

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 3 - NR 1

1976 (1-76)

Postępy Biologii Komórki

PWN - WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu 1976

Wydanie I. Nakład 400 + 120 egz. Ark. wyd. 6,25. Ark. druk. 4,75 + 1 wkl. + wkl. Papier druk.
sat. 111 kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 13 XI 1975 r. Podpisano do druku w stycz-
niu 1976 r. Druk ukończono w lutym 1976 r. Zam. 2484/75. — A-27. Cena zł 20,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław ul. Lelewela 4

EFEKTY BIOLOGICZNE NIEDOBORU AMINOKWASOWEGO W HODOWANYCH IN VITRO KOMÓRKACH SSAKÓW

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

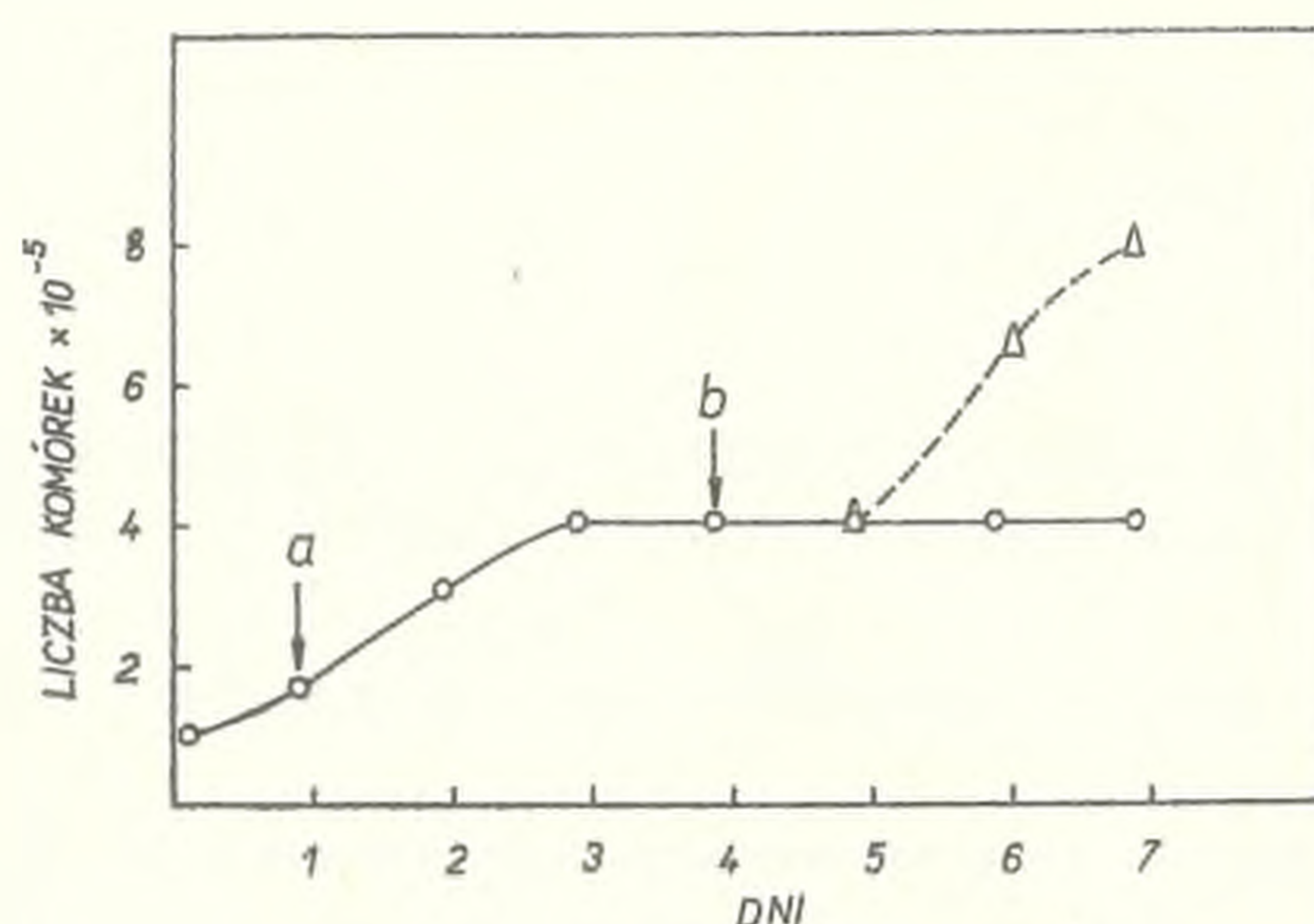
Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
Warszawa

Streszczenie. Omówiono wpływ niedoboru aminokwasowego w środowisku hodowlanym komórek ssaków na intensywność przebiegu syntezy białka, RNA i DNA w komórkach. W większości badanych układów komórkowych przy obniżonej intensywności syntezy białek następowało zakłócenie prawidłowego przebiegu syntezy RNA i DNA, a w konsekwencji zakłócenie przebiegu cyklu komórkowego.

Pobieranie, anabolizm i katabolizm aminokwasów oraz wykorzystanie ich w licznych procesach biosyntetycznych kontrolują w pewnym stopniu wzrost komórek hodowanych in vitro. W hodowlach komórkowych główne źródło aminokwasów stanowią aminokwasy syntetycznych pożywek oraz aminokwasy obecne w dodanej surowicy [54, 65, 70]. Większość hodowanych in vitro komórek ssaków wymaga do wzrostu aż 13 aminokwasów. Są to: leucyna, tryptofan, walina, metionina, glutamina, izoleucyna, treonina, fenyloalanina, lizyna, histydyna, arginina i cysteina, tyrozyna [12, 13]. Efektem obniżenia stężenia niezbędnych aminokwasów w środowisku jest bardzo wyraźne zwolnienie szybkości wzrostu hodowli (rys. 1, [35, 46, 52, 53, 60]). Efekt ten jest odwracalny i po 12-15 godzinach od przywrócenia typowego stężenia niezbędnych aminokwasów w pożywce, komórki ponownie zaczynają się dzielić.

Komórki pobierają niezbędne aminokwasy ze środowiska z niejednakową intensywnością. Tak np. mysie komórki L szczególnie intensywnie pobierają z pożywki glutaminę, leucynę i izoleucynę [61]; ludzkie diploidalne komórki linii MRC-5 oraz ludzkie komórki leukemiczne (J-111) w stosunkowo niewielkim stopniu wykorzystują z pożywki histydynę [29].

Niejednokrotnie także stwierdzono zależność intensywności pobierania przez komórki aminokwasów od gęstości populacji (17, 71) i fazy wzrostu hodowli [16, 27, 28, 30].



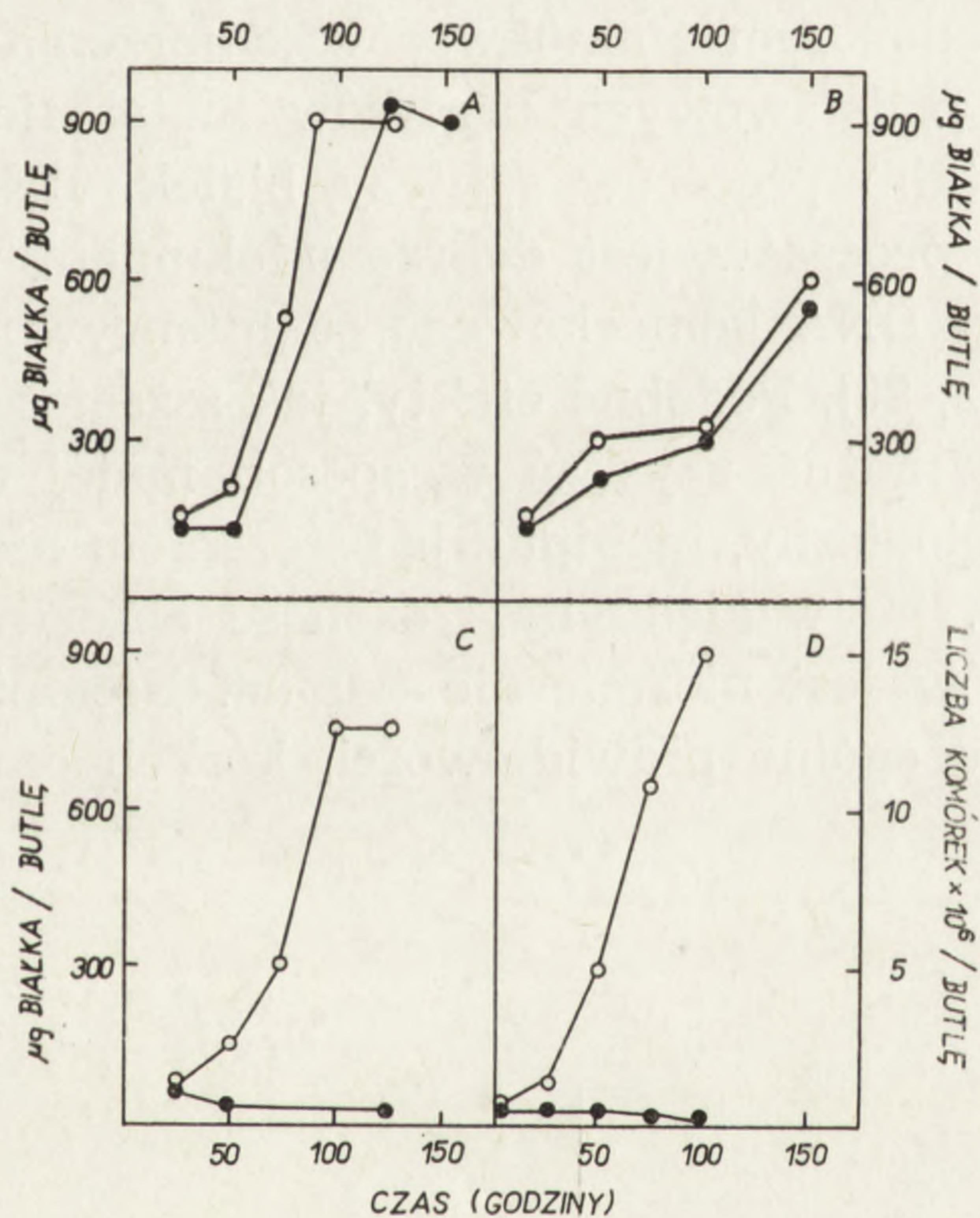
Rys. 1. Krzywe wzrostowe komórek 3T3 hodowanych w pełnej i eksperymentalnej pożywce (wg Holley i wsp. [35]). Po pierwszym dniu hodowli (\downarrow a) pożywkę pełną zmieniono na pożywkę eksperymentalną zawierającą jedynie 2% normalnej zawartości wszystkich aminokwasów. Czwartego dnia hodowli (\downarrow b) do części naczyń hodowlanych dodano brakujące aminokwasy. Począwszy od następnego dnia hodowli zaobserwowano znaczny przyrost ilości komórek (— — — — —)

Poszczególne linie komórkowe, w szczególności zaś linie komórek nowotworowych, charakteryzują się specyficznym zapotrzebowaniem na określone aminokwasy, co może wynikać nie tylko z upośledzenia syntezy tego aminokwasu, lecz wskazywać także na jego szczególną rolę w komórkach nowotworowych. W hodowli *in vitro* wzrost bardzo wielu komórek nowotworowych zależy w znacznym stopniu od obecności w środowisku L - asparaginy [32, 63, 66, 67]. Obserwacje te dały podstawę do rozwoju gałęzi chemoterapii, tzw. „amino acid depletion chemotherapy”, w której zastosowanie enzymu specyficznie rozkładającego aminokwas, konieczny dla rozwoju nowotworu, pozwala na pewną kontrolę jego wzrostu. I tak, zastosowana *in vivo* L - asparaginaza poprzez wywołanie niedoboru L - asparaginy, powoduje zahamowanie wzrostu oraz częściową remisję niektórych typów nowotworów (np. białaczka limfatyczna o ostrym przebiegu, białaczka granulocytarna o ostrym lub chronicznym przebiegu [1, 3, 6, 10, 34, 59, 93]). L - asparaginaza zastosowana *in vivo* nie tylko wpływa na poziom L - asparaginy, ale także zakłóca transport lizyny i argininy oraz tymidyny do komórek guza [59].

Wyraźną zależność przeżywalności i wzrostu w hodowli od obecności w środowisku argininy wykazano badając między innymi komórki HeLa,

L5178 i L1210 oraz komórki lymphomy Burkitta [2a, 77, 89]. I tak na przykład, dodanie do hodowli komórek oczyszczonej arginazy [77, 89] lub też ekstraktów wątrobowych (zawierających między innymi arginazę, [2a]), jak również obniżenie stężenia argininy w pożywce poniżej określonego, krytycznego poziomu powodowało silne upośledzenie wzrostu komórek.

Brak w pożywce metioniny także silnie ogranicza wzrost komórek nowotworowych [33]. Komórki raka płuc szczura (rys. 2C) oraz mysie leukemiczne komórki L1210 (rys. 2D) nie rosły w pożywce, w której metioninę zastąpiono homocysteiną. Komórki prawidłowe zaś (rys. 2A i B) rosły z niemalże jednakową intensywnością w pożywce zawierającej metioninę lub homocysteinę.



Rys. 2. Zależność wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych od obecności w środowisku L - metioniny (15 mg/l) lub L - homocysteiny (30 mg/l) (wg Halpern i wsp. [33] zmodyfikowane).

A — fibroblasty z wątroby szczura; B — fibroblasty ludzkie; C — komórki raka płuc szczura W256; D — leukemiczne komórki L1210.

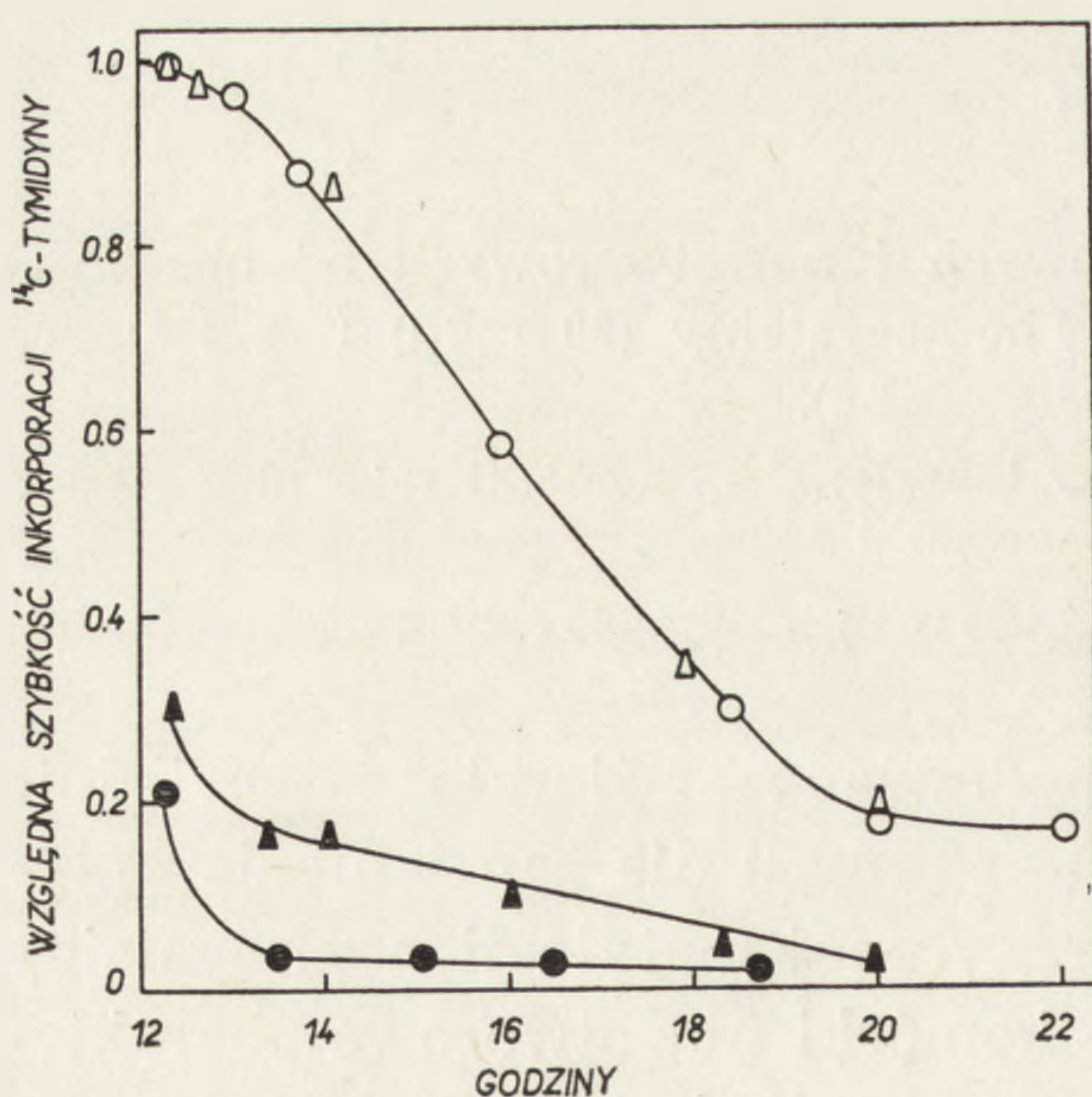
○ — pożywka z metioniną, ● — pożywka z homocysteiną

Należy podkreślić, że środowisko hodowlane zawierało odpowiednie ilości folianu (10 mg/l) oraz witaminy B₁₂ (4 mg/l) dla zapewnienia optymalnych warunków do przebiegu enzymatycznej metylacji homocysteiny do metioniny. Wprawdzie nie wszystkie komórki nowotworowe charakteryzuje defekt metaboliczny polegający na upośledzeniu syntezy metio-

niny, to jednakże wydaje się, że w niektórych typach nowotworów stosowanie metioninazy mogłoby przyczynić się do pewnej kontroli ich wzrostu.

Komórki hodowane w warunkach niedoboru chociażby jednego z niezbędnych aminokwasów charakteryzowało znaczne obniżenie żywotności, któremu bardzo często towarzyszyło pojawienie się szeregu zmian degeneracyjnych [8, 26, 38, 43, 47]. Tak np. w komórkach wyhodowanych z jajnika chińskiego chomika przy niedoborze argininy pojawiały się liczne aberacje chromosomalne, których ilość zwiększała się w miarę wydłużania okresu niedoboru aminokwasowego [26]. Z kolei niedobór waliny wywoływał w komórkach HeLa szereg zmian degeneracyjnych w cytoplazmie, objawiających się bardzo silną wakuolizacją oraz zanikiem organelli komórkowych [8]. Efekty te zniknęły po dodaniu do pożywki brakującego aminokwasu, jednakże pod warunkiem, że czas eksperymentu nie był zbyt długi.

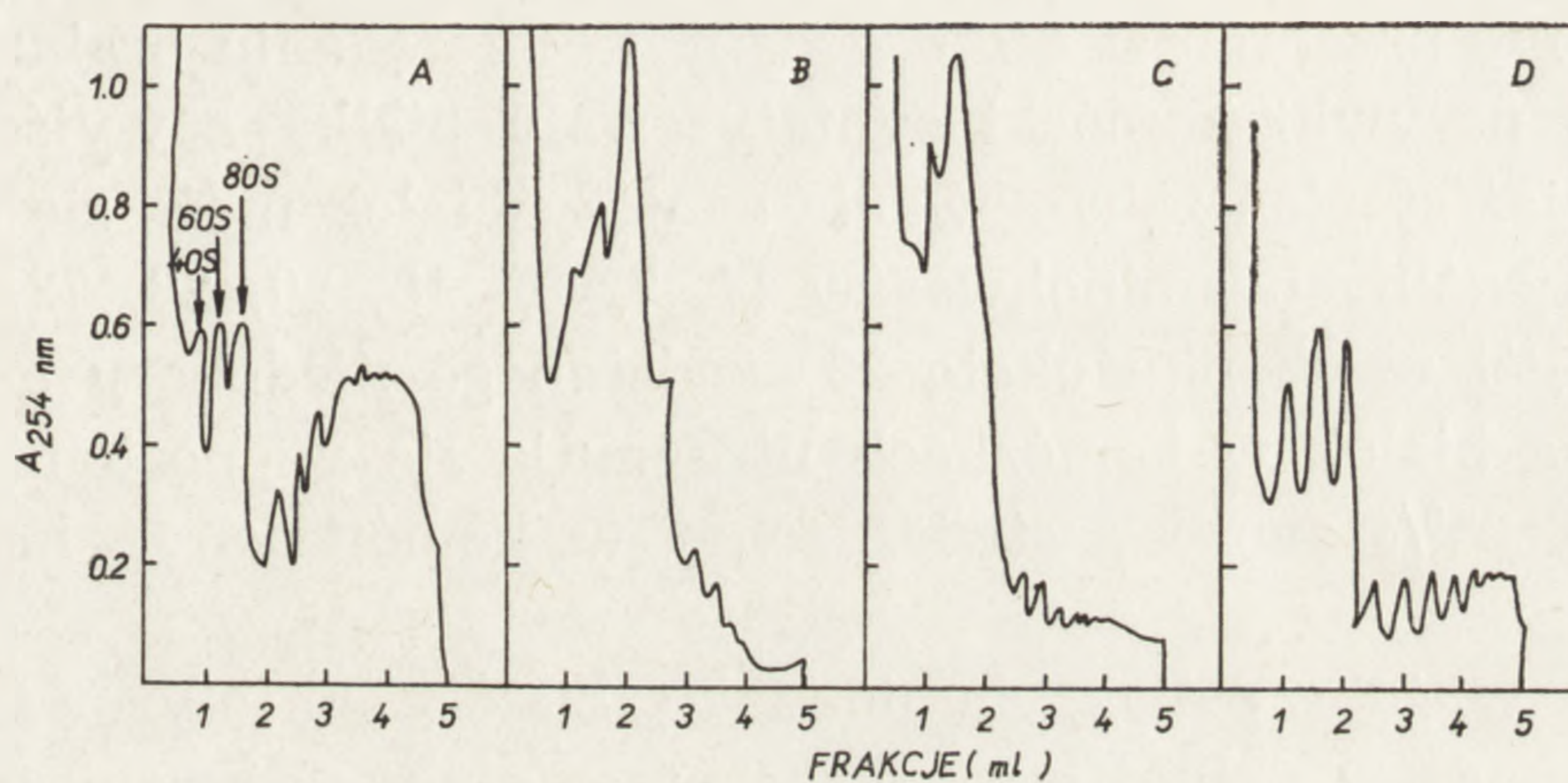
Powodowane niedoborem aminokwasów zaburzenia morfologiczne są wynikiem zakłóceń podstawowych procesów metabolicznych w komórkach, przede wszystkim procesów syntezy białek, RNA i DNA. Ścisła współzależność tych procesów jest dobrze udokumentowana, szczególnie zaś zależność syntezy DNA komórkowego od intensywności syntezy białka (rys. 3) [42, 51, 72, 90]. Podobne efekty, jak z zastosowaniem inhibitorów syntezy białka, można uzyskać w sposób mniej drastyczny i tym samym bardziej fizjologiczny, manipulując stężeniem niezbędnych aminokwasów w pożywce. Ze względu na złożoność obserwowanych efektów interpretacja wyników jest niezmiernie trudna. Niemniej jednak można zaobserwować pewne ogólne prawidłowości, których omówienie stanowić będzie treść artykułu.



Rys. 3. Zahamowanie syntezy DNA w komórkach HeLa przez cyklohesimid (28,5 μ M, \blacktriangle) i puromycynę (18,4 μ M, \bullet) (wg Weiss [90]). Komórki zsynchronizowano metodą selekcji komórek w mitozie. Po 12,5 godzinach od założenia hodowli (połowa fazy S) dodano do pożywki badane inhibitory, a następnie w różnym czasie pobierano komórki i badano inkorporację znakowanej tymidyny do DNA komórek. Symbole puste dotyczą wyników uzyskanych dla komórek z hodowli kontrolnych

WPLYW NIEDOBORU AMINOKWASOWEGO NA SYNTEZĘ BIAŁEK

Prawidłowy przebieg biosyntezy białka w komórkach warunkuje przede wszystkim obecność właściwych aminokwasów oraz obecność i odpowiedni stan funkcjonalny polisomów. Polisomy stanowią w komórce układ bardzo wrażliwy, gdyż zarówno *in vivo* [62], jak i *in vitro* [18, 25, 36, 37, 45, 49] w wyniku działania różnorodnych bodźców zachodzi ich dysocjacja do nieaktywnych w syntezie białka rybosomów. Zjawisko to obserwuje się również przy zubożeniu pożywki chociażby w jeden z podstawowych aminokwasów [7, 18, 85]. W niektórych układach doświad-



Rys. 4. Profil rybosomowy komórek L po wirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy (wg Christmana [7], zmodyfikowane).

A — hodowla w środowisku kontrolnym (pożywka Eagle'a + 10% surowicy); B — inkubacja 15 minut w środowisku pozbawionym niezbędnych aminokwasów; C — hodowla 18-godzinna w środowisku pozbawionym niezbędnych aminokwasów; D — hodowla 18-godzinna w środowisku pozbawionym niezbędnych aminokwasów; następnie dodano brakujące aminokwasy i po 2 godzinach oznaczono profil rybosomalny komórek. Obserwuje się wówczas pojawienie się polisomów

czalnych już po 15 minutach od usunięcia niezbędnego aminokwasu stwierdzić można nagromadzenie w komórkach dużych ilości wolnych rybosomów (rys. 4A i B). W niektórych komórkach, np. w komórkach L, długość okresu trwania niedoboru aminokwasowego nie zmieniała w zasadniczy sposób profilu rybosomowego (rys. 4C), w innych natomiast (komórki HeLa) po 2 godzinach wzrostu w nieobecności histydyny następował pewien powolny wzrost ilości polisomów [86]. W kilkadziesiąt minut po dodaniu brakującego aminokwasu do pożywki obserwowano re-agregację rybosomów w polisomy (rys. 4D), jednakże jeśli niedobór aminokwasów trwał przez wiele godzin, ilość polisomów była niższa niż przed rozpoczęciem eksperymentu. W analogiczny sposób następowało także

tworzenie polisomów w komórkach, w których zahamowano syntezę RNA aktywnością D przed rozpoczęciem eksperymentu z niedoborem aminokwasów [7] lub też dodano aktywności D w momencie usunięcia aminokwasu [18]. Wskazuje to zarówno na stabilność mRNA w komórkach rosnących w eksperymentalnej pożywce, jak też na łatwość jego ponownego włączania w polisomy [7, 18].

Tak szybka dysocjacja polisomów w komórkach rosnących w środowisku pozbawionym niezbędnych aminokwasów stanowi zapewne bezpośrednią przyczynę obniżenia stopnia wbudowywania piętnowanych prekursorów do białek stwierdzanego niejednokrotnie nawet już po 10 minutach przebywania komórek w środowisku pozbawionym któregośkolwiek z podstawowych aminokwasów [7]. Jeśli czas trwania niedoboru aminokwasowego nie przekraczał kilku godzin, to po dodaniu brakującego aminokwasu do pożywki komórki syntetyzowały białka z wyjściową szybkością. Chociaż stopień zahamowania syntezy białek może się różnić przy braku poszczególnych aminokwasów [4, 7, 15, 18, 20, 23, 73, 76, 85], to jednak na ogół w wyniku około 20-godzinnego niedoboru aminokwasowego synteza białek w komórkach utrzymuje się na poziomie nie przekraczającym 25% syntezy stwierdzonej w komórkach z hodowli kontrolnych.

Analiza w żelu poliakrylamidowym białek syntetyzowanych przez komórki rosnące w pełnej oraz eksperymentalnej pożywce wykazała, że białka syntetyzowane przez komórki rosnące w warunkach niedoboru aminokwasowego nie różniły się w zasadniczy sposób ani rodzajem, ani wielkością cząsteczki od białek normalnie syntetyzowanych przez komórki [7]. Obserwacja ta, jak również bardzo szybka dysocjacja polisomów przy braku podstawowych aminokwasów w pożywce przemawiają, zdaniem Christmana, za sugestią, że spośród wszystkich etapów translacji jedynie inicjacja syntezy łańcucha peptydowego jest procesem wrażliwym na niedobór aminokwasów. Jeśli bowiem wrażliwymi etapami byłyby etapy wydłużania łańcucha białkowego lub też jego zakończenia, to wówczas w powyższych warunkach eksperymentalnych następowałoby nagromadzenie się w komórkach dużych (ciężkich) polisomów o różnych ciężarach cząsteczkowych.

Białka rybosomalne. W wyniku kilkugodzinnego wzrostu komórek raka Landschütza w środowisku zawierającym podstawowe aminokwasy w stukrotnie niższym stężeniu niż pożywka kompletna następowało obniżenie fosforylacji niektórych frakcji białek rybosomalnych, szczególnie frakcji o ciężarze cząsteczkowym 85 000, 60 000 i 48 000 [41]. Celem sprawdzenia, czy obserwowany efekt nie jest efektem wtórnym, wynikającym z obniżenia wielkości puli znakowanych nukleotydów, oznaczano w równoległych doświadczeniach włączanie radioaktywnego fosforu do

ATP i GTP (głównych dawców fosforu przy fosforylacji białek rybosomalnych). Nie stwierdzono jednakże, aby kilkugodzinny niedobór podstawowych aminokwasów wywierał jakikolwiek wpływ na intensywność fosforylacji tych nukleotydów [41].

Brak w pożywce niektórych aminokwasów niezbędnych, w szczególności waliny, okazał się bardzo specyficzny. W nieobecności tego aminokwasu w cytoplazmie komórek HeLa nie tylko pojawiała się bowiem: zaledwie 10% ilości rybosomów znajdujących w komórkach rosnących w pełnej pożywce, lecz co więcej stwierdzono nagromadzenie się znacznie większych ilości podjednostek 30S niż 50S [58, 69]. Celem określenia czy szybkość syntezy białek wchodzących w skład podjednostki 50S nie jest czynnikiem warunkującym formowanie się rybosomów, przeprowadzono badania porównawcze składu białek podjednostki 50S z komórek hodowanych w różnych wariantach doświadczalnych [69]. Okazało się, że przy niedoborze w środowisku waliny upośledzona jest synteza białka o ciężarze cząsteczkowym 50 000, będącego charakterystycznym składnikiem podjednostki 50S. Fakt ten wydaje się wskazywać, że w komórkach HeLa o szybkości powstawania podjednostki 50S decyduje przede wszystkim szybkość syntezy jej białek strukturalnych.

Białka jądrowe. Kilkugodzinny niedobór aminokwasowy oddziałuje zarówno na intensywność syntezy histonów [41, 92], jak też i kwaśnych niehistonowych białek jądrowych [9, 41, 92]. Krótkotrwałe (2 1/2 - godzinny) brak podstawowych aminokwasów wywołał niewielkie (20–30%), ale powtarzalne podwyższenie stopnia fosforylacji histonów w komórkach raka Landschütza [41]. Wyraźniejszy efekt niedoboru aminokwasowego dał się natomiast zaobserwować w przypadku białek niehistonowych. W analogicznym układzie doświadczalnym, jak w doświadczeniach z histonami, znaleziono w komórkach raka Landschütza wyraźną stymulację (50–200%) fosforylacji szeregu białek niehistonowych [41], przy czym fosforylacja trzech frakcji została podwyższona nawet dwukrotnie. Podobny efekt, tzn. podwyższenie syntezy określonej frakcji białek niehistonowych, stwierdzono w fibroblastach kurczęcia hodowanych przez 6 godzin w nieobecności lizyny [9]. Nie znamy dotąd roli biologicznej tych białek jądrowych charakteryzujących się szybkim metabolizmem. Mogą to być białka typu regulatorowego, odpowiedzialne za zatrzymanie komórek w określonej fazie cyklu komórkowego [9]. Należy jednak podkreślić, że w analogicznych warunkach doświadczalnych szybkość syntezy białek komórkowych była znacznie obniżona. Tak więc zarówno fosforylacja histonów, jak i przemiany określonych frakcji białek niehistonowych wydają się nie zależeć od intensywności syntezy innych białek komórkowych.

WPŁYW NIEDOBORU AMINOKWASOWEGO NA SYNTEZĘ RNA
I RYBOSOMÓW

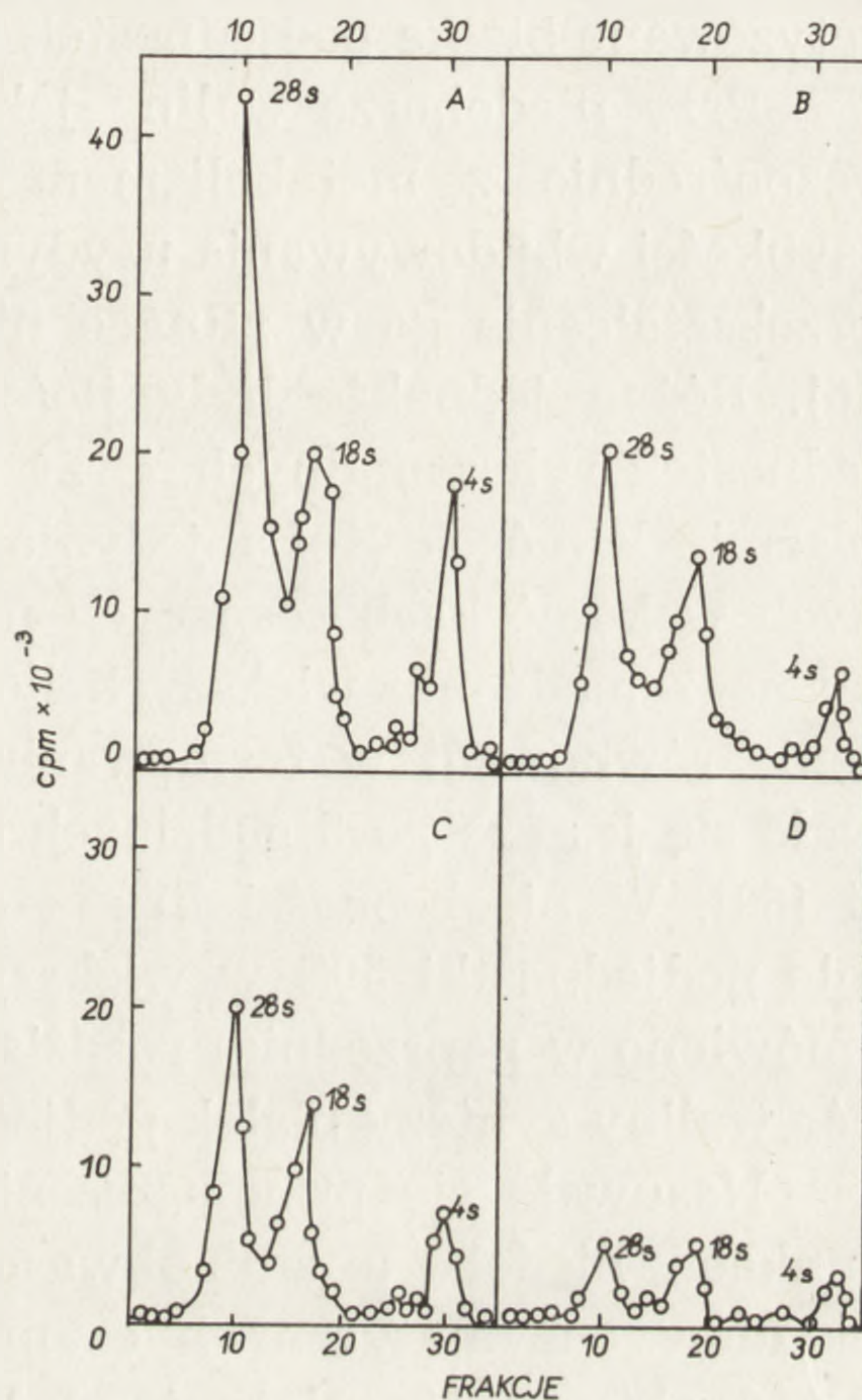
Brak w pożywce szeregu aminokwasów z grupy aminokwasów niezbędnych upośledzał wbudowywanie radioaktywnej urydyny do RNA w takich komórkach, jak komórki wątrobowe Changa [4], limfatyczne komórki 6C₃HED [19], komórki raka Ehrlicha [24], komórki HeLa [52, 58, 75] czy też komórki raka Landschütza [73]. Efekt ten był odwracalny i ustępował po podaniu brakującego aminokwasu, jednakże dopiero po upływie kilku godzin. W niektórych innych typach komórek natomiast, jak np. w mysich komórkach L [74], nie znaleziono obniżenia stopnia wbudowywania urydyny do RNA w tych warunkach, chociaż na skutek niedoboru aminokwasowego w pożywce, wbudowywanie radioaktywnej leucyny do białek było rzędu jedynie 30% wartości kontrolnej.

W komórkach wrażliwych na niedobór aminokwasów już po 2 1/2 godzinie obserwowano nawet 50% zahamowania wbudowywania urydyny do różnych frakcji RNA komórkowego (tabela 1). Z danych zestawionych w tabeli 1 wynika, że szczególnie silny efekt na syntezę RNA w komórkach raka Landschütza wywierał brak argininy i glutaminy. Przy nieobecności glutaminy (w odróżnieniu od braku innych aminokwasów) szczególnie silnemu zahamowaniu ulegało wbudowywanie urydyny do frakcji 28S RNA [40].

TABELA 1. Wpływ 2 1/2-godzinnego niedoboru podstawowych aminokwasów na wbudowywanie ³H-urydyny do frakcji 18S i 28S RNA komórek raka Landschütza (wg Jolicoeur [40])

Brakujący aminokwas	% zahamowania wbudowywania ³ H-urydyny do RNA		
	18S	28S	18+28S
13 niezbędnych	49	55	50
Arginina	52	35	48
Cysteina	23	—	16
Izoleucyna	20	0,3	15
Tyrozyna	29	—	20
Treonina	25	—	17
Glutamina	51	72	59
Lizyna	21	24	22
Leucyna	17	4	14
Walina	18	6	15
Histydyna	13	7	12
Metionina	14	21	16
Fenylalanina	10	—	6
Tryptofan	11	4	9

Syntezę RNA w komórkach jajnika chomika chińskiego szczególnie silnie hamował brak proliny (rys. 5, [23]). Co więcej, w tym układzie doświadczalnym, obserwowano addytywność efektu braku proliny oraz braku surowicy w pożywce na intensywność syntezy RNA.



Rys. 5. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym RNA ekstrahowanego z komórek chińskiego chomika (CHO) hodowanych w różnych wariantach doświadczalnych (wg Fan i wsp. [23]). Komórki preinkubowano przez 3 godziny w środowisku: A — kontrolnym; B — bez surowicy; C — pozbawionym proliny; D — pozbawionym proliny i surowicy. ^3H -urydynę dodano na okres 6 godzin i następnie izolowano z komórek RNA

Wydaje się prawdopodobne, że obserwowane zahamowanie syntezy 18S i 28S RNA może pozostawać w związku z upośledzeniem syntezy w jądrze prekursorów rybosomalnego RNA. Tak np. wynikiem 17-godzinnego niedoboru waliny w środowisku jest, w porównaniu z kontrolą, 40% zahamowania w ludzkich fibroblastach syntezy prekursora rybosomalnego RNA (45S - r - pre - RNA) i niemal 90% zahamowanie pojawia się 18S i 28S RNA w podjednostkach rybosomalnych [86]. Podobne rezultaty uzyskano również badając w tym aspekcie różne prawidłowe i nowotworowe komórki ssaków hodowane w warunkach niedoboru proliny [23], lizyny [55, 56], tyrozyny [75] i waliny [58, 79, 87]. Pomimo tego, że niedobór każdego z niezbędnych aminokwasów upośledzał wbudowywanie radioaktywnej urydyny do rRNA komórek HeLa, to jednak brak niektórych z nich wywołał specyficzne efekty. Szczególnie silny efekt ujawniał się w przypadku niedoboru w pożywce metioniny [57, 88] oraz waliny i lizyny [55, 58, 69]. W nieobecności metioniny w pożywce, w wyniku upośledzenia metylacji prekursora rybosomalnego RNA, nie tworzyły się w komórkach HeLa kompletne rybosomy [56, 57, 88]. W tych

warunkach nie następowały także dalsze przemiany tego niedometylowanego prekursora, co powodowało znaczne upośledzenie syntezy podjednostek rybosomalnych. Niedobór metioniny nie uniemożliwiał natomiast prawidłowej syntezy białek rybosomalnych, gdyż nawet przy sześciogodzinnym niedoborze metioniny pojawiały się w jądrze nowo zsyntetyzowane białka podjednostek rybosomalnych [57].

Przy niedoborze waliny jak i lizyny, aminokwasów nie związanych bezpośrednio z metabolizmem RNA, również obserwowano obniżenie szybkości wbudowywania urydyny do prekursora rRNA oraz upośledzenie przekształcania go w rRNA o niższych stałych sedymentacji [55, 58, 79, 86]. Różne jednakże były ilości pojawiających się w komórkach podjednostek rybosomalnych. Przy niedoborze waliny pojawiało się w cytoplazmie komórek HeLa jedynie około 10% ilości rybosomów znajdujących w komórkach rosnących na pełnej pożywce i co więcej, stwierdzano nagromadzenie większych ilości podjednostek 30S niż 50S. To zakłócenie równowagi w formowaniu podjednostek rybosomalnych utrzymywało się jeszcze po 5 godzinach od dodania waliny do środowiska hodowli [69]. W nieobecności lizyny natomiast nagromadzały się w cytoplazmie podjednostki 50S w większych ilościach [58]. Wynika to, jak to już omówiono w poprzednim rozdziale, z wybiórczego zakłócenia przez niedobór waliny syntezy białek podjednostki 50S.

Nasuwało się przypuszczenie, że upośledzenie syntezy RNA w warunkach niedoboru aminokwasowego jest wynikiem zmian aktywności układów enzymatycznych czynnych w syntezie RNA [24, 39, 75]. Jak dotąd aktywność zależnej od DNA jądrowej polimerazy RNA badano tylko w jądrach komórek raka Ehrlicha [24] oraz w jądrach komórek raka Landschütza [39]. Okazało się, że wynikiem krótkotrwałego niedoboru aminokwasowego (50 minut–2 godzin) jest znaczne obniżenie aktywności polimerazy RNA, przy czym w przypadku komórek raka Landschütza najsilniejszy efekt ujawniał się przy braku argininy lub glutaminy. Badając *in vitro* własności tego enzymu wykazano, że aktywność polimerazy RNA zmieniała się wraz ze zmianami stężenia aminokwasów w mieszaninie inkubacyjnej, co wydaje się wskazywać na pewien udział aminokwasów w regulacji aktywności tego enzymu [24]. Niewiele jednak wiadomo o mechanizmie regulacji aktywności polimerazy RNA przez aminokwasy. Wydaje się prawdopodobne, że za aktywacją polimerazy RNA przez aminokwasy mogłoby być w części odpowiedzialne podwyższenie intensywności syntezy purynowych i pirymidynowych prekursorów substratów enzymów. Jednakże w doświadczeniach, w których komórki raka Ehrlicha inkubowano w pożywkach (pełnej lub pozbawionej niezbędnych aminokwasów) wzbogaconych w urydynę i inozynę, nie zaobserwowano wpływu egzogennych nukleotydów na aktywność badanego enzymu (tabela 2).

TABELA 2. Aktywność zależnej od DNA polimerazy RNA z jąder komórek raka Ehrlicha (wg Franze de Fernandez [24])

Komórki hodowane w środowisku	Aktywność polimerazy RNA (pmole wbudowanego GTP/mg DNA)
Eagle'a	1150
Eagle'a bez podstawowych aminokwasów	310
Eagle'a + 0,1 mM urydyna + 0,1 mM inozyna	1030
Eagle'a bez podstawowych aminokwasów +0,1 mM urydyna +0,1 mM inozyna	380

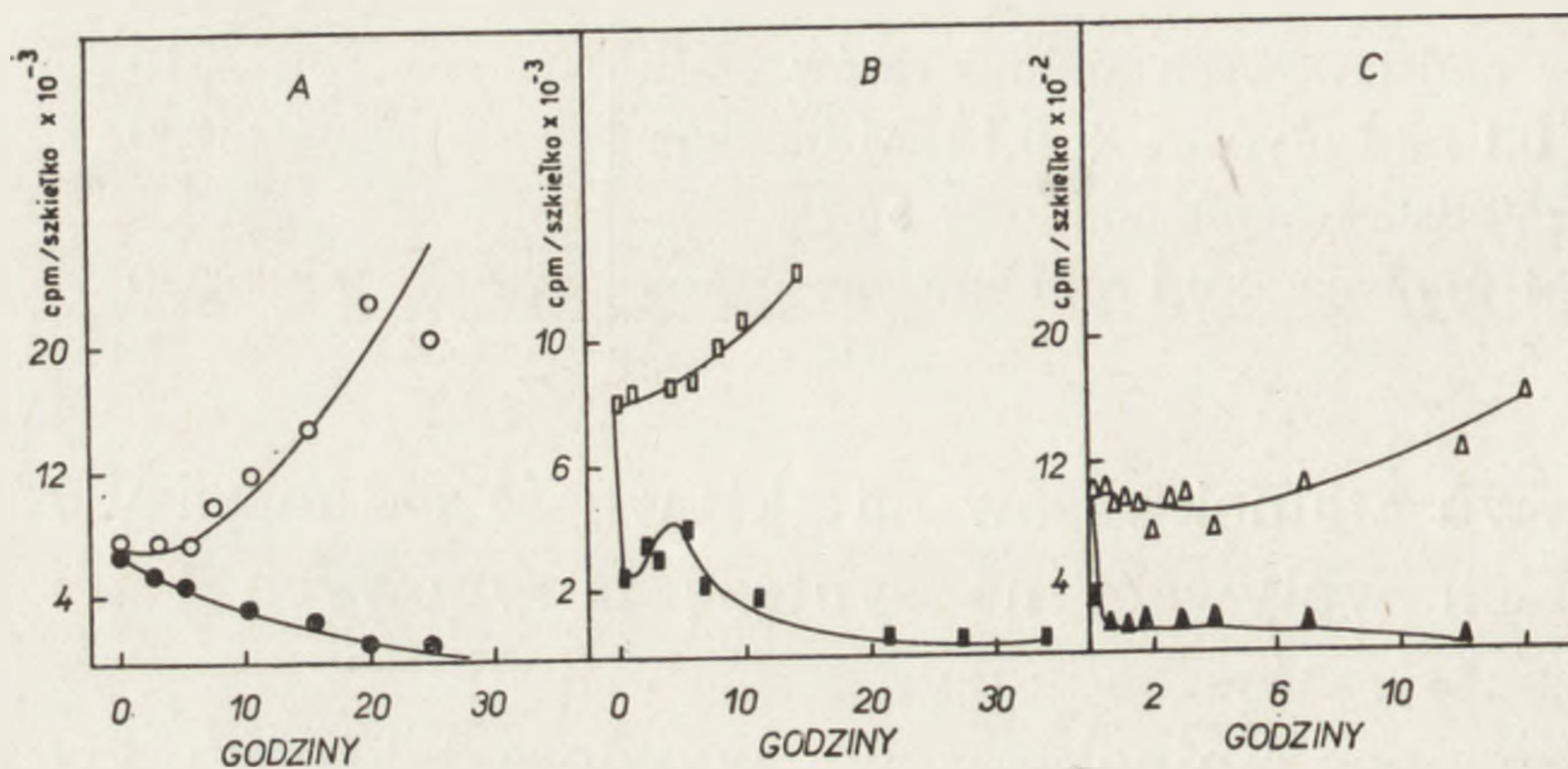
A zatem wpływu aminokwasów na aktywność polimerazy RNA nie można wiązać z ich wpływem na syntezę purynowych i pirymidynowych prekursorów substratów badanego enzymu [24].

tRNA. Niedobór aminokwasowy wywiera także wpływ na formowanie się w komórkach tRNA oraz jego acylowych pochodnych. Dotychczas doniesiono o efektach wywoływanych jedynie brakiem tyrozyny [76] i metioniny [2], można jednak przypuszczać, że brak i innych niezbędnych aminokwasów będzie ujawniał się w podobny sposób. W wyniku kilkugodzinnego niedoboru tyrozyny lub metioniny pojawiają się w komórkach cząsteczki deacylowanych tRNA [76] oraz nagromadza się pre-tRNA [2]. W przypadku braku metioniny zablokowana zostaje zatem interkonwersja, pre-tRNA do tRNA. Można więc sądzić, że odpowiednie zmetylowanie cząsteczki pre-tRNA jest niezbędne do zadziałania enzymów nukleolitycznych i powstania tRNA [2].

WPLYW NIEDOBORU AMINOKWASOWEGO NA SYNTEZĘ DNA

Wiele spośród niezbędnych aminokwasów wywiera znamienny wpływ na replikację genomu komórek. Szczególnie wyraźny efekt zaobserwowano w przypadku takich niezbędnych aminokwasów, jak izoleucyna i leucyna [20–22, 80–84], a także tryptofan [5, 92], metionina [11], prolina [23], asparagina [78] i arginina [26, 48, 77]. Przetrzywanie komórek w pożywce pozbawionej któregokolwiek z tych aminokwasów powodowało szybki spadek, a następnie zatrzymanie syntezy DNA. W komórkach rosnących w pożywce bez izoleucyny już po 1 godzinie [20], a bez tryptofanu po 3 godzinach [92] synteza DNA spadała do 50% poziomu syntezy DNA w komórkach rosnących na pełnych podłożach. Po 20–21 godzinach wzrostu w pożywce bez leucyny (rys. 6B) lub tryptofanu, a po 25–30 godzinach wzrostu o pożywce bez izoleucyny (rys. 6A) ustawała w komór-

kach synteza DNA. Ponadto stwierdzono znaczne obniżenie żywotności komórek L1210 hodowanych w nieobecności tryptofanu. Po 25-godzinnej hodowli znajdowano w populacji jedynie 75% żywych komórek, a przedłużanie okresu trwania niedoboru tryptofanu wywoływało dalszy gwałtowny spadek żywotności komórek [92].



Rys. 6. Porównanie wpływu braku izoleucyny (A) lub leucyny (B) oraz dodanego cykloheksimidu (C) na inkorporację tymidyny do komórek CHO (wg Everhardta [21]). Symbole puste dotyczą wyników uzyskanych w hodowlach kontrolnych, symbole pełne — w hodowlach doświadczalnych

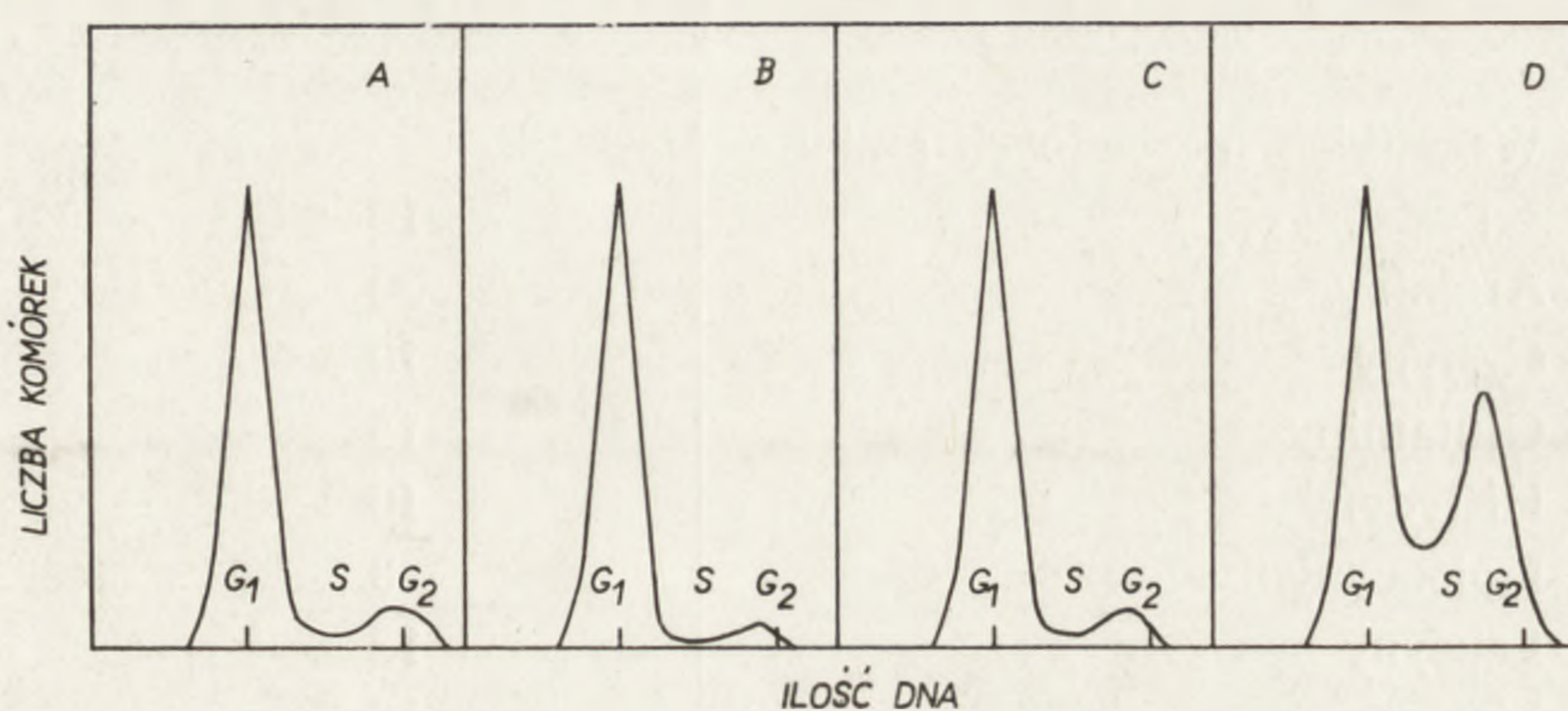
Znaczne upośledzenie (jednakże nie całkowite zatrzymanie) syntezy DNA w mysich fibroblastach (3T3 i 3T3 transformowanych wirusem SV40) stwierdzono również w rezultacie 24-godzinnego niedoboru metioniny w pożywce [11] lub w komórkach CHO po 6 godzinach hodowli w nieobecności proliny [23].

Porównano efekt braku podstawowych aminokwasów (rys. 6 A, B) na syntezę DNA z efektem wywieranym przez cykloheksimid (rys. 6C). Podczas gdy przy braku aminokwasów zahamowanie inkorporacji ³H-tymidyny pogłębiało się w miarę upływu czasu, to już po 15 minutach od momentu dodania do hodowli cykloheksimidu zahamowanie wbudowywania tymidyny sięgało 90% [21].

WPLYW NIEDOBORU AMINOKWASOWEGO NA PRZEBIEG CYKLU KOMÓRKOWEGO

Konsekwencją zahamowania syntezy DNA komórkowego, zarówno na skutek obniżenia stężenia surowicy w środowisku [64], jak też i stężenia niezbędnych aminokwasów do 0,1% wartości kontrolnej lub też fosforanu do 1% [35], jest zatrzymanie wzrostu komórek w określonych fazach cyklu komórkowego. Oznaczenia zawartości DNA w komórkach

pozwalają na obliczenie procentowego rozmieszczenia komórek danej populacji w poszczególnych fazach cyklu. Okazało się, że w powyższych warunkach eksperymentalnych większość komórek nagromadza się w fazie G-1 (rys. 7 A, B, C). Efekt ten obserwuje się również, gdy tylko



Rys. 7. Analiza zawartości DNA (przy zastosowaniu przepływowego mikrofluorymetru) w komórkach 3T3 hodowanych w różnych wariantach doświadczalnych (wg Holley i wsp. [35], zmodyfikowane).

A — 3-dniowa hodowla w środowisku z jedynie 0,1% zawartości wszystkich niezbędnych aminokwasów; B — 3-dniowa hodowla w środowisku bez fenyloalaniny; C — 3-dniowa hodowla w środowisku bez lizyny; D — 3-dniowa hodowla w środowisku bez niezbędnych aminokwasów, do której na 17 godzin przed wykonaniem oznaczeń dodano brakujące aminokwasy

jeden z podstawowych aminokwasów jest wyeliminowany z pożywki [35]. Nie wszystkie jednak komórki z populacji zostają selektywnie zatrzymane w fazie G-1, a ilość komórek wkraczająca w dalsze fazy cyklu komórkowego różni się przy braku poszczególnych aminokwasów. W tabeli 3 zestawiono procentową zawartość komórek 3T3 będących w fazie S po 3 dniach hodowli w pożywce zawierającej jedynie 1% ilości normalnie dodawanych aminokwasów. Dodanie do pożywki brakujących aminokwasów powoduje po kilkunastu godzinach ponowne podjęcie (reinicjację) syntezy DNA. Tak np. w omawianych komórkach 3T3 procent ilości komórek w fazie S zwiększa się po 17 godzinach z 10% do 60% (rys. 7D). W omawianych eksperymentach z komórkami 3T3 reinicjacja syntezy DNA, po dodaniu pojedynczego aminokwasu, następowała jedynie w niewielkim stopniu ze względu na słaby stan komórek będący rezultatem ich wzrostu w tych warunkach eksperymentalnych [35].

Jednakże inne, niż 3T3, linie komórkowe okazały się mniej wrażliwe na niedobór poszczególnych aminokwasów, co zostało wykorzystane do opracowania metod synchronizacji populacji komórkowych. Obiecujące wyniki uzyskano obniżając stężenie lub niemal całkowicie eliminując z pożywki izoleucynę [8, 64, 80] oraz leucynę [22], tryptofan [92] i asparaginę [78].

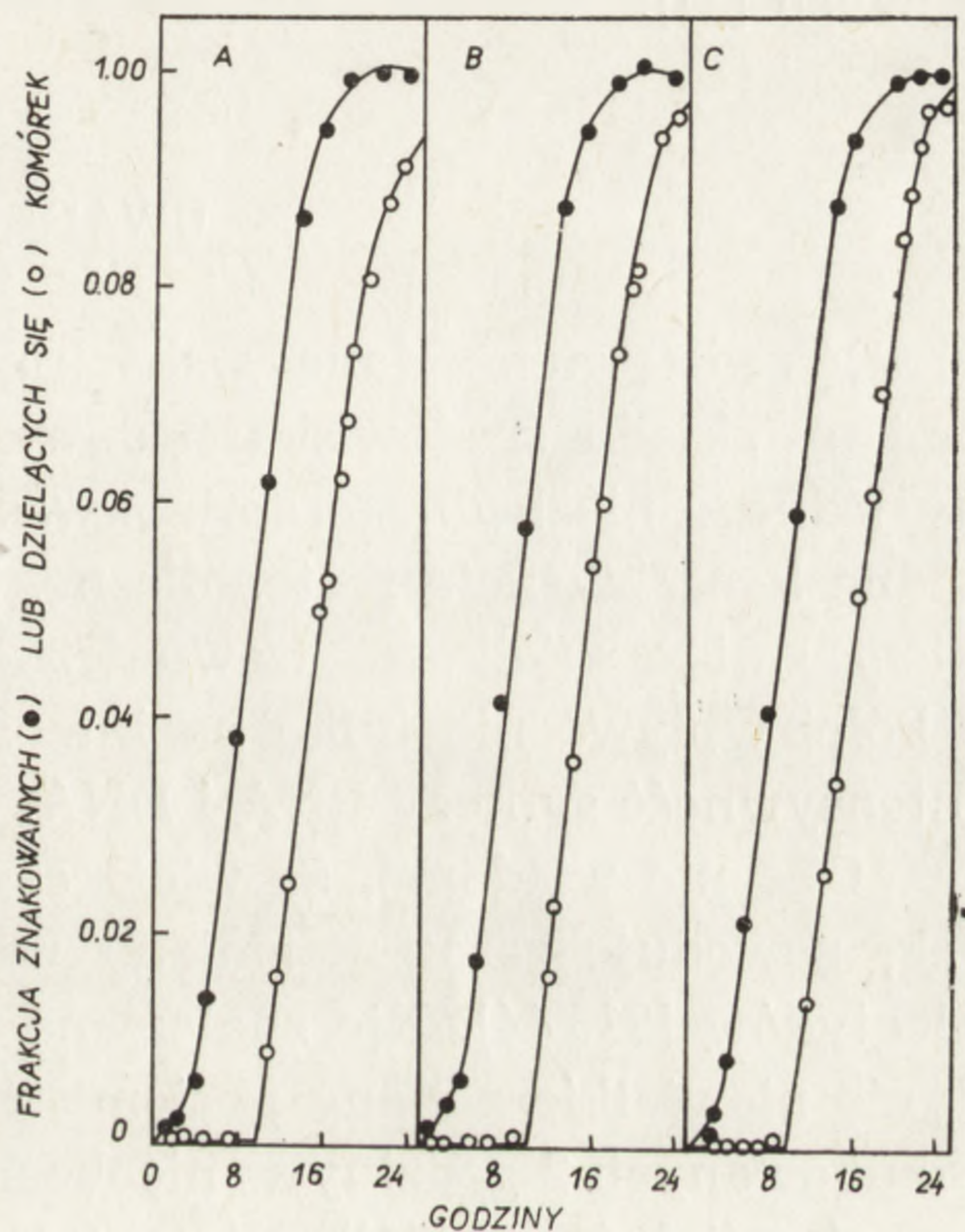
Szczególnie dużo uwagi poświęcono badaniom niedoboru izoleucyny,

TABELA 3. Wpływ braku poszczególnych niezbędnych aminokwasów na liczbę komórek 3T3 wkraczających w fazę S (wg danych Holley i wsp. [35])

Pożywka z 1% zawartości typowej ilości	% komórek w fazie S
Wszystkich niezbędnych aminokwasów	10
Argininy	20
Cystyny	10
Glutaminy	15
Histydyny	10
Izoleucyny	8
Leucyny	12
Lizyny	10
Metioniny	35
Fenylalaniny	6
Treoniny	8
Tyrozyny	15
Waliny	15

gdyż niedobór tego aminokwasu w środowisku wywołuje najłabsze upośledzenie syntezy białka. W komórkach rosnących nawet 30 godzin w pożywce bez izoleucyny syntezy białek utrzymuje się na poziomie 57% wartości kontrolnej [20]. Wyniki autoradiograficznych badań włączania radioaktywnej tymidyny do DNA komórek CHO hodowanych przez różny okres czasu w nieobecności izoleucyny wskazują, że w tych warunkach eksperymentalnych komórki nie wbudowują radioaktywnej tymidyny. Można sądzić, że zostały one selektywnie zatrzymane w fazie G - 1 i nie mogą wkroczyć w fazę S [21, 22]. Po dodaniu izoleucyny do pożywki w stężeniu 2×10^{-6} M [50] lub też zmiany eksperymentalnej pożywki na kompletną (pełną), po upływie kilkudziesięciu minut obserwowano rozpoczęcie w komórkach syntezy DNA, a po około 12-14 godzinach podjęcie podziałów przez niemal wszystkie komórki (rys. 8). Synchronizację hodowli poprzez manipulowanie stężeniem izoleucyny w pożywce opisano dotychczas dla hodowanych in vitro komórek z jajników chińskiego (CHO) i syryjskiego (BHK 21/CB) chomika [64, 80, 83] oraz mysich komórek L [84]. Jak dotąd nie udało się jednakże zsynchronizować przy zastosowaniu tej metody komórek transformowanych wirusami (komórki BHK 21 stransformowane wirusem SV40), co również jest wskaźnikiem różnic w odpowiedzi komórek prawidłowych i stransformowanych na niedobory aminokwasowe w środowisku [64]. Ponadto okazało się, że zainfekowanie komórek PPLO wyklucza możliwość ich synchronizacji wywołanej niedoborem izoleucyny [80, 84].

W wyniku hodowli komórek w pożywce zubożonej bądź to w leucynę (komórki CHO; [21, 22]), bądź też w asparaginę (komórki BHK 21/13; [78]) lub tryptofan (leukemiczne komórki L1210; [92]) również obserwowano nagromadzenie się znacznej liczby komórek w fazie G - 1 (50–70%). Jednakże w następstwie dodania każdego z tych aminokwasów nie stwierdzono, aby cała populacja komórek rozpoczynała syntezę DNA i następnie podziały. W przedstawionych układach można zatem mówić jedynie o częściowej synchronizacji populacji.



Rys. 8. Efekt dodania pełnej pożywki (A), izoleucyny i glutaminy (B) oraz jedynie izoleucyny (C) na podjęcie syntezy DNA (●) oraz podziałów komórkowych (○) przez komórki CHO zatrzymane w fazie G - 1 cyklu komórkowego na skutek 48-godzinnej wzrostu w środowisku pozbawionym izoleucyny (wg Tobey i wsp. [84]).

Szczególną sytuację znaleziono w przypadkach hodowli komórek wątrobowych z zarodków szczura w pożywce zubożonej w argininę [68]. Dodanie argininy do środowiska powodowało wprowadzenie inicjacji syntezy DNA, jednakże dopiero po 12–16 godzinach. Ten długi okres czasu wpływający od momentu dodania argininy do rozpoczęcia podziałów sugeruje, zdaniem autorów, zatrzymanie komórek w fazie G - 0, a nie zaś w fazie G - 1.

Należy dodać, że również w komórkach CHO ze stacjonarnej fazy wzrostu hodowli, w których synteza DNA uległa zatrzymaniu, po dodaniu do pożywki dodatkowych ilości izoleucyny lub glutaminy następowała reinicjacja syntezy DNA [50]. I tak kilkakrotnie podwyższając stężenie izoleucyny w pożywce (z 6×10^{-7} M do 2×10^{-6} M) wywoływano zainicjowanie syntezy DNA we wszystkich komórkach. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że izoleucyna, leucyna i glutamina były jedynymi aminokwasami wyczerpanymi z pożywki, gdy komórki L

hodowano przez dłuższy okres czasu bez zmiany pożywki [61]. Następująca interpretacja referowanych wyników wydaje się prawdopodobna: synteza białek niezbędna jest zarówno dla przejścia komórek z fazy G-1 w fazę S (inicjacja syntezy DNA), jak i dla prawidłowego przebiegu fazy S (kontynuacja syntezy DNA). Moment zainicjowania syntezy DNA wydaje się bardziej wrażliwy na upośledzenie syntezy białka spowodowane brakiem poszczególnych aminokwasów, niż sama synteza DNA. Dla kontynuowania syntezy DNA może częściowo wystarczać ilość izoleucyny i leucyny uwalniana w wyniku wewnątrzkomórkowych przemian białkowych [21].

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione dane wskazują wyraźnie, że nawet tak niewielkie zmiany składu środowiska hodowlanego, jak obniżenie stężenia chociażby jednego niezbędnego aminokwasu wywołują daleko posunięte i różnorodne konsekwencje metaboliczne. Należy przypuszczać, że są one wynikiem zmian wielkości wewnątrzkomórkowej puli aminokwasów, która z kolei wpływa nie tylko na intensywność syntezy białka, lecz także na intensywność syntezy RNA i DNA.

Obecnie wiadomo, że wiele czynników, wpływając na wzrost komórek, powoduje zarazem zmiany w komórkach poziomu cyklicznych nukleotydów [31, 44]. Nie znaleziono jednakże zmian poziomu cAMP, a jedynie niewielkie zmiany poziomu cGMP w komórkach raka Landschütza inkubowanych 2 godziny w nieobecności wszystkich podstawowych aminokwasów (tabela 4, [41]). Nie ustalono dotychczas, czy obniżenie poziomu cGMP jest wynikiem słabszej intensywności syntezy tego nukleotydu, czy też wzmożonego rozpadu. Na podstawie tych bardzo niekompletnych danych nie można stwierdzić, czy cykliczne nukleotydy mają bezpośredni związek z odpowiedzią komórek na wahania wielkości wewnątrzkomórkowej puli aminokwasowej. Nie można natomiast negować wpływu cAMP na efektywność transportu aminokwasów do komórek [68].

Niejednakowa odpowiedź różnych komórek na ten sam bodziec, jakim jest zmiana stężenia aminokwasu w pożywce, wskazuje na możliwość występowania w komórkach eukariotycznych różnego typu powiązań pomiędzy intensywnością syntezy białka a intensywnością syntezy RNA, analogicznie jak to ma miejsce w układach bakteryjnych [17, 91]. W licznych układach komórkowych znacznemu obniżeniu syntezy białka, na skutek niedoboru aminokwasowego, towarzyszy obniżenie intensywności syntezy RNA, lecz nie jej całkowite zatrzymanie. Występuje tu zatem sytuacja analogiczna do sytuacji spotykanej w tych szczepach bakteryj-

TABELA 4. Wpływ niedoboru aminokwasowego na poziom cGMP oraz cAMP w komórkach raka Landschütza (z danych Jolicoeur i wsp. [41])

Czas trwania niedoboru aminokwasowego (min.)	cGMP (pmole/mg białka)		cAMP (pmole/mg białka)	
	–aminokwasy	+aminokwasy	–aminokwasy	+aminokwasy
15	0,35	0,37	3,19	3,06
60	0,41	0,71	2,96	3,26
120	0,59	1,10	2,83	3,26

Komórki inkubowano w pełnej pożywce lub też w pożywce pozbawionej aminokwasów, zawsze w nieobecności surowicy. W tabeli przedstawiono wyniki uzyskane w typowym doświadczeniu.

nych, w których zahamowanie syntezy białka nie pociąga za sobą zatrzymania syntezy RNA (relaxed). W przypadku regulacji syntezy DNA liczni autorzy postulują natomiast, że efektywność transportu do komórek podstawowych aminokwasów, a w związku z tym i ich wewnątrzkomórkowe stężenie, są czynnikami wpływającymi bezpośrednio na intensywność syntezy DNA [35, 68].

Wyniki uzyskane w omawianych badaniach mają też pewien aspekt praktyczny. Pozwoliły one bowiem na opracowanie metody otrzymywania, bez stosowania inhibitorów metabolicznych, dzielących się synchronicznie populacji komórkowych. Badania takich populacji komórkowych mogą zezwolić na precyzyjne wniknięcie w mechanizmy regulacji metabolizmu komórkowego.

LITERATURA

- [1] ASTALDI G., L-asparaginase and immune reactions, *Przegląd Lekarski*, **29**: 595–601, 1972.
- [2] BERNHARDT D., DARNELL J. E. jr., tRNA synthesis in HeLa cells: a precursor to tRNA and the effects of methionine, starvation on tRNA synthesis *J. Mol. Biol.*, **42**: 43–56, 1969.
- [2a] BORYSIEWICZ J., KOJ A., Studies on the inhibition of HeLa cell growth by proteins from granular fraction of rat liver, *Folia Biol. (Kraków)*, **20**: 23–34, 1972.
- [3] BOYSE E. A., OLD L. J., MASHBURN L. T., Suppression of murine leukemias by L-asparaginase, *J. Exptl. Med.*, **125**: 17–31, 1967.
- [4] BÖLCSFÖLDI G., POELS L., ELIASSON E., RNA metabolism in human cells during amino acid deprivation, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**: 665–675, 1971.
- [5] BRUNNER M., Regulation of DNA synthesis by amino acid limitation, *Cancer Res.*, **33**: 29–32, 1973.
- [6] CAPIZZI R. L., BERTINI J. R., SKELL R. T., CREASEY W. A., ZANES R., OLAYON C., PETERSON R. G., HANDSCHUMACHER R. E., L-asparaginase: cli-

- nical, biochemical, pharmacological and immunological studies, *Ann. Intern. Med.*, **74**: 893-901, 1971.
- [7] CHRISTMAN J. K., Effect of elevated potassium level and amino acid deprivation on polysome distribution and rate of protein synthesis in L cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **294**: 138-152, 1973.
- [8] COHEN E. P., NYLEN M. U., SCOTT D. B., Microstructural changes induced in mammalian cell cultures by omission and replacement of a single amino acid, *Exp. Cell Res.*, **23**: 443-453, 1961.
- [9] COURTOIS Y., DASTUGUE B., KRUH J., Effects of lysine deprivation and serum stimulation on the synthesis of nonhistone chromosomal proteins by confluent chick fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, **83**: 152-158, 1974.
- [10] COONEY D. A., HANDSCHUMACHER R. E., L - asparaginase metabolism, *Ann. Rev. Pharmacol.*, **10**: 421-440, 1970.
- [11] CULP L. A., BLACK P. H., DNA synthesis in normal and virus transformed mammalian cells after methionine deprivation, *Biochim. Biophys. Acta*, **247**: 220-232, 1971.
- [12] EAGLE H., Amino acid metabolism in mammalian cell cultures, *Science*, **130**: 432-437, 1959.
- [13] EAGLE H., OYAMA V. J., LEVY M., Amino acid requirements of normal and malignant human cells in tissue culture, *Archs. Biochem. Biophys.*, **67**: 432-446, 1957.
- [14] EAGLE H., PIEZ K. A., The population dependent requirement by cultured mammalian cells for metabolites which they can synthesize, *J. Exp. Med.*, **116**: 29-43, 1962.
- [15] EAGLE H., PIEZ K. A., FLEISCHMAN R., OYAMA V. J., Protein turnover in mammalian cell cultures, *J. Biol. Chem.*, **234**: 592-597, 1959.
- [16] EAGLE H., WASHINGTON C. L., LEVY M., COHEN L., The population — dependent requirement by cultured mammalian cells for metabolites which they can synthesize. II. Glutamic acid and glutamine; aspartic acid and asparagine, *J. Biol. Chem.*, **241**: 4994-4999, 1966.
- [17] EDLIN G., BRODA P., Physiology and genetics of the „Ribonucleic acid control” locus in *Escherichia coli*, *Bacteriol. Rev.*, **32**: 206-226, 1968.
- [18] ELIASSON E., BAUER G. E., HULTIN T., Reversible degradation of polyribosomes in Chang cells cultured in a glutamine-deficient medium, *J. Cell Biol.*, **33**: 287-297, 1967.
- [19] Ellem K. A. O., FABRIZIO A. M., JACKSON L. G., Cyclic variation in protein, DNA and ribosomal RNA synthesis in 6C₃HED lymphoma cell cultures due to essential amino acid depletion, *Biochim. Biophys. Acta*, **209**: 425-444, 1970.
- [20] ENGER M. D., TOBEY R. A., Effects of isoleucine deficiency on nucleic acid and protein metabolism in cultured Chinese hamster cells. Continued ribonucleic acid and protein synthesis in the absence of deoxyribonucleic acid synthesis, *Biochemistry*, **11**: 269-277, 1972.
- [21] EVERHART L. P., Effects of deprivation of two essential amino acids on DNA synthesis in Chinese hamster cells, *Exptl. Cell Res.*, **74**: 311-318, 1972.
- [22] EVERHART L. P., PRESCOTT D. M., Reversible arrest of Chinese hamster cells in G-1 by partial deprivation of leucine, *Exptl. Cell Res.*, **75**: 170-174, 1972.
- [23] FAN K., FISHER K. M., EDLIN G., Effect of amino acid and serum deprivation on the regulation of RNA synthesis in cultured Chinese hamster ovary cells, *Exptl. Cell Res.*, **82**: 111-118, 1973.
- [24] FRANZE de FERNANDEZ H. T., POGO A. O., Regulation of nucleolar DNA -

- dependent RNA polymerase by amino acids in Ehrlich ascites tumor cells, in: Gene expression and its regulation, F. T. Kenney, B. A. Hamkalo, G. Favell, J. T. August, eds, (Plenum Press), 91-99, 1973.
- [25] FREEDMAN M. L., RABINOVITZ M., Ribosomal subunits in rabbit reticulocytes under different conditions of polyribosome disaggregation, *Exptl. Cell Res.*, **60**: 480-482, 1970.
- [26] FREED J. J. SCHATZ S. A., Chromosome aberrations in cultured cells deprived of single essential amino acids, *Exptl. Cell Res.*, **55**: 393-409, 1969.
- [27] GRIFFITHS J. B., The quantitative utilization of amino acids and glucose and contact inhibition of growth in cultures of the human diploid cell, WI - 38, *J. Cell Sci.*, **6**: 739-749, 1970.
- [28] — The effect of cell population density on nutrient uptake and cell metabolism: a comparative study of human diploid and heteroid cell lines, *J. Cell Sci.*, **10**: 515-524, 1972.
- [29] — The histidine requirement of a normal and a leukemia cell - line from man: comparative effects on cell growth, metabolism and composition, *J. Cell Sci.*, **15**: 407-417, 1974.
- [30] GRIFFITHS J. P., PIRT S. J., The uptake of amino acids by mouse cells (strain LS) during growth in batch culture and chemostat culture: the influence of cell growth rate, *Proc. R. Soc. B.*, **168**: 421-438, 1967.
- [31] GRZELAKOWSKA - SZTABERT B., Adenozyno 3', 5' - monofosforan jako regulator wzrostu komórek in vitro, *Post. Biochem.*, **19**: 423-445, 1973.
- [32] HALEY E. E., FISCHER G. A., WELCH A. D., The requirement for L - asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture, *Cancer Res.*, **21**: 532-536, 1961.
- [33] HAPLERN B. C., CLARK B. R., HARDY D. N., HALPERN R. M., SMITH R. A., The effect of replacement of methionine by homocysteine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 1133-1136, 1974.
- [34] HILL J. M., ROBERTS J., LOEB E., KHAN A., MACLELLAN A., HILL R. W., L - asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remission in human leukemia, *J. Am. Med. Assoc.*, **202**: 882-888, 1967.
- [35] HOLLEY R. W., KIERNAN J. A., Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low molecular weight nutrients, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 2942-2945, 1974.
- [36] HORI M., FISCHER J. M., RABINOVITZ M., Tryptophan deficiency in rabbit reticulocytes: polyribosomes during interrupted growth of hemoglobin chains, *Science*, **155**: 83-84, 1967.
- [37] HOSICK H. L., STROHMAN R. C., Changes in ribosome - polyribosome balances in chick muscle cells during tissue dissociation, development in culture and exposure to simplified culture medium, *J. Cell Physiol.*, **77**: 145-156, 1971.
- [38] JAGENDORF - ELFVIN M., ELIASSON E. E., Reversible changes in the ultrastructure of Chang liver cell mitochondria following incubation of the cells in a glutamine — deficient medium, *J. Cell Biol.*, **41**: 905-909, 1969.
- [39] JOLICOEUR P., LABRIE F., Effect of amino acid starvation on RNA polymerase activity of Landschutz ascites tumour cells, *Fed. Proc.*, **32**: 646, 1973.
- [40] — Control of RNA synthesis by amino acids in Landschütz ascites tumour cells, *Can. J. Biochem.*, **52**: 867-876, 1974.
- [41] JOLICOEUR P., LEMAY A., LABRIE F., STEINER A. L., Phosphorylation of chromosomal and ribosomal proteins and intracellular levels of cyclic 3',5' - ade-

- nosine monophosphate and 3',5' - guanosine monophosphate during amino acid starvation in Landschutz tumour cells, *Exp. Cell Res.*, **89**: 231-240, 1974.
- [42] KIM J. H., GELBARD A. S., PEREZ A. G., Inhibition of DNA synthesis by actinomycin D and cycloheximide in synchronized HeLa cells, *Exptl. Cell Res.*, **53**: 478-487, 1968.
- [43] KOCHHAR O. S., Effect of glutamine starvation on the ultrastructural organization of Changs cultured cells, *Exptl. Cell Res.*, **49**: 598-611, 1968.
- [44] KRAM R., MAMONT P., TOMKINS G. M., Pleiotropic control by adenosine 3',5' - cyclic monophosphate: a model for growth control in animal cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 1432-1436, 1973.
- [45] KUWANO M., ENDO H., IKEHERA Y., Differences in RNA formation and polyribosome metabolism in serum - starved normal and transformed cells, *Cancer Res.*, **33**: 2965-2971, 1973.
- [46] LAISSUE J., MARX W., GRIEDER A., SCHINDLER R., Proliferation and specific functions of neoplastic mast cells in culture, effect of amino acid deprivation, *Exptl. Cell Res.*, **69**: 57-64, 1971.
- [47] LANE N. J., NOVIKOFF A. B., Effects of arginine deprivation, ultraviolet radiation and X - radiation on cultured KB cells, *J. Cell Biol.*, **27**: 603-620, 1965.
- [48] LEFFERT H. L., PAUL D., Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells, *J. Cell Biol.*, **52**: 559-568, 1972.
- [49] LEVINE E. M., JENG D. Y., CHANG Y., Contact inhibition, polyribosomes and cell surface membranes in cultured mammalian cells, *J. Cell Physiol.*, **84**: 349-354, 1974.
- [50] LEY K. D., TOBEY R. A., Regulation of initiation of DNA synthesis in Chinese hamster cells II. Induction of DNA synthesis and cell division by isoleucine and glutamine in G - 1 arrested cells in suspension culture, *J. Cell Biol.*, **47**: 453-459, 1970.
- [51] LITTLEFIELD J. W., JACOBS P. S., The relation between DNA and protein synthesis in mouse fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **108**: 652-658, 1965.
- [52] LITWIN J., Human diploid cell response to variations in relative amino acid concentrations in Eagle's medium, *Exptl. Cell Res.*, **72**: 566-568, 1972.
- [53] — Growth of human diploid fibroblasts in media with different amino acid composition, *J. Cell Sci.*, **14**: 671-680, 1974.
- [54] LOCART R. Z., EAGLE H., Requirements for growth of single human cells, *Science*, **129**: 252-255, 1959.
- [55] MADEN B. E. H., Effects of lysine or valine starvation on ribosome subunit balance in HeLa cells, *Nature*, **224**: 1203-1205, 1969.
- [56] — Effects of amino acid starvation on ribosome formation in HeLa cells, ribosomal labelling patterns in cells deprived of different individual amino acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **281**: 396-398, 1972.
- [57] MADEN B. E. H., VAUGHAN M. H. jr., Synthesis of ribosomal proteins in the absence of ribosome maturation in methionine - deficient HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **38**: 431-435, 1968.
- [58] MADEN B. E. H., VAUGHAN M. H., WARNER J. R., DARNELL J. R., Effects of valine deprivation on ribosome formation in HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **45**: 265-275, 1969.
- [59] MASHBURN L. T., LANDIN L. M., Inhibition of thymidine and basic amino acid metabolism in P1798 lymphosarcoma by L - asparaginase, *Cancer Res.*, **34**: 313-318, 1974.

- [60] MEISLER A. J., Studies on contact inhibition of growth in the mouse fibroblast, 3T3. II. Effects of amino acid deprivation and serum on growth rate, *J. Cell. Sci.*, **12**: 861-873, 1973.
- [61] MOHBERG J., JOHNSON M. J., Amino acid utilization by 929 - L fibroblasts in chemically defined media, *J. Nat. Cancer Inst.*, **31**: 611-625, 1963.
- [62] MUNRO H. N., Role of amino acid supply in regulating ribosome function, *Fed. Proc.*, **27**: 1231-1237, 1968.
- [63] NEUMAN R. E., McCOY T. A., Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for asparagine and glutamine, *Science*, **124**: 124-125, 1956.
- [64] PARDEE A. B., A restriction point for control of normal animal cell proliferation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**: 1286-1290, 1974.
- [65] PATTERSON M. K. jr., Uptake and utilization of amino acids by cell cultures, in *Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture*, ed. H. Rothblat, W. J. Cristofalo, I, 171-209, 1972.
- [66] PATTERSON M. K. jr., MAXWELL M. D., CONWAY E., Studies on the asparagine requirement of the Jensen sarcoma and the deprivation of its nutritional variant, *Cancer Res.*, **29**: 296-300, 1969.
- [67] PATTERSON M. K., MAXWELL M. D., Effects of L - asparagine deprivation on the cell cycle of the Jensen sarcoma, *Cancer Res.*, **30**: 1064-1067, 1970.
- [68] PAUL D., WALTER S., Growth control in primary fetal rat liver cells in culture, *J. Cell Physiol.*, **85**: 113-124, 1975.
- [69] PAWLOWSKI P. J., VAUGHAN M. H., Comparison of the relative synthesis of the proteins of the 50S ribosomal subunit in growing and valine deprived HeLa cells, *J. Cell Biol.*, **52**: 409-419, 1972.
- [70] PIEZ K. A., OYAMA V. J., LEVINTOW L., EAGLE H., Proteolysis in stored serum and its possible significance in cell culture, *Nature*, **188**: 59-60, 1960.
- [71] SATO G., FISHER H. W., PUCK T. T., Molecular growth requirements of single mammalian cells, *Science*, **126**: 961-964, 1957.
- [72] SCHNEIDERMAN M. H., DEWEY W. C., HIGHFIELD A. P., Inhibition of DNA synthesis in synchronized Chinese hamster cells treated in G - 1 with cycloheximide, *Exptl. Cell Res.*, **67**: 147-155, 1971.
- [73] SHIELDS R., KORNER A., Regulation of mammalian ribosome synthesis by amino acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **204**: 521-530, 1970.
- [74] SKÖLD O., ZETTERBERG A., Studies on the amino acid regulation of RNA synthesis in mammalian cells in tissue culture, *Exptl. Cell Res.*, **55**: 289-294, 1969.
- [75] SMULSON M. E., Amino acid deprivation of human cells: effects on RNA synthesis, RNA polymerase and ribonucleoside phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**: 537-540, 1970.
- [76] SMULSON M. E., THOMAS J., Ribonucleic acid biosynthesis of human cells during amino acid deprivation, *J. Biol. Chem.*, **244**: 5309-5312, 1969.
- [77] STORR J. M., BURTON A. F., The effects of arginine deficiency on lymphoma cells, *Brit. J. Cancer*, **30**: 50-59, 1974.
- [78] TORPIER G., GRUEST J., MONTAGNIER L., Synchronization de cellules BHK 21 par carence partielle en L - asparagine, *Exptl. Cell Res.*, **85**: 437-442, 1974.
- [79] TIOLLAIS P., GALIBERT F., BOIRON M., Effects of valine deprivation on the biosynthesis of ribosomal and messenger RNA in a mammalian cell line (L5178Y), *Eur. J. Biochem.*, **18**: 35-45, 1971.
- [80] TOBEY R. A., Production and characterization of mammalian cells reversibly

- arrested in G-1 by growth in isoleucine-deficient medium, *Methods in Cell Biol.* ed. D. Prescott, **VI**: 67-112, 1973.
- [81] TOBEY R. A., CRISSMAN H. A., Preparation of large quantities of synchronized mammalian cells in late G-1 in the pre-DNA replicative phase of the cell cycle, *Exptl. Cell Res.*, **75**: 460-464, 1972.
- [82] TOBEY R. A., CRISSMAN H. A., KRAEMER P. M., A method for comparing effects of different synchronizing protocols of mammalian cell cycle traverse, *J. Cell Biol.*, **54**: 638-645, 1972.
- [83] TOBEY R. A., LEY K. D., Regulation of initiation of DNA synthesis in Chinese hamster cells. I. Production of stable reversible G-1 — arrested population in suspension culture, *J. Cell Biol.*, **46**: 141-158, 1970.
- [84] TOBEY R. A., LEY K. D., Isoleucine-mediated regulation of genome replication in various mammalian cell lines, *Cancer Res.*, **31**: 46-51, 1971.
- [85] VAN VENROIJ W. J. W., HENSHAW E. C., HIRSCH C. A., Effects of deprivation of glucose or individual amino acids on polyribosome distribution and rate of protein synthesis in cultured mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **259**: 127-137, 1972.
- [86] VAUGHAN M. H. jr., Comparison of regulation of synthesis and utilization of 45S ribosomal precursor RNA in diploid and heteroploid human cells in response to valine deprivation, *Exptl. Cell Res.*, **75**: 23-30, 1972.
- [87] VAUGHAN M. H., PAWLOWSKI P. J., FORSCHHAMMER J., Regulation of protein synthesis initiation in HeLa cells deprived of single essential amino acids, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**: 2057-2061, 1971.
- [88] VAUGHAN M. H., SOEIRO R., WARNER J. R., DARNELL J. E., The effects of methionine deprivation on ribosome synthesis in HeLa cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**: 1527-1534, 1967.
- [89] WEINBERG A., BECKER Y., Effect of arginine deprivation on macromolecular processes in Burkitt's lymphomas, *Exptl. Cell Res.*, **60**: 470-474, 1970.
- [90] WEISS B. G., The dependence of DNA synthesis on protein synthesis in HeLa S₃ cells, *J. Cell Physiol.*, **73**: 85-90, 1969.
- [91] WILLIS M. V., BASEMAN J. B., AMOS H., Noncoordinate control of RNA synthesis in eucaryotic cells, *Cell* **3**: 179-184, 1974.
- [92] WOOLLEY P. V., III, DION R. L., BONO V. H. jr., Effects of tryptofan deprivation on L 1210 cells in culture, *Cancer Res.*, **34**: 1010-1014, 1974.
- [93] WRISTON J. C. jr., YELLIN T. O., L-asparaginase, a review, *Adv. Enzymol.*, **39**: 185-248, 1973.

Otrzymano: 11 lipca 1975.

Przyjęto: 15 września 1975.

Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

NAJNOWSZE HIPOTEZY DOTYCZĄCE INTERAKCJI DNA - HISTONY

Halina MICHNIEWICZ

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii
Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Przedstawiono dane z lat 1974-1975 dotyczące budowy molekularnej chromatyny i interakcji DNA z histonami. Struktura chromatyny oparta jest na powtarzających się jednostkach występujących wzdłuż fibryli chromatynowej. Jednostki te, widoczne w mikroskopie elektronowym w postaci kulistych cząstek (ciała v) o średnicy 70 Å, zbudowane są z określonej długości odcinków DNA zasocjowanych z kompleksami histonów. Do budowy jednostki konieczne są histony wszystkich klas za wyjątkiem F1. Histon F1 występuje między tymi kulistymi strukturami i głównie tworzy poprzeczne mostki między fibrylami chromatynowymi. Kuliste cząstki połączone są przez krótkie odcinki DNA. W ten sposób fibryla chromatynowa ma postać „koralików na sznurku” („bead on the string”).

Chromatyna jąder interfazowych stanowi fibrylarną strukturę zbudowaną z DNA i histonów. Histony prawdopodobnie regulują aktywność genetyczną i utrzymują DNA wewnątrz jądra w stanie wtórnie zwiniętym. Jednak sposób w jaki oddziałują z DNA tworząc nukleoproteidowe fibryle nie jest jasny. W celu zrozumienia mechanizmu interakcji białek histonowych i DNA w kontroli ekspresji genowej zaproponowano szereg modeli.

Pierwsze dane świadczące iż histony wpływają na strukturę chromatyny pochodzą z badań dyfrakcji promieni X. Wielu badaczy wykazało, że chromatyna daje szereg pasm dyfrakcji promieni X, co stanowi dowód występowania powtarzających się jednostek w przedziałach 100 Å wzdłuż długości fibryli chromatynowej. Po usunięciu histonów ten wzór ugięcia ulega zaburzeniu. Pardon i Wilkins [13] na podstawie badań dyfrakcji promieni X zaproponowali model super-zwoju. Model ten zakłada, iż podwójna helisa DNA pokryta jest histonami. Całość ta wtórnie spiralizowana tworzy pojedynczy super-zwój (super-helix) o powtarzających

się 120 Å odcinkach i średnicy 100 Å. Ten model, częściowo ze względu na brak dowodów na inny rodzaj struktury, był ogólnie akceptowany [10] [11].

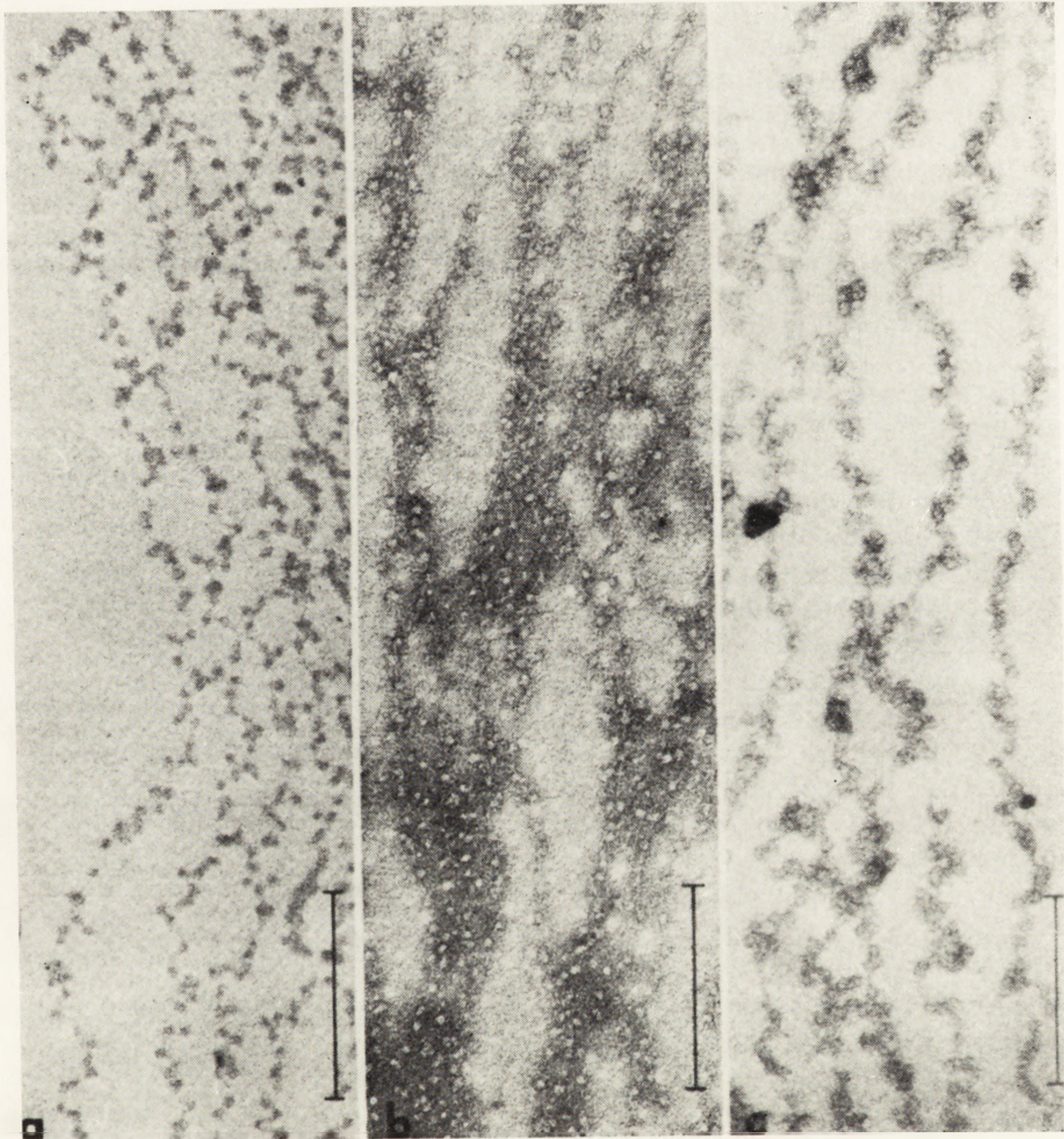
Ostatnio pojawiło się szereg danych sugerujących, że DNA jest uporządkowany w małych powtarzających się jednostkach nukleoproteidowych wzdłuż fibryli chromatynowej.

W ostatnim roku Olins i Olins [8] opublikowali mikrofotografie chromatyny jąder izolowanych z grasicy i wątroby szczura oraz z erytrocytów kurzych, kontrastowanych pozytywnie lub negatywnie. Fibryle chromatynowe były bardzo długie, równoległe rozmieszczone i wykazywały kuliste cząstki — ciała v (v-bodies) o średnicy 60–80 Å połączone cienkimi odcinkami o średnicy około 15 Å. Autorzy zakładają, że ciała v stanowią struktury, w których są upakowane nukleohistony i podają pewne ich właściwości fizyczne: średnica tych sferycznych ciał wynosi 70 Å, objętość właściwa — 0,68 cm³/g, masa cząsteczkowa 160 000 daltonów.

Istnieje możliwość, że widoczne na mikrofotografiach elektronowych liniowe uszeregowanie kulistych cząstek stanowi artefakt powstały podczas preparatyki do badań w mikroskopie elektronowym. Pojawiło się jednak szereg dalszych dowodów przemawiających za takim modelem struktury chromatyny, zwanym „koraliki na sznurku” („bead on the string”).

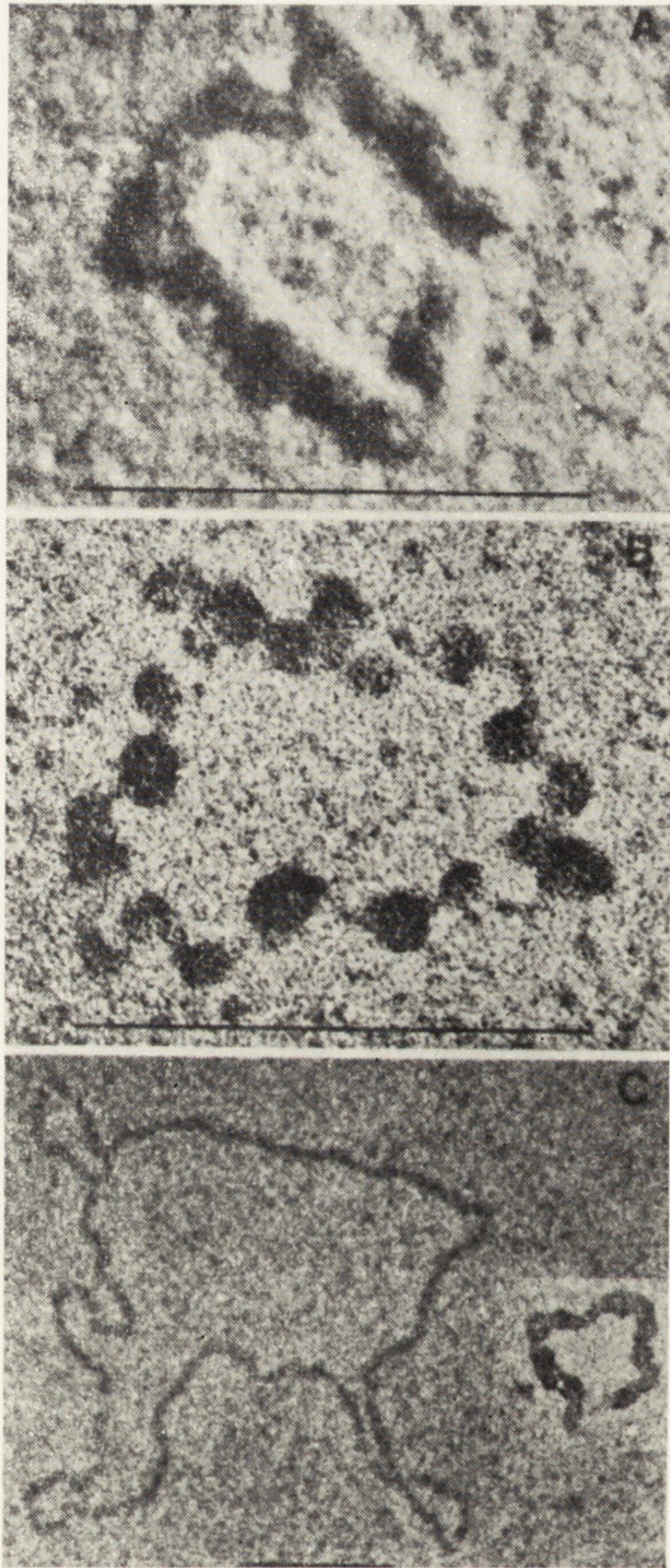
Istotnych dowodów świadczących o występowaniu jednostek w strukturze chromatyny dostarczyły eksperymenty z działaniem dezoksyrybonukleaz. Trawienie chromatyny grasicy cielęcia i retikulocytów kurzych DNA - azą ze *Staphylococcus* daje serię odcinków DNA - histony o 130–145 parach zasad [1]. Precyzja z jaką następuje rozpad na fragmenty takiej długości, sugeruje specyficzne uporządkowanie histonów na powierzchni DNA. Prawdopodobnie określone odcinki ich polipeptydowego łańcucha są w ścisłym kontakcie z DNA, dzięki czemu ten fragment DNA jest zabezpieczony przed trawieniem. Usunięcie histonów lizyno-bogatych przed trawieniem enzymatycznym powoduje, że pojawiają się fragmenty DNA o długości 130 par zasad.

Dalsze dowody, świadczące że DNA w kulistych strukturach nie jest łatwo dostępny dla nukleaz pochodzą z badań przedstawionych przez Oosterhofa [12]. Przebieg fragmentacji chromatyny pod wpływem DN - azy wykazuje, że enzym ten powoduje powstanie równych ilości kwasorozpuszczalnych oligonukleotydów i 11S nukleoproteidowych cząstek. Obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazały, że cząstki 11S zawierają dwupasmowy DNA o długości około 400 Å, co odpowiada 120 parom zasad. Trawienie chromatyny przeprowadzono na materiale różnego pochodzenia, stosując DN - azę I i II, a także DN - azę pochodzenia



Rys. 1. Mikrografie fibryli chromatynowych znajdujących się na zewnątrz popękanych jąder. Widoczne kuliste ciała v połączone cienkimi strukturami nitkowatymi. Podziałka odpowiada $0,2 \mu\text{m}$.

a — Chromatyna grasicy szczura kontrastowana mieszaniną 4% wodnego roztworu kwasu fosforo-wolframowego i 90% etanolu (3:7), płukana w 95% etanolu i suszona na powietrzu. *b* — Chromatyna grasicy szczura kontrastowana negatywowo 0,5% molińdenianem amonu (pH 7). *c* — Chromatyna erytrocytów kurzych kontrastowana podobnie jak w *b* (wg. Olins i Olins [8])



Rys. 2. Minichromosomy wirusa SV40 izolowane z jąder zakażonych komórek, oglądane w stanie natywnym (A), koralikopodobnym (B), oraz po usunięciu białek (C). Kreski oznaczają 1000 Å, a dodatkowe zdjęcie natywnego minichromosomu z boku (C) przy tym samym powiększeniu pozwala ocenić różnice długości

bakteryjnego. We wszystkich badanych przypadkach obserwowano podobny lub identyczny wzór fragmentacji, co wskazuje, że wyniki te są konsekwencją powszechnych cech struktury chromatyny. Autorzy sugerują, że 400 Å odcinki tworzą jednostki trudno dostępne dla działania wymienionych nukleaz. 50% DNA występuje jako jednostki 11S. Jednostki te mogą być połączone liniowo przez krótkie, wrażliwe na DN - azę odcinki DNA. Istnieje jednak możliwość, że jest więcej takich odcinków dostępnych dla nukleaz. Odcinki te nie ochraniane przez histony mogą odpowiadać obszarom aktywności matrycowej DNA.

Wzór fragmentacji nukleazowej otrzymany przez Oosterhofa [12] wykazujący, że miejsca wrażliwe na działanie DN - azy są rozmieszczone w 400 Å odstępach wzdłuż fibryli chromatynowej jest dokładnym potwierdzeniem modelu zaproponowanego przez Olins i Olins [8]. Autorzy ci założyli, że koralikopodobne regiony (ciała v) mają co najmniej po jednej cząsteczce histonu z każdej klasy, co daje w sumie 84 000 daltonów. Wobec tego masa cząsteczkowa DNA wynosiłaby około 80 000, co odpowiada długości 400 Å. Te 400 Å odcinki miałyby znajdować się w sferycznej cząstce o średnicy 70 Å.

Model „koralików na sznurku” sugerowano również, posługując się wirusem SV40 jako źródłem DNA [3]. W skład dezoksyrybonukleoproteidu wirusowego, izolowanego z zakażonych komórek, wchodzi histony. Wykazano, że odcinki DNA związanego z histonami, długości 40 par zasad, są siedmiokrotnie zwinięte, tworząc struktury koralikopodobne. Obecność odcinków DNA charakterystycznej długości wykazano również w jednym z bardziej prymitywnych eukariotów — drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* [7].

Przedstawione wyniki powszechnie uważane są za dowód wskazujący, że trudno dostępne dla nukleaz odcinki DNA znajdują się w kulistych cząstkach („koralikach”) gdzie są zasocjowane z histonami. Ponieważ DNA w kulistych cząstkach jest jeszcze częściowo dostępny dla enzymów, które mogą powodować jego modyfikację lub degradację, wielu badaczy przypuszcza, że DNA owinięty jest na zewnątrz globularnego kompleksu histonów tworząc „koralik”. Olins i wsp. [8] sugerują, że co najmniej połowa DNA chromatyny tworzy powłokę dokoła histonów i ta część dostępna jest dla nukleazy i barwników.

Rozpatrując wielkość odcinków opornych na trawienie DN - azą wydaje się nieprawdopodobne, aby pojedyncza cząsteczka histonu mogła stanowić wystarczające ich zabezpieczenie. Dlatego też większość autorów jest zdania, że histony są zasocjowane w pęczki na powierzchni DNA.

Kornberg i Thomas [5] wykazali, że histony in vitro mają tendencje do tworzenia dużych agregatów. W roztworach histony asocjują w pary. Wykazano tworzenie monomerów F2A2 i F2B, dimerów F2A1 i F3

oraz tetramerów $(F2A1)_2(F3)_2$. Istnieje wiele dowodów świadczących, że takie same pary histonów, jakie obserwowano w roztworach, występują także w chromatynie. Najważniejszym dowodem na występowanie tetramerów $(F2A1)_2(F3)_2$ w chromatynie jest fakt, że kompleks utworzony z tetramerów, oligomerów $F2A2-F2B$ i DNA daje taki sam wzór ugięcia promieni X jak chromatyna.

Na podstawie dyfrakcji promieni X, analizy biochemicznej histonów oraz badań nad degradacją chromatyny przez DN - azę, Kornberg [6] sugeruje, że struktura chromatyny oparta jest na powtarzających się jednostkach składających się z dwóch rodzajów oligomerycznych struktur histonów $F2A1$, $F3$, $F2A2$ i $F2B$ oraz 200 par zasad kwasu nukleinowego. Zwinięty DNA stanowi szkielet każdej jednostki. Fibryle chromatynowe mają zawierać wiele takich jednostek, które tworzą łańcuch. W proponowanym modelu autor sugeruje sposób uporządkowania histonów i DNA w powtarzających się jednostkach. Rdzeń tych jednostek mają tworzyć tetramery histonów $(F2A1)_2(F3)_2$. Za argumenty wskazujące na takie ułożenie histonów autor uważa globularną strukturę tetramerów, konserwatywność sekwencji aminokwasów histonów $F2A1$ i $F3$, a także fakt, że histony te usuwane są z chromatyny jako ostatnie przez łagodne metody ekstrakcji. Natomiast histony $F2A2$ i $F2B$, które występują jako dimery $F2A2-F2B$ lub większe oligomery $F2A2-F2B$ determinują rozstawienie jednostki wzdłuż długiej osi fibryli chromatynowych.

Kornberg [6] uważa, że „koralikopodobne”, gęste regiony o średnicy 70 Å, obserwowane przez Olins i Olins [8], pozostają w zgodzie z proponowanym modelem i mogą być zbudowane właśnie z globularnych tetramerów $(F2A1)_2(F3)_2$ o średnicy 40–50 Å pokrytych przez podwójną helisę DNA o średnicy 20 Å.

Odpowiedzi na pytanie, czy interakcja między histonami, jaka zachodzi w roztworze, dotyczy również histonów związanych z DNA, dostarczają również badania wrażliwości kompleksów histonowych na działanie trypsyną. Histony są dostępne dla trypsyny tylko wtedy, gdy znajdują się na zewnątrz kulistych cząstek („koralików”). Degradacja trypsyną może być więc stosowana dla określenia, czy te same partie cząstek histonów znajdują się na zewnętrznej części koralika zarówno w sytuacji kiedy są one związane z DNA, jak i wtedy kiedy znajdują się w roztworze. Weintraub i von Lente [15] wykazali, że kiedy histony są zasocjowane z DNA w chromatynie, trypsyna degradowuje tylko 20–30 aminokwasów od końca N-terminalnego. Pozostałe aminokwasy wchodzące w skład histonów są odporne na działanie trypsyny prawdopodobnie dlatego, że wchodzą ze sobą w interakcję wewnątrz kompleksu. Interakcja histon-histon zabezpiecza większą część kompleksu przed trawieniem,

ale pomimo to koniec N - terminalny wystaje na zewnątrz i jest dostępny dla trypsyny.

Kornberg [6] w proponowanym modelu sugeruje regularne występowanie odcinków DNA, które składają się z 200 par zasad i są długości 60 Å. W literaturze istnieje jednak szereg dowodów wskazujących na możliwość występowania jednostek o innej długości. Powstawanie w wyniku trawienia nukleazami odcinków, które są raczej wielokrotnością 200 par zasad, Kornberg tłumaczy blokowaniem miejsc pęknięć przez białka niehistonowe. Wielu autorów wykazuje powstawanie w wyniku trawienia nukleazami znacznie mniejszych odcinków DNA. Wydaje się więc bardziej prawdopodobne, że występuje więcej rodzajów powtarzających się odcinków DNA zasocjowanych z białkami.

Na podstawie przedstawionych danych Weintraub i von Lente [15] sugerują inną koncepcję interakcji histonów z DNA. Zgodnie z tą koncepcją końce N - terminalne histonów są zlokalizowane wzdłuż regionów odpowiadających odcinkom tej samej cząsteczki DNA, natomiast histony C - terminalne są umieszczone wzdłuż regionów odpowiadających różnym cząstkom DNA. Autorzy proponują model, w którym kompleks specyficznych histonów oplata DNA przez poprzeczne wiązanie zwartych obszarów chromatyny. Te poprzeczne wiązania mogą występować w chromatynie zwartej między różnymi fibrylami lub między sąsiednimi obszarami zwartymi tej samej fibryli chromatynowej. Ponadto autorzy sugerują, że nukleazo-wrażliwe odcinki DNA mogą leżeć w postaci pętli ponad powierzchnią chromatyny.

Dalszych dowodów o występowaniu jednostek w strukturze chromatyny dostarczają badania dyfrakcji promieni X przeprowadzone przez Bram i wsp. [2]. Autorzy ci, podobnie jak cytowani badacze, sugerują że 100 Å, kuliste ciała zawierają zarówno białka, jak i DNA. Nie wyjaśniają jednak jakie jest uporządkowanie histonów i DNA wewnątrz tych kulistych cząstek, ale przypuszczają, że DNA musi być w nich zwinięty czterokrotnie. Bram i wsp. [2] uważają, że te sferyczne 100 Å ciała mają konfigurację super-zwoju. Na jeden obrót zwoju ma przypadać 8 kul w strukturach bardziej gęstych, natomiast jeżeli przyjąć model „koralików na sznurku” — na jeden obrót będą przypadały 3 kule. Promień takiego super-zwoju ma wynosić 130 Å, a skok — 500 Å.

Wielu badaczy przypuszcza, że tylko 4 z 5 rodzajów histonów (tj. F2A1, F2A2, F2B, F3) oddziałują ze sobą tworząc globularne skupienia zasocjowane z kulistymi strukturami. Natomiast piąty rodzaj histonu (F1) jest prawdopodobnie związany z odcinkami DNA znajdującymi się między cząstkami. Jest to zgodne z obserwacjami Richardsa i Pardona [14] wykazującymi, że usunięcie frakcji F1 nie powoduje zmiany

wzoru ugięcia promieni X przez chromatynę, natomiast usunięcie każdego innego histonu powoduje zniszczenie tego wzoru.

Histon F1 jest najslabiej związanym histonem i często ulega degradacji do peptydów podczas procesu trawienia nukleazami (preparaty handlowe DN - azy I i DN - azy II zawierają pewne ilości proteaz). Wykazano jednak [1], że proteoliza histonu F1 nie jest konieczna dla uwolnienia jednostek przez nukleazy. Histon ten, zgodnie z ogólnie przyjętym poglądem, jest odpowiedzialny za wiązanie poprzeczne fibryli chromatynowych.

Związanie DNA z histonami powoduje niedostępność pewnych sekwencji DNA dla polimerazy RNA, wskutek tego ogranicza ekspresję genów. Niektórzy badacze próbują określić, czy histony rozpoznają specyficzną sekwencję DNA. Wiele dowodów wskazuje, że histony nie wiążą się do specyficznych sekwencji DNA. Axel [1] wykazał, że wzór trawienia nukleazami chromatyny zrekonstruowanej z histonów i DNA pochodzenia wirusowego, bakteryjnego i eukariota jest taki sam.

McCarthy i Polishy (cyt. za Kolata [4]) określili lokalizację cząsteczek histonów na DNA wirusa SV40 przy zastosowaniu endonukleazy, która rozrywa ten DNA w 6 dobrze znanych miejscach. Okazało się, że możliwość pęknięć jest jednakowa we wszystkich 6 miejscach. Należy wobec tego sądzić, że wprowadzone histony ulegają rozmieszczeniu przypadkowemu na DNA wirusa SV40.

Być może jednak, że histony rozpoznają specyficzną sekwencję DNA w żywych komórkach [4]. Kolata [4], dla sprawdzenia czy histony wiążą się do specyficznych regionów DNA, proponuje izolowanie kulistych cząstek („koralików”) oraz usuwanie z nich i analizowanie sekwencji otrzymanych fragmentów DNA. Takie eksperymenty nie były jeszcze wykonane.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu literatury, sferyczne struktury — ciała v — opisano dopiero w ubiegłym roku. Prawdopodobnie przyczyn — wobec rozwijanych szeroko co najmniej od 10 lat obserwacji struktury chromatyny w mikroskopie elektronowym — należy szukać w stosowanych metodach preparatyki. Olins i wsp. [9] rozważając dlaczego dotychczasowe metody obserwacji struktury chromatyny nie wykazywały sferycznych struktur podobnych do opisanych później ciał v sugerują, że odwodnienie chromatyny powoduje drastyczne zakłócenia strukturalne. O naruszeniu struktury natywnej chromatyny świadczą wyniki analizy wzorów dyfrakcji promieni X, uzyskiwanych przy niskim kącie dla osadów jądrowych na różnych etapach preparatyki do mikroskopii elektronowej. Na podstawie tych badań autorzy przypuszczają, że

cząstki te (ciała v) obserwowane w mikroskopie elektronowym mogą ściśle odpowiadać konfiguracji natywnej chromatyny.

Spośród przedstawionych modeli interpretujących mechanizmy interakcji DNA - histony, najbardziej prawdopodobny wydaje się model „koralików na sznurku”. Model ten jest zgodny z wynikami eksperymentów przeprowadzonych na różnym materiale i różnymi metodami, co pozwala przypuszczać, że taki sposób organizacji musi być powszechny i charakterystyczny dla chromatyny w żywych komórkach.

Intensywne badania prowadzone w tym kierunku pozwalają mieć nadzieję na dalsze wyjaśnienie tych problemów.

Autorka dziękuje prof. dr hab. Marii Olszewskiej za konsultację i pomoc w opracowywaniu zagadnienia.

LITERATURA

- [1] AXEL R., MELCHIOR M. W., SOLLNER - WEBB J. R. B., FENSENFELD G., Specific sites of interaction between histones and DNA in chromatin, *Proc. Acad. Sci. USA*, **71**: 4101-4105, 1974.
- [2] BRAM S., BUTLER - BROWNE G., BANDY P., IBEL K., Quaternary structure of chromatin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 1043-1045, 1975.
- [3] GRIFFITH J. D., Chromatin structure; Deduced from a minichromosome, *Science*, **187**: 1202-1203, 1975.
- [4] KOLATA B. G., Chromatin structure: The supercoil is superseded, *Science*, **188**: 1097-1099, 1975.
- [5] KORNBERG R. D., THOMAS J. O., Chromatin structure: Oligomers of the histones, *Science*, **184**: 865-868, 1974.
- [6] KORNBERG R. D., A repeating of histones and DNA, *Science*, **184**: 868-871, 1974.
- [7] LOHR D., VON HOLDE E. K., Yeast chromatin subunits structure, *Science*, **188**: 165-166, 1975.
- [8] OLINS A. L., OLINS E. D., Spheroid chromatin units (V bodies), *Science*, **183**: 330-331, 1974.
- [9] OLINS A. L., CARLSON R. D., OLINS D. E., Visualization of chromatin substructure: V bodies, *J. Cell. Biol.*, **64**: 528-537, 1975.
- [10] OLSON O. J., BUSCH H., Nuclear proteins: Histone and chromatin structure, [w] *The Cell Nucleus*, red. H. Busch, Academic Press, New York, London 1974, 223-228.
- [11] OLSZEWSKA M. J., Ultrastruktura chromatyny i chromosomów, *Post. Biol. Kom.*, **1**: 1-13, 1974.
- [12] OOSTERHOF D. K., HOZIER I. C., RILL R. L., Nuclease action on chromatin: Evidence for discrete repeated nucleoprotein units, along chromatin fibrils, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 633-637, 1975.

- [13] PARDON J. F., WILKINS M. H. F., A super-coil model for nucleohistone, J. Mol. Biol., **68**: 115-124, 1972.
- [14] RICHARDS M. B., PARDON J. F., The molecular of nucleohistone (DNH), Exp. Cell. Res., **62**: 184-196, 1970.
- [15] WEINTRAUB H., VON LENTE F., Dissection of chromosome structure with trypsin and nuclease, Proc. Nat. Acad. Sci USA, **71**: 4249-4253, 1974.

Otrzymano: 15 października 1975.

Przyjęto: 20 października 1975.

Adres autorki: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

SPECYFICZNOŚĆ BIAŁEK NIEHISTONOWYCH

Zofia KILIAŃSKA i Leokadia KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ

Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Białka niehistonowe (NHP)* stanowią składnik jądra komórkowego, któremu przypisuje się rolę regulatorów funkcji genów. Substancje, które mogą pełnić funkcję regulatorową w ekspresji genowej powinny wykazywać daleko idącą niejednorodność i specyficzną. Większość NHP jest typowa dla wszystkich tkanek (m.in. NHP obdarzone aktywnością enzymatyczną), natomiast niewielką ilość tych białek cechuje specyficznosc tkankowa i gatunkowa, przejawiająca się charakterystyczną wędrówką w polu elektrycznym, fosforylacją, acetylacją. Ponadto, tę niewielką część NHP charakteryzuje zdolność do rozpoznawania w sposób wysoce selektywny pewnych fragmentów homologicznego DNA, a także do wywołania odpowiedzi immunologicznej w postaci produkowania przeciwciał skierowanych specyficznie przeciwko kompleksom NHP - DNA.

W centrum zagadnień współczesnej biologii komórki znajduje się niewątpliwie mechanizm regulacji aktywności genów. Coraz częściej wymienia się białka niehistonowe (NHP) jądra komórkowego [6, 14-17, 38, 39, 44, 45] obok chromosomalnego RNA [6] jako cząsteczki mogące regulować transkrypcję genów w sposób specyficzny.

NHP stanowią zróżnicowany materiał jądrowy, w którym odnaleźć można znaczną ilość enzymów, białka strukturalne i regulatorowe [13], a także stwierdzone ostatnio białka kurczliwe o naturze zbliżonej do aktyny i miozyny [27]. Podstawową właściwością regulatorów funkcji genów jest ich specyficznosc sprawa ta w odniesieniu do NHP jest przedmiotem niniejszego opracowania.

Histony — represory aktywności DNA w chromatynie, dobrze zakonserwowane w procesie ewolucji molekularnej, reprezentują substancje o ograniczonej specyficznosci. Z kolei białkom niehistonowym przypisuje

* NHP — (angl.) non - histone protein.

się dużego stopnia specyficzność tkankową i gatunkową w zakresie obrazu elektroforetycznego [2, 3, 22, 37, 50, 53, 57], oddziaływania z określonymi fragmentami DNA [20, 32, 48, 50], odpowiedzi immunologicznej [42, 54–56] wysoką specyficzność ich syntezy po podaniu hormonów [43, 48]. Szereg tych cech znajduje wytłumaczenie w znacznej niejednorodności NHP, która jednocześnie sprawia, że nasze wiadomości o tej grupie białek jądrowych w dalszym ciągu obfitują w wielką ilość znaków zapytania.

W badaniach niejednorodności NHP szczególnie owocną okazała się metoda elektroforezy w żelu poliakryloamidowym oraz elektroforezy dwuwymiarowej [1–3, 28, 29, 50–58], a także techniki chromatografii kolumnowej [4, 19, 28, 35]. Analiza porównawcza elektroferogramów NHP z różnych źródeł stała się jednocześnie podstawą wnioskowania o ich specyficzności tkankowej i gatunkowej.

Z laboratorium Wanga [22, 57] i Allfrey'a [49, 50] pochodzą jedne z pierwszych danych o specyficzności NHP. Teng i wsp. [50] opisali złożony obraz pasm w żelu poliakryloamidowym fosfoproteidów jądrowych (frakcja NHP o dużej aktywności metabolicznej) wątroby, nerki, śledziony i mózgu szczura. Znaczna niejednorodność NHP była wysoce powtarzalna w różnych preparatach z tego samego źródła i zmieniała się idąc od jednej tkanki do drugiej. Różnice te miały charakter zarówno ilościowy, jak i jakościowy. NHP tych tkanek wykazywały ponadto odmienny stopień fosforylacji *in vitro*.

Wu i wsp. [59] porównali NHP z siedmiu tkanek szczura (wątroba, nerka, śledziona, płuca, grasica, tarczyca, mózg) na drodze elektroforezy w żelu poliakryloamidowym. Preparaty białkowe z różnych narządów zawierały od 12 do 18 frakcji. Szereg pasm, zdaniem autorów, reprezentowało wspólne frakcje typowe dla wszystkich tkanek, ale każda tkanka posiadała niewielką ilość NHP charakterystycznych tylko dla niej. Największe różnice w NHP z badanych źródeł dotyczyły frakcji o masach cząsteczkowych od 40 000 do 100 000 daltonów.

MacGillivray i wsp. [28] analizując w żelu poliakryloamidowym NHP nerki, wątroby i mózgu dwóch gatunków, tj. myszy i wołu, obserwowali w badanych białkach nieznaczne różnice, głównie natury ilościowej, które dotyczyły frakcji niskocząsteczkowych ($< 40\ 000$ daltonów).

Późniejsze prace [29, 36] wykorzystujące technikę elektroforezy dwuwymiarowej, a także elektroforezę w żelu poliakryloamidowym ufosforylowanych NHP wątroby, nerki, mózgu i nowotworu Landschütza myszy pozwoliły wykryć obok pasm NHP wspólnych dla wszystkich tkanek pewną, niewielką ilość frakcji posiadających cechy specyficzności.

Badania elektroforetyczne fosfoproteidów jądrowych izolowanych z mózgu, serca, nerki i wątroby szczura po uprzednim włączeniu *in vivo* (^3H) - octanu również potwierdziły różny rozkład radioaktywnego octanu

dla analizowanych białek. Blizsza analiza ^3H - acetylowanych białek wykazała w nich obecność dwóch acetylowanych aminokwasów, tj. acetyloseryny i acetylolizyny [46].

Znaczną niejednorodność NHP wątroby, mózgu, grasicy i nerki szczura ekstrahowanych 8 M roztworem mocznika w 0,05 M buforze fosforanowym (pH 7,6) udowodniło także oznaczanie grup $-\text{SH}$ poprzez blokowanie (^{14}C) - N - etylomaleimidem [11].

W przypadku NHP wątroby, mózgu, grasicy i nerki szczura zawartość grup $-\text{SH}$ wynosiła odpowiednio 75, 71, 60, 61 nmoli na mg białka. Na podstawie rozdziału techniką ogniskowania izoelektrycznego NHP z powyższych tkanek wykazano w nich pewne różnice w rozkładzie grup $-\text{SH}$, głównie o charakterze ilościowym.

Dość sugestywne wyniki przemawiające za istnieniem specyficzności tkankowej i gatunkowej NHP uzyskano wykorzystując technikę elektroforezy dwuwymiarowej do analizy tych białek z wątroby szczura oraz wątroby i retikulocytów kurczęcia. Okazało się, że między białkami niehistonowymi tkanki wątrobowej z dwóch odległych gatunków istnieje więcej podobieństw aniżeli między NHP wątroby i retikulocytów tego samego organizmu. W ogóle preparaty NHP analizowane tą metodą cechowała znaczna specyficzność, bowiem dla wszystkich trzech tkanek stwierdzono tylko jedną wspólną frakcję o masie cząsteczkowej 56 000 daltonów [2].

Przedstawiona przez Bekhora i wsp. [3] metoda izolowania białek chromatynowych na drodze stopniowej dysocjacji chromatyny w 5 M roztworze mocznika (pH 8,0) z wzrastającymi stężeniami NaCl (0–3 M) dostarczyła w żelu poliakryloamidowym aż 94 frakcje NHP wątroby królika. Elektroferogramy NHP z mózgu, wątroby, serca i ślinianek podszczękowych królika różniły się tak dalece, że wysunięto bardzo śmiało, jak się wydaje wnioski: 1. narządy można rozróżniać na podstawie analizy elektroforetycznej ich NHP, 2. aberracje genetyczne można badać na poziomie NHP.

Z nielicznych prac nad NHP z erytrocytów ptasich na uwagę zasługują zmiany obserwowane w procesie regeneracji tych komórek. Porównując fenolorozpuszczalne NHP (w fenolu o pH 8,4 i 9,4) z wątroby dojrzałych i regenerujących erytrocytów gęsi Shelton i Neelin [41] stwierdzili, że NHP krwinek czerwonych są uboższe w szereg frakcji i wykazują nawet różnice natury jakościowej. W elektroferogramach NHP wątroby gęsi obserwowano około 23 pasma w ekstrakcie o pH 8,4 i 22 pasma — w pH 9,4, podczas gdy w analogicznych białkach otrzymanych z erytrocytów dojrzałych — odpowiednio 17 i 13 pasm w pH 8,4 i 9,4 i niewiele więcej w NHP erytrocytów regenerujących. Różnice w białkach niehistonowych erytrocytów dojrzałych i regenerujących dotyczą kilku drobnych frakcji i pewnych, być może, niskocząsteczkowych zanieczyszczeń globiną. NHP krwi-

nek czerwonych dojrzałych i regenerujących zawierają większą ilość frakcji wysokocząsteczkowych w porównaniu z białkami wątroby gęsi. Różnice w obrębie NHP z trzech populacji komórkowych gęsi (hepatocyty, erytrocyty, retikulocyty) mogą być związane z ich różną aktywnością w syntezie białek i kwasów nukleinowych.

Również porównanie metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym NHP izolowanych z form dojrzałych i niedojrzałych erytrocytów kaczki pozwoliło zaobserwować szereg znacznych różnic ilościowych i jakościowych, które dotyczyły głównie polipeptydów o znacznej masie cząsteczkowej [37]. Wyniki przytoczonych prac sugerują, że zmiany w obrębie NHP komórek erytroidalnych podczas dojrzewania mogą być związane z procesem różnicowania komórkowego.

W 1973 r. Vidali i wsp. [53] opisali interesujące zmiany w fenolorozpuszczalnych NHP komórek erytroidalnych kaczki w procesie embriogenezy, obserwując jednocześnie ilość histonu F2c oraz podstawowy produkt tych komórek, tj. hemoglobinę.

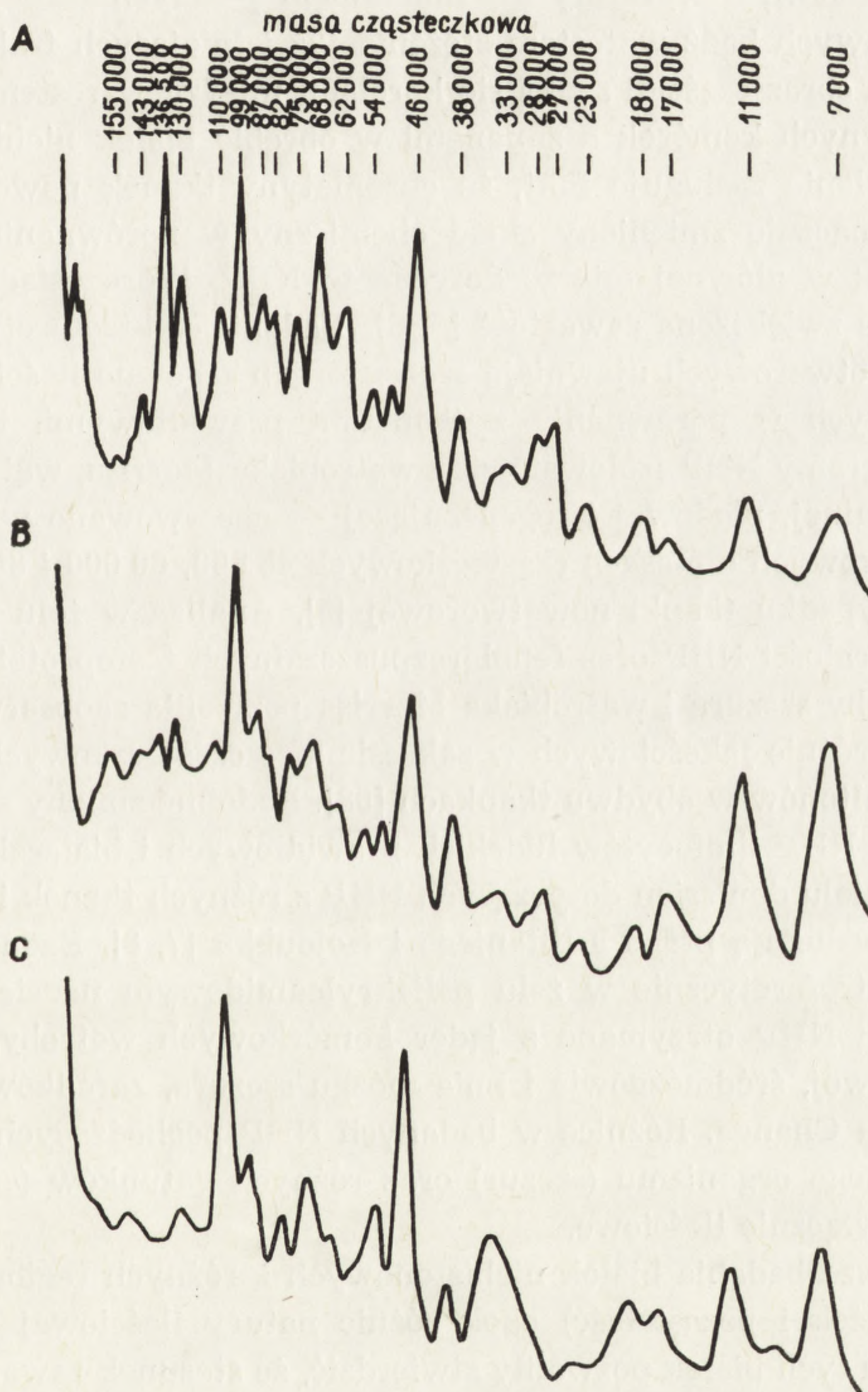
Porównanie elektroferogramów NHP krwinek czerwonych z kolejnych stadiów rozwoju zarodkowego kaczki wykazuje zmniejszanie się ilości frakcji NHP. Populacje komórek erytroidalnych 7-dniowych zarodków kaczych zawierają znaczną ilość frakcji wysokocząsteczkowych o masie 130 000 i 136 000 daltonów, których zawartość znacznie spada w erytrocytach 14-dniowych zarodków i prawie zanika u dojrzałych osobników (rys. 1).

Zmniejszeniu ulegają także w czasie embriogenezy frakcje o masach cząsteczkowych 62 000, 82 000 i 110 000 daltonów. Część frakcji NHP jest syntetyzowana w procesie rozwoju embrionalnego de novo, czego dowodem byłby wzrost frakcji białkowych o masach cząsteczkowych 38 000 i 99 000 daltonów w 14-dniowych zarodkach. W dojrzałych formach krwinek czerwonych obserwuje się postępujący spadek zawartości NHP o masach cząsteczkowych 136 000, 130 000, 110 000, 82 000 i 68 000 daltonów.

Głównymi frakcjami NHP charakterystycznymi dla badanych stadiów rozwojowych erytrocyta były frakcje o masach cząsteczkowych 46 000 i 99 000 daltonów. Opisanym zmianom w obrębie frakcji NHP erytrocytów w czasie embriogenezy, towarzyszył zanik pierwotnych form krwinek czerwonych, zawierających hemoglobiny płodowe oraz pojawienie się form ostatecznych związanych z hemoglobiną dojrzałą.

Inną ciekawą zależność między poszczególnymi formami komórek erytroidalnych obserwowano w narastaniu specyficznej dla erytrocytów ptasich frakcji histonowej F2c, która w krwinkach 7-dniowych zarodków stanowiła 6%, natomiast w dojrzałych erytrocytach aż 27% całkowitego histonu.

Vidali i wsp. [53] sugerują, że obserwowane zmiany w NHP mogą być związane z kontrolą syntezy różnych mRNA. Stwierdzono, że komórki o bardzo zbliżonej morfologii i funkcji, pochodzące z różnych etapów embriogenezy, różnią się pod względem ich podstawowego produktu — he-



Rys. 1. Wykresy densytometryczne rozdziału w żelu poliakryloamidowym NHP krwinek czerwonych kaczki z zarodków 7-dniowych (A), 14-dniowych (B) oraz form dojrzałych (C) [53]

moglobiny, co nasuwa przypuszczenie, że białka te odgrywają rolę w selektywnej transkrypcji genomu.

Na uwagę zasługują zmiany w białkach niehistonowych izolowanych z jąder komórkowych i jąderek śluzowca *Physarum polycephalum* w czasie intensywnego wzrostu oraz różnicowania wywołanego głodem [26]. Największe różnice dotyczyły NHP o masie cząsteczkowej od 32 000 do 160 000 daltonów, a wyrażały się zanikaniem pewnych frakcji, pojawianiem się nowych bądź wzrostem stężenia już istniejących frakcji.

Ostatnio coraz częściej szuka się korelacji między wzrostem nowotworowym pewnych komórek a zmianami w obrębie białek niehistonowych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że chromatyny tkanek nowotworowych posiadają znacznie zmieniony skład chemiczny w porównaniu z tkanką macierzystą; w głównej mierze dotyczy to NHP, które osiągają w nich 2–3 - krotnie zwiększoną zawartość [5, 6]. Badania elektroforetyczne NHP tkanek nowotworowych ujawniają szereg zmian zarówno ilościowych, jak i jakościowych w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Porównując elektroferogramy NHP izolowanych z wątrobiaka Morrisa, wątroby szczura — normalnej, płodowej i regenerującej — obserwowano większą ilość frakcji białkowych o masach cząsteczkowych 48 000, 60 000 i 85 000 daltonów w przypadku tkanki nowotworowej [5]. Analiza w żelu poliakryloamidowym całości NHP oraz fenolorozpuszczalnych fosfoproteidów jądrowych wątroby szczura i wątrobiaka Morrisa pozwoliła zaobserwować występowanie różnic jakościowych w zakresie mas cząsteczkowych od 40 000 do 70 000 daltonów w obydwu tkankach [58]. Podobne zmiany stwierdzono porównując NHP limfocytów ludzkich prawidłowych i białaczkowych [6].

Wśród wielu doniesień dotyczących NHP z różnych tkanek i gatunków, na uwagę zasługują prace Fujitaniego i Holoubka [7, 8]. Badacze ci, rozdzielili elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym na siedem głównych frakcji NHP otrzymane z jąder komórkowych wątroby, mózdzku, kory mózgowej, śródmózgowia i pnia mózgu szczura, zarodków kurczęcia i wątrobiaka Changa. Różnice w badanych NHP pochodzących z różnych tkanek jednego organizmu (szczur) oraz różnych gatunków (szczur, kurczę) były wyłącznie ilościowe.

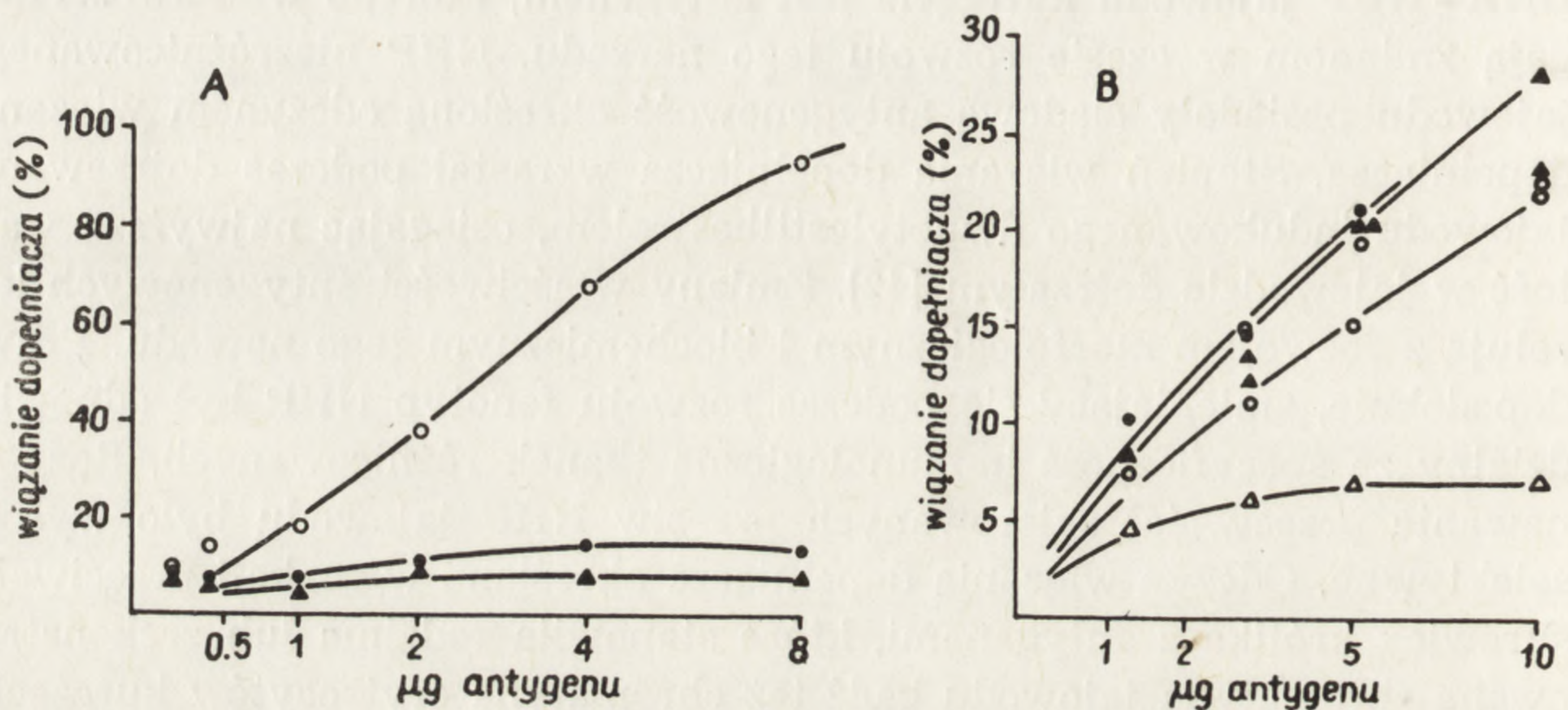
Wnikliwsze badania białek niehistonowych z różnych regionów mózgu (kora, mózdzek i pozostałość) obok różnic natury ilościowej w elektroferogramach tych białek pozwoliły stwierdzić, że stosunek zawartości NHP do DNA w trzech różnych obszarach mózgowia był odmienny i wynosił 0,52 w korze, 0,38 w pozostałości oraz 0,18 w mózdzku [8]. Ten różny stosunek ilości NHP do DNA w poszczególnych częściach mózgu wydaje się być odbiciem różnej aktywności genomu w obrębie tkanki mózgowej.

SPECYFICZNOŚĆ IMMUNOLOGICZNA BIAŁEK NIEHISTONOWYCH
I SELEKTYWNOŚCI ICH INTERAKCJI Z DNA

W ciągu ostatnich lat udowodniono specyficzność NHP metodami immunologicznymi. W laboratorium Spelsberga [42] wykazano, że kompleks DNA - NHP jajowodu kurczęcia jest antygenem, którego właściwości ulegają zmianom w czasie rozwoju tego narządu. NHP niezróżnicowanego jajowodu posiadały śladową antygenowość określoną odczynem wiązania dopełniacza. Stopień wiązania dopełniacza wzrastał podczas dojrzewania jajowodu indukowanego dwuetylostilbestrolem, osiągając najwyższą wartość w jajowodzie dojrzałym [42]. Zmiany właściwości antygenowych korelują z rozwojem morfologicznym i biochemicznym tego narządu. Prawdopodobnie, zmieniający się podczas rozwoju fenotyp NHP był odpowiedzialny za specyficzność immunologiczną tkanek różnicowanych. Rozpoznawanie przeciwciał skierowanych przeciw NHP jajowodu było wysoce selektywne. Odczyn wiązania dopełniacza określano w reakcji przeciwciał surowicy królika z antygenami, które stanowiła rodzima lub zrekonstruowana chromatyna jajowodu bądź też chromatyna erytrocytów kurczęcia. Wysoce specyficzna zdolność przeciwciał w rozpoznawaniu tylko NHP jajowodu została potwierdzona brakiem wyraźnej reakcji z antygenem w postaci kompleksu DNA - NHP erytrocytów. Na uwagę zasługiwał fakt wiązania dopełniacza przy zastosowaniu takiego antygeny, jak DNA erytrocytów - NHP jajowodu, podczas gdy kompleks DNA jajowodu - NHP erytrocytów wykazywał znikomą antygenowość. Wyniki te sugerują, że przeciwciała wytworzone przez kompleks DNA - NHP jajowodu są skierowane głównie przeciw NHP, a nie przeciw DNA.

Wnikliwsze badania nad tym zagadnieniem podjęto w laboratorium Hnilicy [54]. Stwierdzono, że kompleksy DNA - NHP wątrobiaka Novikoffa otrzymane na drodze usunięcia histonów z chromatyny po jej dysocjacji w układzie 2 M NaCl - 5 M mocznik (pH 6,0) powodowały tworzenie przeciwciał skierowanych tylko przeciw tym kompleksom. Przeciwciała te wykazywały powinowactwo tylko do kompleksu DNA - NHP wątrobiaka i były nieaktywne w odczynie wiązania dopełniacza z analogicznymi kompleksami chromatyny z wątroby szczura czy grasicy cielęcia (rys. 2A). Okazało się, że w reakcji wiązania dopełniacza przeprowadzonej w obecności przeciwciał skierowanych przeciw kompleksom DNA - NHP wątrobiaka Novikoffa oraz antygenów w postaci chromatyn innych nowotworów, np. guza Walkera czy wątrobiaka AS - 30D znikła tkankowa specyficzność antygenowa, czego wyrazem był nieomal jednakowy poziom wiązania dopełniacza przy zastosowaniu trzech różnych antygenów (rys. 2B).

Wydaje się, że proces tworzenia nowotworów zmienia charakter kompleksu DNA - NHP. Być może, zmiany nowotworowe niszczą specyficzność oryginalnej tkanki, tj. wątroby i podstawiają ją nowym typem wspólnym dla trzech badanych guzów.



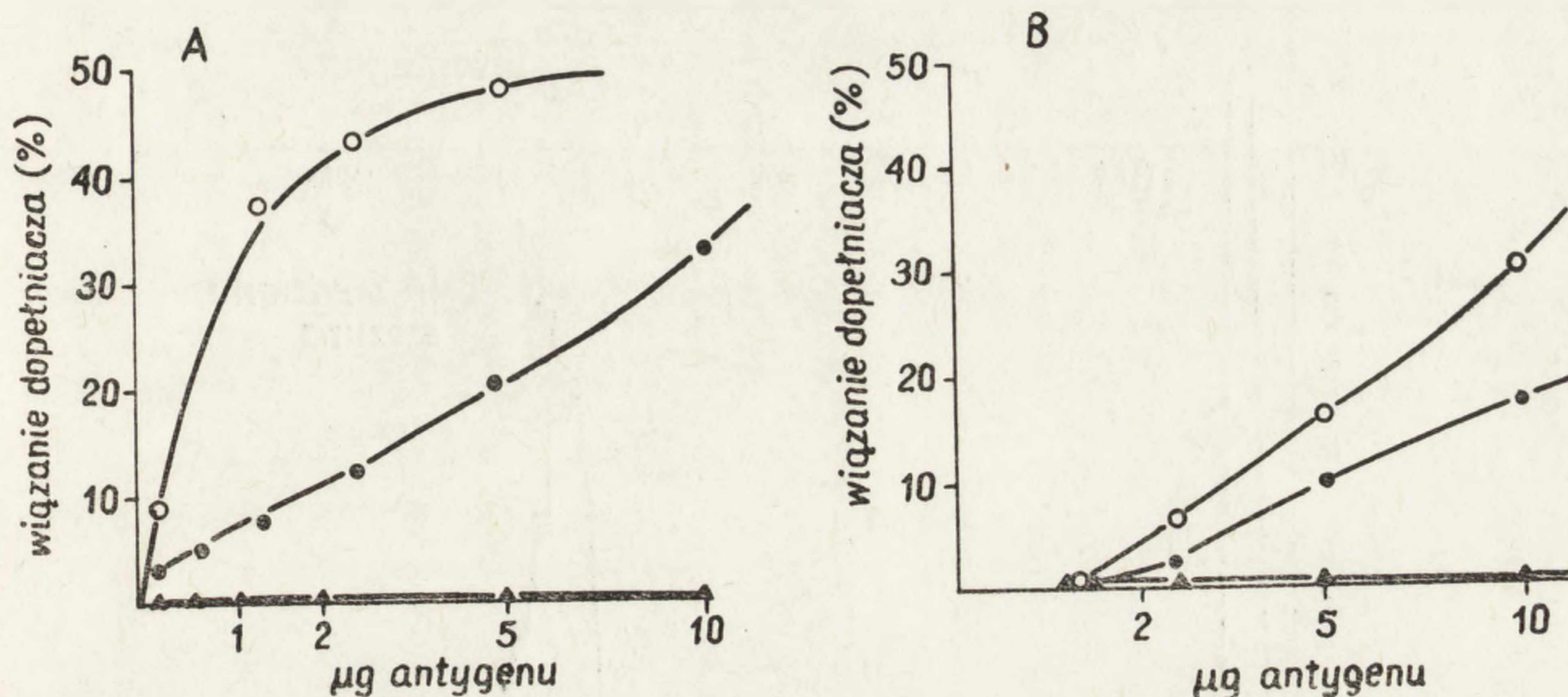
Rys. 2. A — Wiązanie dopełniacza przez kompleksy NHP - DNA z wątrobiaka Novikoffa (o—o), wątroby szczura (▲—▲) i grasicy cielęcej (●—●) w reakcji z przeciwciałami wyprodukowanymi w surowicy królika przeciw kompleksom NHP - DNA z wątrobiaka Novikoffa

B — Wiązanie dopełniacza przez kompleksy NHP - DNA z wątrobiaka Novikoffa (o—o), wątrobiaka AS—30D (●—●), guza Walkera (▲—▲) i wątroby szczura (Δ—Δ) w reakcji z przeciwciałami wyprodukowanymi w surowicy królika przeciw kompleksom NHP - DNA z wątrobiaka Novikoffa [54]

Dysocjacja chromatyny (w układzie 2M NaCl - 5M mocznik (pH 8,0)) i ponowne odtworzenie hybrydu chromatynowego prowadziło do stopniowego obniżenia immunochemicznej kompetencji, natomiast trawienie DN - azą chromatyny pełnej lub pozbawionej histonów — do jej zupełnego zaniku (rys. 3A). Wykazana zależność wiązania dopełniacza w obecności DNA ujawniła nowy problem, tj. czy istotny jest tylko ujemny ładunek składnika w kompleksie z NHP, czy nieodzowną jest obecność właśnie DNA. W tym celu badano immunologiczną kompetencję odtworzonych kompleksów NHP wątroby szczura z DNA wątroby i śledziony szczura, DNA jeżowca morskiego oraz takich polianionów, jak drożdżowy RNA, siarczan dekstranu, poliglutaminian, sulfenian polietyleny. Obniżony stopień wiązania dopełniacza obserwowano przy użyciu jako antygeny chromatyny odtworzonej z białek chromatynowych wątroby szczura i DNA tego samego organizmu, tj. śledziony, a zupełny brak przy zastosowaniu pozostałych polianionów (rys. 3B). Wyniki przed-

stawionych eksperymentów wskazują na zależność reakcji wiązania dopełniacza od połączenia NHP z DNA i to z DNA homologicznym.

Ostatnio [55, 56] podano bliższą charakterystykę NHP wiążących się z DNA i rozpoznawanych w reakcjach immunochemicznych. Białka nie-



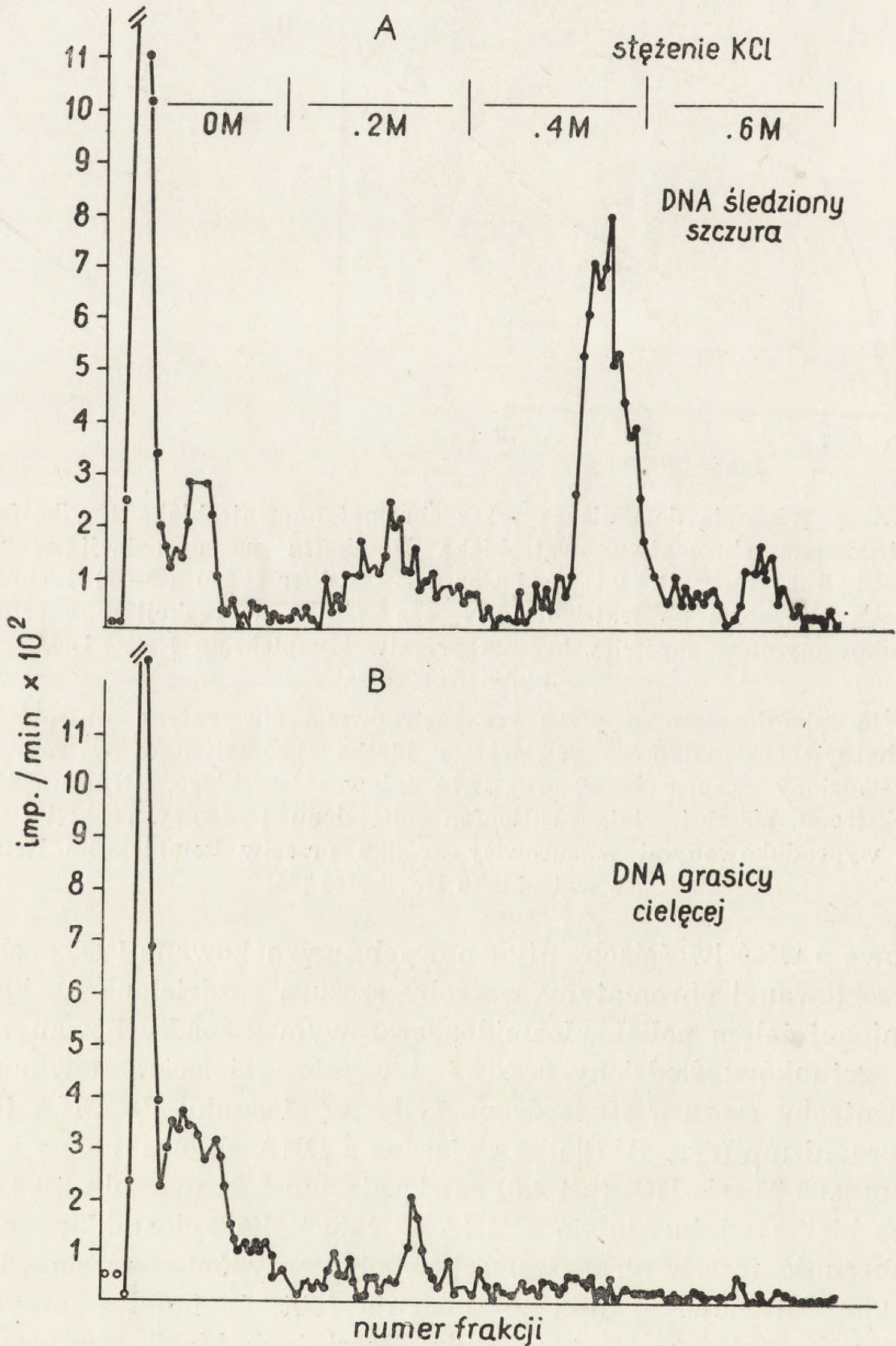
Rys. 3. A — Wiązanie dopełniacza przez chromatynę wątrobiaka Novikoffa (o—o), zrekonstruowaną chromatynę wątrobiaka Novikoffa po dysocjacji w układzie 2 M NaCl - 5 M mocznik - 0,1 M - bufor tris - HCl (pH 8,0) (●—●) i chromatynę wątrobiaka Novikoffa po trawieniu DN - azą (▲—▲) w reakcji z przeciwciałami wyprodukowanymi w surowicy królika przeciw kompleksom NHP - DNA z wątrobiaka Novikoffa

B — Wiązanie dopełniacza przez zrekonstruowaną chromatynę wątroby szczura (o—o), hybryd chromatynowy zawierający białka chromatynowe wątroby szczura i DNA śledziona szczura (●—●) oraz DNA jeżowca morskiego, RNA drożdży, siarczan dekstranu, poliglutaminian, sulfonian polietylenu (▲—▲) w reakcji z przeciwciałami wyprodukowanymi w surowicy królika przeciw kompleksom NHP - DNA z wątrobiaka Novikoffa [54]

histonowe o właściwościach antygenowych, wyznakowane ^{125}J , pochodzące ze zdysocjowanej chromatyny wątroby szczura rozdzielano na kolumnie wypełnionej żelami poliakryloamidoagarozy z zaadsorbowanym DNA dwóch gatunków: śledziona szczura i grasicy cielęcia. Powinowactwo NHP wątroby szczura stwierdzono tylko w stosunku do DNA tego samego organizmu (rys. 4). Białko związane z DNA eluowało się z kolumny buforem 0,05 M tris-HCl (pH 8,0) zawierającym 5 M mocznik i 0,4 M KCl. Analiza białka wiążącego się z DNA w żelu poliakryloamidowym wykazała obecność trzech niskocząsteczkowych peptydów o masie od 12 000 do 15 000 daltonów. Wyniki te ilustrują fakt, że immunospecyficzność NHP jest ograniczona do niewielkiej ilości tych białek, rozpoznających tylko homologiczny DNA.

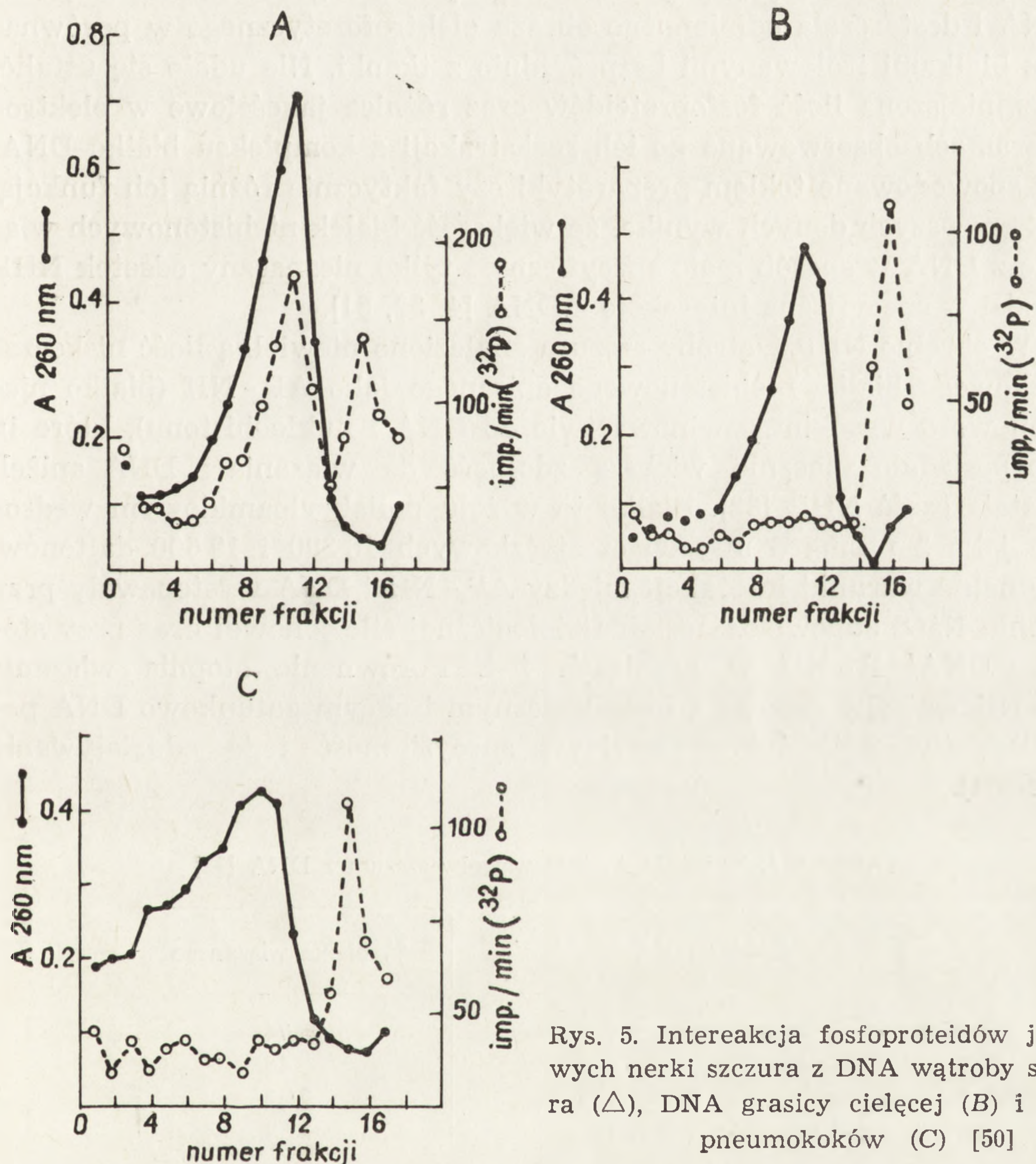
Stwierdzenie, które frakcje z całości białek niehistonowych wykazują specyficzność wiązania z DNA, jest zagadnieniem bardzo trudnym. Pier-

wotnie zastosowaną metodą w badaniach interakcji DNA - NHP był rozdział chromatograficzny ^{131}J - fosfoproteidów jądrowych na kolumnie celulozowej z zaadsorbowanym DNA różnego pochodzenia [20]. Wśród NHP



Rys. 4. Wykres rozdziału chromatograficznego NHP wątroby szczura na kolumnie wypełnionej żelem poliakryloamidoagarozowym z zaadsorbowanym DNA śledziony szczura (A) i DNA grasicy cielecej (B) [56]

wątroby szczura znaleziono niewielką ilość ($< 0,1\%$ NHP) eluowanych 0,6 M NaCl, specyficznie reagujących z homologicznym DNA. Frakcja tego białka nie wchodziła w interakcję z heterologicznym DNA pochodzącym z *E. coli* czy spermy łososia.



Rys. 5. Intereakcja fosfoproteidów jądrowych nerki szczura z DNA wątroby szczura (Δ), DNA grasicy cielęcej (B) i DNA pneumokoków (C) [50]

Teng i wsp. [49, 50] obserwowali tworzenie kompleksów fosfoproteidów z DNA w toku gradientowej dializy. Powstawanie kompleksów fosfoproteidy-DNA przebiegało najlepiej przy niskiej sile jonowej (0,01 M NaCl), gdy białko i DNA pochodziły z tej samej tkanki z różnych tkanek tego samego organizmu. Interakcja fosfoproteidy-DNA ulegała osłabieniu przy próbach kompleksowania obydwu składników w przypadku blisko spokrewnionych gatunków (szczur, mysz), a nie występowała

w ogóle w reakcji fosfoproteidów nerki szczura z DNA grasicy cielęcej i DNA pneumokoków (rys. 5) czy też DNA łożyska ludzkiego lub wątroby psa.

Przy dalszych doświadczeniach okazało się, że tylko część fosfoproteidów (8% z 13% użytych początkowo) była zaangażowana w wiązanie z DNA i dostarczała odmiennego obrazu elektroforetycznego w porównaniu z białkami izolowanymi bezpośrednio z tkanki. Nie udało się ustalić, czy zmniejszona ilość fosfoproteidów oraz różnice jakościowe w elektroferogramach obserwowane po ich reekstrakcji z kompleksu białko-DNA, były spowodowane tokiem preparatyki czy faktycznie różnią ich funkcją.

Z nowszych danych wynika, że większość białek niehistonowych wiąże się z DNA w sposób mało specyficzny i tylko nieznaczny odsetek NHP wchodzi w specyficzną interakcję z DNA [4, 32, 51].

W obrębie NHP wątroby szczura znaleziono niewielką ilość niskocząsteczkowego białka niehistonowego opisanego jako AP-NH (białko niehistonowe o wysokim powinowactwie do DNA i nukleohistonu), które *in vitro* posiadało znacznie większą zdolność do wiązania z DNA aniżeli pozostała część NHP [32]. Białko to w żelu poliakryloamidowym wędrowało jako 2 pasma o masach cząsteczkowych 16 300 i 19 600 daltonów. Optymalne warunki interakcji między AP-NH i DNA występowały przy stężeniu NaCl odpowiadającym fizjologicznej sile jonowej oraz przy stosunku DNA/AP-NH w granicach 1-4. Porównanie stopnia wiązania AP-NH wątroby szczura z homologicznym i obcym gatunkowo DNA pozwoliło stwierdzić tylko częściową specyficzność tego oddziaływania (tabela 1).

TABELA 1. Wiązanie AP-NH wątroby szczura z DNA [32]

Źródło DNA	% białka wiązanego
Wątroba szczura	74
Grasica cielęcia	46
Sperma łososa	21,2
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	32,8

Ostatnio do badania interakcji NHP-DNA wprowadzono technikę sączenia na filtrach nitrocelulozowych [40, 51]. Stosując ją równolegle z metodą chromatografii powinowactwa (kolumny wypełnione żelem poliakryloamidoagarozy z zaadsorbowanym DNA) Umanskij i wsp. [51] stwierdzili, że wszystkie NHP wątroby i grasicy szczura reagują z DNA w 0,02 M buforze tris-HCl (pH 7,5)-3 mM MgCl₂ i że większość NHP jest wiązana z DNA w sposób niespecyficzny. Badacze ci znaleźli również

niewielką ilość NHP, która wykazywała specyficzną wiązania z DNA i to zarówno z DNA natywnym, jak i zdenaturowanym. Intensywność oddziaływania tych dwóch składników była większa w przypadku DNA zdenaturowanego i nie wymagała obecności mocznika. Natomiast specyficzność reakcji homologicznego, natywnego DNA z NHP udało się wykryć dopiero po dodaniu mocznika (5 M), co sugeruje, że DNA musi ulec częściowej destabilizacji przed „rozpoznaniem” białek niehistonowych specyficznie z nim oddziaływających. Można zatem przypuszczać, że tworzenie kompleksów NHP - DNA w toku gradientowej dializy w obecności mocznika zgodnie z metodą Tenga i wsp. [50] dostarcza DNA już o pewnym stopniu destabilizacji, czyniąc go podatniejszym w interakcji NHP. W badaniach *in vitro* rozległość tworzenia kompleksów DNA - NHP zależy od „wieku” tych białek oraz od stopnia polimeryzacji DNA. Okazało się bowiem, że wiązanie NHP wątroby szczura z heterologicznym (o znacznej masie cząsteczkowej) DNA faga T4 było silniejsze niż z homologicznym, wątrobowym DNA.

Tkankowo - specyficzne oddziaływanie między NHP i DNA wydaje się być ograniczone do pewnej tylko niewielkiej części NHP, które mogą posiadać funkcję regulatorową w ekspresji genowej.

Fakt, że specyficzność jest związana z niewielkim odsetkiem NHP nie jest niespodzianką, biorąc pod uwagę, że w tej grupie białek jądrowych odnaleziono aktywność wielu enzymów typowych dla wszystkich tkanek, między innymi: fosfokinazą białkową [14, 15, 25, 47], deacetylazę histonową [52], acetylo - i metylotransferazę histonową [9, 17], DNA polimerazę [12], alkaliczną DN - azę [31], ligazę polinukleotydomową [10].

Zdolność do rozpoznawania DNA jest prawdopodobnie zakodowana w sekwencji aminokwasów oraz w konformacji łańcuchów polipeptydowych NHP.

WPLYW BIAŁEK NIEHISTONOWYCH NA AKTYWNOŚĆ GENÓW

Zagadnienie udziału NHP w represji i aktywacji genów zostało częściowo opracowane przez nas uprzednio [18, 21], a obecnie przedstawimy krótko dane nowszego piśmiennictwa, uwzględniającego specyficzność oddziaływania NHP na aktywność matrycową chromatyny. Od kilku lat wiadomo, że NHP posiadają zdolność tkankowo - specyficznej represji [39] oraz stymulacji [16, 17, 22, 44] syntezy RNA zależnej od DNA *in vitro*. Jednakże mechanizm, dzięki któremu NHP oddziałują na chromatynę modyfikując jej odpowiedź na poziomie transkrypcji, jest zupełnie niewyjaśniony. Zapewne modyfikacje chemiczne, którym ulegają same białka niehistonowe, (fosforylacja, acetylacja, metylacja) powodują między

innymi zmiany ich powinowactwa do określonych odcinków DNA. Prawdopodobnie nawet drobne różnice w ufosforylowaniu NHP mogą regulować aktywność dużej ilości genów. Zmiany fosforylacji NHP podczas cyklu komórkowego [33], a także różnicowania komórkowego [34] bardziej niż różnice w stężeniu tych białek mogą odgrywać rolę w regulowaniu procesu transkrypcji. Okazało się, że stymulacja syntezy RNA przez ufosforylowane NHP nosi cechy specyficzności gatunkowej [38], np. aktywacja transkrypcji przez ufosforylowane NHP wątroby szczura występowała jedynie wtedy, gdy jako matrycę stosowano homologiczny DNA. Ufosforylowane NHP tej tkanki nie okazywały wzmożenia syntezy RNA, jeśli matrycą był DNA grasicy cielęcia, spermy łososa, *E. coli* czy *C. perfringens*, a także w przypadku potraktowania ufosforylowanych NHP alkaliczną fosfatazą.

Udało się również odnaleźć korelację między fosforylacją NHP a biosyntezą kwasów nukleinowych w cyklu komórkowym komórek nerki chomika BHK₂₁C₁₃ [30].

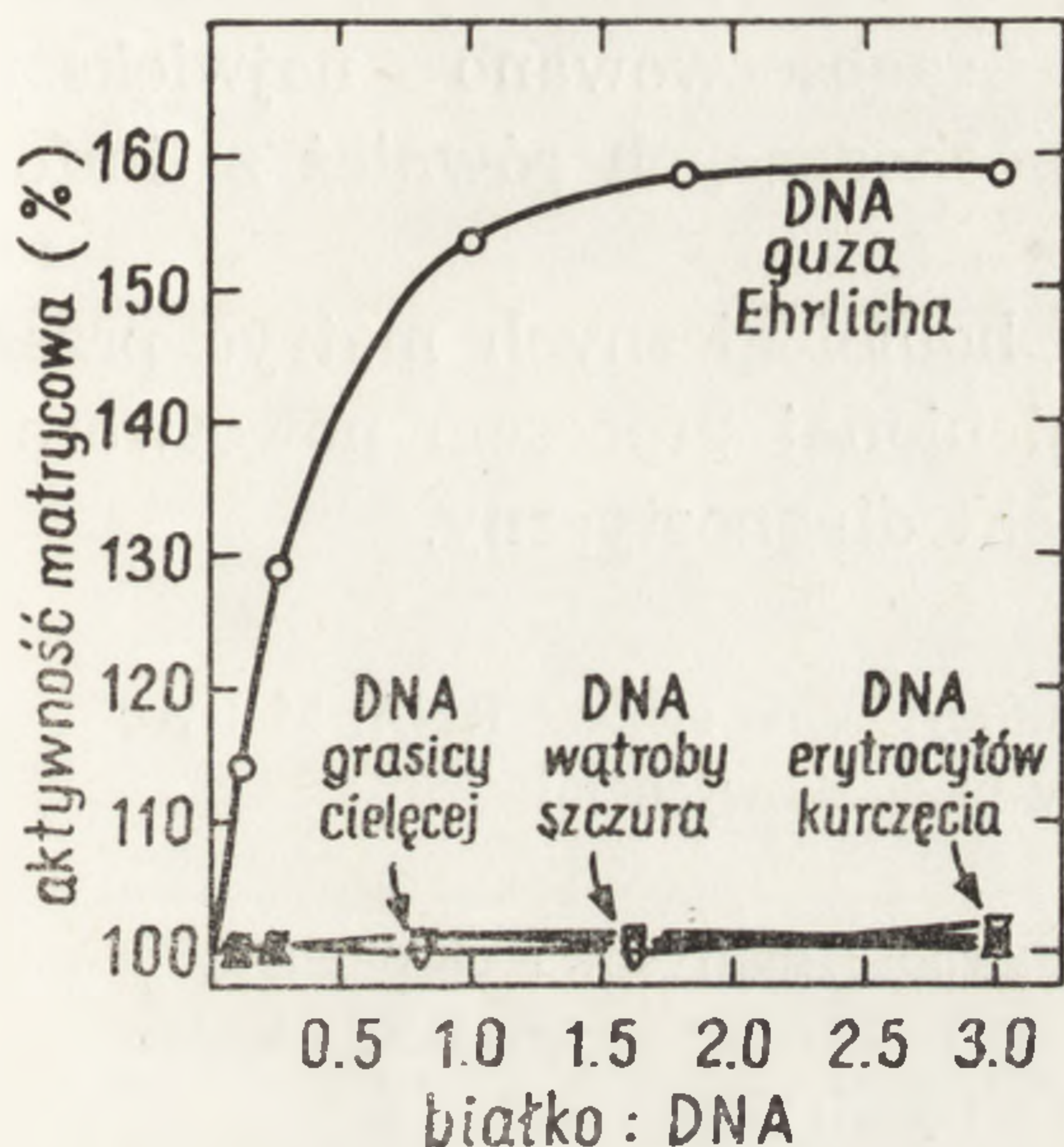
Większość prac pochodzących z laboratorium Wanga [16, 22, 24] dowodzi tkankowo-specyficznej stymulacji procesu transkrypcji przez białka niehistonowe. Nowo utworzony RNA podczas transkrypcji aktywowanej przez NHP reprezentuje RNA zawierający więcej informacji niż RNA kontrolny, a ponadto jakościowo różny w przypadku stymulacji homologicznymi bądź heterologicznymi NHP.

Ostatnio doniesiono o aktywującym wpływie na syntezę RNA, specyficznej frakcji fosfoproteidowej otrzymanej z chromatyny guza Ehrlicha przez ekstrakcję fenolową NHP rozpuszczalnych w 0,35 M NaCl [24]. Ta szczególna frakcja NHP, stanowiąca 5,9% całości NHP rozpuszczalnych w 0,35 M NaCl, zawiera 0,9% fosforu zasadolabilnego i wiąże się w sposób specyficzny z homologicznym DNA. Podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym wykazano w niej obecność kilku peptydów o masie cząsteczkowej poniżej 36 000 daltonów. Dodanie tego białka do układu polimerazy RNA *in vitro* przy zastosowaniu homologicznej matrycy w postaci nowotworowego DNA stymuluje wzrost syntezy RNA do 60% w porównaniu z kontrolą (rys. 6).

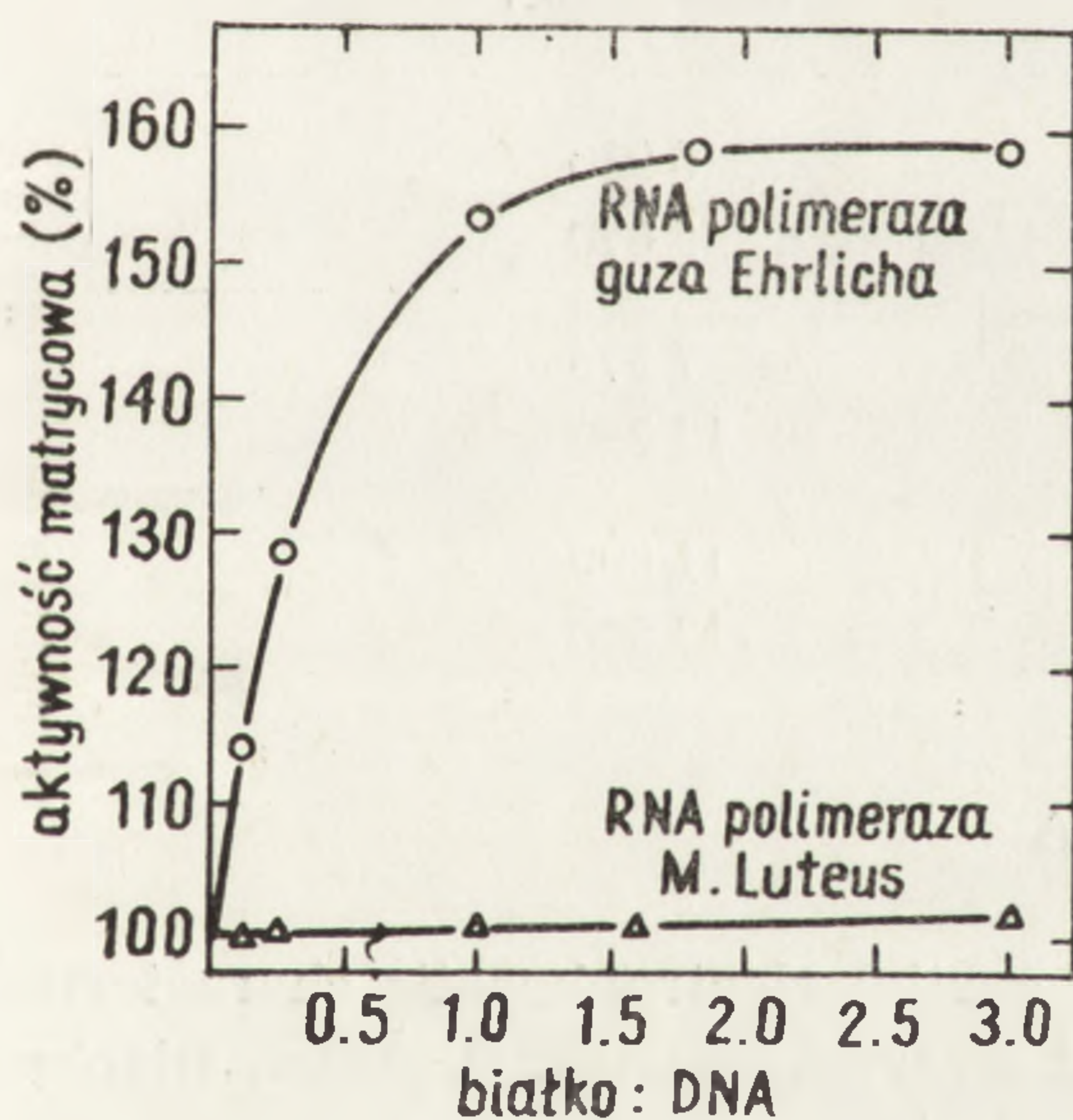
Z kolei, użycie heterologicznych matryc, którymi były DNA grasicy cielęcia, wątroby szczura czy erytrocytów kurczęcia nie dawało podobnego efektu. Okazało się, że w badaniach wpływu NHP na transkrypcję nieodzownym jest stosowanie obok homologicznego DNA również homologicznej polimerazy RNA (rys. 7).

Być może frakcja NHP, specyficznie wiążąca DNA w czasie transkrypcji, w pierwszej kolejności wiąże się z polimerazą RNA i w postaci takiego kompleksu rozpoznaje miejsca akceptorowe na DNA. Tu należy wspomnieć o sugestii wysuniętej już w 1971 r. [50], że funkcje aktywnej

frakcji fosfoproteidowej jądra komórkowego wątroby szczura są podobne do czynnika polimerazy RNA *E. coli*. W takim przypadku wiązanie enzymu z frakcją NHP specyficznie wiążącą DNA, stanowiłoby kluczowy moment w inicjacji syntezy RNA. Również w białkach niehistonowych guza Ehrlicha znaleziono frakcję, która hamowała w 80% syntezę RNA zależną od DNA *in vitro* [23]. Białko to wyizolowano z kompleksu DNA - białka



6. Wpływ frakcji NHP guza Ehrlicha specyficznie wiążącej się z homologicznym DNA na syntezę RNA *in vitro* w układzie polimerazy RNA przy zastosowaniu jako matrycy DNA z: guza Ehrlicha (o—o), wątroby szczura (□—□), grasicy cielęcej (Δ—Δ) i erytrocytów kurczęcia (▽—▽) [24]



7. Wpływ frakcji NHP guza Ehrlicha specyficznie wiążącej się z homologicznym DNA na syntezę RNA *in vitro* w układzie polimerazy RNA przy zastosowaniu jako matrycy homologicznego DNA oraz homologicznego (o—o) bądź heterologicznego (Δ—Δ) enzymu syntetyzującego [24]

jądrowe, stosując ekstrakcję fenolem. Podobnie jak opisana uprzednio frakcja, wykazuje ono selektywność wiązania z homologicznym DNA, potwierdzoną na drodze chromatografii powinowactwa. Ta interesująca frakcja NHP jest białkiem kwaśnym (stosunek aminokwasów kwaśnych do zasadowych = 1,4), wędrującym podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w postaci pojedynczej smugi o masie cząsteczkowej około 12 000 daltonów.

Wysoce specyficzny wpływ aktywujący NHP na syntezę RNA obserwowano w ludzkich limfocytach zmienionych procesem nowotworo-

wym [6]. Przy wnikliwych badaniach fizykochemicznych chromatyn limfocytów prawidłowych i patologicznych stwierdzono, że chromatyny komórek patologicznych wykazują temperaturę topnienia o kilka stopni wyższą oraz zawierają więcej NHP aniżeli limfocyty prawidłowe.

Dodając białka niehistonowe izolowane z limfocytów prawidłowych oraz limfocytów patologicznych (mononukleoza zakaźna i ostra białaczka limfatyczna) do układu polimerazy RNA, w którym matrycę stanowiła chromatyna limfocytów białaczkowych, zaobserwowano największy wzrost transkrypcji pod wpływem NHP pochodzących również z limfocytów białaczkowych (tabela 2).

To specyficzne rozpoznawanie ściśle homologicznych matryc przez białka niehistonowe tej samej tkanki, zmienionej procesem nowotworowym, może mieć w przyszłości ważny aspekt diagnostyczny.

TABELA 2. Wpływ NHP izolowanych z ludzkich limfocytów na syntezę RNA. Matrycę stanowiła chromatyna limfocytów białaczkowych [6]

Źródło NHP	Aktywność matrycowa chromatyny limfocytów leukemicznych. Ilość włączonego (^3H -UTP (imp./min.)
Limfocyty krwi obwodowej	6 930
	5 670
Limfocyty w mononukleozie zakaźnej	7 375
	10 250
Limfocyty w ostrej białaczce limfatycznej	11 800
	12 500

LITERATURA

- [1] ARNOLD E. A., YOUNG K. E., Isolation and partial electrophoretic characterization of total protein from non-sheared rat liver chromatin, *Biochim. Biophys. Acta*, **257**: 482-496, 1972.
- [2] BARRET T., GOULD H. J., Tissue and species specificity of non-histone chromatin proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **294**: 165-170, 1973.
- [3] BEKHOR I., LAKSHMI A., KIM J., LAPEYRE J. N., STAMBAUGH R., Organ discrimination through organ-specific nonhistone chromosomal proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**: 11-19, 1974.
- [4] van den BROEK H. W. J., NOODEN L. D., SEVALL J. S., BONNER J., Isolation, purification and fractionation of nonhistone chromosomal proteins, *Biochemistry*, **12**: 229-236, 1973.
- [5] CHAE C. B., SMITH C., MORRIS H., Chromosomal nonhistone proteins of rat hepatomas and normal rat liver, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **60**: 1468-1471, 1974.

- [6] DESAI L. S., WULFF U. C., FOLEY G. F., Properties of chromosomal proteins of human leukemic cells, *Biochimie*, **57**: 315-323, 1975.
- [7] FUJITANI H., HOLOUBEK V., Presence of the same types of nonhistone chromosomal proteins in different tissues, *Experientia*, **30**: 474-476, 1974.
- [8] — Nonhistone nuclear protein of rat brain, *J. Neurochem.*, **23**: 1215-1224, 1974.
- [9] GALLWITZ D., SURES I., Histone acetylation. Purification and properties of three histone-specific acetyltransferases from rat thymus nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **263**: 315-328, 1972.
- [10] GAZIEV A. J., ZAKRZEVSKAJA D. T., UMANSKIJ S. R., STRAŽEVSKAJA N. B., STRUCZKOV V. A., KUZIN A. M., Polinukleotidligaznaja aktivnost niegistonovykh białkov chromatina kostnogo mozga, *Dokł. Akad. Nauk ZSRR*, **199**: 470-473, 1971.
- [11] GRONOW M., THACKRAH T., The nonhistone nuclear proteins of some rat tissues, *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**: 377-386, 1973.
- [12] HOWK R., WANG T. Y., DNA-polymerase from rat liver chromosomal proteins. I. Partial purification and general characteristics, *Arch. Biochem. Biophys.*, **133**: 238-246, 1969.
- [13] KADOHAMA N., TURINGTON R. W., Acidic chromatin proteins: changes in breast cancer cells, [w] *Hormones and cancer*, red. M. Kernes, Acad. Press, New York and London 1974, 1-27.
- [14] KAMIYAMA M., DASTUQUE B., Rat liver non-histone proteins: correlation between protein kinase activity and activation of RNA synthesis. *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **44**: 29-35, 1971.
- [15] KAMIYAMA M., BERNARD R., KRUIH J., DASTUQUE B., Action of phosphoproteins and protein kinase from rat liver chromatin on RNA synthesis. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **44**: 1345-1351, 1971.
- [16] KAMIYAMA M., WANG T. Y., Activated transcription from rat liver chromatin by non-histone proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**: 563-576, 1971.
- [17] KAMIYAMA M., DASTUQUE B., DEFER N., KRUIH J., Liver chromatin non-histone proteins partial fractionation and mechanism of action on RNA synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**: 576-583, 1972.
- [18] KILIAŃSKA Z., KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., Biologiczna rola białek niehistonowych chromatyny, *Post. Biochem.*, **19**: 533-558, 1973.
- [19] KILIAŃSKA Z., MISZCZAK E., KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., Studies on heterogeneity of nuclear phosphoproteins from calf lymph nodes, *Biochimie*, **55**: 825-827, 1973.
- [20] KLEINSMITH L. J., HEIDEMA J. CARROL A., Specific binding of rat liver nuclear proteins to DNA, *Nature*, **226**: 1025-1026, 1970.
- [21] KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., POLANOWSKA Z., Kwaśne białka jąder komórkowych, *Post. Biochem.*, **17**: 601-629, 1971.
- [22] KOSTRABA N. C., WANG T. Y., Differential activation of transcription of chromatin by non-histone fractions, *Biochim. Biophys. Acta*, **262**: 169-181, 1972.
- [23] — Repression of DNA-directed RNA synthesis in vitro by a DNA-binding non-histone chromosomal protein, *Fed. Proc.*, **32**: 611, 1975.
- [24] KOSTRABA N. C., MONTAGNA R. A., WANG T. Y., Study of the loosely bound non-histone chromatin proteins, *J. Biol. Chem.* **250**: 1548-1555, 1975.
- [25] KRUIH J., DASTUQUE B., DEFER N., KAMIYAMA M. TICHONICKY L., Chromosomal non-histone proteins and nuclear protein kinases, *Biochimie*, **56**: 995-1001, 1974.

- [26] LeSTOURGEON W. M., RUSCH H. P., Localization of nuclear and chromatin residual acidic protein changes during differentiation in *Physarum polycephalum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**: 144-158, 1973.
- [27] LeSTOURGEON W. M., FORER A., YANG Y. Z., BERTRAM J. S., RUSCH H. P., Contractile proteins. Major components of nuclear and chromosomal nonhistone proteins of chromatin. Their isolation and composition in a number tissues, *Biochim. Acta*, **277**: 384-402, 1972.
- [28] MacGILLIVRAY A. J., CAMERON R. J., KRAUZE R. J., RICKWOOD D., The non-histone proteins of chromatin. Their isolation and composition in a number tissues, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**: 384-402, 1972.
- [29] MacGILLIVRAY A. J., RICKWOOD D., The heterogeneity of mouse-chromatin non-histone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography, *Eur. J. Biochem.*, **41**: 181-190, 1974.
- [30] MORALES M. M., BLAT C., HAREL L., MORALES M. M., Changes in the phosphorylation of nonhistone chromosomal proteins in relationship to DNA and RNA synthesis in BHK 21C13 cells, *Exptl. Cell Res.*, **86**: 111-120, 1974.
- [31] O'CONNOR P. J., An alkaline deoxyribonuclease from rat liver non-histone chromatin protein, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **35**: 806-811, 1969.
- [32] PATEL G. L., THOMAS T. L., Some binding parameters of chromatin acidic proteins with high affinity for deoxyribonucleic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2525-2528, 1973.
- [33] PLATZ R. D., STEIN G., KLEINSMITH L. J., Changes in the phosphorylation of non-histone chromatin proteins during the cell cycle of HeLa S₃ cells, *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **51**: 735-740, 1973.
- [34] PLATZ R. D., HNILICA L. S., Phosphorylation of non-histone chromosomal proteins during sea urchin development, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **54**: 222-227, 1973.
- [35] RICHTER K. M., SEKERIS C. E., Isolation and partial purification of non-histone chromosomal proteins from rat liver, thymus and kidney, *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**: 44-53, 1973.
- [35] RICHTER K. M., SEKERIS C. E., Isolation and partial purification of non-histone chromosomal proteins from rat liver, thymus and kidney, *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**: 44-53, 1972.
- [36] RICKWOOD D., RICHES P. G., MacGILLIVRAY A. J., Studies of the in vitro phosphorylation of chromatin non-histone protein in isolated nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **299**: 162-171, 1973.
- [37] SANDERS L. A., Isolation and characterization of the non-histone chromosomal proteins of developing avian erythroid cells, *Biochemistry*, **13**: 527-534, 1974.
- [38] SHEA M., KLEINSMITH L. J., Template-specific stimulation of RNA synthesis by phosphorylated non-histone chromatin proteins, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **50**: 473-479, 1973.
- [39] SPELSBERG T. C., HNILICA L. S., ANSEVIN A. T., The macromolecules in specific restriction of the chromatin DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**: 550-562, 1971.
- [40] SHEEHAN D. M., OLINS D. E., The binding of nuclear non-histone protein to DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **353**: 438-446, 1974.

- [41] SHELTON K. R., NEELIN J. M., Nuclear residual proteins from goose erythroid cells and liver, *Biochemistry*, **10**: 2342–2348, 1971.
- [42] SPELSBERG T. C., MITCHELL W. M., CHYTIL F., WILSON B. M., O'MALLEY B. W., Chromatin of the developing chick oviduct: changes in the acidic proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **312**: 765–778, 1973.
- [43] STEGGLES A. W., SPELSBERG T. C., O'MALLEY B. W., Tissue specific binding in vitro of progesterone receptor to the chromatins of chick tissues. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **43**: 20–27, 1971.
- [44] STEIN G., CHAUDHURI S., BASERGA R., Gene activation-in WI - 38 fibroblasts stimulated to proliferate. Role of non - histone chromosomal proteins, *J. Biol. Chem.*, **247**: 3918–3922, 1972.
- [45] STEIN G. S., SPELSBERG T. C., KLEINSMITH L. J., Nonhistone chromosomal proteins and gene regulation, *Science*, **138**: 817–824, 1974.
- [46] SURIA D., LIEW C. C., Isolation of nuclear acidic proteins from rat tissues. Characterization of acetylated liver nuclear acidic protein, *Biochem. J.*, **137**: 355–362, 1974.
- [47] TAKEDA M., YAMAMURA H., OHGA Y., Phosphoprotein kinases associated with rat liver chromatin, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **42**: 103–110, 1971.
- [48] TENG C. S., HAMILTON T. H., Regulation by estrogen of organ - specific synthesis of a nuclear acidic protein, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **40**: 1231–1238, 1970.
- [49] TENG C. T., TENG C. S., ALLFREY V. G., Species - specific interactions between nuclear phosphoproteins and DNA, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **41**: 690–696, 1970.
- [50] TENG C. S., TENG C. T., ALLFREY V. G., Studies of nuclear acidic proteins, *J. Biol. Chem.*, **246**: 3597–3609, 1971.
- [51] UMANSKY S. R., KOVALEV Y. I., TOKARSKAYA V. I., Specific interaction of chromatin non - histone proteins with DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **383**: 242–254, 1975.
- [52] VIDALI G., BOFFA L. C., ALLFREY V. G., Properties of an acidic histone binding protein fraction from cell nuclei, *J. Biol. Chem.*, **247**: 7365–7373, 1972.
- [53] VIDALI G., BOFFA L. C., LITTAU K. M., ALLFREY K. M., ALLFREY V. G., Changes in nuclear acidic protein complement of red blood cells during embryonic development, *J. Biol. Chem.*, **248**: 4065–4068, 1973.
- [54] WAKABAYASHI K., HNILICA L. S., The immunospecificity of nonhistone protein complex with DNA, *Nature*, **242**: 153–155, 1973.
- [55] WAKABAYASHI K., WANG S., HORD G., HNILICA L. S., Tissue specific nonhistone chromatin proteins with affinity for DNA, *FEBS Lett.*, **32**: 46–48, 1973.
- [56] WAKABAYASHI K., WANG S., HNILICA L. S., Immunospecificity of non - histone proteins in chromatin, *Biochemistry*, **13**: 1027–1032, 1974.
- [57] WANG T. Y., Tissue specificity of nonhistone chromosomal, proteins, *Exptl. Cell Rs.*, **69**: 217–219, 1971.
- [58] WIERZBICKI R., GRABOWSKA M., KILIAŃSKA Z., KRAJEWSKA W., LIPIŃSKA A., KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ L., CHORAŻY M., Nonhistone

chromatin proteins of normal rat liver and *Morris hepatoma*, 9th FEBS Meeting, Budapest 1974, s. 142.

- [59] WU F. C., ELGIN S. C. R., HOOD L. E., Nonhistone chromosomal proteins of rat tissues. A comparative study by gel electrophoresis, *Biochemistry*, **12**: 2792-2797, 1973.

Otrzymano: 17 października 1975.

Przyjęto: 20 października 1975.

Adres autorów: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

INHIBITORY KOMÓRKOWYCH ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

Krzysztof WOROWSKI

Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii
Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Aktywność komórkowych enzymów proteolitycznych hamowana jest przez inhibitory syntetyczne i naturalne, wytwarzane przez drobnoustroje, rośliny i zwierzęta. Wśród inhibitorów syntetycznych wyróżnia się inhibitory inaktywujące proteazy karboksylowe, sulfhydrylowe, serynowe i metaloproteazy. W grupie inhibitorów naturalnych na szczególną uwagę zasługują inhibitory syntetyzowane przez drobnoustroje, ze względu na ich małą toksyczność i możliwość stosowania *in vivo*. Zastosowania praktyczne inhibitorów proteaz komórkowych dotyczą badań nad strukturą centrów aktywnych tych enzymów, ich lokalizacją w obrębie komórki i tkanek oraz rolą w degradacji białek komórkowych. Stwarzają one ponadto możliwość regulacji proteolizy tkankowej w stanach patologicznych i są używane do celów preparatywnych i analitycznych.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA INHIBITORÓW KOMÓRKOWYCH ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

Wśród związków hamujących aktywność komórkowych enzymów proteolitycznych wyróżnia się inhibitory syntetyczne i naturalne [9].

Inhibitory syntetyczne są związkami nieorganicznymi lub organicznymi o ściśle określonej strukturze i dobrze poznanym mechanizmie działania.

Naturalne inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych należą do białek lub peptydów i bardzo często zawierają w swej strukturze nietypowe aminokwasy lub składniki węglowodanowe. Mechanizm działania wielu z tych inhibitorów nie jest w pełni poznany.

Do grupy inhibitorów naturalnych należą inhibitory fizjologiczne, będące normalnymi składnikami tkanek i płynów ustrojowych i inhibitory nefizjologiczne, syntetyzowane wprawdzie przez organizmy żywe (drobnoustroje, rośliny, zwierzęta niższe), ale działające na enzymy proteolityczne wyizolowane z tkanek zwierząt wyższych.

Ze względu na mechanizm działania wyróżnia się według klasycznych definicji inhibitory kompetycyjne i niekompetycyjne.

Przypadki inhibicji kompetycyjnej i niekompetycyjnej w odniesieniu do inhibitorów enzymów proteolitycznych są przypadkami skrajnymi, a wyniki eksperymentów nie odpowiadają najczęściej żadnemu z nich [125]. W przyrodzie występują najczęściej inhibitory typu pośredniego (mieszane) wykazujące cechy wspólne dla inhibitorów kompetycyjnych i niekompetycyjnych. Inhibitory mieszane utrudniają zarówno powstanie kompleksu enzym-substrat, jak i zmniejszają szybkość tworzenia się i uwalniania produktu z tego kompleksu. Dzieje się tak dlatego, ponieważ kompleks enzymu z inhibitorem wiążącym się poza centrum aktywnym posiada niższe powinowactwo do substratu niż wolny enzym, a inhibitor wiążący się z centrum aktywnym może reagować także z innym miejscem cząsteczki enzymu i oddziaływać przez to na fazę katalityczną reakcji. W obu przypadkach odgrywają istotną rolę zmiany konformacyjne cząsteczki enzymu i wytworzenie przeszkody sterycznej przez inhibitor, co w efekcie wpływa na mieszany charakter inhibicji. Typ inhibicji zależy niekiedy również od stężenia inhibitora [32]. Przy małych stężeniach inhibitor reaguje z aktywnym centrum enzymu, a jeśli jego stężenie jest dostatecznie duże, reaguje także z innym obszarem cząsteczki enzymu, lub na odwrót. Mieszany typ inhibicji może wystąpić także, gdy w reakcji enzymatycznej bierze udział szereg substratów i gdy wobec niektórych z nich inhibitor działa kompetycyjnie, a wobec innych niekompetycyjnie. W układach wielosubstratowych katalityczne działanie enzymu proteolitycznego na jeden z substratów może być ponadto hamowane kompetycyjnie przez drugi substrat [16]. Typ inhibicji może zależeć również od stężenia substratu na który działa enzym proteolityczny [97]. Złożone układy mają miejsce w organizmach żywych, w których występuje obok siebie wiele różnych substratów białkowych w różnych stężeniach. Różnorodność substratów powiększa znacznie pojawianie się pośrednich produktów degradacji białek. Produkty takie wykazują często działanie inhibicyjne w stosunku do proteaz [116].

Do określenia typu hamowania służą równania podane przez Lineweavera i Burka [73], Dixona [27] i innych [17, 37, 95].

Wydaje się, że tempo syntezy inhibitorów proteaz komórkowych zależy od rozmieszczenia tych enzymów w komórce i ich poziomu w cytoplazmie. Uszkodzenie lizosomów i uwolnienie z nich enzymów powoduje wybitny wzrost szybkości biosyntezy inhibitorów takich jak α_1 -antytrypsyna, haptoglobina i orozomukoid [61]. Zwiększona synteza inhibitorów enzymów proteolitycznych należy w takich przypadkach do mechanizmów obronnych.

Degradacji i inaktywacji określonych inhibitorów dokonują proteazy niewrażliwe na ich inhibicyjne działanie [47, 70, 96, 100]. Proces ten zachodzi jednak ze znacznie większą szybkością po związaniu się inhibitora z właściwym mu enzymem. Wskazuje na to o wiele krótszy czas półtrwania kompleksu enzym-inhibitor niż wolnego inhibitora [7, 87].

Stężenie inhibitorów proteaz oznacza się metodami enzymatycznymi lub immunologicznymi. W metodach enzymatycznych o poziomie inhibitora wnosi się na podstawie obniżenia aktywności enzymu nań wrażliwego. Aby wyeliminować wpływ nadmiaru inhibitora na wynik pomiaru wyznacza się takie jego stężenie, które obniża aktywność enzymu o 50% (ID₅₀) [41, 106]. Metody immunologiczne znajdują zastosowanie do oznaczania stężenia inhibitorów białkowych, posiadających właściwości antygenowe. Do ich ilościowego oznaczania stosuje się zwykle techniki immunoelektroforetyczne [118].

INHIBITORY SYNTETYCZNE

Poznano wiele związków chemicznych nieorganicznych i organicznych inaktywujących niespecyficznie różne enzymy, w tym również enzymy proteolityczne. Należą do nich między innymi sole metali ciężkich, takich jak rtęć, ołów i kadm. Kationy tych metali wiążą się z grupami sulfhydrylowymi i karboksylowymi enzymów, niezależnie od tego czy występują one w obrębie centrum aktywnego, czy też poza nim. Powoduje to zmiany konformacyjne białka enzymatycznego i obniżenie lub zanik aktywności enzymatycznej. Niektóre inhibitory syntetyczne odznaczają się jednak znaczną specyficznością działania. Wiążą one jedynie określone grupy funkcyjne zlokalizowane w obrębie centrum aktywnego enzymu. Specyficzność tych inhibitorów jest jednak specyficznością grupową, odnoszącą się do wszystkich enzymów proteolitycznych posiadających identyczną strukturę centrum aktywnego (tabela 1)

Do blokowania aktywności proteaz komórkowych o karboksylowych centrach aktywnych stosowane są odczynniki estryfikujące te grupy. Powszechnie są używane do tego celu dwuazoacetylowe pochodne estrów metylowych aminokwasów [8, 53, 76, 98, 105]. Estryfikacja grup karboksylowych enzymów tymi odczynnikiemami zachodzi w obecności jonów miedziowych, spełniających rolę katalityczną [53]. Do blokowania centrum aktywnego katepsyny D [53, 108] i katepsyny E [56] szczególnie polecany jest ester metylowy dwuazoacetylo - D,L - norleucyny.

Inhibicyjny wpływ na aktywność katepsyny D wywierają również analogi syntetycznych substratów. Syntetycznym substratem katepsyny D jest heksapeptyd Gli₁ - Fen₂ - Leu₃ - Gli₄ - Fen₅ - Leu₆, w którym enzym

TABELA 1. Proteazy tkankowe i ich syntetyczne inhibitory

Proteazy	Inhibitory	Literatura
Karboksyłowe: katepsyna D, katepsyna E	Ester metylowy dwuazoacetylo-D, L-norleucyny (DAN)	[53, 56, 105]
Sulfhydryłowe: katepsyna B ₁ , katepsyna B ₂ , katepsyna C	Jodoacetamid, kwas p-chlorortęcio-benzoesowy (PCMB), N-etyloimid kwasu maleinowego (NEM)	[80, 99]
Serynowe: katepsyna A, obojętna proteaza leukocytów, obojętna proteaza chromatyny jądrowej, elastaza	Dwuizopropylofluorofosforan (DFP)	[20, 45, 75, 90]
Metaloproteazy: kolagenaza, leucyno-aminopeptydaza	Sól sodowa kwasu etylenodwuamino-czterooctowego (EDTA) 1,10-o-fenantrolina	[14, 71, 74, 89]

ten rozszczepia wiązanie Fen₂-Leu₃. Rozkład wymienionego substratu jest utrudniony w obecności heksapeptydów zawierających w swej strukturze D aminokwasy [54]. O sile działania inhibicyjnego decyduje liczba i rozmieszczenie w cząsteczce inhibitora D - aminokwasów (tabela 2). Najsilniejsze działanie inhibicyjne wykazują analogi posiadające tylko je-

TABELA 2. Hamowanie rozkładu Gli₁-Fen₂-Leu₃-Gli₄-Fen₅-Leu₆ przez katepsynę D w obecności D izomerów tego substratu (wg [54])

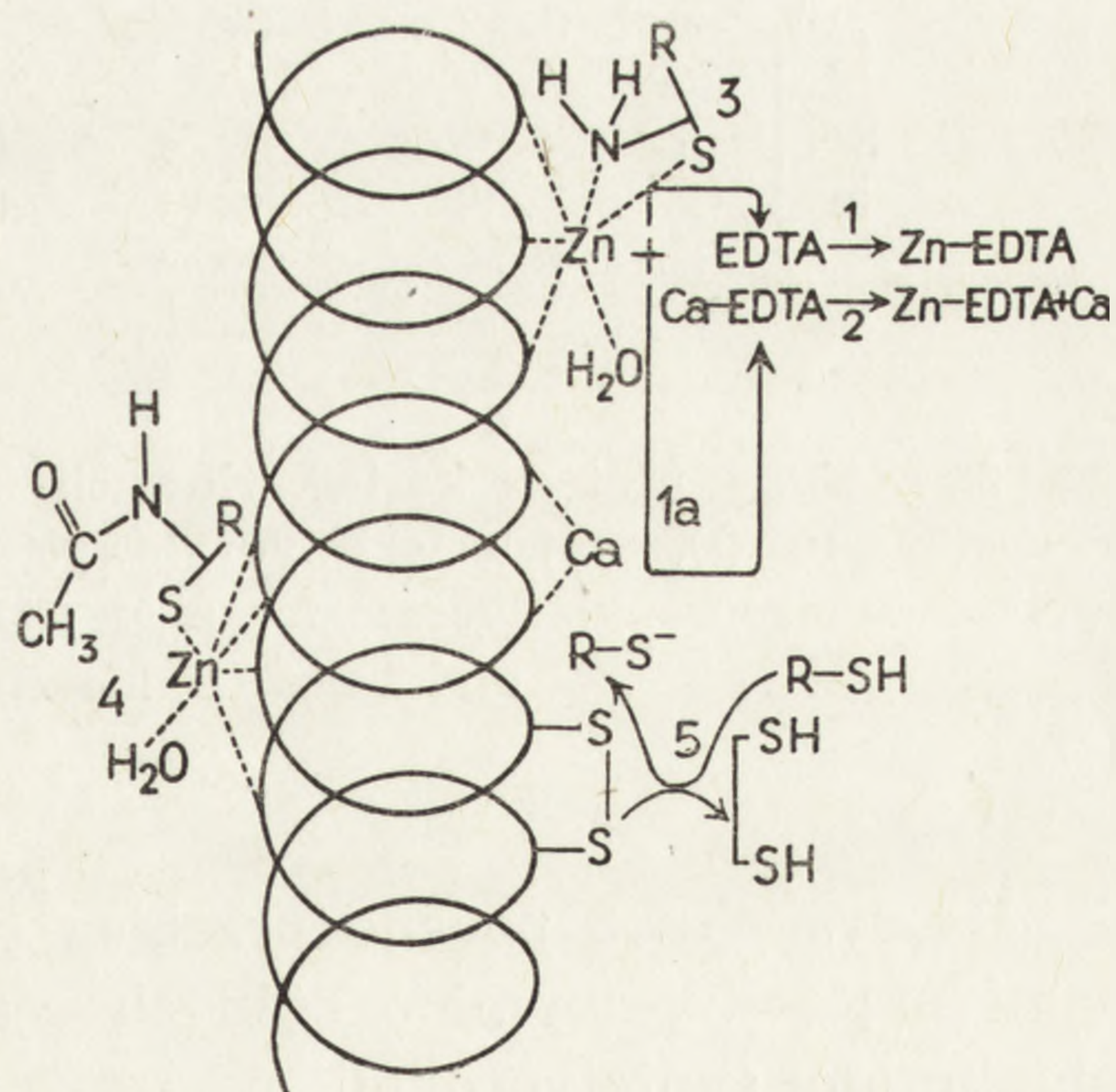
Dodany D izomer	Inhibicja (%)
Gli-Fen-Leu-Gli-Fen-D-Leu	89,2
Gli-Fen-Leu-Gli-D-Fen-Leu	75,4
Gli-D-Fen-Leu-Gli-Fen-Leu	63,1
Gli-D-Fen-Leu-Gli-D-Fen-Leu	0
Gli-Fen-Leu-Gli-Fen-Leu	0

den D aminokwas maksymalnie oddalony od miejsca wrażliwego na działanie enzymu. Znaczne podobieństwo struktury do heksapeptydu zbudowanego wyłącznie z L aminokwasów umożliwia silne wiązanie się takich analogów z centrum aktywnym. Natomiast analogi zawierające dwa D aminokwasy w cząsteczce oraz heksapeptyd cykliczny nie przejawiają w ogóle działania inhibicyjnego.

Proteazy sulfhydrylowe blokowane są najczęściej w drodze alkilacji, za pomocą chlorowcopochodnych rtęciowych związków organicznych oraz przy użyciu N - etyloimidu kwasu maleinowego. Alkilację grup sulfhydrylowych proteaz przeprowadza się w drodze karboksymetylowania przy użyciu kwasu jodooctowego lub jodoacetamidu [99]. Spośród organicznych związków rtęci do blokowania grup sulfhydrylowych stosowane są związki typu R - HgX. Klasycznymi ich przedstawicielami jest p - chlorortęciobenzoesan (PCMB), p - chlorortęciosulfonian (PCMS) i metylortęciójodan [80, 99]. Bardzo specyficznie blokuje grupy sulfhydrylowe enzymów proteolitycznych N - etyloimid kwasu maleinowego [99].

Tkankowe enzymy proteolityczne posiadające serynowe centra aktywne są inaktywowane przez dwuizopropylofluorofosforan (DFP) na drodze estryfikacji grupy hydroksylowej [45, 66, 75, 86]. Ponieważ pozostałe reszty seryny występujące w białku enzymatycznym nie są atakowane przez DFP wnosi się, że proces estryfikacji seryny centrum aktywnego jest rezultatem działania katalitycznego. Powstający fosfoenzym jest jednak w odróżnieniu od acyloenzymu połączeniem trwałym.

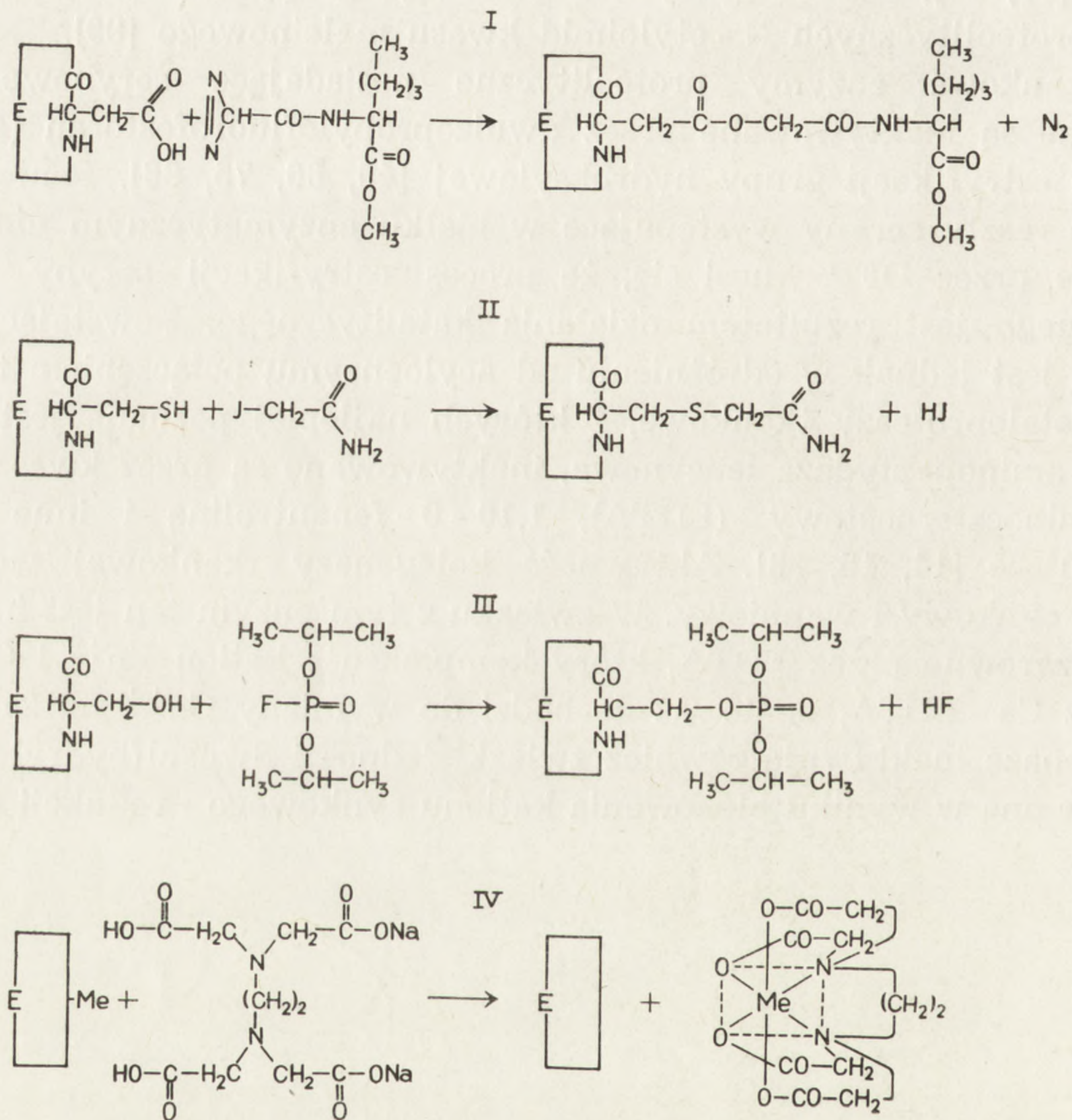
Metaloproteazy tkankowe, z których najlepiej poznana jest kolagenaza i aminopeptydaza leucynowa, inaktywowane są przez kwas etylenodwuaminocztworowy (EDTA), 1,10 - 0 - fenantrolinę i inne związki chelatujące [14, 15, 38]. Aktywność kolagenazy tkankowej warunkuje kation cynkowy i wapniowy. W związku z tym enzym ten jest inaktywowany zarówno przez EDTA, który kompleksuje kation Zn^{+2} i Ca^{+2} , jak i przez Ca - EDTA, ponieważ dochodzi do wymiany Ca^{++} na Zn^{++} [14]. Kolagenazę inaktywują również związki jedno- i dwusulfhydrylowe. Następuje ona w wyniku blokowania kationu cynkowego i redukcji mostków



Rys. 1. Schemat inaktywacji kolagenazy przez syntetyczne inhibitory (wg [14]).

1 — wiązanie cynku przez EDTA, 1a — wiązanie wapnia przez EDTA, 2 — wiązanie cynku przez Ca - EDTA, 3 — wiązanie cynku przez związki aminosulfhydrylowe, 4 — wiązanie cynku przez związki sulfhydrylowe, 5 — redukcja mostków dwusiarczkowych przez związki sulfhydrylowe

dwusiarczkowych enzymu. Wprowadzenie grupy aminowej do związku sulfhydrylowego wzmacnia działanie inhibicyjne. Dzieje się tak dlatego, że w blokowaniu Zn^{+2} biorą udział zarówno grupy sulfhydrylowe, jak i aminowe [14, 38]. Z tego względu cysteina działa silniej niż acetylcysteina, której grupa aminowa jest zablokowana. Mechanizmy prowadzące do inaktywacji kolagenazy przedstawia rysunek 1.



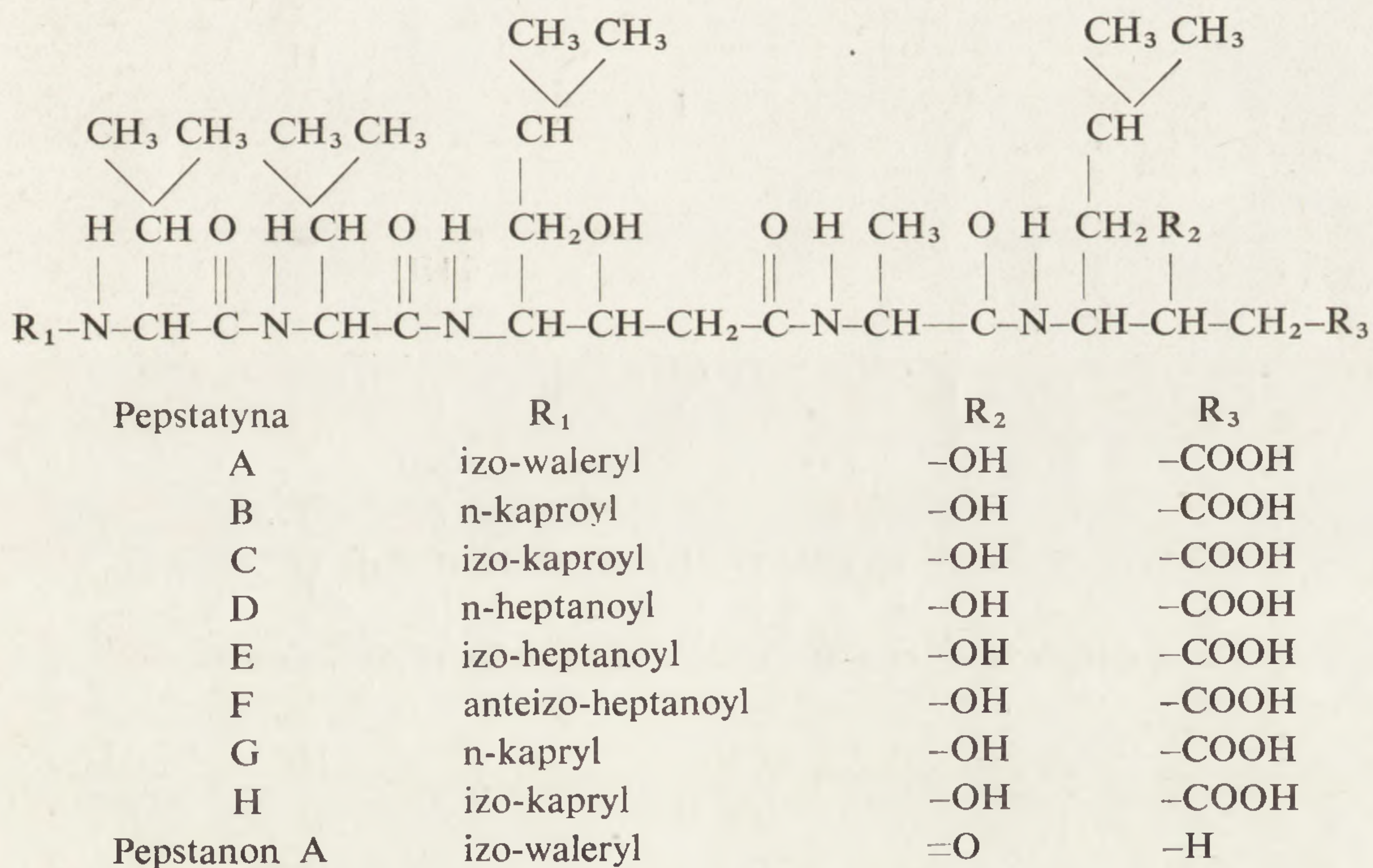
Rys. 2. Reakcja proteaz karboksylowych z estrem metylowym dwuazoacetylo - D, L - norleucyny (I), proteaz sulfhydrylowych z jodoacetamidem (II), proteaz serynowych z dwuizopropylfluorofosforanem (III) i metalproteaz z solą sodową kwasu etylenodwuaminoczterooctowego (IV)

Na rysunku 2 podano przebieg reakcji zachodzących między enzymami proteolitycznymi o różnych centrach aktywnych i specyficznymi inhibitorami syntetycznymi.

INHIBITORY IZOLOWANE Z DROBNOUSTROJÓW I ROŚLIN

Badacze japońscy pracujący pod kierunkiem Umezawy stwierdzili, że inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych syntetyzowane są przez różne szczepy drobnoustrojów rodzaju *Streptomyces* [6, 112]. Należą do nich pepstatyny, leupeptyny, antypaina i chymostatyny.

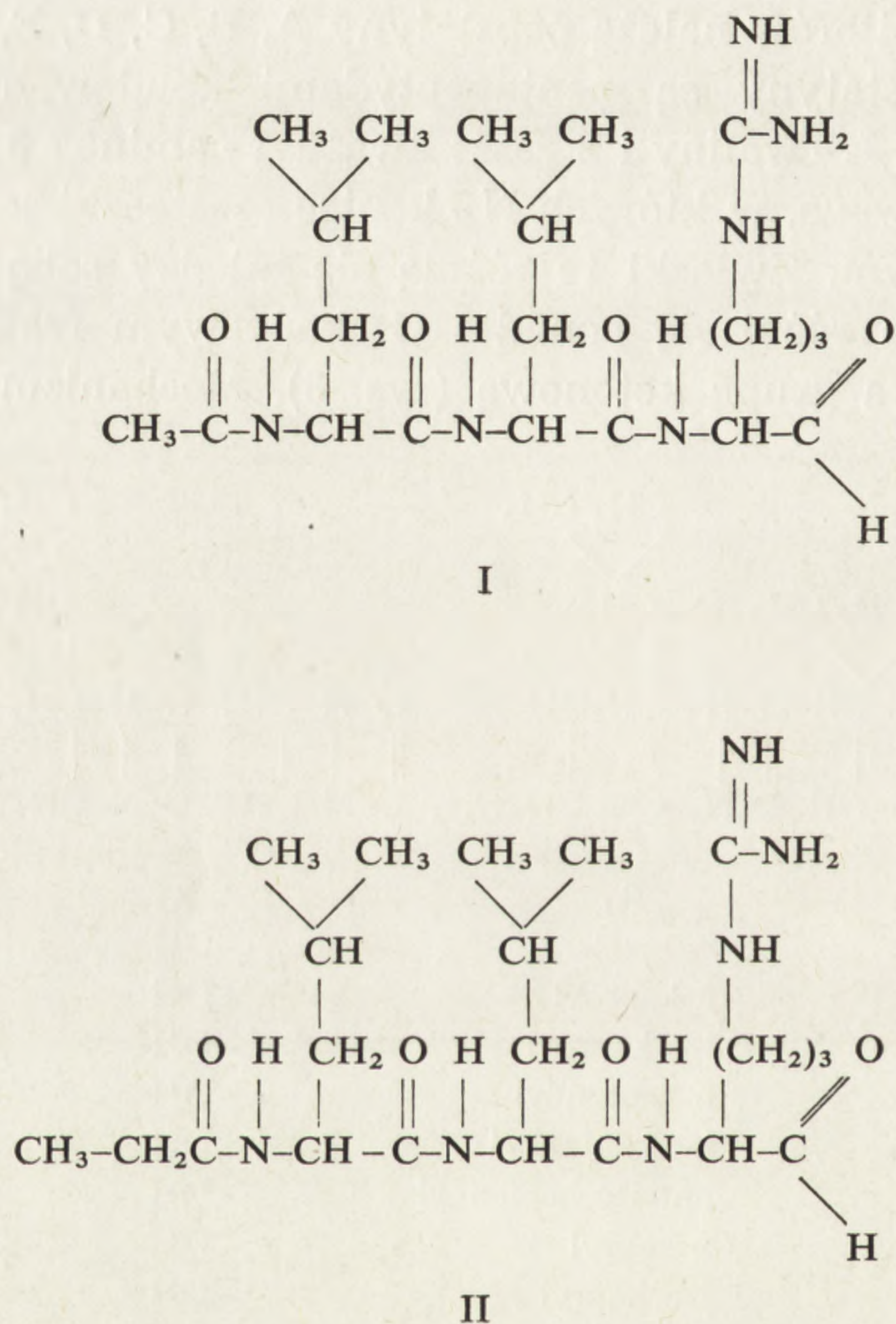
Pepstatyny hamują aktywność proteaz o karboksylowych centrach aktywnych takich, jak katepsyna D [5, 10, 71, 124] i katepsyna E [10]. Do tej grupy inhibitorów należą pepstatyny A, B, C, D, E, F, G, H i pepstanon A [5]. Pepstatyny są pentapeptydami zbudowanymi z 1 reszty L - alaniny, 2 reszt L - waliny i 2 reszt kwasu 4 - amino - 3 - hydroksy - 6 - -metylo - heptanowego, w których N - koniec cząsteczki jest zablokowany rodnikiem acylowym. Związki te różnią się między sobą strukturą tego rodnika. Pepstanon różni się ponadto C - końcowym fragmentem struktury, który zawiera grupę ketonową (rys. 3). Mechanizm działania pep-



Rys. 3. Struktura chemiczna pepstatyn (wg [83])

statyn badany był przy użyciu pepsyny i katepsyny D. Stwierdzono, że dla działania inhibicyjnego pepstatyn istotne znaczenie posiadają grupy hydroksylowe występujące w strukturze tych inhibitorów [65, 112]. Mała toksyczność pepstatyn umożliwia użycie ich do badania procesów zależnych od działania katepsyny D na żywych komórkach, tkankach i organizmach. Pepstatyny mogą być podawane doustnie lub dootrzewnowo. LD₅₀ pepstatyny A dla szczurów przy podaniu doustnym wynosi 2,0 g/kg, a przy podaniu dootrzewnowym 0,875 g/kg wagi ciała [114].

Leupeptyny hamują aktywność katepsyny B₁ [40], proteaz komórkowych degradujących histony w obojętnym i zasadowym pH [49] i szeregu proteaz przewodu pokarmowego i krwi [6]. Do leupeptyn należy acetylo-leupeptyna (acetylo-L-leucylo-L-leucylo-D,L-argininal) i propionylo-leupeptyna (propionylo-L-leucylo-L-leucylo-D,L-argininal) oraz ich analogi strukturalne zawierające w miejscu jednej lub dwóch reszt leucyny, izoleucynę lub walinę [63, 77] (rys. 4). W działaniu in-

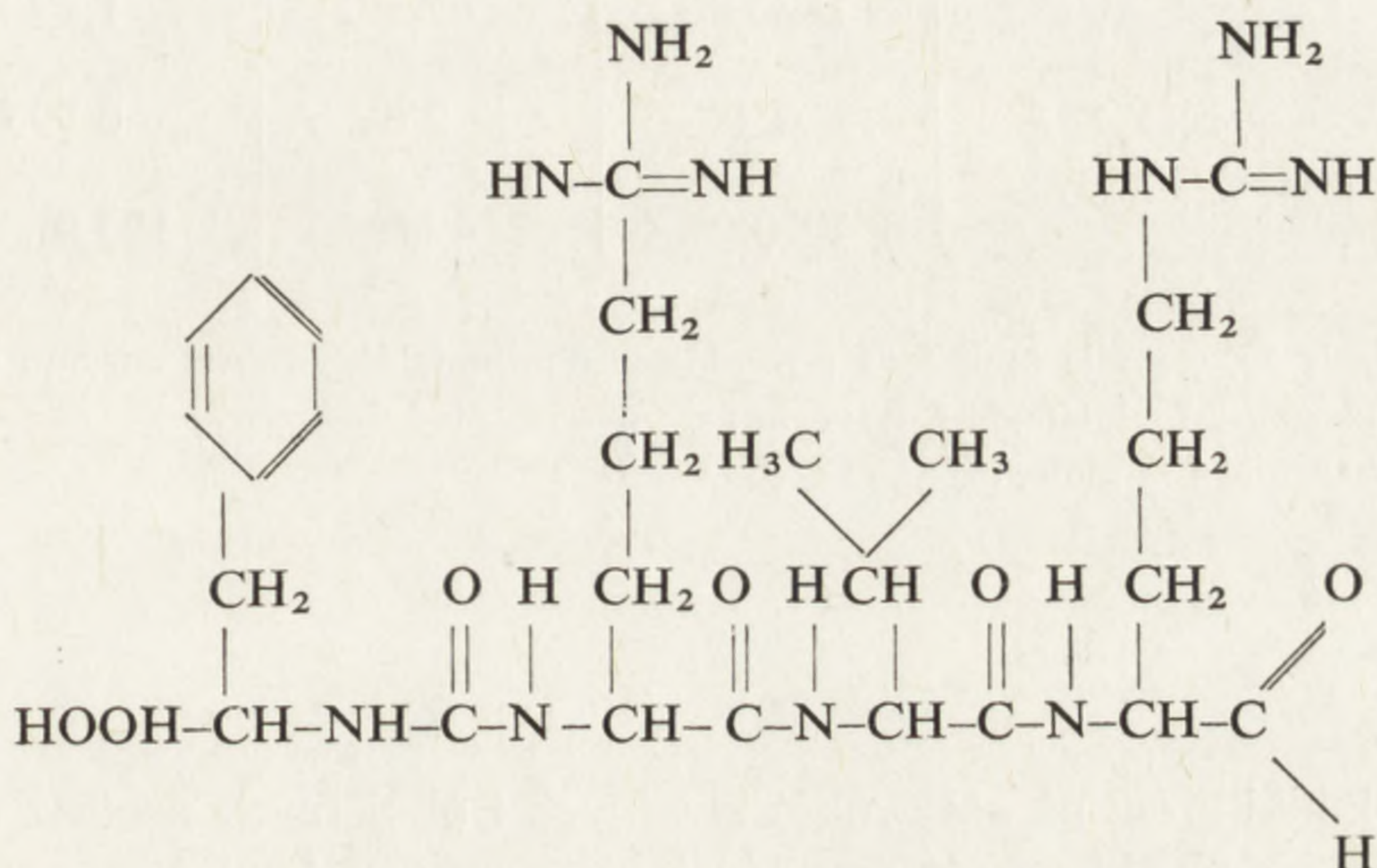


Rys. 4. Struktura chemiczna leupeptyn (wg [50]).

I — acetylo-leupeptyna II — propionylo-leupeptyna

hibicyjnym leupeptyn istotną rolę odgrywa grupa aldehydowa C-końcowej reszty argininalu [4]. Wniosek ten wysunięto na podstawie badań, w których wykazano zanik aktywności inhibitorowej po utlenieniu tej grupy do grupy karboksylowej bądź zredukowania do grupy alkoholowej. Leupeptyna wchłania się do krążenia po podaniu doustnym. Może być także stosowana podskórną i dożylną. LD₅₀ badana na szczurach wynosi dla tego inhibitora przy podaniu doustnym lub podskórnym powyżej 4,0 g/kg i 0,125 g/kg wagi ciała, gdy jest on wprowadzony dożylnie [6].

Antypaina jest nietypowym peptydem o nazwie systematycznej [(S) - 1 - karboksy - 2 - fenyloetylo] - karbamoilo - L - arginylo - L walylo - L - argininal, którego strukturę przedstawiono na rys. 5. Inhibitor ten hamuje aktywność katepsyny A [41], katepsyny B₁ [41], proteaz komórkowych degradujących histony [49] oraz niektórych proteaz roślin-



Rys. 5. Struktura chemiczna antypainy (wg [115])

nych, przewodu pokarmowego i krwi [41, 106]. Działanie inhibicyjne antypainy warunkuje grupa aldehydowa [106]. Stwierdzono, że podanie tego inhibitora doustnie w dawce 1,0 g/kg lub dożylnie w dawce 0,125 g/kg wagi ciała jest dobrze tolerowane przez myszy [106].

Chymostatyny są inhibitorami peptydowymi o nie ustalonej dotąd sekwencji aminokwasów. Zawierają one w swym składzie takie aminokwasy, jak walina, leucyna, izoleucyna, argininal i fenyloalanina [113]. Chymostatyny hamują aktywność katepsyny B₁ [40].

Wspólną cechą struktury leupeptyn, antypainy i chymostatyn jest obecność grupy aldehydowej w ich cząsteczce. Grupy aldehydowe odgrywają istotną rolę w działaniu inhibicyjnym tych związków, w stosunku do katepsyny B₁. Przyjmuje się, że mechanizm tego działania polega na tworzeniu tio - półacetalowych wiązań kowalencyjnych z grupami sulfhydrylowymi enzymu, będących analogami związków pośrednich powstających w katalizie [4, 123].

Stężenia inhibitorów bakteryjnych hamujące 50% aktywności (ID₅₀) katepsyn komórkowych podane są w tabeli 3.

Poliwalentne inhibitory proteaz występujące w wielu roślinach oraz inhibitory trypsyny izolowane z płuc i trzustki nie hamują aktywności proteaz komórkowych o kwaśnych optymach pH [92, 127]. Wiele z nich hamuje jednak aktywność proteaz tkankowych działających w obojęt-

TABELA 3. Hamowanie aktywności proteaz komórkowych przez leupeptynę, chymostatynę, antypainę i pepstatynę (wg [40, 41])

Katepsyna	Substrat	ID ₅₀ (μg/ml)*			
		Leupeptyna	Chymostatyna	Antypaina	Pepstatyna
A	N-α-Cbz-L-Glu-L-Tyr**	1680,00	62,5	1,19	> 125
B	N-α-Bz-L-Arg-NH ₂ ***	0,44	2,6	0,595	> 125
D	Hemoglobina	109,00	49,0	125,0	0,011

- * – inhibitor dosis 50, stężenie inhibitora powodujące obniżenie aktywności enzymu o 50% ;
 ** – N-α-karbobenzoksy-L-glutamyl-L-tyrozyna;
 *** – amid N-α-banzoilo-L-argininy.

TABELA 4. Wpływ inhibitorów na aktywność kwaśnych i obojętnych proteaz mózgu wołu oraz na aktywność pepsyny i trypsyny (wg [78])

Inhibitor	Stosunek molowy enzym/ /inhibitor lub stężenie końcowe inhibitora w mM*	% inhibicji			
		Proteaza kwaśna	Proteaza obojętna	Pepsyna	Trypsyna
Inhibitor sojowy	1:4	0	80**	0	100
Inhibitor trzuskowy	1:4	0	14**	0	100
Inhibitor z fasoli	1:4	0	41**	0	100
TPCK	0,2*	0	46	0	0
PMSF	1,0*	10	—	0	—
β-fenylopirogrońian	0,2*	36	—	80	0
Chlorek benzetonium	2,5*	36	100	0	0
Kwas indolylo-3-piro- gronowy	12,5*	0	0	65	0
Pepstatyna	1,5*	100	0	100	0

- TPCK – L-1-p-toluenosulfonylamido-2-fenyletyl chlorometyl keton,
 PMSF – fluorek fenylometylosulfonowy.

nych i zasadowych pH (Tabela 4). Jedynie poliwalentne inhibitory izolowane z bulw ziemniaka hamują częściowo degradację białek przez enzymy proteolityczne homogenatu śledziona w kwaśnym zakresie pH [128]. Stwierdzono, że efekt ten zależy od hamowania aktywności katepsyny A przez inhibitor ziemniaczany 4b i 5b [126].

INHIBITORY ORGANIZMÓW ZWIERZĘCYCH

Inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych wytwarzane są przez zwierzęta należące do różnych grup systematycznych.

Z glisty ludzkiej (*Ascaris lumbricoides*) wyizolowano inhibitor katepsyny E [57].

W białku jaja kurzego zawarte są inhibitory katepsyny B₁ i C [58]. Droga chromatografii na Sephadexie G - 75 wyizolowano z tego materiału dwa inhibitory różniące się ciężarami cząsteczkowymi i specyficnością działania inhibicyjnego. Oba inhibitory hamują aktywność katepsyny B₁, podczas gdy aktywność katepsyny C jest hamowana tylko przez inhibitor II. Inhibitor II wiąże się z katepsyną B₁ w stosunku molowym 1:1. Połączenie to powstaje nawet wtedy jeśli enzym jest zablokowany rtęcią, co wskazuje, że wiąże się on z enzymem poza jego sulfhydrylowym centrum aktywnym [58]. Ciężar cząsteczkowy kompleksu enzym - inhibitor wyznaczony metodą sączenia molekularnego wynosi 31000 daltonów. Jest on zatem niższy od sumy ciężaru cząsteczkowego katepsyny B₁ (24000) i inhibitora (12500) wynoszącego 36500 daltonów. Niższy ciężar cząsteczkowy kompleksu enzym - inhibitor od teoretycznego spowodowany jest zmianą kształtu tworzących go komponent [58]. Inhibitor II z białka jaja wiąże się również z katepsyną C o zablokowanych rtęcią grupach sulfhydrylowych [59]. W tym przypadku kompleks enzym - inhibitor tworzy się jednak tylko w obecności jonów chlorkowych, które są aktywatorami allosterycznymi tego enzymu. Aktywność katepsyny C jest również inhibowana przez kompleks katepsyny B₁ z inhibitorem. Wskazuje to, że inhibitor II z białka jaja ma dwa niezależne miejsca reaktywne, jedno umożliwiające wiązanie katepsyny B₁, a drugie wiążące katepsynę C [59].

Inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych występują również w tkankach i osoczu krwi zwierząt wyższych i człowieka.

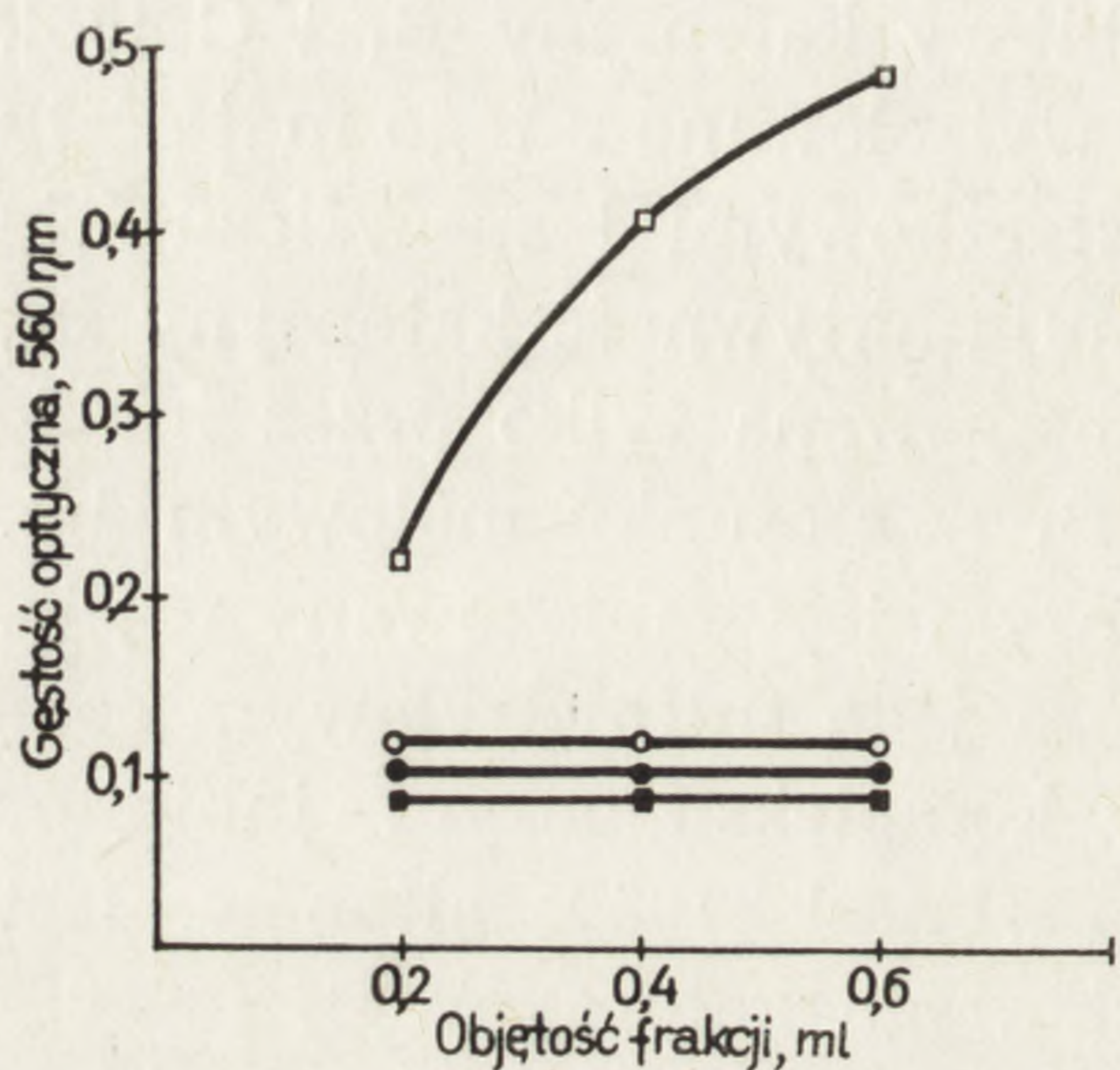
Stwierdzono, że aktywność katepsyny B i C jest hamowana przez inhibitor zawarty we frakcji mikrosomalno - cytoplazmatycznej komórek wątroby (rys. 6). Inhibitor ten jest termostabilny i nie dializuje przez błony półprzepuszczalne [33, 52]. Jego działanie przejawia się w pH lekko kwaśnym i słabo zasadowym [52]. W cytozolu występuje również inhibitor proteazy neutralnej [23, 30] i elastazy [46].

Aktywność katepsyny B jest hamowana także przez węglowodanowy inhibitor [100], którego nośnikiem jest haptoglobina surowicy krwi [101].

Orozomukoid surowicy krwi okazał się inhibitorem katepsyny C [61].

Inhibitorem wielu enzymów proteolitycznych jest α_1 - antytrypsyna surowicy krwi. Hamuje ona aktywność obojętnych proteaz komórkowych [62, 64, 88], elastazy [44, 88], enzymów proteolitycznych występujących w przewodzie pokarmowym, osoczu krwi i wytwarzanych przez bakterie

[19, 110, 122]. α_1 - antytrypsyna hamuje zarówno aktywność proteolityczną, jak również hydrolizę niskocząsteczkowych substratów, takich jak amidy i estry aminokwasów [68]. Inhibitor ten jest glikoproteidem, zawierającym 12% węglowodanów, posiadającym ciężar cząsteczkowy wynoszący 45000 daltonów [19].

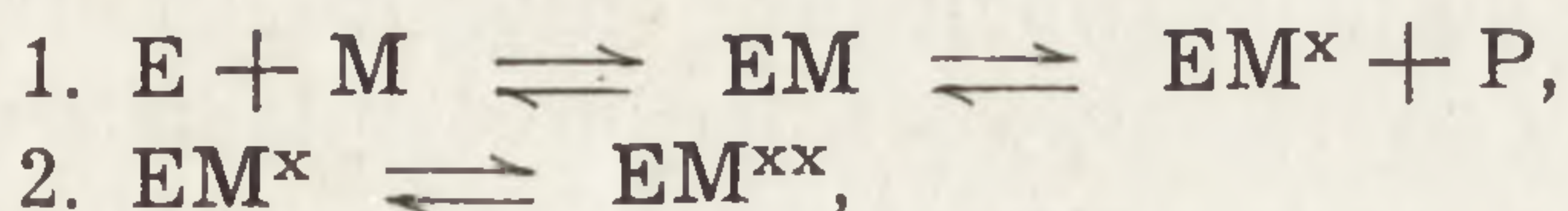


Rys. 6. Aktywność proteolityczna frakcji podkomórkowych wątroby szczura mierzona na β - naftylamidzie benzoilo - D, L - argininy w pH 7,5 (wg [52]).

(○) — pełen homogenat, (□) — frakcja lizosomalno-mitochondrialna, (●) — frakcja mikrosomalno-cytoplazmatyczna, (■) — mieszanina równych objętości (□) i (●).

Drugim, poliwalentnym inhibitorem enzymów proteolitycznych, występującym w surowicy krwi jest α_2 - makroglobulina. Hamuje ona aktywność katepsyny B₁ [11, 102, 103], katepsyny D [11], elastazy [1, 12, 36], kolagenazy [1, 36, 119], obojętnych proteaz leukocytarnych [62] oraz podobnie jak α_1 - antytrypsyna, niektóre enzymy proeolityczne przewodu pokarmowego, krwi i bakterii [29, 35, 42, 67]. α_2 - makroglobulina jest glikoproteidem, zawierającym 6463 reszty aminokwasowe i 363 reszt cukrowych w cząsteczce [31]. Ciężar cząsteczkowy tego inhibitora wynosi 820 000 daltonów. α_2 - makroglobulina hamuje aktywność enzymów proteolitycznych w ich działaniu na wysokocząsteczkowe substraty białkowe, natomiast nie hamuje hydrolizy substratów niskocząsteczkowych [34, 67]. Wytłumaczenie tego faktu wydaje się znajdować w sposobie łączenia się inhibitora z enzymami proteolitycznymi, które to połączenie wytwarza się poza centrum aktywnym [35]. α_2 - makroglobulina stanowi w ten sposób przeszkodę przestrzenną skuteczną jedynie dla substratów wysokocząsteczkowych, podczas gdy substraty niskocząsteczkowe docierają do centrum aktywnego i są hydrolizowane. Przeszkodą przestrzenną tłumaczy się również brak wrażliwości kompleksów enzym - α_2 - makroglobulina hydroli-zujących substraty niskocząsteczkowe na działanie wysokocząsteczkowych inhibitorów, takich jak α_1 - antytrypsyna i inhibitor sojowy [35]. Barrett i Starkey [11] proponują dwuetapowy mechanizm wiązania enzymów proteolitycznych przez α_2 - makroglobulinę. Cząsteczka α_2 - makroglobuliny zawiera fragment polipeptydowy szczególnie podatny na hydrolizę przez enzymy proteolityczne o różnej specyficzności w stosunku do rozszcze-

pianych wiązań. W pierwszym etapie następuje odszczepienie tego fragmentu. Powoduje to zmiany konformacyjne w pozostałej części cząsteczki i wiązanie enzymu w drugim etapie. Sekwencję omawianych zjawisk obrazuje schemat:

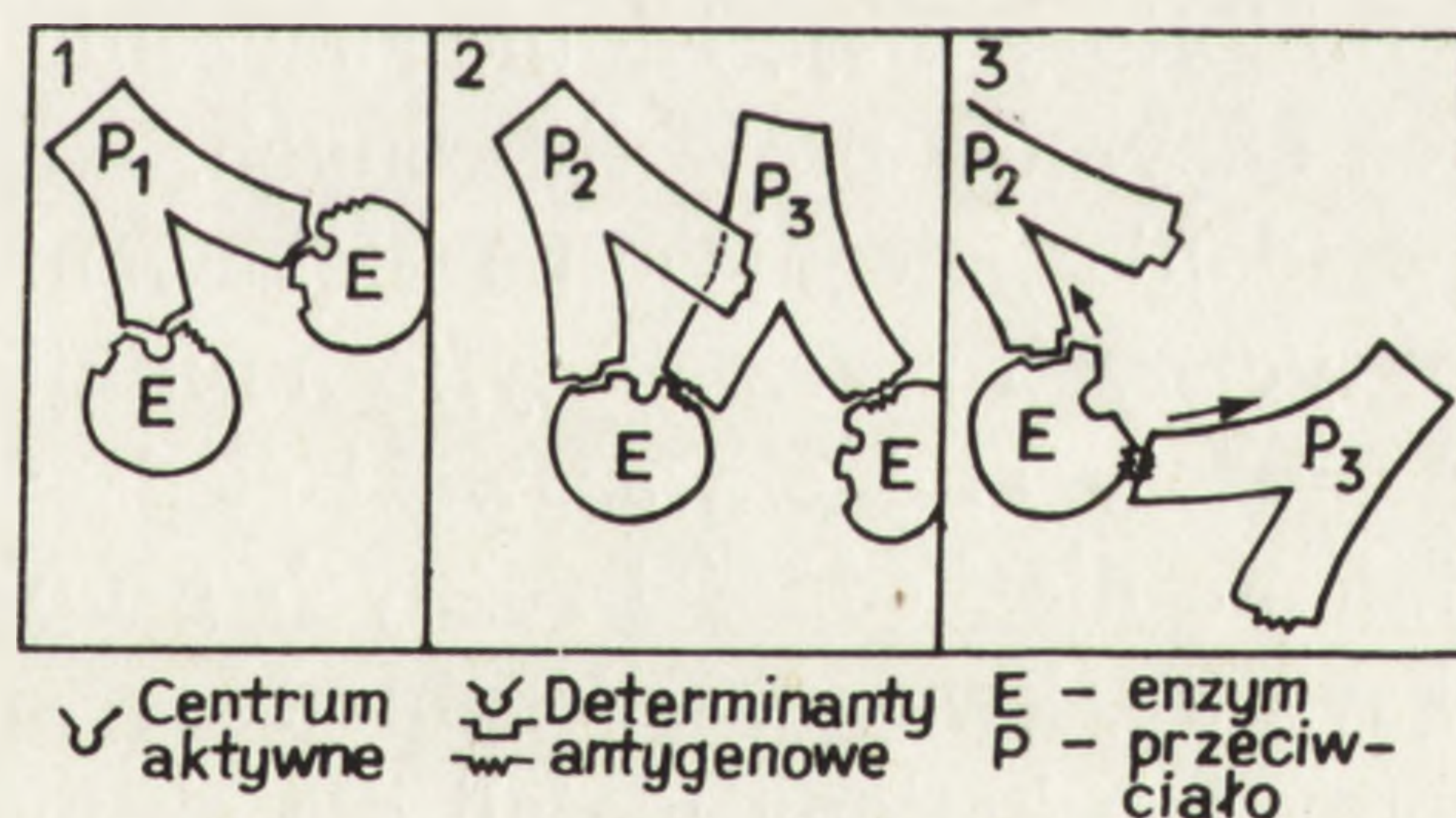


w którym: E = enzym; M = α_2 -makroglobulina; M^x = M zmodyfikowana w wyniku ograniczonej proteolizy; P = odszczepiony polipeptyd; M^{xx} = M^x po zmianach konformacyjnych.

Specjalną grupę inhibitorów zwierzęcych stanowią antyenzymy. Podobnie jak dla białek antygenowych, dla wielu enzymów otrzymuje się specyficzne surowice odpornościowe od zwierząt po ich immunizacji obcymi gatunkowo enzymami. Ich działanie polega na interakcji między enzymem (antygenem) a antyenzymem (przeciwciałem). W zależności od tego czy centrum katalityczne i grupy antygenowe są zlokalizowane w tych samych, czy też różnych miejscach cząsteczki enzymu, utworzony kompleks enzym - przeciwciało nie wykazuje w ogóle aktywności, wykazuje aktywność zmniejszoną lub też wykazuje aktywność pełną. Według Uriela [117] w przypadku reakcji enzymu z przeciwciałem zahamowanie aktywności enzymatycznej może zaistnieć w wyniku trzech możliwych ewentualności, które ilustruje rys. 7. Tworzenie kompleksu enzym - prze-

Rys. 7. Trzy możliwe mechanizmy hamowania aktywności enzymatycznej przez przeciwciała (wg [117]).

1 — hamowanie typu kompetycyjnego, 2 — hamowanie wskutek powstania przeszkody sterycznej, 3 — hamowanie w wyniku zmian konformacyjnych centrum aktywnego enzymu



ciwciało może inaktywować enzym na skutek inhibicji typu kompetycyjnego, przez wytworzenie przeszkody sterycznej lub przez zmiany konformacyjne centrum aktywnego. Przypadek pierwszy ma miejsce wtedy, gdy ugrupowanie centrum katalitycznego ma właściwości antygenowe, wówczas specyficzne przeciwciała współzawodniczą z substratem o centrum aktywne enzymu. Dwie dalsze możliwości hamowania aktywności enzymów przez przeciwciała dotyczą sytuacji gdy przeciwciało łączy się z enzymem poza jego centrum aktywnym. W tym przypadku hamowanie aktywności enzymu może być wynikiem zaistnienia przeszkody przestrzennej nie pozwalającej na łączenie się enzymu z substratem lub zmian kon-

formacyjnych centrum aktywnego. Obok tych trzech ewentualności, może zaistnieć również czwarta, polegająca na tworzeniu kompleksu enzymu z przeciwciałem z zachowaniem aktywności enzymu, ponieważ nie mają miejsca trzy wymienione sytuacje. W przypadku przeciwciał skierowanych przeciwko katepsynie D dochodzi do inaktywacji tego enzymu [104, 121]. Natomiast katepsyna C zachowuje pełną aktywność po precypitacji z surowicą odpornościową [91]. Przeciwciała antykatepsynowe są z punktu widzenia specyficzności najcenniejszymi inhibitorami. Ich specyficzność jest specyficznością absolutną, dotyczącą nie tylko określonego enzymu, ale także jego gatunkowego pochodzenia. Przeciwciała skierowane przeciw katepsynie D wątroby dają reakcję precypitacji z tym enzymem izolowanym z innych narządów tego samego gatunku [104]. Nie reagują jednak z katepsyną D innych gatunków. Pewne ograniczenia w stosowaniu przeciwciał antykatepsynowych stanowi zależność tworzenia się kompleksów enzym - przeciwciało od pH. Tworzenie takiego kompleksu ze specyficznym przeciwciałem zachodzi najsprawniej w pH 5-6. W niższych pH kompleks enzym - przeciwciało powstaje opornie, a w pH 3 nie powstaje w ogóle i enzym wykazuje pełną aktywność [104].

ZASTOSOWANIA PRAKTYCZNE INHIBITORÓW KOMÓRKOWYCH ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

Inhibitory mają istotne znaczenie w identyfikacji i badaniu grup czynnych enzymów proteolitycznych.

Badania polegające na blokowaniu centrów aktywnych enzymów proteolitycznych przez specyficzne inhibitory działające wybiórczo na określone reszty aminokwasowe i śledzenie aktywności enzymu pozwoliło na ustalenie niezbędności różnych grup funkcyjnych, takich jak grupy karboksylowe, kwasu asparaginowego, sulfhydrylowe cysteiny, hydroksylowe seryny lub kationy metali dla aktywności tych enzymów [13, 14, 53, 75, 99].

Użycie inhibitorów będących syntetycznymi analogiami substratów pozwala wnioskować o wielkości i strukturze centrum katalitycznego i grupach funkcyjnych czynnych bezpośrednio w procesie katalizy oraz umożliwia wyjaśnienie charakteru wiązań chemicznych, jakie tworzą się przy powstawaniu kompleksu enzym - substrat. Tak na przykład za pomocą peptydylo - chlorometylo - ketonów, różniących się liczbą i sekwencją aminokwasów, badano strukturę przestrzenną centrum aktywnego elastazy leukocytów [94, 111]. Użycie dwuizopropylofluorofosforanu pozwoliło na wysunięcie hipotezy o serynowym centrum aktywnym katepsyny A [75]. Ponieważ enzym ten jest także wrażliwy na inne syntetyczne

inhibitory, jednoznaczna interpretacja wyników nastrocza trudności [28, 51]. Wrażliwość katepsyny A na inhibitory serynowych enzymów proteolitycznych izolowanych z ziemniaka przemawia jednak za słuszością tej hipotezy [126]. Porównawcze badania wrażliwości na inhibitory enzymów proteolitycznych o tej samej specyficzności substratowej w identycznych centrach aktywnych, lecz pochodzących z różnych źródeł, pozwala wnosić o podobieństwach i różnicach w strukturze miejsc wiążących substraty. Niektóre proteazy o karboksylowych centrach aktywnych, takie jak katepsyna E i pepsyna, są hamowane przez inhibitor wyizolowany z glisty ludzkiej, podczas gdy inne, do których należy katepsyna D i rennina, nie są wrażliwe na ten inhibitor [57]. Spostrzeżenia te świadczą o podobieństwach w strukturze fragmentów cząsteczek katepsyny E i pepsyny odpowiedzialnych za wiązanie substratu i różnicach analogicznych miejsc w cząsteczce katepsyny D i renniny. O odrębności katepsyny D i E świadczy również niewrażliwość tej ostatniej na przeciwciała skierowane przeciwko katepsynie D [104].

Znakowanie centrum aktywnego enzymu za pomocą inhibitora związanego z nim kowalencyjnie umożliwia, po dokonaniu ograniczonej proteolizy, wyizolowanie fragmentu struktury zawierającego ten znacznik i ustalenie jego składu aminokwasowego i sekwencji aminokwasów. Postępowanie takie zastosowano w badaniach nad strukturą okolicy centrum aktywnego katepsyny D, które stanowi grupa karboksylowa kwasu asparaginowego [55]. Znacznikiem w tym przypadku był ester metylowy dwuazoacetylo - D, L - norleucyny. W badaniach nad analogicznym fragmentem struktury katepsyny B₁ podstawiono grupy sulfhydrylowe centrum aktywnego tego enzymu ¹⁴C - jodoacetamidem [109].

Znakowane radiopierwiastkami inhibitory znalazły także zastosowanie w badaniu lokalizacji enzymów proteolitycznych w obrębie tkanek i komórek. Znakowany trytem dwuizopropylofluorofosforan (³H - DFP) był stosowany do lokalizacji serynowych proteaz w komórkach tucznych [18, 22]. W tym samym celu stosowane były specyficzne przeciwciała znakowane fluoresceiną skierowane przeciwko katepsynie B₁ [107] i katepsynie D [26, 93].

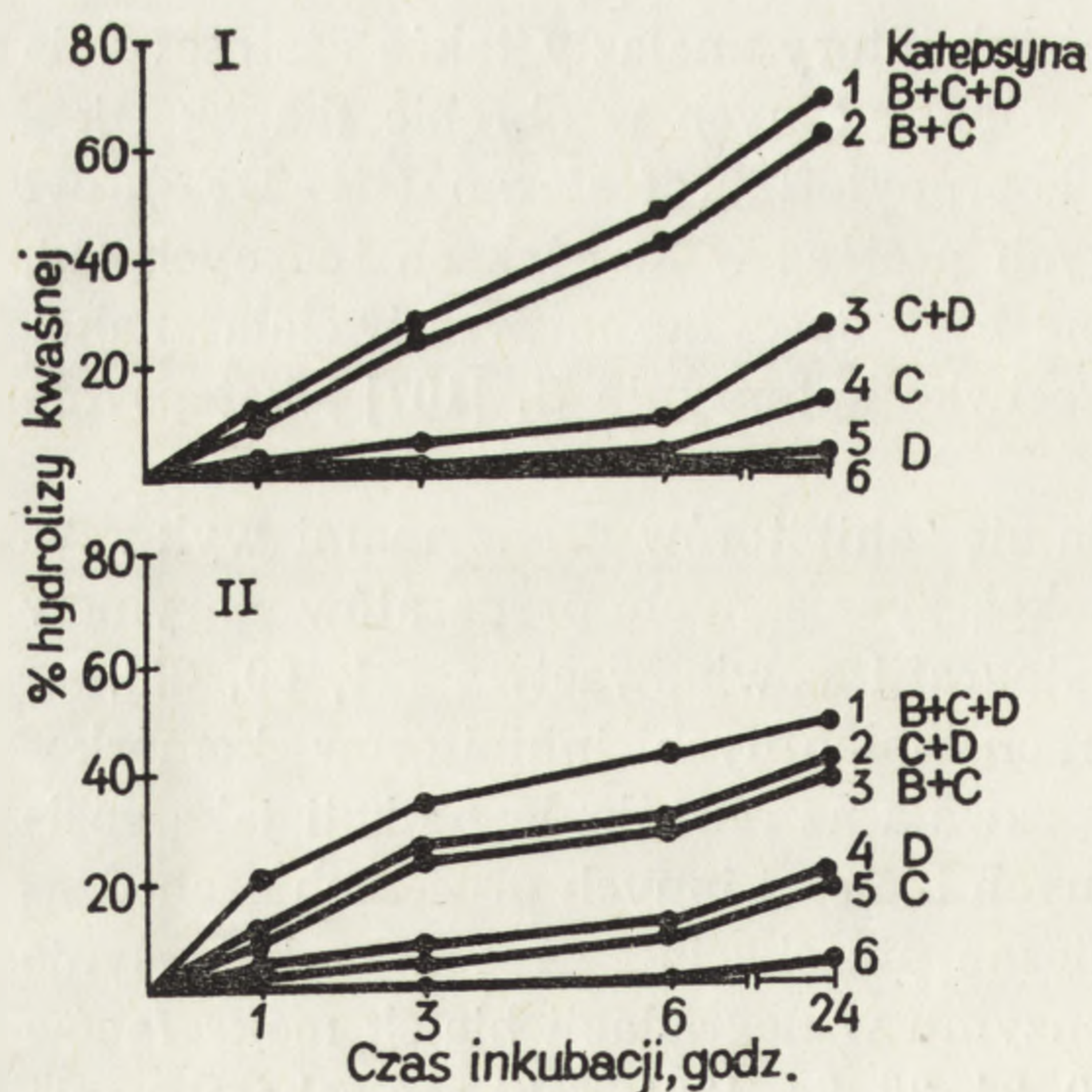
Wysoka specyficzność wiązania się inhibitorów z enzymami wykorzystywana jest do izolowania wysokooczyszczonych preparatów enzymów proteolitycznych techniką chromatografii powinowactwa [21, 60, 85].

Zastosowanie specyficznych monowalentnych inhibitorów komórkowych enzymów proteolitycznych pozwala na określenie funkcji jaką spełniają te enzymy w degradacji różnych białek i innych procesach zachodzących w komórce. Stosując specyficzne przeciwciała przeciwko katepsynie D wykazano istotny udział tego enzymu w degradacji białek makrofagów [26] i proteoglikanów chrząstki [10, 24, 25, 84, 120]. Fakt zaś zahamowania

proliferaacji komórkowej po podaniu inhibitorów proteaz wydaje się potwierdzać hipotezę o pobudzaniu tego procesu przez proteazy lizosomalne [2, 3, 82].

Znaczenie biologiczne inhibitorów występujących w cytoplazmie i płynach ustrojowych polega na ochronie białek w przypadkach uszkodzenia lizosomów i przedostania się poza ich obręb enzymów proteolitycznych [61]. Zmniejszenie się we krwi poziomu tych inhibitorów powoduje wystąpienie określonych stanów patologicznych. Stwierdzono, że niedobór α_1 -antytrypsyny prowadzi do rozedmy płuc, wskutek uszkodzenia łącznotkankowego zrębu tkanki płucnej przez proteazy leukocytarne i tkankowe [43, 64].

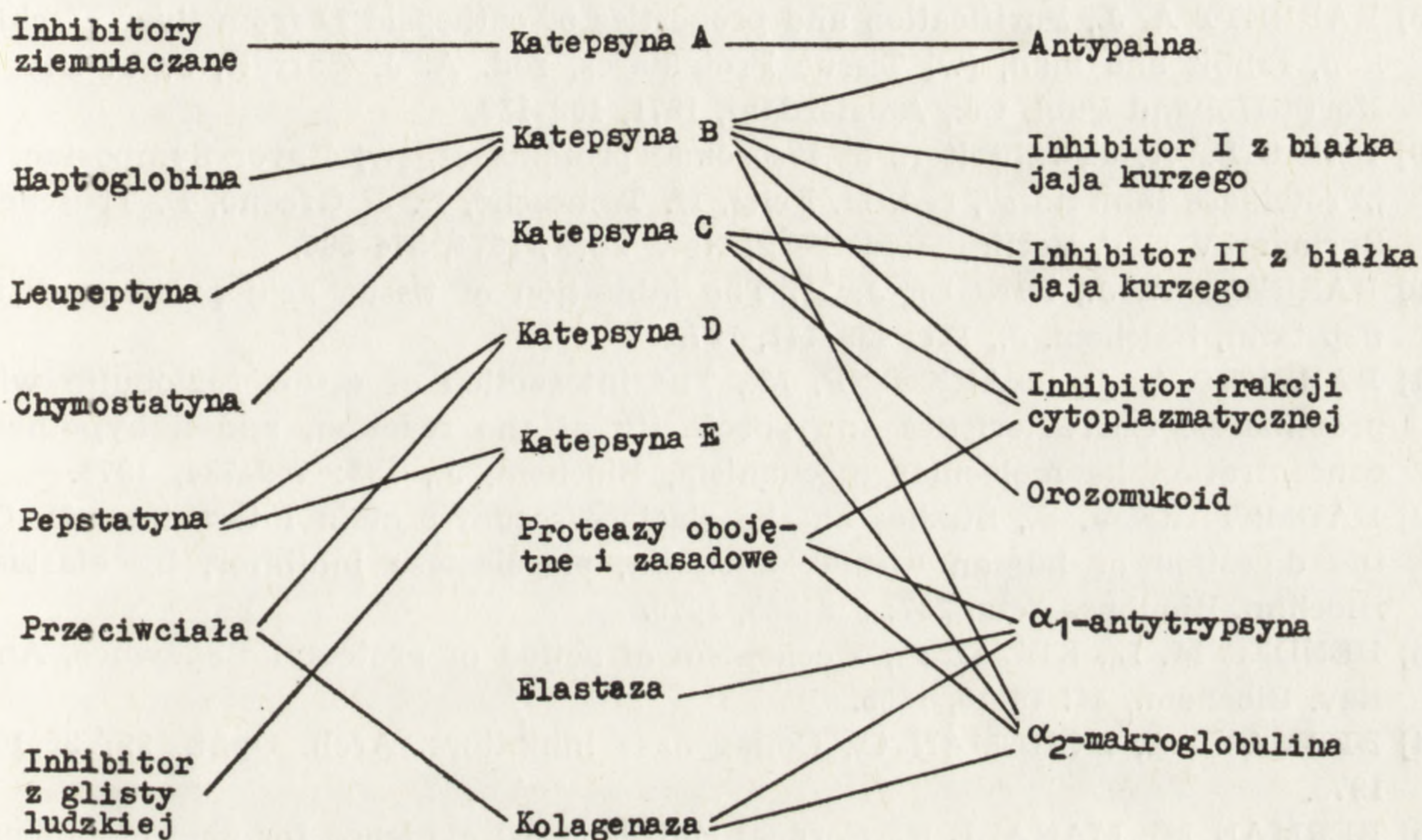
Podjęmowane są próby leczniczego stosowania inhibitorów komórkowych enzymów proteolitycznych. Inhibitory syntetyczne ze względu na dużą toksyczność nie są przydatne do tych celów. Regulowanie proteolizy tkankowej *in vivo* możliwe jest natomiast za pomocą mało toksycznych inhibitorów naturalnych. Niemożliwe jest jednak unieczynnienie aktywności wszystkich proteaz komórkowych przez jeden inhibitor. Całkowite zahamowanie proteolizy tkankowej można osiągnąć dopiero przy użyciu mieszaniny inhibitorów unieczynnających enzymy proteolityczne o różnych centrach aktywnych [39, 48] (rys. 8). Dobór mieszaniny tych inhibitorów ułatwiają dane dotyczące specyficzności działania inhibitorów naturalnych podane na rys. 9. Najwięcej badań poświęcono dotąd zastosowaniu terapeutycznemu pepstatyny. Stosowana była ona w eksperymentalnym nadciśnieniu [69, 81], w fenomenie Shwartzmanna - Sanarelli [72], w doświadczalnym wrzodzie żołądka i stanach zapalnych [114].



Rys. 8. Przebieg degradacji albuminy surowicy krwi (I) i hemoglobiny (II) przez ekstrakt lizosomalny w pH 5,0 (wg [39]). Degradację śledzono przyrostem azotu α -aminowego. Wyniki wyrażono w procencie hydrolizy, przyjmując na 100% całkowitą hydrolizę kwaśną.

Degradacja: 1 — bez inhibitorów, 2 — z pepstatyną, 3 — z leupeptyną lub antypainą, 4 — z pepstatyną i leupeptyną lub antypainą, 5 — z monojodoocetanem, 6 — z monojodoocetanem i pepstatyną.

Wydaje się, że inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych powinny znaleźć zastosowanie przy preparatywnym otrzymywaniu frakcji subkomórkowych oraz białek komórkowych, celem zabezpieczenia ich przed degradacją enzymatyczną.



Rys. 9. Specyficzność naturalnych inhibitorów tkankowych enzymów proteolitycznych.

Występowanie inhibitorów w cytoplazmie i osoczu krwi ma istotne znaczenie przy pomiarach aktywności proteaz komórkowych w tym materiale. Powoduje to, że wyniki oznaczeń zależą nie tylko od aktywności enzymu, ale także od poziomu inhibitora.

LITERATURA

- [1] ABE S., NGAI Y., Interaction between tadpole collagenase and human α_2 -macroglobulin, *Biochim. Biophys. Acta*, **278**: 125-132, 1972.
- [2] ADAMS R.L.P., Periodic activation of lysosomal enzymes during regeneration of the liver, *Biochem. J.*, **87**: 532-536, 1964.
- [3] ALLISON A. C., MALLUCCI L., Lysosomal enzymes in dividing cells, special reference to lymphocytes, *Lancet*, **2**: 1371-1373, 1964.
- [4] AOYAGI T., MIYATA S., NANBO M., KOJIMA F., MATSUZUKI M., ISHIZUKA M., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Biological activities of leupeptins, *J. Antibiot.*, **22**: 558-568, 1969.
- [5] AOYAGI T., MORISHIMA H., NISHIZAWA R., KUNIMOTO S., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Biological activity of pepstatins, pepstatone A and partial peptides on pepsin, cathepsin D and renin, *J. Antibiot.*, **25**: 689-694, 1972.

- [6] AOYAGI T., TAKEUCHI T., MATSUZAKI S., KAWAMURA S., KONDO S., HAMADA M., MAEDA K., UMEZAWA H., Leupeptins new protease inhibitors from actinomycetes, *J. Antibiot.*, **22**: 283-286, 1969.
- [7] ARNESEN H., FAGERHOL M. G., α_2 -macroglobulin, α_1 -antitrypsin and anti-thrombin III in plasma and serum during fibrinolytic therapy with urokinase, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **29**: 251-263, 1972.
- [8] BARRETT A. J., Purification and properties of cathepsin D from liver of chicken, rabbit and man, [w] *Tissue Proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1971, 109-133.
- [9] BARRETT A. J., Inhibitors of lysosomal proteinases, [w] *Bayer-Symposium V „Proteinase inhibitors”*, red. H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974, 574-580.
- [10] BARRETT A. J., DINGLE J. T., The inhibition of tissue acid proteinases by pepstatin, *Biochem. J.*, **127**: 439-441, 1972.
- [11] BARRETT A. J., STARKEY P. M., The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concentration its molecular mechanism, *Biochem. J.*, **133**: 709-724, 1973.
- [12] BAUMSTARK J. S., Studies on the elastase-serum protein interaction. II. On the digestion of human α_2 -macroglobulin, an elastase inhibitor, by elastase, *Biochim. Biophys. Acta*, **207**: 318-325, 1970.
- [13] BENDER M. L., KÉZDY F., Mechanism of action of proteolytic enzymes, *Ann. Rev. Biochem.*, **34**: 49-76, 1965.
- [14] BERMAN M., DOHLMAN C., Collagenase inhibitors, *Arch. Opht.*, **35**: 95-108, 1975.
- [15] BERMAN M., MANABE R., Corneal collagenases: evidence for zinc metalloenzymes, *Ann. Opthal.*, **6**: 1193-1198, 1973.
- [16] BERNHARD S. A., The correlation of the Michaelis constants with the inhibition constants, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 1973-1974, 1955.
- [17] BIETH J., Some kinetic consequence of the tight binding of protein-proteinase-inhibitors to proteolytic enzymes and their application to the determination of dissociation constants, [w] *Bayer-Symposium V „Proteinase inhibitors”*, red. H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974, 31-39.
- [18] BUDD G., DARŻYNKIEWICZ Z., BARNARD E. A., Intracellular localization of specific proteases in rat mast cells, *Nature*, **213**: 1202-1203, 1967.
- [19] BUNDY H. F., MEHL J. W., Trypsin inhibitors of human serum. II. Isolation of the α_1 -inhibitor and its partial characterisation, *J. Biol. Chem.*, **234**: 1124-1128, 1959.
- [20] CHONG M. T., GARRARD, W. T., BONNER J., Purification and properties of a neutral protease from rat liver chromatin, *Boichemistry*, **13**: 5128-5134, 1974.
- [21] CORVOL P., DEVAUX C., MENARD J., Pepstatin an inhibitor for renin purification by affinity chromatography, *FEBS Letters*, **34**: 189-192, 1973.
- [22] DARŻYNKIEWICZ Z., BARNARD E. A., Specific proteases of the rat mast cell, *Nature*, **213**: 1198-1199, 1967.
- [23] DAVIES P., RITA G. A., KRAKANER K., WEISSMANN G., Characterization of a neutral protease from lysosomes of rabbit polymorphonuclear leucocytes, *Biochem. J.*, **123**: 559-569, 1971.
- [24] DINGLE J. T., BARRETT A. J., POOLE A. R., Inhibition by pepstatin of human cartilage degradation, *Biochem. J.*, **127**: 443-444, 1972.
- [25] DINGLE J. T., BARRETT A. J., WESTON P. D., Cathepsin D. Characteristics

- of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown, *Biochem. J.*, **123**: 1-13, 1971.
- [26] DINGLE J. T., POOLE A. R., LAZARUS G. S., BARRETT A. J., Immunoinhibition of intracellular protein digestion in macrophages, *J. Exptl. Med.*, **137**: 1124-1141, 1973.
- [27] DIXON M., The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.*, **55**: 170-171, 1953.
- [28] DOI E., Stabilization of pig kidney cathepsin A by sucrose and chloride ion and inhibition of the enzyme activity by diisopropyl fluorophosphate and sulfhydryl reagent, *J. Biochem.*, **75**: 881-887, 1974.
- [29] DOLOVICH J., WICHER V., The binding of *Bacillus subtilis* alkaline proteinases to α_2 -macroglobulin, *J. Lab. Clin. Med.*, **77**: 951-957, 1971.
- [30] DUBIN A., CHUDZIK J., KOJ A., Obojętna proteaza granulocytów krwi końskiej, *Przegl. Lek.*, **31**: 440-448, 1974.
- [31] DUNN J. T., SPIRO R. G., The α_2 -macroglobulin of human plasma, *J. Biol. Chem.*, **242**: 5549-5555, 1967.
- [32] ELKINS-KAUFMANN E., NEURATH H., Structural requirements for specific inhibitors of carboxypeptidase, *J. Biol. Chem.*, **178**: 645-654, 1949.
- [33] FINKENSTAEDT J. T., Intracellular distribution of proteolytic enzymes in rat liver tissue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**: 302-304, 1957.
- [34] GANROT P. O., Inhibition of plasmin activity by α_2 -macroglobulin, *Clin. Chim. Acta*, **16**: 328-329, 1967.
- [35] HAVERBACK B. J., DYCE B., BUNDY H. F., WIRTCHAFTER S. K., EDMONDSON H. A., Protein binding of pancreatic proteolytic enzymes, *J. Clin. Invest.*, **41**: 972-980, 1962.
- [36] HEIMBURGER N., HAUPT H., Zur spezifität der antiproteinasen des humanplasmas für elastase, *Klin. Wschr.*, **44**: 1196-1199, 1966.
- [37] HOFSTEE B. H. J., Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics, *Nature*, **184**: 1296-1298, 1959.
- [38] HUANG CH. CH., ABRAMSON M., Purification and characterization of collagenase from guinea pig skin, *Biochim. Biophys. Acta*, **384**: 484-492, 1975.
- [39] HUISMAN W., LINEKE LANTING, DODDEMA H. J., BOUMA J. M. W., GRUBER M., Role of individual cathepsins in lysosomal protein digestion as tested by specific inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta*, **370**: 297-307, 1974.
- [40] IKEZAWA H., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Effect of protease inhibitors of actinomycetes on lysosomal peptide — hydrolases from swine liver, *J. Antibiot.*, **24**: 488-490, 1971.
- [41] IKEZAWA H., YAMADA K., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Effect of antipain on lysosomal peptide — hydrolases from swine liver, *J. Antibiot.*, **25**: 738-140, 1972.
- [42] JAMES K., TAYLOR F. S., FUDENBERG H. H., The effect of α_2 -macroglobulin in human serum on trypsin, plasmin and thrombin activities, *Biochim. Biophys. Acta*, **133**: 374-379, 1967.
- [43] JANOFF A., Human granulocyte elastase, *Am. J. Pathol.*, **68**: 579-592, 1972.
- [44] JANOFF A., Inhibition of human granulocyte elastase by serum α_1 -antitrypsin., *Am. Rev. Resp. Dis.*, **105**: 121-126, 1972.
- [45] JANOFF A., BASCH R. S., Further studies on elastase — like esterases in human leucocyte granules, *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, **136**: 1045-1049, 1971.
- [46] JANOFF A., BLONDIN J., Inhibition of the elastase-like esterase in human

- leucocyte granules by human leucocyte cell, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **136**: 1050–1054, 1971.
- [47] JUST M., In vivo interaction of the Kunitz protease inhibitor and of insulin with subcellular structures from rat renal cortex, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **287**: 85–95, 1975.
- [48] KATO T., KOJIMA K., MURACHI T., Proteases of macrophages in rat peritoneal exudate, with special reference to the effects of actinomycete protease inhibitors, Biochim. Biophys. Acta, **289**: 187–193, 1972.
- [49] KATZ J., TROLL W., RUSSO J., FILKINS K., LEVITZ M., Effect of protease inhibitors on in vitro breakdown of uterine histones from hormone-treated rats, Endocrin. Res. Commun., **1**: 331–337, 1974.
- [50] KAWAMURA K., KONDO S., MAEDA K., UMEZAWA H., Structure and synthesis of leupeptins Pr-LL and Ac-LL, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **17**: 1902–1909, 1969.
- [51] KAWAMURA Y., MATOBA HATA T., DOI E., Purification and some properties of cathepsin A of large molecular size from pig kidney, J. Biochem., **76**: 915–924, 1974.
- [52] KAYE C., DABICH D., An inhibitor of trypsin-like activity in rat liver, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **131**: 1366–1368, 1969.
- [53] KEILOVÁ H., Inhibition of cathepsin D by diazoacetylnorleucine methyl ester, FEBS Letters, **6**: 312–314, 1970.
- [54] — On the specificity and inhibition of cathepsin D and B, [w] Tissue proteinases, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, 1971, 45–67.
- [55] — Proceeding of the Symposium "Intracellular Protein Catabolism" at Friedrichroda, 1973, cyt. wg [9].
- [56] KEILOVÁ H., LAPRESLE C., Inhibition of cathepsin E by diazoacetyl — norleucine methyl ester, FEBS Letters, **9**: 348–350, 1970.
- [57] KEILOVÁ H., TOMÁŠEK V., Effect of pepsin inhibitor from *Ascaris lumbricoides* on cathepsin D and E, Biochim. Biophys. Acta, **284**: 461–464, 1972.
- [58] — Effect of papain inhibitor from chicken egg white on cathepsin B₁, Biochim. Biophys. Acta, **334**: 179–186, 1974.
- [59] — Inhibition of cathepsin C by papain inhibitor from chicken egg white and by complex of this inhibitor with cathepsin B₁, Coll. Czechoslov. Chem. Commun., **40**: 218–224, 1975.
- [60] KEILOVÁ H., SALVETOVÁ A., KOSTKA V., Affinity chromatography of chicken pepsin using pepsin inhibitor from *Ascaris lumbricoides*, Collection Czechoslov. Chem. Commun., **40**: 580–584, 1975.
- [61] KOJ A., Naturalne inhibitory enzymów lizosomalnych, Ann. Acad. Med. Lodz., **14**: 241–249, 1973.
- [62] KOJ A., CHUDZIK J., PAJDAK W., DUBIN A., The occurrence of trypsin and of leucocyte neutral proteinase in human serum, Biochim. Biophys. Acta, **268**: 199–206, 1972.
- [63] KONDO S., KAWAMURA K., IWANAGA J., HAMADA J., HAMADA M., AOYAGIA T., TMEDA T., TAKEUCHI T., UMEZWA H., Isolation and characterization of leupeptins produced by actinomycetes, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **17**: 1896–1901, 1969.
- [64] KUEPPERS F., BEARN A., A possible experimental approach to the association of hereditary α_1 -antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **121**: 1207–1210, 1966.

- [65] KUNIMOTO S., AOYAGI T., NISHIZAWA R., KOMAI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Mechanizm of inhibition of pepsin by pepstatin, *J. Antibiot.*, **27**: 413-418, 1974.
- [66] KURECKI T., KOWALSKA-LOTH B., TOCZKO K., CHMIELEWSKA J., Evidence that neutral protease from calf thymus chromatin is a serine type enzyme, *FEBS Letters*, **53**: 313-315, 1975.
- [67] LANCHANTIN G. F., PLESSET M. L., FRIEDMAN J. A., HART D. W., Dissociation of esterolytic and clotting activities of thrombin by trypsin-binding macroglobulin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **212**: 444-449, 1966.
- [68] LAURELL C. B., ERIKSSON S., The serum α_1 -antitrypsin in families with hypo- α_1 -antitrypsinemia, *Clin. Chim. Acta*, **11**: 395-398, 1965.
- [69] LAZAR J., ORTH H., MÖHRING J., GROSS F., Effects of the renin inhibitor pepstatin on the blood pressure of intact and nephrectomized rats, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **275**: 114-118, 1972.
- [70] LAZARUS G. S., Studies on the degradation of collagen by collagenase, [w] *Lysosomes in Biology and Pathology*, red. J. T. Dingle, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, T. 3, 1973, 338-364.
- [71] LAZARUS G. S., BROWN R. S., DANIELS J. R., FULLMER H. M., Human granulocyte collagenase, *Science*, **159**: 1483-1484, 1969.
- [72] LIN T. Y., WILLIAMS H. R., Inhibition of the local hemorrhagic Shwartzman reaction by an acid proteinase inhibitor, pepstatin, *Experientia*, **31**: 209-212, 1975.
- [73] LINEWEAER H., BURK D., The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**: 658-666, 1934.
- [74] LISOWSKI J., RAJKMURT V., WOLF D. P., STEINE A., Evidence for tightly-bound zinc in leucine aminopeptidase from pig kidney, *Acta Biochim. Pol.*, **17**: 311-324, 1970.
- [75] LOGUNOV A. J., OREKHOVICH V. N., Isolation and some properties of cathepsin A from bovine spleen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 1161-1168, 1972.
- [76] LUNDBLAD R. L., STEIN W. H., On the reaction of diazoacetyl compounds with pepsin, *J. Biol. Chem.*, **244**: 155-160, 1969.
- [77] MAEDA K., KAWAMURA K., KONDO S., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., The structure and activity of leupeptins and related analogs, *J. Antibiot.*, **24**: 402-404, 1971.
- [78] MARKS N., D'MONTE B., LAJTHA A., Inhibition of cerebral proteolytic enzymes, *Texas Rep. Biol. Med.*, **31**: 345-365, 1973.
- [79] MARKS N., GRYNBAUM A., LAJTHA A., Pentapeptide (pepstatin) inhibition of brain acid proteinase, *Science*, **181**: 949-951, 1973.
- [80] McDONALD J. K., CALLAHAN P. X., ELLIS S., SMITH R., Polypeptide degradation by dipeptidyl aminopeptidase I (Cathepsin C) and other related enzymes, [w] *Tissue proteinases*, red. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland, Publishing Co., Amsterdam, London, 69-107, 1971.
- [81] MILLER R. P., POPER C. J., WILSON C. W., DeVITO E., Renin inhibition by pepstatin, *Biochem. Pharmacol.*, **21**: 2941-2944, 1972.
- [82] MIYAMOTO M., TERAYAMA H., OHNISHI T., Effects of protease inhibitors on liver regeneration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**: 84-90, 1973.
- [83] MORISHIMA H., TAKITA T., AOYAGI T., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., The structure of pepstatin, *J. Antibiot.*, **23**: 263-265, 1970.
- [84] MORRISON R. J. G., BARRETT A. J., DINGLE J. T., PRIOR D., Cathepsin B₁

- and D. Action on human cartilage proteoglycans, *Biochim. Biophys. Acta*, **302**: 411–419, 1973.
- [85] MURAKAMI K., INAGAMI T., MICHELAKIS A. M., COHEN S., An affinity column for renin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**: 482–487, 1973.
- [86] NAUGHTON M. A., SANGER F., HARTLEY B. S., SHAW D. C., The amino acid sequence around the reactive serine residue of some proteolytic enzymes, *Biochem. J.*, **77**: 149–163, 1960.
- [87] NILÉHN J. E., GANROT P. O., Plasmin, plasmin inhibitors and degradation products of fibrinogen in human serum during and after intravenous infusion of streptokinase, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **20**: 113–121, 1967.
- [88] OHLSSON K., Neutral leukocyte proteases and elastase inhibited by plasma α_1 -antitrypsin, *Scand. J. Lab. Clin. Invest.*, **28**: 225–228, 1971.
- [89] OHLSSON K., OLSSON J., The neutral proteases of human granulocytes: isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases, *Eur. J. Biochem.*, **36**: 473–481, 1973.
- [90] — The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases, *Eur. J. Biochem.*, **42**: 519–527, 1974.
- [91] PAJDAK W., KOJ A., PTAK W., Differential effect of antibodies to rat liver tritosome proteins on the activity of some lysosomal hydrolases in vitro, *Folia Biologica*, **23**: 21–31, 1975.
- [92] PLATT D., Tierexperimentelle untersuchungen zur frage der beeinflussbarkeit lysosomaler enzyme durch trasytol, *Arzneim. Forsch.*, **22**: 1486–1487, 1972.
- [93] POOLE A. R., DINGLE J. T., BARRETT A. J., The immunocytochemical demonstration of cathepsin D, *J. Histochem. Cytochem.*, **20**: 261–265, 1972.
- [94] POWERS J. C., TUHY P. M., Active-site specific inhibitors of elastase, *Biochemistry*, **12**: 4767–4774, 1973.
- [95] RAKITZIS E. T., Kinetics of irreversible enzyme inhibition by an unstable inhibitor, *Biochem. J.*, **141**: 601–603, 1974.
- [96] SANDHAUS R. A., JANOFF A., Degradation of human α_1 -antitrypsin by hepatocyte acid cathepsins. Possible role in clinical α_1 -antitrypsin deficiency, *Am. Rev. Resp. Dis.*, **110**: 263–272, 1974.
- [97] SCHWERT G. W., EISENBERG M. A., The kinetics of the amidase and esterase activities of trypsin, *J. Biol. Chem.*, **179**: 665–672, 1949.
- [98] SMITH G. D., MURRAY M. A., NICHOL L. W., TRIKOJUS V. M., Properties and inactivation by diazoacetyl-norbucine methyl ester, *Biochim. Biophys. Acta*, **171**: 288–298, 1969.
- [99] SNELLMAN O., A study on the reactivity of the thiol group of cathepsin B, [w] *Tissue Proteinases*, ed. A. J. Barrett, J. T. Dingle, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1971, 29–43.
- [100] SNELLMAN O., SYLVEN B., A carbohydrate inhibitor of cathepsin B activity associated with haptoglobin, *Experientia*, **30**: 1114–1115, 1974.
- [101] — Haptoglobin acting as a neutral inhibitor of cathepsin B activity, *Nature*, **216**: 1033, 1967.
- [102] STARKEY P. M., Binding and inhibition of cathepsin B₁ by α_2 -macroglobulin, *Biochem. Soc. Transactions*, **1**: 381–382, 1973.
- [103] STARKEY P. M., BARRETT A. J., Human cathepsin B₁. Inhibition by α_2 -macroglobulin and other serum proteins, *Biochem. J.*, **131**: 823–831, 1973.
- [104] ŠTEFANOVIČ J., FERENČIK M., BELÁŇ J., Inhibícia kralacieho katepsinu D pepstatinom a antikatepsinovym serom, *Bratisl. lek. Listy*, **62**: 513–530, 1974.

- [105] STEPANOW V. M., OREKHOVICH V. N., Deistwie inhibitora pepsina na Katepsin D byczei selezenku, *Biochimija*, **34**: 209–210, 1969.
- [106] SUDA H., AOYAGI T., HAMADA M., TAKEUCHI T., UMEZAWA H., Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes, *J. Antibiot.*, **25**: 263–266, 1972.
- [107] SYLVEN B., SNELLMAN O., The immunofluorescent demonstration of cathepsin B₁ in tissue sections, *Histochemistry*, **38**: 35–41, 1974.
- [108] TAKAHASHI K., CHANG W. J., KO J. S., Specific inhibition of acid proteases from brain, kidney, skelet muscle, and insectivorus plants by diazoacetyl-D, L-norleucine methyl ester and by pepstatin, *J. Biochem.*, **76**: 897–899, 1974.
- [109] TOMAŠEK V., KEILOVÁ H., Katalytické misto katepsinu B₁, *Celostátní biochemické dny*, Praha, 1971, III–2.
- [110] TRAWIS J., JOHNSON D., PANNEL R., Properties of human α_1 -antitrypsin, [w] Bayer-Symposium V „Proteinase Inhibitors”, red. Fritz, H. TSCHESCHE, L. J. Greene, E. Truscheit, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974, 31–39.
- [111] TUHY P. M., POWERS J. C., Inhibition of human leukocyte elastase by peptide chlormethyl ketons, *FEBS Letters*, **50**: 359–361, 1975.
- [112] UMEZAWA H., *Enzyme Inhibitors of Microbiol Origin*, University Park Press, Baltimore, London, Tokyo, 1972, 15–52.
- [113] UMEZAWA H., AOYAGI T., MORISHIMA H., KUNIMITO S., HATSUZAKI M., HAMADA M., TAKEUCHI T., Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by actinomycetes, *J. Antibiot.*, **23**: 425–425, 1970.
- [114] UMEZAWA H., AOYAGI T., MORISHIMA H., MATSUZAKI M., HAMADA H., TAKEUCHI J., Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes, *J. Antibiot.*, **23**: 259–262, 1970.
- [115] UMEZAWA S., TATSUTA K., FUJIMOTO K., TSUCHIYA T., UMEZAWA H., NAGANAWA H., Structure of antipain a new Sakaguchi-positive product of *Streptomyces*, *J. Antibiot.*, **25**: 267–270, 1972.
- [116] UNANA C. R., Protein degradation at neutral pH. Possible enzymie and control mechanism, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**: 31–38, 1971.
- [117] URIEL J., Enzymes et anticorps anti-enzymes, [w] *Immunologie*, red. P. Bordet, Flammarion Medicine Sciences, Paris. 1972, 361–378.
- [118] VERBRUGGEN R., Quantitative immunoelectrophoretic methods: a literature survey, *Clin. Chem.*, **21**: 5–43, 1975.
- [119] WERB Z., Inhibition of specific collagenase by α_2 -macroglobulin, *Bioch. Soc. Trans.*, **1**: 382–383, 1973.
- [120] WESTON P. D., BARRETT A. J., DINGLE J. T., Specific inhibition of cartilage breakdown, *Nature*, **222**: 285–286, 1969.
- [121] WESTON P. D., A specific antiserum to lysosomal cathepsin D. *Immunology*, **17**: 421–428, 1969.
- [122] WICHER W., DOLOVICH J., Interactions of *Bacillus subtilis* alkaline proteinases with α_2 -macroglobulin and α_1 -antitrypsin, *Int. Arch. Allergy*, **40**: 779–788, 1971.
- [123] WINGENDER W., Proteinase inhibitors of microbial origin a review, [w] Bayer-Symposium V „Proteinase inhibitors”, red. H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene, E. Truscheit, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974, 548–559.
- [124] WOESSNER J. F. jr., Pepstatin inhibits the digestion of hemoglobin and pro-

- tein-polysaccharide complex by cathepsin D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**: 965-970, 1972.
- [125] WOROWSKI, K., An antiproteolytic and antifibrinolytic preparation obtained from the potato by means of chromatography on SE-Sephadex C-50, *Thrombos. Diathes. Haemorrhag.*, **32**: 617-632, 1974.
- [126] — Izolowanie, właściwości fizykochemiczne i biologiczne inhibitorów enzymów proteolitycznych z ziemniaka, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **8**: 199-200, 1975.
- [127] WOROWSKI K., BARTOSZYŃSKI P., Hamowane aktywności proteaz tkankowych przez inhibitor ziemniaczany, *Bromat. Chem. Toksykol.*, **8**, 1975.
- [128] WOROWSKI K., MARIAK R. T., Aktywność antyproteolityczna i hemoaglutynacyjna roślin z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), *Acta Polon. Pharm.*, **30**: 453-457, 1973.

Otrzymano: 17 października 1975 r.

Przyjęto: 20 października 1975.

Adres autora: ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok.

RECENZJA

G. GOLDSPINK, editor. *Differentiation and growth of cells in vertebrate tissues.*

Str. XII + 323 oraz 78 tablic na wkładkach, w tym jedna kolorowa. London, Chapman and Hall 1974. Funtów ang. 10,30.

Z przedmowy redaktora wynika, że pierwotnym zamiarem było zawarcie w jednym tomie przeglądu biologii rozwoju komórek kręgowców. Pod nazwą *biologia rozwoju* (*developmental biology*) rozumiano teren styku biologii molekularnej z embriologią. Plan nie został zrealizowany przede wszystkim ze względu na rozmiary dzieła. Obecna książka obejmuje tylko wybór zagadnień.

Komitet redakcyjny postanowił zestawić wiadomości o tym w jaki sposób i pod wpływem jakich czynników komórki kręgowców różnicują się morfologicznie i czynnościowo w ontogenezie. Jakże wiele pomysłowych i skomplikowanych doświadczeń przeprowadzono badając te zagadnienia — recenzowana książka dowodzi jak w istocie mało o nich wiemy.

Pierwszy rozdział, liczący 50 stron, napisany przez J. E. Browna i K. W. Jonesa jest bardzo dobrze ujętym streszczeniem podstawowych faktów embriologii doświadczalnej. Interesujące są przykłady indukcji biochemicznych. Tak np. przerwanie pępowiny noworodka ssaka wywołuje hipoglikemię. Hipoglikemia stymuluje sekrecję glukagonu, glukagon zaś wywołuje aktywację enzymów odpowiedzialnych za uruchamianie glukozy. W łańcuchu tym znane są terminy pojawiania się i znikania kompetencji poszczególnych reakcji. Autorzy uwzględniają zagadnienie rozmiarów komórek, przy omawianiu poliploidalności. Dla cytologów szczególnie interesujące mogą być opisy doświadczeń wyświetlających wzajemne związki jądra i cytoplazmy.

W rozdziale drugim M. Jacobson omawia różnicowanie i wzrost komórek nerwowych. Najważniejsze z zamieszczonych tu faktów są dość dawno znane. Istotnym wnioskiem wynikającym z przestudiowania tego rozdziału jest zdanie sobie sprawy z tego, że właściwie prawie nic nie wiadomo o przyczynach wywołujących niezwykłą różnorodność komórek i ich połączeń w układzie nerwowym.

Zawartość kolejnego rozdziału poświęconego mięśniom prążkowanym pióra G. Goldspinka — redaktora całości — odpowiada najlepiej tytułowi

tomu. Jest to zapewne zasługą autora, ale także wynika ze stanu badań rozwoju i różnicowania tkanki mięśniowej. Autorzy pozostałych rozdziałów mieli znacznie trudniejsze zadanie.

W rozdziale czwartym J. J. Pritchard omawia losy komórek kości, chrząstki i tkanek łącznych. W piątym F. J. Ebling opisuje losy komórek okrycia ciała, przy czym najwięcej miejsca poświęca różnicowaniu się tworów rogowych u ptaków i ssaków. Rozwój komórek gonad zawarty jest w rozdziale szóstym (autor B. Gondos), w siódmym omówiono rozwój krwinek (P. F. Harris), w ósmym M. J. Manning i J. D. Horton opisują histogenezę układu chłonnego. Materiał tych czterech rozdziałów zawiera przewagę morfologii opisowej, natomiast mało miejsca poświęca eksperymentom i cytologii.

W ostatnim rozdziale D. Bellamy daje krótki i jasny przegląd współczesnych teorii starzenia się komórek. Z przeglądu tego wynika, że wszystkim teoriom daleko jeszcze do doskonałości. Książka jest bogato ilustrowana mikrofotografiami i elektronogramami. Główną korzyścią odniesioną przez czytelnika jest zapewne uzmysłowienie sobie, jak bardzo fragmentaryczna i niepełna jest wiedza o różnicowaniu komórek i jakie kierunki badań wydają się dziś najbardziej obiecujące.

Henryk Szarski

Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Prenumeratę przyjmują Oddziały RSW „Prasa - Książka - Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze i cały rok następny,

— do dnia 10 każdego miesiąca (z wyjątkiem grudnia) poprzedzającego okres prenumeraty.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne oraz wszelkiego rodzaju inne zakłady pracy, składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa - Książka - Ruch”.

Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW oraz prenumeratorzy indywidualni, zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych RSW „Prasa-Książka-Ruch”, ul. Wronia 23, 00-958 Warszawa.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona - Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, POLAND.

Please send payments to the account of Ars Polona - Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, POLAND.

SPIS TREŚCI

B. GRZELAKOWSKA - SZTABERT, Efekty biologiczne niedoboru aminokwasowego w hodowanych <i>in vitro</i> komórkach ssaków	1
H. MICHNIEWICZ, Najnowsze hipotezy dotyczące interakcji DNA i histony	23
Z. KILIAŃSKA i L. KŁYSZEJKO - STEFANOWICZ, Specyficzność białek niehistonowych	31
K. WOROWSKI, Inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych	51
Recenzja	75