązania lektyn do białka CJD (4).

Analiza składu aminokwasowego PrP (5) wykazała najczęstsze występowanie glicyny, glutaminy (kwasu glutaminowego) oraz asparaginy (kwasu asparaginowego). Jest to skład podobny do składu aminokwasowego białek amyloidu i sugeruje obecność struktur beta-łańdugowych. Określono

także sekwencję 15 aminokwasów N-końca PrP. Sekwencja ta: Gly-Gln-Gly-Gly-Gly-Thr-His-Asn-Gln-Trp-Asn-Lys-Pro-Ser-Lys jest sekwencją unikalną i nie wykazuje homologii z sekwencją żadnego znanego białka.

Znajomość sekwencji N-końca PrP 27—30 pozwoliła na zsyntetyzowanie 32 komplementarnych oligonukleotydów, które posłużyły do stwierdzenia obecności sekwencji homologicznej w genomie zainfekowanych zwierząt (6). Do syntezy cDNA posłużyły poli-A-RNA wyizolowane podczas eksponencjalnej fazy wzrostu czynnika *scrapie*. cDNA sklonowano w komórkach *E. coli* DH1, posługując się wektorem pHG327. Jedną kolonię wykazującą obecność fragmentu cDNA znaleziono wśród 150 000 kolonii *E. coli*. Sklonowany fragment cDNA wycięto posługując się restryktazą BamH I, przecięto na dwa fragmenty z pomocą restryktazy Hind III i zsekwencjonowano. Interesujący fragment składał się z 1918 nukleotydów poprzedzonych strukturą 33G i zakończonych poli-A (56 reszt). N-końcowy fragment odpowiadał sekwencji PrP (4). Posługując się fragmentem cDNA PrP wyznakowanym 32P przebadano chromosomowy DNA chomika. Okazało się, że gen o sekwencji homologicznej wobec cDNA jest obecny w komórkach mózgow zwierząt zakażonych i niezakażonych. Podobnie białko PrP jest obecne w komórkach mózgow zwierząt zakażonych i zdrowych. Posługując się identycznymi metodami uzyskano równocześnie analogiczne wyniki w innym laboratorium (7).



Ryc. 2. Układ białek otrzymywanych w wyniku procedury opracowanej przez Dirinera (patrz tekst) po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym, w obecności SDS. Żele: 1—2 żele kontrolne (niezainfekowane chomiki szczepu Aura), żele 3—5 zwierzęta zakażone *scrapie* (3 — chomiki szczepu Aura, 4—5 — szczepu Clac). Zwraca uwagę obecność prążka o c.c. 25 000 daltonów (25KD) nieobecnego w żelach kontrolnych. Białko to odpowiada białku PrP (patrz addendum).

Obecność PrP jak i genu PrP w niezainfekowanych komórkach nasuwa dwie podstawowe możliwości interpretacji (6—9). Pierwszą najbardziej prawdopodobną, że PrP jest normalnym białkiem neuronów, wchodzącym następnie w skład SAFs — produkt (amyloidu) tworzącego się podczas infekcji *scrapie*. Druga, że PrP podlega modyfikacjom postranslacyjnym, które prowadzą do jego ekspresji w czasie trwania choroby. Wydaje się także, że kolejna faza poszukiwań czynnika infekcyjnego *scrapie* zakończyła się niepowodzeniem.

Podziękowania

Autor wyraża podziękowanie Profesorowi dr Heino Diringerowi z Robert Koch Institut w Berlinie Zachodnim za udostępnienie materiału ilustracyjnego wykorzystanego w pracy, Docentowi J. Albrechtowi z Zespołu Neuropatologii CMDiK PAN za krytyczne uwagi dotyczące pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Bendheim P. E., Bockman J. M., McKinley M. P., Kingsbury D. T., Prusiner S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985), **82**, 997—1001.
2. Bockman J. M., Kingsbury D. T., McKinley M. P., Bendheim P. E., Prusiner S. B., *New Engl. J. Med.*, (1985), **312**, 73—78.
3. Bolton D. C., Meyer R. K., Prusiner S. B., *J. Virol.*, (1985), **53**, 596—606.
4. Manuelidis L., Valley S., Manuelidis E. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985), **82** (w druku).
5. Prusiner S. B., Groth D. F., Bolton D. C., Kent S. B., Hood L. E., *Cell*, (1984), **38**, 127—134.
6. Oesch B., Westway D., Walchli M., McKinley M. P., Kent S. B., Aebersold R., Barry R. A., Tempst P., Teplow D. B., Hood L. E., Prusiner S. B., Weissmann C., *Cell*, (1985), **40**, 735—746.
7. Chesbero B., Race R., Wehrly K., Nishio J., Bloom M., Lechner D., Bergstrom S., Robins K., Mayer L., Keith J. M., Garon C., Haase A., *Nature*, (1985), **315**, 331—333.
8. Robertson H. D., Branch A. D., Dahlberg J. E., *Cell*, (1985), **40**, 725—727.
9. Haris T., *Nature*, (1985), **315**, 275.

SŁOWNICTWO BIOCHEMICZNE

EWA KOPIECZNA-GRZEBIENIAK *, DANUTA JAKUBOWSKA **

Syntaza czy syntetaza karbamoilofosforanowa?

Carbamoyl — phosphate synthase or synthetase?

Praca zawiera krytykę dowolności w stosowaniu nazw oraz klasyfikacji numerycznej enzymów syntetyzujących karbamoilofosforan, metabolitu pośredniego zużywanego w cyklu mocznikowym i biosyntezie pirymidyn, przedstawia też mechanizm działania syntetazy karbamoilofosforanowej I jako ligazy. Enzym ten, oznaczony skrótem CPS I, w najnowszych polskich podręcznikach biochemii nazywany jest przez jednych autorów syntazą (1, 2, 3), przez innych syntetazą karbamoilofosforanową (4, 5). Jeszcze inni autorzy używają obydwu tych nazw (6, 7).

Według zaleceń Komisji Słownictwa IUB termin syntaza można stosować w przypadku każdego enzymu klasy 4 lub enzymów innych klas (z wyjątkiem enzymów klasy 6), gdy chodzi o podkreślenie syntetycznego aspektu reakcji (8). Stosowanie nazwy syntaza karbamoilofosforanowa było więc uzasadnione tylko do czasu kiedy uważano, że enzymy syntetyzujące karbamoilofosforan są transferazami (11—19).

Jednak nawet autorzy zaliczający ten enzym do klasy transferaz różnie go klasyfikują. Jedni podają jego zaszeregowanie w spisie enzymów jako E.C.2.6.1.13 (11), co wskazywałoby błędnie, że CPS I jest aminotransferazą, inni autorzy uważają, że enzym ten przenosi grupy zawierające fosfor, czyli że jest kinazą. Także jednak ci autorzy stosują różną klasyfikację numeryczną. I tak, niektórzy nieprawidłowo oznaczają CPS I jako E.C.2.7.2.2. (fosfotransferaza ATP: karbaminian, czyli kinaza karbaminianowa) (12, 13, 14); inni oznaczają CPS I numerem E.C.2.7.2.5. (fosfotransferaza ATP: karbaminian defosforylująca) (15, 16, 17, 18, 19).

Według innej (2, 5), niepełnej definicji, syntazy to szczególnie rodzaj liaz. Reakcje katalizowane przez te enzymy nie wymagają wkładu energii ze strony ATP. Równowaga reakcji przesunięta jest w kierunku syntezy, stąd ich nazwa. W jednym przypadku (10), zupełnie nieprawidłowo, podano nawet charakterystykę CPS I jako E.C.4.1.1.15.

W ostatnich latach CPS I w piśmiennictwie światowym występuje pod

*) Dr nauk med., **) Dr nauk med., Zakład Biochemii i Chemii Śląskiej Akademii Medycznej, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice

Wykaz stosowanych skrótów: CP — karbamoilofosforan, CPS I — syntetaza karbamoilofosforanowa I, CPS II — syntetaza karbamoilofosforanowa II.

numerem E.C.6.3.4.16. (9, 20, 21, 22, 23). Pełna jego nazwa brzmi: ligaza dwutlenek węgla: amoniak czyli syntetaza karbamoilofosforanowa (amoniak). Biotyna nie jest potrzebna do aktywacji dwuwęglanu jak uważano wcześniej (4).

Do wytworzenia 1 cząsteczki karbamoilofosforanu CPS I wymaga 2 cząsteczek MgATP (25). Dwie cząsteczki MgATP są używane na oddzielnych etapach. Do 1979 roku uważano, że jedna cząsteczka MgATP zużywana jest do aktywacji dwuwęglanu, w wyniku czego w I etapie reakcji katalizowanej przez CPS I miał powstać kompleks enzym — karboksyfosforan. W II etapie do tego kompleksu przyłączyć miał się NH_4^+ , co miało powodować wytworzenie kompleksu enzym — karbaminian. W III etapie pod wpływem drugiej cząsteczki ATP z kompleksu enzym — karbaminian powstawać miał dopiero karbamoilofosforan (25).

Przebieg syntezy karbamoilofosforanu jest jednak inny. Według Brittona i wsp. (9) CPS I posiada dwa oddzielne miejsca wiązania ATP w centrum aktywnym. N-acetyloglutaminian, a prawdopodobnie także Mg^{++} i K^+ zmieniają konformację białka na bardziej aktywną (25). Pierwszą przyłączoną cząsteczką do enzymu jest ATP, którego grupa fosforylowa odnajdywana jest w CP (9). Następnie z enzymem łączy się ATP z drugą cząsteczką będącą źródłem uwalnianego fosforanu, a następnie dopiero dwutlenkiem węgla. Enzym nie tworzy kompleksu z karbaminianem, natomiast tworzy kompleks: enzym \cdot ATP_BHCO₃ \cdot ATP_A. Ostatni etap reakcji katalizowanej przez CPS I polega na ataku nukleofilowym NH_3 (a nie NH_4^+ prowadzącym do wytworzenia karbamoilofosforanu (9). CPS I należy więc do ligaz, czyli syntetaz. Użycie nazwy sytaza dla enzymów tej klasy zgodnie z przedstawioną wyżej definicją jest błędne (8).

CPS II, enzym również syntetyzujący karbamoilofosforan, w nowszej literaturze zamiast oznaczenia E.C.2.7.2.9. (26) występuje pod numerem E.C.6.3.5.5. (27) i nosi nazwę: amido-ligaza dwutlenek węgla: L-glutamina czyli syntetaza karbamoilofosforanowa (hydrolizująca glutaminę) (8).

Według nowo stosowanej klasyfikacji (8) CPS I i CPS II zakwalifikowano więc do 2 różnych podpodklas zgodnie z ich zapotrzebowaniem substratowym.

Zaakceptowano do druku 15. września 1985 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Lehninger A., (1979), Molekularne podstawy struktury i funkcji komórki, 429, PWRiL.
2. Minakowski W., (1981), Biochemia kręgowców, 253, PWN.
3. Filipowicz B., Więckowski W., (1979), Zarys biochemii, 284, PZWL.
4. Angielski S., Rogulski J., (1982), Zarys biochemii klinicznej i analityki, 352—357, PZWL.

5. Karlson P., (1972), *Zarys biochemii*, 202, PWN.
6. Bryła J., (1983), *Regulacja metabolizmu komórki*, 518 i 595, PWN.
7. Harper H., (1983), *Zarys chemii fizjologicznej*, 561 i 563, PZWL.
8. *Enzyme Nomenclature 1978, 1979*, 437 i 438, Academic Press.
9. Britton H., Rubio V., Grisolia S., (1979), *Eur. J. Biochem.* **102**, 521—530.
10. Bożkowska K., (1983), *Genetycznie uwarunkowane zaburzenia metaboliczne u dzieci*, 158, PZWL.
11. Saheki T., Ohkubo T., Katsunuma T., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 1423—1430.
12. Gautier C., Husson A., Vaillant R., (1977), *Biochimie*, **59**, 91—95.
13. Husson A., Vaillant R., (1982), *Endocrinology*, **110**, 227—232.
14. Oyanagi K., Nakamura K., Sogawa H., Tsukazaki H., Minami R., Nakao T., (1980), *Pediat. Res.*, **14**, 236—241.
15. Chabas A., Grisolia S., Silverstein R., (1972), **29**, 333—342.
16. Mori M., Morris S., Cohen P., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3179—3183.
17. Rattenbury J., Jeacock M., Shepherd D., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **630**, 210—219.
18. Saheki T., Ohkubo T., Katsunuma T., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 1423—1430.
19. Yoshino M., (1980), *Exp. Mol. Path.*, **32**, 253—263.
20. Asai T., Mori M., Miura S., Tatibana M., (1982), *Gann.*, **73**, 728—734.
21. Hensgens H., Verhoeven A., Meijer A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 197—294.
22. Lof C., Wanders R., Meijer A., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 89—94.
23. McIntyre P., DeMartinis M., Hoogenraad M., (1983), *Biochem. Intern.*, **6**, 365—373.
24. Harper H., (1972), *Zarys chemii fizjologicznej*, 385, PZWL.
25. Powers S., Meister A., (1982), *The liver: biology and pathobiology*, red. Arias I., 251—263, Raven Pres., New York.
26. Finney K., O'Sullivan W., (1979), *J. Appl. Biochem.*, **1**, 77—87.
27. Grayson D., Evans D., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 4123—4127.

Uwagi Komisji Słownictwa Biochemicznego na temat nazw „syntazy” i „syntetazy”

Zgodnie z zaleceniami Komisji Słownictwa IUB, zamieszczonymi w „Enzyme nomenclature” z r. 1978, syntetazami nazywamy enzymy należące do klasy 6, katalizujące reakcje przebiegające z hydrolizą trifosfonuklezydów. Nazwę „syntaza” nadaje się enzymom wszystkich klas, oprócz 6, jeśli pragnie się podkreślić syntetyczny aspekt reakcji. Słownictwo to jednak wywoływało i wywołuje wiele nieporozumień, a więc Komisja Słownictwa IUB wprowadziła odpowiednie zmiany w nowym wydaniu „Enzyme nomenclature” (poszerzonym o 2700 haseł), które jest obecnie w druku. Komisja podała do wiadomości wprowadzone zmiany w „Newsletters January 1984”, ogłoszonym w wielu czasopismach, między innymi w *Z. Physiol. Chem.*, (1984), 365, I—V. Poniżej podajemy treść notatki na temat syntaz.

Syntazy

Do Komisji Słownictwa IUB wpłynęło wiele uwag na temat tego, że nazwy „syntaza” i „syntetaza” są zbyt do siebie podobne, aby mogły zadawalająco określić wzajemnie wykluczające się pojęcia. W nowym wydaniu *Enzyme nomenclature* zmieniono więc zalecane nazwy, pozostawiając jednak możliwość użycia dawnych określeń tym, którym odpowiada dotychczasowy sposób. Nazwę „syntaza” można dodawać do nazwy każdej substancji na oznaczenie enzymu katalizującego reakcję, w której ta substancja powstaje. W ten sposób nazwę syntaza można obecnie nadawać także enzymom, katalizującym reakcje przebiegające z hydrolizą trihosfonuklezydów, a więc enzymom, które dotychczas nie mogły nosić tej nazwy. Do nazw „syntaza glikogenowa”, „syntaza cytrynianowa” itp. może dojść obecnie np. „syntaza glutaminowa”, „syntaza NAD⁺”.

Enzymy, katalizujące reakcje z towarzyszącą hydrolizą trifosforanów nukleozydów powinny zawierać raczej określenie „ligaza” niż „syntetaza” w swej nazwie, z wymienieniem łączących się reaktantów. I tak „ligaza tyrozyna-tRNA” i „ligaza octan-CoA” winna zastąpić nazwy „syntetaza tyrozylo-CoA” i „syntetaza acetylo-CoA”. Obok zalecanych nazw, forma „syntetaza” pozostaje jednak nadal jako nazwa dopuszczalna.

Autorzy mogą więc nadal używać słowa „syntetaza” dla wyróżnienia enzymów których reakcje wymagają hydrolizy nukleozydów trifosforanowych, będą oni jednak znacznie lepiej zrozumiani używając nazwę „ligaza”, zważywszy jak wielu biochemików nie rozróżnia znaczenia nazw „syntaza” i „syntetaza”.

SPIS TREŚCI — TOM 31, 1985

ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

K. Bogucka — Współczesne poglądy na mechanizm sprzężenia energetycznego w mitochondriach	Str. 5
J. Kłysik — Czy lewoskrętne Z-DNA może spełniać funkcję biologiczną?	29
M. Gniazdowski — Molekularne mechanizmy hamowania syntezy RNA. Inhibitory oddziaływujące z DNA	53
G. Bartosz, W. Leyko — Białko błony erythrocytu przenoszące aniony	223
L. Lachowicz — Transport głównych kationów w zakończeniach komórek nerwowych	247
A. Kozik — Białka wiążące ryboflawinę	263
J. Ryńca — Udział witaminy K w modyfikacji białek	283
E. Biesiada — Acetylacja histonów	305
M. Wit — Genetyka molekularna głównego kompleksu zgodności tkankowej	323
E. Ziętkiewicz, R. Słomski — Komórkowe antygeny rybonukleoproteinowe	337
B. Olszańska — Rola segmentów poliadenylowych i poliadenylacji RNA w rozwoju embrionalnym	365
E. Vetulani — Neuropeptydy a neurotransmisja	401
G. Kupryszewski — Chemiczna struktura neuropeptydów	421
O. Narkiewicz, L. Nitecka — Rozmieszczenie neuropeptydów w mózgowiu i rdzeniu kręgowym	443
R. Przewłocki — Endogenne systemy opioidowe	463
Z. Herman — Działanie farmakologiczne neurotensyny, substancji P i tuftsyny	487
S. Pużyński — Neuropeptydy a patogeneza i leczenie zaburzeń psychicznych typu endogennego	509
J. Potempa, A. Dubin — Ewolucja struktury i funkcji serynowych enzymów proteolitycznych	531
B. Turyna, A. Guzek — Nieenzymatyczna glikozylacja białek	555
J. Steczko — Zastosowanie żelazianu potasu jako analogu ortofosforanu w modyfikacji centrów aktywnych białek	569
B. Gołoś — Transkrypcje chromosomalne, a transformacja nowotworowa	601
E. Kalinowska — Ekspresja genów wprowadzonych do komórek ssaków metodą transfekcji	617
J. Greger — Enzymy uczestniczące w metabolizmie 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach	631

MINIREVIEW

W. Sokół-Misiak — Sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez hormony glukokortykoidowe w komórkach eukariotycznych	593
--	-----

NOWE W BIOCHEMII

L. Kaczmarek, E. Surmacz — Wpływ 5-metylocytozyny w DNA i 5-azacytodyny na ekspresję niektórych genów u kręgowców	87
D. Hulanicka — Anty-sense RNA, nowy mechanizm regulujący ekspresję genów	585
D. Hulanicka — Rekombinant RNA i jego replikacja	589

Z HISTORII BIOCHEMII

W. Gajewski — Barbara McClintock — laureat Nobla z nauk fizjologiczno- medycznych	Str. 91
--	------------

SŁOWNICTWO

Słownik zalecanych u zwyczajowych nazw enzymów (tłum. J. Kwiatkowska- Korczak, A. Morawiecki, H. Siemieniecki, K. Sobiech, E. Wolna)	95
Słownictwo monosacharydów rozgałęzionych (A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	649
Słownictwo monosacharydów nienasyconych (A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	656
Skrócone nazwy łańcuchów oligosacharydowych (A. Gamian, E. Katzenellen- bogen)	662
Słownictwo polisacharydów (A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	672
Symbole opisujące konformację łańcuchów polisacharydowych (A. Gamian, E. Katzenellenbogen)	677
Słownictwo określające konformację pięcio- i sześcioczłonowych form pierście- niowych monosacharydów i ich pochodnych (A. Gamian, E. Katzenellen- bogen)	687

KRONIKA

Konferencja nt. metabolizmu diadenozynotetrafosforanów, Regensburg, RFN, (H. Jakubowski, A. Guranowski)	207
O profesorze Józefie Chmielu — wspomnienie	219
O profesor Marii Sarneckiej-Keller — wspomnienie	221
O profesorze Włodzimierzu Niemierce — wspomnienie	395
XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 11—20 wrzesień 1984, Olsztyn — (H. Kostyra)	691
Przewodnik po bibliotekach	692

RECENZJE KsiążEK

Z. Zielińska — E. Golowinsky — Biochemie der Antimetabolite	385
W. Rode — Multi forms of Enzyme	695
A. Laskowska — M. Lucker — Secondary Metabolism in Microorganism Plants and Animals	695
A. Czesławski, A. Pitura — Grundlagen der Biopharmazie	696
E. Wałajtyś-Rode — Pathobiochemie in Pathophysiologie es Kohlenhydratstoff- wechsels unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus	679

INDEKS AUTORÓW

B

Bogucka — Współczesne poglądy na mechanizm sprzężenia energetycznego w mitochondriach	5
Bartosz G., Leyko W. — Białko błony erythrocytu przenoszące aniony	223
Biesiada E. — Acetylacja histonów	305

C	Str.
Czesławski A., Pitura A.—Grundlagen der Biopharmazie	696
D	
Dubin A.—(patrz Potempa J., Dubin A.)	
G	
Gniazdowski M.—Molekularne mechanizmy hamowania syntezy RNA. Inhibitory oddziaływujące z DNA	53
Guzdek A.—(patrz Turyna B., Guzdek A.)	
Greger J.—Enzymy uczestniczące w metabolizmie 2'-deoksynukleotydów w mitochondriach	631
Gołos B.—Transkrypcje chromosomalne a transformacje nowotworowe . .	601
Gajewski W.—Barbara McClintock—laureat Nobla z nauk fizjologiczno-medycznych	91
Gamian A., Katzenellenbogen E.—Słownictwo monosacharydów rozgałęzionych	649
Gamian A., Katzenellenbogen E.—Słownictwo monosacharydów nienasyconych	656
Gamian A., Katzenellenbogen E.—Skrócone nazwy łańcuchów oligosacharydowych	662
Gamian A., Katzenellenbogen E.—Słownictwo określające pięcio- i sześcioczłonowych form pierścieniowych monosacharydów i ich pochodnych . .	684
Gamian A., Katzenellenbogen E.—Słownictwo polisacharydów	672
Gamian A., Katzenellenbogen E.—Symbole opisujące konformację łańcuchów polisacharydowych	677
Guranowski A.—(patrz H. Jakubowski, Guranowski A.)	
H	
Herman Z.—Działanie farmakologiczne neurotensyny, substancji P i tuftsyny	487
Hulanicka D.—Anty-sense RNA, nowy mechanizm regulujący ekspresję genów	585
Hulanicka D.—Rekombinant RNA i jego replikacja	589
J	
Jakubowski H., Guranowski A.—Konferencja nt. metabolizmu diadenozynotetrafosforanów, Regensburg, RFN	207
K	
Kaczmarek L., Surmacz E.—Wpływ 5-metylocytozyny w DNA i 5-azacytodyny na ekspresję niektórych genów u kręgowców	87
Kalinowska E.—Ekspresja genów wprowadzonych do komórek ssaków metodą transfekcji	617
Katzenellenbogen E.—(patrz Gamian A., Katzenellenbogen E.)	
Kłysik J.—Czy lewoskrętne Z-DNA może spełniać funkcję biologiczną? . .	29
Kostyra H.—XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 11–20 września 1984, Olsztyn	691

	Str
Kozik A. — Białka wiążące ryboflawinę	263
Kupryszewski G. — Chemiczna struktura neuropeptydów	421
Kwiatkowska-Korczak J., Morawiecki A., Siemieniowski H., Sobiech K., Wolna E. — Słownik zalecanych i zwyczajowych nazw enzymów	95

L

Lachowicz L. — Transport głównych kationów w zakończeniach komórek nerwowych	247
Laskowska A. — M. Lucker — Secondary Metabolism in Microorganism Plants and Animals	695

M

Morawiecki A. — (patrz Kwiatkowska-Korczak J., Morawiecki A., Siemieniowski H., Sobiech K., Wolna E.)

N

Narkiewicz O., Nitecka L. — Rozmieszczenie neuropeptydów w mózgowiu i rdzeniu kręgowym	443
Nitecka L. — (patrz Narkiewicz O., Nitecka L.)	

O

Olszańska B. — Rola segmentów poliadenylowych i poliadenylacji RNA w rozwoju embrionalnym	365
---	-----

P

Pitura A. — (patrz Czesławski A., Pitura A.)	
Potempa J., Dubin A. — Ewolucja struktury i funkcji serynowych enzymów proteolitycznych	531
Przewłocki R., — Endogenne systemy opioidowe	463
Pużyński S. — Neuropeptydy a patogenez a i leczenie zaburzeń psychicznych typu endogenego	509

R

Ryńca J. — Udział witaminy K w modyfikacji białek	285
Rode W. — Multi forms of Enzyme	695

S

Siemieniowski H. — (patrz Kwiatkowska-Korczak J., Morawiecki A., Siemieniowski H., Sobiech K., Wolna E.)	
Sobiech K. — (patrz Kwiatkowska-Korczak J., Morawiecki A., Siemieniowski H., Sobiech K., Wolna E.)	
Sokół-Misiak W. — Sekwencje DNA niezbędne dla regulacji transkrypcji przez hormony glukokortykoidowe w komórkach eukariotycznych	593
Steczko J. — Zastosowanie żelazianu potasu jako analogu ortofosforanu w modyfikacji centrów aktywnych białek	569
Surmacz E. — (patrz Kaczmarek L., Surmacz E.)	

T

- Turyna B., Guzdek A. — Nieenzymatyczna glikozylacja białek 555

V

- Vetulani E. — Neuropeptydy a neurotransmisja 401

W

- Wałajtys-Rode — Pathobiochemie in Pathophysiologie es Kohlenhydratstoff-
wechsels unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus . . . 697
- Witt M. — Genetyka molekularna głównego kompleksu zgodności tkankowej . . . 323
- Wolna E. — (patrz Kwiatkowska-Korczak J., Morawiecki A., Siemieniowski H.,
Sobiech K., Wolna E.)

Z

- Zientkiewicz E., Słomski R. — Komórkowe antygeny rybonukleoproteinowe . . . 337
- Zielińska Z. — E. Golovinsky — Biochemie der Antimetabolite 385

Addendum

W okresie od złożenia artykułu do druku ukazało się wiele prac rozszerzających wiedzę o interferonach. W oparciu o piśmiennictwo z lat 1984—1986 sprostowania wymagają dwie sprawy. Po pierwsze ustalone zostało mianownictwo dwóch grup IFN- α . Zamiast używanych w niniejszej pracy tymczasowych oznaczeń α_S i α_L przyjęto określenia α_I i α_{II} . Po drugie wyjaśniono, iż błędnie wyznaczono granicę między peptydem sygnałowym a właściwym białkiem w sekwencji IFN- γ . Obecnie uważa się, że właściwa cząsteczka tego IFN ma o 3 reszty aminokwasowe mniej niż sądzono pierwotnie. A więc HuIFN- γ składa się ze 143, a MuIFN- γ ze 133 aminokwasów.

Opublikowano dotychczas (listopad 1986) sekwencje aminokwasowe interferonów 6 gatunków. W poniższej tabeli zestawilem informacje dotyczące genów nieallelicznych. W kilku przypadkach brak pełnej sekwencji lub mapy genowej uniemożliwił podanie jednoznacznych danych.

Tabela

IFN	Liczba znanych genów nieallelicznych		Ilość aminokwasów w cząsteczce białka
	łącznie z pseudogenami	funkcjonalnych	
HuIFN- α_1	16—19	13—16	165, 166
HuIFN- α_{II}	5—9	1—2	172
HuIFN- β	2—4	2—4	166
HuIFN- γ	1	2	143
MoIFN- α	1	1	166
MoIFN- β	1	1	166
BoIFN- α_1	4—6	4—6	166
BoIFN- α_{II}	1	1	172
BoIFN- β	3	3	165
BoIFN- γ	1	1	143
PoIFN- α	1	1	166
MuIFN- α	11—12	10—11	162, 166, 167
MuIFN- β	1—3	1—3	161
MuIFN- γ	1	1	133
RaIFN- α	1	1	169
RaIFN- γ	1	1	134

Interferony: Hu — ludzki; M — małpi; Bo — bydły; Po — świński; Mu — mysz; Ra — szczurzy.

Przy pisaniu addendum wykorzystano prace oryginalne (których ze względu na brak miejsca nie wyszczególniono) oraz następujące publikacje zawierające podsumowanie obecnej wiedzy o strukturze interferonów:

76. Langer J. A., Pestka S., (1985), *Pharmac. Ther.*, **27**, 371—401.
77. Henco K., Brosius J., Fujisawa A., Fujisawa J.-I., Haynes J. R., Hochstadt J., Kovacic T., Pasek M., Schamböck A., Schmid J., Todokoro K., Wälchli M., Nagata S., Weissmann C., (1985), *J. Mol. Biol.*, **185**, 227—260.
78. *Methods in Enzymology*, t. 119, red. S. Pestka, Academic Press 1986.
79. Piasecki E., (1987), *Post. Hig. Med. Dośw.* (w druku).

POSTĘPY BIOCHEMII

ARTICLES IN POLISH

Volume 32

Number 1—2

History of Biochemistry

E. Lisowska—Monoclonal antibodies and their applications in biochemical studies (Institute of Immunology and Exp. Therapy, Pol. Acad. Sci., Wrocław)	Str. 5
--	-----------

Articles

J. Kuźnicki—Myosin phosphorylation in vivo and in vitro. Part. I. Myosin of nonmuscle cells (Nencki Institute of Experimental Biology, Department of Biochemistry of Muscle, Warszawa)	15
J. Kuźnicki—Myosin phosphorylation in vivo and in vitro. Part II. Muscle Myosin (Nencki Institute of Experimental Biology, Department of Biochemistry of Muscle, Warszawa)	35
Z. A. Wojciechowski—Protein activators of cholesterol biosynthesis and metabolism (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	59
W. Janiszowska—Biosynthesis of tocopherols (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	79
A. Jerzmanowski—The role of histone H1 in the structure of chromosomes (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	97
K. Staroń—Mitotic condensation of chromosomes (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	129
M. Garstka—Regulation of the urea cycle (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	147

Minireview

B. Sieliwanowicz—Structure and function of 3'-terminal sequences of eucaryotic mRNA (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	173
---	-----

Articles

E. Piasecki—Structure of interferons (Institute of Immunology and Exp. Therapy, Pol. Acad. Sci, Wrocław)	185
P. P. Liberski—The structure of the infectious <i>scrapie</i> agent (Medical Academy Łódź, Department of Neurology, Łódź)	203

Nomenclature

E. Kopiczna-Grzebieniak, D. Jakubowska—Carbamoyl—phosphate synthase or synthetase? (Department of Chemistry and Biochemistry Silesian Medical Academy, Katowice)	225
Comments on enzyme nomenclature: synthases or synthetases	229
Contents of the volume 31, 1985	231

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 omawiając przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 271, 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, Langmans 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. Tytuły tabel i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając, z jakich (jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rusunki, 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 podejmie wydawca.

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

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

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

SPIS TREŚCI

Z historii biochemii

	Str.
E. Lisowska—Przeciwciała monoklonalne i ich zastosowania w badaniach biochemicznych	5

Artykuły

J. Kuźnicki—Fosforylacja miozyny <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . Część I. Miozyna komórek mięśniowych	15
J. Kuźnicki—Fosforylacja miozyny <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . Część II. Miozyna mięśniowa	35
Z. A. Wojciechowski—Białkowe aktywatory biosyntezy i metabolizm cholesterolu	59
W. Janiszowska—Biosynteza tokoferoli	79
A. Jerzmanowski—Rola histonu H1 w strukturze chromosomów	97
K. Staroń—Mitotyczna kondensacja chromosomów	129
M. Garstka—Regulacja cyklu mocznikowego	147

Minireview

B. Sieliwanowicz—Struktura i funkcje 3'-końcowych sekwencji eukariotycznego mRNA	173
--	-----

Artykuły

E. Piasecki—Struktura interferonów	185
P. P. Liberski—Struktura czynnika infekcyjnego scrapie	203

Słownictwo biochemiczne

E. Kopieczna-Grzebieniak, D. Jakubowska—Syntaza czy syntetaza karbamoilofosforanowa?	225
Uwagi Komisji Słownictwa Biochemicznego na temat nazw „syntazy” i „syntetazy” (tłum. J. Kwiatkowska)	229
SPIS TREŚCI—TOM 31, 1985	231