

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

**1971**  
**tom 17**  
**nr 2**

**KWARTALNIK**

<http://rcin.org.pl>

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

*Postępy Biochemii* publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postęпах Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach. Artykuły są honorowane wg ustalonych stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek pracy; żądanie dalszych odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie nadsyłając pracę. Autora obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor.

Redakcja zastrzega sobie możliwość wprowadzenia skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy.

*Forma maszynopisu.* Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

Rozdziały w tekście należy oznaczyć numeracją rzymską, a podrozdziały — arabską. Tytuły nie wydzielone z tekstu nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków, schematów i wzorów. W żądanym miejscu należy pozostawić wolny wiersz i oznaczyć: Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1 lub liczbą rzymską w nawiasie — numer odpowiedniego wzoru. W tekście należy odwołać się do numeracji wzoru po słownym wymienieniu związku, np.: kwas glutaminowy (I).

Powołując się na literaturę należy podać w tekście, w nawiasie, kolejny numer pozycji w spisie literatury.

*Załączniki do tekstu.* Każdy załącznik należy dołączyć na oddzielnej kartce, opatrzonej kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście, np. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej rubryki powinny być zaopatrzone w odpowiedni tytuł.

Podpisy i objaśnienia pod rysunkami i schematami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem. W fotografiach i wykresach należy oznaczyć „górze” i „dół”.

*Literatura.* Wykaz literatury należy wypisać oddzielnie, na ostatnich stronach maszynopisu, w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

*Wolny*

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 1  
tom XVII  
zeszyt 2

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

*Członkowie: J. Chmiel (Poznań), B. Filipowicz (Łódź),  
W. Gajewski (Warszawa), Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejb-  
baum-Katzenellenbogen (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poz-  
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),  
K. L. Wierzchowski (Warszawa)*

Komitet Redakcyjny  
Redaktor — Zofia Lassota  
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki  
Warszawa 12 ul. Rakowiecka 36  
tel. 44-52-01, wewn. 506

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1971

Nakład 2120 (1992+128)	Oddano do składania 13.II.1971 r.
Ark. wyd. 13,25, druk. 11,5	Podpisano do druku w czerwcu 1971.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w czerwcu 1971 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 244/71 U-90

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

JANINA MALEC \*

## Błona jądrowa

### Nuclear Envelope

Some views on nuclear envelope structure and function are presented.

Jednym z podstawowych osiągnięć, jakie wniosło do badań struktury komórkowej zastosowanie mikroskopu elektronowego, było stwierdzenie, że błony są powszechnym i zasadniczym składnikiem struktury cytoplazmy, stanowiąc znaczną część masy komórkowej. W niektórych rodzajach komórek struktury błoniaste osiągają do 80% suchej masy komórki (78).

W roku 1952 Porter i Kallmann (66) wprowadzili termin „siateczka endoplazmatyczna” (ang. *endoplasmic reticulum*) jako określenie dla układu kanalików i pęcherzyków widocznych w mikroskopie elektronowym w całych komórkach. Następnie po udoskonaleniu techniki mikroskopii elektronowej, Palade i Porter (59) użyli tego terminu dla określenia podobnych struktur znajdujących się wyłącznie w cytoplazmie i w podobnym znaczeniu termin ten jest używany do chwili obecnej, obejmując wszystkie błoniaste składniki cytoplazmy z wyjątkiem mitochondriów. I wreszcie w następnych latach Palade i Palay (58, 61) różnicowali składniki siateczki endoplazmatycznej na gładko i szorstko powierzchniowe, co ostatecznie doprowadziło do następującego, obecnie przyjętego podziału obecnych w komórce błon (12):

zewewnętrzne (plazmatyczne),

wewnętrzne (cytoplazmatyczne):

szorstkie (ziarniste, alfa),

gładkie (nieziarniste, beta i gamma),

błony organelli komórkowych.

Określeniem „szorstkie” objęto błony cytoplazmatyczne, na których powierzchni widoczne są ziarnistości utworzone przez przylegające do nich rybosomy. Ziarnistości takich nie widać na powierzchni błon „gładkich”, które z kolei zostały różnicowane na grupę beta i gamma. Grupa beta

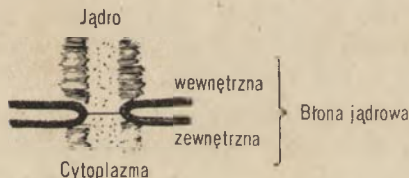
\* Dr med., Zakład Biochemii, Instytut Hematologii, Warszawa

obejmuje te błony cytoplazmatyczne, które wydają się stanowić wgłębienia błony plazmatycznej, podczas gdy błony grupy gamma nie wykazują połączeń z błoną plazmatyczną. Do tej ostatniej grupy błon zaliczany jest aparat Golgiego, uważany za wyspecjalizowaną formę błon gładkich (78). Grupa błon organelli subkomórkowych jest najbardziej zróżnicowana, obejmując błony mitochondrialne i błonę jądrową.

Pierwszą wzmiankę o błonie jądrowej zrobił Robert Brown w 1833 roku (wg 52). W latach pięćdziesiątych Hartmann (30) i następnie Watson (76) zaobserwowali na różnego rodzaju komórkach, że otaczająca jądro otoczka jest złożona z dwóch błon oddzielonych od siebie przestrzenią szerokości około 20—40 nm (przestrzeń perinuklearna), stanowiącą wokół jądra rodzaj fosy. Stwierdzano przy tym wielokrotnie, że wewnętrzna z tych błon jest w ścisłym kontakcie ze znajdującą się na krańcach jądra chromatyną (4, 48, 52, 54), zewnętrzna zaś odgina się w wielu punktach na zewnątrz w kierunku cytoplazmy, wykazując wyraźną łączność z błonami endoplazmatycznej siateczki cytoplazmy. Dzięki temu ogólny obraz siateczki endoplazmatycznej przedstawia się jako złożony układ błoniastych struktur dzielących cytoplazmę na wielką ilość przedziałów i ciągnących się od jądra do błony plazmatycznej (52, 55, 57, 65). Wygląd mikroskopowy otoczki jądrowej jest pod wieloma względami bardzo podobny do błon cytoplazmatycznych zarówno jeśli chodzi o wymiary jak i obecność na jej zewnętrznej powierzchni cząstek rybonukleo-proteidowych, co upodabnia ją do ziarnistych błon cytoplazmy (55, 65). Na fakty te zwrócili po raz pierwszy uwagę Watson (76) oraz Palade i Palay (58, 61), proponując traktowanie błony jądrowej jako składnika układu siateczki endoplazmatycznej, którego część cytoplazmatyczna wywodzi się z błony jądrowej. Taka klasyfikacja błony jądrowej utrzymuje się do obecnej chwili (12). Za ścisłym związkiem cytoplazmatycznej siateczki endoplazmatycznej z błoną jądrową przemawiają także obserwacje nad odtwarzaniem się jej po podziale komórki. Mianowicie nie ulega wątpliwości, że błona jądrowa ulega w czasie mitozy rozpadowi. Dzieje się to w końcowym etapie profazy. Odtworzenie jej następuje w telofazie przez połączenie istniejących w cytoplazmie, zgromadzonych wokół chromosomów struktur, zbliżonych wyglądem do fragmentów siateczki endoplazmatycznej (48). Istnieje szereg obserwacji sugerujących, że cytoplazmatyczna część siateczki endoplazmatycznej tworzy się następnie z błony jądrowej (3, 16, 22, 23, 28, 39, 63). Zostało stwierdzone wielokrotnie, że rysunek siateczki endoplazmatycznej na terenie cytoplazmy wykazuje bardzo dużą różnorodność, która nie jest jednakże przypadkowa, lecz wydaje się zależna od stopnia zróżnicowania komórki, fazy wzrostu i stanu funkcjonalnego (57, 65). W świetle tych obserwacji bardzo interesująca jest koncepcja Portera (65), który sugeruje, że po każdym podziale komórki, gdy nastąpi odbudowa błony jądrowej, tworzy się nowa siateczka cytoplazmatyczna, która pełni swoje

funkcje tylko przez jedną generację komórek i po każdym podziale zostaje zastąpiona przez inną, odpowiednią dla charakteru biologicznego komórki potomnej.

Obok niewątpliwych związków zarówno morfologicznych jak funkcjonalnych, istniejących między błoną jądrową a częścią cytoplazmatyczną układu siateczki endoplazmatycznej, otoczka jądrowa wykazuje pewną stałą cechę morfologiczną, nie występującą w innych błonach komórkowych, która jest uznawana za kryterium różnicujące błonę jądrową od pozostałych struktur błoniastych komórki (20, 73). Cechą tą jest obecność stosunkowo dużych porów o średnicy kilkudziesięciu i więcej milimikronów. Pory takie po raz pierwszy zaobserwowali Callan i Tomlin (8) w jądrach komórek jajowych płazów i od tego czasu opisywano je wielokrotnie w różnych rodzajach komórek. Szczegółowy opis ich budowy mikroskopowej w komórkach jajowych jeżowca morskiego podał Afzelius (1). Budowa ta przedstawia się następująco (schemat 1): w bardziej lub mniej równoległych błonach komórkowych, wewnętrznej i zewnętrznej, występują przerwy, w których obie błony łączą się z sobą, w wyniku czego w otoczce jądra tworzą się otwory. W otworach tych widoczne są cylindryczne struktury, tworzące rodzaj kanalików wiodących z jądra do cytoplazmy i nieco do niej wchodzące. Te cylindryczne struktury właśnie, zwane w literaturze anglosaskiej *por complex*, widoczne są na poprzecznych lub skośnych przekrojach błony jądrowej jako obserwowane wielokrotnie „pory”:



**Schemat 1.** Schematyczne przedstawienie zespołu por

Istnienie błony jądrowej jako wyraźnie zdefiniowanej struktury, charakteryzującej się w dodatku stałymi cechami morfologicznymi, nieco odrębnymi od cech pozostałych błon komórkowych nasuwa od razu wnioski o ważności roli, jaką pełni ona przypuszczalnie jako bariera pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Wiadomo już dziś jednak, że sprawa funkcji błon komórkowych może i powinna być rozpatrywana w co najmniej dwóch aspektach, a mianowicie błon jako barier fizjologicznych, oraz błon — jako struktur metabolicznie czynnych. Ten drugi aspekt zdaje się dotyczyć w szczególności dużym stopniu błon wewnątrzkomórkowych.

Trudności w otrzymywaniu zadowalająco czystych preparatów błon jądrowych były przyczyną, że badania nad strukturą i funkcjami błony

jądrowej są znacznie mniej zaawansowane niż badania nad innymi błonami komórkowymi. W ostatnich kilku latach zaczęły się jednak zarysowywać pewne nowe kierunki badań, których wyniki rzuciły już nieco światła na zagadnienie znaczenia i roli błony jądrowej jako odrębnej jednostki funkcjonalnej i strukturalnej. W pewnym uproszczeniu można przyjąć, że kierunki te wywodzą się z trzech następujących, podstawowych pytań:

1. Na czym polegają funkcje błony jądrowej jako bariery między jądrem a cytoplazmą?
2. Jak wygląda struktura błony jądrowej w porównaniu ze strukturą innych błon komórkowych i czy nie wykazuje ona jakichś cech swoistych, które można by wiązać z jej specjalnymi funkcjami?
3. Czy z błoną jądrową są związane jakieś procesy metaboliczne w ogóle, a specjalnie związane z jądrem w szczególności?

### I. Błona jądrowa jako bariera między jądrem a cytoplazmą

Liczne badania nad przepuszczalnością błony jądrowej wykazały, że małe cząsteczki zarówno elektrolitów jak nieelektrolitów mogą przechodzić przez nią z łatwością, a co więcej, jądra komórkowe mają zdolność akumulowania niektórych drobnocząsteczkowych związków, jak na przykład aminokwasy i nukleotydy, w stężeniach wyższych niż znajdują się one w cytoplazmie tych samych komórek (25, 27, 52), na co pierwsi zwrócili uwagę Naora i wsp. (56). Również i niektóre związki wielkocząsteczkowe mogą przechodzić przez błonę jądrową, jak wskazują prace Goldsteina i Prescottta (26) oraz Zetterberga (84). Autorzy ci stwierdzili mianowicie w różnego rodzaju komórkach swobodne przechodzenie przez błonę jądrową wewnątrzkomórkowego rozpuszczalnego białka. Z drugiej strony jednak istnieją doświadczenia wskazujące, że wprowadzone z zewnątrz do cytoplazmy rozpuszczalne białka jak albuminy i globuliny nie przedostają się do jądra (19, 29, 72), podczas gdy na przykład o wiele większe od cząsteczek tych białek cząstki opłaszczonego poliwinylopirolidonem złota przechodzą do jądra w znacznych ilościach (17). Tego rodzaju wyniki doświadczeń wskazywały na istnienie niewątpliwego kontaktu między jądrem a cytoplazmą, ale równocześnie sugerowały, że kontakt ten nie opiera się wyłącznie na prostej dyfuzji. Wyjaśnienia wymagała również regulacja przechodzenia przez błonę jądrową związków wielkocząsteczkowych wytworzonych w jądrze i przekazywanych do cytoplazmy, przede wszystkim RNA informacyjnego i RNA rybosomów.

Obserwacje różnych komórek w mikroskopie elektronowym zwracały uwagę na pory błony jądrowej jako na możliwą drogę specjalnego kontaktu pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Na podstawie badań cytologicznych



nad przechodzeniem do jądra tworzonej w cytoplazmie hemoglobiny, Davies (13) i Kabat (35) sugerują, że znajdujący się w kanalikach pomiędzy masami chromatyny roztwór hemoglobiny łączy się poprzez pory błony jądrowej z roztworem hemoglobiny syntetyzowanym w cytoplazmie. Przerwanie ciągłości błony cytoplazmatycznej powoduje wyciekanie roztworu hemoglobiny ze śródchromatynowych kanalików na zewnątrz komórki. Fakty te według obu autorów świadczą o tym, że pory błony jądrowej są stale otwarte pozwalając na wolne przechodzenie przez nie roztworu hemoglobiny. Według licznych obserwacji w mikroskopie elektronowym pory błony jądrowej są również miejscem przechodzenia rybosomów z jądra do cytoplazmy (6, 7, 31, 49, 53), z czym wiąże się prawdopodobnie fakt, że jąderka są bardzo często w ścisłym kontakcie z błoną jądrową (7, 31), a jej pory przechodzą bezpośrednio w kanaliki o tej samej średnicy, prowadzące przez okalającą jąderko warstwę chromatyny do jąderka (7). Przechodzenie rybosomów do cytoplazmy a także i niektórych innych produktów syntezy jądra odbywa się jednakże niewątpliwie w sposób kontrolowany, co wydaje się z kolei wykluczać istnienie porów błony jądrowej jako zawsze otwartych luk w otoczce jądra.

Obserwacje porów w mikroskopie elektronowym dają wrażenie, że są one zamknięte cienką przesłoną. Nie zostało jednak wyjaśnione, czy przesłona ta stanowi ciągłość wewnętrznej błony jądrowej, jak to przypuszczali Callan i Tomlin (8), czy też jest to tylko efekt optyczny, jak to proponował Watson (77). Na obrazach z mikroskopu elektronowego pory błony jądrowej są często wypełnione przez nieprzepuszczającą elektronów substancję, występującą w postaci ziarnistości lub włókien (7, 31, 42, 64, 75). Widoczne są one nie tylko w samym wnętrzu porów, ale także po obu ich stronach, to znaczy już na terenie jądra i cytoplazmy (6, 18, 42, 53, 67). Jak wykazały próby trawienia ich enzymami proteolitycznymi, dezoksyrybonukleazą i rybonukleazą, twory te zbudowane są z białka (42, 50). Znaczenie ich nie zostało dotychczas wyjaśnione, ale przypuszcza się między innymi, że stanowią one struktury zamykające pory, w celu regulowania ich przepuszczalności (18, 20, 79). Także pomiary potencjału błony jądrowej (46, 47) zdają się świadczyć, że pory nie zapewniają wolnego kontaktu pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Wniosek taki nasuwa jednak pytanie, jakie czynniki regulują wobec tego ten kontakt? Pomiary potencjału błony jądrowej gruczołów ślinianki owadów wykazały, że przepuszczalność błony jądrowej jest niejednakowa w różnych stadiach rozwojowych owadów, przy czym zmiany przepuszczalności przebiegają równoległe ze zmianami aktywności funkcjonalnej badanych organizmów (47). Podobne zmiany przepuszczalności wywołali autorzy przez podanie hormonu wzrostowego — ekdysonu. W poszukiwaniu korelacji między zmianami potencjału błony jądrowej i związanej z tym zmiany jej przepuszczalności a strukturą błony jądrowej, Wiener i wsp. (79) przeprowadzili badania struktury mikroskopowej błony jądrowej w tych samych

warunkach, w jakich zostały stwierdzone wyraźne zmiany jej przepuszczalności. Nie stwierdzili oni jednakże żadnych wyraźnych zmian ani w wielkości ani w rozłożeniu porów na powierzchni jądra. Z drugiej strony jednak niektóre badania zarówno ilości porów na jednostkę powierzchni jądra jak ich wielkości zdają się wskazywać, że cechy te są niejednakowe w różnych rodzajach komórek. I tak na przykład według Merriama (51) jądra rosnących komórek jajowych żaby mają o 40% więcej porów na jednostkę powierzchni niż komórki jajowe dojrzałe. Według Salomona i wsp. (71) liczba porów w jądrach komórek wątroby szczurów karmionych tioacetamidem wzrasta w widoczny sposób na długo przed pojawieniem się guza. Wreszcie Franke (20) na podstawie badania komórek roślinnych sugeruje, że przynajmniej trzy właściwości mikroskopowej budowy błony jądrowej mogą ulegać zmianom w zależności od charakteru komórki. Są nimi: średnica światła porów, stopień rozwoju ścianki porów oraz liczba porów na jednostkę powierzchni jądra. Badania mikroskopowe błon jądrowych, prowadzone systematycznie przez tego autora w różnego rodzaju komórkach (21) potwierdziły istotnie pewną różnorodność tych cech, nie pozwoliły jednak jeszcze na wyciągnięcie ogólniejszych wniosków ani dotyczących charakteru spostrzeganych różnic ani czynników wpływających na ich powstanie.

Poza czynnikami kontrolującymi przechodzenie przez błonę jądrową różnych substancji z cytoplazmy do jądra i w kierunku odwrotnym, w utrzymaniu odrębnego od cytoplazmy środowiska jądra współdziała jeszcze jedna cecha budowy błony jądrowej. Cechą tą jest ciągłość zewnętrznej błony jądrowej z cytoplazmatycznymi błonami siateczki endoplazmatycznej. Zachowanie tej ciągłości powoduje, że w licznych punktach błony jądrowej, znajdująca się między zewnętrzną a wewnętrzną błoną jądrową przestrzeń perinuklearna łączy się z kanalikami utworzonymi w cytoplazmie przez siateczkę endoplazmatyczną. Wiadomo zaś z kolei, że przynajmniej w niektórych rodzajach komórek kanaliki cytoplazmy mają bezpośrednie połączenie ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym. Oznacza to tym samym, że może istnieć bezpośrednie połączenie między środowiskiem zewnętrznym komórki a przestrzenią perinuklearną jądra, a substancje ze środowiska zewnętrznego komórki nie muszą przechodzić przez cytoplazmę, aby znaleźć się w bezpośrednim kontakcie z błoną wewnętrzną otoczki jądrowej. Ilustracją takiej sytuacji jest obserwacja, że krople tłuszczu o średnicy 60—200 nm, zaabsorbowane z jelita cienkiego, pojawiają się bezpośrednio w przestrzeni między dwiema błonami otoczki jądrowej (60). Wydaje się, że ten mechanizm przenikania substancji ze środowiska zewnętrznego do jądra z pominięciem cytoplazmy (2, 43) znajduje się również u podstaw znanego od wielu lat faktu wybiórczej akumulacji w jądrze jonów sodu, w stężeniu kilkakrotnie przewyższającym stężenie tych jonów w cytoplazmie (43, 44, 56).

## II. Skład chemiczny błony jądrowej

Analiza składu chemicznego różnych rodzajów błon komórkowych wykazała, że różnią się one znacznie między sobą pod względem ilościowym, a niekiedy również i jakościowym, jakkolwiek stałą cechą wszystkich rodzajów błon jest stosunkowo wysoka zawartość lipidów oraz białka. Wydaje się natomiast, że glikolipidy są zlokalizowane w większości, jeśli nie wyłącznie, w błonach plazmatycznych (69, 70, 74).

Z uwagi na zasadniczą rolę przypisywaną lipidom w utrzymywaniu struktury błon, stosunkowo wiele prac poświęcono badaniom porównawczym szczegółowego składu chemicznego różnych klas lipidów pochodzących z różnych rodzajów błon komórkowych. Spośród lipidów zaś szczególne zainteresowanie skupiały z kolei fosfolipidy, jako przeważający ilościowo składnik lipidów.

Tablica 1

Zawartość fosfolipidów głównych klas w jądrach różnych narządów wołu  
(w % całkowitej ilości fosfolipidów)

Fosfolipid	Całe jądra			Błona jądrowa
	Grasica (70)	Trzustka (70)	Wątroba (70)	Wątroba (37)
Fosfatydylocholina	52,1	52,4	53,9	55,0
Fosfatydyloetanolamina	19,6	23,5	20,6	23,0
Fosfatydyloseryna	3,2	2,0	3,0	6,0
Fosfatydyloinozytol	9,0	8,6	9,0	8,0
Dwufosfatydyloglicerol (kardiolipina)	1,1	0,6	1,5	nie oznaczony
Sfingomielina	2,6	2,6	2,6	6,0

Porównawcze badania procentowej zawartości głównych klas fosfolipidów, opracowane wyczerpująco przez Rousera i wsp. (70) dla różnych organelli subkomórkowych, wykazały, że jest ona różna w mitochondriach, siateczce endoplazmatycznej oraz jądrach tego samego rodzaju komórek, przy czym jądra nie wykazują swoistości ani gatunkowej ani narządowej. W tablicy 1 przedstawiono skład procentowy fosfolipidów jąder niektórych narządów wołu oraz izolowanej błony jądrowej wątroby wołu. Pewne zastrzeżenia w odniesieniu do danych dotyczących fosfolipidów jąder może budzić fakt, że pochodzą one z analizy całych jąder, a nie izolowanych błon jądrowych. Jednakże według badań Lemarchala i Bornensa (45) skład głównych związków fosfolipidowych wątroby szczura jest bardzo podobny w izolowanej błonie jądrowej i pozostałym po

oddzieleniu błony jądrze, a skład fosfolipidów oznaczony po raz pierwszy w izolowanych błonach jądrowych przez K e e n a n a i wsp. (37) odbiega tylko w niewielkim stopniu od wartości dla całych jąder.

Tablica 2

Skład chemiczny dwóch warstw otoczki jądrowej (w % suchej masy)

Związek chemiczny	Narząd	Warstwa	
		1,19	1,16
Białko	Wątroba szczura (69)	62,3	58,8
Lipidy	Wątroba szczura, CE,* HZ** (70)	46-48	24-27
	Wątroba szczura, CE, HZ (70) z tego około 70% stanowiły fosfolipidy	27-50	27-50
Lipidy	Wątroba szczura (69)	27,7	35,2
Fosfolipidy	„	24,1	29,2
Cholesterol	„	3,6	6,0
Węglowodany	„	3,9	2,9
cukry obojętne	„	3,6	2,6
hekszoamina	„	0,21	0,24
Kwas sialowy	„	0,09	0,06
RNA	Wątroba szczura, CE, HZ (70)	0,08-0,1	
	Wątroba szczura (70)	3,3	1,4
	CE (70)	2,1	1,1
DNA	Wątroba szczura (69)	6,1	3,1
	Wątroba szczura (70)	1,3	0,2
	CE (70)	0,9	0,2
	Wątroba szczura (69)	0	0

\* CE—*Carcinoma Ehrlicha*

\*\* HZ—*Hepatoma Zajdela*

W opracowanej przez B e r e z n e y a i wsp. (5) metodzie izolowania na dużą skalę błon jądrowych z wątroby wołu, autorzy ci odzyskiwali w preparatach izolowanych błon następujące ilości całkowitego materiału obecnego w jądrach: białka — 10,3%, fosfolipidów — 47,1%, RNA — 23,9%, DNA — 0,27%. W otrzymanych tą metodą preparatach błony jądrowej (37) fosfolipidy stanowiły 62% całkowitej ilości lipidów, cholesterol — 16%, wolne kwasy tłuszczowe — 13%. Około 70% reszt acylowych lipidów stanowiły 18-węglowe kwasy tłuszczowe, a stosunek zawartości kwasu palmitynowego do kwasu olejowego wynosił 0,55. Porównując otrzymane przez siebie wyniki analizy błony jądrowej wątroby wołu z wynikami analizy siateczki endoplazmatycznej cytoplazmy wątroby szczura (38) autorzy zwracają uwagę na zbliżone zawartości głównych związków fosfolipidowych w obu rodzajach błon, interpretując ten fakt jako dowód na podkreślany przez cytologów ścisły związek pomiędzy tymi dwoma rodzajami błon. Jednakże porównanie tych samych danych z wynikami analizy

składu fosfolipidów frakcji mikrosomalnej z innych narządów niż wątroba (70) nasuwa zastrzeżenie, że podobieństwo to może odnosić się wyłącznie do wątroby, a zatem nie można go uważać za dowód na identyczność błony jądrowej i siateczki endoplazmatycznej cytoplazmy we wszystkich rodzajach komórek. Koncepcji identyczności tych dwóch rodzajów błon nie podtrzymuje również porównanie zawartości cholesterolu, tłuszczów obojętnych i wolnych kwasów tłuszczowych w błonie jądrowej wątroby wołu (37) i siateczce endoplazmatycznej wątroby szczura (24, 38, 81), gdyż wartości te wyraźnie od siebie odbiegają.

Bardzo istotny materiał do zasobu informacji o budowie chemicznej błony jądrowej wniosły ostatnie, niestety jeszcze bardzo niekompletne, badania składu chemicznego poszczególnych warstw otoczki jądrowej. Mianowicie wirując izolowane błony jądrowe w gradiencie sacharozy uzyskuje się ich rozdział na dwie frakcje o gęstości około 1,16 i 1,19. Według autorów metoda frakcja „lekka” (1,16) odpowiada prawdopodobnie błonie zewnętrznej otoczki jądrowej, frakcja „ciężka” (1,19) — błonie wewnętrznej. (82). Wyniki badania składu chemicznego wyizolowanych w ten sposób frakcji zostały zestawione w tablicy 2. Jak widać, dwie warstwy błony jądrowej różnią się pod względem swojej budowy chemicznej i można przypuszczać, że i funkcje ich nie są jednakowe.

### III. Funkcje metaboliczne błony jądrowej

Badania aktywności enzymatycznych obecnych w błonie jądrowej, prowadzone przeważnie na komórkach wątroby szczura, wykazały co następuje: glukozo-6-fosfataza, dehydrogenaza zred. NAD: cytochrom c i ATP-aza stanowią integralne składniki błony jądrowej, przy czym aktywności właściwe glukozo-6-fosfatazy i dehydrogenazy zred. NAD: cytochrom c wynosiły około 50% aktywności tych enzymów w błonach siateczki endoplazmatycznej cytoplazmy (36). Obserwacja powyższa sugeruje, zdaniem autorów, że enzymy te są związane tylko z jedną warstwą otoczki jądrowej, prawdopodobnie zewnętrzną i stanowi biochemiczne poparcie dla wysuniętej na podstawie badań morfologicznych hipotezy o bliskim związku zewnętrznej błony jądrowej z siateczką endoplazmatyczną cytoplazmy. Badania poszczególnych warstw błony jądrowej wykazały, że warstwa 1,19 zawiera znaczne ilości arylosulfatazy A i B (62, 82), zaś aktywność ATPazy, obecna w obu warstwach, jest szczególnie duża w warstwie 1,16 (82). Obie warstwy wykazują znaczne aktywności enzymów utleniających (tablica 3) — oksydazy cytochromu oraz dehydrogenazy: zred. NAD (i zred. NADP): cytochrom c (82, 83).

Tak duże aktywności enzymów utleniających oraz fakt aktywacji ATP-azy przez 2,4-dwunitrofenol i hamowania przez oligomycynę i gramicydynę S sugerują, zdaniem Z b a r a s k i e g o i wsp. (82), że procesy utleniania

zachodzące w jądrze mogą być zlokalizowane w jego błonie. Ci sami autorzy stwierdzili w jądrach i błonie jądrowej brak aktywowanej przez jony sodu ATPazy, co potwierdzałoby przypuszczenie, że błona jądrowa nie posiada właściwości „pompy sodowej”, a duże stężenie jonów sodu w jądrze jest wynikiem bezpośredniego ich przechodzenia ze środowiska zewnętrznego do przestrzeni perinuklearnej jądra.

Tablica 3

Aktywności enzymatyczne w błonach jądrowych, jądrach i innych frakcjach subkomórkowych wątroby szczura (82)

Enzym	Błona jądrowa		Jądra	Frakcja mitochondrialno-lizosomalna	Mikrosomy
	1,19	1,16			
Oksydaza cytochromu <i>c</i>	38,0	30,7	6,0	59,2	6,2
Dehydrogenaza zred. NAD: cytochrom <i>c</i>	59,7	16,3	21,0	61,6	283,0
Dehydrogenaza zred. NADP: cytochrom <i>c</i>	6,5	7,7	2,5	10,7	17,7

Wśród nielicznych prac poświęconych badaniu składu chemicznego błon jądrowych znajduje się tylko jedna poświęcona metabolizmowi składników błony jądrowej. Mianowicie Lemarchal i Bornens (45) oznaczali szybkość wbudowywania  $^{32}\text{P}$  do trzech głównych związków fosfolipidowych (lecytyn, fosfoetanolamin i fosfoinozytoli) jąder i błony jądrowej wątroby szczura i stwierdzili, że krzywa włączania tego prekursora do każdego z trzech wymienionych związków jest identyczna w preparacie jąder pozostałym po oddzieleniu błon jądrowych oraz w izolowanej błonie jądrowej, przy czym fosfolipidy błony stanowiłyby około 35% całkowitej ilości fosfolipidów jądra. Interpretując tę obserwację autorzy brali pod uwagę dwie możliwości jej wyjaśnienia: 1. bardzo szybką wymianę fosfolipidów pomiędzy błoną jądrową a wnętrzem jądra, 2. syntezę tych związków w jądrze i błonie jądrowej niezależnie od siebie ale z podobną szybkością. Ta druga możliwość oznaczałaby, że istnieje bardzo duże zapotrzebowanie na syntetyzowane w błonie jądrowej fosfolipidy, co autorzy pracy proponują powiązać z licznymi, a dotychczas niezrozumiałymi obserwacjami z mikroskopu elektronowego, wskazującymi na oddziaływanie wzajemne między błoną jądrową a chromatyną (14, 15, 48, 80), oraz z wynikami doświadczenia Jacksona i wsp. (32), którzy wyodrębnili z chromatyny jąder grasicy cielęcej kompleks dezoksyrybonukleohistonu i lipoproteidu. Kompleks ten miałby, według Jacksona, powstawać w wyniku interakcji związków lipoproteidowych błony jądrowej z chromatyną. Mechanizm tej interakcji tłumaczy Comings (10) opierając się na kon-

cepcji replikonu jako podstawowej jednostki replikacji DNA, wysuniętej przez Jacoba i wsp. (33, 34) dla wyjaśnienia szeregu zjawisk związanych z syntezą DNA w bakteriach. Według tej koncepcji replikacja chromosomu bakteryjnego zostaje zapoczątkowana w specjalnym miejscu chromosomu zwanym replikatorem, które przylega do specjalnego miejsca na błonie bakteryjnej. Raz rozpoczęta w replikonie synteza DNA jest następnie kontynuowana aż do jej zakończenia. Związanie replikatora z błoną bakteryjną stanowi bardzo istotny moment procesu replikacji DNA, ponieważ zapewnia ono rozdzielenie i uszeregowanie chromosomów potomnych na przeciwległych biegunach komórki. Według Comingsa obserwacje cytologiczne świadczące o istnieniu połączenia między chromosomami jądra w interfazie a błoną jądrową (15, 48, 80) oraz doświadczenia Comingsa i Kakefudy (11) wskazujące, że w komórkach człowieka zapoczątkowanie syntezy DNA odbywa się w błonie jądrowej, upoważniają do wysunięcia hipotezy, że w komórkach organizmów wyższych chromosomy jądra w interfazie są ułożone w sposób uporządkowany dzięki połączeniu z błoną jądrową, zaś niektóre z tych „punktów przyczepu” mogą odpowiadać punktom inicjującym syntezę DNA w poszczególnych replikonach.

#### IV. Uwagi końcowe

Ścisłe podobieństwo morfologiczne wszystkich błon komórkowych stało się podstawą sformułowanej przez Robertsona (68) w 1957 roku teorii jedności błon komórkowych. Obserwował on mianowicie na obrazach z mikroskopu elektronowego, że wszystkie obecne w różnych rodzajach komórek błony charakteryzują się jednakową szerokością  $75\text{\AA}$ , przy czym na szerokość tę składają się dwie warstwy o szerokości  $20\text{\AA}$  przedzielone warstwą szerokości  $35\text{\AA}$ . Proponując swój model „jednostki błony” (ang. *unit membrane*) Robertson zakładał, że wszystkie błony komórkowe mają jednakową trójwarstwową budowę, identyczną strukturę molekularną i wspólne pochodzenie. Jednakże wraz z rozwojem mikroskopii elektronowej stało się widoczne, że szerokość rozmaitych błon komórkowych nie jest jednakowa. Zarysowały się mianowicie wyraźne różnice między błonami plazmatycznymi a cytoplazmatycznymi. Według Sjöstranda (73) błony komórkowe można na podstawie wymiarów podzielić na co najmniej trzy klasy: błony mitochondrialne i szorstkie siateczki endoplazmatycznej, błony gładkie siateczki endoplazmatycznej oraz błony plazmatyczne. Okazało się także, że i druga cecha błon, na której opierała się teoria Robertsona, a mianowicie ich trójwarstwową budową, nie jest uniwersalna. Bowiem podczas gdy błony plazmatyczne badane różnymi technikami mikroskopii elektronowej wydają się w dalszym ciągu trójwar-

stwowe, błony cytoplazmatyczne zdają się posiadać strukturę globularną (73, 74). Równocześnie gromadzące się wyniki licznych biochemicznych badań poszczególnych rodzajów błon komórkowych (9, 40, 41, 69, 70) dowodzą, że różnią się one bardzo wyraźnie nie tylko pod względem budowy mikroskopowej ale również składu chemicznego, zawartości enzymów oraz funkcji metabolicznych. Znaczenie obserwowanych różnic w składzie chemicznym oraz w obrazie mikroskopowym różnych rodzajów błon dla ich funkcji pozostaje ciągle jeszcze nie wyjaśnione, ale konieczność brania tych różnic pod uwagę przy próbach formułowania teorii, dotyczących organizacji błon biologicznych, jest ostatnio coraz częściej podkreślana przez różnych autorów (9, 40, 41, 73, 74). Znaczne różnice zarówno strukturalne jak funkcjonalne pomiędzy różnymi rodzajami obecnych w tej samej komórce błon nasuwają również przypuszczenie, że jakkolwiek część z nich może ulegać wzajemnym przekształceniom, to jednak, być może, nie jest to zjawisko obejmujące wszystkie rodzaje błon w komórce. W takim zaś wypadku trzeba by brać pod uwagę istnienie więcej niż jednego miejsca syntezy błon w komórce (40).

W świetle powyższych uwag wydaje się, że aktualną sytuację dotyczącą współczesnego stanu wiedzy o strukturze molekularnej błon komórkowych bardzo dobrze ilustruje następujące sformułowanie Korna (41): „Nie ma obecnie wyraźnych podstaw dla podtrzymywania naszej wiary w teorię ubogo-molekularnej jednostki błony. (ang. *paucimolecular unit membrane*). Nie znaczy to, że teoria ta jest fałszywa, tylko, że nie jest dowiedziona. Istnieją realne możliwości, że błony mogą różnić się między sobą w takim stopniu, że ich struktura molekularna nie będzie mogła być opisana przez jeden uniwersalny model”.

#### LITERATURA

1. Afzelius B. A., *Exptl. Cell Res.* **8**, 147 (1955).
2. Allfrey V. G., w *The Nucleus*, red. A. J. Dalton i F. Haguenau, Academic Press, New York-Londyn 1968, str. 1.
3. Anderson E., *J. Ultrastruct. Res. (Suppl.)* **8**, 1 (1965).
4. Barer R., Joseph S., Meele G. A., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **152**, 353 (1960).
5. Berezney R., Funk L. K., Crane F. L., *Biochim. Biophys. Acta* **203**, 531 (1970).
6. Bernhard W., Granboulan N., *Exptl. Cell Res. (Suppl.)* **9**, 19 (1963).
7. Bernhard W., Granboulan N., w *The Nucleus*, red. A. J. Dalton i F. Haguenau, Academic Press, New York-Londyn 1968, str. 81.
8. Callan H. G., Tomlin S. G., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **137**, 367 (1950).
9. Chapman D., w *Biological Membranes*, red. D. Chapman, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 125.
10. Comings D. E., *Am. J. Human. Genet.* **20**, 440 (1968).
11. Comings D. E., Kakefuda T., *J. Mol. Biol.* **33**, 225 (1968).



12. Cook G. M. W., *Brit. Med. Bull.* **24**, 118 (1968).
13. Davies H. G., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 671 (1961).
14. Davies H. G., Small J. V., *Nature* **217**, 1122 (1968).
15. Duprau E. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **53**, 161 (1965).
16. Essner E., Novikoff A. B., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **15**, 289 (1962).
17. Feldherr C. M., *J. Cell Biol.* **14**, 65 (1962).
18. Feldherr C. M., *J. Cell Biol.* **25**, 43 (1965).
19. Feldherr C. M., Feldherr A. B., *Nature* **185**, 250 (1960).
20. Franke W. W., *J. Cell Biol.* **31**, 619 (1966).
21. Franke W. W., Kartenbeck J., *Experientia* **25**, 396 (1969).
22. Gay H., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **21**, 257 (1956).
23. Gay H., *J. Biophys. Biochem. Cytol. (Suppl.)* **2**, 407 (1956).
24. Glaumann H., Dallner G., *J. Lipid Res.* **9**, 720 (1968).
25. Goldstein L., w *Cytology and Cell Physiology*, red. G. H. Bourne, Academic Press, New York-Londyn 1964, str. 559.
26. Goldstein L., Presscott D. M., *J. Cell Biol.* **33**, 637 (1967).
27. Goldstein L., Presscott D. M., *J. Cell Biol.* **33**, 651 (1967).
28. Hadek R., Swift H., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **13**, 445 (1962).
29. Harding C. V., Feldherr C., *J. Gen. Physiol.* **42**, 1155 (1959).
30. Hartmann J. F., *J. Comp. Neurol.* **99**, 201 (1953).
31. Hay E. D., w *The Nucleus*, red. A. J. Dalton i F. Hagenau, Academic Press, New York-Londyn 1968, str. 3.
32. Jackson V., Earnhardt J., Chalkley R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 253 (1968).
33. Jacob F., Brenner S., Cuzin F., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 329 (1963).
34. Jacob F., Ryter A., Cuzin F., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **164**, 267 (1966).
35. Kabat D., *J. Biol. Chem.* **243**, 2597 (1968).
36. Kashing D. M., Kasper Ch. B., *J. Biol. Chem.* **244**, 3786 (1969).
37. Keenan T. W., Berezney R., Funk L. K., Crane L. F., *Biochim. Biophys. Acta* **203**, 547 (1970).
38. Keenan T. W., Morré T. J., *Biochemistry* **9**, 19 (1970).
39. Kessel R. G., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **19**, 391 (1963).
40. Korn D. E., *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 263 (1969).
41. Korn D. E., *Federation Proc.* **28**, 6 (1969).
42. Koshiba K., Smetana K., Busch H., *Exptl. Cell Res.* **60**, 199 (1970).
43. Langendorf H., Siebert G., *Nature* **204**, 888 (1964).
44. Langendorf H., Siebert G., Lorenz I., Hannover R., Beyer R., *Biochem. Z.* **335**, 273 (1961).
45. Lemarchal P., Bornens M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 1021 (1969).
46. Loewenstein W. R., Kanno Y., *Nature* **195**, 462 (1962).
47. Loewenstein W. R., Kanno Y., Ito S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 708 (1966).
48. Mazia D., w *The Cell*, red. J. Brachet i A. E. Mirsky, Academic Press, New York-Londyn 1964, tom III, str. 77.
49. Mephan R. H., Lane G. R., *Nature* **221**, 288 (1969).
50. Merriam R. W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11**, 559 (1961).
51. Merriam R. W., *J. Cell Biol.* **12**, 79 (1962).
52. Mirsky A. E., Osawa S., w *The Cell*, red. J. Brachet i A. E. Mirsky, Academic Press, New York-Londyn, 1961, tom II, str. 677.
53. Monneron A., Bernhard W., *J. Ultrastruct. Res.* **27**, 266 (1969).

54. Moses M. J., w Proc. of the Fourth Intern. Congress of Electron Microscopy, red. W. Bergman, Springer Verlag, Berlin 1958, tom II, str. 230.
55. Moses M. J., w Cytology and Cell Physiology, red. G. H. Bourne, Academic Press, New York-Londyn 1964, str. 423.
56. Naora H., Naora H., Izawa M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 853 (1962).
57. Northcote D. H., *Brit. Med. Bull.* **24**, 107 (1968).
58. Palade G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol. (Suppl.)* **2**, 85 (1956).
59. Palade G. E., Porter K. R., *Anat. Record.* **112**, 370 (1952).
60. Palay S. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 391 (1960).
61. Palay S. L., Palade G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 69 (1955).
62. Pokrowski A. A., Zbarski I. B., Toutelian V. A., Perewoszczikowa K. A., Lasznewa K. A., Delektorskaja L. N., *Dokł. Akad. Nauk S.S.S.R.* **181**, 1280 (1968).
63. Poletti H. M., Castellano M. A., *Experientia* **23**, 465 (1967).
64. Pollister A. W., Geltner M. E., Ward R., *Science* **120**, 789 (1954).
65. Porter K. R., w The Cell, red. J. Brachet i A. E. Mirsky, Academic Press, New York-Londyn 1961, tom II, str. 621.
66. Porter K. R., Kallmann F. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **54**, 882 (1952).
67. Rabinow C. F., Marak J., *J. Cell Biol.* **29**, 129 (1966).
68. Robertson J. D., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 1043 (1957).
69. Rothfield L., Finkelstein A., *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 464 (1968).
70. Rouser G., Nelson G. J., Fleischer S., Simon G., w Biological Membranes, red. D. Chapman, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 5.
71. Salomon I. C., Salomon M., Bernhard W., *Bull. Cancer* **49**, 139 (1962).
72. Schiller A. A., Schayer R. W., Hess E. L., *J. Gen. Physiol.* **36**, 489 (1952).
73. Sjøstrand F. S., w The Membranes, red. A. J. Dalton i F. Hagenau, Academic Press, New York-Londyn 1968, str. 151.
74. Sjøstrand F. S., w Regulatory Functions of Biological Membranes, red. J. Järnefelt, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam-Londyn-New York 1968, str. 1.
75. Stevens B. J., Swift H., *J. Cell Biol.* **31**, 55 (1966).
76. Watson M. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 257 (1955).
77. Watson M. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 147 (1959).
78. Whittaker V. P., *Brit. Med. Bull.* **24**, 101 (1968).
79. Wiener J., Spiro D., Loewenstein W. R., *J. Cell Biol.* **27**, 107 (1965).
80. Woolam D. H., Millen J. W., Ford D. H. R., *Nature* **213**, 298 (1967).
81. Yunghans W. N., Keenan T. W., Morré D. J., *Exptl. Mol. Pathol.* **12**, 36 (1970).
82. Zbarski I. B., Perevoschchikova K., Delektorskaya L. N., Delektorsky V. V., *Nature* **221**, 257 (1969).
83. Zbarski I. B., Pokrowski A. A., Perewoszczikowa A. K., Gapparov M. M., Delektorskaja L. N., Lasznewa N. V., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **181**, 993 (1968).
84. Zetterberg A., *Exptl. Cell Res.* **43**, 526 (1966).

LECH WOJTCZAK \*

## Enzymatyczna organizacja błon mitochondrialnych

### Enzymatic Organization of Mitochondrial Membranes

Mitochondrial outer and inner membranes can be separated by several mild procedures. The inner membrane thus obtained is the locus of the respiratory chain and the energy coupling system. The outer membrane appeared to contain cytochrome  $b_5$ , NADH-cytochrome  $b_5$  reductase, monoamine oxidase and enzymes acylating glycerophosphate and lysophospholipids. The inner compartment (matrix) contains complete enzyme set for the citrate cycle (except succinate dehydrogenase) and fatty acid activating systems. The intermembrane space contains adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase. More drastic procedures for disruption of mitochondria produce membrane fractions of considerably different enzyme patterns, most likely due to cross contamination.

Recent studies on enzymic organization of the inner membrane reveal the following localization of enzymes: coupling factor  $F_1$  in projecting subunits, NADH-dehydrogenase and succinate dehydrogenase close to the inner surface, cytochrome  $c$  bound close to the outer surface, and cytochromes  $a$ ,  $a_3$ ,  $b$  and  $c_1$  deep inside the membrane.

### I. Rys historyczny

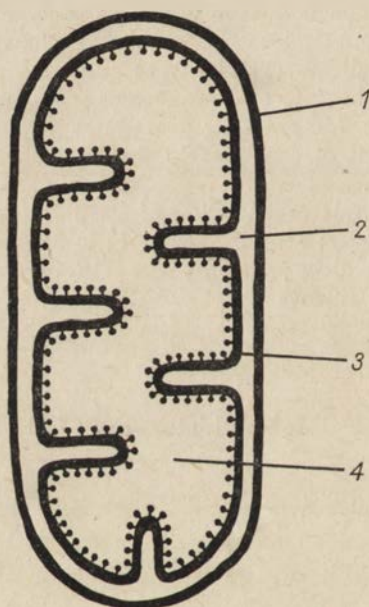
Jedną z tendencji współczesnej biochemii jest badanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji procesów przemiany materii i roli poszczególnych struktur subkomórkowych w tych procesach. Badania w tym zakresie doprowadziły w ostatnich latach do tego, że niektóre procesy metaboliczne potrafimy już umiejscowić w strukturach biologicznych z dokładnością równą niemal rozmiarom makrocząsteczek. Ciekawie pod tym względem przedstawia się historia badań nad rolą mitochondriów.

Dzięki opracowaniu pod koniec lat czterdziestych metod rozdzielania struktur wewnątrzkomórkowych drogą frakcjonowanego wirowania (52), udało się wykazać, że łańcuch oddechowy oraz sprzężona z nim synteza ATP zlokalizowane są w mitochondriach. Jednakże jeszcze w roku 1955 Schneider (53), przedstawiając na III Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym ówczesny stan badań nad wewnątrzmitochondrialną loka-

\* Prof. dr, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

lizacją przemiany materii, poddawał w wątpliwość umiejscowienie całego cyklu cytrynianowego w mitochondriach.

Budowa wewnętrzna mitochondriów była w owym czasie prawie nieznaną. Najbliższe jednak lata, dzięki rozwojowi mikroskopii elektronowej, pozwoliły na wyjaśnienie ultrastruktury tych organelli. Wykazano istnienie dwóch błon oraz oddzielonych nimi przestrzeni: przestrzeni wewnętrznej czyli matrix i przestrzeni międzybłonowej (rysunek 1). Przed biochemią stanęło wówczas pytanie: jaka jest funkcja poszczególnych części mitochondrionu w przemianie materii tej organelli i gdzie zlokalizowane są poszczególne procesy i enzymy? Pierwsze próby odpowiedzi na to pytanie opierały się na badaniach drogą rozbijania mitochondriów, na przykład ultradźwiękami, i oddzielania enzymów rozpuszczalnych od fragmentów nierozpuszczalnych za pomocą ultrawirrowania. Bardziej subtelne podejście



**Rys. 1.** Schemat budowy mitochondrionu. Błona wewnętrzna tworzy wypuklenia zwane grzebieniami mitochondrialnymi (*cristae mitochondriales*). Jej wewnętrzna powierzchnia pokryta jest „grzybkowatymi” strukturami.

1 — Błona zewnętrzna, 2 — przestrzeń międzybłonowa, 3 — błona wewnętrzna, 4 — przestrzeń wewnętrzna (matrix)

polegało na stopniowanej ekstrakcji mitochondriów roztworami soli (28, 42). Dopiero jednak opracowanie metody izolacji zewnętrznych i wewnętrznych błon mitochondrialnych (30, 31, 32, 40, 41, 50, 51, 56, 57, 58) stworzyło podstawy do bardziej efektywnych badań w tym kierunku. W ostatnim zaś roku posunęliśmy się jeszcze dalej. Obecnie chodzi już nie tylko o stwierdzenie, w której z obu błon mitochondrialnych znajduje się ten

czy inny enzym lub zachodzi odpowiedni proces biochemiczny, ale także, w którym miejscu błony się to dzieje: czy na jej powierzchni zewnętrznej lub wewnętrznej, czy też w głębszych warstwach. Zważywszy, że grubość każdej z błon mitochondrialnych wynosi kilkadziesiąt angströmów, precyzja takiej lokalizacji musi być ogromna.

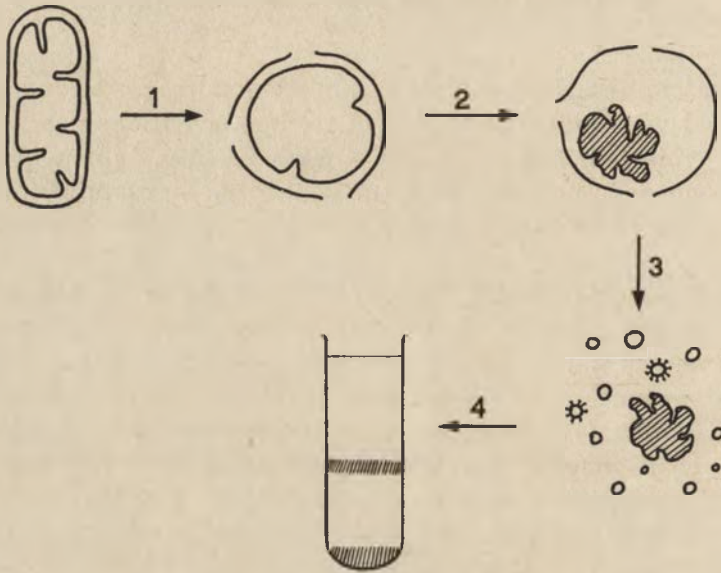
## II. Metody rozdziału błon mitochondrialnych

Pierwszą skuteczną metodę rozdziału błon mitochondrialnych podali Parsons i wsp. (40). Oparli się oni na wspólnych naszych badaniach (61) nad pęcznieniem mitochondriów, które wykazały, że na skutek pęcznienia w środowisku hipotonicznym lub pod wpływem czynników chemicznych następuje pęknięcie błony zewnętrznej i jej częściowe oddzielenie od błony wewnętrznej. Parsons i wsp. (40) wykazali, że gdy tak traktowane mitochondria poddać następnie wirowaniu w gradiencie stężeń sacharozy, można wydzielić frakcję zawierającą fragmenty błony zewnętrznej (rysunek 2 i 3) oraz mitochondria w większym lub mniejszym stopniu pozbawione błony zewnętrznej. Metoda ta, udoskonalona następnie przez autorów (41), pozwala na uzyskanie zewnętrznych błon mitochondrialnych o znacznej czystości. Dzięki temu, że wewnętrzna błona mitochondrialna, mimo spęcznienia, zachowuje w znacznym stopniu swą ciągłość, metoda ta pozwala ponadto na oddzielenie substancji rozpuszczalnych zawartych w przestrzeni międzybłonowej. Wadą metody jest natomiast niska wydajność w odniesieniu do uzyskiwanych błon zewnętrznych.

W celu podniesienia wydajności Sottocasa i wsp. (56, 57, 58) opracowali procedurę, polegającą na wywoływaniu hipotonicznego pęcznienia mitochondriów, a następnie ich skurczu pod wpływem hipertonicznego roztworu sacharozy, zawierającego ponadto ATP. Powodowało to dalsze odsunięcie błony zewnętrznej od wewnętrznej (61). Tak spreparowane mitochondria poddawano następnie bardzo krótkotrwałemu i ściśle dozowanemu działaniu ultradźwięków, co ostatecznie oddzielało od siebie błony mitochondrialne. Wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy pozwalało na uzyskanie oddzielnych frakcji (rysunek 4). Wydajność uzyskiwania błon zewnętrznych została w ten sposób znacznie zwiększona. Jednakże frakcja tych błon uzyskana tą metodą jest zwykle w pewnym stopniu zanieczyszczona fragmentami błon wewnętrznych. Ostatnio opracowana przez nas modyfikacja (63) pozwala zmniejszyć tę kontaminację.

Inna metoda rozdziału zewnętrznych i wewnętrznych błon mitochondrialnych polega na traktowaniu mitochondriów digitoniną. Dzięki znacznej zawartości cholesterolu, z którym digitonina tworzy kompleks, zewnętrzna błona mitochondrialna ulega znacznie łatwiej fragmentacji, a następnie solubilizacji pod wpływem tego związku niż błona wewnętrzna. Dzięki te-

mu stało się możliwe oddzielenie od siebie błon zewnętrznych i mitochondriów pozbawionych tych błon, czyli tak zwanych mitoplastów (rysunek 5). Metoda ta wprowadzona została przez Lévy i wsp. (30, 31, 32), następnie rozwinięta przez Schnaitman i wsp. (50, 51) oraz Hoppe i wsp. (24, 35). Przy odpowiednim dozowaniu digitoniny pozwala ona na wydzielenie czystej i nieuszkodzonej frakcji mitoplastów (rysunek 5), co nie jest możliwe przy zastosowaniu innych metod.



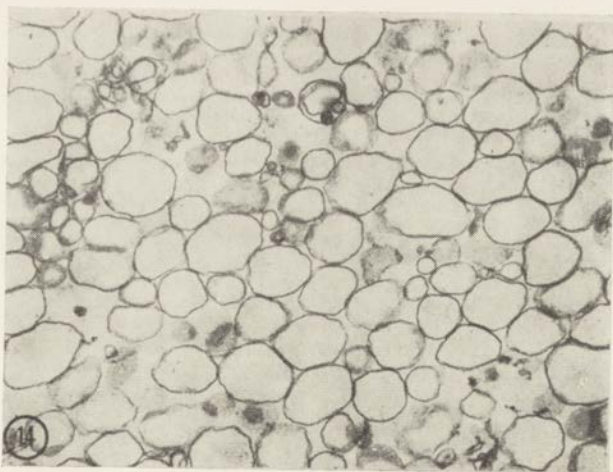
**Rys. 4.** Rozdzielanie błon mitochondrialnych metodą Sottocasy i wsp. (56—58, 63).

Etap 1 — pęcznienie w środowisku hipotonicznym; etap 2 — skurcz pod wpływem hipertonicznego roztworu sacharozy; etap 3 — krótkotrwałe rozbijanie mitochondriów za pomocą ultradźwięków; powstają pęcherzyki błony zewnętrznej (kółka gładkie, porównaj rys. 3), „wycinowane” fragmenty błony wewnętrznej (porównaj rys. 7) i skurczone mitoplasty (zaciemnione); etap 4 — rozdzielanie fragmentów drogą wirowania w gradiencie stężeń sacharozy

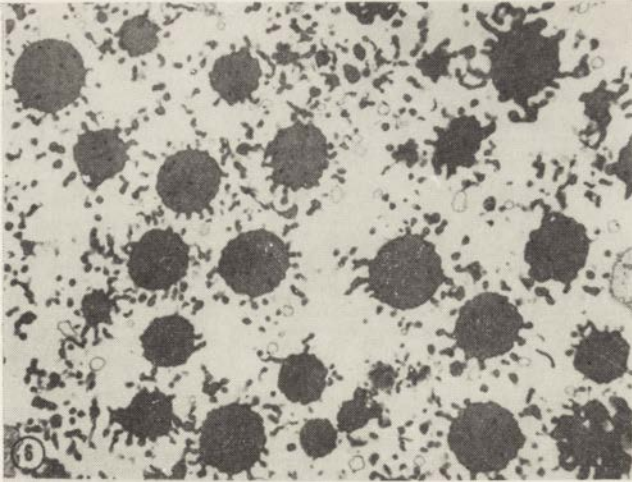
Przedstawione tu metody charakteryzuje po pierwsze ostrożne traktowanie mitochondriów, mające na celu uniknięcie poważniejszych zmian w strukturze i składzie izolowanych błon, po drugie staranne rozdzielanie błon i oddzielanie ich od substancji rozpuszczalnych, pochodzących z przestrzeni międzybłonowej i przestrzeni wewnętrznej. Tych podstawowych zasad nie przestrzega grupa D. E. Greena z Instytutu Badań Enzymatycznych Uniwersytetu stanu Wisconsin. Stosuje ona do rozbicia mitochondriów środki bardziej drastyczne, jak fragmentacja za pomocą ultradźwięków, działanie rozpuszczalnikami organicznymi, detergentami lub fosfolipazą (2, 5, 6, 23). Jest bardzo prawdopodobne, na co szkoła Greena nie zwraca większej uwagi, że przy stosowaniu wyżej wymienionych środków następuje nie tylko oddzielenie błony zewnętrznej od wewnętrznej, lecz także znaczne uszkodzenie błony wewnętrznej i wydostanie się części ma-



**Rys. 2.** Zewnętrzne błony mitochondrialne otrzymane według metody Parsonsa i wsp. (41). Preparat utrwalony czterotlenkiem osmu i poddany „barwieniu negatywowemu”. Fotografia z mikroskopu elektronowego. Powiększenie około 17 000 $\times$ . Według Parsonsa i wsp. (41).



**Rys. 3.** Frakcja zewnętrznych błon mitochondrialnych otrzymana metodą Parsonsa i wsp. (41). Zdjęcie z mikroskopu elektronowego przedstawia pęcherzyki powstałe z fragmentów zewnętrznej błony po jej rozerwaniu. Powiększenie około 35 000 $\times$ . Według Parsonsa i wsp. (41).



**Rys. 5.** Mitochondria pozbawione błony zewnętrznej (mitoplasty) działaniem digitoniny według procedury S ch n a i t m a n a i wsp. (50). Zdjęcie z mikroskopu elektronowego; powiększenie ok. 20 000 $\times$ . Według S ch n a i t m a n a i wsp. (51).



**Rys. 6.** Mitochondrion wątroby szczura uszkodzony pod wpływem pęcznienia, skurczu i działania fosfowolframanu.



trix. W rezultacie frakcje błony zewnętrznej izolowane przez Greena i wsp. zawierają najprawdopodobniej również enzymy przestrzeni wewnętrznej. Jest to przyczyną trwających od kilku lat rozbieżności między grupą Greena (3, 22) i innymi autorami (11, 18, 29, 32, 41, 51, 55, 56, 57) na temat wewnątrzmitochondrialnej lokalizacji enzymów i powodem znacznego zamieszania w tym zakresie.

### III. Właściwości i skład enzymatyczny błon mitochondrialnych

Błony mitochondrialne zewnętrzna i wewnętrzna różnią się między sobą zarówno morfologią, składem chemicznym, właściwościami fizycznymi, jak i zawartością enzymów. Pod względem strukturalnym najbardziej charakterystyczną cechą błony wewnętrznej jest obecność „grzybkowatych” struktur opisanych po raz pierwszy przez Fernández-Morana i wsp. (19) i zaobserwowanych w mikroskopie elektronowym, po zastosowaniu techniki barwienia negatywowego, na wewnętrznej powierzchni błony wewnętrznej (rysunki 1 i 6).

Głównymi pod względem ilościowym składnikami błon mitochondrialnych są białka i fosfolipidy. Wzajemne proporcje tych składników są jednak odmienne w błonie zewnętrznej i wewnętrznej. Błona zewnętrzna zawiera mianowicie znacznie więcej fosfolipidów (41), co powoduje, że jej ciężar właściwy jest niższy. Stwarza to możliwość rozdzielania obu błon za pomocą wirowania w gradiencie stężeń. Również skład fosfolipidów obu błon jest różny. Przedstawia to tablica 1.

Obie błony różnią się znacznie przepuszczalnością. Podczas gdy błona zewnętrzna działa jak sito molekularne, przepuszczając cząsteczki małe, a zatrzymując związki wielkocząsteczkowe (26, 28, 43, 63, 64), błona wewnętrzna ma bardzo ograniczoną przepuszczalność. Mogą przez nią swobodnie przenikać w zasadzie tylko związki obojętne elektrycznie o ciężarze cząsteczkowym nie przekraczającym 100—150 (18, 26, 28). Transport większości metabolitów oraz jonów możliwy jest dzięki obecności specyficznych układów przenośnikowych (14, 15, 21, 26, 28, 47) \*.

Wewnętrzna błona mitochondrialna jest siedliskiem łańcucha oddechowego i sprzężonych z nim procesów przekształcania energii, czyli oksydacyjnej fosforylacji. Pod tym względem istnieje całkowita zgodność badaczy zajmujących się tym problemem. Głównymi donatorami elektronów dla łańcucha oddechowego są, jak wiadomo, zredukowane NAD i bursztynian. Również system utleniający kwasy tłuszczowe i przekazujący pochodzące stąd elektrony na łańcuch oddechowy zlokalizowany jest w błonie wewnętrznej (8). Z poglądem tym, uznawanym przez większość autorów (18), nie zgadza się jednak grupa Greena (4), która uważa, że utlenianie

\* Zagadnienie przepuszczalności błon mitochondrialnych i transportu przez nie metabolitów omówione zostało obszerniej w oddzielnym artykule (62).

Właściwości i skład błon mitochondrialnych wg (18 i 41)

	Błona zewnętrzna	Błona wewnętrzna
Grubość	50—70 Å	50—70 Å
Ciężar właściwy	1,094—1,122	1,192—1,230
Cechy morfologiczne	Gładka	Tworzy wpuklenia („grzebień”) do przestrzeni wewnętrznej. Wewnętrzna powierzchnia pokryta „grzybkowatymi” strukturami.
Przepuszczalność	Przepuszczalna dla związków o ciężarze cząstkowym poniżej 5 000—10 000	Łatwo przepuszczalna dla związków niskocząsteczkowych (c. cz. poniżej 100—150), niejonizowanych. Przepuszczalność wobec większości metabolitów zależna od specyficznych układów transportujących.
Zawartość fosfolipidów (w stosunku do sumy: białka + fosfolipidy)	45%	21%
Skład fosfolipidów (dla mitochondriów wątroby świnki morskiej; w procentach sumy wszystkich fosfolipidów):		
kardiolipina	3,2	21,5
fosfatydyloinozytol	13,5	4,2
fosfatydylocholina	55,2	44,5
fosfatydyloetanolamina	25,3	27,7

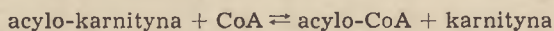
Tablica 1 ciąg dalszy

Właściwości i skład błon mitochondrialnych

<p>Enzymy</p>	<p>cytochrom <math>b_5</math>,                      oksydoreduktazy zred. NAD: cyt. <math>b_5</math>,                      i zred. NAD: cyt. <math>c</math>                      oksydaza monoaminowa                      acylaza glicerofosforanu                      acylazy lizofosfolipidów                      fosfolipaza <math>A_2</math>                      system wydłużający łańcuch kwasów tłuszczowych</p>	<p>łańcuch oddechowy: dehydrogenaza zred. NAD,                      dehydrogenaza bursztynianowa,                      cytochromy <math>b</math>, <math>c_1</math>, <math>c</math>, <math>a</math>, <math>a_3</math>                      układ syntetyzujący ATP, sprzężony z łańcuchem oddechowym                      transacylaza acylo-CoA — karnityna                      system wydłużający łańcuch kwasów tłuszczowych                      dehydrogenazy acylo-CoA</p>
<p>Enzymy</p>	<p>Przestrzeń międzybłonowa</p> <p>kinaza adenylanowa                      kinaza dwufosfonukleozydowa</p>	<p>Przestrzeń wewnętrzna (matrix)</p> <p>syntaza cytrynianu                      akonitaza                      fumaraza                      dehydrogenazy cyklu cytrynianowego (prócz dehydrogenazy bursztynianowej)                      syntetazy acylo-CoA                      kinaza monofosfonukleozydowa                      układ syntezy białek</p>

kwasów tłuszczowych przebiega w błonie zewnętrznej. Jest to jednym z przykładów rozbieżności, o których pisaliśmy w poprzednim rozdziale i które są prawdopodobnie wynikiem niewłaściwej metody rozdziału błon mitochondrialnych przez grupę Greena.

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej zachodzi reakcja transacylacji (38)



Reakcja ta ma duże znaczenie z tego względu, że estry karnitynowe kwasów tłuszczowych (acylo-karnityna) są formą transportową zaktywowanych kwasów tłuszczowych przez błonę mitochondrialną.

W błonie wewnętrznej, a także częściowo w przestrzeni wewnętrznej (matrix), zachodzą na ograniczoną skalę niektóre procesy biosyntetyczne. Stwierdzono mianowicie (9), że mitoplasty (mitochondria pozbawione błony zewnętrznej) mogą wbudowywać aminokwasy do nierozpuszczalnych białek błony wewnętrznej. Również włączanie octanu znakowanego  $^{14}\text{C}$  do kwasów tłuszczowych obserwowano we fragmentach błony wewnętrznej. Chodzi tu jednak głównie o wydłużanie już istniejących łańcuchów kwasów tłuszczowych (16, 45), chociaż w błonie wewnętrznej mitochondriów serca obserwowano także kompletną syntezę łańcucha kwasów tłuszczowych (60).

Zewnętrzna błona mitochondrialna ma zupełnie odmienny skład enzymatyczny. Spośród enzymów oksydoredukcyjnych występują w niej cytochrom  $b_5$  oraz oksydoreduktazy zred. NAD: cytochrom  $b_5$  i zred. NAD: cytochrom  $c$  (32, 41, 56, 57). Ta ostatnia, w przeciwieństwie do układu enzymatycznego przenoszącego elektrony ze zred. NAD na cytochrom  $c$  w łańcuchu oddechowym w błonach wewnętrznych, nie jest hamowana przez rotenon i amytal. Jakie znaczenie ma układ oksydoredukcyjny w błonie zewnętrznej, nie jest dotychczas jasne. Podobny układ występuje również w endoplazmatycznym retikulum.

Zewnętrzna błona mitochondrialna zawiera pewne enzymy biorące udział w syntezie fosfolipidów, mianowicie enzymy prowadzące acylację glicerofosforanu do kwasu fosfatydowego (65) i kwasu lizofosfatydowego (17) oraz acylację lizofosfolipidów do odpowiednich fosfolipidów (49, 59). Tak więc błona zewnętrzna ma pewne ograniczone możliwości syntezy fosfolipidów. Brak jej jednak prawdopodobnie układów mogących tworzyć *de novo* lecytynę i fosfatydyloetanolaminę (33, 65), a więc główne składniki fosfolipidowe błon mitochondrialnych (Tablica 1). Zewnętrzna błona mitochondrialna zawiera także enzym hydrolizujący fosfolipidy — fosfolipazę  $A_2$  (37).

Podobnie jak w błonie wewnętrznej, tak i w błonie zewnętrznej może zachodzić proces wydłużania łańcuchów kwasów tłuszczowych (16, 60), jednakże specyficzność tego procesu w obu błonach jest różna. Enzymem przyjmowanym często za „marker” błony zewnętrznej jest oksydaza monoamin (50).

Grupa Greena reprezentuje pogląd, że w błonie zewnętrznej zachodzi

szereg procesów oksydoredukcyjnych dostarczających zred. NAD dla łańcucha oddechowego, jak reakcje cyklu cytrynianowego (3, 5, 22), utlenianie kwasów tłuszczowych (4) i utlenianie  $\beta$ -hydroksymaślanu (2, 23). Jednakże inni autorzy, zajmujący się lokalizacją enzymów wewnątrz mitochondriów, kategorycznie temu zaprzeczają (8, 11, 18, 29, 41, 55, 56, 57). Jak już wspomniano, przyczyną rozbieżności jest prawdopodobnie znaczne zanieczyszczenie otrzymanywanych przez Greena i wsp. (19, 55) frakcji błon zewnętrznych enzymami błony wewnętrznej a nawet matrix. Obecność dehydrogenaz cyklu cytrynianowego w błonie zewnętrznej byłaby trudna do zrozumienia i z tego względu, że błona wewnętrzna jest nieprzepuszczalna dla nukleotydów nikotynamidowych, które są redukowane przez te dehydrogenazy, a utleniane w łańcuchu oddechowym.

Zgodnie z zapatrywaniem większości autorów cykl cytrynianowy jest zatem zlokalizowany w przestrzeni wewnętrznej (jedynie jedna z dehydrogenaz, mianowicie dehydrogenaza bursztynianowa, znajduje się w błonie wewnętrznej). Do przestrzeni tej wnikają z zewnątrz pirogronian i kwasy tłuszczowe, dla których to związków wewnętrzna błona mitochondrialna jest łatwo przepuszczalna. Natomiast dzięki ograniczonej przepuszczalności dla pośrednich związków cyklu cytrynianowego stężenia ich w przestrzeni wewnętrznej są utrzymywane na poziomie umożliwiającym sprawne funkcjonowanie całego cyklu. Powstający zred. NAD ulega następnie utlenieniu w łańcuchu oddechowym w błonie wewnętrznej, do której od wewnątrz ma łatwy dostęp (patrz rozdział następny).

Przestrzeń wewnętrzna zawiera ponadto enzymy aktywujące kwasy tłuszczowe (1), transaminazy (29, 51), kinazę monofosfonukleozydową (54) i układ prowadzący ograniczoną syntezę białka (9). Bardziej wyczerpujące zestawienie enzymów zawartych w przestrzeni wewnętrznej, a także w innych częściach mitochondriów, znajdzie Czytelnik w artykule Ernsta i Kuylenstierny (18).

Skład enzymatyczny przestrzeni międzybłonowej nie jest dokładnie poznany. Wiadomo, że zawiera ona kinazę adenylnową (50, 51, 54, 58) i kinazę dwufosfonukleozydową (54). W przestrzeni tej znaleziono także dezoksyrybonukleazę (7), a nasze badania (10) wskazują na niezwykle dużą zawartość magnezu, prawdopodobnie w formie związanej.

W świetle opisanej tu lokalizacji enzymów możemy lepiej zrozumieć funkcje poszczególnych części mitochondrionu. Zadaniem błony wewnętrznej i zamkniętej w jej wnętrzu matrix jest utlenianie substratów oddechowych komórki w cyklu cytrynianowym i przy udziale łańcucha oddechowego oraz przetwarzanie uzyskanej w ten sposób energii na energię wiązań fosforanowych ATP. Przy tym cykl cytrynianowy zachodzi w rozpuszczalnej fazie matrix, natomiast łańcuch oddechowy i oksydacyjna fosforylacja, wymagające wysokiego stopnia organizacji molekularnej i ponadmolekularnej, zlokalizowane są w błonie. Przestrzeń zewnętrzna, bogata w kinazę adenylnową i dwufosfonukleozydową, pełni rolę pośrednika w przekazy-

waniu wysokoenergetycznych połączeń fosforanowych z mitochondrionu do reszty komórki. Dzięki tym dwóm enzymom możliwa jest pośrednio fosforylacja nie tylko ADP, ale także AMP i dwufosfonukleozydów nieadeninowych. Nie jest natomiast zrozumiała dotychczas rola błony zewnętrznej. Jedną z jej funkcji jest prawdopodobnie utrzymanie w przestrzeni międzybłonowej obecnych tam enzymów. Natomiast rola zawartych w błonie zewnętrznej enzymów oksydoredukcyjnych, podobnie jak i znaczenie dla metabolizmu komórkowego zachodzących tam niektórych procesów syntezy fosfolipidów, pozostają niejasne.

Pod względem układu enzymatycznego i właściwości fizykochemicznych zewnętrzna błona mitochondrialna jest podobna, choć nie identyczna, do endoplazmatycznego retikulum. Wydaje się prawdopodobne, że obie te struktury mają wspólne pochodzenie; inaczej mówiąc, że zewnętrzna błona mitochondrialna jest wyspecjalizowaną i zmienioną częścią błon retikulum.

#### IV. Enzymatyczna organizacja błony wewnętrznej

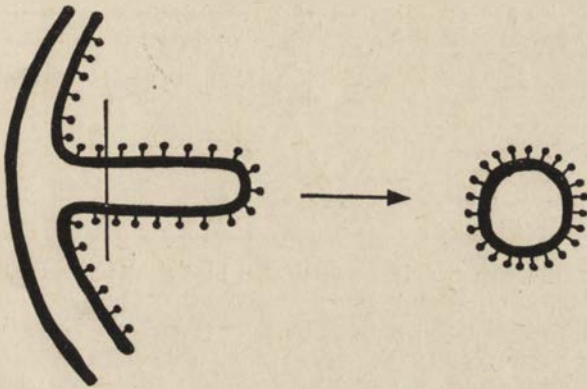
Wewnętrzna błona mitochondrialna jest asymetryczna zarówno pod względem morfologicznym, funkcjonalnym, jak i organizacji enzymatycznej. Asymetria morfologiczna przejawia się przede wszystkim obecnością „grzybkowatych” struktur (rysunki 1 i 6), które barwienie negatywowe preparatów do mikroskopu elektronowego ujawnia tylko po wewnętrznej stronie błony. Uważa się obecnie za udowodnione (48), że w tych strukturach jest zlokalizowany tak zwany czynnik sprzęgający  $F_1$ , wykryty przez grupę R a c k e r a (44), a będący częścią układu enzymatycznego, warunkującego sprzęgnięta z transportem elektronów syntezę ATP.

Przykładem asymetrii funkcjonalnej jest jednokierunkowy transport jonów sprzężony z transportem elektronów w łańcuchu oddechowym lub z hydrolizą ATP. Mianowicie, reakcjom oksydoredukcyjnym zachodzącym w błonie wewnętrznej towarzyszy segregacja jonów  $H^+$  i  $OH^-$  po obu stronach błony, prowadząca do akumulacji jonów  $H^+$  na zewnętrznej, zaś jonów  $OH^-$  na wewnętrznej stronie błony. Powstałe w ten sposób gradient stężeń (gradient  $pH$ ) i różnica potencjałów elektrostatycznych są siłą napędową transportu szeregu substancji przez błonę mitochondrialną (14, 26, 39).

Najświeższym osiągnięciem w dziedzinie biochemii mitochondriów jest stwierdzenie asymetrycznego ułożenia enzymów łańcucha oddechowego w błonie wewnętrznej. Na podstawie licznych obserwacji wiadomo, że cząstki submitochondrialne, powstałe przez rozbijanie mitochondriów ultradźwiękami, mają w większości odwróconą konfigurację błony. Ilustruje to rysunek 7. W cząstkach tych grzybkowate struktury eksponowane są na zewnątrz, podczas gdy w całych mitochondriach skierowane są ku prze-

strzeni wewnętrznej. Warunkuje to odmienne właściwości cząstek submitochondrialnych w porównaniu z mitochondriami, a jednocześnie ułatwia badanie konfiguracji błony.

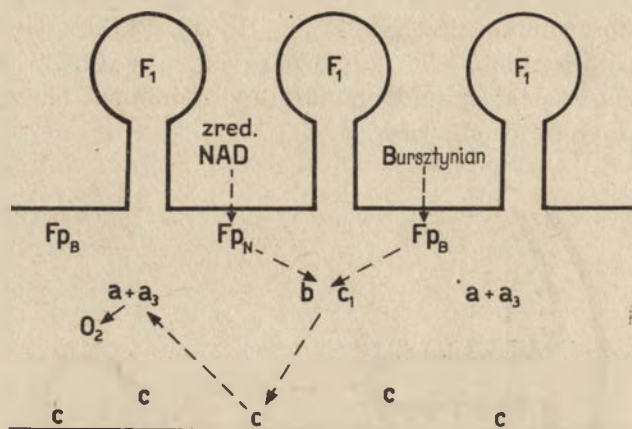
Obecność czynnika sprzęgającego  $F_1$  (44) po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej (a zatem po zewnętrznej stronie cząstek submitochondrialnych) potwierdziły badania Fessenden a i Rackera (20) z zastosowaniem przeciwciał przeciw  $F_1$ . Okazało się, że przeciwciała te hamują czynność ATPazy (będącą jedną z funkcji czynnika  $F_1$ ), jeśli działają na cząstki submitochondrialne, natomiast nie mają wpływu na ATPazę całych mitochondriów.



**Rys. 7.** Schemat ilustrujący powstawanie fragmentów błony wewnętrznej (cząstek submitochondrialnych). Pionowa linia wskazuje miejsce rozerwania błony.

Za punkt wyjścia badań nad lokalizacją cytochromów posłużyły obserwacje Muscatello i Carafoliego (36), że submitochondrialne cząstki otrzymane w wyniku rozbijania mitochondriów ultradźwiękami słabo utleniają dodany cytochrom *c*, w przeciwieństwie do mitoplastów i mitochondriów zsolubilizowanych za pomocą detergentów, utleniających go ze znaczną szybkością. Dane te wskazują, że oksydaza cytochromowa jest łatwiej dostępna od zewnętrznej strony wewnętrznej błony mitochondrialnej niż od jej strony wewnętrznej. Przypuszcza się obecnie (12, 27), że jest to uwarunkowane związaniem mitochondrialnego cytochromu *c* w pobliżu zewnętrznej powierzchni błony wewnętrznej. Wydaje się bowiem mało prawdopodobne, aby dodany z zewnątrz cytochrom *c* mógł bezpośrednio reagować z oksydazą cytochromową. Właściwym substratem (donatorem elektronów) dla tego enzymu jest cytochrom *c* związany z błoną. A zatem dostępność oksydazy cytochromowej dla zewnętrznego cytochromu *c* od strony zewnętrznej, lecz nie wewnętrznej powierzchni wskazywałaby na zlokalizowanie związanego cytochromu *c* właśnie w pobliżu powierzchni zewnętrznej. Potwierdzają to doświadczenia z zastosowaniem przeciwciał przeciw cytochromowi *c* (12) oraz sztucznego, nieprzenikającego

go przez wewnętrzną błonę mitochondrialną akceptora elektronów dla cytochromu  $c$ , jakim jest żelazycyjanek (27). Natomiast sama oksydaza cytochromowa (cytochromy  $a+a_3$ ) oraz cytochromy  $b$  i  $c_1$  są prawdopodobnie umiejscowione w pewnym oddaleniu zarówno od zewnętrznej jak i wewnętrznej powierzchni błony (12, 27). Ilustruje to rysunek 8.



**Rys. 8.** Enzymatyczna organizacja wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wewnętrzna strona błony skierowana jest na rysunku ku górze i pokryta „grzybkowatymi” strukturami zawierającymi czynnik sprzęgający ( $F_1$ ). Pozostałe oznaczenia:  $a, a_3, b, c, c_1$  — odpowiednie cytochromy,  $Fp_H$  — flawoproteidowa dehydrogenaza zred. NAD,  $Fp_B$  — dehydrogenaza bursztynianowa. Linia przerywaną i strzałkami oznaczono kierunek transportu elektronów

Nieco odmienny pogląd na lokalizację układu cytochromowego wyrażają Chance i wsp. (13). Postulują oni istnienie dwóch niezależnych łańcuchów cytochromowych  $c_1-c-a-a_3$ , jednego dostępnego z zewnętrznej, drugiego — z wewnętrznej strony błony, przy czym tylko transport elektronów w łańcuchu „zewnątrznym” byłby sprzężony z fosforylacją. Brak fosforylacji przy utlenianiu cytochromu  $c$  przez cząstki submitochondrialne, a więc przy udziale „wewnętrznego” łańcucha cytochromowego obserwowali także Burstein i Racker (12). Nasuwa się jednak pytanie, czy wewnętrzny łańcuch cytochromowy istnieje także w niezniszczonych mitochondriach, a jeśli tak, to jaką odgrywa rolę, czy też jest artefaktem powstałym w trakcie otrzymywania cząstek submitochondrialnych.

Istnieje szereg danych wskazujących, że związane z łańcuchem oddechowym dehydrogenazy flawinowe (dehydrogenaza zred. NAD i dehydrogenaza bursztynianowa) zlokalizowane są w pobliżu wewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej. Po pierwsze, wiadomo, że tylko wewnętrzny zred. NAD może być utleniany przez łańcuch oddechowy mitochondriów. To samo wydaje się słuszne również dla bursztynianu (46). Po drugie, ekstrakcja dehydrogenazy bursztynianowej z mitochondriów



możliwa jest dopiero po ich rozbiciu (25). Podobnie rekonstrukcja oksydazy bursztynianowej za pomocą rozpuszczalnej dehydrogenazy (25), czyli ponowne włączenie się dehydrogenazy do łańcucha oddechowego, zachodzi na cząstkach submitochondrialnych, a więc na wycinowanych fragmentach wewnętrznej błony (rysunek 7).

W rezultacie otrzymujemy obraz ułożenia enzymów łańcucha oddechowego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej taki, jak to pokazuje w uproszczeniu \* rysunek 8. Wynika z niego, że transport elektronów wzdłuż łańcucha przebiega po linii zygzakowatej, oscylując między dwiema powierzchniami błony. Taki przebieg procesów oksydoredukcyjnych w błonie mitochondrialnej jest zgodny z założeniami „chemiosmotycznej” teorii oksydacyjnej fosforylacji (34).

#### LITERATURA

1. Aas M., Bremer J., *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 157 (1968).
2. Allmann D. W., Bachmann E., Green D. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 165 (1966).
3. Allmann D. W., Bachmann E., Orme-Johnson N., Tan W. C., Green D. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 981 (1968).
4. Allmann D. W., Galzinga L., MacCaman R. E., Green D. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 413 (1966).
5. Bachmann E., Allmann D. W., Green D. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 153 (1966).
6. Bachmann E., Lenaz G., Perdue J. F., Orme-Johnson N., Green D. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 73 (1967).
7. Baudhuin P., Hertoghe-Lefèvre E., de Duve C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **35**, 548 (1969).
8. Beattie D. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 57 (1968).
9. Beattie D. S., Basford R. E., Koritz S. B., *Biochemistry* **6**, 3099 (1967).
10. Bogucka K., Wojtczak L., w przygotowaniu do druku.
11. Brdiczka D., Pette D., Brunner G., Miller F., *Eur. J. Biochem.* **5**, 294 (1968).
12. Burstein C., Racker E., 8th Intern. Congress Biochem., Switzerland, 1970, Abstracts, str. 161.
13. Chance B., Erecińska M., Lee C. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 928 (1970).
14. Chappell J. B., Crofts A. R., w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (BBA Library, tom VII), red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello i E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 293.
15. Chappell J. B., Haarhoff K. N., w Biochemistry of Mitochondria, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga i L. Wojtczak, PWN i Academic Press, Warszawa i Londyn 1967, str. 75.
16. Colli W., Hinkle P. C., Pullman M. E., *J. Biol. Chem.* **214**, 6432 (1969).
17. Daae L. N. W., Bremer J., *Biochim. Biophys. Acta* **210**, 92 (1970).

\* Rys. 8 nie uwzględnia postulowanego przez Chance'a i wsp. (13) istnienia dwóch łańcuchów cytochromowych.

18. Ernster L., Kuylenstierna B., w *Mitochondria—Structure and Function*, red. L. Ernster i Z. Drahota, Academic Press, Londyn i New York 1969, str. 5.
19. Fernández-Morán H., Oda T., Blair P. V., Green D. E., *J. Cell Biol.* **22**, 63 (1964).
20. Fessenden J. M., Racker E., *J. Biol. Chem.* **241**, 2483 (1966).
21. Fonyo A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 624 (1968).
22. Green D. E., Allmann D. W., Harris R. A., Tan W. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 368 (1968).
23. Green D. E., Bachmann E., Allmann D. W., Perdue J. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 172 (1966).
24. Hoppel C., Cooper C., *Biochem. J.* **107**, 367 (1968).
25. Keilin D., King T. E., *Proc. Roy. Soc., Ser. B* **152**, 163 (1960).
26. Klingenberg M., *FEBS Letters* **6**, 145 (1970).
27. Klingenberg M., 8th Intern. Congress Biochem., Switzerland 1970, Abstracts, str. 154.
28. Klingenberg M., Pfaff E., w *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (BBA Library, tom VII), red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello i E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 180.
29. Landriscina C., Papa S., Coratelli P., Mazzarella L., Quagliariello E., *Biochim. Biophys. Acta* **205**, 136 (1970).
30. Lévy M., Toury R., André J., *Compt. Rend. Acad. Sci., Ser. D* **262**, 1593 (1966).
31. Lévy M., Toury R., André J., *Compt. Rend. Acad. Sci., Ser. D* **263**, 1766 (1966).
32. Lévy M., Toury R., André J., *Biochem. Biophys. Acta* **135**, 599 (1967).
33. McMurray W. C., Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **112**, 91 (1969).
34. Mitchell P., Moyle J., *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga i L. Wojtczak, P.W.N. i Academic Press, Warszawa i Londyn, 1967, str. 53.
35. Morton D. J., Hoppel C., Cooper C., *Biochem. J.* **107**, 377 (1968).
36. Muscatello U., Carafoli E., *J. Cell Biol.* **40**, 602 (1969).
37. Nachbaur J., Vignais P. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 315 (1968).
38. Norum K. R., Farstad M., Bremer J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 797 (1966).
39. Papa S., Lofrumento N. E., Loglisci M., Quagliariello E., *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 311 (1969).
40. Parsons D. F., Williams G. R., Chance B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 643 (1966).
41. Parsons D. F., Williams G. R., Thompson W., Wilson D., Chance B., w *Mitochondrial Structure and Compartmentation*, red. E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater i J. M. Tager, Adriatica Editrice, Bari 1967, str. 29.
42. Pette D., w *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello i E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam, 1966, str. 28.
43. Pfaff E., Klingenberg M., Ritt E., Vogell W., *Eur. J. Biochem.* **5**, 222 (1968).
44. Pullman M. E., Penefsky H. S., Datta A., Racker E., *J. Biol. Chem.* **235**, 3322 (1960).
45. Quagliariello E., Landriscina C., Coratelli P., *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 12 (1968).
46. Quagliariello E., Palmieri F., *Eur. J. Biochem.* **4**, 20 (1968).
47. Quagliariello E., Papa S., Meijer A. J., Tager J. M., w *Mitochondria—Structure and Function*, red. L. Ernster i Z. Drahota, Academic Press, Londyn i New York 1969, str. 335.

48. Racker E., Horstman L. L., *J. Biol. Chem.* **242**, 2547 (1967).
49. Sarzała M. G., van Golde L. M. G., de Kruyff B., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 106 (1970).
50. Schnaitman C., Erwin V. G., Greenwalt J. W., *J. Cell Biol.* **32**, 719 (1967).
51. Schnaitman C., Greenwalt J. W., *J. Cell Biol.* **38**, 158 (1968).
52. Schneider W. C., *J. Biol. Chem.* **176**, 259 (1948).
53. Schneider W. C., 3-ème Congrès Intern. Bioch., Conférences et Rapports, Bruxelles 1955, Imprimerie H. Vaillant-Carmanne S. A., Liège 1956, str. 305.
54. Silva-Lima M., Nachbaur G., Vignais P., *Compt. Rend. Acad. Sci., Ser. D* **266**, 739 (1968).
55. Smoly J. M., Kuylenstierna B., Ernster L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 125 (1970).
56. Sottocasa G. L., Ernster L., Kuylenstierna B., Bergstrand A., Mitochondrial Structure and Compartmentation, red. E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater i J. M. Tager, Adriatica Editrice, Bari 1967, str. 74.
57. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A., *J. Cell Biol.* **32**, 415 (1967).
58. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A., w *Methods in Enzymology*, red. R. W. Estabrook i M. E. Pullman, Academic Press, New York 1967, t. 10, str. 448.
59. Stoffel W., Schiefer H. G., *Z. Physiol. Chem.* **349**, 1017 (1968).
60. Whereat A. F., Orishimo M. W., Nelson J., *J. Biol. Chem.* **214**, 6498 (1969).
61. Włodawer P., Parsons D. F., Williams G. R., Wojtczak L., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 34 (1966).
62. Wojtczak L., *Monografie Biochemiczne*, w druku.
63. Wojtczak L., Sottocasa G. L., w przygotowaniu do druku.
64. Wojtczak L., Załuska H., *Biochim. Biophys. Acta* **193**, 64 (1969).
65. Zborowski J., Wojtczak L., *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 73 (1969).



STEFAN KLITA \*

## Retikulum endoplazmatyczne a biosynteza białka

### Endoplasmic Reticulum and the Biosynthesis of Protein

The biochemical characteristics of membranes of endoplasmic reticulum and their role in protein biosynthesis are reviewed

Olbrymi rozwój cytologii i biochemii w ciągu ostatnich lat sprawił, że coraz dokładniej poznajemy budowę komórek. Wysoce wyspecjalizowana aparatura, a przede wszystkim mikroskopy elektronowe o dużej zdolności rozdzielczej, pozwalają cytologowi wnikać w subtelną strukturę najdelikatniejszych organelli komórkowych. Otrzymujemy w ten sposób obraz przestrzennej organizacji wewnątrzkomórkowej, ale jest to obraz statyczny. Dynamizuje go dopiero praca biochemika, który, najogólniej mówiąc, szuka zależności między strukturą a funkcją. Tak z punktu widzenia budowy, jak i procesów biochemicznych, wewnątrz komórki jest wybitnie zróżnicowane. Błonki cytoplazmatyczne dzielą je na szereg wypełnionych plazmą komór czy pęcherzyków, nie są też równomiernie rozmieszczone poszczególne enzymy lub ich zespoły. Trójwymiarowa siatka błon cytoplazmatycznych nosi nazwę cytoplazmatycznego systemu wakuolarnego. Jego składowymi są: retikulum endoplazmatyczne, otoczka jądrowa i tzw. aparat Golgiego.

Pierwsze doniesienie o istnieniu endoplazmatycznego retikulum (ER) pochodzi z 1945 roku, a zawdzięczamy je Porterowi i wsp. (36). ER odkryto w fibroblastach hodowanych *in vitro*. Przestrzenna siateczka układu retikulocytarnego tworzy system jamek różnej wielkości, a także duże, spłaszczone woreczki, tzw. cysterny. Retikulum endoplazmatyczne nie jest rozmieszczone równomiernie w całej cytoplazmie. Większe skupiska błon widać w sąsiedztwie jądra komórkowego i mitochondriów (3). W poszczególnych komórkach układ retikulocytarny jest rozbudowany w niejednakowym stopniu. Jest on stosunkowo najprostszy w komórkach embrjonalnych, w innych zaś staje się coraz bardziej złożony w miarę ich różnicowania się. W retikulocytach natomiast błonki ER zanikają wtórnie. Silnie rozwinięte retikulum endoplazmatyczne spotykamy z zasady w komórkach cechujących się szybkim tempem syntezy białka.

Część błon retikulocytarnych jest związana z rybosomami. Nazywamy

\* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

je błonami szorstkimi (ang. *rough membranes*). Pozbawione rybosomów retikulum nosi nazwę błon gładkich (ang. *smooth membranes*).

Jeżeli wirujemy postmitochondrialny supernatant z tkanki np. wątrobowej przez 60 minut przy 105 000 g, na dnie próbówki osadzają się tzw. mikrosomy, preparat szczególnie zasobny w fosfolipidy i kwasy nukleino-we (14, 15). Mikrosomy składają się z fragmentów szorstkiego i gładkiego ER oraz nie związanych z błonami rybosomów i polirybosomów (4, 12, 24, 31, 33). Mikrosomy bywają zwykle punktem wyjścia dla dalszej preparatyki, której celem jest otrzymanie rybosomów, bądź czystych błon ER. Do oddzielenia rybosomów od błon ER zastosowano dezoksychołan sodu (DOC) (27, 33). Użyty w odpowiednim stężeniu, detergent ten nie uszkadza rybosomów rozpuszczając jednocześnie same błony. Rozdzielenie ER na błony szorstkie i gładkie uzyskano stosując ultrawierowanie w gradiencie stężenia sacharozy (16, 29, 31). Z otrzymanych podfrakcji wyosabniano następnie oczyszczone już błonki działaniem 0,5% DOC. Niedogodnością tych metod był znaczny stopień degradacji samych błon powodowany względnie wysokim stężeniem detergentu. Zmniejszono zatem stężenie detergentu do 0,26% (17). Ta metoda pozwalała na otrzymanie preparatów wolnych od rybosomów, lecz i tu stałe uwalnianie się białek i fosfolipidów z ER wskazywało na powolny wprawdzie, lecz stały rozpad błon. Okazało się przy tym, że jedne enzymy obecne w ER są z nim związane trwale, inne zaś — raczej luźno. Całkowicie obejść się bez detergentów pozwalają jedynie metody oparte o ultrawierowanie (5, 8, 13, 28, 44, 45). Stosuje się tu bądź roztwór sacharozy o gęstości niższej od gęstości rybosomów, a wyższej od ER, bądź też liniowo rosnący od 1,13 do 1,26M gradient stężenia sacharozy. W tym drugim przypadku można wirowane mikrosomy rozdzielić na 3 frakcje lokujące się na poziomie gęstości 1,28—1,26, 1,26—1,21 oraz 1,21—1,13M sacharozy. Zmieniając odpowiednio gęstości sacharozy zdołano rozdzielić błony szorstkie na dwie różne frakcje.

## I. Charakterystyka biochemiczna błon retikulum endoplazmatycznego

Powszechnie przyjmuje się dzisiaj, że obecne w ER kwasy nukleinowe skupione są nie tylko w rybosomach (37, 39). Wysoce oczyszczone gładkie błony retikulum, a więc materiał nie związany z rybosomami, zawierają RNA bez względu na technikę ich wyodrębniania (13, 40, 43). Skład zasad RNA z błon gładkich ER wyraźnie różni się od składu RNA rybosomowego czy przenoszącego (13, 19, 40). Rozdzielany na kolumnach z żelom *Sephadex G-200* lub z metylowaną albuminą RNA błon gładkich jest niejednorodny (40, 43), a wirowany w gradiencie stężeń sacharozy dzieli się na dwie frakcje o stałych sedymentacji 28S i 18S (2, 34). Choć odpowiada to stałym sedymentacji RNA podjednostek rybosomowych, to jednak w rybo-

somach stosunek RNA 28S/RNA 18S równy jest 2, zaś w przypadku RNA z gładkich błon retikulum stosunek ten wynosi 2,5. Doświadczenia z zastosowaniem znakowanych prekursorów wykazały też, że aktywność metaboliczna RNA z retikulum endoplazmatycznego jest wyższa niż rRNA (2). Biologiczna rola RNA występującego w błonach ER poza rybosomami jest jeszcze niejasna. Można przypuszczać, że uczestniczy on w przyłączaniu się rybosomów lub polirybosomów do tych błon.

Wielu autorów było zdania, że błony szorstkie odróżnia od gładkich wyłącznie obecność rybosomów (38). Skład fosfolipidowy, zawartość aminokwasów w białkach, rozmieszczenie enzymów, piętno odnajdowane po podaniu zwierzęciu radioaktywnych prekursorów były takie same zarówno w gładkich jak i w szorstkich błonach retikulum (29). Udoskonalenie metod badawczych wpłynęło na zmianę tych poglądów. Wykazano, że błony gładkie są jednak bogatsze w fosfolipidy niż szorstkie, mimo zbliżonej zawartości kwasów tłuszczowych (1). Czynnikiem różnicującym jest zawartość cholesterolu. Stosunek molowy fosfolipidów do cholesterolu wynosi 15 w błonach szorstkich, a tylko 4 w błonach gładkich ER. Cholesterol zawarty w gładkich błonach ER stanowi aż 75% całkowitego cholesterolu komórki wątrobowej (1). Nierównomierny jest też podział związanych z endoplazmatycznym retikulum enzymów między oba rodzaje tych błon. Jeszcze w 1961 roku Fouts (18) zauważył, że pewne enzymy związane z metabolizmem leków podanych zwierzęciu znajdują się w błonach gładkich ER. Dzisiaj przyjmuje się powszechnie, że gładkie retikulum uczestniczy w procesach detoksykacji, metabolizmie steroidów oraz w magazynowaniu glikogenu (35, 38). Potwierdzono też istotną rolę gładkich błon retikulum w syntezie cholesterolu w wątrobie (1).

Udział błon szorstkich ER w procesach biosyntezy białka w komórce wynika z obecności aktywnych rybosomów na powierzchni tych błon. Nie znamy jednak zakresu uczestnictwa samej błony w tym procesie. W związku z istnieniem szorstkich i gładkich błon retikulum Yvonne Moulé (30) stawia ciekawy problem: czy oba rodzaje błon ER są potencjalnie zdolne do łączenia się z rybosomami? Mogłoby to przecież być proces regulowany przez lokalne i aktualne warunki strukturalne i biochemiczne wewnątrz komórki. W rozważaniach nad tym zjawiskiem pomocna byłaby znajomość struktury elementarnej błon ER. W mikroskopie elektronowym o dużej zdolności rozdzielczej otrzymano obrazy, na których gładkie błony ER mają budowę mozaikową, złożoną z szeregu podobnych do siebie komponentów globularnych. Zdaniem Moulé, mogłyby one odpowiadać powtarzającym się jednostkom (*repeating units*) izolowanym przez Greena i wsp. (20) z błon różnego pochodzenia. Można przypuszczać, że właśnie na poziomie tych jednostek rozstrzyga się heterogenność funkcjonalna błon, w tym również błon retikulum endoplazmatycznego. Każda taka jednostka byłaby określoną całością z punktu widzenia składu chemicznego — a zwłaszcza zawartych w niej enzymów. O niezdolności błon gładkich retikulum

do wiązania się z rybosomami mogłaby według Moulé decydować np. wysoka zawartość cholesterolu. Ciekawym przyczynkiem do rozważań nad różnicami między szorstkimi i gładkimi błonami ER są spostrzeżenia Dallnera i wsp. (16), że w stadium embrionalnym komórki wątrobowe zawierają zasadniczo tylko szorstkie retikulum. Dopiero w czasie rozwoju postnatalnego obserwuje się w komórkach wątroby znaczny przyrost gładkich błon retikulum. Zdaniem Dallnera, szorstkie retikulum jest miejscem syntezy elementów gładkich błon ER.

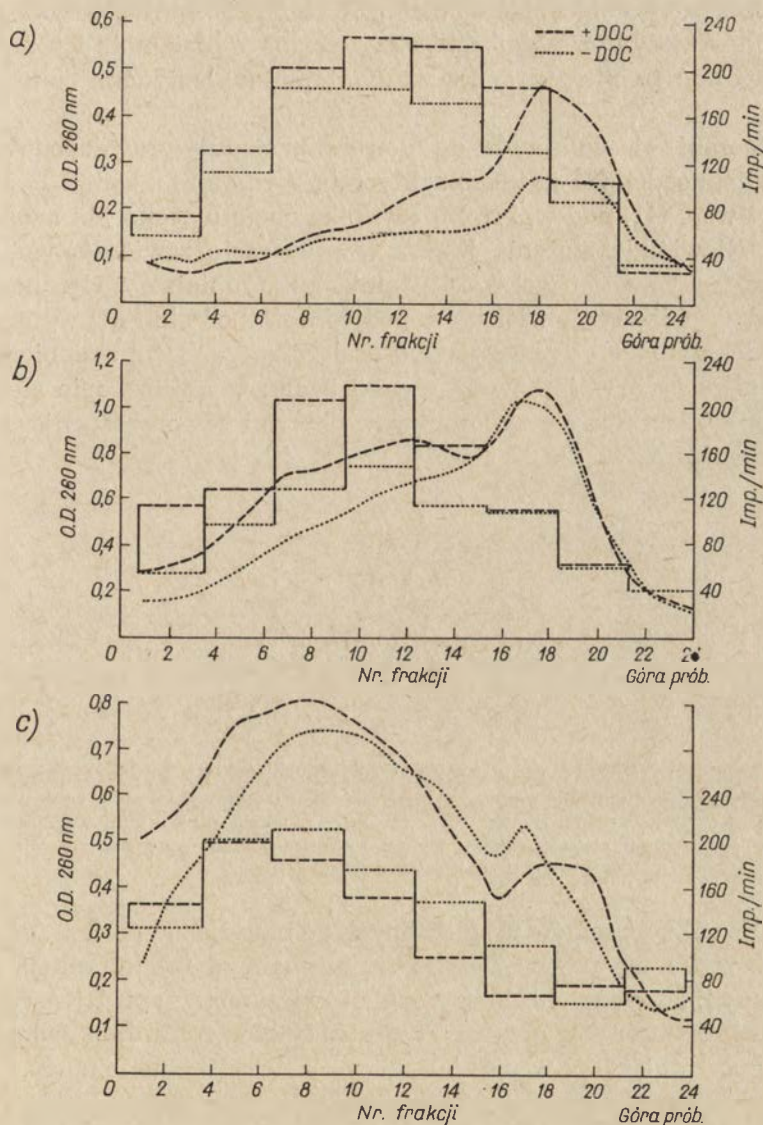
## II. Retikulum endoplazmatyczne i biosynteza białka

Do niedawna jeszcze nie było pewności, czy z błonami szorstkimi retikulum połączone są wolne rybosomy, czy też polirybosomy, bowiem potraktowanie frakcji mikrosomalnej detergentami uwalniało z niej jedynie monosomy oraz ich dimery. Wprawdzie już w 1963 roku Wettstein, Staehelin i Noll (46) wydzielili, jako pierwsi, polisomy z wątroby, lecz materiałem wyjściowym w ich doświadczeniach był postmitochondrialny supernatant, a nie mikrosomy oczyszczone. Wyjaśnienie sprawy zawdzięczamy Lawfordowi i wsp. (24), oraz Blobelowi i Potterowi (4). Okazało się, że detergent aktywuje obecny w mikrosomach enzym nukleolityczny degradujący polisomy. We frakcji rozpuszczalnych białek komórkowych znajduje się jednak naturalny inhibitor tej RNazy. Polisomy udało się wyodrębnić z mikrosomów prowadząc preparatykę w obecności frakcji zawierającej inhibitor. Inhibitor ten został następnie oczyszczony przez Lawforda i Schachtera (25). Polisomy połączone z błonami retikulum endoplazmatycznego nazywamy polisomami związanymi. Nie wszystkie polisomy we frakcji mikrosomalnej są jednak związane z błonami ER. Wykazali to Henshaw i wsp. (21), posługując się wirowaniem w gradiencie stężeń sacharozy. Są pewne dane, że oprócz polisomów silnie związanych z ER i polisomów wolnych, frakcja mikrosomalna zawiera też bardzo słabo związane z błonami polisomy, które można izolować bez stosowania DOC (7). Okazało się dalej, że polisomy mocno związane z błonami ER mają stosunkowo duże wymiary. Ciekawe są spostrzeżenia Webba i wsp. (45) na temat wzajemnego stosunku ilościowego polisomów wolnych i związanych w wątrobie. Otóż jeśli w wątrobie normalnej lub regenerującej 60—70% polisomów znajdują się w stanie związanym, to w komórkach wątroby dotkniętej chorobą nowotworową ilość ich spada. W krańcowym przypadku (hepatoma Novikoffa) nie ma prawie wcale polisomów związanych.

Całkowita ilość polisomów wątrobowych, tak wolnych, jak i związanych z błonami ER, poziom radioaktywności odnaleziony w nich po po-



daniu zwierzęciu znakowanego aminokwasu, a także stosunek monosomów do polisomów — są wartościami zmiennymi. W normalnych warunkach zależą one od wieku zwierzęcia. Rysunki 1a, 1b i 1c przedstawiają kolejno



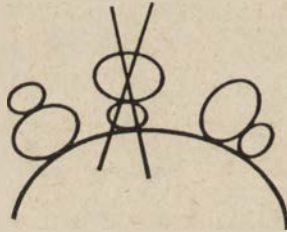
**Rys. 1a, b, c.** Profile gęstości optycznej i radioaktywności rybosomów i polisomów z wątroby szczura 1-dniowego (1a), 5-dniowego (1b) i dorosłego (1c) wg (10)

Polirybosomy izolowano metodą Webb'a i wsp. (44), następnie wirowano je w gradiencie stężenia sacharozy 10–40% i zbierano frakcje o objętości 1 ml (11). Dla oznaczenia radioaktywności łączono frakcje w grupy po 3, wytrącano białko i mierzono jego aktywność w liczniku scyntylacyjnym

doświadczenia przeprowadzone na wątrobie szczura jednodniowego, pięciodniowego oraz dorosłego.

Z rysunków wynika, że zwiększona proporcja pojedynczych rybosomów do polirybosomów jest cechą pierwszych dni życia zwierzęcia, potem zaś maleje. Zarówno wolne, jak i związane polisomy noszą piętno, aktywnie zatem uczestniczą w biosyntezie białka. Wolne rybosomy nie biorą udziału jako takie w biosyntezie białka *in vivo*, lecz po wydzieleniu ich mogą one współpracować *in vitro* z syntetycznymi polinukleotydami jako matrycami (9).

Przyłączanie się polisomów do błon ER następuje prawdopodobnie poprzez podjednostkę 60S każdego rybosomu. Wynika to z badań Sabatini'ego i wsp. (41) nad wpływem czynnika chelatującego jon magnezowy (EDTA). Niewielkie stężenie EDTA w preparacie zawierającym mikrosomy z wątroby świnki morskiej uwalnia tylko mniejsze podjednostki rybosomów, zaś odłączenie większych podjednostek od błon ER wymaga dalszego zwiększania stężenia związku chelatującego. Uzupełnieniem i potwierdzeniem tych wniosków są wyniki badań w mikroskopie elektronowym. Sposób łączenia się rybosomów z błonami ER przedstawia schematycznie rysunek 2.



**Rys. 2.** Trojaka możliwość przyłączania się rybosomów do powierzchni błony ER. Wiązanie się za pośrednictwem mniejszej podjednostki zostało wykluczone w wyniku badań z zastosowaniem EDTA (przekreślone). Wyboru między dwoma pozostałymi wariantami dokonano dzięki mikroskopii elektronowej. Przyjmuje się interakcję tylko poprzez większą podjednostkę rybosomu (41)

Wrażliwość rybosomów przyłączonych do błon ER na poziom jonu magnezowego rzuca też pewne światło na mechanizm tej interakcji. Można przypuszczać, że mamy tu do czynienia z wiązaniem typu RNA-RNA lub RNA-białko rybosomów, przy czym ze strony błon retikulum endoplazmatycznego uczestniczyły w nim ich własny kwas rybonukleinowy.

### Uwagi końcowe

Przytoczone wyżej fakty są tylko niewielkim fragmentem rozległego frontu badań nad retikulum endoplazmatycznym. Niemniej i z tego wynika jasno, że ER przestało być domeną badaczy zajmujących się tylko

strukturą komórki. Komórki wątroby, organu będącego najczęściej źródłem materiału do wielorakich badań, wykazują się dużą intensywnością biosyntezy białka. Wiadomo, że w toku syntezy powstają białka tak na potrzeby własne komórki (białka struktury, enzymy), jak i na potrzeby całego organizmu (np. albuminy osocza krwi). Obecność w komórce dwóch klas polirybosomów, tych związanych z retikulum, oraz innych, wolnych, a jeśli związanych to z błonami cytoplazmatycznymi innymi niż ER, nie jest zapewne przypadkowa. Należy się spodziewać ścisłego rozgraniczenia funkcji jednych i drugich. Pewne fakty są już znane: np. białka osocza krwi syntetyzowane są przez polisomy związane z ER (42), a podobnie powstaje też katalaza (22). Nie ma natomiast jeszcze pewności co do miejsca syntezy reduktazy zredu. NADP-cytochrom c, ani też rozpuszczalnych enzymów cytoplazmatycznych. Jeśliby podział na białka syntetyzowane przez polisomy wolne i związane z błonami ER miał się okazać ścisły, to powstaje pytanie, która ze składowych polirybosomu jest za to odpowiedzialna. Poznanie kodu genetycznego nie pozostawia wątpliwości, że struktura polipeptydu jest determinowana przez strukturę mRNA (26). Wiemy jednak, że mRNA nie uczestniczy w przyłączaniu się polisomu do powierzchni błony ER (6, 32). Pozostają zatem rybosomy. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że według coraz powszechniejszej opinii rybosomy nie są homogenne z punktu widzenia budowy, a być może i funkcji (23). Można założyć, że cząsteczka mRNA specyficznego np. dla katalazy może utworzyć polisom tylko z określoną klasą rybosomów, zawsze takich samych, te zaś miałyby możliwość przyłączania się do błon ER. Należałoby ponadto eksperymentalnie dowieść, że są rybosomy pozbawione możliwości interakcji z ER. One z kolei, w połączeniu ze specyficznymi tylko dla siebie łańcuchami mRNA, tworzyłyby populację polisomów wolnych. Byłoby to dość skomplikowane, lecz prawdopodobne, zjawisko wzajemnej specyficzności pomiędzy mRNA, rybosomami i retikulum endoplazmatycznym. Błony ER są tu zapewne aktywnym partnerem, tym samym więc skupiają na sobie szczególną uwagę.

#### LITERATURA

1. Auliac P. B., Praca Doktorska, Uniwersytet Paryski 1967, cyt. wg Yvonne Moulé w *Structure and Function of the Endoplasmic Reticulum in Animal Cells*, red. F. C. Gran, Universitetsforlaget, Oslo, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 9.
2. Bergeron-Bouvet C., Moulé Y., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 617 (1966).
3. Bernhard W., Rouiller C., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2** (suppl.), 73 (1956).
4. Blobel G., Potter V. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1283 (1966).
5. Blobel G., Potter V. R., *J. Mol. Biol.* **26**, 279 (1967).

6. Blobel G., Potter V. R., *J. Mol. Biol.* **26**, 293 (1967).
7. Bloemendal H., Bont W. S., Benedetti E. L., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 177 (1964).
8. Cammarano P., Guidice G., Lukes B., *Biochem Biophys. Res. Comm.* **19**, 487 (1965).
9. Campbell P. N., Cooper C., Hicks M., *Biochem. J.* **92**, 225 (1964).
10. Campbell P. N., Lawford G. R., w Structure and Function of the Endoplasmic Reticulum in Animal Cells, red. F. C. Gran, Universitetsforlaget, Oslo, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 63 i 64.
11. Campbell P. N., Lowe E., Serck-Hanşsen G., *Biochem. J.* **103**, 280 (1967).
12. Chauveau J., Gautier A., Moulé Y., Rouiller C., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **241**, 337 (1955).
13. Chauveau J., Moulé Y., Rouiller C., Schneebeli J., *J. Cell. Biol.* **12**, 17 (1962).
14. Claude A., *J. Exptl. Med.* **84**, 51 (1946).
15. Claude A., *Advan. Protein Chem.* **5**, 423 (1949).
16. Dallner G., Siekevitz P., Palade G. E., *J. Cell. Biol.* **30**, 73 (1966).
17. Ernster L., Siekevitz P., Palade G. E., *J. Cell. Biol.* **15**, 541 (1962).
18. Fouts J. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 373 (1961).
19. Goswami P., Barr G. C., Munro H. N., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 408 (1962).
20. Green D. E., Allmann D. W., Bachmann E., Baum H., Kopaczyk K., Korman E. F., Lipton S., MacLennan D. H., McConnell D. G., Perdue J. F., Rieske J. S., Tzagoloff A., *Arch. Biochem. Biophys.* **119**, 312 (1967).
21. Henshaw E. C., Bojarski T. B., Hiatt H. H., *J. Mol. Biol.* **7**, 122 (1963).
22. Higashi T., Peters T. jun., *J. Biol. Chem.* **238**, 3952 (1963).
23. Kurland C. G., *Science* **169**, 1171 (1970).
24. Lawford G. R., Langford P., Schachter H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1835 (1966).
25. Lawford G. R., Schachter H., *Can. J. Biochem.* **45**, 144 (1967).
26. Lengyel P., Söll D., *Bacteriol. Rev.* **33**, 264 (1969).
27. Littlefield J. W., Keller E. B., Gross J., Zamecnik P. C., *J. Biol. Chem.* **217**, 111 (1955).
28. Loeb J. N., Howell R. R., Tomkins G. M., *Federation Proc.* **24**, 654 (1965).
29. Manganiello V. C., Phillips A. H., *J. Biol. Chem.* **240**, 3951 (1965).
30. Moulé Y., w Structure and Function of the Endoplasmic Reticulum in Animal Cells, red. F. C. Gran, Universitetsforlaget, Oslo, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 10 i 11.
31. Moulé Y., Chauveau J., Rouiller C., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 547 (1960).
32. Noll H., Staehelin T., Wettstein F. O., *Nature* **198**, 632 (1963).
33. Palade G. E., Siekevitz P., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 171 (1956).
34. Petrović S., Bacarević A., Petrović J., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 518 (1965).
35. Porter K. R., w The Cell, red. J. Brachet i A. E. Mirsky, Academic Press, New York 1961, t. 2, str. 621.
36. Porter K. R., Claude A., Pullmann E. F., *J. Exptl. Med.* **81**, 233 (1945).
37. Reid E., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 218 (1961).

38. Reid E., w *Enzyme Cytology*, red. D. B. Roodyn, Academic Press, New York 1967, str. 321.
39. Reid E., Stevens B. M., *Nature* **182**, 441 (1958).
40. Rodionova N. P., Shapot V.S., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 206 (1966).
41. Sabatini D. D., Tashiro Y., Palade G. E., *J. Mol. Biol.* **19**, 503 (1966).
42. Sargent J. R., Campbell P. N., *Biochem. J.* **96**, 134 (1965).
43. Shapot V., Pitot H. C., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 37 (1966).
44. Webb T. E., Blobel G., Potter V. R., *Cancer Res.* **24**, 1229 (1964).
45. Webb T. E., Blobel G., Potter V. R., Morris H. P., *Cancer Res.* **25**, 1219 (1965).
46. Wettstein F. O., Staehelin T., Noll H., *Nature* **197**, 430 (1963).



BARBARA FRĄCKOWIAK\*

## Struktura i funkcja błon chloroplastów

### The Structure and Function of Chloroplast Membranes

The structural and functional aspects of chloroplast membranes are reviewed.

Błony stanowią zasadnicze strukturalne elementy w wielu organellach komórkowych. W błonach chloroplastów są zlokalizowane wieloenzymatyczne układy biorące udział w transporcie elektronów i syntezie ATP. Zgodnie z chemiczną hipotezą syntezy ATP błona utrzymuje odpowiednią strukturę układów białek katalizujących wytwarzanie ATP, natomiast według chemiosmotycznej teorii fosforylacji błona spełnia zasadniczą rolę w transporcie protonów i wytworzeniu odpowiedniego potencjału warunkującego syntezę ATP.

Poznanie struktury i funkcji błon chloroplastów ma więc niewątpliwe znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu fotofosforylacji.

#### I. Morfologiczna struktura błon chloroplastów roślin wyższych

W latach 1936—1947 Frey - Wyssling i Wuhrmann (14, 16) oraz Heitz (19) po zastosowaniu mikroskopu świetlnego stwierdzili, że chloroplasty roślin wyższych składają się z dwóch faz: z zawierającej chlorofil fazy granularnej oraz z bezpostaciowej stromy. Autorzy ci zaobserwowali ponadto, że grana posiadają strukturę warstwową. Późniejsze badania z zastosowaniem mikroskopu elektronowego (17, 35, 36, 41, 78, 79) nie tylko potwierdziły lamellarną strukturę gran chloroplastów, ale wykazały, że obszar stromy, początkowo uważany za homogenny, także ma strukturę warstwową.

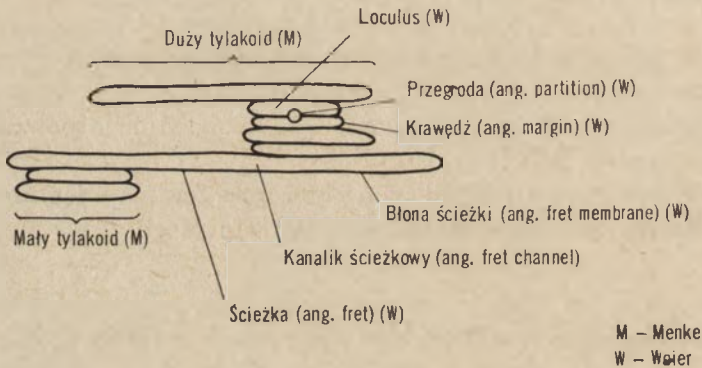
Układ błon chloroplastów składa się z dysków (79) lub spłaszczonych pęcherzyków nazywanych tylakoidami (48, 50). Każdy tylakoid ma dwie równoległe błony połączone ze sobą. Grubość tych błon wynosi około 70Å i zależy od stosowanych metod utrwalania preparatów (87). Menke (48)

\* Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: INT — chlorek 2-p-jodofenyl-3-p-nitrofenyl-5-fenylomonotetrazolowy, DCIP — 2,6-dwuchlorofenolindofenol

wyróżnia dwa rodzaje tylakoidów. Jedne, tzw. duże tylakoidy lub tylakoidy stromy, rozciągają się w obszarze międzygranowym, natomiast tzw. małe tylakoidy lub tylakoidy gran ograniczają się do obszaru granum. Grana obserwowane w chloroplastach roślin wyższych są więc wiązką regularnie ułożonych tylakoidów.

Ścisłe rozróżnianie dwóch rodzajów tylakoidów nie wydaje się jednak konieczne w świetle prac Weiera i Thompsona (90) oraz Wehmeyera (83). Wehmeyer (83) wykazał, że krawędzie lamelli granum mogą podwijać się tworząc jak gdyby dwa tylakoidy w tym samym granum. Równocześnie możliwe jest występowanie perforacji w błonach tylakoidów gran, co umożliwia połączenie między poszczególnymi tylakoidami (13, 21, 78). Istnienie perforacji wykazano również w błonach przestrzeni międzygranularnej (13).



**Rys. 1.** Model struktury chloroplastu z zaznaczeniem nomenklatury Menkego i Weiera wg Parka (65)

Weier i wsp. (87) stwierdzili, że koncepcja systemu błon oparta na istnieniu tylakoidów nie może stosować się do takiego rodzaju obrazów struktury błon chloroplastów, jakie otrzymali stosując mikroskop elektro-nowy o dużej zdolności rozdzielczej. Autorzy ci zwrócili szczególną uwagę na obszar, gdzie przylegają do siebie błony dwóch sąsiednich tylakoidów. Stwierdzili bowiem, że przestrzeń między dwoma sąsiadującymi obok siebie tylakoidami jest mniejsza, niż podwójna grubość błony zewnętrznego tylakoidu granum. Poza tym wewnątrz granum trudno jest rozróżnić poszczególne błony sąsiadujących ze sobą tylakoidów.

Te obserwacje sugerują istnienie ścisłego połączenia między sąsiadującymi tylakoidami, z czym wiąże się możliwość, że tylakoid nie stanowi rzeczywistej jednostki strukturalnej błon chloroplastów. Za tego rodzaju jednostkę można natomiast uważać całe granum. (87). Na potwierdzenie tej hipotezy Weier i wsp. (87) przedstawiają obrazy częściowo uszkodzonych chloroplastów, w których, mimo uszkodzenia obszaru międzygra-



nowego, grana zostają zachowane jako odrębne struktury. Ponadto, jak wykazano w wielu laboratoriach (28, 29, 40, 61), przestrzeń intergranowa w pewnych warunkach znacznie pęcznieje, a mimo to granum pozostaje nadal jednostką strukturalną.

Opierając się na powyższych obserwacjach Weier i wsp. (84, 86, 87, 88) stosują inne niż Menke (48) terminy opisujące budowę granum. Cienkie, ciemne błony obserwowane wewnątrz granum określane są jako przegrody (ang. *partitions*). Błony te albo łączą się ze sobą na końcach (ang. *margin*) albo łączą się z innymi granami przez ścieżki (ang. *fret*). Przestrzeń ograniczona przez przegrodę określana jest jako *loculus*, natomiast obszar wewnątrz ścieżki jako kanalik ścieżkowy (ang. *fret channel*).

Schemat ultrastruktury błon chloroplastów z zaznaczeniem terminów stosowanych przez Weiera i Menke przedstawia rysunek 1.

## II. Molekularna struktura błon chloroplastów

### 1. Podjednostki w błonach chloroplastów

Na występowanie podjednostek w błonach chloroplastów zwrócili po raz pierwszy uwagę Frey-Wyssling i Steimann (15). Park i Pon (68) oraz Park i Biggins (66) rozszerzyli te badania otrzymując obrazy cząstek o długości 160—185Å, szerokości 155Å i grubości 100Å. Ziarnistości te nazwano kwantosomami uważając, że stanowią one nie tylko strukturalne, ale również funkcjonalne podjednostki błon, w których zachodzi fotosynteza (63, 64, 65, 69).

Stosując technikę przygotowania preparatów mikroskopowych opracowaną przez Mora i wsp. (53), która polega na zamrażaniu materiału w roztworze glicerolu przed wykonaniem skrawków i dalszym sublimacyjnym wytrawieniu tych skrawków (ang. *freeze-etching*) Mühlethaler i wsp. (58) wykazali istnienie dwóch rodzajów cząstek. Jedne, o wielkości 120Å, składają się prawdopodobnie z czterech podjednostek wielkości 60Å, a drugie, pojedyncze cząstki mają wielkość 60Å. Stosując tę samą technikę również Bamberger i Park (6) wykazali dwa rodzaje cząstek: mniejsze około 100Å i większe 175Å.

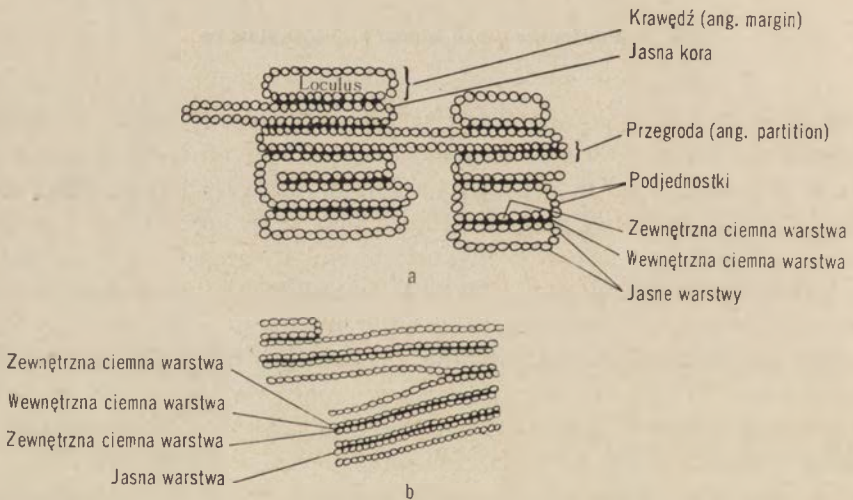
Zasadnicze rozbieżności między badaniami przeprowadzonymi w laboratoriach Mühlethaler i Parka dotyczą położenia cząstek wewnątrz struktury granum. Nierozstrzygnięte jest czy cząstki leżą częściowo na zewnątrz, a częściowo wewnątrz błony (57), czy też same cząstki stanowią błonę (6, 9). Obrazy zdjęć z mikroskopu elektronowego, wykonane w laboratorium Mühlethaler i Parka z zastosowaniem podobnych technik, są bardzo podobne. W obu przypadkach zaobserwowano dwa rodzaje cząstek,

a różnice w ich wielkości i umiejscowieniu mogą raczej być wynikiem odmiennej preparatyki niż odzwierciedlać rzeczywiste różnice występujące *in vivo*.

Niezależnie od położenia cząstek należy się liczyć z możliwością, że niektóre ziarnistości obserwowane przez różnych autorów mogą pochodzić ze stromy. Mühlethaler (57) przypuszcza, iż jeden z rodzajów cząstek obserwowanych przez niego mogą stanowić rybosomy.

## 2. Ułożenie podjednostek w błonach chloroplastów

Zastosowanie przez Weiera i wsp. (86, 87, 88, 89) mikroskopu elektronowego o dużej zdolności rozdzielczej pozwoliło stwierdzić, że w podjednostkach błon chloroplastów można wyróżnić jasny rdzeń o średnicy 37Å i ciemniejszą warstwę zewnętrzną (ang. *rim*) grubości 28Å. Ułożone w szereg podjednostki tworzą przegrodę (ang. *partition*), która składa się z pięciu warstw (rysunek 2).



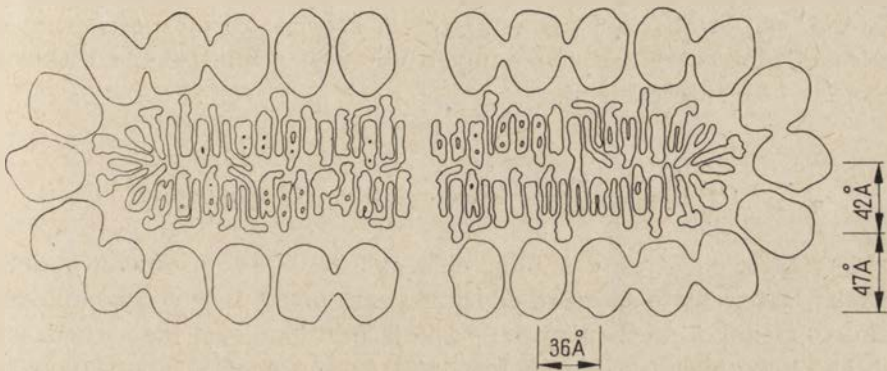
**Rys. 2.** Ułożenie podjednostek w błonach chloroplastów wg Weiera i wsp. (86)

Środkowa ciemna warstwa tworzy się na granicy dwóch szeregów podjednostek. Jest ona obszarem hydrofobowym w przeciwieństwie do hydrofilowej zewnętrznej powierzchni przegrody. Hydrofobowy charakter warstwy wewnętrznej może być wynikiem odpowiedniego przegrupowania cząsteczek błony lub też połączenia dwóch warstw o hydrofobowych powierzchniach (18, 85). Podjednostki przegrody mogą więc być asymetrycznymi cząsteczkami lipoproteidów. Weier i Benson (85) uważają, że warstwy podjednostek są połączone poprzez otaczające je substancje hy-

drofilowe. Środkowa, ciemna część przegrody jest hydrofobowa i połączona z innymi substancjami hydrofobowymi, jak chlorofil, chinony, karotenoidy i prawdopodobnie kardiolipina.

Nieco inny model ułożenia podjednostek w błonach chloroplastów proponują Menke i Kreutz (37, 38, 39, 49, 51, 52) (rysunek 3).

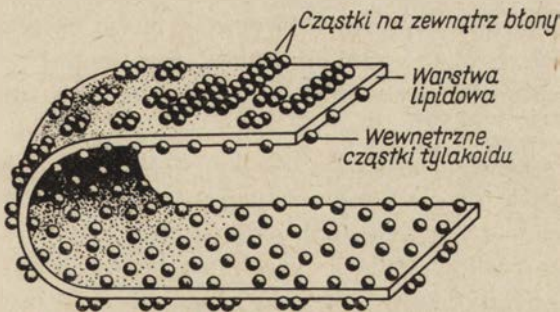
Według tego modelu warstwy lipidowe i białkowe ułożone są w błonach oddzielnie, jedna nad drugą (37). Dowodem tego rodzaju budowy ma być obserwacja, że wyekstrahowanie lipidów z chloroplastów zmniejsza ich grubość, ale nie zmienia średnicy (38, 52). Autorzy ci sugerują również, że jedna warstwa błony jest homogeniczna, druga składa się z podjednostek. Ponieważ interferencja, charakterystyczna dla układów o powtarza-



Rys. 3. Model tylakoidu proponowany przez Menkego (51)

jących się podjednostkach, występuje również po wyekstrahowaniu lipidów z chloroplastów, należy przypuszczać, że globularne podjednostki występują w warstwie białkowej (37).

Jest prawdopodobne, iż różnice między modelami Menke i Kreutza oraz Weiera są spowodowane stosowaniem różnych technik badań.



Rys. 5. Schematyczne ułożenie cząstek białkowych na powierzchni błony tylakoidu wg Mühlethaler i wsp. (58)

Inne modele tylakoidów proponują Mühlethaler i wsp. (57, 58, 59) oraz Park i wsp. (10, 64, 68). Branton i Park (10) stosując technikę sublimacyjnego wytrawiania (53) zaproponowali model, w którym cząstki (kwantosomy) ułożone są w charakterystyczny sposób na wewnętrznej powierzchni błony (rysunek 4).

Mühlethaler i wsp. (58) uważają, że cząstki białkowe znajdują się nie tylko na wewnętrznej, ale także na zewnętrznej powierzchni lipidowej błony tylakoidu (rysunek 5). Cząstki można bowiem usunąć przez przemycie błon wodą i odwirowanie (51, 56). Park i Shumway (70) zastosowali nieco inną technikę — głębokiego wytrawiania (ang. *deep etching*) i stwierdzili ponownie, że cząstki znajdują się wewnątrz błony tylakoidu.

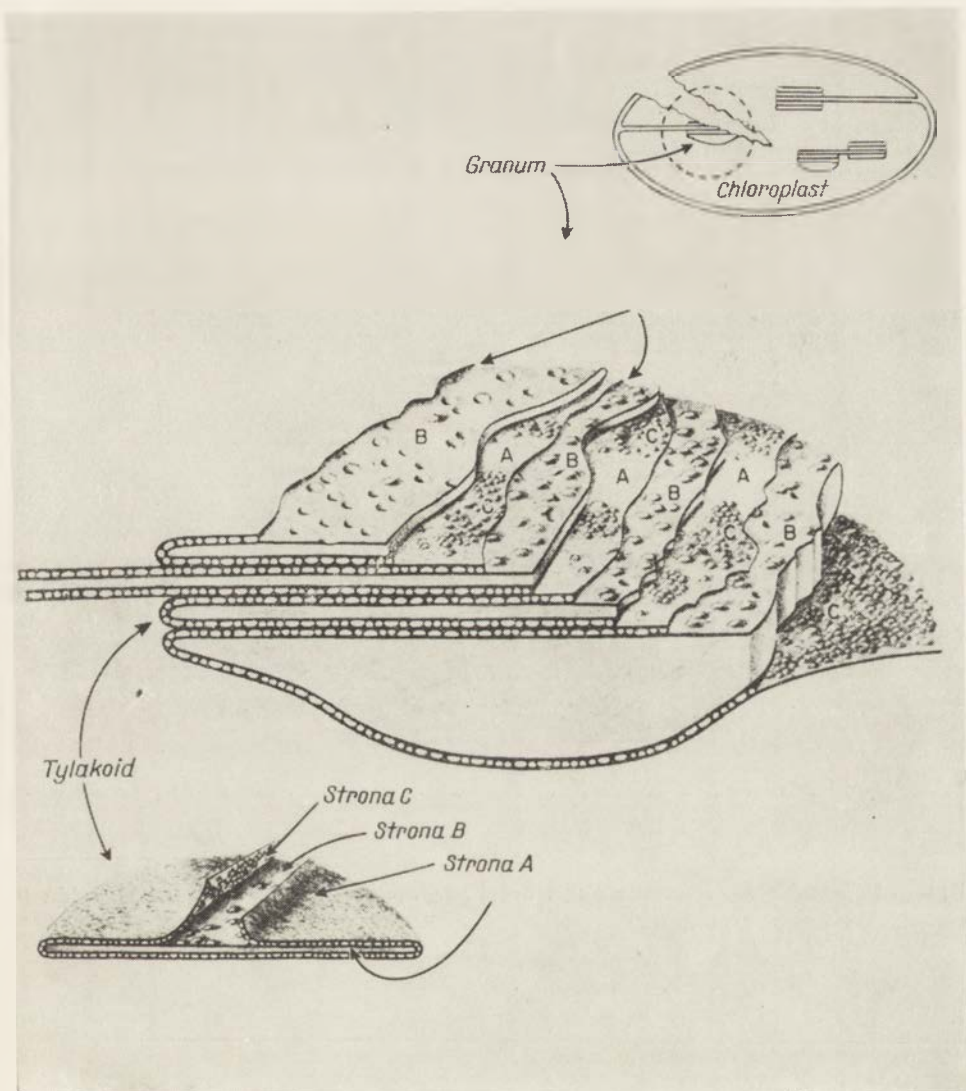
Pomimo dość dużej ilości badań dotyczących modelu tylakoidu nie ustalono jego ostatecznej postaci. Istnieją znaczne rozbieżności pomiędzy badaczami dotyczące zarówno samych obrazów z mikroskopu elektronowego, jak i ich interpretacji.

### III. Biochemiczne własności błon chloroplastów

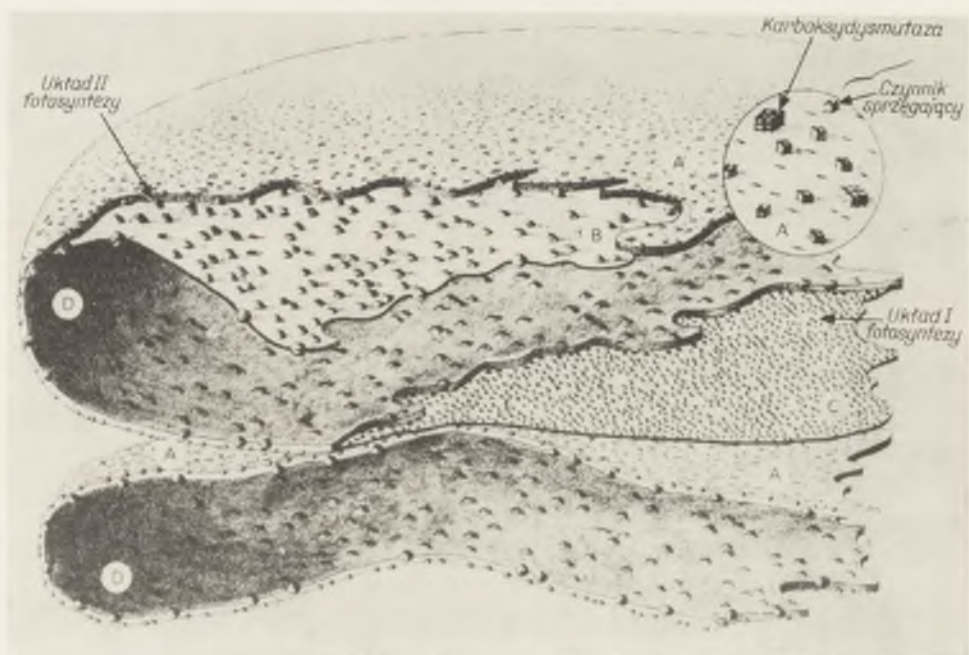
Morfologiczna struktura błon chloroplastów jest stosunkowo dobrze poznana, natomiast o sposobie oddziaływania molekularnych kompleksów, umiejscowieniu i mechanizmach reakcji fotochemicznych, zachodzących w błonach posiadamy jedynie fragmentaryczne dane. Badania powiązań struktury błon z aktywnościami fotosyntetycznymi przeprowadza się stosując metody histochemiczne lub frakcjonując błony chloroplastów i określając ultrastrukturę oraz aktywności fotosyntetyczne otrzymanych fragmentów.

#### 1. Lokalizacja reakcji Hilla w błonach za pomocą metod histochemicznych

Dla lokalizacji miejsc w komórce, gdzie zachodzą reakcje utleniania i redukcji, stosuje się często sole związków tetrazolowych (73, 75, 76). Utlenione formy związków tetrazolowych są łatwo rozpuszczalne w wodzie, natomiast produktem redukcji jest nierozpuszczalny w wodzie formazan. Osad formazanu wytworzony w odpowiednim miejscu w błonie ma dostateczną gęstość elektronową dla zaobserwowania tego miejsca w mikroskopie elektronowym. By zbadać umiejscowienie reakcji Hilla w błonach chloroplastów, użyto chlorku 2-*p*-jodofenylo-3-*p*-nitrofenylo-5-fenylomonotetrazolowego (INT) (25). Związek ten redukuje się przy udziale aktywnych w reakcji Hilla błon chloroplastów jedynie na świetle. Stwierdzono (25, 54, 55), że w miarę zwiększania czasu oświetlania preparatów błon w obecności INT występuje stopniowe odkładanie się formazanu na błonach. Formazan odkłada się na całej powierzchni błon, a nie je-



**Rys. 4.** Model tylakoidu proponowany przez Brantona i Parka (10)



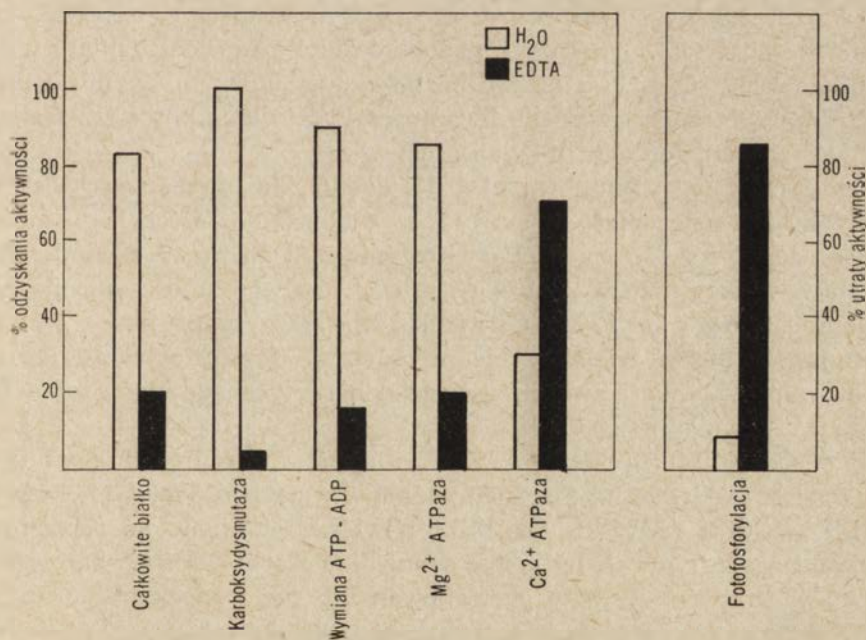
**Rys. 7.** Schemat rozmieszczenia aktywności enzymatycznych w błonach tylakoidu (4)

dynie na cząstkach związanych z błonami. Cząstki związane z błonami, zwane kwantosomami (43), prawdopodobnie nie są jedynym miejscem, w których zachodzą reakcje fotoredukcji. Jak przypuszczają Moudria-nakis i wsp. (25, 54, 55) fotoredukcja w błonach chloroplastów nie zachodzi w wyodrębnionych i poszczególnych miejscach, ale jest procesem charakterystycznym dla całej błony. Nie jest wykluczone, że fotoredukcja zachodzi w ziarnistościach błony, które są dużo mniejsze niż kwantosomy i dlatego nie mogą być rozróżniane w mikroskopie elektronowym (55).

## 2. Ekstrakcja błon chloroplastów za pomocą H<sub>2</sub>O i EDTA

Dla rozwiązania problemu, jakie aktywności fotosyntetyczne są zlokalizowane w ziarnistościach błon, próbowano usunąć różnymi czynnikami te ziarnistości z wyizolowanych błon chloroplastów. Stwierdzono przede wszystkim, że chociaż działanie na błony chloroplastów wieloma czynnikami chemicznymi i fizycznymi (55, 56) powoduje znaczne zmniejszenie ilości cząstek na błonach, to jednak aktywność reakcji Hilla w takich preparatach pozostaje niezmienną. Tego rodzaju obserwacje potwierdziły badania histochemiczne (25), z których również wynikało, że ziarnistości błon typu kwantosomów nie są miejscem, gdzie zachodzi fotoredukcja.

Całkowite usunięcie ziarnistości z błon chloroplastów można uzyskać przez ekstrakcję wodą, a następnie 1mM EDTA. Taką ekstrakcję zastoso-



Rys. 6. Uwalnianie aktywności enzymatycznych z błon chloroplastów po ekstrakcji błon wodą i EDTA (55)

wano w celu określenia, jakie aktywności enzymatyczne są charakterystyczne dla ziarnistości błon (55, 56) (rysunek 6).

Stwierdzono, że trzykrotne przemycie chloroplastów wodą, a następnie 1mM EDTA, powoduje usunięcie 90% rozpuszczalnych białek z powierzchni błony. Usunięte białka wykazują aktywność karboksydysmutazy, katalizują wymianę fosforanu w układzie ATP-ADP, wykazują aktywność ATPazy stymulowanej  $Mg^{2+}$  i ATPazy stymulowanej  $Ca^{2+}$ . Wysoką aktywność karboksydysmutazy obserwuje się w supernatancie już po ekstrakcji wodą błon chloroplastów, natomiast 70% aktywności ATPazy stymulowanej  $Ca^{2+}$  przechodzi do supernatantu dopiero po ekstrakcji 1mM EDTA. Trzykrotne przemycie wodą prawie wcale nie zmniejsza fotofosforylacji, dopiero ekstrakcja 1mM EDTA powoduje utratę zdolności katalizowania syntezy ATP przez preparaty błon.

Zaobserwowano również rozprzęganie transportu elektronów i fosforylacji w chloroplastach pod wpływem EDTA (5, 44, 80). Rozprzęganie to jest związane z uwalnianiem równocześnie tzw. „czynnika sprzęgającego”. (ang. *coupling factor*) (42, 45, 46, 71), który w pewnych warunkach, na przykład po inkubacji z dwutiotreitolem lub trypsyną, wykazuje aktywność ATPazy stymulowanej  $Ca^{2+}$  (46, 80).

Howell i Moudrianakis (26) rozdzielili frakcje białkowe, otrzymane przez ekstrakcję błon chloroplastów wodą i EDTA, i zbadali ich obrazy w mikroskopie elektronowym, stosując negatywowe wybarwienie preparatów. Autorzy ci stwierdzili, że frakcja ATPazy stymulowanej  $Ca^{2+}$  przedstawia taki sam obraz, jak kwantosomy obserwowane w błonach. Obserwowane cząstki, podobnie jak kwantosomy, miały wielkość około 100Å. Cząstki z frakcji karboksydysmutazy miały nieco inny kształt i były nieco większe niż kwantosomy. Również pozostałe frakcje różniły się znacznie od obrazu kwantosomów.

Frakcja ATPazy stymulowanej  $Ca^{2+}$ , dodana do uprzednio wyekstrahowanych błon chloroplastów, przywraca zdolność do fosforylacji, niezależnie od tego, czy frakcja ATPazy zostanie dodana przed oświetleniem mieszaniny reakcyjnej, czy też w okresie ciemności bezpośrednio po naświetleniu. Howell i Moudrianakis (26) sugerują, że frakcja kwantosomów bierze udział w ciemnym etapie fotofosforylacji, już po wytworzeniu w reakcji świetlnej wysokoenergetycznego pośrednika  $X_E$  (22).

Tego rodzaju interpretacji przeciwstawiają się twórcy teorii kwantosomów. Park i Pfeiffer (67) podają w wątpliwość fakt, że ekstrakcja EDTA usuwa wszystkie cząstki z powierzchni błony chloroplastów. Autorzy ci zaobserwowali na powierzchni błon ziarnistości (kwantosomy) zarówno w preparatach błon ekstrahowanych, jak i nieekstrahowanych EDTA. Badacze ci twierdzą, że usuwane podczas ekstrakcji EDTA cząstki stanowią karboksydysmutazę (10) i ATPazę zależną od  $Ca^{2+}$ , ale nie są kwantosomami.



Ostatnie badania przeprowadzone w laboratorium Crane'a (4) wykazały, że stosując technikę wybarwienia negatywowego Moudrianakisa dla uzyskania obrazów błon chloroplastów ekstrahowanych EDTA rzeczywiście nie można zaobserwować cząstek na błonach. Natomiast przy stosowaniu techniki sublimacyjnego wytrawiania błony prawdopodobnie nadal zawierają ziarnistości.

Wobec istniejących rozbieżności konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, które pozwolą wyjaśnić czy cząstki obserwowane w mikroskopie elektronowym przy zastosowaniu techniki Mora i wsp. (53) są rzeczywiście miejscami procesów fotochemicznych.

### 3. Frakcjonowanie chloroplastów detergentami

Detergenty powodują rozdzielanie błon chloroplastów na mniejsze fragmenty, co umożliwi badanie zarówno lokalizacji poszczególnych reakcji fotofosforylacji, jak i mechanizmu transportu elektronów i syntezy ATP.

Najczęściej stosowanymi detergentami są digitonina (1, 2, 3, 4, 7, 8, 31, 32, 34, 47, 60, 91) oraz Triton X-100 (11, 20, 23, 24, 27, 30, 33, 62, 72, 74, 81, 82). Do tego rodzaju badań stosuje się ponadto siarczan dodecyłu (77), Tween 20 (33), Tween 40 (7), saponiny (33) oraz Span 80 (12).

Tablica 1

Aktywności fotochemiczne i enzymatyczne cząstek chloroplastów otrzymanych po traktowaniu digitoniną (4)

Frakcja	Zawartość chlorofilu mg	Szybkość redukcji $\mu\text{mole/mg chlorofilu/godz.}$			ATPaza stymulowana $\text{Ca}^{2+}$
		DCIP*	NADP	NADP z DCIP+ Askrobinian	
Chloroplasty kontrolne	35,00	164	88	148	132,0
1 000 g	6,75	36	1,66	53	15,8
10 000 g	15,00	36	11,0	19	41,1
50 000 g	3,65	5	0	115	235,0
144 000 g	1,92	0	0	325	294,0
Supernatant					
144 000 g	4,88	0	0	320	292,0

\* DCIP — 2,6-dwuchlorofenolindofenol

Wessels (91, 92) stosując digitoninę do frakcjonowania chloroplastów, otrzymał fragmenty błon katalizujące cykliczną fosforylację i fotoredukcję NADP przez zredukowany 2,6-dwuchlorofenolindofenol (DCIP), lecz nie katalizujące fotoredukcji NADP przy użyciu wody jako donora elektronów. Inni badacze (1, 2, 3, 4, 8, 47) stosując do frakcjonowania di-

gitoninę otrzymali dwa rodzaje fragmentów błon chloroplastów: jedne sedymentujące przy 1 000—10 000 g, w których stosunek chlorofilu a do chlorofilu b był niższy niż w nienaruszonych chloroplastach oraz inne fragmenty, sedymentujące między 50 000—144 000 g w których stosunek ilości chlorofilu a do chlorofilu b był wyższy niż w nienaruszonych chloroplastach (tablica 1).

Ponadto stwierdzono (2, 3, 4), że frakcja 10 000 g łatwiej redukuje DCIP niż NADP. W tej frakcji zlokalizowane są głównie aktywności związane z układem II fotosyntezy. W przeciwieństwie do tego lżejsze fragmenty błon, sedymentujące przy 144 000 g, nie katalizują redukcji samego DCIP lub NADP, natomiast redukują bardzo szybko NADP w obecności sztucz-

Tablica 2

Ultrastruktura chloroplastów frakcjonowanych digitoniną (4)

Frakcja	Stosowana technika	
	Wybarwienie negatywowe	Sublimacyjne wytrawianie (ang. <i>freeze etching</i> )
Chloroplasty nienaruszone (aktywny układ I i II fotosyntezy)	Cząstki 100—110 Å powiązane z zewnętrzną powierzchnią błon	Cząstki 175 Å i 110 Å
Frakcja 10 000 g (zachowana aktywność układu II fotosyntezy, niska aktywność układu I)	Błony prawie bez cząstek	Większość cząstek dużych (175 Å), niewielkie obszary z cząstkami małymi (110 Å)
Frakcja 144 000 g (aktywność układu I fotosyntezy)	Błony zupełnie pozbawione cząstek	Jedynie małe cząstki (110 Å)

nego donora elektronów (DCIP + askorbinian). Frakcja 144 000 g zawiera zatem aktywność układu I fotosyntezy. Frakcja 144 000 g zawiera również aktywność ATPazy stymulowanej  $Ca^{2+}$  (4). Za pomocą digitoniny można więc fizycznie rozdzielić układ I fotosyntezy od układu II.

Obrazy poszczególnych frakcji w mikroskopie elektronowym z zastosowaniem sublimacyjnego wytrawiania preparatów (4) wykazały, że frakcję zawierającą układ II fotosyntezy (10 000 g) stanowią fragmenty błon, w których występują głównie cząstki wielkości 175 Å podobnie ułożone, jak w chloroplastach kontrolnych (tablica 2).

Natomiast frakcja wykazująca aktywność układu I fotosyntezy (144 000 g) składa się tylko z mniejszych cząstek o wielkości 110 Å. Po zastosowaniu techniki negatywowego wybarwienia cząstki 110 Å obserwowano we frakcji błon 10 000 g. Wydaje się, że ziarnistości te nie tylko zlokalizowane są na powierzchni błony, ale także stanowią jej część.

Pomiary grubości wyizolowanych błon frakcji 10 000 g i 144 000 g wykazały, że błony te są cieńsze niż lamelle znajdujące się w nienaruszonych chloroplastach. Arntzen, Dilley i Crane (4) uważają więc,

że traktowanie błon chloroplastów digitoniną powoduje ich rozdzielenie na dwie warstwy, w których zlokalizowane są reakcje I i II układu fotosyntezy. Podobne rozerwanie błony chloroplastów zachodzi również przy zamrażaniu błon w wodnym roztworze glicerolu (10).

Na podstawie tego rodzaju badań Arntzen, Dilley i Crane (4) proponują zobrazowane na rysunku 7 rozmieszczenie aktywności fotosyntetycznych. Rysunek przedstawia części dwóch tylakoidów z naniesionymi podjednostkami. Warstwa B stanowi frakcję 10 000 g zawierającą cząstki wielkości 174Å, która wykazuje aktywności układu II fotosyntezy. Warstwa C jest frakcją 144 000 g z ziarnistościami wielkości 110Å, katalizującą reakcje układu I fotosyntezy. Na zewnętrznej powierzchni tylakoidu znajduje się karboksydysmutaza i czynnik sprzęgający, obserwowane już uprzednio przez Howella i Moudrianakisa (26).

Podobne rozfrakcjonowanie układu I i II fotosyntezy uzyskano przy zastosowaniu *Tritonu X-100* (90, 91), dzielając błony chloroplastów na dwie frakcje: lżejszą i cięższą o różnym stosunku chlorofilu a do chlorofilu b.

Możliwość rozfrakcjonowania układu I i II fotosyntezy digitoniną i *Tritonem X-100* potwierdza również wysuniętą przez Arnona i wsp. (3) hipotezę o odrębności reakcji fosforylacji cyklicznej i niecyklicznej, według której fosforylacja cykliczna związana jest z układem I fotosyntezy, natomiast fosforylacja niecykliczna wyłącznie z układem II fotosyntezy.

Oprócz wielu niejasnych jeszcze zagadnień dotyczących morfologicznej struktury błon chloroplastów istnieje przede wszystkim problem, czy ziarnistości związane z błonami chloroplastów reprezentują rzeczywiście jednostki fotosyntetyczne. Możliwość rozfrakcjonowania układów I i II fotosyntezy wskazuje, że jeżeli jednostki takie istnieją, to muszą składać się z dwóch podjednostek. Williams (93) postuluje istnienie odrębnych podjednostek układu I i II fotosyntezy, które odpowiednio połączone tworzą jednostkę fotosyntetyczną. Być może, że obserwowane przez różnych autorów dwa rodzaje ziarnistości błon odpowiadają właśnie tym podjednostkom.

#### LITERATURA

1. Anderson J. M., Boardman N. K., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 403 (1966).
2. Anderson K. M., Boardman N. K., David D. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 685 (1964).
3. Arnon D. I., Tsujimoto H. Y., Mc Swain B. D., Chain R. K., w *Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis*, red. K. Shibata, A. Takamiya, A. T. Jagendorf, R. C. Fuller, Tokyo Press, Tokyo 1968, str. 68.
4. Arntzen C. J., Dilley E. A., Crane F. C., *J. Cell. Biol.* **43**, 16 (1969).
5. Avron M., *J. Biol. Chem.* **237**, 2011 (1962).

6. Bamberger E. S., Park R. B., *Plant. Physiol.* **41**, 1591 (1966).
7. Bekina R. M., Krasnovskii A. A., *Biochimija* **35**, 122 (1970).
8. Boardman N. K., Anderson J. M., *Nature* **203**, 166 (1964).
9. Branton D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1048 (1966).
10. Branton D., Park R. B., *J. Ultrastruct. Res.* **19**, 283 (1967).
11. Briantais J. M., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **267**, 2207 (1968).
12. Chiba J., Okayama S., *Plant Cell Physiol.* **3**, 379 (1962).
13. Diers L., Schotz F., *Planta* **70**, 322 (1966).
14. Frey-Wyssling A., *Protoplasma* **29**, 279 (1937).
15. Frey-Wyssling A., Steinmann E., *Naturforsch. Ges. Zurich. Vierteljahresschr.* **98**, 20 (1953).
16. Frey-Wyssling A., Wuhrmann K., *Helv. Chim. Acta* **30**, 2023 (1947).
17. Granik S., Porter K. R., *Am. J. Botany* **34**, 545 (1947).
18. Green D. E., Perdue J. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1295 (1966).
19. Heintz R., *Planta* **26**, 134 (1936).
20. Henninger M. D., Margee L., Crane F. L., *Biochim. Biophys. Acta* **131**, 110 (1967).
21. Heslop-Harrison J., *Planta* **60**, 243 (1963).
22. Hind G., Jagendorf A. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 715 (1963).
23. Hinkson J. W., Vernon L. P., *Plant Physiol.* **34**, 268 (1959).
24. Hohl A. R., Hepton A., *J. Ultrastruct. Res.* **12**, 542 (1965).
25. Howell S. H., Moudrianakis E. N., *J. Mol. Biol.* **27**, 323 (1967).
26. Howell S. H., Moudrianakis E. N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1261 (1967).
27. Izawa S., Good E., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 20 (1965).
28. Jakobi G., Perner E., *Flora* **150**, 209 (1961).
29. Kahn J. S., von Wettstein D., *J. Ultrastruct. Res.* **5**, 557 (1961).
30. Kahn J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 234 (1964).
31. Katoh S., Takamiya A., *Plant Cell. Physiol.* **4**, 335 (1963).
32. Katoh S., Takamiya A., Shiratori I., *J. Biochem. (Tokyo)* **51**, 32 (1962).
33. Ke B., Clendenning K. A., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 74 (1956).
34. Kok B., Rurainski H. J., Karmon E. A., *Plant Physiol.* **39**, 513 (1964).
35. Kreutz W., *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 1098 (1963).
36. Kreutz W., *Z. Naturforsch. Sect. B* **19**, 441 (1964).
37. Kreutz W., w Biochemistry of Chloroplasts, red. T. W. Goodwin, Academic Press, New York 1966, tom I, str. 83.
38. Kreutz W., Menke W., *Z. Naturforsch. Sect. B* **15**, 483 (1960).
39. Kreutz W., Menke W., *Z. Naturforsch. Sect. B* **17**, 674 (1962).
40. Leech R. M., Stocking G. R., Greenwood A. D., I Zjazd FEBS, Streszczenie B I, 109.
41. Lehninger A. L., *Sci. Am.* **205**, 62 (1961).
42. Levine A., Racker E., *J. Biol. Chem.* **244**, 1332 (1969).
43. Lichtenhaler H. K., Park B. R., *Nature* **198**, 1070 (1963).
44. McCarty R. E., Racker E., Brookhaven Symposia in Biology No 19 1966, str. 202.
45. McCarty R. E., Racker E., *J. Biol. Chem.* **242**, 3455 (1967).
46. McCarty R. E., Racker E., *J. Biol. Chem.* **243**, 129 (1968).
47. McSwain B. D., Arnon D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 989 (1968).
48. Menke W., *Experientia* **16**, 537 (1960).
49. Menke W., *Z. Naturforsch. Sect. B* **16**, 543 (1961).
50. Menke W., *Ann. Rev. Physiol.* **13**, 27 (1962).
51. Menke W., Brookhaven Symposia in Biology No 19, 1966, str. 328.

52. Menke W., Menke G., *Protoplasma* **46**, 535 (1956).
53. Moor H., Mühlethaler K., Waldner H., Frey-Wyssling A., *J. Cell Biol.* **10**, 1 (1961).
54. Moudrianakis E. N., *Federation Proc.* **27**, 1180 (1968).
55. Moudrianakis E. N., Howell S. H., Karu A. E., w Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, red. K. Shibata, A. Takamiya, A. T. Jagendorf, R. C. Fuller, Tokyo Press, Tokyo 1968, str. 67.
56. Murakami S., w Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, red. K. Shibata, A. Takamiya, A. T. Jagendorf, R. C. Fuller, Tokyo Press, Tokyo 1968, str. 67.
57. Mühlethaler K., w Biochemistry of Chloroplasts, red. T. W. Goodwin, Academic Press, New York 1966, tom I, str. 49.
58. Mühlethaler K., Moor H., Szarkowski J. W., *Planta* **67**, 304 (1965).
59. Mühlethaler K., Wehrli E., *Progr. Photosynthesis Res.* **1**, 87 (1969).
60. Nieman R. H., Vennesland B., *Plant Physiol.* **34**, 255 (1959).
61. Nobel P. S., Murakami S., Taharnija A., *Plant Cell Physiol.* **7**, 263 (1966).
62. Oda T., Huzisige H., *Exptl. Cell Res.* **37**, 481 (1965).
63. Park R. B., *J. Cell Biol.* **27**, 151 (1965).
64. Park R. B., Brookhaven Symposia in Biology No 19, 1966, str. 341.
65. Park R. B., *Intern. Rev. Cytol.* **20**, 92 (1966).
66. Park R. B., Biggins J., *Science* **144**, 1009 (1964).
67. Park R. B., Pfeifhofer A. O. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 337 (1968).
68. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.* **3**, 1 (1961).
69. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.* **6**, 105 (1963).
70. Park R. B., Shumway L. K., w Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, red. K. Shibata, A. Takamiya, A. T. Jagendorf, R. C. Fuller, Tokyo Press, Tokyo 1968, str. 57.
71. Racker E., w Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, red. E. Racker, Van Nostrand, New York 1970, str. 127.
72. Reiko Ohki, Atusi Takamiya, *Biochim. Biophys. Acta* **197**, 249 (1969).
73. Rosa C. G., Tsou K. C., *J. Cell Biol.* **16**, 445 (1963).
74. Sauer K., Park R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 476 (1964).
75. Sedar A. W., Burde R. M., *J. Cell Biol.* **27**, 57 (1965).
76. Sedar A. W., Rosa C. G., Tsou K. C., *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 506 (1962).
77. Smith E. L., *J. Gen. Physiol.* **24**, 593 (1941).
78. Steinmann E., *Exptl. Cell Res.* **3**, 367 (1952).
79. Steinmann E., Sjostrand F. S., *Exptl. Cell Res.* **8**, 15 (1955).
80. Vambutas V. K., Racker E., *J. Biol. Chem.* **240**, 2660 (1965).
81. Vernon L. P., Garcia A., Mallenhawer H., Ke B., w Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, red. K. Shibata, A. Takamiya, A. T. Jagendorf, R. C. Fuller, Tokyo Press, Tokyo 1968, str. 3.
82. Vernon L. P., Shaw E. R., *Biochemistry* **4**, 132 (1965).
83. Wehmeyer W., *Planta* **62**, 272 (1964).
84. Weier T. E., *Am. J. Botany* **48**, 615 (1961).
85. Weier T. E., Benson A. A., w Biochemistry of Chloroplasts, red. T. W. Goodwin, Academic Press, New York 1966, tom I, str. 91.
86. Weier T. E., Bisalputra T., Harrison A., *J. Ultrastruct. Res.* **15**, 38 (1966).
87. Weier T. E., Englebrecht A. H. P., Horrison A., Risley E. B., *J. Ultrastruct. Res.* **13**, 92 (1965).

88. Weier T. E., Stocking R. C., Bracker C. E., Risley E. B., *Am. J. Botany* **52**, 339 (1965).
89. Weier T. E., Stocking C. R., Thomson W. W., Drevet H., *J. Ultrastruct. Res.* **8**, 122 (1963).
90. Weier T. E., Thomson W. W., *Am. J. Botany* **49**, 807 (1962).
91. Wessels J. S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 561 (1962).
92. Wessels J. S. C., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **157**, 345 (1963).
93. Williams W. P., *Nature* **225**, 1214 (1970).

WOJCIECH ROSSOWSKI\*

## Budowa antygenowa błon komórek zwierzęcych

### Antigenic Membrane Structure of Animal Cells

Different aspects of antigenic structure of membranes of animal cells are reviewed and discussed.

Badania nad właściwościami immunogenetycznymi komórek zapoczątkowali Landsteiner oraz Little i ich współpracownicy w początkach obecnego stulecia (63, 64, 65, 70, 71). Little (70) jako pierwszy postulował, że przyjęcie się przeszczepu guza w organizmie biorcy zależy od obecności u obu partnerów dużej liczby wspólnych, genetycznie określonych „czynników wrażliwości”. Jeżeli zespół czynników zgodności dawcy, będzie odpowiadał zespołowi czynników biorcy, przeszczep zostanie przyjęty. W przeciwnym razie przeszczep nie może się rozwijać (70).

Little stworzył więc podwaliny teorii genetycznej w nauce o przeszczepach, którą rozwinął później G. D. Snell i wsp. (103, 104). Prace Landsteinerja (63) oraz Dungerna i Hirszfelda (30) nad grupami krwi a także Landsteinerja i Levine (64) nad osobniczymi różnicami krwi i dziedzicznymi właściwościami aglutynogenów krwi u człowieka nie tylko stworzyły podstawy współczesnej hematologii lecz również zapoczątkowały badania nad antygenami komórkowymi.

Dopiero jednak w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych zwrócono baczniejszą uwagę i uzyskano dowody na podstawową rolę struktur błonowych w komórkowych procesach immunologicznych. Billingham, Brent i Medawar (10) stwierdzili, że można wywołać wrażliwość przeciw przeszczepom skóry przez uprzednie wprowadzenie do organizmu biorcy zawiesiny rozbitych komórek śledziony dawcy. Manson, Fosch i Palm (74, 75, 85) wykazali związek antygenów transplantacyjnych z lipoproteidami frakcji mikrosomów komórek prawidłowych i nowotworowych. Herberman i Stetson (50) stwierdzili, że najwyższą zawartość antygenów transplantacyjnych posiadają błony komórkowe oraz błony gładkie retikulum endoplazmatycznego. W ostatnich latach Shimada i Nathenson (100, 101), Kahan i Reisfeld i wsp. (57, 58) oraz Davies (24, 25) drogą preparatywną otrzymali z błon ko-

---

\* Dr hab. med., Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, Warszawa

mórkowych śledziona myszy, świnki morskiej i człowieka, niektóre alloantygeny w formie jednorodnych elektroforetycznie i chromatograficznie preparatów. Preparaty te wykazują jedną lub kilka swoistości i w stanie zamrożonym zachowują aktywność biologiczną przez kilka lat (24, 81).

## I. Podstawy genetyczne i ontogeneza właściwości antygenowych błon

Właściwości immunologiczne błony określają zespoły molekuł glikolipidowych, glikoproteidowych i białkowych, należące do kilkunastu poznanych dotychczas systemów antygenowych, kontrolowanych przez określone loci w systemie genetycznym komórki.

Na powierzchni komórek człowieka i innych ssaków występują dwa główne i niezależne układy antygenów błonowych. Pierwszym jest podstawowy układ zgodności tkankowej. Układ ten kontrolowany przez locus HL-A u człowieka locus H-2 myszy i ich analogi u innych ssaków określa osobnicze właściwości immunologiczne powierzchni błon. Drugim jest układ substancji grupowych krwi, występujący powszechnie w komórkach i ich produktach. Ponadto na powierzchni komórek oraz błon wewnątrzkomórkowych występują substancje antygenowe należące do odrębnych układów immunogenetycznych (4, 12, 13, 91, 111). Niekiedy są one charakterystyczne tylko dla jednego określonego typu komórki na przykład antygen TL lub PC.1. i stanowią wówczas antygeny różnicujące. Częściej występują na powierzchni kilku typów komórek, na przykład antygeny Ly-A i Ly-B oraz antygen  $\Theta$ , wykrywane w tymocytach, limfocytach, a także w centralnym układzie nerwowym (8).

Antygeny zgodności tkankowej (transplantacyjne) są zespołem odrębnych, genetycznie determinowanych cząstek wbudowanych w strukturę lipoproteidową błony. Układ alloantygenów typu HL-A u człowieka jest najsilniejszym układem warunkującym przyjęcie lub odrzucenie przeszczepu (24, 27). U człowieka informacje genetyczne zawiadujące systemem izoantygenów HL-A zlokalizowane są na jednej parze autosomalnych chromosomów (5, 60). Zdaniem większości badaczy najważniejsze informacje genetyczne zawarte są w dwóch odrębnych regionach chromosomu, określonych jako region LA (Payne) i region 4 serii lub „czwarty” system Van Rood'a (5). Nie jest pewne, czy są to dwa odrębne loci, czy też dwie lub więcej podjednostek w obrębie jednego locus (5, 60). Większość badaczy przyjmuje obecnie, że u człowieka są to dwa odrębne loci ściśle ze sobą powiązane (5, 24, 37, 58, 60, 94, 114). Ilość alleli w obu loci jest odmienna. Jednak podawane liczby alleli dla układu HL-A; podobnie jak i ich symbole zmieniają się wraz z postępem badań. Najniższe oznaczone ilości alleli wynoszą 20—30. Wiadomo jednak, że wśród 44 badanych alleli



podczas III International Histocompatibility Workshop, nie stwierdzono dwóch identycznych (5). B a c h (5) posługując się testem MLC (ang. *mixed leukocyte culture*) stwierdził, że limfocyty pobrane od 600 nie związanych ze sobą par osobników, we wszystkich przypadkach wykazywały efekt stymulacji. Biorąc pod uwagę jedynie dokładnie przebadane swoistości antygenowe w układzie HL-A, K i s s m e y e r - N i e l s e n i w s p. (60), w pierwszym locus umieszczają 7 alleli, a mianowicie LA1 (HL-A1), LA2 (HL-A2), Ba, LA3 (HL-A3), ILN (HL-A.11); „Stewart” (HL-A.9) oraz 0 w drugim zaś 8 alleli, to jest 7C (HL-A.7), 7D (HL-A.8), T12 (HL-A.12), NH (HL-A.13), R, BB oraz 0. F e l l o w s i D a u s s e t (37) w haploidalnym genomie ludzkiego plemnika w pierwszym locus lokalizują allele kontrolujące syntezę antygenów HL-A.1, HL-A.2, HL-A.3, HL-A.9, Da15 i Da17 (HL-A.19), podczas gdy drugi locus zawiera według nich geny HL-A.5, HL-A.7, HL-A.8 i Da4 (HL-A.12). W a l f o r d i w s p. (115) w pierwszym locus lokalizują także geny „Thompson” i Lc-26, a w drugim geny Lc-15, „Gallegos” i „Merritt”. Ten ostatni gen wykrywano w 90% przypadków ostrej białaczki u dzieci, a także u ich zdrowych rodziców.

Badania nad zachowaniem się poszczególnych antygenów w populacjach oraz nad rozmieszczeniem ich w poszczególnych rodzinach, pozwoliły podzielić wszystkie znane dotychczas alloantygeny na odpowiednie grupy tak zwane segreganty, to jest antygeny wzajemnie wyłączające się w procesach dziedziczenia. Przypuszczalnie istnieją cztery serie segregantów. W pierwszej serii znajdują się antygeny HL-A.1, 2, 3, HL-A.9, 10 i HL-A.11, w drugiej zaś — antygeny HL-A.5, 7, 8, 12 i 13 (5).

U myszy, podobnie jak u człowieka, antygeny transplantacyjne typu H-2 występują na powierzchni większości komórek i są głównym czynnikiem grupowym krwi oraz czynnikiem zgodności tkankowej (7, 11, 84). Kontrolowane są one przez locus H-2, jeden z 13 transplantacyjnych loci myszy. Locus H-2 zawiera ponad 20 alleli, z których każdy determinuje 9 do 15 z 27 znanych swoistości (24, 97, 101, 102). Locus H-2 jest, jak się zdaje, utworzony z grupy ściśle związanych ze sobą genów zlokalizowanych na IX parze chromosomów. Składa się on z dwóch oddzielonych od siebie obszarów oznaczonych jako odcinek „D” i odcinek „K”. Determinują one wytwarzanie odrębnych cząstek antygenowych zlokalizowanych w odrębnych miejscach na błonie komórkowej (24).

Ponadto u myszy występują również układy antygenów zlokalizowane na powierzchni ściśle określonych typów komórek (np. izoantygeny  $\Theta$ , układu LyA i LyB, oraz układu TL).

Związki podobne do substancji grupowych krwi człowieka występują także u bakterii, roślin wyższych i różnych grup systematycznych kręgowców (7, 11, 51, 106). U człowieka obecność substancji grupowych krwi wykazano w większości komórek różnych narządów oraz w wydzielinach (54, 77, 108, 109, 110). S c h u l m a n (108) zaobserwował ścisłą równoległość

występowania substancji grupowych A i B krwi oraz antygeny H/O na powierzchni komórek u człowieka, przy czym najwyższe stężenie antygeny H — wykazywały tkanki grupy O.

Substancje grupowe krwi stwierdza się już u najmłodszych badanych zarodków. Obecność antygenów ABH wykazano u 5 do 8 mm zarodków ludzkich (108, 109), gdzie występowały one na powierzchni śródbłków układu sercowo-naczyniowego oraz w większości komórek nabłonkowych, z wyjątkiem centralnego układu nerwowego, nadnerczy i wątroby. Najwyższą zawartość antygenów nabłonkowych stwierdzono u zarodków 35 mm. U starszych zarodków i płodów stężenie antygenów ABH w komórkach nabłonkowych stopniowo maleje w miarę dojrzewania czynnościowego narządów i podejmowania przez nie swoistych funkcji fizjologicznych (108, 109, 110). Antygeny ABH wykrywano także w wysoko zróżnicowanych rakach skóry oraz w gruczolakorakach (109).

W tkankach dojrzałego człowieka antygeny ABH wykryć można na powierzchni śródbłków układu sercowo-naczyniowego oraz w nabłonkach wielowarstwowych płaskim i przejściowym (108, 109, 110).

Podobne badanie przeprowadzono na innych ssakach. U 10-dniowego zarodka szczura jako pierwsze pojawiają się na powierzchni erytrocytów antygeny grupowe krwi C i E. Antygen D pojawia się w niewielkiej ilości pomiędzy 16 i 18 dniem życia płodowego, natomiast antygen A — dopiero w 32 dniu życia pozapłodowego (84).

U myszek szczepu C3H krwinki czerwone i komórki śledziony są niewrażliwe na humoralne izoprzeciwciała w czasie pierwszych dwóch do trzech dni życia a reaktywność osobnika dojrzałego uzyskują dopiero pomiędzy 6-tym i 10-tym dniem (78). Natomiast erytrocyty i komórki śledziony myszy szczepów C57Bl i C57L są wrażliwe na humoralne izoprzeciwciała już w pierwszym dniu po urodzeniu (79).

Odmienne zachowują się antygeny transplantacyjne typu H-2 u myszy. Stężenie alloantygenów tej grupy w tkankach zarodków i płodów wzrasta stopniowo w miarę dojrzewania. Metodą immunofluorescencji wykryto antygeny grupy H-2 u płodów dopiero powyżej 15 dnia życia wewnątrzmacicznego, u noworodków zaś wszystkie badane tkanki wykazywały już dodatnie odczyny (78). O ile jednak poziom alloantygenów grupy H-2 graczy już u 18-dniowych płodów odpowiada narządowi osobnika dojrzałego, to śledziona osiąga pełną dojrzałość immunologiczną dopiero pomiędzy pierwszym i czwartym tygodniem życia pozapłodowego (21).

Podobne zależności pomiędzy dojrzewaniem morfologicznym i immunologicznym znaleziono także dla innych układów antygenowych. Poziom izoantygenów układu  $\Theta$  w mózgu noworodków u 8 szczepów myszy stanowi zaledwie około 0,8% wartości charakterystycznej dla mózgu osobnika dojrzałego (93). Niskie stężenie tych izoantygenów utrzymuje się przez pierwsze 4 dni życia, po czym wzrasta stopniowo, osiągając poziom osobnika dojrzałego pomiędzy 5 i 6 tygodniem (91, 93).

## II. Morfologiczne podstawy struktury antygenowej błon

### 1. Wybrane zagadnienia organizacji molekularnej błon

Podstawowa struktura błon, utworzona jest dzięki swoistym oddziaływaniom fizykochemicznym genetycznie określonych drobin białkowych z drobinami lipidowymi. Istota tych oddziaływań oraz towarzyszące im zmiany konformacji nie są jeszcze dokładnie poznane. W przypadku błony komórkowej krwinki czerwonej stan konformacji podstawowej grupy białek prawdopodobnie nie jest związany ściśle ze stanem fizycznym większości fosfolipidów błonowych. G l a s e r i wsp. (42) na podstawie wyników badań dyspersji skręcalności optycznej, dichroizmu kołowego oraz protonowego rezonansu magnetycznego błon erytrocytów normalnych oraz traktowanych fosfolipazą C, dochodzą do wniosku, że podstawowa część fosfolipidów i białek może zmieniać strukturę niezależnie od siebie. Zgodne z tym poglądem są spostrzeżenia L e n a r d a i S i n g e r a (67), że usunięcie fosfolipidów z błon krwinki czerwonej nie zmienia konformacji białek.

Jednakże badając inne rodzaje błon cytoplazmatycznych uzyskano odmiennie wyniki. T r u m p i wsp. (113) stwierdzili, że w błonach endoplazmatycznego retikulum stan fizyczny lipidów wpływa w znacznym stopniu na konformację białek. Wyrazem takich zmian konformacji zachodzących w wyniku działania fosfolipazy C, jest poszerzenie błony widoczne w mikroskopie elektronowym oraz utrata aktywności glukozo-6-fosfatazy. Rekonstrukcja i reagregacja błon przeprowadzone w odpowiednich warunkach przywracają aktywność enzymatyczną (97, 113).

Rozmieszczenie podstawowych składników strukturalnych błony komórkowej jest niesymetryczne. Asymetryczna struktura błony wyraża się w szczególności odmiennością strukturalną i funkcjonalną jej części zewnętrznej i wewnętrznej (8). Pogląd R o b e r t s o n a (95) o asymetrii strukturalnej błony znalazł następnie poparcie innych badaczy (29, 35, 36). Wykazano (8), że w rezultacie utrwalenia błon komórkowych w roztworze aldehydu glutarowego oraz w roztworze czterotlenku osmu lub octanu uranylu, blaszka wewnętrzna jednostki strukturalnej błony (107) staje się nieco szersza (30 Å do 40 Å) i wykazuje mniejsze powinowactwo do metali ciężkich w porównaniu z blaszką zewnętrzną. Szczególnie wyraźnie różnicuje obie blaszki utrwalenie błony przy pomocy soli lantanu ( $\text{LaMnO}_4^-$ ) (29). Blaszka zewnętrzna oraz przylegająca do niej warstwa mukopolisacharydowa wykazuje znacznie silniejsze powinowactwo do tego metalu niż blaszka wewnętrzna. D o g g e n w e i l e r i F r e n k (29) sądzą, że blaszka wewnętrzna w przeciwieństwie do zewnętrznej, zbudowana jest głównie z fosfatydocholiny, który to związek nie wykazuje powinowactwa do soli lantanu i wapnia.

Asymetria funkcjonalna błony wyraża się między innymi nierównomiernym rozmieszczeniem nukleotydo jedno-, dwu- i trój-fosfataz oraz kwasu siałowego na powierzchni komórki (8, 117). Kwas siałowy w strukturach komórkowych występuje najczęściej w postaci kompleksu glikoproteidowego lub lipopolisacharydowego. W przypadku glikoproteidów M i N czerwonych ciałek krwi człowieka z resztami kwasu siałowego lub sialo-galacto-pyranozy związana jest swoistość antygenowa (87, 105).

Substancje glikoproteidowe i lipopolisacharydowe tworzą system egzosacharydów otaczający powierzchnię komórki i innych błon cytoplazmatycznych (8, 44, 48). Obecność warstwy mukopolisacharydowej, nazwanej przez *Bennetta* „*glycocalyx*” (9), wykazano na powierzchni zewnętrznej wszystkich badanych dotąd komórek zarówno wolnożyjących jak i występujących w zespołach tkankowych (patrz 8, 44). Warstwę tę określaną również jako „płaszcz zewnętrzny” (ang. *extraneous coat*) można uwidocznic metodami histochemicznymi wykazującymi kwaśne mukopolisacharydy (45). W mikroskopie elektronowym „*glycocalyx*” przedstawia się jako substancja bezpostaciowa bezpośrednio przylegająca do części zewnętrznej błony komórkowej (9, 44, 45). Można ją usunąć przez trawienie neuraminidazą (45).

Funkcja biologiczna „*glycocalyx*” nie jest jeszcze dokładnie poznana. Wiadomo jednak, że w określonych warunkach warstwa ta spełnia funkcję substancji osłaniającej oraz dzięki obecności na jej powierzchni określonych receptorów antygenowych determinuje immunologiczne właściwości powierzchni komórki.

Immunologiczną asymetrię błony komórkowej stwierdzali liczni badacze, *Easton*, *Goldberg* i *Green* (32) jako jedni z pierwszych wykazali, że głównym miejscem wiązania cytotoksycznych przeciwciał przez komórki raka wsiękowego Krebs-2 jest powierzchnia błony komórkowej oraz błony gładkiego retikulum endoplazmatycznego.

*Lee* i *Feldman* (66) badali rozmieszczenie antygenów grupowych krwi oraz czynnika Rh<sub>0</sub>(D) na powierzchni błony krwinki czerwonej. Produkt reakcji immunologicznej lokalizował się w określonych miejscach na zewnętrznej powierzchni błony w regularnych odstępach.

*Carey* i *Pettengill* (19) stwierdzili na żywych fagocytach, że dodatek surowicy antyfagocytowej, w ilości nie wpływającej jeszcze na stopień włączania znakowanej tymidyny i urydyny, hamuje fagocytozę. Towarzyszy temu znaczne pofałdowanie błony, charakterystyczne dla zjawiska aglutynacji. Autorzy sądzą, że w wyniku reakcji immunologicznej pomiędzy przeciwciałem i antygenem zlokalizowanym w błonie dochodzi do „usztynienia” błony i zahamowania procesów ruchowych niezbędnych podczas fagocytozy. *Benedetti* i *Emmellot* (8) badając w mikroskopie elektronowym izolowaną frakcję błon komórkowych homogenatu wątroby, którą poddano reakcji immunologicznej z przeciwciałami, stwier-

dzili obecność materiału włóknistego ściśle przylegającego do zewnętrznej blaszki błony.

Ostatnio publikowane badania elektronomikroskopowe nad lokalizacją antygenów błonowych na powierzchni komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego wskazują, że aktywne receptory antygenowe są bezpośrednio związane z warstwą mukoproteidową przylegającą do zewnętrznej blaszki błony komórkowej (3, 4).

W przeciwieństwie do poprzednio cytowanych autorów, którzy receptory antygenów lokalizowali jedynie na zewnętrznej powierzchni błony, Furusawa (39) sądzi, że niektóre płodowe aglutynogeny, których nie można wykryć na powierzchni dojrzałych erytrocytów są zlokalizowane w wewnętrznej blaszce błony, są jednak w stanie zamaskowanym i nie można ich wykryć bezpośrednimi metodami immunologicznymi.

## 2. Lokalizacja śródkomórkowa

Antygeny zgodności tkankowej typu H-2 zlokalizowane są we frakcji lipoproteidowej błon komórkowych i błon cytoplazmatycznych obok antygenów determinowanych przez inne H-loci, jak: H-3, H-6, H-7 i inne (27, 48, 52, 74, 75, 85). Zawartość antygenów w poszczególnych tkankach myszy jest odmienna. Z badań Herbermana i Stetsona (50) wynika, że w przeliczeniu na mg białka, najwyższą zawartość antygenów grupy H-2 wykazuje śledziona, wątroba i węzły chłonne, najniższą zaś mózg, mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy. Różne formy izoantygenów określane przez locus H-2, w danej tkance czy narządzie wykazują podobny typ rozmieszczenia, co może wskazywać, że pod względem fizjologicznym stanowią one kompleks funkcjonalny, tworzący jednostkę czynnościową na powierzchni błony (50).

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie izoantygenów systemu H-2 zbadano na frakcjach (50) homogenatu wątroby uzyskanych drogą wirowania różnicowego według metody de Duve (31) i Petersa (86) oraz na frakcji błon komórkowych uzyskanych przy pomocy metody Neville (82). Najwyższą zawartość antygenów grupy H-2 znaleziono we frakcji błon komórkowych (100—167 jednostek na mg białka), około 5—6 razy mniej we frakcji błon gładkich mikrosomalnych i około 300 razy mniej we frakcji mitochondrialnej. Frakcja lizosomów zawierała 5 do 8 jednostek antygenowych na mg białka.

Frakcja gładkich błon mikrosomalnych wątroby, śledziony i nerek wykazuje średnio 50-krotnie wyższe stężenie antygenów grupy H-2 w porównaniu z analogiczną frakcją z mózgu, mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego i jąder (50).

Podobne rozmieszczenie śródkomórkowe jak antygeny grupy H-2, wykazują również inne układy antygenów błonowych w szczególności izoantygeny systemu  $\Theta$ , TL, i LyA, LyB (12, 13, 92). Aktywność antygeny

Θ we frakcji mikrosomów grasicy myszy jest 19-krotnie wyższa w porównaniu z pełnym homogenatem (92).

### 3. Właściwości antygenowe a stan konformacji błony

Zmiany w strukturze antygenowej błon krwinek czerwonych zachodzące w procesie dojrzewania opisał F u r u s a w a (39). Autor ten, jako jeden z pierwszych, stwierdził, że aglutynogeny, które są obecne na powierzchni komórek raka wsiękowego Ehrlicha, występują także na powierzchni erytroblastów i erytrocytów młodych płodów myszki do 16 dnia życia płodowego. W późniejszych okresach rozwoju oraz u osobników dojrzałych wspomniane aglutynogeny są również obecne w błonie erytrocytów, ale ich grupy czynne stają się niedostępne. F u r u s a w a (39) sądzi, że przyczyną tego zjawiska może być modyfikacja samej drobiny antygeny, bądź też zakrycie grup czynnych aglutynogenów przez inne substancje produkowane w kolejnych etapach różnicowania.

Odwrotne zjawisko, to jest odsłanianie ukrytych grup receptorowych, spostrzegane jest *in vivo* w przebiegu procesów transformacji komórki oraz *in vitro* w wyniku działania niektórych proteaz na powierzchnię błony. Najaktywniejszymi proteazami okazały się ficyna i papaina działająca już w stężeniu rzędu  $10^{-3}$  mg na 1 ml zawiesiny komórek (17). Przypuszcza się, że proteazy mogą usuwać powierzchniową warstwę białkową lub związaną z białkami, odsłaniając bezpośrednio miejsca receptorowe, bądź też mogą indukować przekształcenia struktury molekularnej błony, prowadzące do ujawnienia się aktywności aglutynacyjnych (17). Należy szczególnie podkreślić duże podobieństwo pomiędzy zmianami w strukturze błon pod działaniem proteaz i zmianami w procesie transformacji (16, 17). Zmiana konformacji wykształconej już struktury błony jest jednym z charakterystycznych przejawów procesu nowotworowego (17). Błonowe receptory aglutynin swoistych dla komórek nowotworowych są prawdopodobnie związane z frakcją drobinową komórek sedymentującą przy 105 000 g (16, 17). Frakcja ta uzyskana z komórek białczkowych myszy szczepu L 1210 oraz z komórek transformowanych BHK-21 hamuje aglutynację komórek macierzystych (16, 17, 18). Analogiczna frakcja z komórek prawidłowych nie wykazuje właściwości hamowania aglutynacji, jednak obecność w niej receptorów aglutynin można ujawnić w odpowiednich warunkach *in vitro* (17). Inni autorzy (48) stwierdzili, że frakcja gangliozydów z komórek nowotworowych hamuje aglutynację komórek macierzystych, natomiast także frakcja z komórek prawidłowych jest nieaktywna. Gangliozydy komórek prawidłowych stają się aktywne w teście hamowania cytoaglutynacji komórek nowotworowych po utlenianiu nadjodanem w reakcji Smitha, co wskazuje, że czynnikiem maskującym jest fukoza lub galaktoza (48). Usunięcie cukru maskującego przekształca czas-

teczkę normalnego gangliozydu w formę nieprawidłową o niekompletnym łańcuchu cukrowym, podobną do znajdowanej w komórkach nowotworowych (47, 48). Tak zmodyfikowana frakcja gangliozydów hamuje swoiście charakterystyczną dla komórek nowotworowych aglutynację pod wpływem aglutyniny kielków pszenicy (47, 48).

W niektórych przypadkach odsłonięcie aktywnych receptorów antygenowych uzyskuje się trawiąc powierzchnię komórek neuraminidazą. W ten sposób wykazano obecność antygenów transplantacyjnych na powierzchni błony komórek trofoblastu myszy (41). W naturalnych warunkach obszary receptorowe tych antygenów są maskowane związkami wchodzącymi w skład normalnej otoczki mukoproteidowej komórki. Odsłonięcie receptorów antygenowych zmienia właściwości biologiczne komórki: np. komórki białaczkowe myszy potraktowane neuraminidazą nie mogą rozwijać się w organizmie myszy zdrowej, rozwijają się natomiast w ustroju myszy napromienionej, której układ immunologiczny został uszkodzony lub zniszczony (40). Wiadomo też (40), że usunięcie kwasu sialowego z *zona pellucida* komórki jajowej królika silnie hamuje wnikanie plemnika, oraz że traktowanie izolowanych mięśni gładkich neuraminidazą i EDTA znosi wrażliwość na serotoninę, a dodatek gangliozydów lub kwasu sialowego wrażliwość tę przywraca.

Prawdopodobnie receptor błonowy reagujący z serotoniną jest glikoproteidem, a usunięcie z niego kwasu sialowego zmienia odwracalnie konformację obszaru receptorowego (20, 40).

Istnienie na powierzchni erytrocytów receptorów, przy pomocy których wirusy łączą się z błoną komórkową jest znane od dawna. Z erytrocytów człowieka otrzymano receptor wirusa grypy posiadający właściwości substancji grupowych M i N (6, 61). Ostatnio stwierdzono (105) wyraźną zależność pomiędzy zdolnością hamowania hemaglutynacji wywołanej przez wirusy grypy A/PRS i B/Md, a wielkością drobin glikoproteidów i zawartością kwasu sialowego. Wykazano, że na powierzchni inhibitora o ciężarze cząsteczkowym  $1 \times 10^6$  (mucyna ślinianki podżuchwowej owcy) znajduje się 800 reszt sialo- $\alpha$ -N-acetylo-galaktozoaminowych związanych wiązaniem O-glikozydowym z resztami seryny i treoniny (87).

Podobne właściwości wykazują także fragmenty antygenów grupowych M i N o ciężarze cząsteczkowym  $3,0 \times 10^4$  i  $1,2 \times 10^7$  (105).

Ostatnio Kornfeldowie (62) wyodrębnili z krwinek czerwonych człowieka glikopeptyd, który wiąże się z fitohemaglutyniną (PHA). Jego ciężar cząsteczkowy wynosi około 2000 a cukrem determinującym jest reszta galaktozy osłonięta kwasem N-acetyloneuraminowym. Z fitohemaglutyniną glikopeptyd ten wiąże się prawdopodobnie wiązaniem glikozylaminowym pomiędzy kwasem asparaginowym i N-acetyloglikozoaminą, na co wskazuje oporność tego wiązania na redukcję borowodorkiem w środowisku alkalicznym (62). Glikopeptyd z krwinek hamuje odpowiedź mitotyczną indukowanych PHA limfocytów i to około 3000 razy skuteczniej

niz N-acetylogalaktozamina lub galaktoza. Fakt ten może wskazywać, że PHA może wiązać się z podobnymi oligosacharydami tak na błonie krwinki czerwonej jak i limfocyту (62).

Szczególnie interesujące są dane o odmienności struktury błony komórek prawidłowych i nowotworowych ocenianej na podstawie zdolności wiązania konkanawaliny A (53). Konkanawalina A, białko o charakterze globulin, uzyskane z grochu (*Canavalia ensiformis*) wiąże się z wieloma rozgałęzionymi polisacharydami oraz glikoproteidami posiadającymi wolne grupy hydroksylowe przy węglach C-3, C-4 i C-6 pierścienia D-hekso-pyranozowego (68). Komórki nowotworowe i transformowane przy pomocy wirusa polyoma i SV-40 czy uszkodzone promieniami X posiadają na swojej powierzchni receptory zdolne do reakcji z grupami czynnymi konkanawaliny A, rezultatem czego jest aglutynacja (53). Aglutynację tę można odwrócić wprowadzając do środowiska  $\alpha$ -metylo-D-glikopyranozę, która łącząc się z natywnymi grupami receptorowymi konkanawaliny A zapobiega związaniu z receptorami antygenowymi powierzchni komórki (53). Komórki prawidłowe rosnące w normalnych warunkach nie aglutynują pod wpływem konkanawaliny A. Stwierdzono (68) wprawdzie, że konkanawalina A otacza płaszczem krwinki czerwone, nie powoduje jednak ich aglutynacji. Jeżeli komórki tkanek normalnych poddać działaniu trypsyny, to zyskują one zdolność aglutynacji pod wpływem konkanawaliny (53). Na tej podstawie przypuszcza się, że komórki prawidłowe mają te same lub podobne receptory błonowe jakie stwierdza się w komórkach nowotworowych lub uszkodzonych (promienie X), ale występują one w formie zakrytej i mogą zostać odsłonięte m.inn. pod wpływem proteaz (16, 17, 39, 53).

### III. Charakterystyka wyodrębnionych antygenów błonowych

Antygeny transplantacyjne systemu H-2 wyodrębniono z błon komórkowych limfocytów oraz komórek śledziony, płuc, nerek, wątroby i innych narządów (24, 97, 100, 118).

Ekstrakcja do roztworów wodnych uwalnia około 2% ogólnej zawartości antygenów, a trawienie papainą lub ficyną — około 5% antygenów o swoistości H-2.2 i około 18% antygenów H-2.5. Pozostałe antygeny uszkodzone w czasie preparatyki tracą aktywność biologiczną (24, 55, 56, 80, 114). Przeprowadzenie antygenów do roztworu można też uzyskać stosując detergenty (*Triton X-114*, cholan potasu), a także pod wpływem ultradźwięków (52, 59). Dalsze oczyszczanie prowadzi się drogą sączenia przez *Sephadex G-75* lub *G-200*, a następnie chromatografii jonowymiennej i elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (24, 55, 56, 58, 73, 94, 118). Preparat antygeny transplantacyjnego wyodrębniony w ten sposób z komórek śledziony świnki morskiej miał gęstość pozorną ponad 1,238 i ciężar cząsteczkowy około 200 000 (55, 57). Podobne wartości ciężaru cząsteczkowego



(75 000—200 000) dla preparatu antygenów typu H-2 ze śledzony uzyskali Nathenson i Davies (80). W późniejszych pracach Davies (24) określiła ciężar cząsteczkowy większości rozpuszczalnych preparatów antygenów transplantacyjnych typu H-2 na 45 000 do 70 000. Podobną wartość uzyskali dla preparatu ludzkiego antygeny transplantacyjnego typu HL-A Sanderson i Batchelor (99). Stosując kontrolowane trawienie papainą błon komórkowych śledzony dwóch szczepów myszy o genotypach H-2<sup>b</sup> i H-2<sup>d</sup> wyodrębniono (101, 118) dwie klasy fragmentów wykazujących aktywności alloantygenowe.

Pierwsza klasa o ciężarze cząsteczkowym około 66 000 wykazywała obecność kilku swoistości. Dla allelu H-2<sup>b</sup> stwierdzono swoistości H-2.5, H-2.33 i H-2.28, a dla allelu H-2<sup>d</sup> swoistości H-2.3,8; H-2.3,10,13 (81, 101). Fragmenty pierwszej klasy są glikoproteidami zawierającymi 80 do 90% białka i 10% cukrów, w tym cukry obojętne, glukozaminę i kwas sialowy. Alloantygeny grupy H-2<sup>b</sup> zawierały 90% białka, 5% cukrów obojętnych i około 4,4% heksozaminy zaś antygeny grupy H-2<sup>d</sup> zawierały nieco mniej cukrów, w tym 3—5% cukrów obojętnych i 3% heksozaminy. Różnice te acz niewielkie są jednak znamienne. Antygeny obu grup zawierały około 1% kwasu sialowego. Wśród cukrów obojętnych stwierdzono głównie galaktozę i mannozę.

Analiza składu aminokwasowego obu grup antygenów wskazuje na duże podobieństwo. Jedyna uchwytna różnica polega na nieco większej zawartości argininy i kwasu asparaginowego w materiale alloantygenowym typu H-2<sup>d</sup> w porównaniu z grupą H-2<sup>b</sup> (101).

Druga klasa fragmentów alloantygenów H-2 ma ciężar cząsteczkowy około 33 000 (118). Fragmenty alloantygenów tej klasy wykazują tylko jedną swoistość alloantygenową. Swoistością tą dla genotypu H-2<sup>b</sup> jest H-2.2, a dla genotypu H-2<sup>d</sup>, cecha H-2.31. Analiza chemiczna wykazała, że badany materiał zawiera glikoproteidy o zawartości 72% (dla H-2<sup>d</sup>) do 83% (dla H-2<sup>b</sup>) białka, 6 do 7% cukrów obojętnych, glukozaminę i kwas sialowy. Materiał izolowany ze śledziony myszy o genotypie H-2<sup>b</sup> zawiera więcej seryny i tyrozyny oraz około 6% glukozaminy, natomiast materiał H-2<sup>d</sup> zawiera więcej kwasu asparaginowego, waliny, leucyny i izoleucyny, a praktycznie nie zawiera glukozaminy. Glikoproteid H-2<sup>d</sup> jest nieco cięższy (34 000) niż glikoproteid H-2<sup>b</sup>. Większość peptydów w obu glikoproteidach jest identyczna, jednak trzy peptydy w glikoproteidzie H-2<sup>b</sup> i cztery w glikoproteidzie H-2<sup>d</sup> są odmienne (102). Węglowodany obu glikoproteidów tworzą prawdopodobnie identyczne łańcuchy, z których każdy zawiera około 15 reszt monocukrów. Usunięcie kwasu sialowego z cząsteczek glikoproteidów nie zmienia ich właściwości antygenowych (102).

Ludzki antygen transplantacyjny typu HL-A uzyskano w kilku pracowniach (58, 73, 114). Materiał aktywny w reakcji stymulacji limfocytów zawarty jest w pośredniej frakcji wypływającej z kolumny *Sephadex G-200* (114). Preparaty antygeny transplantacyjnego ludzkiego typu HL-A i my-

siego typu H-2 są podobne. W obu przypadkach najwyższy procent przejścia do roztworu materiału antygenowego z błon komórek śledziony uzyskano w wyniku 60 minutowego trawienia papainą. Najwyższe stężenie aktywności antygenowej, wyrażone stopniem hamowania efektu cytotoksycznego znaleziono w podobnej objętości eluatu z kolumny *Sephadex*

Tablica 1

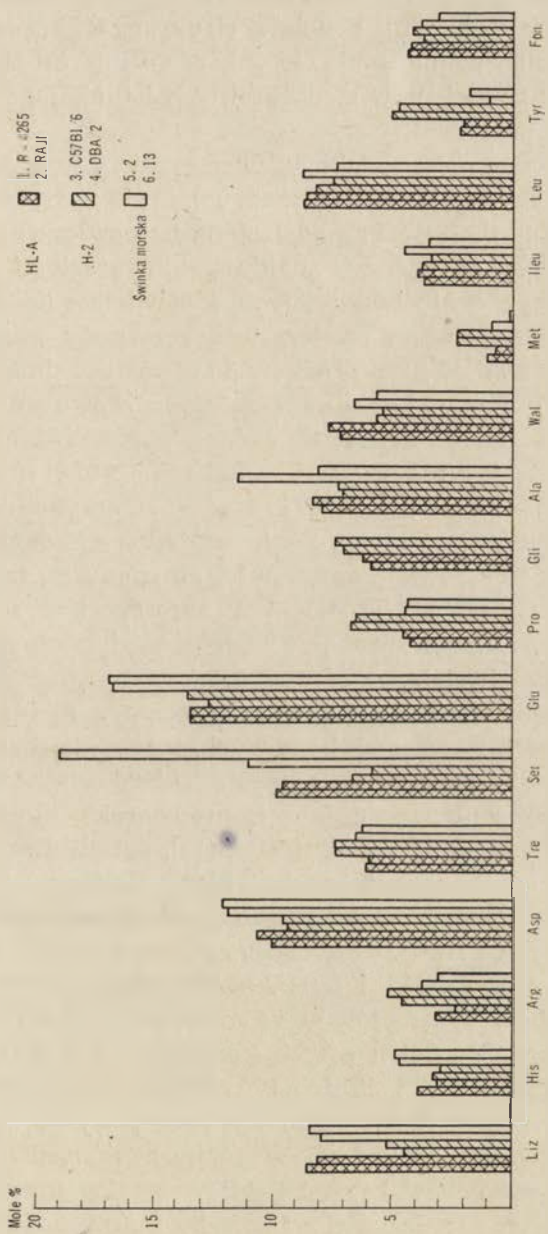
Skład cukrów w oczyszczonych alloantygenach H-2 i HL-A wg (73)

Źródło alloantygeny	cukry obojętne (%)	kwas sialowy (%)	aminocukry (%)
H-2			
CS7B1/6	5,96	1,45	4,90
DBA/2	3,34	1,10	3,22
HL-A			
RAJI	7,33	0,9	0,50
R-4265	6,14	0,75	0,50

G-150. Punkt izoelektryczny materiału HL-A przypada na  $pH$  4,35, a dla materiału H-2 przy  $pH$  5,2. W żelu poliakrylamidowym aktywność HL-A sp. 6b i 7c, wędruje nieco szybciej w porównaniu z aktywnością alloantygenową H-2.5. Ruchliwość elektroforetyczna antygeny HL-A w  $pH$  9,4 (58) jest nieco większa niż antygeny transplantacyjnego świnki morskiej (56, 57). Zawartość cukrów w oczyszczonych preparatach alloantygenów HL-A i H-2 przedstawia tablica 1. Największe różnice występują w zawartości glukozy. Skład aminokwasowy antygenów typu HL-A i H-2 jest również zbliżony (rysunek 1).

Struktura I rzędowa antygeny transplantacyjnego świnki morskiej wykazuje również znaczne podobieństwo do antygenów człowieka i myszy. Antygen transplantacyjny świnki morskiej wyodrębniony w 1967 roku (56) okazał się jedynym białkiem odpowiedzialnym za opóźniony efekt skórny u uczulonych świnek morskich (56, 57).

Skład aminokwasowy antygeny transplantacyjnego ze śledziony i płuc dwóch różnych szczepów wsobnych świnek morskich wykazuje statystycznie znamienne różnice w zawartości seryny, alaniny, izoleucyny, leucyny i waliny (58). K a h a n i wsp. (58) sądzą, że niektóre z tych aminokwasów nadają określonym drobinom swoiste cechy immunologiczne warunkując bezpośrednio konfigurację struktury antygenowej, bądź determinując odpowiednie modyfikacje struktury drugo- i trzeciorzędowej. Podobne wnioski wynikają z wspomnianych już badań (101, 102) nad strukturą białkową alloantygenów H-2<sup>b</sup> i H-2<sup>d</sup> myszy. Porównując skład aminokwasowy antygeny transplantacyjnego myszy, świnki morskiej i człowieka widzimy, że zawartość leucyny, izoleucyny, fenyloalaniny i treoniny wykazuje najmniejsze różnice międzygatunkowe. Trzy pierwsze aminokwasy mają sądząc z tablicy T a n f o r d a (43) wysoki współczynnik hydrofobowości.



**Rysunek 1.** Skład aminokwasowy oczyszczonych antygenów transplantacyjnych człowieka, szczura i świnki morskiej według Manna i Nathensona (73) oraz Kahana i Reissfelda (57).

Największe różnice ilościowe dotyczą lizyny, proliny, seryny, tyrozyny i metioniny (patrz rysunek 1). Jeżeli przyjąć, że antygeny te stanowią homologi białkowe u badanych gatunków, to wielkość zespołów grup hydrofobowych zgodnie z poglądami Goldsacka (43) powinna być podobna, co zapewniałoby utrzymanie podobnej struktury III rzędowej i funkcji biologicznej. Przypuszczenie takie jest bardzo interesujące, zwłaszcza w świetle znanych podobieństw strukturalnych i funkcjonalnych antygenów błonowych.

*Antygen  $\Theta$ .* Antygen  $\Theta$  opisano jako antygen grasiczy występujący w normalnej tkance myszy szczepu AKR (91, 92, 93). Dwie jego postacie izoantygenu  $\Theta$ -AKR oraz  $\Theta$ -C3HeB/Fe znaleziono na powierzchni tymocytów. Szczególnie duże ilości antygenu  $\Theta$  znajdują się w grasicy i w centralnym układzie nerwowym osobników dojrzałych, a niewielkie ilości także w śledzionie, węzłach chłonnych, wyrostku robaczkowym i płucach. Jak już wspomniano, mózg płodów i noworodków do czwartego dnia życia zawiera małe ilości tego antygeny. Lokalizacja śródkomórkowa antygeny  $\Theta$  jest podobna jak alloantygenu typu H-2. Jednak w przeciwieństwie do nich, antygen  $\Theta$  wykazano jedynie na powierzchni tymocytów, limfocytów i komórek siateczki (4). Boyse i wsp. (14) sądzą, że antygen  $\Theta$  jest zlokalizowany wewnątrz struktury błony. Ponieważ żadna z badanych przez nich surowic nie hamuje całkowicie aktywności antygeny  $\Theta$ , natomiast surowica anty- $\Theta$  blokuje system TL i H-2(D) autorzy ci są zdania, że ilość antygeny  $\Theta$  w błonie komórkowej jest większa niż innych antygenów blokowanych przez przeciwciała.

Próby wyodrębnienia antygeny  $\Theta$  przy pomocy metod stosowanych w preparatyce innych antygenów błonowych, powodują jego inaktywację. Inaktywuje go też ekstrakcja mieszaniną chloroform:metanol (2:1) co skłania do przypuszczenia, że antygen  $\Theta$  ma charakter lipoproteidu (92). *Izoantygenu Ly-A i Ly-B.* Boyse i wsp. (12), opisali dwa układy izoantygenu występujących na powierzchni błony limfocytów i tymocytów myszy. Oznaczono je jako Ly-A i Ly-B (od ang. *lymphocyte*), a kontrolujące je loci jako Ly-A i Ly-B. Każdy locus składa się tylko z dwóch alleli (Ly-A.1 i Ly-A.2 oraz Ly-B.1 i Ly-B.2). Antygeny Ly zostały wykryte na powierzchni błony tymocytów a w mniejszej ilości na powierzchni limfocytów. Prekursory szpikowe tych komórek nie wykazują obecności antygenów Ly. Tymocyty i limfocyty chimer popromiennych wykazują obecność antygenów powierzchniowych grup Ly-A, Ly-B i  $\Theta$  dawcy. Poziom antygenów Ly badano w różnych tkankach myszy. Jeżeli zawartość obu izoantygenu Ly-A i Ly-B w grasicy uznać za 100%, to w węzłach chłonnych w zależności od szczepu myszy i typu izoantygenu znajduje się od 23 do 75%, w śledzionie od 8 do 52%, w szpiku kostnym od 1 do 5%, a tkanki centralnego układu nerwowego, płuc, wątroby, nerek oraz czerwone ciała krwi nie wykazują obecności antygenów Ly.

Udział izoantygenu Ly-A i Ly-B w procesach odrzucania przeszczepu

pu nie jest jeszcze ostatecznie udokumentowany, ponieważ jednak niezgodność w zakresie obu układów powoduje powstawanie przeciwciał, B o y s e i wsp. (14) proponują, aby je uznać jako antygeny zgodności tkankowej. *Antygen TL*. Antygen TL (ang. *Thymus-leukaemia*) wykryty został w normalnej grasicy niektórych szczepów myszy oraz w komórkach białaczkowych (13, 15). W stanie fizjologicznym występuje on tylko w tymocytach. TL locus jest kompleksowy i determinuje trzy swoistości antygenowe TL.1, 2 i 3. Zlokalizowany jest on w sąsiedztwie końca D układu antygenów transplantacyjnych H-2. W tymocytach myszy występuje w jednej z trzech form fenotypowych jako TL-; TL+(TL.2); TL+(TL.1,2,3). Forma fenotypowa TL.1 uważana jest za antygen swoisty białaczkowy (13, 26). Komórki białaczkowe występować mogą zatem w trzech formach fenotypowych, a mianowicie: TL.1; TL.1,2 lub TL.1,2,3, w zależności od szczepu, z którego się wywodzą. Ponieważ białaczka może powstawać zarówno u osobników TL-, jak i TL+, D a v i e s i wsp. (26) sądzą, że gen strukturalny dla syntezy antygenu TL, występuje u obu szczepów myszy. Antygen jest wytwarzany jednak tylko u szczepu TL+, podczas gdy u szczepu TL-, gen strukturalny podlega represji.

W komórce antygen TL związany jest z frakcją lipoproteidową błon gdzie występuje razem z antygenami typu H-2. Można go oczyścić i odzielić od antygeny H-2 przez frakcjonowanie na kolumnie z *Bio-Gel P 300* a następnie na kolumnie z *DEAE-Sephadex A-50* (26). D a v i e s i wsp. (26) wyciągają stąd wniosek, że aktywność antygenów TL i H-2 zlokalizowana jest na odrębnych cząsteczkach. Ponieważ reprezentacja układu antygenowego H-2 na powierzchni tymocytów jest związana z obecnością antygenów TL (jest ona większa u osobników TL-) przypuszcza się, że istnieje współzależność chemiczna pomiędzy dwoma rodzajami drobin o odmiennych funkcjach biologicznych (26).

#### IV. Reprezentacja układów antygenowych na powierzchni komórki

Istnienie szeregu systemów antygenowych na powierzchni błon zostało wykazane w różnych typach komórek przy pomocy metod serologicznych i biochemicznych. Z badań prowadzonych metodą immunofluorescencji można wnosić, że poszczególne alloantygeny uformowane są w postaci odrębnych skupisk, bądź też występują w formie rozproszonej na całej powierzchni komórki (21, 34). Dokładniejszą lokalizację umożliwiło dopiero zastosowanie znakowanych ferrytyną przeciwciał do badań w mikroskopie elektronowym. Metoda ta nasuwa jednak szereg zastrzeżeń.

Sprzęganie przeciwciał z ferrytyną dokonuje się przy współudziale dwuwartościowych chemicznych „couplerów”, którymi są najczęściej dwuizocyjanian metaksylenu, tolueno-2,4-dwuizocyjanian lub p,p'-m,m'-dwuniro-dwufenylo sulfonian. Związki te niezależnie od znacznej denaturacji

przeciwciał wywoływanej podczas sprzęgania, mają ponadto zdolność wiązania się w wielu punktach cząsteczki białka tworząc agregaty dwóch lub więcej drobin. Wysoce heterogenny produkt, wymaga oczyszczania, które w dalszym ciągu obniża aktywność przeciwciał. W mikroskopie elektronowym obserwuje się ostatecznie szereg warstw cząstek ferrytyny w rejonie antygeny, co zaciemnia subtelną mozaikę makromolekularnego utkania błony. Modyfikacją tej bezpośredniej metody jest opracowana przez Hammerlinga i wsp. (49) tak zwana metoda pośrednia. Wynik reakcji zależy tutaj nie od kowalencyjnego wiązania ferrytyny z globuliną, lecz od swoistych wiązań typu antygen-przeciwciało pomiędzy ferrytyną i globuliną anty-ferrytynową. Wykazanie produktu reakcji w mikroskopie elektronowym wymaga stworzenia dwuwartościowych przeciwciał hybrydów anty-ferrytyna i anty  $\gamma$ -G oraz wstępnego „uczulenia” badanych komórek przeciwciałami nieznakowanymi. Tą metodą uzyskuje się znacznie subtelniejsze jednowarstwowe wyznakowanie badanych antygenów, przy czym wyznacznikiem może być nie tylko ferrytyna, ale także niektóre wirusy roślinne (3).

Niezależnie od swych wad metody oparte na sprzęganiu przeciwciał z ferrytyną pozwoliły ustalić szereg różnic w strukturze antygenowej komórek.

Na powierzchni limfocytów wykryto do tej pory alloantygeny pięciu układów antygenowych: H-2,  $\Theta$ , MSLA, Ly-A i Ly-B. Aoki i wsp. (4) metodą bezpośrednią i pośrednią znakowania przeciwciał ferrytyną zbadali lokalizację alloantygenów układów H-2,  $\Theta$  i TL na powierzchni limfocytów, tymocytów i innych komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego. Używane surowice zawierały przeciwciała skierowane przeciwko kilku swoistościom badanych układów antygenowych. Wszystkie surowice dawały podobny obraz z odpowiednimi fenotypowo limfocytami. W obszarach dla układu H-2 drobinę ferrytyny odnajdywano na mniejszych lub większych obszarach błony komórkowej małych i dużych limfocytów, przy czym te ostatnie były intensywniej wyznakowane. Ogólną powierzchnię wyznakowaną ocenić można na 85 do 90%. Antygen  $\Theta$  zajmuje tylko niewielkie odcinki błony limfocytów.

Wyniki te różnią się od wcześniejszych badań Davisa i Silvermana (28), którzy stwierdzali jednolite i równomierne rozmieszczenie ferrytyny na całej powierzchni limfocyty.

Rozmieszczenie alloantygenów na powierzchni tymocytów jest inne niż na limfocytach. Charakterystyczne jest, że obszar wyznakowany ferrytyną dla antygenów H-2 stanowi zaledwie około 10%, natomiast obszar zajęty przez układ  $\Theta$  wynosi ponad 50% powierzchni tymocytów. Najmniejszy obszar zajmuje układ TL. Ogranicza się on do jednego lub kilku małych odcinków reprezentujących około 5% powierzchni komórki (4).

Zawartość antygenów układu  $\Theta$ , Ly-A oraz antygeny MSLA oznaczoną na podstawie pojemności absorpcyjnej limfocytów wyrażono w wartościach

Tablica 2

Reprezentacja systemów antygenowych na powierzchni niektórych komórek

Antygen	Tymocyty	Limfocyty	Komórki plazmatyczne	Komórki siateczki	Makrofagi	Granulocyty kwasochłon.	Erytrocyty
H-2	+(+++)	+++ (+++++)	+++	+++	+	+++	++(+)
TL	+(+++)	-	-	-	++	-	-
O	++++	+	-	+	-	-	-
MSLA	++++	+	-	+	-	-	-
Ly-A	++++	++	-	++	-	-	-
Ly-B	++	+	-	+	-	-	-
PC. 1	++	+	++	+	-	-	-

Przedstawione na podstawie (4, 28, 111).

względnych w stosunku do pojemności absorbcyjnej tymocytów (111). Przyjmując jako 100 procent zawartość antygeny  $\Theta$ -C3H w tymocytach myszy szczepu BALB, w limfocytach węzłów chłonnych stwierdzono 25<sup>0</sup>%, a w limfocytach krwi obwodowej 19<sup>0</sup>%. W analogicznych komórkach zawartość antygeny Ly-A.2 wynosi 66<sup>0</sup>% i 68<sup>0</sup>% oraz antygeny MSLA odpowiednio 46<sup>0</sup>% i 32<sup>0</sup>% (111).

Odmianą strukturę antygenową przedstawia powierzchnia komórek plazmatycznych. Komórki te nie posiadają antygenów charakterystycznych dla limfocytów (88). Takahashi i wsp. (111) przy pomocy testu absorbcyjnego z odpowiednimi antysurowicami wykazali brak antygenów  $\Theta$ -C3H, Ly-A.2, MSLA, TL i Ly-B na powierzchni prawidłowych komórek plazmatycznych oraz komórek szpiczaka MOPC-70A, MOPC-104E i MPC-67. Natomiast surowica DBA/2 anty MOPC-70A wykazywała właściwości cytotoksyczne jedynie w stosunku do komórek wspomnianych wyżej trzech linii szpiczaka myszy, a nie wykazywała tych właściwości w stosunku do limfocytów, tymocytów i komórek śledziony, a także komórek białaczkowych wykazujących obecność antygenów G, FMR, ML, E i TL. Swoisty antygen błonowy odpowiedzialny za efekt cytotoksyczny z tą surowicą obecny jest na powierzchni różnych badanych linii szpiczaków myszy i prawidłowych komórek plazmatycznych, a także w homogenacie wątroby, nerki i mózgu oraz w komórkach śledziony (111). Antygen ten został określony symbolem PC.1 (od ang. *plasma cell*).

Na powierzchni prawidłowych komórek plazmatycznych rozpoznano dotąd tylko dwa układy antygenowe: H-2 i PC.1. Reprezentacja układu H-2 na powierzchni tych komórek sądząc na podstawie kinetyki testu cytotoksycznego jest tego rzędu co u tymocytów (111). Jednakże badania w mikroskopie elektronowym wskazują na znacznie większą reprezentację H-2, przypominającą raczej sytuację w limfocytach (4). Reprezentacja antygeny PC.1 na powierzchni komórek plazmatycznych obecnie nie jest jeszcze znana.

Strukturę antygenową innych komórek wolnożyjących badano jedynie fragmentarycznie. Aoki i wsp. (4), którzy jak dotąd przedstawili najobszerniejszą dokumentację uważają, że reprezentacja układu H-2 jest najobfitsza na powierzchni komórek siateczki, a najmniejsza na makrofagach i czerwonych ciałkach krwi. Reprezentację szeregu badanych układów antygenowych na powierzchni niektórych komórek ilustruje tablica 2, sporządzona na podstawie wyników badań Aoki i wsp. (4), Takahashi i wsp. (111) oraz Davisa i Silvermana (28).

Rozmieszczenie poszczególnych układów antygenowych na powierzchni komórek można badać także przy pomocy metod serologicznych w oparciu o tak zwany test blokowania (14, 23). Metoda opiera się na spostrzeżeniu, że jeżeli dwa antygeny są wystarczająco blisko siebie zlokalizowane na powierzchni błony, to absorbcja przeciwciał przez jeden z nich zmniejsza



absorbencję drugiego. Procent obniżenia zdolności absorbcyjnej można obliczyć według wzoru (14):

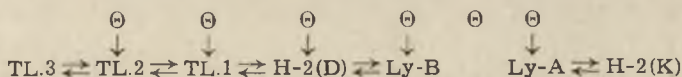
$$\frac{n [\text{tymocyty blokowane}] - n [\text{tymocyty kontrolne}]}{n [\text{tymocyty blokowane}]} \times 100$$

Metoda ta pozwala nie tylko zlokalizować antygen na powierzchni błony, ale także w przypadku kilku antygenów określić ich pozycję względem siebie.

Cresswell i Sanderson (23) stwierdzili tą metodą, że izoantygeny układu H-2 o odmiennych swoistościach, są zlokalizowane tak blisko siebie, że wiązanie się z przeciwciałami jednego z nich stwarza zawadę przestrzenną hamującą absorbencję drugiego. Odległość między tymi antygenami jest więc równa lub mniejsza od rozmiarów drobiny IgG.

Boyse i wsp. (14) zastosowali test blokowania do lokalizacji na powierzchni tymocytów pięciu układów alloantygenowych: H-2,  $\Theta$ , Ly-A, Ly-B oraz TL. Stwierdzili oni, że antygeny determinowane przez parę alleli, zajmują najbliższą względem siebie pozycję. Oceniając procent blokowania przeciwciał skierowanych przeciw poszczególnym antygenom wykazali też, że badane systemy alloantygenowe można podzielić na dwie grupy: pierwszą obejmującą alloantygeny TL.3; TL.2; TL.1; H-2(D) i Ly-B oraz drugą grupę zawierającą Ly-A i H-2(K). W obu przypadkach kolejność antygenów ustalono na podstawie braku kompetycji pomiędzy H-2(D) i H-2(K), TL.1 i TL.3 itd.

Jak wspomniano wcześniej, antygen  $\Theta$  nie jest blokowany przez żadne przeciwciało, natomiast surowica anti- $\Theta$  blokuje antygeny TL.2; TL.1; H-2(D); Ly-B i Ly-A. Pozwala to przypuszczać, że ilość antygeny  $\Theta$  w komórce jest większa od ilości antygenów blokowanych. Jeżeli antygen  $\Theta$  jest zlokalizowany w części wewnętrznej jednostki strukturalnej błony, to przypuszczalna kolejność na błonie przedstawia się następująco (14):



## V. Inne antygeny błonowe

Badania struktury błon komórkowych w ostatnich latach osiągnęły znaczny postęp ze względu na opracowanie nowych metod wyodrębniania składnika białkowego.

W 1968 r. Neville (83) stosując ekstrakcję do 1 mM roztworu EDTA w pH obojętnym izolował z frakcji błon komórek wątrobowych antygen stanowiący około 10% całkowitej zawartości białka. W rozdziale elektroforetycznym w 5M moczniku w pH 2,7 białko to wykazywało ruchliwość o  $R_f = 0,18$ . To swoiste narządowe białko jest związane jedynie z frakcją błon komórek wątrobowych. Porównawcze badania immunologiczne po-

twierdziły obecność podobnego antygeny w błonach komórek wątrobowych myszy, szczura i świnki morskiej. W procesie ontogenezy białko to pojawia się dopiero w drugiej połowie życia płodowego.

W tym samym czasie Marchesi i wsp. (76) z błon czerwonych ciałek krwi wypreparowali białko, które nazwali „*Spectrin*”. Białko to następnie wydzielono również z błon erytrocytów świnki morskiej, konia, owcy, królika i człowieka.

W roztworach soli *spektrina* polimeryzuje, tworząc dwie główne formy agregatów o stałej sedymentacji  $S_{20w} = 8$  i 11, a w roztworze 6M guanidyny dysocjuje na podjednostki o współczynniku sedymentacji 1,9S. Ciężar cząsteczkowy podjednostki obliczono na 140 000—150 000. Głównymi aminokwasami są: kwas glutaminowy (20,5  $\mu\text{M}^0/\text{o}$ ), leucyna (12,4  $\mu\text{M}^0/\text{o}$ ) oraz kwas asparaginowy (10,9  $\mu\text{M}^0/\text{o}$ ). *Spektrina* w błonie czerwonych ciałek stanowi około 20% całkowitej zawartości białka. W teście dyfuzji podwójnej białko to tworzy jedno pasmo precypitacji z homologiczną surowicą odpornościową. *Spektriny* z błon krwinek czerwonych różnych gatunków ssaków wykazują częściowe podobieństwo immunologiczne. Badania immunologiczne i elektrono-mikroskopowe wskazują, że *spektrina* znajduje się po wewnętrznej stronie błony gdzie prawdopodobnie tworzy włóknistą sieć (112).

Furthmayr i Timpl (38) podobną metodą jak Marchesi (76) otrzymali z błon erytrocytów wołu, owcy i człowieka białko strukturalne o bardzo zbliżonej charakterystyce do *spektriny*. Białko to nie zawiera kwasu sialowego ani lipidów, a jego ciężar cząsteczkowy wynosi około 190 000 do 210 000. Podobnie jak *spektrina*, białko to jest prawdopodobnie zlokalizowane w głębszych warstwach struktury błony erytrocytów (38).

Białko o podobnej charakterystyce do *spektriny* zawarte jest prawdopodobnie również we frakcji błon retikulum endoplazmatycznego homogenatu wątroby szczura (97).

Istnieje szereg danych w literaturze donoszących o wyizolowaniu antygenów swoistych pod względem narządowym jak i śródkomórkowym. Edington i wsp. (33) otrzymali dwa typy antygenów swoistych związanych z błonami komórek nabłonkowych nerki. Jeden z nich oznaczony jako RTE-3 jest lipoproteidem o współczynniku sedymentacji  $S_{20w}^0 = 28$ . Drugi antygen o współczynniku sedymentacji 9,8S jest białkiem immunogennym ale w stanie fizjologicznym występuje w formie zamaskowanej. Pojawia się on w surowicy krwi w przypadkach uszkodzenia nabłonków nerkowych. Opisano także antygeny swoiste występujące w tarczycy (34), w nabłonku jelita (41) oraz w grasicy (22, 98). Wiele prac poświęcono analizie immunologicznej struktur błonowych uzyskanych z frakcji retikulum endoplazmatycznego. Jako jedni z pierwszych przeprowadzili analizę frakcji mikrosomów uzyskanych z wątroby, śledziony i węzłów chłonnych Whitbeck i Rosenberg (116). Stwierdzili oni w badanych frakcjach obecność antygeny Forssmana. Lundkvist i wsp. (72) oraz

R o s s o w s k i (96) badali przy pomocy metod immunologicznych komponent białkowy błon endoplazmatycznego retikulum komórek wątrobowych. Stwierdzono, że w czasie ontogenezy ilość antygenów białkowych oraz lipoproteidowych charakterystycznych dla osobnika dojrzałego zwiększa się z 6 do 14, w szczególności zlokalizowane w strefach  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 i  $\beta$ -1 globulin. R a f t e l l i P e r l m a n (90) stwierdzili we frakcji błon gładkich mikrosomowych nie wiążących się z jonami magnezu obecność dwóch swoistych antygenów, które wykazać można już drugiego dnia po urodzeniu. Jeden z antygenów wykazywał aktywność nukleotydo-dwufosfatazy. Frakcja gładkich błon mikrosomowych wiążących jony magnezu oraz frakcja błon szorstkich wykazuje obecność wielu antygenów wspólnych przy czym jeden z nich jest swoisty dla tych frakcji.

Analizując strukturę błon komórkowych należy mieć na uwadze substancje, których obecność na powierzchni komórek związana jest z ich swoistą fizjologiczną funkcją. Substancjami takimi są immunoglobuliny (69, 89) oraz białko aktynopodobne (46).

Obecność aktywnych determinantów immunoglobulin na powierzchni żywych limfocytów wykazali przy pomocy odczynu immunofluorescencyjnego R a f f i w s p. (89). Dodatni odczyn występuje w postaci „czapy” obejmującej 1/3 do 1/5 powierzchni komórki. Pochodzenie immunoglobulin na powierzchni limfocytów nie jest wiadome. Przypuszcza się, że są one wytwarzane przez te same komórki na powierzchni których występują (89). Wstępne doświadczenia wskazują także, że immunoglobuliny odnajdywane na powierzchni wszystkich badanych do tej pory komórek należą do jednej klasy. Ponieważ są one blokowane przez przeciwciała anty-kappa można przypuszczać na podstawie badań L e s l e y a i D u t t o n a (69), że omawiane receptory immunoglobulinowe zawierają łańcuch lekki typu kappa. Ogólnie przyjmuje się, że immunoglobuliny te zlokalizowane są na powierzchni komórek biorących udział w procesach odpowiedzi immunologicznej i warunkują swoiste rozpoznanie antygeny (69). Odrębną funkcję spełnia substancja aktynopodobna występująca na powierzchni niektórych typów komórek (fibroblasty tkanki łącznej i trombocyty, oraz komórki mięśni i wątroby płodów). Białko to ma odgrywać pewną rolę w procesach adhezji (46).

## VI. Uwagi końcowe

W świetle obecnych wyników badań, w strukturę molekularną błon wbudowane są zarówno antygeny charakterystyczne dla form dojrzałych, których receptory w warunkach prawidłowych tworzą warstwę percepcyjno-reaktywną na powierzchni błon, jak również antygeny „nieczynne” w dojrzałych formach komórkowych, których receptory zostały zabloko-

wane na określonych etapach różnicowania. Receptory tych antygenów mogą zostać ujawnione wówczas, gdy w warunkach *in vivo* mechanizmy kontroli genetycznej zostaną zmodyfikowane na przykład w procesie transformacji nowotworowej, lub w wyniku działania kancerogenów chemicznych. W tych przypadkach dochodzi do zmiany metabolizmu komórek, a następnie wzrostu przepuszczalności ich błony (1). Istnieje pogląd, że właśnie lizosomalne proteazy są czynnikiem modyfikującym strukturę antygenową błon, podobnie jak to ma miejsce w warunkach *in vitro* (1, 17). Zmieniona struktura warstwy percepcyjno-reaktywnej błon byłaby zatem odpowiedzialna za zmienione cechy komórek, to jest szybki wzrost, proliferację, zanik zdolności adhezji (17). Tak więc, zmieniona konformacja błony lub jej poszczególnych białek stałaby się genetycznie określonym skutkiem i przyczyną zjawisk różnicowania i odróżnicowywania komórki.

W miarę postępu procesów dojrzewania wzrasta ilość wykrywalnych systemów antygenów transplantacyjnych. Stanowi to dodatkową barierę zabezpieczającą swoistość komórek i tkanek. Mnogość odrębnych cech kodowanych przez system genetyczny HL-A człowieka nie jest jeszcze poznana. Kissmeyer-Nielsen i wsp. (60) wyznaczyli 1596 odmiennych HL-A genotypów. Jest to jednak prawdopodobnie najniższa możliwa wartość. Przypuszczać bowiem należy, że ilość odrębnych cech genotypowych jest niezwykle wysoka (2). Stanowią one skuteczne, jak dotąd, zabezpieczenie odrębności jednostki biologicznej.

Szczególnie szybki rozwój badań w ostatnich latach nad strukturą antygenową błon oraz nad strukturą poszczególnych antygenów, świadczy o wadze omawianego zagadnienia, którego rezultaty mogą znaleźć praktyczne zastosowanie między innymi w onkologii oraz w nauce o przeszczepach.

#### LITERATURA

1. Allison A. C., Mallucci L., *J. Exptl. Med.* **121**, 463 (1965).
2. Amos D. B., *Transplantation* **6**, 678 (1968).
3. Aoki T., Boyse E. A., Old L. J., De Harven E., Hämmerling U., Wood H. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **65**, 569 (1970).
4. Aoki T., Hämmerling U., Harven E. de, Boyse E. H., Old L. J., *J. Exp. Med.* **130**, 979 (1969).
5. Bach F. H., *Science* **168**, 1170 (1970).
6. Baranowski T., Lisowska E., Morawiecki A., Romanowska E., Strożecka K., *Arch. Immunol. Terapii Dośw.* **7**, 15 (1959).
7. Basch R. S., Stetson Ch. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **97**, 83 (1962).
8. Benedetti E. L., Emmelot P., w *The Membranes*, red. Dalton A. J. i Hagenaz F., Academic Press, New York i Londyn 1968, str. 33.
9. Bennett H. S., *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 14 (1963).
10. Billingham R., Brent L., Medawar P. B., *Nature* **178**, 514 (1956).
11. Bogden A. E., Aptekman P. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **97**, 43 (1962).

12. Boyse E. A., Miyazawa M., Aoki T., Old L. J., *Proc. Roy. Soc. B.* **170**, 175 (1968).
13. Boyse E. A., Old L. J., Luell S., *Nature* **201**, 779 (1964).
14. Boyse E. A., Old L. J., Stockert E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 886 (1968).
15. Boyse E. A., Stockert E., Old L. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 954 (1967).
16. Burger M. M., *Nature* **219**, 499 (1968).
17. Burger M. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **62**, 994 (1969).
18. Burger M. M., Goldberg A. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 359 (1967).
19. Carey F. J., Pettengill O. S., *J. Cell Biol.* **33**, 709 (1967).
20. Carroll P. M., Sereda D. D., *Nature* **217**, 667 (1968).
21. Cerottini J. C., Brunner K. T., *Immunology* **13**, 395 (1967).
22. Colley D. G., Malakian A., Waksman B. H., *J. Immunology* **104**, 585 (1970).
23. Cresswell P., Sanderson A. R., *Transplantation* **6**, 996 (1968).
24. Davies D. A. L., *Transplantation* **6**, 660 (1968).
25. Davies D. A. L., *Transplantation* **8**, 51 (1969).
26. Davies D. A. L., Boyse E. A., Old L. J., Stockert E., *J. Exptl. Med.* **125**, 549 (1967).
27. Davies D. A. L., Manstone A. I., Viza O. C., Colombani J., Dausset J., *Transplantation* **6**, 571 (1968).
28. Davis W. C., Silverman L., *Transplantation* **6**, 535 (1968).
29. Doggenweiler C. F., Frenk S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 425 (1965).
30. Dungern E. V., Hirszfeld L., *Z. Immunitätsf. Orig.* **6**, 284 (1910).
31. de Duve Ch., Pressman B. C., Gianetto B., Wattiaux R., Applemans F., *Biochem. J.* **60**, 604 (1955).
32. Easton J. M., Goldberg B., Green H., *J. Exptl. Med.* **115**, 275 (1962).
33. Edgington Th. S., Glassock R. J., Watson J. I. Dixon F. J., *J. Immunology* **99**, 1199 (1967).
34. Fagraeus A., Jonsson J., *Immunology* **18**, 413 (1970).
35. Farquhar M. G., Palade G. E., *J. Cell Biol.* **17**, 375 (1963).
36. Farquhar M. G., Palade G. E., *J. Cell Biol.* **26**, 263 (1965).
37. Fellows M., Dausset J., *Nature* **225**, 191 (1970).
38. Furthmayr H., Timpl R., *Eur. J. Biochem.* **15**, 301 (1970).
39. Furusawa M., *Exp. Cell Res.* **47**, 63 (1967).
40. Ginsburg V., Neufeld E. F., *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 371 (1969).
41. Gitzelmann R., Bächli Th., Binz H., Lindermann J., Semenza G., *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 20 (1970).
42. Glaser M., Simpkins H., Singer S. J., Sheetz M., Chan S. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **65**, 721 (1970).
43. Goldsack D. E., *Biopolymers* **9**, 247 (1970).
44. Groniowski J., *Archiv. Patologii* **42**, 16 (1969).
45. Groniowski J., Biczyskova W., *Lab. Invest.* **20**, 430 (1969).
46. Gröschel-Stewart U., Jones B. M., Kemp R. B., *Nature* **227**, 280 (1970).
47. Hakomori S., *Transplantation* **6**, 652 (1968).
48. Hakomori S., Murakami W. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 254 (1968).
49. Hämmerling U., Aoki T., de Harven E., Boyse E. A., Old L. J., *J. Exptl. Med.* **128**, 1461 (1968).
50. Herberman R., Stetson Ch. A., *J. Exptl. Med.* **121**, 533 (1965).

51. Hildemann W. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **97**, 139 (1962).
52. Hilgert I., Kandutsch A. A., Cherry M., Snell G. D., *Transplantation* **8**, 451 (1969).
53. Inbar M., Sachs L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **63**, 1418 (1969).
54. Jones A. R., Kaneb L., *Vox Sanguinis* **6**, 110 (1961).
55. Kahan B. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 153 (1965).
56. Kahan B. O., Reisfeld R. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1430 (1967).
57. Kahan B. D., Reisfeld R. A., *J. Immunology* **101**, 237 (1968).
58. Kahan B. D., Reisfeld R. A., Pellegrino M. A., Curtoni E. S., Mattiuz P. L., Ceppellini R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 895 (1968).
59. Kandutsch A. A., Hilgert I., Ruszkiewicz M., Cherry M., Snell G. D., *Transplantation* **6**, 658 (1968).
60. Kissmeyer-Nielsen F., Svejgaard A., Hauge M., *Nature* **219**, 1116 (1968).
61. Klenk E., Uhlenbruck G., *Z. Physiol. Chem.* **319**, 151 (1960).
62. Kornfeld S., Kornfeld S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **63**, 1439 (1969).
63. Landsteiner K., *Wiener Klin. Wochenschr.* **14**, 1132 (1901).
64. Landsteiner K., Levine P., *J. Exptl. Med.* **48**, 731 (1928).
65. Landsteiner K., Miller C. P., *J. Exptl. Med.* **43**, 854 (1925).
66. Lee R. E., Feldman J. D., *J. Cell Biol.* **23**, 396 (1964).
67. Lenard J., Singer S. J., *Science* **159**, 738 (1968).
68. Leon M. A., Young N. M., *J. Immunol.* **104**, 1556 (1970).
69. Lesley J., Dutton R. W., *Science* **169**, 487 (1970).
70. Little C. C., *Science* **40**, 904 (1914) cyt. wg. 7.
71. Little C. C., Strong L. C., *J. Exptl. Zool.* **41**, 93 (1925) cyt. wg. 7.
72. Lundkvist U., Perlmann P., Enekull P., *Exp. Cell Research* **47**, 363 (1967).
73. Mann D. L., Nathenson S. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **64**, 1380 (1969).
74. Manson L. A., Fosch G. V., Palm J., *J. Cell Comp. Physiol.* **61**, 109 (1963).
75. Manson L. A., Palm J., *Transplantation* **6**, 667 (1968).
76. Marchesi S. L., Steers E., Marchesi V. T., Tillack T. W., *Biochemistry* **9**, 50 (1970).
77. McNeil L., Trantelman E. F., Kreutzer V. O., Fullmer C. D., *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 145 (1957).
78. Moller G., *J. Immunol.* **86**, 56 (1961).
79. Moller G., *J. Immunol.* **90**, 271 (1963).
80. Nathenson S. G., Davies D. A. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 476 (1966).
81. Nathenson S. G., Shimada A., *Transplantation* **6**, 662 (1968).
82. Neville D. M. jr., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8**, 413 (1960).
83. Neville D. M. jr., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 540 (1968).
84. Owen R. D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **97**, 37 (1962).
85. Palm I., Manson L. A., *Transplantation* **6**, 666 (1968).
86. Peters T. Jr., *J. Biol. Chem.* **237**, 1183 (1962).
87. Pigman W., Gottschalk A., w Glycoproteins, red. A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, Londyn, New York 1966, str. 434.
88. Potworowski E. F., Nairn R. C., *Immunology* **14**, 59 (1968).
89. Raff M. C., Sternberg M., Taylor R. B., *Nature* **225**, 553 (1970).
90. Raftell M., Perlmann P., *Exptl. Cell Res.* **57**, 119 (1969).
91. Reif A. E., Allen J. M., *J. Exptl. Med.* **120**, 413 (1964).
92. Reif A. E., Allen J. M., *Nature* **209**, 521 (1966).
93. Reif A. E., Allen J. M., *Nature* **209**, 523 (1966).

94. Reisfeld R. A., Pellegrino M., Papermaster B. W., Kahan B. D., *J. Immunology* **104**, 560 (1970).
95. Robertson J. D., w *Cellular Membranes in Development* red. M. Locke, Academic Press, New York 1964, str. 182.
96. Rossowski W., *Monografie Biochemiczne* **17**, red. J. W. Szarkowski, PWN Warszawa 1968.
97. Rossowski W., Kłoczewiak M., *Streszczenia VIII Zjazdu PT Bioch. Szczecin*, 1970.
98. Salerno A., Courcon J., Grabar P., *Ann. Inst. Pasteur* **112**, 38 (1967).
99. Sanderson A. R., Batchelor J. R., *Transplantation* **7**, 554 (1969).
100. Shimada A., Nathenson S. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 828 (1967).
101. Shimada A., Nathenson S. G., *Biochemistry* **8**, 4048 (1969).
102. Shimada A., Yamane K., Nathenson S. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **65**, 691 (1970).
103. Snell G. D., *J. Nat. Cancer Inst.* **14**, 691 (1953).
104. Snell G. D., Smith P., Gabrielson F., *J. Nat. Cancer Inst.* **14**, 457 (1953).
105. Springer G. F., Schwick H. G., Fletcher M. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 634 (1969).
106. Springer G. F., Williamson P., Readler B. L., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **97**, 104 (1962).
107. Szarkowski J. W., Gołaszewski T., *Post. Biochem.* **13**, 275 (1967).
108. Szulman A. E., *J. Exptl. Med.* **115**, 977 (1962).
109. Szulman A. E., *J. Exptl. Med.* **119**, 503 (1964).
110. Szulman A. E., *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 752 (1965).
111. Takahashi T., Old L. J., Boyse E. A., *J. Exptl. Med.* **131**, 1325 (1970).
112. Tillack T. W., Marchesi S. L., Marchesi V. T., Steers E. Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **200**, 125 (1970).
113. Trump B. F., Duttera S. M., Byrne W. L., Arstilla A. U., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **66**, 433 (1970).
114. Viza D. C., Ora de Gani, Dausset J., Davies D. A., *Nature* **219**, 704 (1968).
115. Walford R. L., Finkelstein S., Neerhout R., Konrad P., Schanbrom E., *Nature* **225**, 461 (1970).
116. Whitbeck E. G., Rosenberg L. T., *Immunology* **7**, 363 (1964).
117. Whittam R., Ager M. E., *Biochem. J.* **93**, 337 (1964).
118. Yamane K., Nathenson S. G., *Biochemistry* **9**, 1336 (1970).





TERESA SAWICKA \*, ANDRZEJ PIASEK \*\*

## Heteropolisacharydy zwierzęcych błon komórkowych

### Heteropolisaccharides of Plasma Membranes

Some properties of glycolipids and glycoproteins of mammalian cell surfaces are reviewed.

Przez szereg lat utrzymywał się w biologii pogląd o wyłącznie lipoproteidowej strukturze błon komórek zwierzęcych. Obecnie przyjmuje się za udowodnione, że na powierzchni wszystkich rodzajów komórek zwierzęcych występują również węglowodany (68). Mimo to, żadna z teorii dotyczących struktury błon komórkowych dotychczas nie uwzględniła współuczestniczenia kompleksów węglowodanowych.

Badania immunochemiczne wskazują na specyficzną rolę jaką odgrywa komponent cukrowy występujący na powierzchni komórek. Specyficzność ta, wyrażająca się we wzajemnym oddziaływaniu międzykomórkowym jak selektywne nagromadzenie się określonego typu komórek w miejscach zakażenia, wyodrębnianie się komórek tego samego typu z mieszaniny lub „samorozpoznawanie” się komórek w wyniku reakcji immunologicznych, jest prawdopodobnie wynikiem charakterystycznej struktury antygenowej błon komórkowych, rozpoznawanej przez komplementarne miejsca innych komórek lub związków wielkocząsteczkowych. Ustalenie chemicznej struktury związków determinujących specyficzność komórek oraz wyjaśnienie mechanizmów reakcji prowadzących do ich biosyntezy może w przyszłości pozwolić na regulowanie tych procesów w pożądanym immunologicznie kierunku.

Ogólne dane dotyczące charakterystyki składników cukrowych zwierzęcych glikoproteidów i glikolipidów oraz niektóre drogi ich metabolizmu zostały przedstawione uprzednio w niniejszym czasopiśmie (14, 76, 91). Omówienie swoistości immunologicznej glikolipidów i glikoproteidów substancji grupowych krwi układu AB0 może czytelnik znaleźć w artykule

\* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

\*\* Mgr, Instytut Hematologii, Zakład Biochemii, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: Gal — galaktoza, Glk — glukoza, GalNAc — N-acetylogalaktozoamina, GINac — N-acetyloglukozoamina, NAN — N-acetylneuraminowy kwas, Fuk — fukoza.

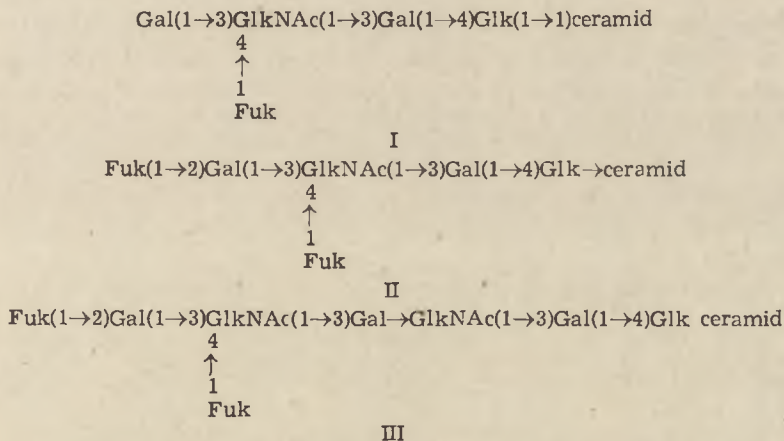
przeglądowym Kościelaka (56). Intencją niniejszego artykułu jest przedstawienie nielicznych jeszcze danych, bezpośrednio dotyczących występowania, funkcji i niektórych mechanizmów regulujących biosyntezę heteropolisacharydów (glikolipidy, glikoproteidy) będących komponentami zewnętrznych błon cytoplazmatycznych komórek zwierzęcych.

## I. Występowanie i funkcja

Pierwsze dane o występowaniu komponentu węglowodanowego na powierzchni komórek zwierzęcych pochodzą z prac Chambersa (8, 9). Chambers posługując się metodami histochemicznymi zaobserwował występowanie jeszcze jednej warstwy, poza lipoproteidową, okrywającej błony komórkowe jaj pewnych bezkręgowców i pierwotniaków. Późniejsze badania potwierdziły te dane (67, 72, 79, 80), nie uogólniano ich jednak w stosunku do komórek zwierząt wyższych. Prace Gasica i wsp. (24, 25) dostarczyły w 1962 roku pierwszych bezpośrednich danych histochemicznych, świadczących o występowaniu na powierzchni komórek ssaków zewnętrznej otoczki bogatej w węglowodany. Ponieważ prace te dotyczyły wyłącznie komórek raka wysiękowego Ehrlicha przypuszczano, że obecność węglowodanów w błonie komórkowej jest cechą towarzyszącą nowotworzeniu. Dopiero Rambourg i wsp. (79, 80), którzy badali 50 różnych typów komórek szczura wykazali na powierzchni komórek obecność warstwy bogatej w węglowodany (ang. *cell coat*), co stanowi cechę wspólną dla prawie wszystkich komórek ssaków. Badania histochemiczne i biochemiczne wykazały, że w skład błon komórek normalnych i nowotworowych wchodzi kompleksy heteropolisacharydowe o charakterze zarówno glikoproteidowym jak i glikolipidowym (4, 36, 37, 55, 59, 82). Rozwój technik badawczych pozwalających na izolowanie błon komórkowych lub ich fragmentów otwiera możliwości prowadzenia badań w szerszym zakresie. Dotychczas są to jednak badania fragmentaryczne. Dodd i Grey (18), Stahl i Trams (98) oraz Ray i wsp. (88) otrzymali niewielkie ilości glikolipidów (około 6% materiału lipidowego) z zewnętrznych błon komórkowych wyizolowanych z wątroby szczura. Autorzy stwierdzili, że w skład frakcji glikolipidowej wchodzi pochodne acylowanej sfingozyny — ceramidu. Klenk (46), Rapport i wsp. (83), oraz Yamakawa i Suzuki (115) ustalili strukturę szeregu prostych glikolipidów występujących w błonach komórek pochodzących z różnych źródeł. Stwierdzili oni, że w błonach komórkowych erytrocytów oraz komórek z tkanek nowotworowych i normalnych (nerka, wątroba) występują następujące glikosfingolipidy: glukozyloceramid, galaktozylo-glukozyloceramid (laktoceramid), galaktozylo-galaktozylo-glukozyloceramid, N-acetylogalaktozaminilo-galaktozylo-galaktozylo-glukozyloceramid (globozyd), N-acetylneuraminy-

lo-galaktozylo-glukozyloceramid (hematozyd). We wszystkich wymienionych związkach łańcuch oligosacharydowy (lub monosacharyd) połączony jest wiązaniem glikozydowym między glukozą i pierwszym węglem sfingozyny. Z błon komórkowych tkanek nowotworowych R a p p o r t i wsp. (86, 87) wyodrębnili glikosfingolipid wykazujący właściwości antygenowe i nazwali go cytolipliną H. Okazało się, że cytoliplina H ma budowę laktoceramidu. W kilka lat później R a p p o r t i wsp. (84) otrzymali z tkanki nerkowej człowieka tzw. cytoliplinę K, o strukturze identycznej ze strukturą globozydu.

H a k o m o r i i wsp. (32, 35, 36) dostarczyli danych świadczących o różnicach wzajemnych stosunków ilościowych i budowy antygenów glikolipidowych z błon komórek nowotworowych i normalnych. W procesie nowotworzenia wywołanego sztucznie przez transformację fibroblastów chomika wirusem polyoma, wraz ze zmianą własności antygenowych transformowanych fibroblastów zaobserwowano zmniejszanie się zawartości N-acetylogalaktozaminy (GalNAc), fukozy (Fuk), N-acetyloglukozoaminy (GlnAc), mannozy i kwasu sialowego (NAN) (4, 37). Badania porównawcze wykazały, że błony nowotworowych fibroblastów zawierają pięciokrotnie mniej hematozydu i dziesięciokrotnie więcej laktoceramidu niż błony fibroblastów normalnych. H a k o m o r i i wsp. (32, 35) wyizolowali z ludzkich tkanek rakowych glikolipidy o rozbudowanym łańcuchu oligosachary-



**Schemat 1.** Struktura substancji grupowych  $\text{Le}^a$  (I) (33) i  $\text{Le}^b$  (II, III) (32) z ludzkiego gruczolakoraka żołądka

dowym (34), których skład i strukturę przedstawia schemat 1. Glikolipidy te wykazywały specyficzność antygenową substancji grupowych krwi typu  $\text{Le}^a$  (I) i  $\text{Le}^b$  (II i III). Nagromadzenie się sfingolipidów o aktywności grupowej  $\text{Le}^a$  przy równoczesnej delecji haptenu A i B zaobserwowano w wielu ludzkich tkankach nowotworowych (43, 85, 101).

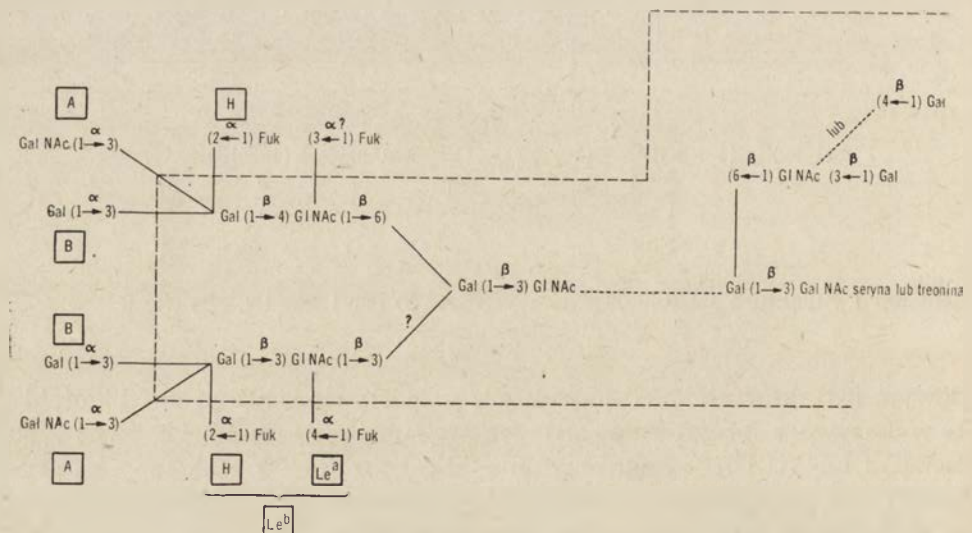
Funkcje antygenowe tkanek mogą być uzależnione od występowania

na powierzchni błon komórkowych nie tylko glikolipidów, lecz również glikoproteidów (66). N a t h e n s o n i w s p. (75), prowadząc badania nad „antygenem przeszczepialności” wyizolowanym z komórek śledziony myszy, uwalniali z błon działaniem papainy rozpuszczalne fragmenty glikoproteidowe. Materiał oczyszczano za pomocą chromatografii na *CM-Sephadex*, *DEAE-Sephadex* oraz elektroforezy krążkowej na żelu. Jednorodny elektroforetycznie materiał zawierał 85% białek i 15% węglowodanów.

Szersze omówienie zagadnień związanych z antygenami transplantacyjnymi można znaleźć w artykule R o s s o w s k i e g o (90) w niniejszym czasopiśmie.

Dotychczasowa wiedza na temat chemicznego składu i struktury węglowodanowego komponentu zewnętrznych błon komórkowych dotyczy głównie erytrocytów. Przyczyniły się do tego badania nad występowaniem i strukturą glikolipidów i glikoproteidów będących nośnikami specyficznej aktywności grupowej krwi. Ustalono, że charakter antygenowy nadaje substancjom grupowym komponent węglowodanowy (106). Obserwowaną aktywność grupową erytrocytów wiązano z identyczną serologicznie aktywnością grupową glikoproteidów występujących w płynach ustrojowych. Łatwość otrzymania glikoproteidowych substancji grupowych z płynów ustrojowych pozwoliła na ustalenie struktury łańcuchów węglowodanowych warunkujących specyficzność serologiczną (schemat 2). Składnik węglowodanowy tych glikoproteidów jest połączony z polipeptydem wiązaniem glikozydowym między N-acetyloglukozoaminą a seryną lub treoniną.

Z błon komórkowych erytrocytów ludzkich grupy A i B wyizolowano glikolipidy wykazujące aktywność grupową (38, 53, 54, 55). Stwierdzono,



**Schemat 2.** Struktura łańcuchów oligosacharydowych substancji grupowych (106)





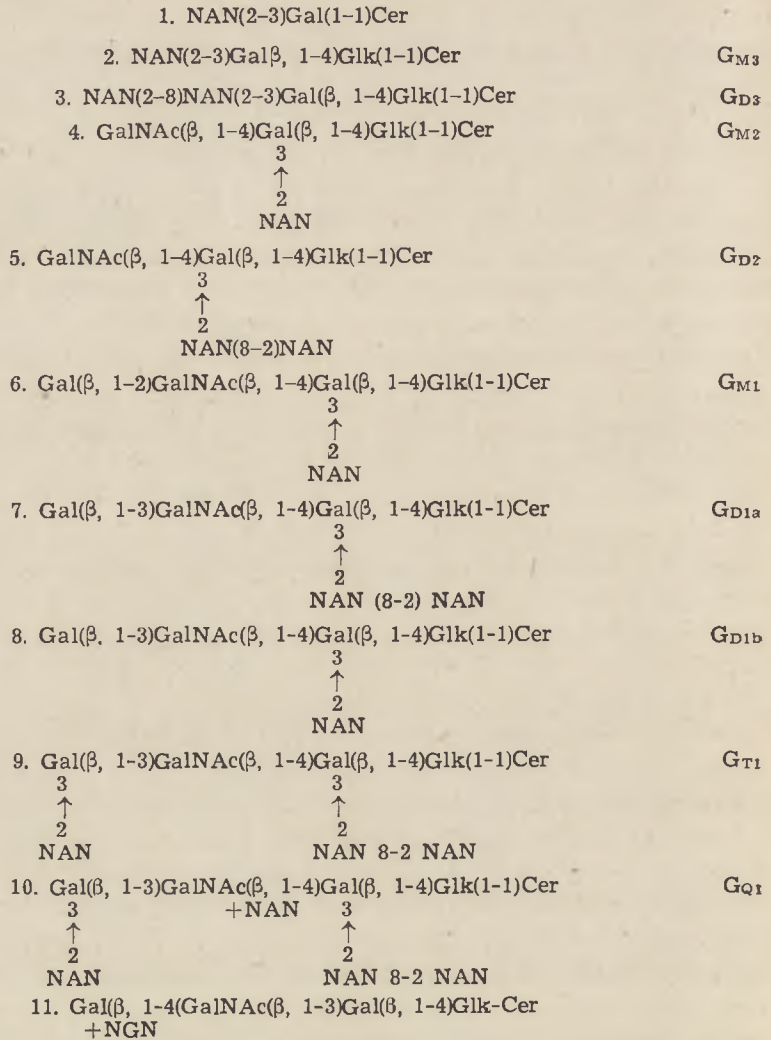
ny jest obecnością kwasu N-acetyloneuraminowego. Dalsze badania potwierdziły słuszność poglądów Klenka, rozszerzając równocześnie zakres badań na inne typy komórek zwierzęcych (108, 109, 110). Zaobserwowano, że zmiany ujemnego ładunku powierzchni komórek są połączone z procesami takimi jak nowotworzenie, adhezja oraz wzrost (10, 70).

Liczną grupę związków występujących w błonach komórkowych są gangliozydy, czyli glikosfingolipidy zawierające kwas sialowy. Gangliozydy, zawierające reszty kwasu sialowego, specyficzną sekwencję węglowodanów w łańcuchach oligosacharydowych i hydrofobowe reszty lipidowe, występując na powierzchni komórek mogą wpływać na elektryczny ładunek, właściwości antygenowe i adhezję komórek (69). Te właściwości prawdopodobnie odgrywają rolę we wzajemnej regulacji podziałów komórkowych. Z drugiej strony, gangliozydy występując w błonach neuronowych, dendrytach, oksonach i w połączeniach synaptycznych mogą współuczestniczyć w zjawiskach przenoszenia impulsu nerwowego.

Najdokładniej poznane są gangliozydy wyizolowane z tkanki mózgowej (99, 100), występujące zresztą również w innych tkankach (69). N-acetylowe pochodne kwasu neuraminowego występują głównie w gangliozydach mózgu, śledziony i erytrocytach ludzkich podczas gdy N-glikolilowe pochodne dominują we frakcjach wyizolowanych z niektórych tkanek zwierzęcych (48, 52, 53, 61, 69, 114).

W zależności od ilości reszt kwasu sialowego gangliozydy dzieli się na jedno-, dwu-, trój- i cztero-sialowe. Jak dotychczas wyizolowano i częściowo ustalono strukturę piętnastu różnych gangliozydów. W roku 1967 *Commission on Biochemical Nomenclature* ustaliła następujące nazewnictwo dla gangliozydów. Dużą literą G oznaczamy przynależność danego związku do grupy gangliozydów. Litery M, T, D, Q charakteryzują ilość reszt kwasu sialowego w cząsteczce: M — jedna, D — dwie, T — trzy i Q — cztery. Cyfry arabskie określają sekwencje łańcucha oligosacharydowego. Cyfrą 1 oznaczamy gangliozydy posiadające następującą strukturę łańcucha oligosacharydowego: galaktozylo-N-acetylo-galaktozoaminylo-galaktozylo-glukozylo-ceramid, cyfrą 2 — N-acetylo-galaktozoaminylo-galaktozylo-glukozylo-ceramid, cyfrą 3 — galaktozylo-glukozylo-ceramid. Małą literą a lub b oznaczamy izomery posiadające te same reszty cukrowcowe (102). Na schemacie 5 przedstawiono strukturę oraz obowiązujące nazewnictwo gangliozydów wyizolowanych z mózgu (od 1—10) i erytrocytów (11). W niektórych stanach chorobowych między innymi w chorobie Tay-Sachsa zaobserwowano wyraźne zmiany stosunków ilościowych poszczególnych typów gangliozydów (44, 45). Zmiany takie zaobserwowano również w błonach komórek nowotworowych (6).

Naruszenie struktury cukrów powierzchniowych powoduje poważne zmiany cech różnych komórek. Na przykład krążenie limfocytów szczura zmienia się po trawieniu ich glikozydazami (26). Limfocyty preinkubowane z glikozydazami pochodzącymi z *Clostridium perfringens* i wstrzykiwane



**Schemat 5.** Struktura gangliozydów. (1—10 z mózgu, 11 — z erytrocytów) (70)

szczurom są wyłączone z normalnej cyrkulacji przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Zjawisko to interpretuje się jako wynik naruszenia określonej struktury kompleksów cukrowych występujących na powierzchni limfocytów, co z kolei powoduje brak odpowiednich miejsc rozpoznawanych przez komplementarne struktury na powierzchni komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego (wątroba, śledziona) i w rezultacie uniemożliwia przenikanie limfocytów. Podobny efekt powoduje trawienie limfocytów neuraminidazą (112) i trypsyną (113). Ponadto stwierdzono, że glikoproteidowe komponenty błon komórkowych mogą odgrywać rolę w takich procesach jak koniugacje drożdży (13) oraz reagregacja zdysocjowanych komórek morskich gąbek (64).



## II. Regulacja biosyntezy

Sposób w jaki odbywa się regulacja biosyntezy glikoproteidów i glikolipidów jest przedmiotem wielu spekulacji i nie jest jeszcze całkowicie jasny. Problem ten jest szczególnie interesujący ze względu na heterogeny skład tych związków. Biosynteza węglowodanowych komponentów glikolipidów i glikoproteidów wchodzących w skład zewnętrznych błon komórkowych przebiega drogą stopniowego przyłączania jednostek cukrowych do łańcucha oligosacharydowego według zasady jeden gen — jeden enzym — jedno wiązanie glikozydowe. W większości komórek katalizujące ten proces glikozylotransferazy, tworzą wieloenzymowy kompleks związany z błonami gładkimi endoplazmatycznego retikulum. *B o s m a n i* wsp. (5), badając procent włączania znakowanej glukozoaminy i fukozy w glikoproteidy i glikolipidy różnych frakcji komórek HeLa, stwierdzili po 30 minutowej inkubacji, że przeważająca ilość radioaktywności nagromadza się w polimerach błon gładkich frakcji mikrosomalnej. Po 3,5-godzinnej inkubacji większość znakowanej glukozoaminy odnajdowano w glikolipidach i glikoproteidach wyizolowanych z frakcji zewnętrznych błon komórkowych, uzyskiwanych drogą wirowania w gradiencie sacharozy. Dane te nasunęły autorom wniosek, że glikolipidy i glikoproteidy syntetyzowane w mikrosomach przesuwiają się stopniowo do zewnętrznych błon komórkowych. Nie jest jasne, czy przesuwiają się one indywidualnie, czy też jako większe kompleksy tworzące strukturalne podjednostki błon. *M o l n a r* i wsp. (71) badając wewnątrzkomórkowe umiejscowienie procesu wbudowywania węglowodanów do glikoproteidów błon cytoplazmatycznych raka wysiękowego Ehrlicha, stwierdzili że heksozoaminy i galaktoza są wbudowywane intensywniej do polimerów frakcji zewnętrznych błon cytoplazmatycznych niż frakcji błon gładkich endoplazmatycznego retikulum. Z obserwacji tej autorzy wnosili, że przyłączanie monosacharydów do łańcuchów oligosacharydowych glikolipidów i glikoproteidów może być katalizowane przez enzymy umiejscowione w różnych strukturach wewnątrzkomórkowych. Lokalizacja glikozylotransferaz w zewnętrznych błonach cytoplazmatycznych umożliwiłaby skompletowanie łańcuchów oligosacharydowych, których synteza zapoczątkowana jest w mikrosomach, oraz proces regenerowania uszkodzonych przez zewnętrzne czynniki fragmentów błon.

Istotną sprawą w doświadczeniach prowadzących do ustalenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji procesów glikozylacji białkowych lub lipidowych akceptorów jest wybór odpowiedniej techniki. W wielu wypadkach badania prowadzone przy zastosowaniu endogennych akceptorów, które mogłyby być różnorodnymi pośrednikami niekompletnej glikozylacji, związanymi z błonami mikrosomalnymi i pozostającymi z nimi podczas homogenizacji. W badaniach tego typu właściwe jest stosowanie egzogen-

nych akceptorów o znanej strukturze, co pozwala na dokładną charakterystykę uzyskanego produktu glikozylacji.

Dotychczasowe dane dotyczące biosyntezy gangliozydów mają charakter fragmentaryczny. W mózgu embrionów kurczęcia wykazano obecność transferazy sialowej, katalizującej przeniesienie kwasu N-acetylneuraminowego na dwuheksozoceramid i aminoglikolipid (41, 49). Wykazano również występowanie transferazy katalizującej przeniesienie galaktozy z UDP-galaktozy na akceptory glikolipidowe (14, 98).

Jednym z zasadniczych zagadnień biosyntezy glikoproteidów i glikolipidów błon komórkowych jest zagadnienie, czy synteza komponentu węglowodanowego obu tych polimerów katalizowana jest przez ten sam system enzymatyczny. Danych dotyczących tego zagadnienia dostarczają badania nad biosyntezą substancji grupowych krwi. Według hipotezy Morgana i Watkins (74, 107) potwierdzonej w ostatnich latach danymi doświadczałnymi, genetyczna kontrola syntezy substancji grupowych krwi układu AB0 i Lewis wyraża się obecnością lub brakiem transferaz glikozylowych, które katalizują przyłączanie reszt cukrowych, będących immunologicznymi determinantami, do substancji prekursorowych. I tak na przykład transferaza galaktozy, która katalizuje przyłączanie galaktozy, będącej determinantem substancji grupowej krwi typu B, występuje tylko u ludzi i małp z typem krwi B (51). Podobnie transferaza N-acetylogalaktozoaminy występuje tylko u ludzi o typie krwi A (31). Specyficzność wymienionych substancji zależy więc od występowania określonego genu A lub B, którego pierwszym produktem jest odpowiednia glukozylotransferaza. W wypadku substancji Le<sup>b</sup>, której specyficzność jest uwarunkowana obecnością dwóch reszt L-fukozy (schemat 2), określona struktura jest rezultatem współdziałania dwóch genów (7, 78, 95). Przypuszcza się, że struktura komponentu węglowodanowego substancji grupowych jest wynikiem współdziałania glukozylotransferaz pochodzących z genomu obu rodziców i wyrażać się może indywidualnością tkankową, mogącą odgrywać rolę w odrzucaniu przeszczepów. Pewne dane wskazują, że reakcje przyłączania tej samej reszty cukrowej tym samym wiązaniem katalizują te same enzymy bez względu na to, czy akceptorem jest glikolipid, glikoproteid czy oligosacharyd (28). Na przykład ugrupowanie GalNAc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal, które wyraża specyficzność grupową A (105), występuje w glikolipidach wyizolowanych z erytrocytów (60), w glikoproteidach wydzielanych przez śluzówki (1), w oligosacharydach moczu (64) oraz w mleku dawców o typie krwi A (51), nie występuje natomiast w związkach pochodzących z osobników o grupie krwi B lub 0 (cytowane wg Ginsburga i Neufeldta (28). Ponieważ synteza ugrupowania Gal-NAc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal jest uzależniona od tego samego genu A, prawdopodobnie ta sama glukozylotransferaza bierze udział w tych procesach niezależnie od rodzaju akceptora. Schenkel-Brunner i Tuppy (94) poddając ludzkie erytrocyty grupy 0 i B działaniu transferazy N-acetylogalaktozoaminy w obec-

ności ( $^3\text{H}$ )UDP-N-acetylogalaktozoaminy stwierdzili włączanie znakowanego aminocukru do polimerów otoczki komórkowej, co pociągało za sobą zmianę rodzaju aktywności grupowej badanych erytrocytów. Autorzy obliczyli ilość reszt GalNAc przeniesionych na badane erytrocyty i stwierdzili, że jest ona dwa do trzech razy większa od ilości miejsc antygenowych oznaczonych dla erytrocytów typu A przez Economidou i wsp. (19). Obserwacja ta sugeruje możliwość występowania na powierzchni erytrocytów innych akceptorów dla N-acetylogalaktozoaminy poza glikolipidowymi, przy czym w obu wypadkach reakcją przeniesienia reszty cukrowej katalizowałyby ten sam enzym.

Nowych danych dotyczących specyficzności transferaz glikozylowych w stosunku do akceptora dostarczyły badania przy zastosowaniu nisko-cząsteczkowych akceptorów cukrowych. I tak transferaza  $\alpha$ -D-N-acetylogalaktozoaminy, pochodząca z gruczołów podszczękowych lub z mleka dawców ludzkich o grupie krwi A, katalizuje przeniesienie  $\alpha$ -N-acetylogalaktozoaminy na resztę galaktozy (wiązaną przy węglu 3 galaktozy) wyłącznie wtedy, gdy akceptorowa cząsteczka galaktozy jest podstawiona przy węglu 2 przez L-fukozę (39, 50). Funkcji akceptorowej nie spełniają w tym wypadku dwu-, trój- i pięciosacharydy, w których L-fukoza jest przyłączona do N-acetylogalaktozoaminy. Podobna specyficzność charakteryzuje transferazę galaktozy występującą u dawców o grupie krwi B, która katalizuje przeniesienie  $\alpha$ -D-galaktozy z UDP-galaktozy na resztę galaktozową podstawioną przez L-fukozę przy węglu 2 (50). Ponieważ skład oligosacharydów występujących w mleku ludzkim różni się w zależności od grupy krwi dawcy (49) wysunięto przypuszczenie, że czynnikiem regulacji syntezy określonych substancji grupowych krwi może być nie tylko obecność lub brak odpowiednich transferaz glikozylowych, ale również enzymów niezbędnych do syntezy określonych akceptorów oligosacharydowych (27). Sprawą dyskusyjną jest również, jaki czynnik wpływa na zakończenie procesu przyłączania reszt cukrowych. Gottschalk (29) zwraca uwagę na fakt, że gdy kwas sialowy znajduje się na końcu nieredukującego łańcucha oligosacharydowego dalsze przyłączanie jednostek cukrowych nie następuje. Natomiast gdy kwas sialowy występuje w łańcuchu bocznym, łańcuch główny może ulegać dalszej glikozylacji. Innym czynnikiem wpływającym na zakończenie syntezy komponentu węglowodanowego może być według Gottschalka anomeryczna konfiguracja ostatniej reszty cukrowej. Na przykład końcowymi jednostkami cukrowymi ludzkich substancji grupowych A i B są N-acetylogalaktozoamina i galaktoza o konfiguracji  $\alpha$ -D podczas gdy inne reszty cukrowe tych substancji występują w konfiguracji  $\beta$ -D lub  $\alpha$ -L.

Na przebieg syntezy glikolipidów i glikoproteidów może również wpływać mechanizm hamowania zwrotnego, pod którego kontrolą znajduje się pula nukleozydodwufosfocukrów w tkankach zwierzęcia. Bates i wsp. (3) stwierdzili znaczny wzrost poziomu UDP-N-acetyloheksozoamin w wą-

trobie szczurów karmionych pożywieniem zawierającym kwas orotowy, przy czym zjawisko to było wynikiem raczej wzmożonej ich syntezy niż zahamowaniem zużywania nukleozydodwufosfocukrów w procesie biosyntezy glikoproteidów. Według autorów wzmożona synteza nukleotydów urydylowych w wątrobie szczura jest wynikiem zniesienia hamowania zwrotnego, utrzymującego w normalnych warunkach równowagę między aktywnością amidotransferazy, katalizującej przeniesienie grupy amidowej z glutaminy na fruktozo-6-fosforan, a poziomem puli UDP-N-acetyloglukoaminy. Równocześnie autorzy stwierdzili, że dwuazomycyna A będąca analogiem glutaminy hamuje syntezę pochodnych glukoaminy w wątrobie i zmniejsza pulę UDP-N-acetyloheksosoamin o 85% w ciągu 4 godzin od wstrzyknięcia. W ten sposób dwuazomycyna A powoduje blok syntezy glikoproteidów w sposób pośredni, zmniejszając poziom UDP-N-acetyloheksosoamin w wątrobie. Efekt ten może być zniesiony przez wstrzykiwanie szczurom glukoaminy.

Poziom UDP-N-acetyloheksosoamin w tkankach zwierzęcych może być również regulowany działaniem jonów metali. Na przykład Daehnfeldt i Sawicka (15) zaobserwowali wpływ manganu na syntezę UDP-N-acetyloheksosoamin z N-acetyloheksosoamino-1-fosforanów i UTP, katalizowaną *in vitro* przez białko o tym samym ciężarze cząsteczkowym (92). W określonych warunkach doświadczalnych obecność jonów  $Mn^{2+}$  hamuje syntezę UDP-N-acetyloglukoaminy, pozostając bez wpływu na tworzenie się UDP-N-acetylogalaktoaminy.

Na podstawie badań *in vivo* (62) wysunięto hipotezę wyjaśniającą biosyntezę glikoproteidów w wątrobie szczura. Według Schachtera (93) synteza łańcuchów oligosacharydowych jest sprzężona z biosyntezą łańcucha peptydowego. Pierwszy cukier łańcucha oligosacharydowego, N-acetylo-glukoamina, jest przyłączana do łańcucha polipeptydowego biosyntetyzowanego na rybosomach. Dalsza synteza łańcucha peptydowego związanego z rybosomami powoduje przyłączenie nowych oligosacharydów. Zakończenie biosyntezy łańcuchów cukrowych następuje w aparacie Golgiego organelli i warunkuje wydzielanie glikoproteidów na zewnątrz komórki (93).

Na zakończenie trzeba podkreślić, że mimo intensywnego prowadzenia badań w celu wyjaśnienia struktury i mechanizmów regulujących syntezę heteropolisacharydów cytoplazmatycznych błon komórkowych, wiele zagadnień czeka w dalszym ciągu na rozwiązanie.

#### LITERATURA

1. Aminoff D., Morgan W. T., Watkins W. M., *Biochem. J.* **46**, 426 (1950).
2. Baranowska T., Lisowska E., *Arch. Immunol. Therap. Exptl.* **11**, 609 (1963).

3. Bates C. J., Adams W. R., Handschumacher R. E., *J. Biol. Chem.* **241**, 1705 (1966).
4. Black P. H., Wu H., Meezan E., Robertson H. T., Robbins P. W., *Federation Proc.* **28**, 567 (1969).
5. Bosman H. B., Hagopian A., Eylar E. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 573 (1969).
6. Brady R. O., Borek C., Bradley R. M., *J. Biol. Chem.* **244**, 6552 (1969).
7. Ceppellini R., Proc. 5th Congr. Intern. Soc. Blood. Transfusion, Paris 1955, str. 207.
8. Chambers R., *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **8**, 144 (1940).
9. Chambers R., Chambers E. L., Explorations into the Nature of the Living Cell. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1961, str. 33.
10. Cook G. M. W., *Biol. Rev.* **43**, 363 (1968).
11. Cook G. M. W., Eylar E. H., *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 57 (1965).
12. Cook G. M. W., Heard D. H., Seaman G. V. F., *Nature* **188**, 1011 (1960).
13. Crandall M. A., Brock T. D., *Bacteriol. Rev.* **32**, 139 (1968).
14. Czartoryska B., *Post. Biochem.* **17**, 3 (1971).
15. Daehnfelddt J., Sawicka T., International Cancer Congress, Houston 1970, Abstracts str. 262.
16. Dodd M. C., Bigley N. J., Geyer V. B., *Science* **132**, 1398 (1960).
17. Dodd M. C., Bigley N. J., Johnson G. A., McCluer R. M., *Nature* **204**, 549 (1964).
18. Dodd M. C., Gray G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 397 (1968).
19. Economidou J., Hughes-Jones N. C., Gardner B., *Vox Sanguinis* **12**, 321 (1967).
20. Eylar E. H., Madoff M., *Federation Proc.* **21**, 402 (1962).
21. Eylar E. H., Madoff M., Brody O., Oncley J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 1992 (1961).
22. Furchgott R. F., Ponder E., *J. Gen. Physiol.* **24**, 447 (1941).
23. Gardas A., Kościelak J., *Vox Sanguinis*, w druku
24. Gasic G., Berwick J., *J. Cell. Biol.* **19**, 223 (1962).
25. Gasic G., Gasic T., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **114**, 660 (1963).
26. Gesnar B., Ginsburg V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 750 (1964).
27. Ginsburg V., Kobata A., Grollman E. E. w Blood and Tissue Antigens, red. D. Aminoff, Academic Press, New York-Londyn 1970.
28. Ginsburg V., Neufelddt E. F., *Annual Rev. Biochem.* **38**, 371 (1969).
29. Gottschalk A., *Nature* **222**, 452 (1969).
30. Green F. A., *J. Biol. Chem.* **243**, 5519 (1968).
31. Grollman E. F., Kobata A., Ginsburg V., *Federation Proc.* **27**, 345 (1968).
32. Hakomori S., Andrews H. D., *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 225 (1970).
33. Hakomori S., Jeanloz R. W., *J. Biol. Chem.* **236**, 2827 (1961).
34. Hakomori S., Jeanloz R. W., *J. Biol. Chem.* **239**, PC 3606 (1964).
35. Hakomori S., Jeanloz R. W., *Federation Proc.* **24**, 231 (1965).
36. Hakomori S., Kościelak J., Bloch K. J., Jeanloz R. W., *J. Immunol.* **98**, 31 (1967).
37. Hakomori S., Murakami W. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 254 (1968).
38. Hakomori S., Strycharz G. C., *Biochemistry* **7**, 1279 (1968).
39. Hearn V. M., Smith Z. G., Watkins W. M., *Biochem. J.* **109**, 315 (1968).
40. Kalcker H. M., Control of Cell Division and Cancer Induction Natl. Cancer Inst. Monograph. **14**, 21 (1964).

41. Kanfer J. N., Blacklow R. S., Warren L., Brady R. O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 287 (1964).
42. Kathan R. H., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 21 (1963).
43. Kay H. E. H., Wallace B. M., *J. Nat. Cancer Inst.* **26**, 1349 (1961).
44. Klenk E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **262**, 128 (1939).
45. Klenk E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **267**, (1940).
46. Klenk E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **273**, 76 (1942).
47. Klenk E., Neuraminic acid w The Chemistry and Biology of Mucopolisaccharides, red. G. E. W. Wostenholme i M. O. Connor str. 269 1958.
48. Klenk E., Padberg G., *Z. Physiol. Chem.* **327**, 249 (1962).
49. Kobata A., Ginsburg V., Tsuda M., *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 509 (1969).
50. Kobata A., Grollman E. F., Ginsburg V., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 609 (1968).
51. Kobata A., Grollman E. F., Ginsburg V., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 272 (1968).
52. Kobayashi K., *Tohoku J. Exptl. Med.* **63**, 185 (1956).
53. Kościelak J., *Nature* **194**, 751 (1961).
54. Kościelak J., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 313 (1963).
55. Kościelak J., Proc. 10th Congr. Int. Soc. Blood Transf. Stockholm 1964, str. 453.
56. Kościelak J., *Pol. Tyg. Lek.* **24**, 22, 851 (1969).
57. Kościelak J., dane nie opublikowane.
58. Kościelak J., Piasek A., Górniak H., w Blood and Tissue Antigens, red. D. Aminoff, Academic Press, New York-Londyn 1970, str. 163.
59. Kościelak J., Zakrzewski K., Proc. Int. Symp. Biol. Avt. Mucoids, Warszawa str. 21 (1959).
60. Kościelak J., Zakrzewski K., *Nature* , 517 (1960).
61. Kuhn R., Wiegandt H., *Z. Naturforsch.* **B 19**, 80 (1964).
62. Lawford G. R., Schachter H., *J. Biol. Chem.* **241**, 5408 (1966).
63. Lisowska E., *Nature* **218**, 569 (1968).
64. Lundblad A., *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 151 (1967).
65. Makela O., Mittinen T., Pesola R., *Vox Sanguinis* **5**, 492 (1960).
66. Marcus D. M., Cass L. E., *Science* **164**, 557 (1969).
67. Margoliash E., Schenck J. R., Hargie M. P., Burokas S., Richter W. R., Barlow G. M., Moscona A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 383 (1965).
68. Marshall J. M., Nachmias V. T., *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 92 (1965).
69. Martensson E., *Progr. Chem. Fats Lip.* **10**, 374 (1969).
70. Mayhew E., O'Grady E. A., *Nature* **207**, 4992, 86 (1965).
71. Molnar J., Chao H., Markovic G., *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 533 (1969).
72. Monne L., Slautterback D. B., *Exptl. Cell. Res.* **1**, 477 (1950).
73. Morawiecki A., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 339 (1964).
74. Morgan W. T., Watkins W. M., *British Med. Bull.* **25**, 30 (1969).
75. Nathenson S. G., Shimada A., Yamane K., *Federation Proc.* **28**, 567 (1969).
76. Noworytko J., Sarnecka-Keller M., *Post. Biochem.* **15**, 15 (1969).
77. Pepper D. S., Jamieson G. A., *Biochemistry* **8**, 3362 (1969).
78. Race C., Ziderman D., Watkins W. M., *Biochem. J.* **107**, 733 (1968).
79. Rambourg A., Leblond C. P., *J. Cell. Biol.* **32**, 27 (1967).
80. Rambourg A., Neutra M., Leblond C. P., *Anat. Record.* **154**, 41 (1966).

81. Rapport M. M., Graf L., *Cancer Res.* **21**, 1225 (1961).
82. Rappert M. M., Graf L., Alonzo N., *Cancer* **8**, 546 (1955).
83. Rapport M. M., Graf L., Alonzo N. F., *J. Lip. Res.* **1**, 301 (1960).
84. Rapport M. M., Graf L., Schneider H., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 43 (1964).
85. Rapport M. M., Graf L., Skipski V. P., Alonzo N. F., *Cancer* **12**, 438 (1959).
86. Rapport M. M., Skipski V. P., Alonzo N. F., *Nature* **181**, 1803 (1958).
87. Rapport M. M., Yariv J., *Arch. Biochem.* **92**, 438 (1961).
88. Ray T. K., Skipski V. P., Braclay M., Essner E., Archibald F. M., *J. Biol. Chem.* **244**, 5528 (1969).
89. Romanowska E., *Vox Sanguinis* **9**, 578 (1964).
90. Rossowski W., *Post. Biochem.* **17**, 249 (1971).
91. Sarnecka-Keller M., Noworytko J., *Post. Biochem.* **15**, 3 (1969).
92. Sawicka T., Chojnacki T., *Bull. Acad. Sci. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* **18**, 125 (1970).
93. Schachter H., w *Blood and Tissue Antigens*, red. D. Aminoff, Academic Press, New-York-Londyn 1970, str. 357.
94. Schenkel-Brunner H., Tuppy H., *Nature* **223**, 1272 (1969).
95. Shen L., Grollman E. F., Ginsburg V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 224 (1968).
96. Shimada A., Nathenson S. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 828 (1967).
97. Stahl W. L., Trams E. G., *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 459 (1968).
98. Steigerwald J. C., Kaufman B., Basu S., Roseman S., *Federation Proc.* **25**, 587 (1966).
99. Svennerholm L., *Nature* **177**, 524 (1956).
100. Svennerholm L., *J. Lipid Res.* **5**, 145 (1964).
101. Tal C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1318 (1965).
102. The Nomenclature of Lipids, IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, April 1967, *Eur. J. Biochem.* **2**, 127 (1967).
103. Thomas D. B., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **244**, 5943 (1969).
104. Uhlenbruck G., Krupe M., *Vox Sanguinis* **10**, 326 (1965).
105. Watkins W. M., w *Glycoprotein* red. Gottschalk A., Elsevier Press, Amsterdam 1966, str. 628.
106. Watkins W. M., *Science* **152**, 172 (1966).
107. Watkins W. M., Morgan W. T. J., *Vox Sanguinis* **4**, 97 (1959).
108. Weiss L., *J. Cell. Biol.* **26**, 735 (1965).
109. Weiss L., *The Cell Periphery Metastatic and other Contact Phenomena*, North Holland Publishing Co, Amsterdam 1967.
110. Weiss L., Mayhew E., Ulrich K., *Lab. Invest.* **15**, 1304 (1966).
111. Winzler R. J., w *Blood and Tissue Antigens*, red. D. Aminoff, Academic Press, New York-Londyn 1970, str. 117.
112. Woodruff J., Gesner B. M., *J. Clin. Invest.* **46**, 134 (1967).
113. Woodruff J., Gesner B. M., *Science* **161**, 176 (1968).
114. Yamakawa T., Matsamoto M., Suzuki S., Iida T., *J. Biochem. (Tokyo)* **43**, 41 (1956).
115. Yamakawa T., Suzuki S., *J. Biochem. (Tokyo)* **39**, 393 (1952).





WIRGINIA JANISZOWSKA\*, ZDZISŁAW WOJCIECHOWSKI\*\*

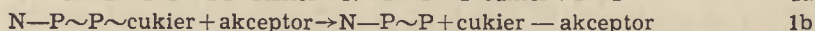
## Biosynteza polisacharydów ściany komórkowej roślin wyższych

### The Biosynthesis of the Cell Wall Polysaccharides in Higher Plants

The recent investigations on the structure and biosynthesis of the cell wall polysaccharides in higher plants are reviewed.

Przyjmuje się obecnie, że większość reakcji biosyntezy złożonych związków cukrowych, a w szczególności biosynteza polisacharydów, przebiega z udziałem nukleozydodwufosfocukrów jako donorów reszt cukrowych. Występowanie, własności oraz metabolizm tych związków omówiony jest w wielu szczegółowych opracowaniach monograficznych (36, 41, 81). Wolna energia hydrolizy ( $\Delta F$ ) wiązania glikozylowego w nukleozydodwufosfocukrach wynosi około  $-7,6$  kcal/mol i jest znacznie wyższa od energii hydrolizy wszelkich innych biologicznych pochodnych glikozylowych (w tym również fosforanów cukrów). Z termodynamicznego punktu widzenia nukleozydodwufosfopochodne są więc najdogodniejszymi donorami reszt cukrowych do biosyntezy rozmaitych złożonych cukrowców.

Synteza nukleozydodwufosfopochodnych cukrów zachodzi przy udziale enzymów, zwanych ogólnie pirofosforylazami, według reakcji 1a. Wykorystanie powstałego nukleozydodwufosfocukru przebiega według reakcji 1b, katalizowanej przez transferazy specyficzne w stosunku zarówno do akceptora jak i cukrowej pochodnej.



gdzie: N — nukleozyd purynowy lub pirymidynowy

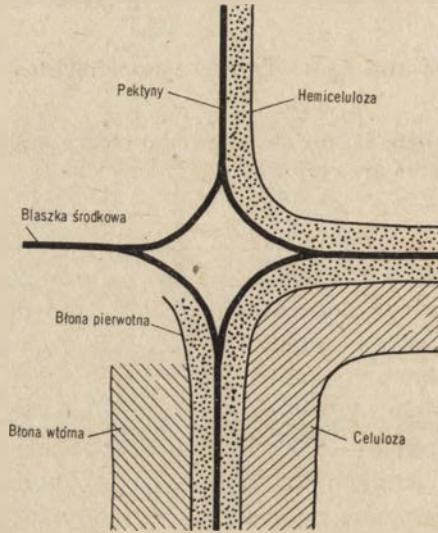
W ciągu ostatnich kilku lat, dzięki intensywnym badaniom prowadzonym w licznych ośrodkach, poznano dość dokładnie rozmaite aspekty udziału nukleozydodwufosfocukrów w biosyntezie zapasowych polisacharydów roślinnych i zwierzęcych tj. skrobi i glikogenu (43, 58, 75). Znacznie mniej wiemy o biosyntezie innych układów polisacharydowych. Poniżej omówione zostaną szczegółowo badania nad udziałem nukleozydodwufosfocukrów w biosyntezie polisacharydów roślinnych ścian komórkowych.

\* Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa.

\*\* Dr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa.

## I. Składniki wielocukrowcowe ściany komórkowej roślin wyższych

Każdą komórkę roślin wyższych otacza jej martwy twór — ściana komórkowa. Oślania ona komórkę przed niekorzystnymi bodźcami zewnętrznymi i tworzy szkielet rośliny. Ściana komórkowa składa się z trzech warstw: blaszki środkowej, błony pierwotnej i błony wtórnej (rysunek 1). Głównymi składnikami każdej z nich są polisacharydy.



Rys. 1. Budowa ściany komórkowej roślin wyższych

W czasie podziału komórki pierwsza powstaje blaszka środkowa, zbudowana z pektyn. Podstawowym elementem strukturalnym pektyn są nierozgałęzione łańcuchy zbudowane z cząsteczek D-galakturonopiranozy połączonych wiązaniami  $\alpha(1\rightarrow4)$  (10, 55). Liczba jednostek w łańcuchu wynosi od kilkudziesięciu do kilkuset. W natywnej pektynie część grup karboksylowych reszt kwasu D-galakturonowego jest zmetylowana. Z nowszych badań wynika, że w pektynach występują także w niewielkich ilościach cukry obojętne, między innymi D-galaktoza, D-ksyloza, L-arabinoza i L-ramnoza (14, 32, 39). Cukry te dołączone są do głównego łańcucha poligalakturonianowego wiązaniami glikozydowymi tworząc rozgałęzienia, a być może wchodzi również w skład łańcucha głównego (9, 10). Możliwe również, że pektyny w ścianie komórkowej powiązane są wiązaniami estrowymi z innymi polisacharydami, na przykład arabanem i galaktanem.

Po uformowaniu blaszki środkowej powstaje błona pierwotna, a następnie błona wtórna. Błona pierwotna zawiera stosunkowo mało celulozy, która jest głównym składnikiem polisacharydowym błony wtórnej. Celuloza jest nierozgałęzionym homopolisacharydem zbudowanym z 3 000—

10 000 jednostek D-glukopiranozowych połączonych wiązaniami  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Łańcuch celulozy jest sztywny dzięki dodatkowym wiązaniom wodorowym między C-2 i C-6 sąsiednich jednostek (24, 44). W ścianie komórkowej cząsteczki celulozy zgrupowane są w równoległe wiązki stanowiące mikrofibrylle. Mikrofibrylle nie są regularnie ułożone na całej przestrzeni, lecz tworzą obszary „krystaliczne”, tzw. micelle, i obszary niekrystaliczne, zwane przestrzeniami międzymicellarnymi. W błonie pierwotnej przestrzenie międzymicellarne wypełnione są hemicelulozą (83).

Termin „hemiceluloza” określa wszystkie polisacharydy ściany komórkowej różne od pektyn i celulozy. Jest to grupa homo- i heteropolisacharydów o na ogół stosunkowo niskim ciężarze cząsteczkowym. W substancjach hemicelulozowych występują przede wszystkim: D-ksyloza, L-arabinoza, D-mannoza, D-glukoza, D-galaktoza, kwas D-glukuronowy i L-ramnoza (37, 78). Niektórzy autorzy (48, 74) wyodrębniają, na zasadzie różnej rozpuszczalności w ługach, dwie frakcje: hemicelulozę A i hemicelulozę B. Frakcja B zawiera większą ilość kwasu glukuronowego, często w postaci 4-O-metylopo pochodnych (50, 51). We frakcji A przeważają cukry obojętne. W skład hemicelulozy wchodzi między innymi następujące polisacharydy: ksylany, araboksylany, arabany, glukomannany, mannany, galaktany i glukuroniany.

Ksylany są zbudowane z 40—200 jednostek D-ksylopiranozy połączonych wiązaniami  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Większość łańcuchów jest nierozgałęziona lub zawiera rozgałęzienia w postaci pojedynczych jednostek cukrowych, zazwyczaj L-arabinozy (8). Gdy zawartość L-arabinozy dochodzi do kilkunastu procent, polisacharyd taki nazywa się araboksylianem (46). W niektórych roślinach wyższych występują arabany złożone z reszt L-arabofuranozy połączonych wiązaniami  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 5) i  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) (45).

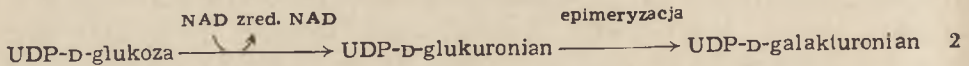
Mannany są zbudowane z cząsteczek D-mannopiranozy połączonych wiązaniami  $\beta$ —(1 $\rightarrow$ 4) (7). Glukomannany składają się z cząsteczek D-mannopiranozy i D-glukopiranozy połączonych w nierozgałęziony łańcuch wiązaniami  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (16, 73, 86), przy czym stosunek glukozy do mannozy wynosi 1:3—4 (27).

Galaktany zbudowane są z około 4 600 cząsteczek D-galaktopiranozy połączonych wiązaniami  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (89). Czasem w ścianie komórkowej występują arabogalaktany (92).

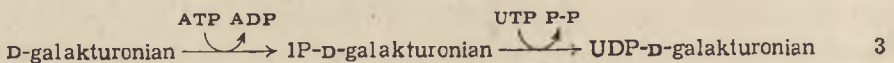
## II. Biosynteza pektyn

Wykrycie w wielu roślinach wyższych UDP-D-galakturonianu nasuwało od dawna przypuszczenia o możliwej roli tego związku jako donora reszt kwasu galakturonowego w procesie biosyntezy łańcuchów poligalakturonianowych pektyn. UDP-D-galakturonian wykryto między innymi w fasoli (40, 68), bawełnie (34) i owsie (28).

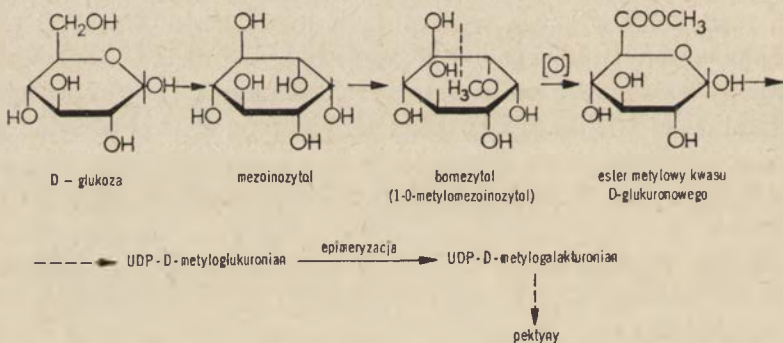
Wiadomo obecnie, że jedną z dróg powstawania UDP-D-galakturonianu w roślinach wyższych jest dwuetapowa reakcja przekształcenia UDP-D-glukozy (5, 66, 76, 82) (reakcja 2).



Enzymy katalizujące poszczególne przekształcenia — dehydrogenazę UDP-D-glukozy i 4-epimerazę UDP-D-glukuronianu — wyodrębniano z niektórych roślin, między innymi z fasoli (6, 30, 70, 84). W siewkach fasoli wykryto również enzymy katalizujące powstawanie UDP-D-galakturonianu na drodze bezpośredniej (29, 70) (reakcja 3).



Szereg badań wskazuje na możliwość biosyntezy UDP-D-galakturonianu na jeszcze innej drodze. Stwierdzono mianowicie, że 2-<sup>14</sup>C- lub 2-<sup>3</sup>H-mezoinozytol jest dobrym prekursorem pektyn w roślinach wyższych (1, 2, 4, 57, 62, 63). Zaproponowana przez Loewusa i Kelly (59, 60, 62) droga łączy metabolizm mezoinozytoli z powstawaniem pektyn (schemat 1).



**Schemat 1.** Powstawanie pektyn z glukozy poprzez mezoinozytol wg (51)

Według Loewusa (61) proces ten przebiegałby w następujących etapach: 1) cyklizacja heksozy do cyklitolu, 2) metylowanie cyklitolu, 3) utlenienie pochodnej metylowej cyklitolu z rozszczepieniem wiązania między C<sub>1</sub> i C<sub>6</sub> do estru metylowego kwasu glukuronowego, 4) epimeryzacja do estru metylowego kwasu galakturonowego (na poziomie UDP-pochodnej).

Trudno obecnie definitywnie stwierdzić, która z omówionych wyżej dróg powstawania UDP-D-galakturonianu odgrywa najważniejszą rolę

w biosyntezie pektyn. Niewykluczone jest, że drogi te funkcjonują równolegle.

W 1965 roku w pracowni Hassida (90) otrzymano z siewek fasoli frakcję enzymatyczną, katalizującą biosyntezę poligalakturonianu z UDP-D-<sup>14</sup>C-galakturonianu. Szczegółowe badania radioaktywnego polimeru kwasu galakturonowego, syntetyzowanego przez ten układ, polegające na częściowej degradacji za pomocą poligalakturonazy (EC.3.2.1.15) z *Penicillium chrysogenum* i liazы poligalakturonianowej (EC.4.2.2.2.) z *Clostridium multifementas*, wykazały ponad wszelką wątpliwość, że otrzymany polimer rzeczywiście jest identyczny z naturalną pektyną. Działanie tych enzymów jest specyficzne w stosunku do łańcuchów α (1→4) poligalakturonianowych (64, 65). Pierwszy z nich rozszczepia wiązania glikozydowe z wytworzeniem mono- lub oligomerów kwasu galakturonowego, drugi powoduje kolejne odszczepienie od nieredukującego końca łańcucha cząsteczek kwasu Δ<sup>4,5</sup>dwugalakturonowego na drodze nie hydrolitycznej. Zastosowanie enzymów do trawienia radioaktywnego polimeru wykazało ponadto, że włączanie galakturonianu z UDP-D-<sup>14</sup>C-galakturonianu do układów poligalakturonianowych, katalizowane przez preparat enzymatyczny z siewek fasoli, polega na syntezie całych łańcuchów *de novo*, a nie na przyłączaniu pojedynczych jednostek kwasu galakturonowego do już gotowych łańcuchów poligalakturonianowych, znajdujących się w nieoczyszczonym preparacie. Preparaty enzymatyczne o podobnych własnościach otrzymano również z innych roślin, między innymi z pomidorów i buraka (53, 87, 89, 90). Aktywność transferazy katalizującej syntezę pektyn związana jest, jak wielokrotnie wykazano, z frakcją sedymentującą w zakresie 500—10 000 g, zawierającą fragmenty ściany komórkowej.

Obszerne badania nad specyficznością substratową układów syntetyzujących pektyny przeprowadzili Tsau-Yen Lin i wsp. (87). Wykazali oni, że preparaty enzymatyczne z wielu roślin wyższych istotnie do syntezy pektyn najlepiej wykorzystują UDP-pochodną kwasu galakturonowego. W preparatach z siewek pomidorów i buraka stosunkowo dobrym donorem kwasu galakturonowego była również TDP pochodna (około 1/3 aktywności UDP-pochodnej), natomiast w preparacie z siewek fasoli — CDP-pochodna. Inne pochodne nukleotydomy (GDP- i ADP-D-galakturonian) praktycznie nie były wykorzystywane do syntezy pektyn.

W naturalnych pektynach część grup -COOH reszt kwasu galakturonowego jest zmetylowana (3, 4). Wykazano, że biosynteza estrów metyloowych pektyn odbywa się na drodze transmetylacji z L-metioniny (79, 80). Bezpośrednim donorem reszt metyloowych jest według Kausa i wsp. (52, 54) „czynna metionina” — S-adenozyl-L-metionina. Nie jest całkowicie jasne czy wprowadzenie grup metyloowych zachodzi już po utworzeniu łańcucha kwasu poligalakturonowego, czy też, jak sugerowali niektórzy badacze (3, 4, 60), polimeryzacji ulegają uprzednio zmetylowane reszty kwasu galakturonowego. Większość danych eksperymentalnych przema-

wią za pierwszą z tych możliwości, to znaczy za wprowadzeniem reszt metylowych do gotowej już cząsteczki kwasu poligalakturonowego. Vilemez, Swanson i Hassid (89) stwierdzili, że preparat enzymatyczny z siewek fasoli, efektywnie włączający do frakcji pektynowej  $^{14}\text{C}$  z UDP- $^{14}\text{C}$ -D-galakturonianu, w nieznacznym tylko stopniu wykorzystuje UDP- $^{14}\text{C}$ -D-metylogalakturonian. Nie obserwowali oni również stymulowania włączania reszty cukrowej z UDP-D-galakturonianu, gdy podawano równocześnie UDP-metylo-D-galakturonian. Włączenie grup metylowych z S-adenozylometioniny do pektyn zachodzi nawet wówczas, gdy preparat pozbawi się uprzednio śladów „endogennych” nukleotydów za pomocą fosfodwuesterazy (53). Wskazuje to, że metylowaniu podlega gotowy łańcuch kwasu poligalakturonowego, a nukleozydodwufosfocukry nie pośredniczą w tym procesie. W każdym jednak razie oba układy enzymatyczne biorące bezpośrednio udział w biosyntezie pektyn, tj. enzymy katalizujące tworzenie wiązań glikozydowych (polimeryzacja) i wiązań estrowych (metylowanie), zlokalizowane są w tych samych strukturach komórkowych, związanych ściśle ze ścianami komórkowymi.

Niewiele wiadomo o czynnikach, które regulują szybkość syntezy pektyn. Wykazano, że UTP, UDP i UMP hamują biosyntezę pektyn z UDP- $^{14}\text{C}$ -D-galakturonianu, natomiast stymulujące działanie ma ATP (89, 90). Obserwowano również wyraźnie aktywujące działanie niektórych kationów jedno- i dwuwartościowych ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) (89), kwasu indoliloctowego i niektórych enzymów rozkładających polisacharydy ścian komórkowych, na przykład  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glukazy z mikroorganizmów (91).

### III. Biosynteza celulozy

W 1958 roku Glaser (38) stwierdził, że bezkomórkowe preparaty z *Acetobacter xylinum* mają zdolność syntetyzowania celulozy w obecności UDP-D-glukozy. Fakt wytwarzania celulozy przez mikroorganizmy z UDP-D-glukozy nie przesądzał, że tak samo jest w roślinach wyższych. W 1964 roku Barber, Elbein i Hassid (12, 13, 26) otrzymali z siewek fasoli i innych roślin wyższych frakcję, osadzającą się przy 10 000 g, która wykorzystywała GDP-D- $^{14}\text{C}$ -glukozę do syntezy nierozpuszczalnego w wodzie polisacharydu o identycznych z celulozą właściwościach. Po częściowej hydrolizie kwasowej lub za pomocą enzymów celulolitycznych zawsze otrzymywano wyłącznie celobiozę (glukozylo- $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glukozę) i oligosacharydy zbudowane z reszt glukozy połączonych wiązaniami  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Inne nukleozydodwufosfopochodne glukozy (UDP-, ADP-, TDP-, CDP-glukoza) oraz sama glukoza i fosforany glukozy nie były substratami w tej reakcji (12, 26). Na podstawie własnych prac Hassid (42) uważa, że specyficz-

nym donorem reszt glukozy dla biosyntezy celulozy u roślin wyższych jest wyłącznie GDP-D-glukoza. Jednakże niektórzy badacze nie podzielają zdania Hassida i uważają zagadnienie specyficzności transferazy, biorącej udział w syntezie celulozy, w stosunku do zasady wchodzącej w skład nukleozydodwufosfoglukozy za nadal otwarte.

Brummond i Gibbons (18), prowadząc badania na preparacie enzymatycznym z łubinu stwierdzili, że zarówno GDP-D-glukoza, jak i UDP-D-glukoza mogą być wykorzystywane do syntezy polisacharydu o własnościach celulozy, przy czym lepszym donorem glukozy była w tym przypadku UDP-D-glukoza. Podobne wyniki dla preparatu z liścieni owsa otrzymali Ordini i Hall (71, 72). Jednak gdy donorem glukozy była UDP-D-<sup>14</sup>C-glukoza, po częściowej hydrolizie powstałego polisacharydu uzyskano mieszaninę oligosacharydów zawierających reszty glukozy połączone wiązaniami  $\beta$  (1→4) i  $\beta$  (1→3), między innymi celobiozę i laminariobiozę (glukozylo  $\beta$  (1→3) glukozę). Natomiast gdy substratem była GDP-D-<sup>14</sup>C-glukoza otrzymano polisacharyd, w którym wiązania pomiędzy resztami glukozy były wyłącznie  $\beta$  (1→4) (71, 72, 88). Nie jest zupełnie jasne, czy gdy donorem reszt glukozy jest UDP-D-glukoza, obok celulozy powstaje kalloza ( $\beta$  (1→3) glukan), czy też zbliżony właściwościami do celulozy polisacharyd zawierający zarówno wiązania  $\beta$  (1→3) i  $\beta$  (1→4).

Franz i Meier (35) badali biosyntezę celulozy z UDP-D-<sup>14</sup>C-glukozy *in vivo* we włoskach nasion bawełny. Materiał ten jest szczególnie dogodny do badań nad biosyntezą celulozy *in vivo*, gdyż izolowane włoski bawełny stosunkowo łatwo utrzymać przy życiu przez dłuższy okres czasu, a ich ściany komórkowe zawierają około 96% celulozy i tylko nieznaczną ilość substancji pektynowych i hemicelulozowych. W czasie rozwoju włosków bawełny dość dobrze wyróżniają się dwa okresy: pierwszy — do 25 dni od zakwitnięcia rośliny, kiedy syntetyzowane są niemal wyłącznie pektyny i hemicelulozy błony pierwotnej, oraz drugi okres — od 25 do 35 dnia, kiedy zachodzi synteza celulozy błony wtórnej. W pierwszej fazie rozwoju włosków bawełny, odpowiadającej okresowi syntezy pektyn i hemiceluloz, ogólne włączenie glukozy z UDP-D-<sup>14</sup>C-glukozy było stosunkowo niewielkie i zbliżone do poziomu włączania <sup>14</sup>C-glukozy (przy tych samych stężeniach obu substratów). W drugiej fazie, odpowiadającej okresowi syntezy celulozy, poziom włączenia glukozy z UDP-<sup>14</sup>C-glukozy szybko wzrastał przewyższając wielokrotnie poziom włączenia wolnej <sup>14</sup>C-glukozy, przy czym otrzymany radioaktywny polisacharyd zawierał wyłącznie wiązania  $\beta$  (1→4). Podobne zjawisko obserwowano prowadząc badania nad preparatem enzymatycznym otrzymywanym z siewek fasoli w różnym wieku (33). Dalszym dowodem przemawiającym za tym, że w bawełnie specyficznym donorem glukozy dla biosyntezy celulozy jest UDP-D-glukoza, są wyniki analizy zawartości nukleozydodwufosfocukrów we włoskach bawełny w obu okresach rozwoju. W okresie pierwszym wykrywano UDP-D-glukozę, UDP-D-

galaktozę, UDP-L-arabinozę, UDP-D-ksylozę i UDP-D-galakturonian, czyli nukleozydodwufosfopochodne tych cukrów, które są niezbędne do wytworzenia blaszki środkowej i błony pierwotnej. Natomiast w drugim okresie, gdy zachodzi biosynteza celulozy, wykrywano jedynie UDP-D-glukozę i nieznaczące ilości UDP-D-galaktozy, a nie wykrywano w ogóle GDP-D-glukozy (34).

Wiadomo, że o ile UDP-glukoza jest prawdopodobnie głównym składnikiem puli nukleozydodwufosfocukrów w roślinach wyższych (28, 34, 40) o tyle GDP-D-glukozy, która według Hassida jest specyficznym donorem reszt glukozy w biosyntezie celulozy, nie wykryto dotąd w żadnej z badanych roślin, z wyjątkiem liści truskawki (47). Jednak — zdaniem Hassida — niewykrywanie GDP-D-glukozy w materiale roślinnym może być związane z dużą szybkością wykorzystywania tego nukleozydodwufosfocukru do syntezy celulozy. Stwierdzono, że niektóre rośliny wyższe zawierają układ enzymatyczny katalizujący wytwarzanie GDP-D-glukozy z *l*-fosforanu glukozy i GTP (26).

#### IV. Biosynteza hemiceluloz ściany komórkowej

*Glukomannan.* Prowadząc badania nad biosyntezą celulozy przez preparat enzymatyczny z siewek fasoli, *Elbein* i *Hassid* (27) zauważyli, że dodatek nieznakowanej GDP-D-mannozy stymuluje włączenie GDP-D-<sup>14</sup>C-glukozy do frakcji polisacharydowej. Syntetyzowany polimer nie był celulozą lecz heteropolisacharydem zawierającym glukozę i mannozę. Szczegółowa analiza kilku oligosacharydów, uzyskanych w wyniku częściowej hydrolizy polimeru, wykazała, że jest on  $\beta$  (1→4) glukomannanem zawierającym 3—4 cząsteczek mannozy na jedną cząsteczkę glukozy (25). Gdy podawano GDP-D-<sup>14</sup>C-mannozę i nieznakowaną GDP-D-glukozę, otrzymano identyczny polisacharyd zawierający radioaktywną mannozę, przy czym niewielką część radioaktywności odnaleziono również w glukozie. Można przypuszczać, że frakcja enzymatyczna warunkująca biosyntezę polisacharydów ściany komórkowej zawiera 2-epimerazę GDP-D-mannozy. Maksymalne włączenie mannozy z GDP-D-mannozy obserwowano wówczas, gdy stosunek stężenia GDP-D-mannozy do stężenia GDP-D-glukozy wynosiło 3:1, to znaczy tyle, ile stosunek obu cukrów w polisacharydzie. Wykazano, że jony  $Mg^{2+}$  wyraźnie stymulują włączanie mannozy z GDP-D-mannozy do glukomannanu, natomiast nie mają wpływu na włączanie glukozy z GDP-D-glukozy. Nasuwa to przypuszczenie, że reszty glukozy i mannozy w czasie biosyntezy glukomannanu przenoszone są przez odrębne transferazy (25).

*Ksylany i araboksylany.* *Pridham* i *Hassid* (77) otrzymali frakcję enzymatyczną z niedojrzałych kolb kukurydzy, aktywnie włączającą



D-ksylozę z UDP-D-<sup>14</sup>C-ksylozy do polisacharydu identycznego z naturalnym ksylanem. Okazało się (15), że powstający radioaktywny polimer zawiera również radioaktywną L-arabinozę. Wskazuje to, że UDP-D-ksyloza ulega częściowo epimeryzacji do UDP-L-arabinozy, a następnie oba te nukleozydodwufosfocukry wykorzystywane są do biosyntezy polisacharydu.

*Galaktan.* Ne Nab, Villemez i Albersheim (67) wykazali, że układ enzymatyczny z siewek fasoli w obecności UDP-D-<sup>14</sup>C-galaktozy syntetyzuje polimer o własnościach identycznych z galaktanem wyodrębnionym z tej samej rośliny.

*Kwasowe polisacharydy frakcji hemicelulozowej.* Prawdopodobnie donorami reszt cukrowych w biosyntezie kwaśnych hemiceluloz są również UDP-cukry. Kauss (48) otrzymał z kolb kukurydzy preparat enzymatyczny wytwarzający glukuronoksylan z UDP-D-glukuronianu i UDP-D-ksylozy. W kwaśnych heteropolisacharydach hemicelulozowych część cząsteczek kwasu glukuronowego występuje w postaci 4-O-metylopo pochodnych. Badania Kausa i Hassida (50, 51) wyjaśniły, że metylowanie jest procesem wtórnym, zachodzącym już po utworzeniu łańcucha polisacharydowego, a donorem reszt metylowych jest S-adenozyl-L-metionina (analogicznie jak podczas biosyntezy pektyn).

Jak wynika z omówionych wyżej wyników badań, donorem reszt cukrowych w biosyntezie polisacharydów typu hemiceluloz, z wyjątkiem glukomannanu, są prawdopodobnie zawsze UDP-cukry. Centralną pozycję w metabolizmie tych związków zajmuje UDP-D-glukoza, z której na drodze enzymatycznych przekształceń (epimeryzacja, utlenienie, dekarboksylacja) powstają wszystkie pozostałe UDP-cukry niezbędne do syntezy polisacharydów typu hemiceluloz: UDP-D-galaktoza, UDP-D-glukuronian, UDP-D-ksyloza, UDP-L-arabinoza i UDP-L-ramnoza (36).

## V. Aktualne problemy i perspektywy w badaniach biosyntezy polisacharydów ściany komórkowej

Pomimo niewątpliwie wzrastającego w ostatnich latach zainteresowania zagadnieniem biosyntezy polisacharydów ściany komórkowej roślin wyższych i znacznych osiągnięć w tej dziedzinie, wiele podstawowych problemów pozostaje nadal niedostatecznie wyjaśnionych. Dalszy postęp w tej dziedzinie zależy jest, jak się wydaje, od postępów w poznaniu struktury chemicznej składników ścian komórkowych oraz metod ich wyodrębniania w stanie czystym z uniknięciem częściowej degradacji. Z drugiej strony niezbędne jest udoskonalenie metodyki otrzymywania preparatów enzymatycznych syntetyzujących polisacharydy ścian komórkowych. Jak dotąd, preparaty enzymatyczne katalizujące powstawanie rozmaitych polisacharydów ścian komórkowych z odpowiednich nukleozydodwufosfo-

cukrów otrzymuje się w wyniku wirowania rozbitych komórek przy 500—10 000 g. Otrzymywane aktywne frakcje są fragmentami ściany komórkowej z przylegającymi do niej fragmentami błony cytoplazmatycznej, z którą związane są enzymy syntetyzujące polisacharydy. Efekty prób oczyszczenia tych preparatów są jak dotychczas nieznaczące. Szczególnie trudne jest oddzielenie układów enzymatycznych od fragmentów ściany komórkowej. Otrzymane preparaty enzymatyczne zawierają więc zawsze endogenne akceptory reszt cukrowych (tj. odpowiednie polisacharydy). Fakt ten utrudnia w zasadniczy sposób badanie mechanizmu przenoszenia reszt cukrowych. Z tego właśnie powodu brak dotąd informacji, czy dla syntezy potrzebne są „primery”, tak jak to wykazano dla układów syntetyzujących skrobię oraz glikogen (43, 58, 75).

Zdecydowana większość badaczy zajmujących się zagadnieniem biosyntezy polisacharydów ścian komórkowych zgadza się z tym, że odpowiednie nukleotydowe pochodne cukrów są bezpośrednimi donorami reszt cukrowych w procesie biosyntezy wiązań glikozydowych. Niektórzy autorzy postulują jednak istnienie lipidowego przenośnika, za którego pośrednictwem odbywałoby się przeniesienie reszt cukrowych z nukleozydodwufosfocukrów na właściwy akceptor (tj. polisacharyd) (17, 20, 21, 22, 49). Chociaż dane doświadczalne przemawiające za istnieniem takiego pośrednika są nieliczne i dotyczą w większości syntezy polisacharydów przez mikroorganizmy, hipoteza ta zasługuje na bardziej szczegółowe omówienie, gdyż dobrze tłumaczy przestrzenny mechanizm współdziałania między układami enzymatycznymi, biorącymi udział w syntezie polisacharydów ścian komórkowych.

Wiadomo, że enzymy katalizujące syntezę nukleozydodwufosfocukrów (pirofosforylasy) zlokalizowane są w cytoplazmie. Układ polimeryzujący (transferazy) związany jest natomiast z zewnętrzną częścią lipido-białkowej błony cytoplazmatycznej. Przenośnik lipidowy, zlokalizowany wewnątrz błony cytoplazmatycznej, brałby więc udział w przenoszeniu reszt cukrowych z nukleozydodwufosfocukrów tworzonych po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej na akceptor położony po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. W 1961 roku Colvin (21) wykrył u syntetyzującego celulozę mikroorganizmu *Acetobacter xylinum* i w niektórych roślinach wyższych glikolipidowy związek, który prawdopodobnie mógłby pełnić funkcję takiego przenośnika reszt cukrowych. Glikolipid ten jest wykorzystywany przez układ enzymatyczny z *Acetobacter xylinum*, jako donor reszt glukozy do syntezy celulozy. Zdaniem Colvina, związek ten składa się z polialkoholu zawierającego około 30 atomów węgla, glukozy i ewentualnie zasady organicznej (22). Z kolei Kauss (49) przypuszcza, że u roślin wyższych takim przenośnikiem lipidowym mogłyby być glikozydy steroli. Otrzymany przez niego z siewek fasoli preparat enzymatyczny, inkubowany z UDP-<sup>14</sup>C-D-glukozą, obok syntezy celulozy katalizuje włączenie glukozy do glikozydów  $\beta$ -sitosterolu i stigmasterolu. Z drugiej

jednak strony Flowers i wsp. (31) wykazali, że częściowo oczyszczone preparaty enzymatyczne z siewek fasoli i lubinu, syntetyzujące intensywnie celulozę, nie wytwarzają w uchwytynych ilościach żadnych połączeń glikolipidowych. Problem ewentualnego lipidowego przekaźnika cukrów w biosyntezie polisacharydów ścian komórkowych pozostaje więc nadal otwarty.

Na szczególną uwagę zasługuje zagadnienie specyficzności transferaz, biorących udział w syntezie poszczególnych polisacharydów, w stosunku do zasady wchodzącej w skład donora reszty cukrowej, tj. nukleozydodwufosfocukru. Wiadomo obecnie, że skrobia w roślinach wyższych syntetyzowana jest z ADP-D-glukozy (75), glikogen zwierzęcy z UDP-D-glukozy (43), celuloza natomiast — według prac Hassida i wsp. (12, 13, 26, 42) — z GDP-D-glukozy. Tak więc trzy ilościowo najważniejsze biologiczne polimery glukozy wytwarzane byłyby z różnych nukleozydodwufosfopochodnych glukozy. W komórkach roślin wyższych są układy enzymatyczne katalizujące syntezę zarówno ADP-, GDP-, jak i UDP-D-glukozy. Ostatni związek jest donorem reszt glukozy w biosyntezie niektórych różnych od celulozy a zawierających glukozę polimerów wchodzących w skład ściany komórkowej oraz do syntezy szeregu glikozydów, między innymi fenolowych (11, 23, 56, 93), sterolowych (19, 49) i innych (85). Wysoce prawdopodobna wydaje się hipoteza, że biosynteza rozmaitych połączeń glukozydowych w roślinach wyższych może być regulowana na poziomie syntezy nukleozydodwufosfopochodnych. Oddziaływania powodujące zmiany aktywności poszczególnych pirofosforylaz decydowałyby o wielkości pul ADP-, GDP- i UDP-D-glukozy i poprzez to — o relacji między szybkością biosyntezy skrobi, celulozy i innych pochodnych glukozydowych w komórkach.

#### LITERATURA

1. Albersheim P., *J. Biol. Chem.* **236**, 162 (1961).
2. Albersheim P., *Plant Physiol.* **38**, 426 (1963).
3. Albersheim P., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **234**, 3105 (1959).
4. Albersheim P., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **238**, 1608 (1963).
5. Altermatt H. A., Neish A. C., *Can. J. Biochem. Physiol.* **34**, 405 (1956).
6. Ankel M., Feingold D. S., *Biochemistry* **4**, 2468 (1965).
7. Aspinall G. O., *Advan. Carbohydrate Chem.* **14**, 429 (1959).
8. Aspinall G. O., Cairncross I. M., Ross K. M., *J. Chem. Soc.* str. 1721 (1963).
9. Aspinall G. O., Canas-Rodriguez A., *J. Chem. Soc.* str. 3877 (1958).
10. Aspinall G. O., Fanshawe R. S., *J. Chem. Soc.* str. 4215 (1961).
11. Barber G. A., *Biochemistry* **1**, 463 (1962).
12. Barber G. A., Elbein A. D., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **239**, 4056 (1964).
13. Barber G. A., Hassid W. Z., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 397 (1964).
14. Barrett A. J., Northcote D. H., *Biochem. J.* **94**, 617 (1965).
15. Beiley R. W., Hassid W. Z., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1586 (1966).
16. Bishop C. T., Cooper F. P., *Can. J. Chem.* **38**, 793 (1960).
17. Brown A. M., Gascoigne J. A., *Nature* **187**, 1010 (1960).

18. Brummond D. O., Gibbons A. P., *Biochem. Z.* **342**, 308 (1965).
19. Ching Tsang Hou, Yasukiyo Umemura, Michinori Nakamura, Saburo Funahashi, *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 389 (1967).
20. Colvin J. R., *Nature* **183**, 1135 (1959).
21. Colvin J. R., *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 1921 (1961).
22. Colvin J. R., w *The Formation of Wood in Forest Trees*, red. M. H. Zimmermann, Academic Press, Nowy Jork 1964, str. 189.
23. Conhcie J., Moreno A., Cardini C. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 127 (1960).
24. Dyke S. F., w *The Chemistry of Natural Products*, Interscience Publishers, New York-Londyn 1960, tom V.
25. Elbein A. D., *J. Biol. Chem.* **244**, 6 (1969).
26. Elbein A. D., Barber G. A., Hassid W. Z., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 309 (1964).
27. Elbein A. D., Hassid W. Z., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 311 (1966).
28. Elnagy M. A., Nordin P., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 72 (1966).
29. Feingold D. S., Neufeld E. F., Hassid W. Z., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 401 (1958).
30. Feingold D. S., Neufeld E. F., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **235**, 910 (1960).
31. Flowers H. M., Batra K. K., Kemp J., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **244**, 4969 (1969).
32. Foglietti M. J., Percheron F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**, 1439 (1966).
33. Franz G., *Verhandl. Schweiz. Naturforsch. Ges.* **147**, 134 (1968).
34. Franz G., *Phytochemistry* **8**, 737 (1969).
35. Franz G., Meier H., *Phytochemistry* **8**, 579 (1969).
36. Ginsburg V., *Advan. Enzymol.* **26**, 35 (1964).
37. Ginsburg V., Stumpf P. K., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **223**, 977 (1956).
38. Glaser L., *J. Biol. Chem.* **232**, 627 (1958).
39. Gould Sh. E., Ress D. A., Richardson N. G., *Nature* **208**, 876 (1965).
40. Gregoire J., Gregoire J., Limozin N., Van L. V., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 195 (1965).
41. Hassid W. Z., *Some Aspects of Sugar Nucleotide Metabolism w Current Aspects of Biochemical Energetics*, Academic Press, New York Londyn 1966.
42. Hassid W. Z., *Science* **165**, 3889 (1969).
43. Helmreich E., *Control of Synthesis and Breakdown of Glycogen, Starch and Cellulose w Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florkin, Elsevier Publishing Company 1969, t. 17, str. 17.
44. Honeyman J., *Recent Advances in the Chemistry of Cellulose and Starch*, Interscience Publishers, New York 1959.
45. Hough L., Powell D. B., *J. Chem. Soc.* str. 16 (1960).
46. Howard B. H., *Biochem. J.* **67**, 643 (1957).
47. Isherwood F. A., *Biochem. J.* **105**, 723 (1967).
48. Kauss H., *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 572 (1967).
49. Kauss H., *Z. Naturforsch. Sect B* **23**, 1522 (1968).
50. Kauss H., *Phytochemistry* **8**, 985 (1969).
51. Kauss H., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **242**, 1680 (1967).
52. Kauss H., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **242**, 3449 (1967).
53. Kauss H., Swanson A. L., *Z. Naturforsch. Sect. B* **24**, 28 (1969).
54. Kauss H., Swanson A. L., Hassid W. Z., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 234 (1967).
55. Kertesz Z. I., *The Pectic Substances*, Wiley Interscience, New York 1951.

56. Kleinhots A., Haskins F. A., Gorz H. J., *Phytochemistry* **6**, 1313 (1967).
57. Kroh M., Loewus F., *Science* **160**, 1352 (1968).
58. Leloir L. F., Role of uridine diphosphate glucose in the synthesis of glycogen, Ciba Foundation Symposia, Control of Glycogen metabolism, 1964.
59. Loewus F. A., *Nature* **203**, 1175 (1964).
60. Loewus F. A., *Advances Tracer Metodol.* **2**, 163 (1965).
61. Loewus F. A., *Federation Proc.* **24**, 855 (1965).
62. Loewus F. A., Kelly S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 24 (1962).
63. Loewus F. A., Kelly S., Neufeld E. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 421 (1962).
64. Macmillan J. D., Phaff H. I., Vaughn R. H., *Biochemistry* **3**, 572 (1964).
65. Macmillan J. D., Vaughn R. H., *Biochemistry* **3**, 564 (1964).
66. Neish A. C., *Can. J. Biochem. Physiol.* **36**, 187 (1958).
67. Ne Nab J. M., Villemez C. L., Albersheim P., *Biochem. J.* **106**, 355 (1968).
68. Neufeld E. F., Feingold D. S., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 589 (1961).
69. Neufeld E. F., Feingold D. S., Hassid W. Z., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 16 (1958).
70. Neufeld E. F., Feingold D. S., Ilves S. M., Kessler G., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **236**, 3102 (1961).
71. Ordin L., Hall M. A., *Plant. Physiol.* **42**, 205 (1967).
72. Ordin L., Hall M. A., *Plant. Physiol.* **43**, 473 (1968).
73. Perila O., Bishop C. T., *Can. J. Chem.* **39**, 815 (1961).
74. Pigman W. W., *The Carbohydrates*, Academic Press, New York 1957, str. 659.
75. Preiss J., Ghosh H. P., w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. Goodwin, Academic Press, New York 1967, t. 2, str. 131.
76. Pridham J. B., Hassid W. Z., *Plant Physiol.* **40**, 984 (1965).
77. Pridham J. B., Hassid W. Z., *Biochem. J.* **100**, 21P (1966).
78. Reid J. S. G., Wilkie K. C. B., *Phytochemistry* **8**, 2059 (1969).
79. Sato C. S., Byerrum R. U., Ball C. D., *J. Biol. Chem.* **224**, 717 (1957).
80. Sato C. S., Byerrum R. U., Albersheim P., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **223**, 128 (1958).
81. Sawicka T., *Post. Biochem.* **15**, 37 (1969).
82. Slater W. G., Beevers H., *Plant Physiol.* **33**, 146 (1958).
83. Strasburger E., *Botanika*, PWN, Warszawa 1960, str. 235.
84. Strominger J. L., Mapson L. W., *Biochem. J.* **66**, 567 (1957).
85. Tabone M. J., Tabone D., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 955 (1958).
86. Timell T. E., *Can. J. Chem.* **41**, 1389 (1963).
87. Tsau-Yen Lin, Elbein A. D., Jong-Ching Su, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 650 (1966).
88. Villemez C. L., Franz Jr., G., Hassid W. Z., *Plant Physiol.* **42**, 1219 (1967).
89. Villemez C. L., Swanson A. L., Hassid W. Z., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 446 (1966).
90. Villemez C. L., Tsau-Yen Lin, Hassid W. Z., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1626 (1965).
91. Wada Shunji, Tamimoto Eiichi, Maduda Yoshio, *Plant Cell Physiol.* **9**, 369 (1968).
92. Wise L. E., Jahn E. C., w *Wood Chemistry*, Reinhold, New York 1952, t. 1, str. 644.
93. Yamaha T., Cardini C. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 127 (1960).



ZBIGNIEW RUCZAJ \*

## Antybiotyki — inhibitorami biosyntezy ściany komórkowej bakterii

### Antibiotics — Inhibitors in Biosynthesis of the Bacterial Cell-Wall

The mode of action of antibiotics on biosynthesis of the peptidoglycan precursors and their cross-linking is described.

Mechanizm działania antybiotyków w komórce polega na swoistym oddziaływaniu na reakcje enzymatyczne lub struktury komórkowe. Antybiotyki uznać więc można za inhibitory o bardzo ściśle określonej funkcji. Znamienne jest przy tym, że penicylina nie tylko była pierwszym zastosowanym w terapii antybiotykiem, lecz również była pierwszym, którego działanie inhibitorowe umożliwiło poznanie złożonego procesu biosyntezy.

Już w początkowym okresie badań zauważono, że penicylina hamując rozwój bakterii powoduje zmiany ich kształtu; obserwacja ta wskazywała na oddziaływanie tego antybiotyku na powierzchniowe struktury komórki. Lederberg (24) wykazał, że bakterie pod wpływem niskich stężeń penicyliny zamieniały się w pozbawione ściany sferoplasty, identyczne z otrzymanymi przez Weillbull'a pod wpływem lizozymu, a Park i Johnson (35, 37) już w 1949 roku obserwowali nagromadzenie się w komórkach bakteryjnych, poddanych działaniu penicyliny, związków, w których skład wchodziły nukleotydy urydynowe. Okazało się, że związki te są składnikami ściany komórkowej bakterii (35, 36, 38). Chatterjee i Park (6) uznali więc połączenia te za bezpośrednie prekursorzy ściany. Związki tego typu nagromadzają się również pod wpływem innych czynników. D-Cykloseryna powoduje nagromadzenie w komórkach *Staphylococcus aureus* UDP-NAc-muramylo-L-ala-D-glu-L-lizyny, a brak lizyny w podłożu prowadzi do kumulowania kwasu UDP-NAc-muramylo-L-ala-D-glutaminowego, natomiast w wyniku działania fioletu goryczkowego nagromadza się UDP-NAc-glukozoamina lub kwas UDP-NAc-muraminowy (11, 15, 53). Na udział jonów  $Mg^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  w biosyntezie ściany wskazuje fakt, że brak tych jonów w podłożu powoduje podobne nagromadzenie

\* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Antybiotyków, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: UDP-NAc-Glc — urydino-5-dwufosfo-N-acetylo-glukozoamina, UDP-NAc-Mur — kwas urydino-5-dwufosfo-N-acetylo-muraminowy, mezo-DAP — kwas mezo-dwuaminopimelinowy

się nukleotydowych prekursorów ściany (9). Antybiotyki: bacytracyna, nobiocylna, wankomycyna i rystocetylny, dodane do hodowli *Staphylococcus aureus*, powodują także nagromadzanie różnego typu prekursorów ściany (53).

Odkrycia te zapoczątkowały długoletnie badania nad strukturą i biosyntezą ściany komórkowej bakterii, a antybiotyki stały się użytecznym narzędziem w poznaniu procesu powstawania polimeru cukrowo-peptydowego, wchodzącego w skład ściany, jak również mechanizmu przenoszenia nukleotydowych prekursorów ściany z cytoplazmy poprzez membranę cytoplazmatyczną na zewnątrz komórki.

W procesie biosyntezy ściany komórkowej wyróżnić można trzy etapy zachodzące w różnych układach strukturalnych komórki:

- a. synteza nukleotydowych prekursorów ściany
- b. powstawanie liniowych polimerów mukopeptydowych (peptydoglikanowych)
- c. utworzenie krzyżowych mostków peptydowych, łączących łańcuchy mukopeptydowe.

Poszczególne etapy biosyntezy hamowane są przez różne antybiotyki.

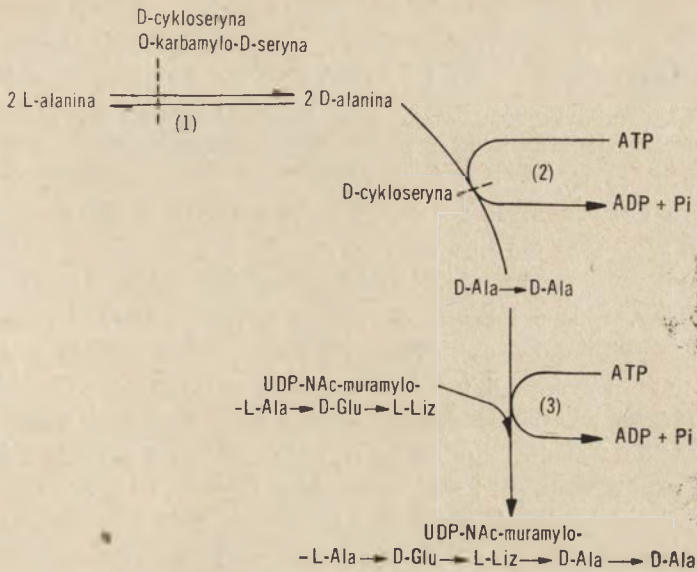
### I. Hamowanie syntezy nukleotydowych prekursorów ściany przez D-cykloserynę i O-karbamylo-D-serynę

Warunkiem rozpoczęcia syntezy ściany komórkowej jest aktywacja cukrów przez utworzenie połączeń z kwasem urydyno-5-trójfosforowym (UTP). U bakterii powstają UDP-N-acetylo-glukozaamina i kwas UDP-N-acetylo-muraminowy, do którego w kolejnych reakcjach przyłączane są aminokwasy w następującej kolejności: L-ala, D-glu, L-liz, oraz dwupeptyd D-ala-D-ala u *Staphylococcus aureus* lub L-ala, D-glu, mezo-DAP i wspomniany wyżej dwupeptyd u *Escherichia coli* (11, 57). Ten ostatni jest przyłączany przez tzw. enzym dołączający — ligazę UDP-NAC-muramylo-L-ala-D-glu-L-liz-: D-alanylo-D-alaniny (16, 33).

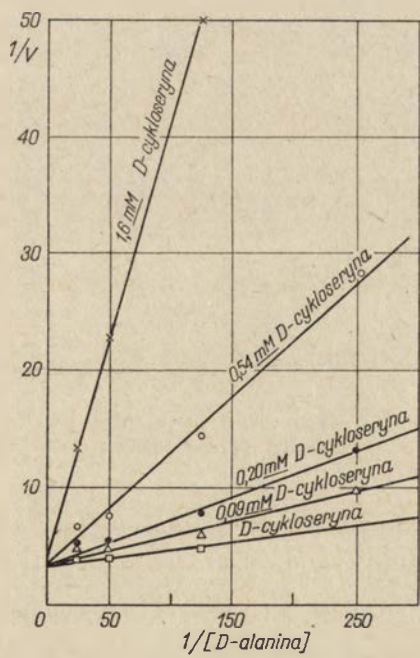
Hamowanie syntezy peptydoglikanu ściany przez cykloserynę (D-4-amino-3-izoksazolidon), wytwarzaną przez *Streptomyces garyphalus* (14), polega na specyficznym oddziaływaniu na racemazę alaninową (EC 5.1.1.1.) (58, 66), oraz syntetazę D-alanylo-D-alaninową (ligaza D-alanylo-D-alaniny (ADP); EC 6.3.2.4.) (16, 32, 56). O-Karbamylo-D-seryna o podobnej strukturze, wytwarzana przez szczepy z rodzaju *Streptomyces* (13), hamuje jedynie racemazę alaninową (26). Działanie obydwu antybiotyków polega więc na ingerencji w syntezę łańcucha peptydowego mukopeptydu (schemat 1).

Racemaza alaninowa jest enzymem specyficznym w stosunku do alaniny, współdziałającym z fosforanem pirydoksalu. D-Cykloseryna hamuje





**Schemat 1.** Hamowanie racemazy alaninowej i syntetazy D-alanylo-D-alaninowej przez cykloserynę



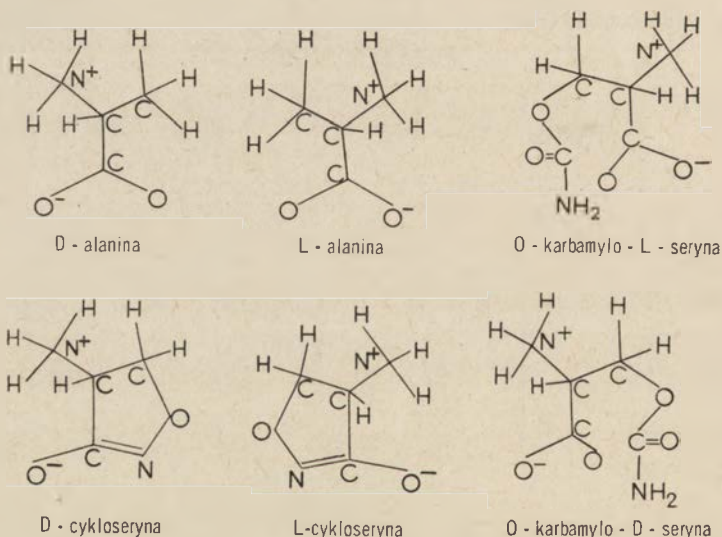
**Rys. 1.** Kompetycyjne hamowanie racemazy alaninowej przez D-cykloserynę według Stromingera i wsp. (56)

aktywność tego enzymu jako inhibitor kompetycyjny (26). Stała inhibitoryjna  $K_i$  D-cykloseryny wynosi 600 mM, a stała Michaelisa  $K_m$  w stosunku do D- i L-alaniny wynosi 6,1 i 6,5 mM (26), co oznacza, że enzym wiąże antybiotyk 100 razy efektywniej niż naturalny substrat jakim jest alanina.

Rysunek 1 przedstawia kompetycyjny charakter hamowania racemazy przez D-cykloserynę.

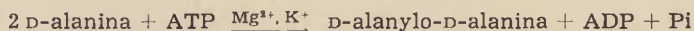
Działanie O-karbamylo-D-seryny polega również na kompetycyjnym hamowaniu racemazy alaninowej (26).

Zarówno L-cykloseryna jak i O-karbamylo-L-seryna nie hamują czynności racemazy. Rose i Strominger (50) na podstawie podobieństwa układu przestrzennego D-cykloseryny i D-alaniny wyjaśnili swoistość hamowania enzymu przez D-izomer antybiotyków (rysunek 2). D-Alanina i L-alanina dzięki ruchomemu wiązaniu pomiędzy atomami węgla przyjmować mogą kilka układów konformacyjnych. Jeden z nich jest identyczny z układem przestrzennym D-cykloseryny. Odrębny układ przestrzenny L-cykloseryny uniemożliwia natomiast jej reagowanie z centrum aktywnym enzymu, w wyniku czego nie hamuje ona aktywności racemazy (57).



**Rys. 2.** Budowa przestrzenna D-cykloseryny, D-alaniny i O-karbamylo-D-seryny w porównaniu z L-izomerami (57).

Synteza dwupeptydu D-alanylo-D-alaniny jest katalizowana przez syntetazę D-alanylo-D-alaniny zgodnie z reakcją (30, 31, 54):



Enzym ten wiąże dwie cząsteczki alaniny. Miejsce wiążące grupę aminową alaniny jest bardziej wrażliwe na działanie cykloseryny niż miejsce wiązania drugiej cząsteczki alaniny przez jej grupę karboksylową (31). Stwier-

dzono, że D-cykloseryna hamuje enzym kompetycyjnie.

Modyfikacje cząsteczki antybiotyku zmieniają jego własności inhibitorowe, na przykład podstawienie przy C<sub>5</sub> grupy metylowej (*cis*-5-metylo-D-4-amino-3-izoksazolidon) pociąga za sobą zmianę charakteru wiązania z enzymem, powodując zmniejszenie stałej inhibitorowej K<sub>i</sub> około 50 razy (K<sub>i</sub> = 12 mM) (31). Nabywanie oporności na D-cykloserynę przez bakterie związane jest ze wzrostem poziomu zarówno racemazy jak i syntetazy alanylo-alaninowej, oraz ze wzrostem wyłącznie racemazy w przypadku pojawienia się oporności na O-karbamylo-D-serynę (43).

## II. Hamowanie syntezy liniowych polimerów mukopeptydowych ściany przez wankomycynę, rystocetynę i bacytracynę

Badania nad mechanizmem syntezy polisacharydowego łańcucha mukopeptydowego w głównej mierze przeprowadzono z bezkomórkowymi ekstraktami enzymatycznymi ze *Staphylococcus aureus* i *Micrococcus lysodeikticus* (1, 2, 28, 59, 60). Coraz więcej jednak danych dotyczących innych drobnoustrojów uzupełnia te wyniki.

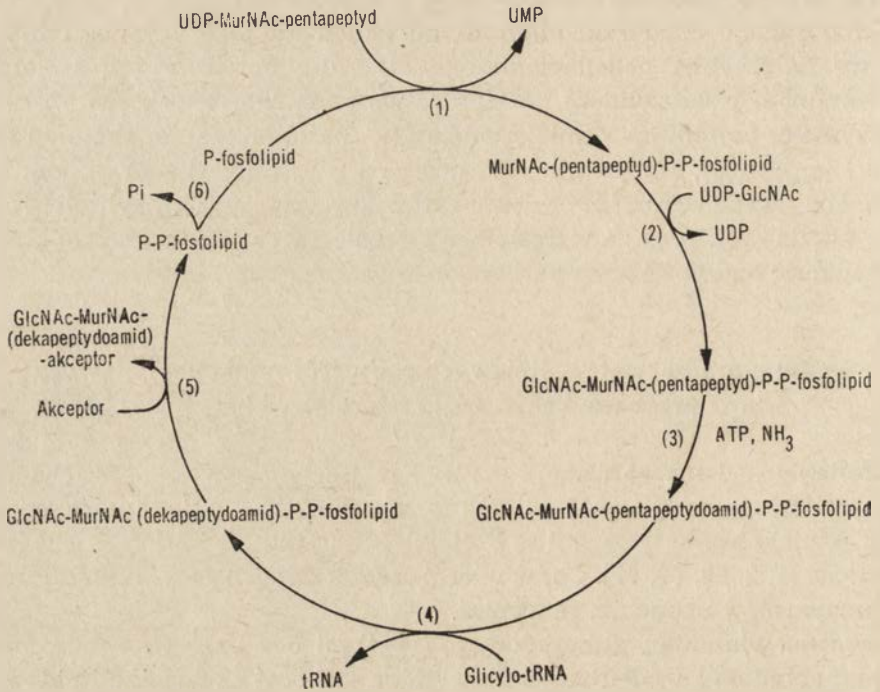
Synteza wiązania β-glikozydowego (1→4) między UDP-NAc-muramylo-pentapeptydem a UDP-NAc-glukozoaminą zachodzi na nośniku lipidowym (1) (schemat 2). Nośnik ten wyosobniono za pomocą chromatografii na DEAE-celulozie i przeprowadzono jego identyfikację. Jest to C<sub>55</sub>-alkohol izoprenoidowy zawierający jedenaście reszt izoprenowych, oraz dwie reszty fosforanowe (3, 11).

Reakcją 1 (schemat 2) przeniesienia fosfo-NAc-muramylo-pentapeptydu z UDP-NAc-muramylo-pentapeptydu na fosfolipidowy związek pośredni katalizuje translokaza fosfo-NAc-muramylo-pentapeptydu (UMP), przy czym uwalnia się UMP (59, 60). Syntezę wiązania glikozydowego (reakcja 2, schemat 2) z UDP-NAc-glukozoaminą katalizuje inny układ enzymatyczny uwalniający jednocześnie cząsteczkę UDP (1).

U *Staphylococcus aureus* reszta kwasu glutaminowego mukopeptydu ulega amidacji (reakcja 3, schemat 2) w obecności jonów NH<sub>3</sub> i ATP, a do grupy ε-aminowej lizyny dołącza się 5 cząsteczek glicyny (reakcja 4, schemat 2), tworząc Glc-NAc-Mur-NAc- (dekapeptyd amid), przy czym donatorem glicyny jest glicylo-tRNA (5, 6, 8, 28, 34, 52, 54).

Liczba i rodzaj dołączanych aminokwasów do fragmentu peptydowego dwusacharydowej cząsteczki mukopeptydu połączonej z nośnikiem fosfolipidowym wiązaniem pirofosforanowym są różne w zależności od gatunku bakterii (49).

U *Micrococcus lysodeikticus* do α-karboksyłowej grupy kwasu glutaminowego dołączana jest tylko jedna cząsteczka glicyny przy udziale ATP. Powstaje NAc-glukozoamino-NAc-muramylo (heksapeptyd) (reakcja 3, schemat 3), (8, 27, 51).



**Schemat 2.** Cykl fosfolipidowy w biosyntezie polimerów mukopeptydowych ściany *Staphylococcus aureus* (według Stromingera i wsp. (57))

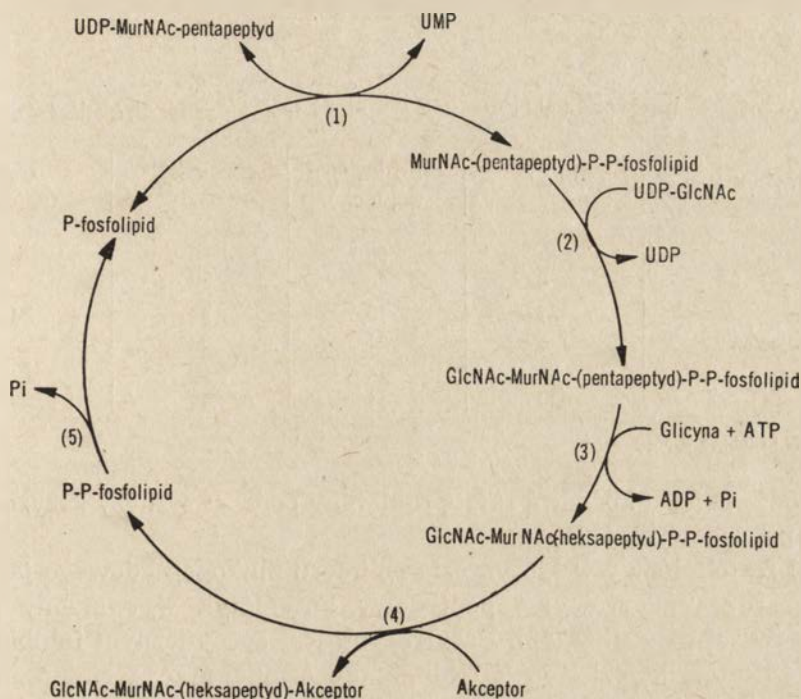
U *Micrococcus roseus* w reakcji dołączania reszt aminokwasowych bierze udział treonylo-tRNA (47, 48), u *Staphylococcus epidermidis* serylo-tRNA (40), a u *Arthrobacter crystallopoietes* L-alanylo-tRNA (46).

Udział tRNA w reakcjach wydłużania fragmentu peptydowego wskazuje na bardziej ogólne znaczenie tej formy aktywacji aminokwasów w procesach biologicznych.

Utworzony w ten sposób mukopeptyd o pełnym fragmencie peptydowym jest przenoszony na nośniku fosfolipidowym poprzez membranę cytoplazmatyczną do miejsca akceptorowego w ścianie, gdzie dwusacharydo-mukopeptyd dołącza się do reszty cukrowej akceptora (reakcja 5, schemat 2; reakcja 4, schemat 3). Mechanizm syntezy tego wiązania glikozydowego jest nieznany. W końcowym etapie, w wyniku działania fosfatazy odłącza się nośnik lipidowy, przy czym uwalnia się fosfor nieorganiczny (51) (reakcja 6, schemat 2; reakcja 5, schemat 3).

Wankomycyna, rystocetyny i bacytracyna hamują łączenie się prekursorów ściany z fosfolipidowymi nośnikami, oraz proces ich defosforylacji (20, 21, 23, 44, 45).

Wankomycyna, wytwarzana przez *Streptomyces orientalis* (41), jest antybiotykiem glikozydowym o nieznanym bliżej budowie, zawiera w częs-



**Schemat 3.** Cykl fosfolipidowy w biosyntezie polimerów mukopeptydowych ściany *Micrococcus lysodeikticus* według Siewerta i Stromingera (51)

teczce ugrupowanie fenolowe, N-metylo-leucynę i kwas asparaginowy, a rystocetyny A i B otrzymane z hodowli *Nocardia lurida* (12) zbudowane są między innymi z glukozy, mannozy, arabinozy i ramnozy. Antybiotyki te hamują reakcję dołączania dwusacharydowej cząsteczki mukopeptydu do akceptora w ścianie bakteryjnej, a w wyższych stężeniach także reakcję katalizowaną przez translokazę fosfo-NAc-muramylo pentapeptydu (22). Zahamowanie w 50% wykorzystania do syntezy ściany dwusacharydowej cząsteczki mukopeptydu obserwowano przy stężeniach obu antybiotyków 20  $\mu\text{g/ml}$  (1, 2, 65). Penicylina nie wykazywała działania hamującego na tę reakcję (tablica 1).

Oba te efekty należy rozpatrywać w połączeniu z obserwacjami nad adsorpcją wankomycyny i rystocetyny na mukopeptydzie ściany w komórce nienaruszonej (7) oraz wiązaniem się z wyosobnionymi mukopeptydowymi prekursorami ściany (39). Antybiotyki te wykazują większe powinowactwo do nienaruszonej ściany komórkowej niż do składników ściany znajdujących się w bezkomórkowych preparatach (4). Stwierdzono, że wankomycyna tworzy połączenia jedynie z takimi prekursorami, które zawierały na końcu łańcucha peptydowego dwupeptyd D-alanylo-D-alaninę (39), co tłumaczy wpływ tych antybiotyków również na czynność karboksypep-

Tablica 1

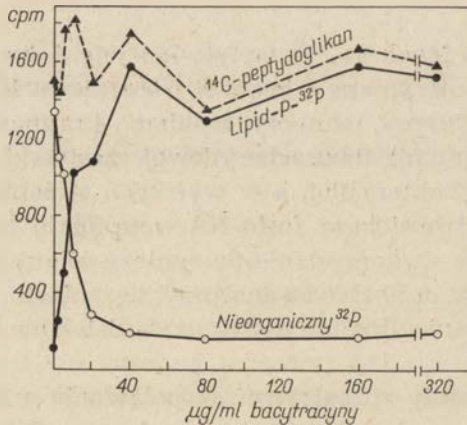
Wpływ antybiotyków na wykorzystanie oczyszczonego GlcNAc-Mur  
NAc-(pentapeptyd)-P-P-fosfolipidu w syntezie peptydoglikanu ściany *M. lysodeikticus* (6)

Antybiotyk	$\mu\text{g/ml}$	Peptydoglikan ( $\text{m}\mu\text{mole}$ )	Hamowanie (%)	$I_{50}$ * ( $\mu\text{g/ml}$ )
—		35	0	
Rystocetyna	6	30	14	
	24	13	63	20
Wankomycyna	6	27	23	
	23	14	60	20
Penicylina G	420	31	11	> 500

\* stężenie hamujące w 50%

tydazy odłączającej końcową resztę D-alaniny podczas syntezy krzyżowych wiązań peptydowych (10, 25).

Cykl fosfolipidowy w biosyntezie polimeru mukopeptydowego jest hamowany przez bacytracynę, peptydowy antybiotyk wytwarzany przez szczepy rodzaju *Bacillus* (42). Bacytracyna jest specyficznym inhibitorem reakcji defosforylacji P-P-fosfolipidu, katalizowanej przez fosfatazę, a tym samym uniemożliwia regenerację nośnika i wejście jego w ponowny cykl reakcji prowadzących do syntezy mukopeptydu (51) (rysunek 3).



**Rys. 3.** Wpływ bacytracyny na udział dwusacharydo ( $^{14}\text{C}$ -pentapeptyd)- $\text{P}$ - $^{32}\text{P}$ -fosfolipidu w syntezie peptydoglikanu ściany i uwalnianie nieorganicznego fosforanu w bezkomórkowych układach enzymatycznych *M. lysodeikticus* według Siewerta i Stromingera (51).

Siewert i Strominger (51) stosując podwójnie znakowany dwusacharydo( $^{14}\text{C}$ -pentapeptyd)- $\text{P}$ - $^{32}\text{P}$ -fosfolipid jako substrat i układ enzy-

matyczny z *Micrococcus lysodeikticus* lub *Staphylococcus aureus* stwierdzili w obecności bacytracyny nagromadzenie P-<sup>32</sup>P-fosfolipidu, przy jednoczesnym zahamowaniu uwalniania <sup>32</sup>P<sub>i</sub> (rysunek 3). Jednocześnie wykazano, że wankomycyna, rystocetyny i penicylina nie wpływały na reakcję defosforylacji P-<sup>32</sup>P-fosfolipidu (tablica 2).

Tablica 2

Hydroliza P-<sup>32</sup>P-fosfolipidu przez frakcję enzymatyczną *M. lysodeikticus* w obecności różnych antybiotyków

Dodany antybiotyk	μg/ml	Ilość uwolnionego <sup>32</sup> P Cpm
Bez enzymu		44
Enzym bez antybiotyku		1040
Bacytracyna	153	361
Penicylina G	40	1030
Rystocetyna A	40	1075
Wankomycyna	40	1001

Bacytracyna hamuje również defosforylację P-<sup>32</sup>P-fosfolipidu katalizowaną przez fosfatazę alkaliczną *Escherichia coli* i tkanek zwierzęcych. Pozostaje niewyjaśnione czy antybiotyk reaguje z fosfolipidowym substratem czy też z fosfatazą (51).

### III. Penicylina inhibitorem „sieciowania” ściany

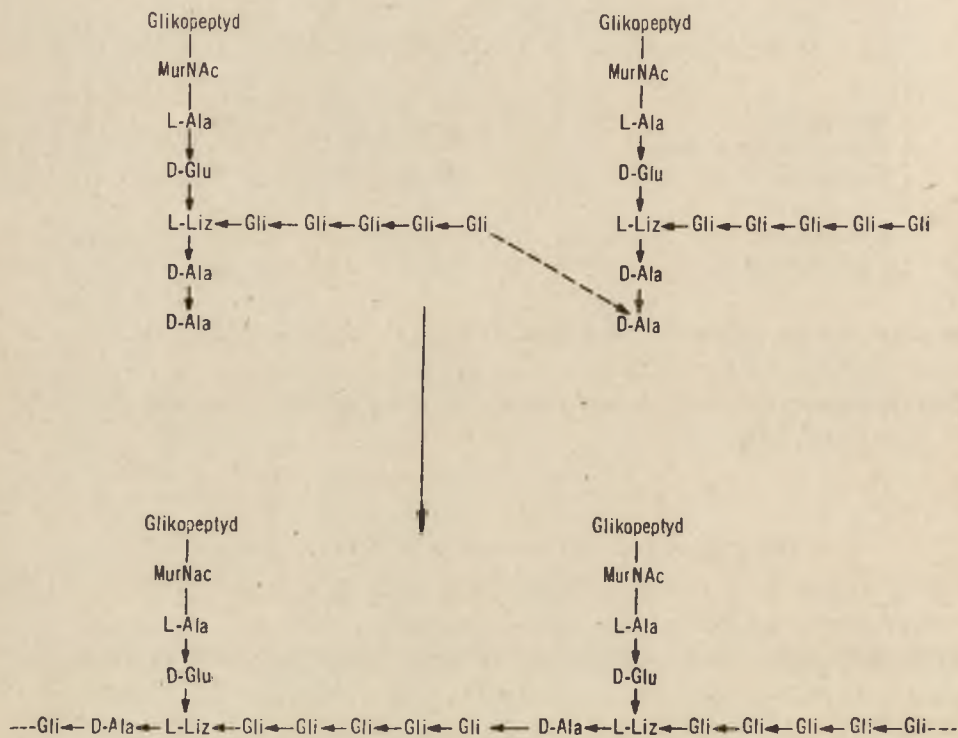
Końcowy etap biosyntezy ściany, polegający na „usieciowaniu” liniowych łańcuchów mukopeptydu przez utworzenie krzyżowych mostków peptydowych, zachodzi bez udziału ATP, jako źródła energii, na zewnątrz membrany cytoplazmatycznej stanowiącej barierę przepuszczalności komórki.

U wszystkich badanych bakterii mostki peptydowe powstają przez połączenie grupy aminowej peptydu jednego łańcucha z przedostatnią częsteczką alaniny w łańcuchu peptydowym. Powstanie nowego wiązania jest możliwe dzięki energii wiązania peptydowego końcowej cząsteczki D-alaniny. Jest to etap syntezy ściany komórkowej hamowany przez penicyliny, w tej liczbie penicyliny syntetyczne: penicylinę V, metycylinę, oksacylinę i ampicylinę, oraz przez cefalosporyny. Mechanizm działania penicyliny został szczegółowo omówiony w odrębnym artykule w *Postęпах Biochemii* (64).

Tipper i Strominger (61) wykazali, że w komórkach *Staphylococcus aureus* występuje 93% peptydoglikanu usieciowanego i tylko 7% nieusieciowanego, który oddzielono metodą sączenia na żelu *Sephadex*.

Pod wpływem penicyliny ilość peptydoglikanu nieusieciowanego zawierającego dodatkową resztę D-alaniny znacznie zwiększała się.

Przeprowadzenie reakcji usieciowania, opartej na transpeptydacji, w układach bezkomórkowych *Staphylococcus aureus* i *Micrococcus lysodeikticus* nie powiodło się, jakkolwiek z tych drobnoustrojów udało się wyodrębnić pośrednie związki oligomeryczne złożone z kilku a nawet z dziesięciu podjednostek (57, 61). Przebieg reakcji transpeptydacji u *S. aureus* przedstawiono na schemacie 4.



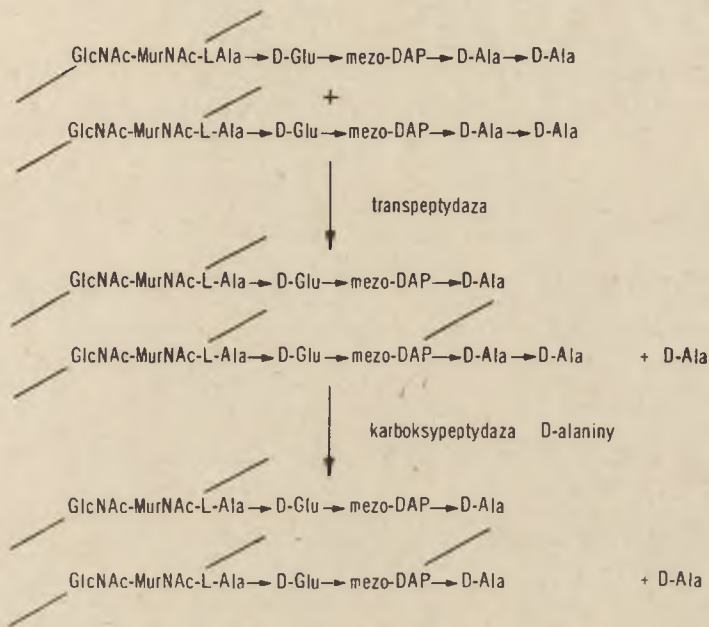
**Schemat 4.** „Sieciovanie” peptydoglikanu w biosyntezie ściany *S. aureus* według Stromingera i wsp. (57); → strzałki wskazują kierunek od końca łańcucha peptydowego z grupą  $-\text{COOH}$  do końca łańcucha z grupą  $-\text{NH}_2$

Stwierdzono, że penicyliny w niskich stężeniach ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) powodowały u *S. aureus* nagromadzenie się niepowiązanych krzyżowo jednostek peptydoglikanowych z końcową D-alaniną w łańcuchu peptydowym. W tych warunkach komórki ulegają szybkiej lizie i giną (17, 63). Charakterystyczne przy tym, że wobec wysokich stężeń penicyliny ( $100 \mu\text{g/ml}$ ), przy całkowitym zahamowaniu syntezy krzyżowych wiązań peptydowych, komórki pozbawione ściany żyły dłużej (63).

Syntezę usieciowanego peptydoglikanu u drobnoustrojów Gramujemnych badano w układach bezkomórkowych *E. coli* (17). Powstanie wiązań



krzyżowych pomiędzy liniowymi łańcuchami peptydoglikanu zachodzi analogicznie jak u *S. aureus*, z wydzieleniem końcowej cząsteczki D-alaniny pentapeptydu. W kolejnej reakcji z udziałem karboksypeptydazy D-alaninowej, zostaje usunięta reszta D-alaniny z końca sąsiedniego łańcucha peptydoglikanu, co warunkuje powstawanie u *E. coli* wyłącznie dimerów (18). Powstawanie dimerów peptydoglikanowych u *E. coli* przedstawia schemat 5. Obydwie reakcje wrażliwe są na działanie penicyliny, przy czym karboksypeptydaza D-alaninowa hamowana jest *in vitro* w stężeniach niższych niż stężenia hamujące wzrost *E. coli* (17, 18, 19).



**Schemat 5.** Powstawanie dimerów peptydoglikanu w układach bezkomórkowych *E. coli* według Stromingera i wsp. (57)

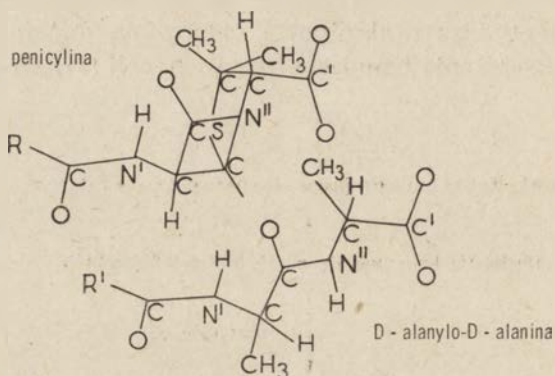
Ze szczepu *E. coli* wyodrębniono drugi enzym, karboksypeptydazę D-alaninową II. Enzym ten, niewrażliwy na działanie penicyliny, odłącza ostatnią resztę D-alaniny w dimerze peptydoglikanu, czyli przedostatnią w pentapeptydowym fragmencie prekursora UDP-muramylopentapeptydu (19).

Wyniki ostatnich badań Stromingera (55), referowane na Międzynarodowym Zjeździe IUPAC w Rydze w 1970 roku, wskazują na identyczność transpeptydazy i karboksypeptydazy I.

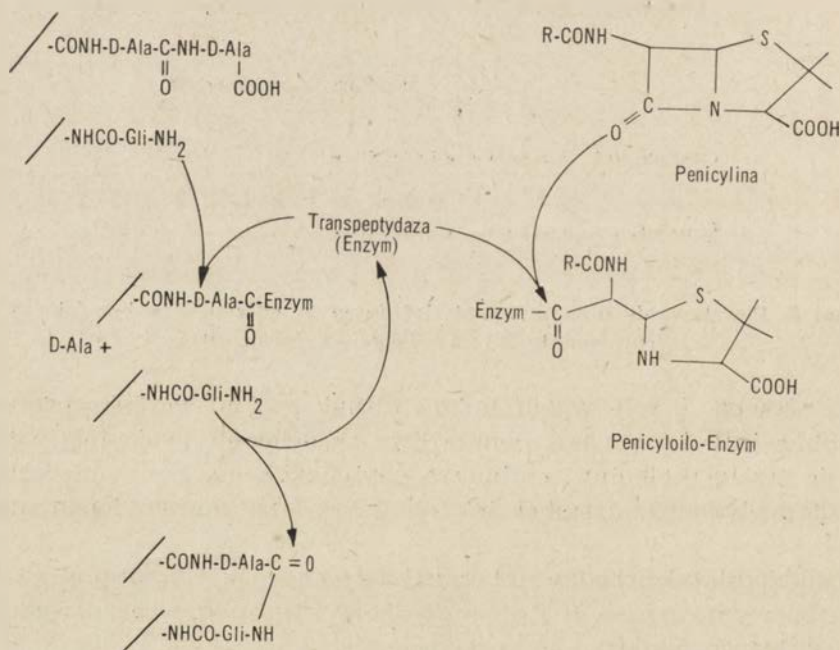
Istnieje duże podobieństwo budowy przestrzennej penicyliny i dwupeptydu D-alanylo-D-alaniny (62). Wiązanie  $-\text{CO}-\text{N}<$  w pierścieniu  $\beta$ -laktamowym penicyliny i  $-\text{CO}-\text{N}<$  w dwupeptydzie leżą dokładnie w tej samej pozycji (rysunek 4). Prawdopodobnie penicylina reaguje z enzymem

tworząc połączenie — penicyloilo-enzym o analogicznym układzie strukturalnym jak D-alanylo-D-alanina (61, 62).

Mechanizm reakcji transpeptydacji przedstawiony na schemacie 6 wskazuje na acylowanie transpeptydazy w jej miejscu aktywnym poprzez  $\beta$ -laktamowy pierścień penicyliny.



Rys. 4. Modele przestrzenne penicyliny i D-alanylo-D-alaniny



Glikopeptyd połączony wiązaniami krzyżowymi

Schemat 6. Mechanizm hamowania transpeptydazy przez penicylinę według Tippera i Stromingera (61)

Różnice w stopniu wrażliwości bakterii Gramdodatnich i Gramujemnych na działanie penicylin i innych antybiotyków spowodowane są różną budową ściany (49).

W tablicy 3 przedstawiono działanie antybiotyków na wzrost bakterii i przebieg reakcji syntezy peptydoglikanu w układach bezkomórkowych *E. coli*. Obserwowane różnice wypływają z małej zdolności penetracyjnej niektórych antybiotyków poprzez ścianę *E. coli*, przy jednoczesnej dużej wrażliwości układów bezkomórkowych tego drobnoustroju (11).

Tablica 3

Porównanie wrażliwości komórek *Escherichia coli* i bezkomórkowych układów enzymatycznych na działanie antybiotyków

Antybiotyk	Stężenie hamujące w 50% ( $I_{50}$ ) $\mu$ g/ml			
	Wzrost	Syntetaza peptydoglikanu	Transpeptydaza	Karboksypeptydaza D-alaniny
Ampicylina	3	—	3	0,04
Penicylina G	30	—	3	0,02
Cefalotyna	50	—	50	1
Metacylina	1000	—	1000	1
Rystocetyna	1000	3	—	—
Wankomycyna	100	10	—	—
Bacytracyna	1000	40	—	—

Przedstawione wyniki badań wskazują jednoznacznie na rolę jaką spełniają antybiotyki w poznaniu reakcji składających się na proces biosyntezy ściany komórkowej bakterii.

## LITERATURA

1. Anderson J. S., Matsushashi M., Haskin M. A., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 881 (1965).
2. Anderson J. S., Meadow P. M., Haskin M. A., Strominger J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 487 (1966).
3. Anderson J. S., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 516 (1966).
4. Best K. G., Grastie M. K., McConnell R. D., *J. Bacteriol.* **102**, 476 (1970).
5. Bumsted R. M., Dahl J. L., Soll D., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 779 (1968).
6. Chatterjee A. N., Park J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **9** (1964).
7. Chatterjee A. N., Perkins H. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 489 (1966).
8. Dietrich C. P., Matsushashi M., Katz W., Siewert G., Thomas P.,

- Anderson J. S., *Federation Proc.* **25**, 588 (1966).
9. Garrett A. J., *Biochem. J.* **115**, 419 (1969).
10. Ghuysen J. M., Leyh-Bouille M., Bonaly R., Nieto M., Perkins H. R., Schleifer K. H., Kandler O., *Biochemistry* **9**, 2955 (1970).
11. Ghuysen J. M., Strominger J. L., Tipper D. J., w *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier Pub. Co., Amsterdam, Londyn-New York 1968, t. 26A, str. 53.
12. Grundy W. E., Sinclair A. C., Theriault R. J., Goldstein A. M., Rickler C. J., Warren H. B., Oliver T. J. Jr., Sylvester J. C., *Antibiotics Ann.* **1956/57**, 687 (1957).
13. Hagemann G. L., Penasse L., Teillon J., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 240 (1955).
14. Harris D. A., Ruger M., Reagan M. A., Wolf F. J., Peck R. L., Wallick H., Woodruff H. B., *Antibiot. Chemotherapy* **5**, 183 (1955).
15. Ito E., Saito M., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 237 (1963).
16. Ito E., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2689 (1962).
17. Izaki K., Matsushashi M., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 656 (1966).
18. Izaki K., Matsushashi M., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3180 (1968).
19. Izaki K., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3193 (1968).
20. Jordan D. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 167 (1961).
21. Jordan D. C., Inniss W., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1961/62*, 218 (1962).
22. Jordan D. C., Mallory H. D. C., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1964/65*, 489 (1965).
23. Jordan D. C., Reynolds P. E., *Antibiotics*, red. D. Gottlieb. P. Shaw Springer Verlag, 1967, t. I, str. 102.
24. Lederberg J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **42**, 574 (1956).
25. Leyh-Bouille M., Ghuysen J. M., Nieto M., Perkins H. R., Shleifer K. H., Kandler O., *Biochemistry* **9**, 2971 (1970).
26. Lynch J. L., Neuhaus F. C., *J. Bacteriol.* **91**, 449 (1966).
27. Matsushashi M., Dietrich C. P., Gilbert J. M., *Federation Proc.* **24**, 607 (1965).
28. Matsushashi M., Dietrich C. P., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 587 (1965).
29. Meadow P. M., Anderson J. S., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 382 (1964).
30. Neuhaus F. C., *J. Biol. Chem.* **237**, 778 (1962).
31. Neuhaus F. C., *J. Biol. Chem.* **237**, 3128 (1962).
32. Neuhaus F. C., Lynch J. L., *Biochemistry* **3**, 471 (1964).
33. Neuhaus F. C., Struve W. G., *Biochemistry* **4**, 120 (1965).
34. Niyomporn B., Dahl J. L., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 773 (1968).
35. Park J. T., *J. Biol. Chem.* **194**, 885 (1952).
36. Park J. T., *J. Biol. Chem.* **194**, 897 (1952).
37. Park J. T., Johnson M., *J. Biol. Chem.* **179**, 585 (1949).
38. Park J. T., Strominger J. L., *Science* **125**, 99 (1957).
39. Perkins H. R., *Biochem. J.* **111**, 195 (1969).
40. Petit J. F., Strominger J. L., Soll D., *J. Biol. Chem.* **243**, 757 (1968).
41. Pittenger R. C., Brigham R. B., *Antibiot. Chemotherapia* **6**, 642 (1956).
42. Regna P. P., w *Antibiotics, Their chemistry and nonmedical uses*, D. van

Nostrand Co., Inc, New York 1959, str. 58.

43. Reitz R. H., Slade H. D., Neuhaus J. L., *Federation Proc.* **25**, 344 (1966).
44. Reynolds P. E., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 403 (1961).
45. Reynolds P. E., *J. Gen. Microbiol.* **35**, 5 (1964).
46. Roberts W. S. L., Petit J. F., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 768 (1968).
47. Reynolds P. E., *J. Gen. Microbiol.* **35**, 5 (1964).
48. Roberts W. S. L., Strominger J. L., Soll D., *J. Biol. Chem.* **243**, 749 (1968).
49. Rogers H. J., Perkins H. R., Cell Walls and Membranes, E. and F. N. Spon Ltd, Londyn 1968, str. 206.
50. Rose U., Strominger J. L., *J. Mol. Pharmacol.* **92**, 2 (1966).
51. Siewert G., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 767 (1967).
52. Siewert G., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 783 (1968).
53. Strominger J. L., The Bacteria, red. Gunsalus I. C. i Stanier R. Y., Acad. Press, New York 1962, tom III.
54. Strominger J. L., *Federation Proc.* **21**, 134 (1962).
55. Strominger J. L., 7<sup>th</sup> International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Riga 1970, wykład
56. Strominger J. L., Ito E., Threnn R. H., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 998 (1960).
57. Strominger J. L., Izaki K., Matsushashi M., Tipper D. J., *Federation Proc.* **26**, 9 (1967).
58. Strominger J. L., Threnn R. H., Scott S. S., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3803 (1959).
59. Struve W. G., Neuhaus F. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 6 (1965).
60. Struve W. G., Sinha R. K., Neuhaus F. C., *Biochemistry* **5**, 82 (1966).
61. Tipper D. J., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1133 (1965).
62. Tipper D. J., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 48 (1966).
63. Tipper D. J., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3169 (1968).
64. Tynecka Z., *Post. Biochem.* **16**, 153 (1970).
65. Wallas C. H., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 2264 (1963).
66. Wood W. A., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **190**, 403 (1951).



STANISŁAW SZMIGIELSKI \*

## Biochemia aktywnego transportu jonów sodu i potasu

### Biochemistry of Active Transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Ions

Active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across cell Membranes is reviewed.

Skład jonowy cytoplazmy komórki różni się zasadniczo od składu płynu okołokomórkowego. Wnętrze komórki zawiera jony potasu i aniony organiczne w wysokich stężeniach, jest natomiast ubogie w sód i chlorki. Płyn okołokomórkowy charakteryzuje się odmiennym składem — wysokim stężeniem sodu i niskim potasu. Naruszenie tych stosunków jonowych między komórką i płynem okołokomórkowym prowadzi w krótkim czasie do głębokich zaburzeń metabolicznych, początkowo odwracalnych, później kończących się śmiercią komórki. Przyczyny występowania tak dużych różnic w składzie jonowym komórki i płynu okołokomórkowego nie są dokładnie znane; przypuszcza się, że gradienty jonowe odgrywają podstawową rolę w przewodnictwie nerwowym i elektrycznym oraz że szereg enzymów we wnętrzu komórki potrzebuje potasu jako kofaktora (21).

Stwierdzenie odmiennego składu jonowego komórki i płynu okołokomórkowego zwróciło uwagę badaczy na błonę komórkową, jako twór umożliwiający występowanie tych różnic i regulujący prawdopodobnie przemianę jonową komórki. Badania przy użyciu radioaktywnych znaczników wykazały, że błona komórkowa jest przepuszczalna dla małych jonów, jednak w różnym stopniu (3). Przenikanie jonów sodu i potasu przez błonę komórkową wbrew gradientowi ich stężeń nasunęło już stosunkowo wcześniej hipotezę istnienia jakiegoś aktywnego systemu transportu jonów w błonie komórkowej. Większość błon komórkowych jest spolaryzowana — wewnątrz komórki ma ładunek ujemny w porównaniu z płynem okołokomórkowym. Przy odpowiednio wysokiej różnicy potencjałów mogłoby to tłumaczyć bierne wnikanie jonów potasu do wnętrza komórki, wbrew ich stężeniu. Jednakże założenie ruchów jonów związane z różnicą ładunków we wnętrzu komórki nie tłumaczy zupełnie przenikania jonów sodu z komórki do płynu okołokomórkowego. Dla tych celów niezbędne jest istnienie jakiegoś mechanizmu czynnego transportu sodu z komórki do płynu

\* Dr, Wojskowy Instytut Medycyny Lotniczej, Warszawa

okołokomórkowego, tzw. pompy sodowej, wymagającej do swej pracy dostarczenia energii.

Większość doświadczeń dążących do ustalenia natury pompy sodowej była przeprowadzona na olbrzymich komórkach nerwowych krabów. Komórki te z powodu ich wielkości są idealnym modelem do badania transportu jonów. Długość kilku centymetrów i szerokość do 1 mm umożliwia przeprowadzenie badań przy użyciu technik mikrochirurgii na pojedynczych włóknach nerwowych, do których wprowadza się radioaktywny  $^{22}\text{Na}$  (8). Badania z użyciem radioaktywnego izotopu sodu wykazały ścisłą zależność między transportem jonów przez błonę komórkową a metabolizmem energetycznym komórki. Zablockowanie oddychania tlenowego komórki przez cyjanki powoduje zatrzymanie  $^{22}\text{Na}$  we wnętrzu komórki, przy czym stopień zahamowania przenikania sodu przez błonę komórkową jest proporcjonalny do ilości wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych ATP (8). Usunięcie trucizny oddechowej pozwala na resyntezę wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych i powoduje wydalenie  $^{22}\text{Na}$  z wnętrza komórki. Wprowadzenie ATP do wnętrza zatrutych komórek (ale nie do płynu okołokomórkowego) powoduje krótkotrwały wzrost przenikania  $^{22}\text{Na}$  z wnętrza komórki do płynu okołokomórkowego, zależny od ilości wprowadzonego ATP (8).

Wszystkie te doświadczenia sugerowały niewątpliwy udział wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych ATP w aktywnym transporcie jonów sodu z wnętrza komórki do płynu okołokomórkowego. Analogiczne wyniki uzyskano przy obserwacji transportu sodu przez błonę krwinek czerwonych (tzw. cieni komórkowych, poddanych działaniu niewielkiego stopnia hipotonii) oraz w skrawkach nerek i mózgu (3). Przedstawione powyżej doświadczenia stanowiły fundament badań nad aktywnym transportem jonów sodu i potasu. Wykazano stosunkowo wcześniej współzależność przenikania tych dwu jonów przez błonę komórkową (15) — usunięcie potasu z płynu okołokomórkowego zmniejsza wydalenie sodu z komórek, a zwiększenie stężenia potasu w płynie okołokomórkowym nasila przenikanie sodu przez błonę komórkową. Analiza kinetyki przenikania sodu i potasu przez błonę komórki w warunkach różnych stężeń tych jonów w płynie okołokomórkowym doprowadziła do wniosku (3), że jony potasu aktywują pompę sodową, a całość ma charakter reakcji enzymatycznej. Dalszym krokiem w zrozumieniu mechanizmu aktywnego transportu sodu i potasu przez błonę komórkową była obserwacja Schatzmana (35), że glikozydy nasercowe, a przede wszystkim digitalis i strofantyna, są silnymi inhibitorami pompy sodowej. Zjawisko hamującego wpływu glikozydów nasercowych na pompę sodową obserwowano we wszystkich badanych komórkach i tkankach, jednak wrażliwość ich wahała się w dość znacznych granicach. W dalszych badaniach (8, 17) stwierdzono, że glikozydy nasercowe działają tylko wtedy, gdy znajdują się w płynie okołokomórkowym. Wprowadzenie nawet dużych ilości ouabainy (strofantyny G)



do wnętrza włókna nerwowego kraba pozostawało bez wpływu na aktywny transport sodu i potasu. Wyciągnięto stąd wniosek, że miejsca działania blokującego glikozydów nasercowych znajdują się na powierzchni błony komórkowej.

Wykazanie zależności transportu sodu od wiązań wysokoenergetycznych ATP oraz od zawartości potasu w płynie okołokomórkowym i możliwość blokowania pompy sodowo-potasowej przez glikozydy nasercowe pozwoliły na opracowanie hipotetycznych modeli aktywnego transportu jonów sodu i potasu. Podstawą modelu jest opisany w roku 1957 przez Skou (38) układ enzymatyczny adenozyntrójfosfatazy aktywowanej przez sód i potas (Na-K-ATPazy). W swej oryginalnej pracy Skou (38) wyizolował z błony komórkowej nerwu kraba frakcję, która w obecności jonów magnezu miała zdolność hydrolizowania ATP. Stopień hydrolizy był zależny od stężenia jonów sodu i potasu oraz był hamowany przez ouabainę. Na tej podstawie powyższy układ enzymatyczny związane z aktywnym transportem jonów sodu i potasu przez błonę komórki. Dalsze prace (por. 21, 26, 42) potwierdziły te obserwacje i pozwoliły na scharakteryzowanie i częściowo zlokalizowanie układu enzymatycznego Na-K-ATPazy w komórce.

### 1. Występowanie i charakterystyka Na-K-ATPazy

Dla określenia aktywności układu Na-K-ATPazy najlepiej posługiwać się mikrometodą Skou (38) — zmodyfikowaną przez Bontinga (4) (tablica 1). Zasadą metody jest określenie ilości fosforanu nieorganicznego uzyskanego przez rozszczepienie ATP pod wpływem enzymu zawartego w roztworze liofilizowanego homogenatu tkanek lub narządów. Reakcję enzymatyczną przeprowadza się w 5 kontrolowanych warunkach (optymalne stężenia  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , bez  $\text{Na}^+$ , bez  $\text{K}^+$ , z dodatkiem ouabainy ( $10^{-5}\text{M}$ ) oraz bez ATP). We wszystkich próbkach znajdują się jony magnezu, jako aktywator ATPazy. Aktywność układu Na-K-ATPazy oblicza się jako różnicę między aktywnością wszystkich ATPaz (próbka I) i aktywnością Mg-ATPazy (średnia próbek II, III i IV).

Przy zastosowaniu powyższej metody stwierdzono aktywność układu Na-K-ATPazy prawie we wszystkich badanych tkankach (4). Najwyższe aktywności stwierdzano w mózgu (szczególnie w substancji szarej), siatkówce oka, rdzeniu nerek oraz w mięśniach. Na-K-ATPaza hydrolizuje ATP do ADP i fosforanu nieorganicznego. Do swego działania wymaga, oprócz jonów  $\text{Mg}^{2+}$ , określonych stężeń jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  (38). Obecność tylko sodu lub tylko potasu nie wystarcza do działania układu. Przy obecności w roztworze jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  potas może być zastąpiony przez jony  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , lub  $\text{Li}^+$  (uszeregowane w kolejności ich efektywności)

Tablica 1

## Zasady określania aktywności układu Na-K-ATPazy

1. Tkanki liofilizowane i homogenizowane w  $H_2O$ .
2. Płyny inkubacyjne:

	A* (I)	B* (II)	C* (III)	D* (IV)	E* (V)
ATP	2	2	2	2	—
Mg <sup>2+</sup>	1	1	1	1	1
Na <sup>+</sup>	58	58	—	58	58
K <sup>+</sup>	5	—	5	5	5
CN <sup>-</sup>	10	10	10	10	10
EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tris pH 7,5 (92mM)	+	+	+	+	+
Ouabaina (10 <sup>-4</sup> M)	—	—	—	+	—

3. Inkubacja 1 godzina w temp. 37°C
4. Określenie fosforu nieorganicznego
5. Całkowita aktywność ATPaz — płyn inkubacyjny A (I)  
Mg-ATPaza — średnia aktywność płynów B, C i D (II, III i IV)  
Aktywność Na-K-ATPazy = Całkowita aktywność ATPaz — aktywność Mg-ATPazy.

\*wartości liczbowe w tabelicy podane w mM

(4, 38). Zwiększanie stężenia potasu w roztworze (przy niezmiennym stężeniu jonów Mg<sup>2+</sup> i Na<sup>+</sup>) powoduje początkowo wzrost aktywności układu, aż do osiągnięcia wartości maksymalnych, po czym aktywność spada do 0. Sód w roztworze inkubacyjnym nie może być zastąpiony przez inny kation (42).

Z analizy kinetycznej wpływu sodu i potasu na aktywność układu Na-K-ATPazy wynikałoby, że enzym ten ma dwa centra aktywne dla kationów — jedno dla sodu (z powinowactwem dla Na<sup>+</sup> 6—8 razy większym niż dla K<sup>+</sup>) oraz drugie dla potasu (39). Dalsze badania wykazały, że układ Na-K-ATPazy w żywych komórkach wymaga dla swej optymalnej aktywności obecności sodu we wnętrzu komórki i potasu na zewnątrz (2, 16, 45).

Substratem dla układu Na-K-ATPazy jest ATP. Przy zastąpieniu go przez ITP, GTP lub UTP (23) układ wykazuje jedynie śladową aktywność. Badania z użyciem <sup>32</sup>P-ATP sugerują, że rozkład ATP przez układ Na-K-ATPazy przebiega dwustopniowo (38) — pierwszym stopniem jest przeniesienie wysokoenergetycznych wiązań fosforowych na związek pośredni (reakcja ta wymaga obecności Mg<sup>2+</sup> i Na<sup>+</sup>), drugim stopniem — defosforylacja wymagająca obecności K<sup>+</sup>. Dwustopniowość reakcji enzymatycznej

nej rozkładu ATP przez Na-K-ATPazę skomplikowała nieco model pompy sodowej, do której działania potrzeba nie jednego a kilku układów enzymatycznych.

We wszystkich badanych tkankach charakterystyka układu enzymatycznego była podobna, stwierdzono jednak pewne różnice w optimum  $\text{pH}$  oraz optymalnych stężeniach jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Optimum  $\text{pH}$  waha się w granicach 7,2 dla nerwu kraba do 7,6 dla tkanek ssaków, stężenie  $\text{Na}^+$  od 1,4mM/l dla nerwu kraba do 0,6mM/l dla nerek i 0,4mM/l dla mózgu ssaków (42). Różnice te mogą zdaniem Aldridge (1) wynikać nie tyle z różnic w budowie chemicznej układu enzymatycznego, co z różnicy zawartości  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  w strukturach podkomórkowych, zawierających Na-K-ATPazę.

Układ Na-K-ATPazy charakteryzuje się dużą wrażliwością na działanie glikozydów nasercowych i wapnia (38, 42). Najważniejsze z inhibitorów tego układu przedstawiono w tablicy 2. Pozwalają one na różnicowanie poszczególnych rodzajów ATPaz występujących w komórkach.

Tablica 2

Najważniejsze inhibitory ATPaz

	Układ Na-K-ATPazy	Mg-ATPaza
Ouabaina	+++	-
Scillaren	+++	-
Związki blokujące grupy-SH	++	+++
Jony $\text{Ca}^{2+}$	+++	+
Mocznik	++	++
N-etylomalcinian	++	+
Dwuetylofluorofosforan(DFP)	+	-
Azydki	-	+++
Bilirubina	-	++
Guanidyna	-	+++
Atebryna	++	+
Oligomycyna	+	+

Zastosowanie inhibitorów układu Na-K-ATPazy pozwala również na różnicowanie aktywnego i biernego transportu sodu i potasu przez błonę komórki. Wrażliwość na ouabainę jest różna dla różnych gatunków zwierząt i dla różnych tkanek. Przeciętnie stężenia powodujące zahamowanie aktywności układu Na-K-ATPazy w 50% wahają się w granicach  $10^{-7}$  M (dla krwinek czerwonych) do  $10^{-8}$  M (dla mózgu). Poza ouabainą również szereg innych glikozydów nasercowych (digoxin, scillaren, emicymarin i inne) są inhibitorami aktywnego transportu jonów przez błonę komórki. Cechą charakterystyczną glikozydów hamujących układ Na-K-ATPazy jest nienasycony pierścień laktonowy w konfiguracji  $\beta$  przy węglu  $\text{C}_{17}$  pierścienia cyklopentanofenantrenu. Zmiana konfiguracji przestrzennej przy węglu

C<sub>17</sub> lub nasycenie pierścienia laktonowego prowadzi do częściowej lub całkowitej utraty właściwości blokowania aktywnego transportu sodu i potasu przez błonę komórki (17). Zahamowanie układu Na-K-ATPazy przez ouabainę w niskich stężeniach może być zniesione przez zwiększenie stężenia potasu w płynie okołokomórkowym. Sugeruje to, że blokowanie układu Na-K-ATPazy przez glikozydy nasercowe odbywa się na drodze zablokowania centrum aktywnego enzymu dla potasu (na zewnątrz komórki).

Inkubacja frakcji podkomórkowych, wykazujących aktywność układu Na-K-ATPazy, z fosfolipazą A (33), lub fosfolipazą C (36) powoduje wyraźne osłabienie wpływu sodu i potasu na aktywność układu enzymatycznego. Podobny efekt obserwuje się po inkubacji z lizolecytyną (41), nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (40) i niektórymi detergentami. We wszystkich tych przypadkach aktywność ATPazy zależnych od jonów Mg<sup>2+</sup> pozostaje niezmienną lub jest tylko nieznacznie obniżona. Wyniki tych obserwacji nasuwają dwojakie przypuszczenie: że lipidy są niezbędne dla stymulacji układu enzymatycznego przez sód i potas lub, że dla aktywnego transportu sodu i potasu przez błonę komórki niezbędne jest zachowanie struktur lipoproteidowych w błonie (42). Udział struktur lipoproteidowych w aktywnym transporcie sodu i potasu przez błonę komórki przemawia za tym, że Na-K-ATPaza nie jest jednym enzymem, jak to początkowo przypuszczano (38, 39), ale układem co najmniej kilku enzymów (42); stąd proponowana nazwa: układ Na-K-ATPazy, stosowana obecnie powszechnie w literaturze anglosaskiej. Układ ten ma zabezpieczać i przeprowadzać aktywny transport sodu i potasu, natomiast wiele niejasności budzi jeszcze sama ATPaza. Enzymu tego nie udało się do chwili obecnej otrzymać w stanie czystym i w dalszym ciągu istnieją w literaturze kontrowersje, jaka jest jego natura. Niektórzy autorzy przypuszczają, że w komórce istnieje tylko jedna ATPaza, aktywowana zarówno przez jony Mg<sup>2+</sup>, jak i Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>, która, zależnie od potrzeb, może spełniać rolę dostarczyciela energii dla różnych układów, między innymi i dla aktywnego transportu sodu i potasu (42). Inni autorzy przychylają się do zdania, że istnieją dwa odrębne układy ATPazy (23).

## 2. Lokalizacja układu Na-K-ATPazy

Badania umiejscowienia układu Na-K-ATPazy w komórkach przeprowadzane były za pomocą frakcjonowanego wirowania oraz technik histochemicznych. Najtrudniejszym problemem jest oddzielenie aktywności układów ATPazy aktywowanych tylko przez Mg<sup>2+</sup> od układu aktywowanego przez jony Mg<sup>2+</sup> oraz Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>. Droga frakcjonowanego wirowania homogenatu tkanek nerwowych kraba można otrzymać preparaty, w których aktywność ATPazy po dodaniu jonów Mg<sup>2+</sup> jest stosunkowo niewielka.

Dodatek jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  w odpowiednich stężeniach zwiększa aktywność ATPazy 6—20 razy (38). W tkankach ssaków zastosowanie analogicznej procedury pozwala jedynie na uzyskanie preparatów, w których stosunek Na-K-ATPazy do Mg-ATPazy wynosi 1,5—3,0. Dodatek dezoksycholenu (DOC) lub EDTA do płynu, w którym przeprowadza się homogenizację, pozwala zwiększyć ten stosunek do 6—8 (40).

Układ enzymatyczny Na-K-ATPazy zlokalizowany jest we frakcjach podkomórkowych, które zgodnie z badaniami Hanzona i Toschi (19) określa się jako błony komórkowe i mikroosomy (5, 12, 16, 22, 23). Frakcja mitochondriów nie zawiera aktywności układu Na-K-ATPazy. Mikroosomy sedymentujące przy siłach grawitacyjnych 30 000—100 000 g składają się z siateczki endoplazmatycznej i fragmentów błon komórkowych (29). Do chwili obecnej nie wiadomo, w którym z tych dwu składników komórki jest zlokalizowany układ Na-K-ATPazy. Badania cytochemiczne przeprowadzone na błonach komórkowych krwinek czerwonych wykazują aktywność enzymu na wewnętrznej stronie błony komórkowej (29, 30). Metoda histochemiczna stosowana do badania aktywności układu Na-K-ATPazy nie jest jednak wolna od zastrzeżeń (6). Opiera się ona na modyfikacji klasycznej metody Wachsteina i Meisela (44) badania aktywności Mg-ATPazy. Zasadą metody jest inkubacja nieutrwalonych tkanek w buforowanym roztworze ATP i soli ołowiowych z dodatkiem aktywatorów ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ ). Produktem reakcji jest fosforan ołowiu, następnie przeprowadzany w siarczek ołowiu, który jest widoczny pod mikroskopem. Podstawowymi zastrzeżeniami w stosunku do tej metody jest stwierdzenie blokowania układu Na-K-ATPazy przez ołów w stężeniach używanych w reakcji cytochemicznej oraz nieenzymatyczny rozkład ATP przez ołów (31, 32). Wynika stąd możliwość powstawania dużej ilości nieswoistych strąków siarczku ołowiu i trudność w zróżnicowaniu aktywności Mg-ATPazy, Na-K-ATPazy i reakcji nieswoistej. W związku z tym wielu badaczy odnosi się krytycznie do cytochemicznej metody badania aktywności ATPazy, uważając że nie pozwala ona zupełnie na określenie aktywności tych enzymów.

### 3. Stechiometria aktywnego transportu jonów sodu i potasu

Dla opracowania modeli pompy sodowo-potasowej niezbędne było poznanie zależności między transportem jonów przez błonę komórkową a innymi funkcjami komórki oraz określenie ilościowe rozpadu ATP w stosunku do sodu i potasu, który przeniknął przez błonę komórki. Wiele prac poświęcono zależności między aktywnością metaboliczną tkanek (mierzoną stopniem zużycia tlenu) a transportem sodu. Rozważania te są bardzo istotne, gdyż mogą w pewnym stopniu przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu transportu jonów przez błonę komórkową. Gdyby transport sodu

przez błonę komórki opierał się na prostym mechanizmie oksydoredukcji, to maksymalna wydajność tego systemu wynosiłaby 4 jony  $\text{Na}^+$  transportowane przez błonę na 1 użytą cząsteczkę tlenu (26). Tymczasem stosunek ten określono dla naskórka żaby na 18 jonów  $\text{Na}^+$  (11), a dla nerek na 28 (27). Sugeruje to, że pompa sodowa ma niewielki związek z systemem oksydoredukcyjnym komórki. Potwierdzają to spostrzeżenia (27), że tkanki zanurzone w roztworach pozbawionych sodu i potasu nie wykazują znamienego obniżenia zużycia tlenu.

Znacznie trudniej jest badać stosunek transportu jonów sodu i potasu do zużycia ATP w całych komórkach, gdyż komórki wykazują tendencję do szybkiego wyrównywania niedoborów ATP i utrzymywania jego ilości na stałych poziomach. W komórkach stale zachodzi fosforylacja nukleotydów i nawet przy szybkim zużywaniu ATP istnieje dostatecznie dużo związków rezerwowych (np. fosfokreatyna), z których natychmiast syntetyzowane jest ATP. Dopiero po wyczerpaniu tych rezerw zaczyna się obserwować zmniejszenie ilości ATP. Dlatego badania stosunku ilości transportowanych jonów sodu i potasu do ilości rozłożonego ATP dawały przez długi czas rozbieżne wyniki (26). Początkowo określano stosunek  $\text{Na}^+/\text{ATP}$  jako 1 (20). Dopiero późniejsze badania wykazały (18, 28, 37), że na jedną rozłożoną cząsteczkę ATP przechodzą przez błonę komórkową trzy jony sodu i dwa potasu. Tłumaczy to różnice w stężeniu sodu i potasu we wnętrzu komórki i w płynie okołokomórkowym. Analogiczny stosunek: 3 jony  $\text{Na}^+$  na 1 cząsteczkę ATP stwierdzono niezależnie od stężenia sodu w płynie okołokomórkowym (37).

#### 4. Związki pośrednie w transporcie sodu i potasu

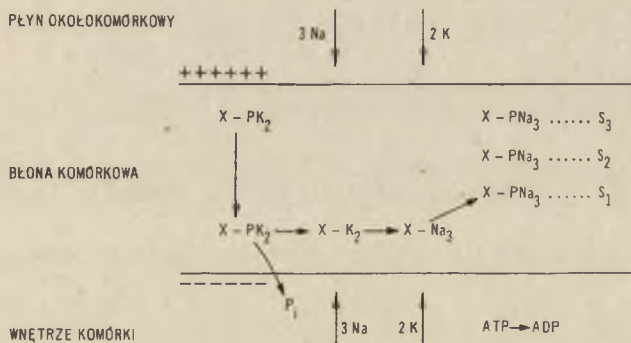
Istnienie związków pośrednich w transporcie sodu i potasu sugerowano wielokrotnie. *Lea* i *Reusch* (28) stwierdzili, że frakcja mikrosomalna nerwu kraba, posiadająca aktywność układu  $\text{Na-K-ATPazy}$  ma również zdolność katalizowania reakcji wymiany  $\text{ATP-ADP}$ . Po inkubacji tej frakcji z dodatkiem  $\text{AD}^{32}\text{P}$  radioaktywność można stwierdzić w ATP. Wymiana ta może być zmniejszona przez dodatek jonów sodu i potasu, natomiast *ouabaina* znosi wpływ tych jonów. Na tej podstawie sugeruje się, że pierwszym etapem rozkładu ATP przez układ  $\text{Na-K-ATPazy}$  jest utworzenie fosforylowanego enzymu połączonego z ADP. Dalszym potwierdzeniem tej hipotezy były wyniki doświadczeń, w których inkubowano frakcje komórkowe zawierające aktywność układu  $\text{Na-K-ATPazy}$  z radioaktywnym  $\text{AT}^{32}\text{P}$ . Badania te (9, 10, 18, 25, 34) wykazały, że po inkubacji w płynie zawierającym jedynie jony  $\text{Mg}^{2+}$  radioaktywność frakcji jest niewielka i szybko osiąga swoje maksimum. Dodatek jonów  $\text{Na}^+$  zwiększa radioaktywność frakcji i w przeciwieństwie do pierwszego układu, po osiągnięciu maksimum radioaktywności obserwuje się jej stopniowy spadek.

Sugeruje to, że w obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  radioaktywny  $^{32}\text{P}$  odszczepiony od ATP ulega początkowo związaniu z frakcją, a po pewnym czasie zostaje związany poza układem enzymatycznym. Dodatek jonów  $\text{K}^+$  do roztworu przyspiesza spadek radioaktywności frakcji. Przemawia to za hipotezą, że dla transportu sodu przez błonę komórkową niezbędna jest fosforylacja układu enzymatycznego, natomiast dla transportu potasu — jego defosforylacja.

Pomimo, że wszyscy badacze są zgodni co do konieczności istnienia związków pośrednich w transporcie sodu i potasu, nadal nieznaną jest natura tego związku. Panuje przekonanie, że są to fosfolipidy (26). Zdaniem *Hokinów* (24) w transporcie sodu i potasu bierze udział monofosfoinozytyd, inni autorzy (7, 13, 14, 43) uważają, że związkiem pośrednim jest trójfosfoinozytyd, który podlega szybkiej defosforylacji i ponownemu ufosforylowaniu.

### 5. Model pompy sodowo-potasowej w komórce

Na podstawie omówionych powyżej spostrzeżeń opracowano wiele modeli pompy sodowo-potasowej w komórce, które w miarę rozszerzania się informacji były coraz bardziej skomplikowane. Jednak do chwili obecnej model pompy sodowo-potasowej pozostaje nadal w sferze hipotez, które dostarczają jedynie wytyczonych do dalszych doświadczeń.



**Schemat 1.** Model pompy sodowo-potasowej według *Skou* (41)

x — związek transportowy (prawdopodobnie fosfolipid) S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> — poziomy energetyczne

Wszystkie modele zakładają istnienie w błonie komórkowej związku, który ma zdolność „pompowania” jonów w oparciu o energię dostarczaną z rozkładu ATP. Najbardziej rozpowszechnionym i najlepiej sumującym posiadane informacje jest model proponowany przez *Skou* (41), przedstawiony na schemacie 1.

Dla wyjaśnienia dużego powinowactwa do sodu we wnętrzu komórki i do potasu na zewnątrz komórki zakłada się, że energia układu Na-K-ATPazy jest zużywana do przemiany związku sodofilnego i połączonego

z sodem na związek o dużym powinowactwie do potasu. Zgodnie z tym modelem wymiana sodu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego następuje w wyniku naprzemiennego rozpadu i resyntezy ATP. Na zewnątrz komórki związek transportowy łączy się z potasem, przenika do wnętrza komórki i ulega defosforylacji, a w miejsce potasu wchodzi sód. W obrębie samej błony komórkowej związek transportowy z dołączonym sodem ( $X-Na_3$ ) znajduje się na różnych pośrednich poziomach energetycznych ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ). Jak już wspomniano, związek pośredni jest prawdopodobnie fosfolipidem lub grupą fosfolipidów. Model ten, podobnie jak inne, jest wysoce spekulatywny, niemniej wydaje się najlepiej podsumowywać zebrane wiadomości o aktywnym transporcie sodu i potasu. Najbliższa przyszłość pozwoli, być może, zidentyfikować związek czy związki pośrednie w transporcie sodu i potasu i określić ich naturę.

## LITERATURA

1. Aldridge W. N., *Biochem. J.* **83**, 527 (1962).
2. Baker P. F., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 287 (1963).
3. Baker P. F., *Endeavour* **25**, 166 (1966).
4. Bonting S. L., w *Water and Electrolyte Metabolism*, red. J. De Graeff B. Leijnse, Elsevier, Amsterdam 1963, str. 35.
5. Bonting S. L., Caravaggio L. L., *Nature* **194**, 1180 (1962).
6. Bosch R., *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 114 (1967).
7. Brockerhoff H., Ballou C. E., *J. Biol. Chem.* **237**, 49 (1962).
8. Caldwell P. C., Hodgkin A. L., Keynes R. D., Shaw T. J., *J. Physiol.* **152**, 561 (1960).
9. Charnock J. S., Post R. L., *Nature* **199**, 910 (1963).
10. Charnock J. S., Rosenthal A. S., Post R. L., *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **41**, 675 (1963).
11. Conway E. J., w *Methods of Isotopic Tracers Applied to the Study of Active Ion Transport*, Coursaget, Londyn 1959, str. 1.
12. Cummins J., Hyden H., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 271 (1962).
13. Dawson R. M. C., Thompson W., *Biochem. J.* **91**, 244 (1964).
14. Ellis R. B., Nawthorne J. N., *Acta Neurol. Scand.* **38**, 33 (1962).
15. Glynn I. M., *J. Physiol.* **134**, 278 (1956).
16. Glynn I. M., *J. Physiol.* **160**, 18 (1962).
17. Glynn I. M., *Pharmacol. Rev.* **16**, 381 (1964).
18. Glynn I. M., *Sci. Basis Med., Annual Rev.* **16**, 218 (1966).
19. Hanzon V., Toschi G., *Exptl. Cell Res.* **16**, 256 (1959).
20. Heald P. J., *Biochem. J.* **57**, 673 (1954).
21. Heinz E., *Annual Rev. Physiol.* **29**, 21 (1967).
22. Hoffman J. F., *Federation Proc.* **19**, 127 (1960).
23. Hoffman J. F., *Circulation* **26**, 1201 (1962).
24. Hokin L. E., Hokin M. R., *Annual Rev. Biochem.* **32**, 553 (1963).
25. Judah J. D., Ahmed K., *Nature* **194**, 382 (1962).
26. Judah J. D., Ahmed K., *Biol. Rev.* **39**, 160 (1964).
27. Lassen N. A., Munck O., Thaysen J. H., *Acta Physiol. Scand.* **51**, 371 (1961).



28. Leaw A., Reushaw A., *Biochem. J.* **65**, 82 (1957).
29. Marchesi V. T., w Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane, red. L. A. Manson, Wistar Inst. Press, Philadelphia 1968, str. 39.
30. Marchesi V. T., Palade G. E., *J. Cell Biol.* **35**, 385 (1967).
31. Moses H. L., *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 354 (1967).
32. Novikoff A. B., *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 353 (1967).
33. Portius H. J., Repke K., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **243**, 335 (1962).
34. Rodnight R., Lavin B. A., *Biochem. J.* **91**, 24 (1964).
35. Schatzmann H. J., *Helv. Physiol. Acta* **11**, 346 (1953).
36. Schatzmann H. J., *Nature* **196**, 677 (1962).
37. Seu A. K., Post R. L., *J. Bol. Chem.* **239**, 345 (1964).
38. Skou J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 394 (1957).
39. Skou J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 6 (1960).
40. Skou J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 314 (1962).
41. Skou J. C., *Progr. Biophys. Chem.* **14**, 131 (1964).
42. Skou J. C., *Physiol. Rev.* **45**, 596 (1965).
43. Thompson W., Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **91**, 233 (1964).
44. Wachstein M., Meisel E., *Am. J. Clin. Pathol.* **27**, 13 (1957).
45. Whittam R., *Biochem. J.* **84**, 110 (1962).



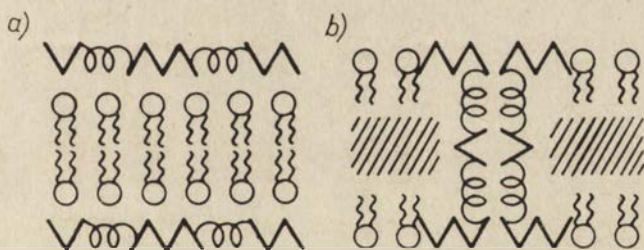
GRAŻYNA DUDEK \*

## Udział białek w transporcie przez błony komórkowe

### The Role of Proteins in Transport through the Cell Membranes

The role and properties of proteins acting as carriers in active transport through the cell membranes is described and discussed.

Błona komórkowa odgrywa aktywną rolę w wymianie substancji między wnętrzem komórki a środowiskiem. Na podstawie badań w mikroskopie elektronowym ustalono, że błony komórkowe utrwalane w roztworach metali ciężkich ( $\text{OsO}_4$ ) wykazują budowę trójwarstwową. Pierwotnie uważano, że znajdująca się w środku warstwa lipidów otoczona jest z zewnątrz i wewnątrz warstwami białka (schemat 1-a). Od 1/4 do 1/3 białek strukturalnych błony występuje w formie spiral reszta zaś w postaci nieuporządkowanych zwojów.



Schemat 1a i b. Struktura błony komórkowej wg (18)

białka w formie helixów (u) i nieuporządkowanych zwojów (w),  $\text{O}$  — polarne lipidy,  $\text{////}$  — niepolarne składniki błony (hydrofobowe reszty aminokwasów czy lipidów)

Obecnie bardziej prawdopodobny wydaje się układ mozaikowy drobin białkowych i lipidowych (schemat 1-b). Hipoteza o istnieniu pojedynczego łańcucha polipeptydowego przechodzącego poprzez błonę komórkową nie została dotychczas potwierdzona (18).

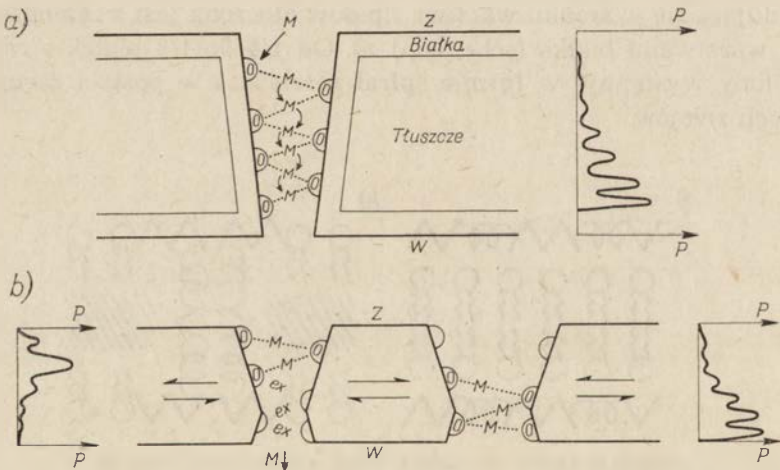
Oprócz przenikania pasywnego czyli dyfuzji przez błony komórkowe istnieje też transport aktywny wielu substancji. Przebiega on niezgodnie z prawami dyfuzji, przeciwko gradientowi stężeń i wymaga nakładu ener-

\* Mgr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, Warszawa

gii. Układy transportu aktywnego w błonach umożliwiają selektywną przepuszczalność substancji zarówno do wnętrza komórki jak i na zewnątrz.

Istnieje szereg modeli mających na celu wyjaśnienie mechanizmu transportu substancji przez błony. Ogólnie możemy je podzielić na modele zakładające istnienie porów (otworów) w błonie komórkowej i modele traktujące błonę jako nieprzerwaną, ciągłą przegrodę.

W roku 1957 B u r g e n (4) wysunął hipotezę, że w błonie komórkowej istnieją pory, przez które substancje przenikają do wnętrza komórki. W myśl tej hipotezy, za aktywny transport substancji przez pory mają być odpowiedzialne białka, posiadające prawdopodobnie własności enzymów, zlokalizowane na wewnętrznych ściankach porów i spełniające funkcję centrów wiążących. Sugerowano, że pory w błonie komórkowej mogą być stabilne, czyli niezmiennące swoich wymiarów oraz niestabilne — oscylacyjne. Na schemacie 2 przedstawiono hipotetyczne modele porów w błonie komórkowej oraz wykresy prawdopodobieństwa znalezienia się cząsteczki substratu wewnątrz porów.



**Schemat 2a i b.** Modele porów w błonie komórkowej wg (4)

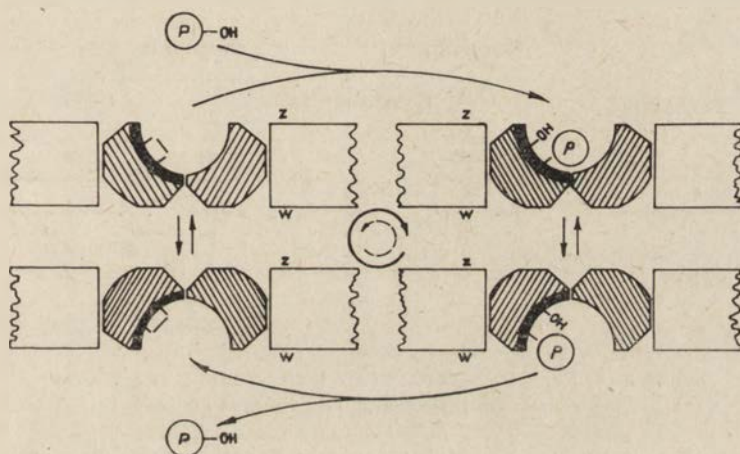
a) model poru stabilnego, b) model poru oscylacyjnego; w formie ściśniętej (po lewej) w formie rozszerzonej (po prawej)

M — cząsteczki przechodzące, O — centra wiążące w porze, Z — zewnętrzna strona błony komórkowej, W — wewnętrzna strona błony komórkowej, P — wykresy prawdopodobieństwa znalezienia się cząsteczek w porze

Wejście cząsteczki do poru stabilnego (schemat 2a) odbywa się na skutek przyciągania jej przez centra wiążące znajdujące się na ściankach poru. Odległość między centrami wiążącymi, a cząsteczką maleje w kierunku strony wewnętrznej błony i w pobliżu niej staje się optymalna dla związania danej cząsteczki. Wówczas zarówno energia wiązania cząsteczki jak i prawdopodobieństwo znalezienia się jej przy stronie wewnętrznej

blony są największe. Model poru stabilnego nie wyjaśnia przejścia substratu z poru do wnętrza komórki. Model poru oscylacyjnego (schemat 2b) tłumaczy mechanizm oderwania cząsteczki z pozycji gdzie jest ona najsilniej związana. Średnica takiego poru oscylacyjnego ulega zmianom. Kiedy por jest ściśnięty centra wiążące znajdujące się bliżej zewnętrznej strony błony komórkowej przyciągają substancje ze środowiska. Gdy por się rozszerza cząsteczki substratu są przyciągane przez centra wiążące znajdujące się bliżej wewnętrznej strony błony komórkowej i przy następnym skurczeniu się poru substrat przechodzi do wnętrza komórki w wyniku obniżenia siły wiązania.

Modele zakładające ciągłość błony przypisują zasadniczą rolę w transporcie enzymom zlokalizowanym wewnątrz lub na powierzchni błony komórkowej. Model zaproponowany przez Mitchella (21) zakłada obecność enzymu, nazwanego „translokazą”, pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią błony.



Schemat 3. Model błony komórkowej wg (21)

Zakreskowane obszary przedstawiają „translokazę” enzym wiążący błony komórkowej, który może oddziaływać alternatywnie między zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią błony  
Z — zewnętrzna strona błony komórkowej, W — wewnętrzna strona błony komórkowej

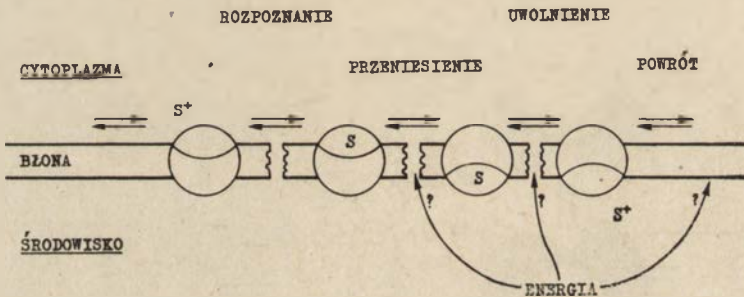
Przemieszczenie anionu ze środowiska do wnętrza komórki przebiega według Mitchella następująco (schemat 3): na zewnętrznej powierzchni błony anion zbliża się do centrum aktywnego i zostaje do niego przyłączony. Dołączenie anionu indukuje zmiany konformacyjne „translokazy” w wyniku czego anion przechodzi na stronę wewnętrzną błony. Po odłączeniu anionu od centrum aktywnego następuje powrót układu do stanu początkowego.

Model transportu enzymatycznego przedstawiony przez Crana (cyt. za 32) w 1966 roku zakłada, że zasadniczą rolę w transporcie odgrywiają enzymy powierzchniowe. Cząsteczki przenikające adsorbowane są w zewnętrz-

nej warstwie błony komórkowej. Termiczne pobudzenie składników błony doprowadza do lokalnych przewężeń błony i przerwy w jej dwucząsteczkowej warstwie lipidów, przez które to przewężenia zaadsorbowane cząsteczki przedostają się do wnętrza komórki.

Wszystkie przedstawione modele opierają się więc na istnieniu nośnika, który wiąże się z przenoszonym jonem lub cząsteczką. W ogólny sposób poszczególne fazy transportu substancji przedstawiono na schemacie 4.

Uważa się (24), że pierwszą fazą jest rozpoznanie substancji mającej ulec przeniesieniu przez jej połączenie z aktywnym miejscem drobiny spełniającej funkcję nośnika. Mechanizm tego zjawiska byłby bardzo podobny do wiązania substratu z enzymem. Następuje z kolei przeniesienie substancji przez błonę. Dalszym etapem transportu jest uwolnienie substancji przenoszonej z miejsca aktywnego i przekazanie jej do wnętrza komórki, po czym następuje powrót systemu do stanu pierwotnego. Taki selektywny transport wymaga użycia energii. Niestety do tej pory nie można określić, w której fazie jest ona dostarczana i w jaki sposób.



**Schemat 4.** Fazy transportu przez błonę komórkową wg (24)  
S — substancja przechodząca do wnętrza komórki

Jak wynika z wyżej przedstawionych danych dokładny mechanizm transportu przez błony komórkowe jest jeszcze nieustalony. Prowadzone od wielu lat badania w tej dziedzinie mają między innymi na celu znalezienie substancji, które są odpowiedzialne za właściwe rozpoznanie i przekazanie odpowiedniej cząsteczki do wnętrza komórki.

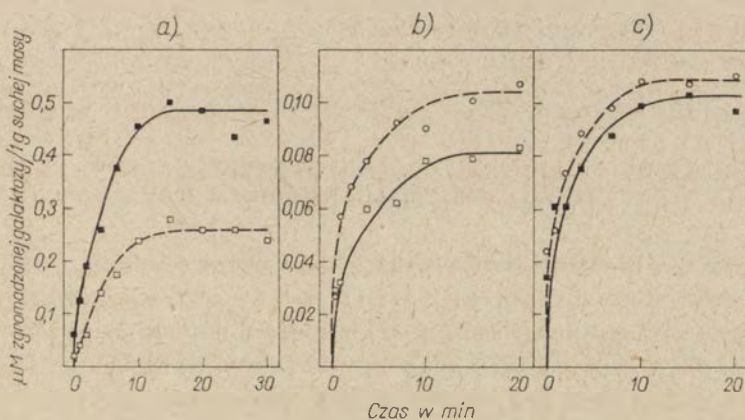
W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań, które wskazują, że transport np. aminokwasów i cukrów, może odbywać się przy udziale określonych białek nośnikowych.

### I. Identyfikacja substancji przenoszących i ich lokalizacja w komórce

W 1966 roku Piperno i Oxender (27) wykazali, że komórki *E. coli* K 12 poddane na zimno szokowi osmotycznemu tracą częściowo zdolność do włączania niektórych aminokwasów. W rok później A n r a k u

(2) badał transport  $^{14}\text{C}$  D-galaktozy u mutantów *E. coli* K 12, pozbawionych galaktokinazy i wykazał, że komórki te poddane szokowi osmotycznemu tracą około 50% zdolności do włączania i gromadzenia galaktozy (rys. 1-a).

Okazało się, że szok osmotyczny uwalnia częściowo z komórki składnik konieczny do przenoszenia galaktozy. Składnik ten przechodząc do roztworu nie zmienia swojej aktywności, gdyż inkubacja z tym roztworem komórek poddanych uprzednio szokowi przywraca im pierwotną zdolność transportu (1-b). Stwierdzono ponadto, że inkubacja komórek prawidłowych z roztworem zawierającym substancje uwalniane w wyniku szoku osmotycznego powoduje niewielkie ale istotne zwiększenie transportu galaktozy (1-c). Substancje uwalniane pod wpływem szoku rozdzielono na kolumnie z *Sephadex G-100* na dwie frakcje. Jedna z nich charakteryzowała się dużą absorpcją przy 280 nm, wysokim stosunkiem  $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$  wynoszącym 1,84 (charakterystyczne cechy białka), oraz zawierała  $^{14}\text{C}$ -galaktozę. Na podstawie tych doświadczeń wysunięto przypuszczenie, że składnikiem koniecznym do transportu D-galaktozy do komórki bakteryjnej i uwalnianym się z niej w wyniku szoku osmotycznego jest białko. Ciężar tego białka nie przekracza 70 000. Potwierdzeniem swoistej funkcji białek w systemie transportu niektórych substancji przez błony komórkowe jest hamowanie tego procesu przez inhibitory syntezy białka np. chloramfenikol (32).



Rys. 1a, b, c. Wpływ szoku osmotycznego na włączanie galaktozy do komórek *E. coli*  
 ■ — komórki kontrolne, □ — komórki poddane szokowi osmotycznemu, ○ — komórki inkubowane z roztworem, który wywołał szok osmotyczny

Przez długi czas trudności metodyczne i techniczne związane z izolacją białek przenoszących uniemożliwiały bliższe ich poznanie. Dopiero zastosowanie metody podwójnego znakowania (32) przyniosło pewien postęp. Metoda ta polega na równoczesnym badaniu dwu hodowli:

- 1) komórek bakteryjnych, które produkują wszystkie białka i mają zdolność transportu badanej substancji, oraz
- 2) ich mutantów, które utraciły zdolność transportu określonych substancji i nie tworzą odpowiednich białek przynoszących.

Do pożywek wzrostowych bakterii dodaje się ten sam znakowany aminokwas np.: fenyloalaninę, ale do hodowli pierwszej  $^{14}\text{C}$ -fenyloalaninę, natomiast do hodowli drugiej  $^3\text{H}$ -fenyloalaninę. Po wyhodowaniu kolonii, miesza się razem równe ilości komórek bakteryjnych z obu kolonii, homogenizuje i poddaje rozdziałowi frakcjonowanemu. Przy równej ilości komórek bakteryjnych, stosunek  $^{14}\text{C}$ -fenyloalaniny do  $^3\text{H}$ -fenyloalaniny będzie około jedności w większości badanych frakcji. Frakcja charakteryzująca się najwyższym stosunkiem  $^{14}\text{C}$ -fenyloalaniny do  $^3\text{H}$ -fenyloalaniny w analizowanym układzie zawiera białka przynoszące. Przy użyciu tej metody udało się uzyskać między innymi białko przynoszące  $\beta$ -galaktozyd w *E. coli* (9). Wykazano, że białka przynoszące są składnikiem błony komórkowej (8, 22) i nazwano je białkami M (membranowymi). Uważa się, że są one związane z błoną wiązaniem białkowo-lipidowym (8).

Bardzo interesujące są ostatnie badania K a b a c k a i M i l n e r a (13) nad wpływem różnych źródeł energii na włączanie proliny przez wyizolowane błony z *E. coli* ML 308—225. Autorzy ci stwierdzili, że dodanie D-mleczanu lub bursztynianu znacznie zwiększa włączanie proliny (odpowiednio 20 i 8 razy) przez błony. Jednocześnie wykazano, że przemiana D-mleczanu w pirogronian przyspiesza transport także innych aminokwasów. Dane te wskazują, że występująca w błonie D-(—) dehydrogenaza kwasu mlekowego jest ściśle związana z transportem różnych aminokwasów.

## II. Własności białek przynoszących

Badania nad białkami transportującymi są prowadzone głównie na komórkach bakteryjnych. P i p e r n o i O x e n d e r (28) wykazali, że w jednej komórce bakteryjnej (*E. coli* K 12) istnieje kilka oddzielnych systemów transportu dla poszczególnych grup aminokwasów: (a) leucyna, izoleucyna, walina, (b) alanina, glicyna, seryna, (c) fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan, (d) metionina. O istnieniu odmiennych systemów transportu w *E. coli* świadczą także badania D i e t z a i wsp. (6), którzy wykazali, że szok osmotyczny obniża w różnym stopniu włączanie poszczególnych grup substratów. Stwierdzono również, że szok osmotyczny uwalnia z komórki kilka białek przynoszących (6, 27).

Białka przynoszące wyizolowano w wielu pracowniach (3, 14, 19, 23, 26, 31, 33, 34). Były one jednorodne zarówno elektroforetycznie jak również w ultrawirówce analitycznej (3, 26, 33). Porównanie dwóch białek przynoszących różne substraty (białka przynoszącego leucynę i białka przeno-



szącego galaktozę) wykazało ich zbliżoną ruchliwość elektroforetyczną (3). W tablicy 1 przedstawiono niektóre własności białek przenoszących substancje przez błony komórkowe.

Ciężar cząsteczkowy większości tych białek wynosi około 30 000 (3, 11, 23, 25, 26, 29, 31, 33). Natomiast białko przenoszące jony  $K^+$  i  $Na^+$  otrzymane z frakcji mikrosomalnej homogenatu mózgu wołu oraz białko transportujące fosfoenolopirogronian z *E. coli* odbiegają znacznie od tej wartości (1, 20). Szczególnie interesujące są trzy różne białka transportujące L-fukozę otrzymane z *Lotus tetragonolobus* (14). Mają one wprawdzie odmienne ciężary cząsteczkowe, ale wiążą L-fukozę w ilości 1 mola na 30 000 g białka, co wskazywałoby na istnienie w cząsteczce tych białek dwóch lub czterech miejsc wiążących. Pozostałe białka przenoszące mają po jednym miejscu wiążącym substrat. Stałe dysocjacji kompleksu białko-substrat są zawarte w granicach  $10^{-6}$  do  $10^{-8}$  mola/litr. Niektóre z białek udało się otrzymać w formie krystalicznej.

W tablicy 2 przedstawiono skład aminokwasowy niektórych białek przenoszących (3, 23, 33). Białko z *Salmonella typhimurium* przenoszące jony  $SO_4^{2-}$ , białka z *Escherichia coli* przenoszące leucynę i galaktozę oraz białko z dwunastnicy kurczęcia przenoszące jony wapnia mają skład aminokwasowy podobny, ale nie identyczny. Odnaczają się one dużą zawartością kwasów asparaginowego, glutaminowego i alaniny, oraz niską zawartością metioniny, tryptofanu i histydyny. Cysteina nie występuje w większości białek przenoszących, a niektóre z nich zawierają znikome ilości tego aminokwasu (3, 14, 23, 26, 31). Są to białka kwaśne. Ich punkt izoelektryczny znajduje się poniżej pH 6 np.: punkt izoelektryczny białka przenoszącego leucynę wynosi 5,15 (26). Białka przenoszące leucynę i galaktozę są termostabilne, odporne na działanie kwasów, a wrażliwe na działanie zasad. Charakteryzują się one dużą wybiórczością w stosunku do przenoszonych substancji (3, 26).

Niektóre substancje mogą być przenoszone przez dwa lub więcej białek transportujących i tak np. arginina u *E. coli* jest przenoszona przez dwa różne białka (34), a jak już wspomniano w transporcie L-fukozy u *Lotus tetragonolobus* biorą udział aż trzy białka (14).

### III. Schematy transportu

Niedawno opracowano dwa schematy uwzględniające udział specyficznych białek przenoszących w aktywnym transporcie przez błony.

#### 1. Transport histydyny

Według Ferro-Luzzi-Ames i Lever (7) w transporcie histydyny u *Salmonella typhimurium* biorą udział trzy białka. Białko-J  $\sim 95\%$

Tablica 1

Własności białek przenoszących: K stała dysocjacji

Organizm	Substrat	Charakterystyka białek			
		Masa cząsteczkowa ( $\times 10^4$ )	Miejsce wiążące	K $\mu$ mole/litr	Forma krystaliczna
<i>Salmonella typhimurium</i> (23, 25, 31)	$\text{SO}_4^{2-}$	3,2	1	0,1; 0,02	tak
<i>Escherichia coli</i> (11, 29)	$\beta$ -Galaktozyd	3,1			
<i>Escherichia coli</i> (26)	Leucyna	3,4	1	1	tak
<i>Escherichia coli</i> (3)	Leucyna	3,6	1	2	tak
<i>Escherichia coli</i> (3)	Galaktoza	3,5	1	1	
<i>Escherichia coli</i> (1)	PEP	0,9	1	kowalencyjne	
<i>Lotus tetragonolobus</i> (14)	L-fukoza	12,0	4		
<i>Lotus tetragonolobus</i> (14)	L-fukoza	5,8	2		
<i>Lotus tetragonolobus</i> (14)	L-fukoza	11,7	4		
Dwunastnica kurczęcia (33)	$\text{Ca}^{2+}$	2,8	1	4	
Mózg wolu (20)	$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$	67,0			

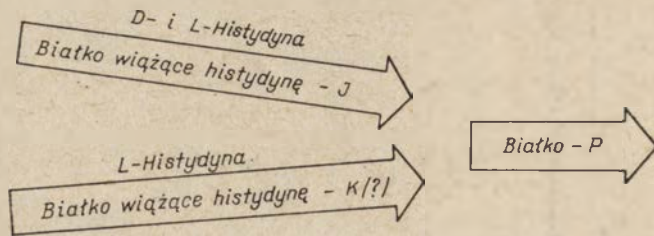
Tablica 2

Skład aminokwasowy białek przenoszących  
Mole aminokwasów/mol białka

Aminokwasy	Substrat			
	Jony a) siarczanowe (23)	Leucyna b) (3)	Galaktoza b) (3)	Jony c) wapnia (33)
Alanina	24	42	42	15,1
Kwas asparaginowy	31	38	49	28,4
Arginina	10	7	6	5,0
Cystyna	0	1	—	3,1
Kwas glutaminowy	21	36	29	31,8
Glicyna	17	33	22	14,5
Histydyna	3	4	3	3,2
Izoleucyna	16	18	15	9,4
Leucyna	16	22	24	24,3
Lizyna	20	28	30	19,8
Metionina	0	4	6	4,0
Fenylalanina	9	10	7	11,1
Prolina	9	14	9	3,0
Seryna	10	11	13	8,6
Treonina	11	16	12	8,3
Tryptofan	5	3	4	
Tyrozyna	8	12	6	8,4
Walina	19	23	29	5,6

Białka przenoszące otrzymane a) z *Salmonella typhimurium*, b) z *Escherichia coli*, c) z *D. magna* nastnicy karczęcia.

i białko-K ~ 5% są białkami wiążącymi histydynę i działają równolegle. Przenoszenie histydyny do wnętrza komórki przez te białka wymaga obecności trzeciego białka — P (schemat 5).

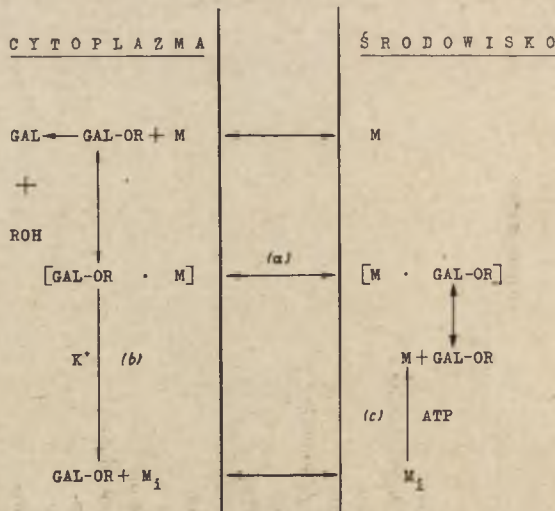


Schemat 5. Transport histydyny u *Salmonella typhimurium* wg (7)

Białko-P i J-białko wiążące histydynę są kodowane przez odpowiednie geny *his P* i *his J*, które mają określoną pozycję na mapie chromosomów. Pozycja genu *his K*, który koduje białko-K jest nieustalona.

## 2. Transport dwucukrów

Najdalej zaawansowane prace nad transportem dwucukrów przeprowadzili Fox i Kennedy ze współpracownikami. W roku 1965 przedstawili oni roboczy schemat transportu, w którym wyjaśnili rolę zlokalizowanego w błonie białka M (membranowego) w przenoszeniu  $\beta$ -galaktozydów do komórki *Escherichia coli* (9). Ciężar cząsteczkowy tego białka określili na około 30 000 (11). Wykazali również, że białko to jest kodowane przez gen



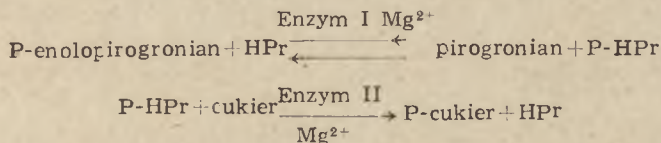
Schemat 6. Model transportu laktozy przez błonę komórkową wg (29)  
Objaśnienia w tekście

y operonu *lac* (8). Białko to ma dwa oddzielne miejsca wiążące dla różnych cukrów (5). W kilka lat później schemat ten zmodyfikowali (29). W obecnej formie pełniej odzwierciedla on ogólne własności transportu przez błony komórkowe. Powyżej przedstawiono uproszczony schemat przenoszenia laktozy w systemie transportu *Escherichia coli* (schemat 6).

Podstawowym założeniem jest istnienie dwóch form białka M; formy M (nośnikowej) oraz formy  $M_i$  (wewnętrznej). Białko w formie M występuje na zewnętrznej stronie błony komórkowej (prawa strona schematu) i może wiązać wybiórczo określone galaktozydy, pełniąc funkcję ich nośnika w transporcie przez błonę komórkową. Ta faza (a) transportu, w której kompleks  $\beta$ -galaktozyd-białko M przechodzi przez błonę nie wymaga dostarczenia energii i nie powoduje zmiany chemicznej cukru. W fazie (b) zachodzącej na wewnętrznej powierzchni błony (lewa strona schematu) forma M przekształca się w formę  $M_i$ . Białko w formie  $M_i$  ma niższe powinowactwo do galaktozydu i nie może służyć jako jego nośnik, w wyniku czego galaktozyd odłącza się. W tej reakcji niezbędne są jony potasowe i amonowe. Następnie na zewnętrznej powierzchni błony zachodzi reakcja (c) powrotu białka w formę M. Reakcja ta zachodzi w obecności jonów  $Mg^{2+}$  i wymaga ATP lub innego trójfosforanu nukleozydu purynowego jako źródła energii.

#### IV. Białko dostarczające energii do transportu

Na ogół energia potrzebna do transportu substancji przez błony komórkowe jest dostarczana bezpośrednio przez nukleotydy purynowe. W przypadku transportu niektórych cukrów przez błony komórkowe *E. coli*, w dostawie energii uczestniczy białko nazwane HPr. Białko to przenosi resztę fosforanową z fosfoenolopirogronianu na cząsteczkę cukru. W roku 1964 Kunding i wsp. (15) wyizolowali z *E. coli* K 235 układ fosfotransferaz bakteryjnych, który katalizował przenoszenie fosforu z fosfoenolopirogronianu na różne węglowodany według reakcji:



System ten składa się z dwóch enzymów (I i II) oraz termostabilnego białka HPr o masie cząsteczkowej około 9 400. Białko HPr odgrywa decydującą rolę w transporcie niektórych cukrów. Komórki, które utraciły to białko w wyniku szoku osmotycznego nie mogą pobierać i gromadzić poszczególnych cukrów. Jeżeli takie komórki inkubowano z oczyszczonym białkiem HPr, to odzyskiwały one zdolność do transportu cukrów (16). Do

azotu w pozycji 1 pierścienia imidazolowego histydyny białka HPr przyłącza się jedna reszta fosforanowa (1, 16). Reszta ta zostaje następnie przekazana cząsteczce cukru, która ulega fosforylacji w pozycji 6 (17). Enzym II charakteryzuje się specyficznością w stosunku do cukrów (10, 30) i decyduje o właściwym rozpoznaniu cukru mającego ulec fosforylacji. Uważa się, że istnieją odpowiednie enzymy II dla poszczególnych cukrów przenoszonych przy udziale systemu fosfotransferaz. Enzym II jest zlokalizowany w błonie komórkowej (16). W 1968 roku Kaback (12) potwierdził rolę systemu fosfoenolopirogronian-fosfotransferaza w transporcie niektórych cukrów (glukozy, fruktozy, 2-dezoksyglukozy, galaktozy, 3-dezoksymetyloglukozy) przez izolowane błony otrzymane z *E. coli*.

Z przedstawionych danych wynika, że transport aktywny niektórych substancji przez błonę komórkową może zachodzić przy udziale swoistych białek. Białka te spełniają rolę nośników (substancji lub energii) w tym procesie i prawdopodobnie odgrywają również rolę we właściwym rozpoznaniu substancji mającej ulec przeniesieniu. W ciągu ostatnich kilku lat białka te zostały dosyć dobrze scharakteryzowane. Stwierdzono, że białka te mają podobne własności fizykochemiczne, ale wykazują wybiórczość w stosunku do substratu. Badania nad białkami przenoszącymi prowadzono głównie na komórkach bakteryjnych. W literaturze spotyka się bardzo mało prac o białkach przenoszących w tkankach zwierzęcych. Szybki postęp badań w tej dziedzinie pozwala mieć nadzieję, że dokładny mechanizm transportu, w którym białka te uczestniczą zostanie wkrótce lepiej poznany.

#### LITERATURA

1. Anderson B., Kunding W., Simoni R., Roseman S., *Federation Proc.* **27**, 643 (1968).
2. Anraku Y., *J. Biol. Chem.* **242**, 793 (1967).
3. Anraku Y., *J. Biol. Chem.* **243**, 3116, 3123, 3128 (1968).
4. Burgen A. S. V., *Can. J. Biochem. Physiol.* **35**, 569 (1957).
5. Carter I. R., Fox C. F., Kennedy E. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 725 (1968).
6. Dietz G., Anraku Y., Heppel L. A., *Federation Proc.* **27**, 831 (1968).
7. Ferro-Luzzi-Ames G., Lever J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 1096 (1970).
8. Fox C. F., Carter J. R., Kennedy E. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 698 (1967).
9. Fox C. F., Kennedy E. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 891 (1965).
10. Fox C. F., Wilson G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 988 (1968).
11. Jones T. H. D., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **244**, 5981 (1969).
12. Kaback H. R., *J. Biol. Chem.* **243**, 3711 (1968).
13. Kaback H. R., Milner L. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 1008 (1970).
14. Kalb A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **168**, 532 (1968).

15. Kunding W., Ghosh S., Roseman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 1067 (1964).
16. Kunding W., Kunding F. D., Anderson B., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **241**, 3243 (1966).
17. Kunding W., Kunding F. D., Anderson B., Roseman S., *Federation Proc.* **24**, 658 (1956).
18. Lenard J., Singer S. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1828 (1966).
19. Medveczky N., Rosenberg H., *Biochim. Biophys. Acta* **192**, 369 (1969).
20. Medzihradsky F., Kline M. M., Hokin L. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 311 (1967).
21. Mitchell P., *Nature* **180**, 134 (1957).
22. Nakane P. K., Nichoalds G. E., Oxender D. L., *Science* **161**, 182 (1968).
23. Pardee A. B., *J. Biol. Chem.* **241**, 5886 (1966).
24. Pardee A. B., *Science* **162**, 632 (1968).
25. Pardee A. B., Prestidge L. S., Whipple M. B., Dreyfuss J., *J. Biol. Chem.* **241**, 3962 (1966).
26. Penrose W. R., Nichoalds G. E., Piperio J. R., Oxender D. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 5921 (1968).
27. Piperno J. R., Oxender D. L., *J. Biol. Chem.* **241**, 5732 (1966).
28. Piperno J. R., Oxender D. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 5914 (1968).
29. Scarborough G. A., Rumley M. K., Kennedy E. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 951 (1968).
30. Simoni R. D., Levinthal M., Kunding F. D., Kunding W., Anderson B., Hartman P. E., Roseman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1963 (1967).
31. Stein W. D., *Biochem. J.* **105**, 3P (1967).
32. Stein W. D., *The Movement of Molecules Across Cell Membranes*, Academic Press, New York-Londyn 1967.
33. Wasserman R. H., Corradino R. A., Taylor A. N., *J. Biol. Chem.* **243**, 3978 (1968).
34. Wilson O. H., Holden J. T., *J. Biol. Chem.* **244**, 2743 (1969).





KONSTANTY WIŚNIEWSKI\*

## Insulina a proces transportu przez błony komórkowe

### Insuline and the Transport Across the Cell Membranes

The postulated mechanisms of the insuline action on the transport across the cell membranes are reviewed.

Komórka wraz z otaczającym ją środowiskiem tworzy podstawową jednostkę życia. Przez błonę komórkową, która oddziela wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego, docierają do komórki informacje. Na podstawie wyników wieloletnich badań nad biologicznie aktywnymi substancjami wysunięto hipotezę o roli hormonów jako chemicznych przekaźników informacji (ang. *chemical messengers*) w ustroju. Substancje te, reagując ze specyficznym receptorem na powierzchni błony komórkowej, kierują procesami metabolicznymi zachodzącymi wewnątrz komórki (21, 25).

Mimo bogatego materiału doświadczalnego, jakim obecnie dysponujemy, do dziś nie jest wyjaśnione zagadnienie, w jaki sposób hormon przekazuje informacje komórce i jakie procesy zachodzą w błonie komórkowej podczas przekształcania informacji w efekt działania hormonu. Ustalono jednak, że błony komórkowe są istotnym miejscem działania hormonów.

Błony komórkowe spełniają wielorakie i bardzo ważne biologiczne funkcje zarówno w życiu całego organizmu, jak też pojedynczej komórki. Błona otaczająca komórkę nadaje jej kształt, warunkuje wystąpienie zjawisk bioelektrycznych i wymianę substancji z otoczeniem. W komórce zachodzi równocześnie wiele reakcji chemicznych. Organizacja tych reakcji zależy nie tylko od wzajemnej reaktywności substratów i enzymów, lecz również od ich kontrolowanego wzajemnego kontaktu.

Błony wewnątrzkomórkowe tworzą bariery segregujące, których selektywna przepuszczalność modyfikuje wzajemny kontakt reagujących substancji, a w konsekwencji kieruje szybkością procesów metabolicznych.

Zagadnienie biochemicznej struktury błon komórkowych było przedmiotem zainteresowań wielu autorów (4, 11, 13, 16, 40, 43, 55). Wyniki badań biochemicznych, morfologicznych oraz doświadczeń przeprowadzo-

\* Doc. dr med. habil. Katedra Farmakologii, Akademia Medyczna, Białystok

Wykaz stosowanych skrótów: Chl — chloropromazyna, I — insulina, INH — hydrazyd kwasu izonikotynowego, NEM — N-etylomaleimid

nych przy użyciu promieni rentgenowskich zdają się zgodnie wskazywać, że błony komórkowe zbudowane są z dwucząsteczkowej warstwy lipidowej, pokrytej z obu stron warstwą białka.

Podstawową właściwością wszystkich błon komórkowych jest ich zdolność do transportu. Zasadniczo możemy wyróżnić kilka podstawowych form procesu transportu przez błony, a mianowicie prostą dyfuzję, aktywny transport i pinocytozę (1, 6, 15, 23, 51, 56, 58). Różnorodność i sprawność powyższych form transportu zależy zarówno od cech fizyko-chemicznych wnikażącej substancji, jak również od właściwości transportowych błon komórkowych.

Procesy transportowe modyfikowane są przez hormony polipeptydowe. Według Riggsa (47) powierzchnia błon komórkowych jest odpowiednim miejscem działania hormonów polipeptydowych, ponieważ mogą one kontrolować procesy metaboliczne nie wnikając do wnętrza komórki.

Do hormonów polipeptydowych należy insulina. W wyniku wieloletnich badań ustalono, że hormon ten wywiera różnorodne i wielokierunkowe działanie. Analizując szczegółowo działanie insuliny wprowadzonej do ustroju, Rieser (48) wylicza aż 22 efekty, jakie ten hormon wywołuje. Wielu autorów zajmujących się mechanizmem działania insuliny od dawna poddawało w wątpliwość, by te wielokierunkowe efekty, jakie wywołuje insulina, mogły zależeć od jej bezpośredniego działania (21, 32, 47, 48, 68). W miarę rozwoju badań zaczął dominować pogląd, że insulina działa na jakiś pojedynczy proces — „rozsusznik”, a obserwowane różnorodne efekty są odległym następstwem i konsekwencją insulinowej aktywacji tego procesu.

Próbując wyjaśnić, jaki jest ten zapoczątkowujący najważniejszy proces aktywowany przez insulinę, wysunięto wiele hipotez. Najwięcej zwolenników zyskała sobie hipoteza transportowego działania insuliny. Według niej insulina, działając na błonę komórki lub systemy transportowe błon, zwiększa transport substratów metabolicznych do wnętrza komórki, wzbogaca zaopatrzenie komórki w materiał pędny i budulcowy, wszelkie zaś inne efekty są następstwem tego działania. W ciągu kilkudziesięciu lat badań stwierdzono, że insulina tak *in vivo* jak *in vitro* zwiększa transport przez błony komórkowe wielu węglowodanów i aminokwasów (8, 9, 17, 27, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 46, 48, 49, 50, 52, 54, 68, 69, 70, 72). Ponieważ w powyższych badaniach stosowano różne metodyki i substraty, otrzymane wyniki różniły się, a na ich podstawie powstało wiele teorii wyjaśniających mechanizm „transportowego” działania insuliny.

Powstanie jednej z teorii transportowego działania insuliny należy wiązać z badaniami Levine’a i współpracowników. Wprawdzie po wykryciu insuliny zaczęły pojawiać się doniesienia o jej wpływie na przemieszczanie się glukozy w ustroju (5, 24, 35), jednak dopiero klasyczne doświadczenia Levine’a i wsp. (33, 34) dostarczyły pewnych i przekonywa-

jących dowodów na to, że *in vivo* hormon ten nasila proces transportu galaktozy, L-ksylozy i L-arabinozy przez błony komórkowe. Wyniki prac Levine'a potwierdzili inni autorzy *in vitro* na izolowanej rogówce królika (49, 50), perfundowanym sercu (38, 39) i izolowanej przeponie szczura (27, 46). Szczególnie interesujące były wyniki Parka i wsp. (38, 39). Autorzy stosując perfuzję serca wykazali, że insulina zwiększa zarówno transport cukrów do tkanki jak również ich wydalanie z tkanki. Kipnis (26) i Manchester (36) wykazali, że insulina nie wywiera transportowego działania w inkubowanych drobno pociętych tkankach, co wskazywałoby, że bezpośrednim i podstawowym miejscem działania insuliny są błony komórkowe.

Według hipotezy transportowego działania insuliny, opracowanej przez Levine'a (31) w 1961 roku, w tkankach wrażliwych na działanie insuliny zlokalizowany w błonach system transportowy jest unieczynniany przez nieokreśloną substancję, usuwaną lub zmienianą przez insulinę. Zatem transport glukozy do wnętrza komórek zwiększałby się pod wpływem tego hormonu. Levine sądził, że wpływ insuliny na błony komórkowe lub systemy transportowe błon jest jej podstawowym i bezpośrednim działaniem.

Nieco odmienną teorię dotyczącą działania insuliny na mechanizm transportowy zaproponowali Randle i Smith (46). W doświadczeniach *in vitro* autorzy wykazali, że niedotlenienie lub trucizny komórkowe, hamujące procesy oksydacyjnej fosforylacji, zwiększają transport glukozy do wnętrza komórek podobnie jak insulina. Na tej podstawie autorzy wysunęli przypuszczenie, że w błonie komórkowej istnieje przenośnik (ang. *carrier*), który może występować w formie aktywnej ufosforylowanej lub nieaktywnej — nieufosforylowanej. Insulina mogłaby hamować fosforylację lub przyspieszać defosforylację przenośnika zwiększając tym samym przenikanie glukozy przez błony komórkowe.

Podobny mechanizm działania insuliny zakładali Fisher i Zacharian (18). Fisher i wsp. (17, 18) stwierdzili, że istniejący w błonach system transportowy dla cukrów jest wysycalny, wykazuje dużą stereospecyficzność, która umożliwia transport przez błony niektórych cukrów wykazujących pewne podobieństwo w budowie chemicznej. W badanej tkance cukier nagromadza się przeciw gradientowi stężeń, a insulina aktywuje ten proces. Według Fishera w błonie komórkowej istnieje przenośnik, który łącząc się z glukozą przenosi ją do wnętrza komórki. Insulina przyspieszałaby proces uwalniania się glukozy z kompleksu przenośnik-glukoza.

Proponowane przez Levine'a, Randle'a i Smitha oraz Fishera hipotezy wyjaśniające mechanizm działania transportowego insuliny nie tłumaczą wielu aspektów jej działania. Jeśli — zgodnie z tymi hipotezami — najistotniejszym działaniem insuliny byłby jej wpływ na system transportu

glukozy, to trudno byłoby wytłumaczyć aktywujące działanie insuliny na transport aminokwasów (8, 9, 27, 30, 36, 37, 44, 69, 70, 72), tym bardziej, że działanie to obserwowano w środowisku nie zawierającym glukozy (27, 28, 29, 70, 71) lub w obecności inhibitora transportu glukozy — florydzyzyny (3). Aktywujący wpływ insuliny na proces transportu aminokwasów jest niezależny od syntezy białka, obserwowano go bowiem także w obecności puromycyny (9, 10, 20, 52, 53).

W innych teoriach starano się wytłumaczyć działanie transportowe insuliny w stosunku do wielu substratów metabolicznych. Wool (69) na podstawie badań własnych wysunął hipotezę genotypowego działania insuliny. Według niej najważniejszym działaniem insuliny jest jej aktywujący wpływ na syntezę mRNA. W wyniku tego działania powstawałyby nowe białka, w tym również enzymy transportowe błon lub ich białka strukturalne. Jednak w kilka lat po opublikowaniu tej teorii sam jej autor wykazał, że w obecności aktynomycyny, podanej w dawce hamującej syntezę mRNA, można nadal obserwować efekty transportowe insuliny (72), które nie mogą zatem zależeć od aktywacji syntezy mRNA.

W badaniach nad mechanizmem działania insuliny od dawna już duże zainteresowanie budziło zagadnienie receptora komórkowego, z którym ten hormon mógłby reagować. Schwartz i wsp. (54) zwrócili uwagę, że aktywność biologiczna wazopresyny zależy od łączenia się jej grup -S-S z grupami -SH białek błon komórkowych. Ponieważ insulina ma również wiązania -S-S, wielu autorów (7, 8, 14, 19) przypuszczało, że hormon ten reaguje w podobny sposób z grupami -SH białek błon komórkowych jak wazopresyna. Przypuszczenie to wydało się tym prawdopodobiejsze, że insulina obniża poziom wolnych grup -SH w izolowanej przeponie szczura (57), a zastosowanie inhibitorów grup -SH zupełnie eliminuje aktywujące działanie insuliny na proces transportu cukru (7, 8, 57). Te dane wskazywałyby, że reakcje insuliny z grupami -SH białek błon komórkowych są istotnym procesem warunkującym wystąpienie dalszych efektów biologicznych działania tego hormonu.

W 1956 roku Peters (45) zaproponował teorię, która wyjaśniała wpływ insuliny na proces transportu chemicznie różnych substratów metabolicznych. Zgodnie z teorią Petersa (ang. *cytoskeleton theory*) hormon po zetknięciu się z powierzchnią błony komórki wywołuje reorganizację całej struktury komórki i tą drogą zmienia przebieg szeregu reakcji enzymatycznych.

W 1961 roku Krahl (30) opierając się na wynikach badań własnych i innych autorów (2, 30, 45) zmodyfikował teorię Petersa. Krahl uważa, że insulina wiążąc się z receptorem w błonie komórkowej wywołuje międzymolekularne przegrupowanie w białkach błony nasilając tym samym transport substratu do wnętrza komórki. Następnie hormon doprowadza do rozluźnienia struktur wewnątrzkomórkowych (siateczki protoplazma-

tycznej) i ułatwiając w ten sposób kontakt substratu z enzymami przyspiesza procesy metaboliczne w komórce. Zmianom strukturalnym towarzyszy wzrost aktywności frakcji mitochondrialnej komórek.

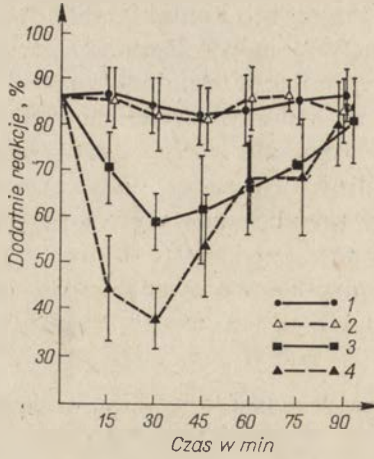
Chociaż dotychczas brak dostatecznych dowodów potwierdzających tę teorię, zdobyła ona duże uznanie wśród badaczy zajmujących się mechanizmem działania insuliny. Tłumaczy ona najbardziej przekonująco i wszechstronnie efekty metaboliczne wywołane przez ten hormon. Najlepiej również tłumaczy tzw. „nieswoiste działanie transportowe” insuliny. Wykazano bowiem, że insulina wprowadzona do ustroju zwiększa znacznie siłę działania wielu leków (12, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67) (tablica 1).

Tablica 1

Wpływ nadmiaru i niedoboru insuliny w ustroju na działanie i poziom niektórych leków w tkankach

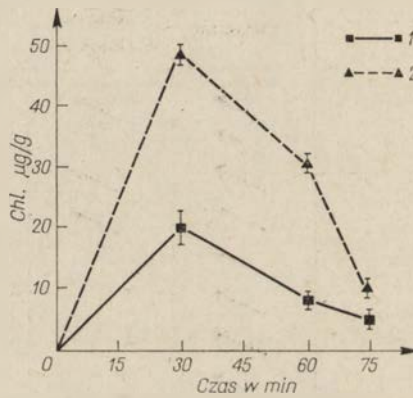
Lek	Insulina			
	Nadmiar		Niedobór	
	w ustroju			
	Działanie	Poziom w tkankach	Działanie	Poziom w tkankach
Moperydyna	↗	↗		
Morfina	↗			
Salicylan sodu	↗	↗	↘	↘
Chloropromazyna	↗	↗	↘	↘
Rezerpina	↗			
Hydroksyzyna	↗			
Fenobarbital	↗			
Prostygmina	↗		↗	
Atropina				
Adrenalina			↘	
Hydrazid kwasu izonikotynowego	↗	↗		↘
Mertiolat	↗			
Proflavina	↗			
Aminitrozol	↗			
Metandrostenolon				

Przy niedoborze insuliny w ustroju, na przykład w cukrzycy alloxanowej, poziom leków w tkankach i ich siła działania były znacznie obniżone. Podanie insuliny normalizowało te procesy. Stwierdzono przy tym, że zarówno przy nadmiarze jak i niedoborze insuliny w ustroju zmianom siły działania leków towarzyszyły podobne zmiany poziomu tego leku w efektorze. Wskazywałoby to, że między tymi dwoma zjawiskami istnieje związek przyczynowy.



**Rys. 1.** Wpływ insuliny (I) na działanie depresyjne chlorpromazyny (Chl) na odruchy warunkowe u szczurów (63)

1 — kontrola, 2 — I, 3 — Chl, 4 — Chl+I

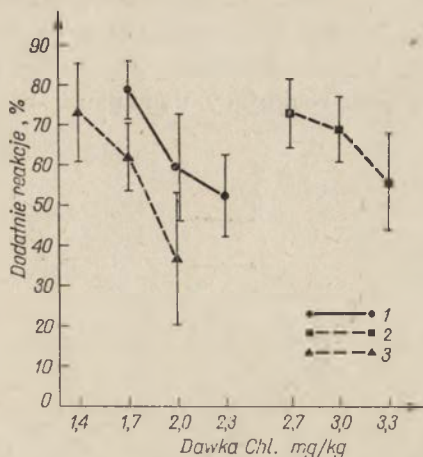


**Rys. 2.** Wpływ insuliny (I) na poziom chlorpromazyny (Chl) w tkance mózgowej szczurów (63)

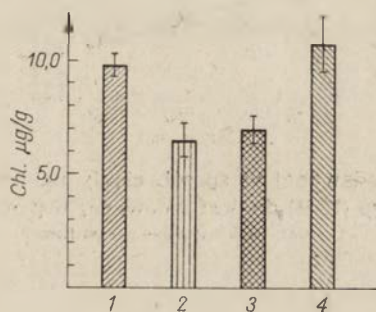
1 — Chl, 2 — Chl+I

Przykłady zmian zarówno działania, jak też poziomu chlorpromazyny w tkance mózgowej przy nadmiarze i niedoborze insuliny przedstawione są na rysunkach 1, 2, 3 i 4.

Zwiększony poziom leku w tkance po podaniu insuliny mógł zależeć od: przyspieszonego transportu leku do tkanki, obniżonego metabolizmu lub zmniejszonego wydalania leku. W celu uzyskania jednoznacznej odpowiedzi, czy zmiana poziomu leków w tkance mózgowej zależy od efektów transportowych insuliny, przeprowadzono doświadczenie na perfundowanej wątrobie szczura. Stwierdzono przede wszystkim, że insulina nie ma wpływu na szybkość rozkładu hydrazidu kwasu izonikotynowego (INH) przez perfundowaną wątrobę szczura (60). Wykazano równocześnie, że hormon ten zwiększał penetrację INH z perfuzatu do tkanki i jego poziom w 15 minucie perfuzji (rysunek 5).



**Rys. 3.** Wpływ chlorpromazyny (Chl) na odruchy warunkowe u szczurów z cukrzycą alloksanową (62)  
1 — kontrola, 2 — cukrzyca, 3 — cukrzyca + insulina



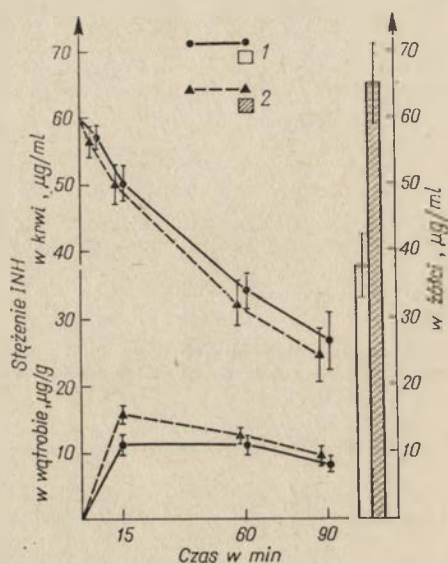
**Rys. 4.** Wpływ insuliny na poziom chlorpromazyny w tkance mózgowej szczurów z cukrzycą alloksanową (62)  
1 — kontrola, 2 — cukrzyca, 3 — cukrzyca + insulina (0,5 j/kg), 4 — cukrzyca + insulina (1,0 j/kg)

Różnice w zawartości INH w wątrobie w doświadczeniach kontrolnych i z insuliną malały w miarę upływu czasu perfuzji. W 90 minucie perfuzji zawartość INH w żółci była większa w doświadczeniu z insuliną niż w doświadczeniu kontrolnym.

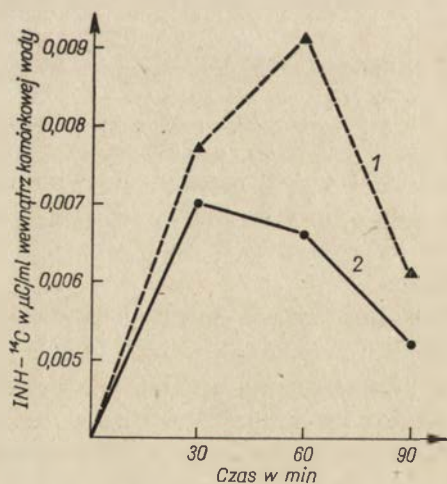
Można sądzić, że insulina podana do płynu perfundującego przyspiesza zarówno transport INH do tkanki jak i jego wydalanie do żółci. Większa zawartość leku w perfundowanej wątrobie w obecności insuliny mogła być uwarunkowana jego nagromadzeniem się w przestrzeniach zewnątrz lub wewnątrzkomórkowych. W doświadczeniach na izolowanej przeponie szczura wykazano, że insulina zwiększa nagromadzenie się znakowanego  $^{14}\text{C}$  INH w przestrzeniach wewnątrzkomórkowych (60) (rysunek 6).

Powyższe dane wskazują, że insulina aktywuje transport leku nie tylko przez błony wielowarstwowe, lecz również przez błonę komórki zwiększ-

szając poziom leku w komórce. Podobnie stwierdzono większe nagromadzenie INH w skrawkach jelita inkubowanych w buforze z dodatkiem INH i insuliną. Efektu tego nie obserwowano gdy bufor zawierał N-etylomalileimid (NEM) — związek reagujący z grupami -SH białek błon komórkowych (rysunek 7).

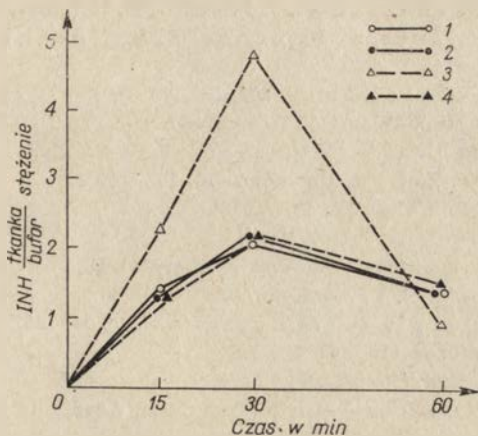


**Rys. 5.** Wpływ insuliny podawanej w sposób ciągły na transport hydrazidu kwasu izonikotynowego (INH) do perfundowanej wątroby szczura (60)  
1 — bez insuliny, 2 — z insuliną



**Rys. 6.** Wpływ insuliny na penetrację  $^{14}\text{C}$ -INH do wewnątrzkomórkowej przestrzeni izolowanej przepony szczura (60)  
1 — z insuliną, 2 — bez insuliny





Rys. 7. Wpływ insuliny (I) i N-etylomaleiloamidu (NEM) na transport INH do izolowanego jelita szczura (61)

1 — INH, 2 — INH+I, 3 — INH+I, 4 — INH+I+NEM

Przedstawione wyniki badań nad wpływem insuliny na proces przenikania leków przez błony komórkowe wskazują, że działanie transportowe tego hormonu dotyczy nie tylko substratów metabolicznych potrzebnych komórce, lecz także substancji obcych jakimi są leki. Mechanizm tego działania pozostaje nadal niewyjaśniony.

#### LITERATURA

1. Ariens E. J., *Molecular Pharmacology*, Academic Press, New York-Londyn 1964.
2. Barrnett R. J., Ball E. G., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 83 (1960).
3. Battaglia F. C., Manchester K. L., Randle P. J., *Biochim. Biophys. Acta* 43, 50 (1960).
4. Bernhard W., *Exp. Cell. Res. (Suppl.)* 6, 17 (1958).
5. Best C. H., Hoet J. P., Marks H., *Proc. Roy. Soc. Ser. B* 100, 32 (1926).
6. Brodie B. B.: w *Absorption and Distribution of Drugs*, red. T. B., C. H. Dodds E. S. Livingstone L. T. D. Edinburgh-Londyn 1964.
7. Cadenas E., Kaji H., Park C. R., Rasmussen H., *J. Biol. Chem.* 236, P. C. 63 (1961).
8. Carlin H., Hechter O., *J. Biol. Chem.* 237, 1371 (1962).
9. Carlin H., Hechter O., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 115, 127 (1964).
10. Castles J. J., Wool J. G., *Biochem. J.* 91, 11c (1964).
11. Collander R., Bärlund H., *Acta Bot. Farm.* 11, 1 (1933).
12. Danysz A., Wiśniewski K., *Arch. Int. Pharmacol.* 158, 30 (1965).
13. Davson H., Danielli J. F., *The Permeability of Natural Membranes* wyd. 2, Cambridge Univ. Press. Londyn 1952.
14. Edelman P. M., Rosenthal S. L., Schwartz I. L., *Nature* 197, 878 (1963).
15. Le Fevre P. G., *Pharmacol. Rev.* 13, 39 (1961).
16. Fawcett D. W., *Frontiers in Cytology*, red. S. L. Palay, Yale Univ. Press., New Haven 1958, str. 19.
17. Fisher R. B., Lindsay D. B., *J. Physiol.* 131, 526 (1956).

18. Fisher R. B., Zacharian P., *J. Physiol.* **158**, 73 (1961).
19. Fong C. T. O., Silver L., Popenoe E. A., Debons A. F., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 190 (1953).
20. Fritz G. R., Knobil E., *Nature* **200**, 682 (1963).
21. Hechter O., w Mechanisms of Hormone Action, red. P. Karlson, Georgu Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York-Londyn 1965.
22. Hechter O., *Vitamins and Hormones* **13**, 293 (1965).
23. Holter H., *Int. Rev. Cytol.* **8**, 481 (1959).
24. Hober R., *Biochem. Z.* **60**, 253 (1914).
25. Karlson P., Sekeris C. E., *Acta Endocrinol.* **53**, 505 (1966).
26. Kipnis D. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **82**, 354 (1959).
27. Kipnis D. M., Parrish J. E., *Federation Proc.* **24**, 1051 (1965).
28. Krahl M. E., *Science* **116**, 524 (1952).
29. Krahl M. E., *J. Biol. Chem.* **200**, 99 (1953).
30. Krahl M. E., The Action of Insulin on Cells, Academic Press, New York 1961.
31. Levine R., *Diabetes* **10**, 421 (1961).
32. Levine R., *Federation Proc.* **25**, 1071 (1965).
33. Levine R., Goldstein M. S., Huddlestun B., Klein S. P., *Am. J. Physiol.* **163**, 70 (1950).
34. Levine R., Goldstein M. S., Klein S. P., Huddlestun B., *J. Biol. Chem.* **179**, 985 (1949).
35. Loewi O., Dietrich S., *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* **215**, 78 (1926).
36. Manchester K. L., *Biochem. J.* **98**, 711 (1966).
37. Manchester K. L., Young F. G., *Biochem. J.* **75**, 487 (1960).
38. Morgan H. E., Cadenas E., Regen D. M., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **236**, 262 (1961a).
39. Morgan H. E., Henderson M. J., Reofen D. M., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **236**, 253 (1961).
40. Overton E., *Pflugers. Arch. Ges. Physiol.* **92**, 115 (1902).
41. Park C. R., Johnson L. H., Wright J. H., Batsel H., *Am. J. Physiol.* **191**, 13 (1957).
42. Park C. R., Post R. L., Kalman C. F., Wright J. H., Johnson L. H., Morgan M. E., *Ciba Foundation Colloguia Endocrinology* **9**, 240 (1956).
43. Parpart A. K., Dziemian A. J., *Coll. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **8**, 17 (1940).
44. Penhos J. C., Krahl M. E., *Am. J. Physiol.* **202**, 349 (1962).
45. Peters R. A., *Nature* **177**, 426 (1956).
46. Randle P. J., Smith G. H., *Biochem. J.* **70**, 490 i 501 (1958).
47. Riggs T. R., w Action of Hormones on Molecular Process, red. G. Litwach, D. Kritchevsky, John Wiley and Sons, Inc. N. Y., Londyn Sydney 1964.
48. Rieser P., w Insulin, Membranes and Metabolism, The Williams, Willuns Company, Baltimore 1967.
49. Ross E. J., *J. Physiol.* **116**, 414 (1952).
50. Ross E. J., *Medicine* **35**, 355 (1956).
51. Schanker K. S., *Pharmacol. Rev.* **12**, 504 (1962).
52. Scharff R., Wool I. G., *Biochem. J.* **97**, 257 (1965).
53. Scharff R., Wool I. G., *Biochem. J.* **97**, 272 (1965).
54. Schwartz I. L., Rasmussen H., Schoessler M. A., Silver L., Fong C. T. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **46**, 1288 (1960).
55. Sjostrand F. S., *J. Cell. Comp. Physiol.* **42**, 45 (1953).
56. Solomon A. K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**, 175 (1958).
57. Ungar G., Kadis S., *Nature* **183**, 49 (1959).

58. Wilbrandt W., Rosenberg T., *Pharmacol. Rev.* **13**, 109 (1961).
59. Wiśniewski K., *Acta Physiol. Polon.* **15**, 94 (1964).
60. Wiśniewski K., *Biochem. Pharmacol.* **17**, 2177 (1968).
61. Wiśniewski K., *Roczniki Akademii Medycznej im. J. Marchlewskiego w Białymstoku, Suplement* **20** (1968).
62. Wiśniewski K., Buczek Wł., *Biochem. Pharmacol.* **16**, 2227 (1967).
63. Wiśniewski K., Danysz A., *Biochem. Pharmacol.* **15**, 669 (1966).
64. Wiśniewski K., Granda J., *Gruźlica* **34**, 147 (1966).
65. Wiśniewski K., Małyszko E., *Acta Physiol. Polon.* **17**, 263 (1966).
66. Wiśniewski K., Moniuszko J., *Acta Physiol. Polon.* **18**, 305 (1967).
67. Wiśniewski K., Zarębski M., *Metabolizm* **17**, 212 (1968).
68. Wool I. G., w *Action of Hormonal on Molecular Process.* red. G. Litwach, D. Kritchevsky, John Wiley and Sons, Inc. N. Y., Londyn-Sydney 1964.
69. Wool I. G., *Federation Proc.* **24**, 1060 (1965).
70. Wool I. G., Krahl M. E., *Am. J. Physiol.* **196**, 961 (1959).
71. Wool I. G., Krahl M. E., *Nature* **183**, 1399 (1959).
72. Wool I. G., Moyer A. N., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 248 (1964).



## RECENZJE

### Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier, Martin Luckner, Gustav Fischer Verlag, Jena 1969, str. 360

Książka Lucknera jest podręcznikiem przeznaczonym dla studentów wyższych lat, którzy znają już chemię, biologię i biochemię w zakresie podstawowym, jak również dla biologów, farmaceutów, chemików, rolników i lekarzy interesujących się zagadnieniem metabolitów wtórnych.

Książka ma 338 stron treści i 22 strony indeksu rzeczowego. Zawiera 312 schematów, wzorów i szlaków metabolicznych oraz 21 tablic. Treść jest podzielona na dwie części: A. Część ogólna (38 str.) i B. Biosynteza i metabolizm metabolitów wtórnych roślinnych i zwierzęcych (300 str.).

W rozdziale 1 części A autor podaje definicję metabolitów wtórnych, zwraca uwagę na to, że w ostatnim trzydziestoleciu nagromadziło się wiele faktów pozwalających na wyjaśnienie biosyntezy i przemian tych związków, jak również wskazujących na ścisłe powiązanie ich przemian z metabolizmem podstawowym. Następnie omawia zmiany zawartości metabolitów wtórnych w zależności od warunków ekologicznych i wieku, miejsce ich syntezy na terenie komórki i mechanizmy regulacji ich przemian. W rozdziale 2 autor przedstawia trzy metody szczególnie przydatne w badaniu metabolitów wtórnych, a mianowicie metodę izotopową, badanie przemian przy zastosowaniu homogenatów lub preparatów enzymatycznych oraz badanie mutantów.

Część B dzieli się na 21 rozdziałów, w których autor omawia metabolity wtórne, pochodzące z następujących jednostek podstawowych: a) cukrów prostych (rozdział 1), b) reszt acetylowych (rozdziały 2—5), c) kwasu szikimowego (rozdział 6) i aminokwasów (rozdziały 7—21). Omówienie każdej z tych grup jest poprzedzone wstępem przedstawiającym reakcje, w jakich jednostki podstawowe powstają, są metabolizowane i degradowane w powiązaniu z ogólnymi przemianami metabolicznymi.

Rozdział 1 omawia glikozydy, aminocukry, dezoksycukry, cukry o rozgałęzionych łańcuchach, kwasy uronowe, onowe i kwas askorbinowy, alkohole cukrowe, cyklitole i streptydynę. Rozdział 2 — metabolity wtórne, powstające w wyniku liniowego łączenia reszt acetylowych, łańcuchowe (kwasy tłuszczowe różnych rodzajów, fosfolipidy, plazmalogeny, *n*-alkany) oraz pierścieniowe (acetogeniny pochodne antracenu, tetracykliny, gryzeofulwiny, alkaloidy *Conium* i pterydyny). Rozdział 3 — pochodne kwasu propionowego (kwasy metylołuszczowe i makrolidy). Rozdział 4 — pochodne metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych i cyklu kwasu glioksalowego (głównie związki cykliczne jak kwas glaukonowy i jego pochodne). Rozdział 5 — pochodne poliprenylowe (mono-, seskwi-, dwu- i trój-terpeny, sterydy i karotenoidy). Rozdział 6 — związki aromatyczne, pochodne kwasu dehydroshikimowego, shikimowego, choryzmowego i antranilowego. Rozdział 7 — reakcje ogólne biosyntezy amin, betain, glikozydów cyjanogennych, olejków gorczycznych i alkaloidów. Rozdział 8 — pochodne glicyny (układy porfiryne, barwniki żółciowe, nukleotydy purynowe i alkaloidy purynowe, pochodne pteryne łącznie z allokksazynami). Rozdział 9 — pochodne cysteiny (koenzym A, różne roślinne pochodne alkilocysteiny, biotyna i pochodne kwasu merkapturowego). Rozdział 10 — pochodne metioniny (*S*-adenozylometionina, tiamina

i jej pochodne). Rozdział 11 — pochodne waliny (erytroskyryna, barwnik *Penicilium islandicum*). Rozdział 12 — pochodne leucyny (pirofosforan izopentenyłu). Rozdział 13 — pochodne izoleucyny (kwasy tyglinowe, kwas metylomastowy, związki pirolowe grzybów). Rozdział 14 — pochodne kwasu asparaginowego (kwas orotowy i nukleotydy pirymidynowe, kwas nikotynowy i jego alkaloidowe pochodne, kwas 2,6-dwupikolinowy, kwas fuzarynowy). Rozdział 15 — pochodne kwasu glutaminowego, proliny i ornityny) alkaloidy tropanowe i pirolizydynowe, pierścień pirolidynowy nikotyny. Rozdział 16 — pochodne lizyny (pochodne pipekoliny i kwasu pipekolinowego, alkaloidy z *Punica*, *Sedum* i *Lobelia*, alkaloidy pochodne chinolizydyny, pierścień pipezydynowy anabazyny i inne). Rozdział 17 — pochodne argininy (pochodne guanidynowe i latoryna z grochu). Rozdział 18 — pochodne histydyny (alkohole imidazolowe). Rozdział 19 — pochodne tryptofanu (alkaloidy indolowe, alkaloidy sporyszu, chininy, kwas kinurenowy i inne). Rozdział 20 — pochodne fenyloalaniny (alkaloidy izochinoliny, kolchicina i inne) i tyrozyny (plastochinon, tokoferylochiny, kwasy tropanowe, kwas cynamonowy, kumaryny, alkohol koniferylowy i lignina, flawany, auryony i izoflawony). Rozdział 21 — metabolity wtórne o strukturze peptydów i białek (dwuketopiperazyny, kwasy hydroksamowe, penicylina, cefalosporyna, peptydy cykliczne, białkowa struktura szkieletu ściany bakteryjnej i sklerotyiny owadów).

Z podanego spisu widać, że wszystkie ważniejsze grupy metabolitów wtórnych zostały przez autora omówione. Treść poszczególnych rozdziałów jest przedstawiona raczej schematycznie podobnie jak w podręczniku Karlsona, ale obejmuje dużą ilość związków i podkreśla zależności metaboliczne pomiędzy nimi. Po każdym rozdziale podano literaturę, głównie monograficzną, doprowadzoną do 1968 roku. Sądzę, że książka Lucknera może być naprawdę interesująca dla wszystkich wymienionych na początku specjalistów oraz dużą pomocą w kształceniu studentów pod warunkiem, że będzie ją można udostępnić po przetłumaczeniu na język polski.

Z. Kasprzyk

### **Advances in Enzyme Regulation, tom 8, red. G. Weber, Pergamon Press, Oxford 1970, str. 389**

Cykl *Advances in Enzyme Regulation* przedstawia materiały z corocznych sympozjów poświęconych problemom regulacji procesów enzymatycznych. Tom 8 dotyczy sympozjum odbytego we wrześniu 1969 roku (Indianapolis, U.S.A.).

Sesja I prowadzona przez Sir Hansa Krebsa poświęcona była mechanizmom kontrolnym w metabolizmie węglowodanów. Pierwszy referat dotyczył hormonalnej regulacji glukoneogenezy u ludzi w czasie długotrwałego głodu. Następnie G. Weber przedstawił zróżnicowany, hamujący wpływ fenyloalaniny i fenylopirogronianu na aktywność kluczowych enzymów glikolitycznych, produkcję mleczanu oraz syntezę tłuszczów, białek, RNA i DNA w mózgu, w czasie rozwoju człowieka i szczura. Stwierdził on, że aktywność glikolityczna wzrasta w mózgu wraz z jego rozwojem, natomiast wrażliwość enzymów glikolitycznych na inhibicję przez fenyloalaninę i fenylopirogronian pozostaje taka sama. Badania kinetyczne wskazują, że obie te substancje działają jako kompetycyjne inhibitory heksokinazy, kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy 6-fosfoglukonianu. Pozwala to przypuszczać, że bogata w węglowodany dieta może działać ochraniająco na tkankę mózgową pacjentów z fenyloketonurią. Ostatni referat tej sesji omawia model allosterycznej kinetyki fosfofruktokinazy z motylicy wątrobowej i serca owcy z uwzględnieniem fizjologicznych aspektów tego zagadnienia.

W sesji II, prowadzonej przez Stadtmana, poświęconej metabolizmowi ptaków, przedstawiono prace nad regulacją dezaminazy dezoksycytydylanu i syntezy tymidylanu w zarodkach kurczęcia. Enzymom tym przypisuje się rolę czynników ograniczających syntezę DNA. F. Maley postuluje, że poziom dezaminazy jest regulowany przez homo i heterotropowe współdziałanie substratu (5-monofosforanu dezoksycytydyny) i antagonistycznych allosterycznych regulatorów (5-trójfosforanu dezoksycytydyny i 5-trójfosforanu dezoksytymidyny) zmieniających konformację podjednostek enzymatycznych. Regulatory te wpływają nie tylko na aktywność enzymu w komórce, ale również kontrolują pośrednio jego syntezę i rozpad przez obniżanie lub podnoszenie stabilności białka enzymatycznego. Natomiast stężenie syntetazy tymidylanu w cytoplazmie jest regulowane na poziomie transkrypcji i translacji przez substrat lub jego analogi, do których należy folan i pochodne folanu. W następnym referacie zespół japoński przedstawił wyniki badań nad wpływem diety wysokobiałkowej na enzymy metabolizujące glutaminę u ssaków i u ptaków.

Sesja III prowadzona przez E. Krebsa poświęcona była mechanizmom kontrolnym u mikroorganizmów. Holzer przedstawił ciekawy referat o trzech drogach regulacji metabolizmu przez ATP, działający jako: 1) donator energii, 2) allosteryczny efektor, przy czym produkty rozpadu: ADP i fosforan także pełnią rolę allosterycznych regulatorów i 3) czynnik powodujący chemiczną modyfikację enzymów poprzez ich fosforylację lub przyłączenie reszty adenylowej. Ostatni typ regulacyjnego działania ATP omawia szerzej E. Stadtman na przykładzie syntetazy glutaminowej z *Escherichia coli*. W sesji traktującej o regulacji na poziomie różnych tkanek R. W. Estabrook i współpracownicy przedstawili metodę spektrofotometrycznego pomiaru procesów oksydoredukcji w skrawkach wątroby inkubowanych w środowiskach o zmiennym składzie. Dzięki zastosowaniu tej techniki można określić ilościowo zawartość mikrosomów i mitochondriów w komórce. Ważną obserwacją jest stwierdzenie, że zużycie tlenu przez system mikrosomalny wynosi tylko około 25% całego zużycia tlenu przez skrawki, chociaż zawartość jednego tylko składnika mikrosomów — cytochromu P<sub>450</sub> ilościowo przekracza 3—6 razy zawartość wszystkich innych cytochromów obecnych w mitochondriach. Artykuł J. Himms-Hagena pt. „Regulacja procesów metabolicznych w brunatnej tkance tłuszczowej w zależności od termogenezy” omawia mechanizm adaptacji zwierząt do niskich temperatur. Zwierzęta takie mogą produkować ciepło niezależnie od pracy mięśni (ang. *nonshivering thermogenesis*). Proces ten można także wywołać podając zwierzętom noradrenalinę. Autor sugeruje, że mechanizm działania hormonu w termogenezie jest następujący: noradrenalina aktywuje cyklazę adenylową i powoduje wzrost poziomu cyklicznego AMP, który z kolei wpływa aktywująco na lipolizę. Uwalniane kwasy tłuszczowe przyspieszają znacznie aktywność oddechową mitochondriów, powodując jednocześnie rozprężenie oksydacyjnej fosforylacji, czego ostatecznym wynikiem jest produkcja ciepła.

Następny dział dotyczy regulacji syntezy i rozpadu glikogenu. H. G. Hers i współpracownicy omawiają warunki wzajemnego przechodzenia formy aktywnej i nieaktywnej syntetazy glikogenu *in vivo* i *in vitro*, przy czym podkreślają wybitne znaczenie cyklicznego AMP i glukozy jako głównych, antagonistycznie działających regulatorów metabolizmu glikogenu. M. A. Brostrom i współpracownicy zajmują się wpływem cyklicznego AMP na kinazę białek. Enzym ten katalizuje fosforylację całego szeregu białek, między innymi kinazy fosforylazy b i syntetazy glikogenu, co z kolei zmienia bardzo znacznie ich aktywność. Stymulację kinazy fosforylazy b przez jony wapnia omówili Mayer i współpracownicy. W dziale poświęconym regulacji hormonalnej rozpatrywane są dwa problemy: mechanizm interakcji między insuliną i receptorem komórkowym w izolowanych komórkach tkanki tłuszczowej oraz regulacja aktywności enzymów flawinowych w wątrobie na tle zmian wywołanych niedoczynnością tarczycy i niedoborem ryboflawiny. Z problematyki mechanizmów

kontrolnych w nowotworach Potter i współpracownicy w oparciu o własne dane eksperymentalne wskazują na niepewność wszelkich dowodów delecji informacji genetycznej dla enzymów „brakujących” w nowotworach w porównaniu z tkanką macierzystą. Galli i współpracownicy zajmują się metabolizmem prekursorów cholesterolu w mózgu i jego nowotworach. LePage przedstawia możliwość wykorzystania dla celów chemoterapeutycznych dwóch szczególnych właściwości niektórych nowotworów — braku dezaminazy adenozykowej oraz zdolności do fosforylacji  $\alpha$ -deзокsytioguanozyny. Zagadnienia indukcji enzymów omawiano na przykładzie indukcji enzymów hydroksylujących leki w wątrobie (Hilton, Sartorelli), spontanicznej indukcji aminotransferazy tyrozyny w wątrobie (Sereni) oraz indukcji kolagenazy w skórze i fibroblastach (Houck, Sharma, Carrillo). Zagadnieniom izoenzymów poświęcono dwa referaty. Dotyczyły one izoenzymów glutaminy w różnego rodzaju nowotworach wątroby (Morris i współpracownicy), oraz dwóch form dehydratazy serynowej występujących w wątrobie szczurów w warunkach normalnych i patologicznych (Inoue, Pitot). Na zakończenie zjazdu Sir Hans Krebs wygłosił referat, którego tematem były mechanizmy kontrolujące cykl kwasów trójkarboksylowych podczas utleniania różnych substratów w wątrobie, sercu i nerce. Szczegółowo omówiono rolę nukleotydów adeninowych.

E. Lenartowicz,  
A. Wojtczak,  
E. Wałajtys,

**M. W. Wolkenstejn: Optische Eigenschaften und Struktur der Fermente, Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik, Heft 10, VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig 1969**

Dziesiąty zeszyt wydawnictwa: *Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik* przynosi tłumaczenie części książki M. W. Wolkenstejna „Fizika Fermentów”, wydanej w Moskwie w roku 1967.

Przetłumaczone kilka rozdziałów tej książki opatrzone tytułem: „Właściwości optyczne i struktura enzymów”. To tematycznie bardzo rozległe zagadnienie ujęte zostało w 8 krótkich rozdziałach oraz dwu rozdziałach uzupełniających, które podzielić można na dwie grupy.

Rozdziały 1—3 oraz Dodatek II omawiają teorię skręcalności optycznej, głównie w zastosowaniu do badań konformacji łańcuchów polipeptydowych i białek. Podano podstawowe założenia i wywody klasycznej teorii Kuhna skręcalności optycznej, oraz późniejsze kwantowo-mechaniczne wyprowadzenia równań opisujących zjawisko dyspersji skręcalności optycznej i efekt Cottona. Następnie autor szczegółowo omówił równanie Moffitta w oparciu o analizę przejść elektronowych w wiązaniach amidowych, przynależących do łańcucha polipeptydowego w formie  $\alpha$ -spirałi. Wspomniano też krótko o właściwościach optycznych formy  $\beta$ -polipeptydów. Rozdział 3 poświęcono omówieniu skręcalności optycznej kilku białek globularnych o właściwościach enzymów. W dodatku II omówiono teoretyczne podstawy zjawiska anomalnej magnetycznej dyspersji skręcalności optycznej, ilustrując je na przykładach zachowania się hemoglobiny i mioglobiny.

Grupa druga jest tematycznie bardziej zróżnicowana. W rozdziałach 4—8 omówiono takie zagadnienia jak: zachowanie się białek jako polielektrolitów, wpływ jonizacji grup funkcyjnych na konformację i aktywność enzymów, kooperatywne



właściwości enzymów a kinetyka reakcji enzymatycznych, zjawiska allosterii i wreszcie zmiany konformacyjne białek a wykonywanie pracy mechanicznej. Dodatek I omawia szczegółowo niektóre zagadnienia formalnego ujęcia kinetyki reakcji enzymatycznych.

Całość zeszytu obejmuje 118 stron druku. Motywem łączącym obydwie grupy jest problem zmian konformacyjnych w białkach: jedna z grup koncentruje się na metodzie badania tych zmian, druga — na ich roli w funkcjonowaniu enzymów.

Na podkreślenie zasługuje głęboka podbudowa teoretyczna omawianych zagadnień. Poruszone są tylko niektóre wybrane tematy, część z nich ujęta jest w sposób uproszczony, jednakże zawsze autor stara się raczej o wyjaśnienie fizycznych podstaw zjawisk, niż o ich opis. W tym podejściu leży szczególna wartość niniejszego opracowania.

Długi, jak na tę dziedzinę wiedzy, okres czasu jaki upłynął od napisania rosyjskiego oryginału spowodował, że niektóre punkty są nieco zdezaktualizowane, jednakże publikacja ta jest nadal wartościowym wstępem do zagadnień aktywności optycznej białek oraz allosterii enzymów. Jest ona godna polecenia dla tych, którzy rozpoczynając poznawanie powyższych zagadnień, chcieliby zgłębić je od strony teoretycznej.

A. Morawiecki

### **E. G. Shellard, Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, London and New-York, Academic Press, 1968, stron 133**

Niewielka monografia licząca zaledwie 133 strony tekstu z tabelami i rysunkami zawiera wiele cennego materiału metodycznego, teoretycznego i dyskusyjnego mieszczącego się w 11 rozdziałach opracowanych przez różnych autorów pod redakcją Shellarda. W rzędzie autorów występują nazwiska znane w różnych dziedzinach biochemii, chemii analitycznej i technologii leku jak *Shellarda*, *Wooda*, *Jorka*, *Jänchena* i innych.

Przystosowanie metody chromatografii bibułowej, a w szczególności cienkowarstwowej do oznaczeń ilościowych znajduje się wciąż jeszcze w stadium prób. Do niedawna jeszcze stosowano głównie metody pośrednie w eluatach z płam ekstrahowanych z bibuły lub wyskrobanych z chromatogramów cienkowarstwowych. Zaledwie od kilku lat metoda bezpośrednich odczytów na chromatogramach bibułowych i cienkowarstwowych za pomocą techniki absorpcyjometrycznej, fluorymetrycznej znajduje coraz szersze zastosowanie.

W 11 rozdziałach wyżej wymienionej monografii autorzy rozpatrują:

1. rolę poszczególnych czynników warunkujących powstawanie plam jednolitych, o regularnych kształtach, nie dyfundujących na bibule i nie dających ogonów (ang. *tailing*) (*G. E. Fairbarn*),
2. sposoby i warunki umożliwiające półilościową i ilościową ocenę chromatogramów bibułowych (*G. E. Fairbarn*),
3. ilościową chromatografię cienkowarstwową w eluatach z chromatogramów (*W. E. Court*),
4. ilościową chromatografię cienkowarstwową densytometryczną (*E. J. Shellard*),
5. ilościową chromatografię cienkowarstwową fluorymetryczną (*D. E. Jänchen*),
6. zalety i problemy bezpośredniej spektrofotometrii na cienkowarstwowych chromatogramach (*H. Jork*),

7. zastosowanie spektroskopii do cienkowarstwowej chromatografii (G. W. Goodman),
8. wizualną ocenę chromatogramu cienkowarstwowego (C. A. Johnson),
9. ilościowe oznaczenia radioaktywności na cienkowarstwowym chromatogramach (B. A. Wood),
10. ilościowe oznaczenia na dwukierunkowych radiochromatogramach (A. E. Lowe),
11. ilościowe oznaczenia na radiochromatogramach przy zastosowaniu komory iskrowej (ang. *spark-chamber*) (B. R. Pullan).

Każdy rozdział zawiera bogatą dokumentację w tabelach, diagramach, chromatogramach i rysunkach, a ponadto piśmiennictwo w danym zakresie.

Dla czytelnika i odbiorcy cenne są syntetyczne opracowania warunków niezbędnych dla otrzymania dobrych wyników. I tak w streszczeniu rozdziału pierwszego autor podaje, że największym źródłem błędu jest niedostateczna precyzja w odmierzeniu startowych objętości badanych roztworów, jak i niejednakowe sposoby nanoszenia na bibułę lub płytki z adsorbentem. Ze streszczenia w rozdziale drugim dowiadujemy się, że niezbędnym warunkiem dla uzyskania dobrych wyników jest umieszczenie na jednym i tym samym chromatogramie obok siebie badanego roztworu i odpowiednich standardów. Przy omawianiu techniki elucyjnej, przy której warunkiem koniecznym dla uzyskania dobrych wyników ilościowych jest dobry rozdział badanych substancji autor zestawia wpływ poszczególnych czynników na wartości  $R_f$ : adsorbentu (jakość, właściwości i zanieczyszczenia, homogenność warstwy, stan jej wysuszenia i aktywności oraz przechowywanie płytek), układu rozwijającego (jakość i właściwości, stopień nasycenia komory parami, temperatura rozwijania), roztworów (naniesione objętości, jakość substancji — między innymi jej trwałość) oraz technikę (wymiary komór, odległość migracji fazy ruchomej od startu do czoła, kierunek rozwijania).

W rozdziale traktującym densytometrię autor określa tę metodę jako szybką i dokładną, pozwalającą oznaczyć badane substancje bezpośrednio po rozdziale bez dodatkowej, powodującej straty elucji. Autor rozpatruje trudności w zastosowaniu densytometrii do chromatogramów cienkowarstwowych ze względu na wpływ samego adsorbentu przy odczytach. *Jänchen* podkreślił zalety metod fluorymetrycznych w ilościowych oznaczeniach na chromatogramach cienkowarstwowych, w oparciu o porównanie wyników uzyskiwanych przy zastosowaniu czterech metod optycznych *in situ* (densytometrycznej, reemisyjnej czyli pomiaru światła odbitego, fluorescencyjnej i wygaszenia fluorescencji). Rysunki aparatury i opisy oraz tabele na przykładach nukleotydów, DNA, aminokwasów i alkaloidów uzupełniają ten cenny rozdział. Na przykładach z praktyki farmaceutycznej *Jork* podnosi zalety metody bezpośredniej spektrofotometrii do oznaczeń substancji na chromatogramach cienkowarstwowych. Autor stwierdził blisko dziesięciokrotnie większą czułość tej metody w porównaniu do metod elucyjnych. Do tych celów potrzebny jest spektrofotometr specjalnie przystosowany do odczytów na chromatogramach. Aparaturę i technikę oznaczeń radioaktywności na chromatogramach cienkowarstwowych, różne typy detektorów między innymi i komorę iskrową opisują *Wood*, *Lowe* i *Pullan* w trzech ostatnich rozdziałach.

W tak niewielkiej, a tak zwięźle opracowanej książce znajduje się wiele cennego materiału dla czytelnika i odbiorcy, przed którym nie ukrywa się trudności większości metod ilościowych adaptowanych do chromatogramów. Wszyscy autorzy podkreślają wyższość metod bezpośrednich odczytów z chromatogramów w porównaniu z metodą elucji. Wszyscy stwierdzają, że zarówno w technice bezpośredniej jak i elucyjnej niezbędne jest dokładne wyeliminowanie wpływu bibuły i adsorbentu. Ponadto obowiązuje precyzja mikropipet w odmierzeniu startowych objętości, uzyskanie możliwie

najlepszego rozdziału plam i homogenność w ich kształtach. Na obecnym etapie rozwoju metod chromatograficznych i ich przystosowywania do oznaczeń ilościowych monografię *Shellarda* należy zaliczyć do najcenniejszych.

*J. Opieńska-Blauth*

**A. B. Roy and P. A. Trudinger, The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur, Cambridge University Press, 1970, stron 388**

Biochemia siarki budzi coraz większe zainteresowanie usprawiedliwione zasadniczym znaczeniem tego pierwiastka dla organizmów żywych. Na plan pierwszy badań wysuwa się udział siarki w budowie białek, ale i inne organiczne jej związki są przedmiotem badań i są coraz dokładniej poznawane. Jest oczywiste, że metabolizm nieorganicznych związków siarki pozostaje w ścisłej łączności z metabolizmem związków organicznych, jednak obecne wiadomości w tym zakresie stale jeszcze nie są kompletne. W tym aspekcie monografia Roya i Trudingera jest bardzo cenna, gdyż zbierając dotychczasowe osiągnięcia pozwala jednocześnie ocenić jak wiele zagadnień czeka jeszcze wyjaśnienia.

Książka podzielona jest na 13 rozdziałów o następujących tytułach: 1. Wstęp, 2. Chemia niektórych związków siarki, 3. Preparatyka niektórych ważnych biologicznie związków siarki 4. Analiza niektórych związków siarki 5. Aktywacja jonów siarczanowych 6. Sulfotransferazy 7. Sulfatazy 8. Rodanaza i siarkotransferaza 3-merkaptopirogronianowa 9. Utlenianie nieorganicznych związków siarki przez mikroorganizmy i rośliny 10. Redukcja nieorganicznych związków siarki przez mikroorganizmy i rośliny 11. Metabolizm nieorganicznych związków siarki u zwierząt 12. Chemia kliniczna nieorganicznych związków siarki 13. Aspekty ekonomiczne metabolizmu nieorganicznych związków siarki.

Książka napisana jest z doskonałą znajomością przedmiotu i w zwięzły ale jasny i precyzyjny sposób przedstawia węzłowe problemy metabolizmu nieorganicznych związków siarki. Niezwykle cennym uzupełnieniem jest obszerna bibliografia doprowadzona do roku 1968 i licząca około 1800 pozycji piśmiennictwa. Dla polskiego czytelnika szczególnie mile jest uwzględnienie przez australijskich badaczy prac polskich autorów. Bez przesady można powiedzieć, że książka ta zawiera tak obszerną bibliografię prac polskich badaczy, że może dla nas samych służyć do oceny polskiego wkładu w tej dziedzinie biochemii.

*T. Szczepkowski*



## SPRAWOZDANIA

### VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

W dniach 28—30 maja 1970 roku odbył się w Szczecinie z udziałem 550 uczestników doroczny Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W ramach Zjazdu odbywały się dwa Sympozja: „Izoenzymy” i „Utleniania biologiczne”. Zjazd otrzymał szczególnie uroczystą oprawę w związku z obchodami 25-lecia Nauki Polskiej na Pomorzu Szczecińskim.

Otwarcie Zjazdu nastąpiło w Sali Koncertowej Filharmonii Szczecińskiej. Otwarcia Zjazdu dokonał doc. dr Eugeniusz Łempicki — Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego. W imieniu Władz Wojewódzkich i Komitetu Honorowego wszystkich gości powitał Protektor Zjazdu — Przewodniczący WRN Marian Łempicki. Przewodnicząca Zarządu Głównego P. T. Bioch. prof. dr Zofia Zielińska podziękowała gospodarzom za gościnność i Władzom za opiekę nad Zjazdem i w krótkiej charakterystyce dziesięcioletniej działalności Szczecińskiego Oddziału Towarzystwa dokonała pozytywnej oceny środowiska i jego działaczy.

Część plenarną Zjazdu zamknęły dwa referaty naukowe, w których prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen przedstawiła współczesny stan badań nad izoenzymami, a dr W. Hendrich mówił o fotoredukcji chlorofilu w fotochemicznym stadium fotosyntezy.

28 maja w godzinach popołudniowych rozpoczęły się w budynku Powiatowej Rady Narodowej obrady w sześciu sekcjach.

Symposium „Izoenzymy” odbywało się w trzech sesjach. W pierwszej po referacie M. Kochmana pt. „Ontogenetyczne i filogenetyczne aspekty struktury i funkcji izoenzymów” wygłoszono 4 komunikaty dotyczące teoretycznych zagadnień heterogenności enzymów. Drugą sesję poświęconą zagadnieniom metodyki w badaniach nad izoenzymami, w której przedstawiono 10 komunikatów poprzedził referat S. Lewaka i A. Rychter p.t. „Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym jako metoda badania izoenzymów w materiale roślinnym”. Trzecią sesję z 6 komunikatami poświęconymi diagnostycznej roli izoenzymów otworzył referat J. Gregorczyka i B. Więckowskiego: „Izoenzymy w diagnostyce klinicznej”.

Symposium „Utleniania biologiczne” przeprowadzono w 4 sesjach przy czym w dwóch przedstawiono ogółem 32 komunikaty, a na pozostałe dwie złożyło się 8 referatów: L. Wojtczaka — Transport metabolitów i jonów między mitochondriami a cytoplazmą; rola błon mitochondrialnych; S. Angielskiego — Współdziałanie mitochondriów i cytoplazmy w przemianie kwasów tłuszczowych; M. Gumińskiej — Regulację glikogenolitycznej drogi wytwarzania energii; K. Raczyńskiej-Bojanowskiej — Karboksylazy współdziałające z biotyną jako układy regulatorowe; Z. Kaniugi i B. Frąckowiak — Fotosyntetyczny transport elektronów i synteza ATP w chloroplastach; J. Michejdy — Mikrosomalny transport elektronów; M. Toczko — Reakcje hydroksylacji u mikroorganizmów i B. Zagadlaka — Udział korynoidów w reakcjach oksydoredukcyjnych.

Zarówno referaty jak i komunikaty sympozjalne prezentowały w stopniu zadowalającym obecny stan badań w Polsce, a duża frekwencja na obradach w pełni satysfakcjonowały organizatorów jak i prelegentów.

W 16 sesjach czterech pozostałych sekcji Zjazdu wygłoszono ogółem 133 komunikaty, których tematyka dotyczyła szczególnie często: enzymów, białek i kwasów nukleinowych. Z profilu tych prac i dyskusji wynika, że w okresie poprzedzającym Zjazd była to tematyka wiodąca w większości placówek w kraju.

Dyskusje w znacznej większości sesji były żywe, zdyscyplinowane w czasie i wielokrotnie kontynuowane w szeroko rozbudowanych kuluarach Zjazdu.

Kontakty naukowe i kuluarowe uczestników Zjazdu były żywe i szczególnie korzystne dla środowiska gospodarzy, którzy dorobek i problematykę badań własnych pracowni przedstawili w wydanym z okazji Zjazdu informatorze.

Na terenie obrad czynna była wystawa aparatury f-my *Unipan*, *Paul Brunning*, *Radiometr*, *Pharmacia* i *LKB*. Zainteresowanie wystawami było duże.

Na program towarzyski Zjazdu złożyły się: dwugodzinny, wieczorny spacer wszystkich uczestników Zjazdu statkiem po Odrze i Porcie Szczecińskim w pierwszym dniu; w drugim dniu koncert orkiestry kameralnej Filharmonii Szczecińskiej i koncert chóru Politechniki Szczecińskiej w sali ks. Bogusława Zamku Książąt Pomorskich, oraz wieczór towarzyski w sali winiarni zamkowej; trzeciego dnia odbyły się wycieczki podmiejskie, a 31 maja na trasach nadmorskich.

W ocenie zarówno strony naukowej jak i organizacyjno-towarzyskiej Zjazd spotkał się z życzliwym przyjęciem znacznej większości uczestników co było najpiękniejszym podziękowaniem dla szeregu organizatorów.

Z. Machoy i J. Gregorczyk

## VIII Międzynarodowy Kongres Biochemii w Szwajcarii, Interlaken

Kongres odbywał się jednocześnie w trzech miejscowościach: w *Interlaken*, *Lucernie* i *Montreux*.

Obrady w *Interlaken* obejmowały 4 Sympozja: Sympozjum Nr 1 — Struktura białka, Sympozjum Nr 2 — Reaktywność białka, Sympozjum Nr 3 — Mechanizm reakcji enzymatycznych, Sympozjum Nr 10 — Immunochemia. W ramach każdego Sympozjum wygłaszane były 20—40-minutowe referaty oraz 10—15-minutowe komunikaty. Zarówno referaty jak i komunikaty wygłaszali wyłącznie zaproszeni przez organizatorów prelegenci.

Poszczególne Sympozja poświęcone były następującym tematom:

### Sympozjum Nr 1

1. Hemoglobiny zbudowane z identycznych łańcuchów
2. Hemoglobiny zbudowane z 2-ch rodzajów łańcuchów
3. Cytochromy
4. Białka mięśniowe I
5. Białka mięśniowe II

### Sympozjum Nr 2

1. Enzymy monomeryczne, struktura przestrzenna i aktywność I
2. Enzymy monomeryczne, struktura przestrzenna i aktywność II
3. Reaktywność na granicy faz białko/rozpuszczalnik I
4. Reaktywność na granicy faz białko/rozpuszczalnik II
5. Badanie struktury białka za pomocą specyficznych reakcji
6. Synteza peptydów i białek

### Sympozjum Nr 3

1. Dehydrogenazy pirydynowe
2. Enzymy tworzące zasady Schiffa z substratami

3. Izomery tryozofosforanów
4. Dehydrogenazy  $\alpha$ -ketokwasów
5. Syntetaza glutaminy
6. Ogólne aspekty i nowe metody badania mechanizmu reakcji enzymatycznych  
Symposium Nr 10

1. Struktura immunoglobulin
2. Biosynteza immunoglobulin i immunogenetyka
3. Przeciwciała
4. Przeciwciała o ograniczonej heterogenności i przeciwciała na enzymy
5. Antygeny
6. Dopełniacz

Zakres omawianych zagadnień był bardzo szeroki i nie sposób przedstawić w krótkim sprawozdaniu wszystkich interesujących wyników. Z tego względu poszczególne Sympozja będą omawiane w bardzo dużym skrócie z podaniem w sposób subiektywny tylko niektórych omawianych zagadnień.

*Symposium Nr 1.* Przedstawiono wyniki porównawczych badań hemoglobin uzyskiwanych z różnych źródeł, działanie różnych efektorów allosterycznych oraz wpływ efektów kooperatywnych na aktywności hemoglobiny. Badania cytochromu c z konia za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej wykazały niską zawartość struktury spiralnej w tym białku. Cytochrom c zawiera hydrofobowy „worek”, w którym znajduje się reszta hemu.

W zakresie białek mięśniowych przedstawiono wyniki dotyczące oddziaływania między łańcuchami lekkimi i ciężkimi miozynu oraz między aktynem i miozynnem. Omawiano również regulatorowe białka mięśniowe typu troponiny. Zarówno aktyn jak i miozyn zawierają metylowane aminokwasy: 3-metylo-histydynę,  $\epsilon$ -N-metylolizynę i trójmetylolizynę. Jakkolwiek w chwili obecnej rola tych aminokwasów nie jest znana, istnieją jednak przesłanki sugerujące, że mogą być one regulatorami aktywności aktynu, a w szczególności miozynu.

*Symposium Nr 2 i Symposium Nr 3.* Ze względu na podobny charakter poruszanych problemów oba Sympozja mogą być omawiane razem.

Przedstawiono wyniki badań rentgenograficznych pepsyny, nukleazy gronkowcowej i dehydrogenazy alkoholowej z wątroby konia. Wiele prac poświęconych było badaniom aktywnych obszarów enzymów za pomocą specyficznych reagentów oraz oddziaływaniem między podjednostkami. Przedstawiono również wyniki potwierdzające istnienie kowalencyjnie związanych  $\alpha$ -ketokwasów (kwas pirogronowy,  $\alpha$ -ketomasłowy) w niektórych enzymach należących do reduktaz (reduktaza prolina), dekarboksylaz (dekarboksylaza histydyny) i deaminaz (deaminaza histydyny i fenyloalaniny). Ketokwasy te odgrywają istotną rolę w mechanizmie reakcji katalizowanych przez te enzymy.

Opisano również interesującą metodę badania struktury i mechanizmu działania enzymów, polegającą na badaniu dyspersji skręcalności optycznej białek zmodyfikowanych za pomocą różnych związków dwuazoniowych. Wprowadzenie takich ugrupowań w białka powoduje powstanie dodatkowych efektów Cottona. Wielkość tych efektów zależy w dużym stopniu od charakteru aminokwasów, będących w pobliżu wprowadzonych grup. Jeżeli wprowadzone ugrupowanie azowe znajduje się w obszarze aktywnym badanego enzymu lub w jego pobliżu można obserwować duże zmiany w wartości efektu Cottona, wywołane wiązaniem substratu lub inhibitora i będące wskazaniem możliwości zachodzenia zmian konformacyjnych przy oddziaływaniu enzym-substrat lub enzym-inhibitor. Metoda ta pozwala również na uzyskiwanie interesujących wyników w przypadku badań aktywacji zymogenów.

W czasie Symposium wielu badaczy podkreślało konieczność zachowania bardzo dużej ostrożności przy interpretacji krzywych dyspersji skręcalności optycznej i di-

chroizmu kołowego. Przedstawiono wyniki badań białek, których struktura przestrzenna została dokładnie zbadana za pomocą wielu metod, łącznie z badaniami rentgenograficznymi. Wyniki te wskazują, że nie można bezkrytycznie przenosić wyników badań poliaminokwasów na białka, szczególnie gdy badane białka posiadają niską zawartość struktury spiralnej i struktury  $\beta$ .

*Symposium Nr 10.* Uczestnicy Symposium przedstawili wyniki ostatnich badań sekwencji aminokwasów immunoglobulin. Badania te są bardzo istotne dla wyjaśnienia zagadnień związanych z powstawaniem i ewolucją przeciwciał, jak również dla wyjaśnienia zależności między budową i specyficznością przeciwciał. Badania obszarów aktywnych w przeciwciałach przeprowadzano głównie za pomocą modyfikacji przez powinowactwo (ang. *affinity labelling*). Metodę tę stosowano również do badania immunoglobulin związanych trwale z komórkami rozpoznającymi antygeny. Wydaje się, że struktura obszarów aktywnych tych immunoglobulin (klasy IgG) jest identyczna ze strukturą obszarów aktywnych przeciwciał krążących, skierowanych przeciw temu samemu antygenowi.

Metoda chromatografii przez powinowactwo (ang. *affinity chromatography*) została wykorzystana do rozdziału komórek rozpoznających antygeny oraz produkujących przeciwciała.

W przypadku przeciwciał skierowanych przeciw różnym antygenom istnienie reakcji krzyżowych zostało wykorzystane jako wskazówka istnienia homologii strukturalnych między antygenami. Metoda może oddać duże usługi w badaniu struktury enzymów.

Wyniki prac poświęconych badaniom biosyntezy immunoglobulin wskazują, że sposób tworzenia mostków dwusiarczkowych między łańcuchami lekkimi i ciężkimi zależy od klasy immunoglobulin i od zwierzęcia; w pierwszym etapie mogą się łączyć łańcuchy ciężkie między sobą i do nich następnie przyłączać łańcuchy lekkie, albo też mogą powstawać dimery łańcuchów ciężkich z lekkimi, które następnie łączą się na pełne drobinę immunoglobulin.

Trudności w uzyskaniu krystalicznych immunoglobulin były przyczyną, że nie przeprowadzono dotychczas badań strukturalnych za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej. W ostatnich latach udało się uzyskać krystalizujące immunoglobuliny IgG od osobników z *myeloma*. Otrzymano również w krystalicznej formie fragmenty Fab, Fab' i Fc. Obrazy dyfrakcyjne fragmentów Fc, uzyskanych od różnych osobników były identyczne lub prawie identyczne. Fragmenty Fab otrzymane od trzech osobników wykazywały różne obrazy dyfrakcyjne. Kryształy fragmentów Fab' były izomorficzne z kryształami fragmentów Fab.

Józef Lisowski

### **Bioenergetyka i mechanizmy regulacyjne metabolizmu na VIII Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Szwajcarii (3—9 wrzesień 1970) i Kolokwium Bioenergetycznym we Włoszech (11—14 wrzesień 1970)**

Ósmy Międzynarodowy Kongres Biochemiczny miał odbyć się latem 1970 r. w Rzymie. Jednakże na skutek rezygnacji Włoskiego Towarzystwa Biochemicznego z organizacji Kongresu postanowiono na wniosek Szwajcarskiego Towarzystwa Biochemicznego, że miejscem Kongresu będzie Szwajcaria. Chcąc utrzymać w całości wcześniej zaplanowany bogaty program naukowy, a także dotrzymać terminu Kongresu, organizatorzy zmuszeni byli wprowadzić kilka poważnych innowacji organizacyjnych. Jedną z nich było rozmieszczenie obrad w trzech różnych miastach: *Lucerne*, *Interlaken* i *Montreux*. Dość znaczne odległości między tymi miejscowościami



praktycznie uniemożliwiały jednoczesne uczestniczenie w sympozjach odbywających się w różnych miastach. Jedynie w połowie Kongresu przewidziano wolny dzień dla umożliwienia uczestnikom zmiany miejsca obrad. Mniejsze były również możliwości spotkań i dyskusji, szczególnie pomiędzy przedstawicielami różnych specjalności biochemicznych. Z drugiej jednak strony rozdzielenie Kongresu na poszczególne sympozja, odbywające się w różnych miejscowościach, wprowadziło atmosferę spokoju i skupienia. Nie było tak charakterystycznych dla dużych zjazdów ustawicznych wędrówek między salami obrad.

Drugą innowacją w stosunku do poprzednich kongresów biochemicznych, podyktowaną również względami organizacyjno-technicznymi, było zaniechanie publikacji sprawozdań kongresowych. Materiały kongresowe zawierały jedynie program i streszczenia wystąpień zaproszonych referentów. Nie opublikowano natomiast streszczeń krótkich doniesień, jak również organizatorzy Kongresu nie przewidują publikacji pełnego tekstu referatów programowych. Referaty te były jednak rejestrowane na taśmie wideofonicznej i w takiej postaci mogą być udostępnione. Odtwarzanie taśmy następuje przy pomocy specjalnej przystawki do telewizora, a koszt pełnego kompletu taśm wynosi około 1300 dol. USA. System ten funkcjonował również w czasie trwania Kongresu, co w pewnym stopniu umożliwiało śledzenie obrad odbywających się w różnych miejscowościach.

Na Kongres złożyło się 10 następujących sympozjów:

1. Budowa białek (*Interlaken*),
2. Reaktywność białek (*Interlaken*),
3. Mechanizmy działania enzymów (*Interlaken*),
4. Utlenianie biologiczne i bioenergetyka (*Lucerna*),
5. Kwasy nukleinowe i synteza białek, I (*Montreux*),
6. Synteza białek i kwasy nukleinowe, II (*Montreux*),
7. Regulacje biochemiczne (*Lucerna*),
8. Struktury komórkowe i układy wieloenzymatyczne (*Montreux*),
9. Biochemia rozwoju i różnicowania (*Montreux*),
10. Immunochemia (*Interlaken*).

We wszystkich sympozjach Kongresu wzięło udział łącznie około 3500 uczestników. Najliczniej reprezentowane były spoza Europy: Stany Zjednoczone Ameryki, Japonia i Izrael, z krajów europejskich: N.R.F., Wielka Brytania, Szwecja i Holandia. Polscy biochemicy przybyli na Kongres w liczbie 10 osób. Stanowiło to poniżej 0,3% ogółu uczestników. Delegacją polską była jedną z najmniej licznych delegacji z krajów Europy. Skład jej został ustalony przez kompetentne czynniki dopiero na kilka tygodni przed rozpoczęciem Kongresu, co nie tylko podniosło koszty wyjazdu (dwukrotne podwyższenie wpisowego, konieczność rezerwacji drogich hoteli), lecz także praktycznie uniemożliwiło zgłoszenie doniesień (tylko jeden uczestnik polski przedstawił komunikat kongresowy).

Bezpośrednio po Kongresie odbyło się w *Pugnochiuso* w południowych Włoszech czterodniowe kolokwium pod tytułem „Przekazywanie energii w procesach oddychania i fotosyntezy”. Kolokwium to miało charakter spotkania „satelitarnego” w stosunku do Sympozjum 4 Kongresu i ściśle się z nim wiązało tematycznie.

Na Sympozjum bioenergetyczne (4) Kongresu w Szwajcarii złożyło się 16 referatów zaproszonych mówców i ponad 30 komunikatów. Sympozjum<sup>7</sup> (regulacje biochemiczne) obejmowało 17 referatów i około 80 komunikatów. Kolokwium w *Pugnochiuso* zgromadziło około 100 uczestników, z których prawie każdy referował swoje prace.

Niniejszy reportaż nie jest pełnym sprawozdaniem. Porusza on te zagadnienia, które piszącemu te słowa wydały się bardziej interesujące lub reprezentatywne dla obrad 4 i 7 Sympozjum Kongresu w Szwajcarii oraz kolokwium bioenergetycznego

w *Pungochiuso*. Niektóre problemy zostały pominięte, np. fotofosforylacja, która zasługuje na oddzielne, obszerniejsze omówienie.

W centrum bioenergetyki pozostaje nadal problem przekształcania energii utleniania na inne, użyteczne formy energii. Obecny stan informacji o tzw. czynnikach sprzężenia energetycznego (ang. *coupling factors*) zreferował na Kongresie *D. R. Sanadi*. Była to próba uporządkowania i usystematyzowania dotychczas wykrytych czynników. Kilka z nich, między innymi czynniki  $F_1$  i  $F_0$  Rackera oraz A, B i D Sanadiego, zostały znacznie oczyszczone, a ich działanie dość ściśle określone. Mechanizm działania, a zatem i mechanizm sprzężenia transportu elektronów z syntezą ATP, pozostaje nadal niezrozumiały.

Jedną z form wykorzystania energii utleniania jest praca osmotyczna. Referaty *E. J. Harrisa*, *E. Quagliariello* i *S. Papy* podsumowały obecny stan wiedzy o transporcie jonów i metabolitów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Motorem transportu jest „pompa protonowa” ściśle sprzężona z transportem elektronów w łańcuchu oddechowym. Dzięki obecności we wnętrzu mitochondriów określonej ilości kationów (głównie  $K^+$ ) oraz alkalicznemu odczynowi, spowodowanemu usuwaniem na zewnątrz protonów, zachodzi w mitochondriach akumulacja fosforanu. Jony fosforanowe z kolei wymieniają się na jony kwasów dwukarboksylowych, wśród nich — jony ważnych metabolitów mitochondrialnych, jak jabłczan i bursztynian. Jony kwasów dwukarboksylowych mogą dalej wymieniać się na jony kwasów trójkarboksylowych, na przykład cytrynianu i jony ketokwasów, na przykład  $\alpha$ -ketoglutaranu.

Ściśle zależny od energii jest również transport jonów  $Ca^{2+}$  w mitochondriach. *A. L. Lehninger* omówił ostatnie badania nad czynnikiem białkowym wyizolowanym z błon mitochondrialnych i warunkującym wiązanie i prawdopodobnie transport wapnia.

Zgodnie z „chemiosmotyczną” teorią sprzężenia energetycznego (*P. Mitchell*) synteza ATP w mitochondriach uwarunkowana jest istnieniem różnicy  $pH$  po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej. *V. P. Skulachev* przedstawił badania wykazujące, że działanie rozprzęgające mają nie tylko substancje znoszące różnicę stężeń jonów  $H^+$  (czyli gradient  $pH$ ), ale także związki znoszące tylko różnicę potencjału elektrycznego bez naruszania gradientu  $pH$ .

Nowe światło na mechanizm sprzężenia zdają się rzucać ostatnie badania zespołów kierowanych przez *Chance'a* i *Slatera* nad nową formą cytochromu *b*. Forma ta różni się od „normalnego” cytochromu *b* nie tylko widmem absorpcyjnym, lecz także potencjałem oksydoredukcyjnym. Jak postulują autorzy, chodzi tu o wysokoenergetyczną formę cytochromu *b*, biorącą bezpośredni udział w procesie sprzężenia energetycznego.

Szeroko omawiane było stosowanie tzw. testu fluorescencyjnego. Chodzi tu o barwniki, np. sulfonian anilino-naftalenowy, które wiążąc się z błoną lipoproteidową mitochondriów lub cząstek submitochondrialnych zmieniają swą fluorescencję. Zmiana ta zależy od zmian hydrofobowych oddziaływań w obrębie błony i, jak się uważa, jest skorelowana ze stanem funkcjonalnym i energetycznym cząstek. Jak wykazała dyskusja, brak dotychczas jasnego poglądu na mechanizm tych zmian, a zatem i interpretacja testu fluorescencyjnego nie jest łatwa.

Ostatni rok przyniósł interesujące dane o usytuowaniu łańcucha oddechowego w obrębie wewnętrznej błony mitochondrialnej. Badania w pracowniach *Rackera*, *Chance'a* i *Klingenberga* wykazały, że enzymy flawinowe łańcucha oddechowego zlokalizowane są po wewnętrznej stronie błony, cytochrom *c* po jej stronie zewnętrznej, natomiast oksydaza cytochromowa i cytochromy *b* i  $c_1$  w środkowych warstwach błony\*.

Z zakresu regulacji metabolizmu komórkowego i jego związku z procesami energetycznymi na wspomnienie zasługują interesujące referaty *L. J. Reeda* na temat dehydrogenazy pirogronianowej i *E. G. Krebsa* o kontroli glikolizy i glukoneogenezy.

Utlenianie pirogronianu jest, jak wiadomo, katalizowane przez kompleks wieloenzymatyczny, którego jednym ze składników jest dehydrogenaza pirogronianowa. Jak wykazały najnowsze badania, enzym ten u ssaków może występować w formie ufosforylowanej i nieufosforylowanej, przy czym tylko ta ostatnia jest aktywna. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej zawiera, oprócz enzymów biorących udział w utlenianiu pirogronianu, także kinazę katalizującą fosforylację dehydrogenazy, jak i fosfatazę, katalizującą jej defosforylację. Ponieważ donatorem reszty fosforanowej dla fosforylacji jest ATP, natomiast ADP działa hamująco, zatem fosforylacja dehydrogenazy, a więc jej unieczynnienie, zależy od stosunku ATP:ADP. Tak więc stan energetyczny komórki reguluje czynność tego enzymu. Jest to zatem jeszcze jeden mechanizm regulacji cyklu Krebsa.

Fosforylacja i defosforylacja białek enzymatycznych spełnia również regulacyjną rolę w glikolizie i glukoneogenezie. Badania w tym zakresie, zreferowane przez *E. G. Krebsa*, wskazują, że zarówno aktywacja syntezy glikogenu jak i fosforolizy glikogenu polega na fosforylacji czynnych w tych procesach enzymów. Fosforylacja fosforylasy katalizowana jest przez specyficzną kinazę, która z kolei wymaga również fosforylacji, aby mogła być aktywna. Ta dwustopniowa aktywacja wymaga obecności niskich stężeń jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Tak więc wapń odgrywa pośrednio decydującą rolę w uruchamianiu fosforolizy glikogenu, procesu zapoczątkowującego reakcje glikolizy niezbędne dla produkcji energii, między innymi w pracującym mięśniu.

Obrady Sympozjum 4 i 7 oraz kolokwium bioenergetycznego były dobrą ilustracją tego, jak szeroki wachlarz zagadnień obejmuje współczesna bioenergetyka: od oddziaływań na poziomie molekularnym do regulacji przemian na poziomie komórkowym. Widoczne również było, jak dalecy jeszcze jesteśmy od rozwiązania wielu podstawowych zagadnień, np. sprzężenia transportu elektronów z procesem zachowania energii. Stało się również jasne, że postęp w wyjaśnieniu tych problemów możliwy będzie tylko dzięki zastosowaniu nowych technik badawczych, wymagających użycia niezwykle subtelnej, skomplikowanej i kosztownej aparatury.

*L. Wojtczak*

\*) Obszerniejsze informacje na temat enzymatycznej organizacji błon mitochondrialnych znajdzie Czytelnik w artykule zamieszczonym w *Postęпах Biochemii* 17, 209 (1971).



## SPIS TREŚCI

J. Malec—Błona jądrowa . . . . .	195
L. Wojtczak—Enzymatyczna organizacja błon mitochondrialnych . . . . .	209
S. Klita—Retikulum endoplazmatyczne a biosynteza białka . . . . .	225
B. Frąckowiak—Struktura i funkcja błon chloroplastów . . . . .	235
W. Rossowski—Budowa antygenowa błon komórek zwierzęcych . . . . .	249
T. Sawicka, A. Piasek—Heteropolisacharydy zwierzęcych błon komórkowych . . . . .	275
W. Janiszewska Z. Wojciechowski—Biosynteza polisacharydów ściany komórkowej roślin wyższych . . . . .	291
Z. Ruczaj—Antybiotyki inhibitorami biosyntezy ściany komórkowej bakterii	305
S. Szmigielski—Biochemia aktywnego transportu jonów sodu i potasu	321
G. Dudek—Udział białek w transporcie przez błony komórkowe . . . . .	333
K. Wiśniewski—Insulina a proces transportu przez błony komórkowe . . . . .	347
Recenzje książek (Z. Kasprzyk, E. Lenartowicz, E. Wałajtys, A. Wojtczak, A. Morawiecki, J. Opieńska-Blauth, T. Szczepkowski) . . . . .	359
VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie (Z. Machoy, J. Gregorczyk) . . . . .	367
VIII Międzynarodowy Kongres Biochemii w Szwajcarii, Interlaken (J. Lisowski)	368
Bioenergetyka i mechanizmy regulacyjne metabolizmu na VIII Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Szwajcarii i Kolokwium bioenergetycznym we Włoszech (L. Wojtczak) . . . . .	370

W 3-cim zeszycie 17-tego tomu ukażą się:

1. Budowa wieloskładnikowych kompleksów enzymatycznych, D. Sołtysiak-Pawłuczuk
2. Regulacja glukoneogenezy cz. I, J. Bryła
3. Metabolizm kwasów siałowych, ich prekursorów i pochodnych, T. Szymczyk, M. Jachimowicz
4. Liza pektynianowa, M. Wojciechowicz
5. Arginaza z tkanek ureotelicznych i urikotelicznych kręgowców, Z. Porembaska
6. Wykorzystanie mocznika przez organizmy nie zawierające ureazy, K. Kleczkowski
7. Synergizm żelaza i miedzi w organizmie, J. Skorkowska-Zieleniewska
8. Poliprenole, G. Turowska
9. Bezpośrednia translacja DNA w układach bezkomórkowych, E. Lenartowicz, S. Klita
10. Inicjacja biosyntezy białka u organizmów eukariotycznych, E. Gąsior

## Postępy Biochemii

April 1971

### ARTICLES IN POLISH

#### Volume 17

#### Number 2

J. Malec—Nuclear Envelope (Dep. Biochem. Inst. Hematol., Warszawa) . . .	195
L. Wojtczak—Enzymic Organization of Mitochondrial Membranes (Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	209
S. Klita—Endoplasmic Reticulum and the Biosynthesis of Protein (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	225
B. Frąckowiak—The Structure and Function of Chloroplast Membranes (Dep. Enzym. Inst. Biochem. Univ., Warszawa) . . . . .	235
W. Rossowski—Antigenic Membrane Structure of Animal Cells (Inst. Nucl. Res., Warszawa) . . . . .	249
T. Sawicka, A. Piasek—Heteropolisaccharides of Plasma Membranes (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa; Dep. Biochem. Inst. Hematol., Warszawa) . . . . .	275
W. Janiszowska, Z. Wojciechowski—The Biosynthesis of the Cell Wall Polysaccharides in Higher Plants (Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	291
Z. Ruczaj—Antibiotics—Inhibitors in Biosynthesis of the Bacterial Cell-Wall (Dep. Biochem. Inst. of Antibiotics, Warszawa) . . . . .	305
S. Szmiągowski—Biochemistry of Active Transport of $\text{Na}^+$ and $\text{K}^+$ Ions (Air Forces Med. Inst., Warszawa) . . . . .	321
G. Dudek—The Role of Proteins in Transport through the Cell Membranes (Inst. Nucl. Res., Warszawa) . . . . .	333
K. Wiśniewski—Insuline and the Transport through the Cell Membranes (Dep. Pharmacol. Med. School, Białystok) . . . . .	346
Chronicle . . . . .	359

Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., Podręcznik Biochemii, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np.: Schneider W.C., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.

## SPIS TREŚCI

J. Malec — Błona jądrowa . . . . .	195
L. Wojtczak — Enzymatyczna organizacja błon mitochondrialnych . . . . .	209
S. Klita — Retikulum endoplazmatyczne a biosynteza białka . . . . .	225
B. Frąckowiak — Struktura i funkcja błon chloroplastów . . . . .	235
W. Rossowski — Budowa antygenowa błon komórek zwierzęcych . . . . .	249
T. Sawicka, A. Piasek — Heteropolisacharydy zwierzęcych błon komórkowych . . . . .	275
W. Janiszowska Z. Wojciechowski — Biosynteza polisacharydów ściany komórkowej roślin wyższych. . . . .	291
Z. Ruczaj — Antybiotyki inhibitorami biosyntezy ściany komórkowej bakterii . . . . .	305
S. Szmigielski — Biochemia aktywnego transportu jonów sodu i potasu . . . . .	321
G. Dudek — Udział białek w transporcie przez błony komórkowe . . . . .	333
K. Wiśniewski — Insulina a proces transportu przez błony komórkowe . . . . .	347
Recenzje książek (Z. Kasprzyk, E. Lenartowicz, E. Wałajtys, A. Wojtczak, A. Morawiecki, J. Opieńska-Blauth, T. Szczepkowski) . . . . .	359
VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie (Z. Machoy, J. Gregorczyk). . . . .	367
VIII Międzynarodowy Kongres Biochemii w Szwajcarii, Interlaken (J. Lisowski) . . . . .	368
Bioenergetyka i mechanizmy regulacyjne metabolizmu na VIII Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Szwajcarii i Kolokwium bioenergetycznym we Włoszech (L. Wojtczak) . . . . .	370