

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 2 · NR 2

1975 (109—180)

**Postępy
Biologii
Komórki**

PWN — WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

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

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział Wrocław 1975

Wydanie I. Nakład 372 + 118 egz. Ark. wyd. 6,25. Ark. druk. 4,5 + 3 wkl. Papier druk. sat.
III kl. 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 25 III 1975 r. Podpisano do druku w lipcu 1975 r.
Druk ukończono w lipcu 1975 r. Zam. 2153/75. — A-15. Cena zł 20,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

NATURALNE GLIKOKORTYKOIDY A METABOLIZM KOMÓRKI WĄTROBOWEJ

Joachim HEPA, Leszek KOCHAŃSKI i Józef STANOSEK

Zakład Biochemii, Instytut Biologiczno-Fizjologiczny,
Śląska Akademia Medyczna, Katowice

Streszczenie. Pierwszym etapem w mechanizmie działania glikokortykoidów jest ich wniknięcie do cytoplazmy komórki wątrobowej a następnie do jądra. W procesie tym bardzo dużą rolę odgrywają białka receptorowe, swoiście wiążące te hormony. Receptory występują zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórki. Po wniknięciu glikokortykoidów do wnętrza jądra, wchodzi one w interakcję z chromatyną, wywierając bezpośredni wpływ na materiał genetyczny komórki. Po połączeniu się z chromatyną jądrową, powstały kompleks chromatyna-hormon stymuluje biosyntezę specyficznych rodzajów mRNA. Dochodzi do pobudzenia biosyntezy de novo białek — a szczególnie enzymów — głównie procesów glikoneogenetycznych. Dochodzi do wzrostu ilości polisomów w komórce, a także do przedłużenia ich okresu półtrwania.

WSTĘP

Glikokortykoidy — mimo podobieństwa strukturalnego do innych hormonów sterydowych — wywierają w odróżnieniu od nich zasadniczo odmienny wpływ na komórki narządów docelowych. Już w początkach lat pięćdziesiątych zauważono, że hormony te inaczej działają na tkanki w obrębie układu limfatycznego, skóry, mięśni niż na narządy mięsiste (wątroba, nerka) [88]. W tkankach pierwszej grupy narządów glikokortykoidy wzmagają procesy kataboliczne, co uwidacznia się m. in. spadkiem masy ciała oraz ujemnym bilansem azotowym. Natomiast w wątrobie hormony te wywierają działanie anaboliczne, przejawiające się przyrostem wartości białek, lipidów i węglowodanów, a także kwasu rybonukleinowego [88]. W konsekwencji działanie ich doprowadza do przerostu poszczególnych komórek wątrobowych, co uwidacznia się wybitnym wzrostem względnej masy tego narządu (tzn. masy wątroby w gramach, jaka przypada na 100 gramów masy ciała zwierzęcia) [88].

Glikokortykoidy wywierają swój wpływ jedynie na komórki na-

rzędów docelowych. Narządy te mają zdolność wybiórczego wychwytywania tych hormonów. Hormony te ulegają nagromadzeniu głównie w wątrobie oraz w narządach układu limfatycznego. Stężenie hormonu w poszczególnych narządach do jego stężenia we krwi stanowi bardzo charakterystyczną wielkość. Wynosi ona odpowiednio: dla wątroby powyżej 3, dla narządów układu limfatycznego powyżej 1, dla pozostałych zaś narządów kształtuje się w granicach jedności bądź też przybiera wartość ułamkową — znacznie mniejszą od jedności [18]. Tak wybitne wychwytywanie hydrokortyzonu przez komórki wątrobowe zachodzi dzięki obecności w tych komórkach tzw. białek receptorowych. Białka te mają duże powinowactwo oraz wybiórczą swoistość wiązania glikokortykoidów.

I. WĄTROBOWE RECEPTORY GLIKOKORTYKOIDÓW

RECEPTORY CYTOPLAZMATYCZNE

W komórce wątrobowej glikokortykoidy nie są rozmieszczone równomiernie. W homogenatach wątroby najwyższy poziom hormonu stwierdzono we frakcji cytosolu oraz w mikrosomach [63]. Większa część podanych pozajelitowo glikokortykoidów — po wnikięciu do wnętrza komórki wątrobowej — ulega przemianie do nieaktywnych biologicznie metabolitów. Jedynie około 6–10% hormonu zostaje związane z białkiem receptorowym w postaci biologicznie czynnej [8, 54]. Takie białka receptorowe zostały wyizolowane również z cytosolu innych tkanek i narządów, jednak ich siła wiązania hormonu jest o wiele mniejsza. Tak dla przykładu białka receptorowe izolowane z cytosolu nerki wiążą połowę, a z cytosolu płuc i śledziony jedynie 1/10 tej ilości hormonu, jaka zostałaby związana przez białka receptorowe cytosolu wątroby [30]. Wyżej omawiane białka są czułe na działanie neuraminidazy [8], należą więc do glikoproteidów, zachowując te same własności zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [9].

Stosując różne techniki rozdziału białek, jak np. sączenie molekularne przy użyciu sefadeksów lub też ultrawirowanie, białka receptorowe rozdzielono na kilka frakcji różniących się ciężarem cząsteczkowym (200 000, 100 000, 50 000) [93].

Białka receptorowe wiążą zarówno kortyzol*, jak i syntetyczne glikokortykoidy. Z cytosolu adrenaektomizowanych szczurów wyizolowano trzy białka receptorowe, nazwane receptorami A, B i G. Dwa

* Kortyzol w rozumieniu hormonu endogennego — w odróżnieniu od hydrokortyzonu jako preparatu hormonalnego — w takim znaczeniu terminy te będą używane w pracy.

z tych białek, a mianowicie receptory A i B, wykazują bardzo duże powinowactwo i swoistość wiązania naturalnych glikokortykoidów, natomiast nie wiążą glikokortykoidów syntetycznych [48]. Receptor A występuje jedynie w cytosolu wątroby, natomiast receptor B spotykany jest również w innych narządach docelowych. Receptor B jest bardzo podobny — jeżeli nawet nie identyczny z transkortyną [10]. Trzecie białko, czyli receptor G, wykazuje duże powinowactwo i swoistość wiązania zarówno naturalnych, jak syntetycznych glikokortykoidów [10]. Własności fizykochemiczne tego receptora różnią się od właściwości receptorów A i B. Szczegóły zostały zestawione w tabeli 1.

Litwack i wsp. [55], biorąc za podstawę elucję w gradiencie KCl z kolumny „DEAE sephadex A-50”, podzielili wszystkie białka receptorowe cytosolu wątroby szczura na cztery klasy. Białka te — wiążące glikokortykoidy — autorzy oznaczyli kolejnymi cyframi rzymskimi I–IV. Receptory I i III wiążą pochodne siarczanowe glikokortykoidów, zaś receptory II i IV głównie niezmetabolizowane hormony. Receptor II wykazuje zróżnicowane powinowactwo do poszczególnych hormonów sterydowych. Powinowactwo to jest największe do deksameazonu, mniejsze do kortykosteronu, a najmniejsze do kortyzolu. Również kortyzon i dezoksykortykosteron są słabo wiązane przez to białko. Niektóre z własności fizykochemicznych zostały również zestawione w tabeli 1.

Zawartość białek receptorowych w komórce wątrobowej jest nam dziś znana. Z ogólnej ilości białek cytosolu — wynoszącej dla jednej komórki 5×10^{-7} mg — jedynie $2,5 \times 10^{-9}$ mg przypada na białko receptora II. Stanowi to po przeliczeniu $3,1 \times 10^5$ cząsteczek receptora na jedną komórkę [30]. Zakładając, że wyizolowany receptor nie jest całkowicie oczyszczony, autorzy przyjmują, że w komórce znajduje się średnio $3,1 \times 10^3$ cząsteczek receptora II, co stanowi 0,005% białka rozpuszczalnego komórki wątrobowej [30].

Oprócz charakterystyki fizykochemicznej białek receptorowych wprowadzane są również kryteria czynnościowe tych białek, ponieważ w komórce wątrobowej występuje również tzw. „ligandyna”, czyli białko wiążące glikokortykoidy nieswoiście [56]. Białko to jest identyczne z receptorem I według podziału Litwacka [55]. Wiąże ono oprócz hormonów sterydowych także takie substancje, jak bilirubinę, kancerogeny i sporą liczbę egzogennych anionów organicznych [56]. Uważa się także, że receptor I jest identyczny z białkiem wiążącym dwumetylaminoazobenzen [57], a także z substancją wielkocząsteczkową cytosolu wiążącą 3-metylocholanantren [91].

Już w początkach lat sześćdziesiątych wykazano, że indukcja aktywności aminotransferazy tyrozynowej pod wpływem hydrokortyzonu nie zachodzi w przypadku, gdy wcześniej podaje się puromycynę [33] lub aktynomycynę D [32]. Wzrost aktywności tego enzymu jest więc wyni-

TABELA 1. Własności receptorów glikokortykoidów komórki wątrobowej szczura

	Receptor			
	A	B	G	
x	termolabilne nie inaktywuje brak wpływu 7,4 brak wpływu denaturacja 0,15 M NaCl brak wpływu 0,06 M NaCl	termolabilne nie inaktywuje brak wpływu 7,9 brak wpływu denaturacja 0,15 M NaCl brak wpływu 0,12 M NaCl	termolabilne inaktywacja inaktywacja 7,4 spadek aktywności brak danych 0,15 M NaCl spadek aktywności 0,03 M NaCl 7S — 200 000 4S — 66 000	
	I	IV	II	
	40 000	50 000 — 60 000	67 000	
	—	0,23 M KCl	0,05 M KCl	
	8,9	4,3	6,7	
xx	III	IV	II	
	5 000 — 7 000	50 000 — 60 000	67 000	
	0,12 M KCl	0,23 M KCl	0,05 M KCl	
	5,4	4,3	6,7	
Cieężar cząsteczkowy				
Stała elucji z DEAE sephadex A-50				
Punkt izoelektryczny (PI)				

Uwaga: Receptory umieszczone w tych samych kolumnach są prawdopodobnie identyczne

x — oznaczenia wg Beato i wsp. [48, 10, 14, 43]

xx — oznaczenia wg Litwacka i wsp. [55]

kiem jego biosyntezy de novo, a wielkość tej biosyntezy zależy będzie od stopnia wysycenia receptora hormonem. Według zdania reprezentowanego przez niektórych autorów [6, 13], zależność taka mogłaby stanowić dogodne kryterium czynnościowe białek receptorowych.

Receptory glikokortykoidów zostały wyizolowane także z cytosolu wątroby świni i z komórek wątrobiaka. Charakterystyka tych receptorów jest jednak odmienna.

W wątrobie świni wykazano obecność dwóch białek receptorowych [95], natomiast w komórkach wątrobiaka — tylko jeden [7]. Ciężary cząsteczkowe receptorów z cytosolu wątroby świni wynoszą 130 000 i 70 000 a z komórek wątrobiaka — 150 000. Receptor glikokortykoidów z komórek wątrobiaka cechuje się ponadto zmienną stałą sedymentacji, zależną od stężenia jonów. Stała ta w niskich stężeniach jonów wynosi 7S, a wzrost stężenia jonów zmienia ją na 4S. Zjawisko to prawdopodobnie jest związane z rozpadem cząsteczki receptora na określone podjednostki. Enzymy proteolityczne znoszą całkowicie zdolność wiązania hormonu. Natomiast inne enzymy, jak np. DNAaza, RNAaza nie wywierają takiego wpływu [7]. Niektóre badania wskazują na to, że receptor ten jest bardzo podobny, a nawet identyczny z receptorem G (receptor II wg podziału Litwacka) wątroby szczura [89].

Z cytoplazmy glikokortykoidy są transportowane do jądra komórki [9]. Dużą rolę w transporcie wewnątrzkomórkowym tych hormonów odgrywa receptor cytoplazmatyczny G [14]. Białko to o ciężarze cząsteczkowym około 200 000 ma stałą sedymentacji 7S. Przy wzroście stężenia jonów białko receptorowe ulega przemianie do drobin mniejszej o ciężarze cząsteczkowym 66 000 i stałej sedymentacji 4S. W tej postaci wchodzi w reakcję z hormonem i jako kompleks „hormon-receptor” zostaje przeniesiony do jądra komórki [9, 12].

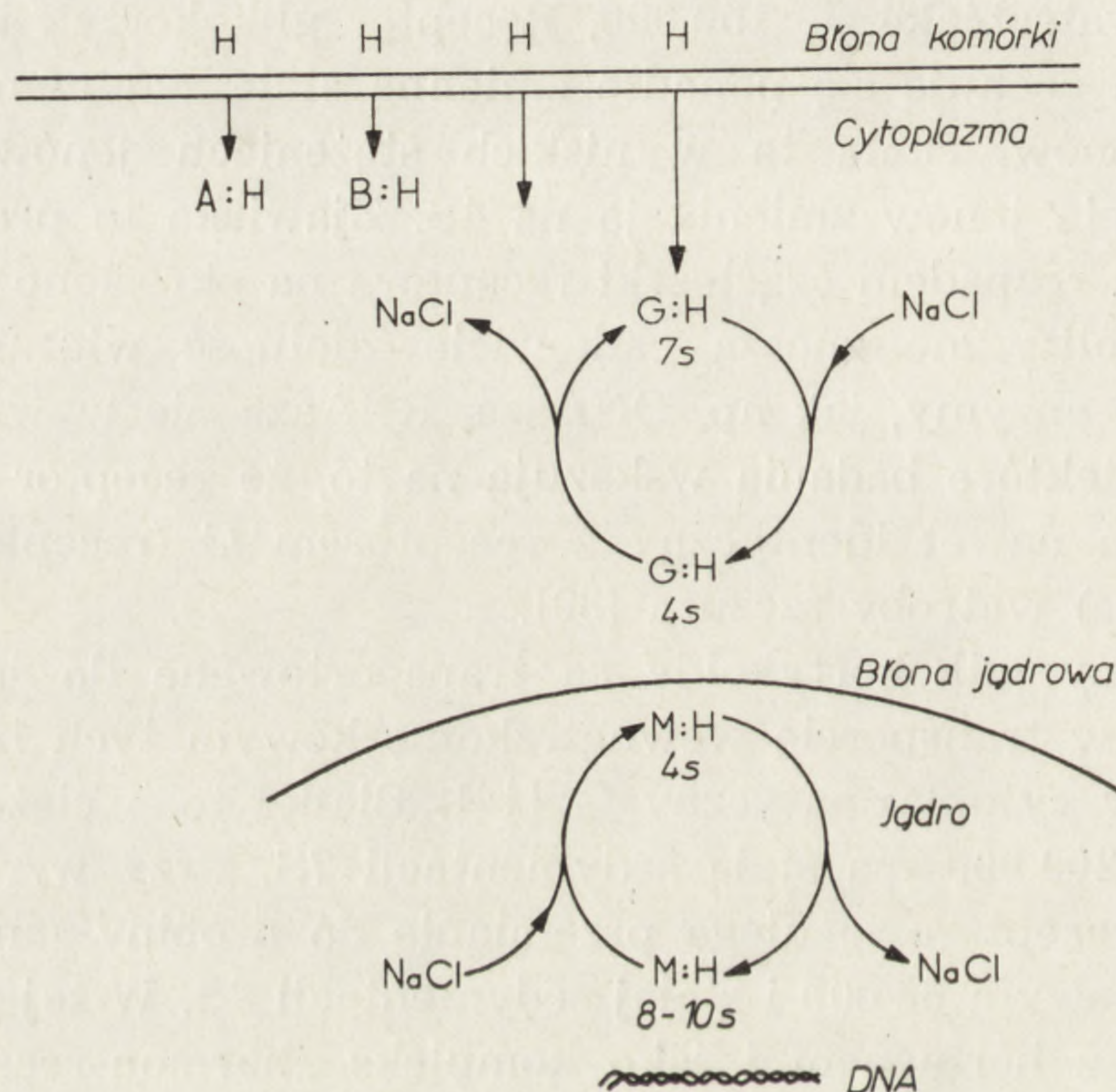
RECEPTORY JĄDROWE

Inkubując izolowane jądra komórek wątrobowych szczura, ze znakowanym ^3H -hydrokortyzonem, stwierdzono jego szybkie wiązanie z białkami jądrowymi [12]. Białko wiążące hydrokortyzon w jądrach komórek wątrobowych świni posiada ciężar cząsteczkowy między 100 000 a 150 000 [95].

W badaniach nad receptorami jądrowymi wątroby szczura wykazano, że ilość „miejsc wiążących” (ang. acceptor site) glikokortykoidy jest różna i w dużym stopniu zależy od warunków inkubacji w czasie doświadczenia. Przeciętnie wynosi ona od 3000 do 12 000 cząsteczek hormonu na jedno jądro [14, 43]. Zakładając, że ilość drobin receptora jądrowego byłaby równa ilości drobin receptora w cytosolu (patrz wyżej) można by przyjąć, że 1 cząsteczka białka receptorowego wiąże 1–4 cząsteczek hor-

monu. W procesie tym dużą rolę odgrywa DNA, gdyż po zadziałaniu na zawieszinę jąder dezoksyrybonukleazą dochodzi do zmniejszenia wiązania hormonu przez receptor [12].

Jądrowy receptor glikokortykoidów wykazuje w niskim stężeniu jonów stałą sedymentacji między 8S a 10S i posiada tendencję do łączenia się z DNA. W wyższym stężeniu NaCl (0,3 M) interakcja z DNA jest bardzo słaba, a białko ulega przemianie na komponenty o stałej sedymentacji 4S [8]. Wewnątrzkomórkowy transport hydrokortyzonu obrazuje ryc. 1.



Ryc. 1. Wnikanie glikokortykoidu do wnętrza komórki wątrobowej

Glikokortykoid (H) drogą biernej dyfuzji wnika do cytoplazmy, gdzie zostaje związany z białkami receptorowymi A, B i G (A:H, B:H, G:H). Kompleks hormon-receptor G w zależności od stężenia jonów może wykazywać różną stałą sedymentacji. (Przy wzroście stężenia jonów — 4S, natomiast przy spadku — 7S). Kompleks 4S przenika przez błonę do jądra, gdzie ulega związaniu z makrocząsteczką jądrową (M:H). Przy spadku stężenia jonów kompleks ten ulega przekształceniu na pochodną o stałej sedymentacji 8 — 10S i w tej postaci wchodzi w interakcję z chromatyną

Powstały in vitro kompleks „hormon-receptor” wchodzi w interakcję z chromatyną, a właściwie z jej częścią białkową, ponieważ wiązanie to ulega zmniejszeniu po zadziałaniu enzymów proteolitycznych. Dodając do środowiska receptor cytoplazmatyczny kortyzolu, kompleks „cytosol-kortyzol” lub też chromatynę zwierząt adrenalektomizowanych, obserwuje się znaczne zwiększenie aktywności matrycowej chromatyny do biosyntezy RNA. Takiego efektu nie spostrzegano, gdy do środowiska dodawano chromatynę z tkanek niehomologicznych lub chromatynę wątroby zwierząt nieadrenalektomizowanych [30].

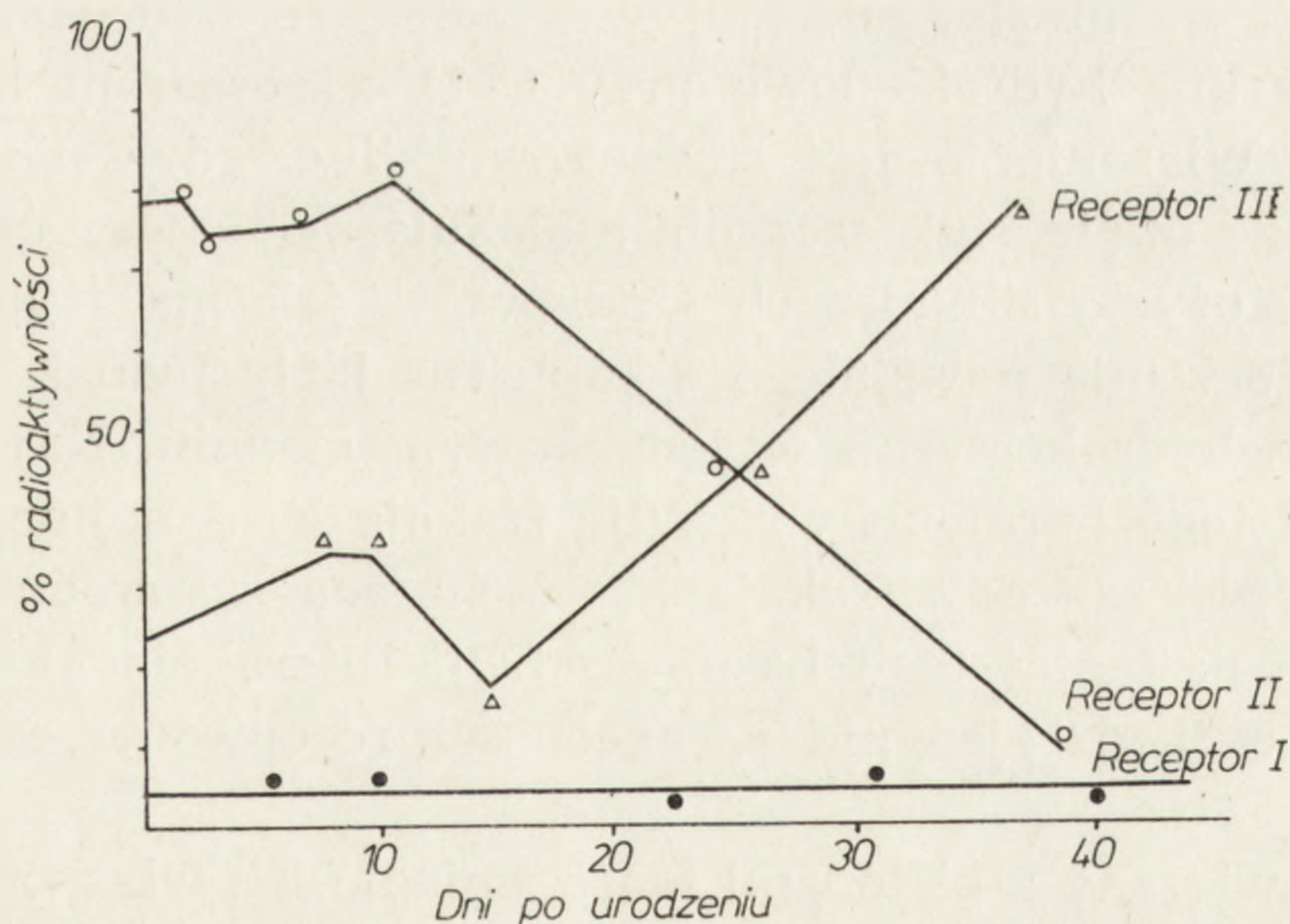
W nowszych badaniach wykazano w kariosolu dwie frakcje białkowe

wiążące się z radioaktywnym hormonem [55]. Pierwsza, wymywająca się z kolumny „DEAE-sephadex A-50” 0,05 M roztworem KCl oraz druga, wymywająca się z tej samej kolumny 0,08 M roztworem KCl.

Ciężar cząsteczkowy pierwszego białka określono na 62 000. Białko to jest prawdopodobnie identyczne z receptorem cytoplazmatycznym G (receptor II Litwacka). Również badaniami metodą elektroogniskowania (electrofocusing) wykazano w jądrze dwa pasma wiążące hydrokortyzon, które odpowiadałyby receptorom cytoplazmatycznym II i III [55] — odpowiednio G i A wg nomenklatury Beato [10]. Receptory te posiadają takie same punkty izoelektryczne, jak receptory cytoplazmatyczne. Receptor cytoplazmatyczny II posiada wartość $pI = 6,7$, zaś receptor cytoplazmatyczny III — $pI = 5,4$.

Śródkomórkowe rozmieszczenie hydrokortyzonu jest uzależnione od płci i wieku zwierzęcia. U samic szczurów pojawia się w cytosolu jedynie 30–35% podanej dawki hormonu, natomiast u samców — 65%. W odróżnieniu od samców, u samic występuje wyższe stężenie hydrokortyzonu we frakcji mikrosomalnej i osiąga ono wartość 36–40% [63].

Wątroba płodów szczurzych wiąże jedynie 20% hormonu w porównaniu ze zwierzęciem dorosłym, a białka receptorowe cytosolu wiążą 9%. U zwierząt dorosłych receptory I, II i III wiążą odpowiednio 3–5%, 4–10% i 80–90% hydrokortyzonu. Już wcześniej wspomniano, że jedynie 6–10% egzogenego hormonu zostaje związana z receptorem II w postaci biologicznie czynnej. Wyniki uzyskane w różnych doświadczeniach są więc prawie identyczne. 80–90% hydrokortyzonu związanego z receptorem III stanowi zatem frakcję zmetabolizowaną, biologicznie nieaktywną. Stopień wiązania tego hormonu przez receptor I nie ulega zmianie z wie-



Wykres 1. Stężenie cytoplazmatycznych receptorów glikokortykoidów w komórce wątrobowej w zależności od wieku zwierzęcia wg Singera i Litwacka [90]

Ilość receptorów określono jako procent radioaktywności związanego 1,2-³H kortyzolu z białkiem po rozdzieleniu na kolumnie DEAE Sephadex A-50

kiem. U noworodków receptor II wiąże 68–73% hydrokortyzonu, podczas gdy receptor III wiąże jedynie 22–28%. Od 16 dnia życia stopień wiązania hormonu przez receptor II zaczyna opadać, receptora III zaś wzrastać. Około 40 dnia życia nie obserwowano różnic w stopniu wiązania hormonu w porównaniu do zwierząt dorosłych. Zależności te obrazuje wykres 1.

Reasumując rozdział o wątrobowych receptorach glikokortykoidów warto podkreślić, że wniknięcie glikokortykoidów do cytoplazmy, a następnie do wnętrza jądra komórkowego, jest pierwszym etapem w mechanizmie działania nie tylko tych, ale i pozostałych hormonów sterydowych (prace przeglądowe [42, 97]).

II. WPLYW NA JĄDRO KOMÓRKI

W jądrze komórki wątrobowej glikokortykoidy wchodzą w reakcję z białkami chromatyny, spełniającymi funkcję regulacyjną aktywności genów. Wzajemne oddziaływanie glikokortykoidów i białek chromatyny nie ogranicza się jedynie do zmian ich ilości, lecz drogą zmian strukturalnych mogą one wywołać także zmiany ich aktywności biologicznej.

WPLYW NA BIAŁKA CHROMATYNY

Interakcja hydrokortyzonu z histonami została wykazana po raz pierwszy przez Ceffery'ego i wsp. [20]. Autorzy ci nie stwierdzili wzrostu aktywności aminotransferazy tyrozynowej pod wpływem hormonu w wątrobie myszy, którym wcześniej wstrzyknięto histon. W badaniach przeprowadzonych na grasicy cielej wykazano, że hydrokortyzon zostaje związany z grupą hydroksylową przy C-11 z obszarem hydrofobowym histonu [96]. Wiązanie to jest stosunkowo silne, gdyż nie udaje się go rozerwać drogą dializy lub sączenia molekularnego przy użyciu sefadesów. Dopiero użycie silniejszych środków — jak np. trypsyny — prowadzi do rozerwania powstałego kompleksu [82]. Jednak nie wszystkie frakcje wiążą hydrokortyzon w jednakowym stopniu. Największe powinowactwo do tego hormonu wykazuje frakcja F₃ o najmniejszej zawartości lizyny, podczas gdy frakcja F₂, cechująca się średnią zawartością lizyny, wiąże najmniej tego hormonu [98]. Interakcja glikokortykoidów z histonami zachodzi jedynie w obecności receptorów cytoplazmatycznych [92].

Hormon związany z histonami może zmienić ich własności biologiczne. W badaniach *in vivo* wykazano wzrost fosforylacji tych białek i to zarówno frakcji lizynowej, jak i frakcji argininowej. Wzrost fosforylacji nie jest uzależniony od biosyntezy tych białek [64]. Niektóre dane doświadczalne wskazują jednak na brak wzrostu fosforylacji frakcji bo-

gatej w lizynę pod wpływem hydrokortyzonu [52]. Należy tu dodatkowo nadmienić, że fosforylacja histonów zachodzi jedynie w obecności receptorów cytoplazmatycznych [17].

Histony zmieniają również swe własności po acetylacji i metylacji [37], jednak dane odnośnie do wpływu glikokortykoidów na te procesy są sprzeczne. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano wyraźny wzrost metylacji przy nieznacznym pobudzeniu acetylacji tych białek [29, 31]. *In vivo* wzrost metylacji histonów wyprzedza biosyntezę mRNA [31]. Natomiast *in vitro* stwierdzono wzrost aktywności polimerazy RNA znacznie wyprzedzający w czasie zmiany w własnościach histonów [29].

Glikokortykoidy wywierają również zmiany ilościowe i jakościowe w białkach kwaśnych jądra komórki wątrobowej. Już po upływie 2–3 godzin wywołują wzrost ilości białka kwaśnego o masie cząsteczkowej 41 000. Zdaniem Sheltona i wsp. [86] jest to pierwszy etap na drodze aktywacji genów przez hormony sterydowe.

Zarówno w białkach zasadowych, jak i w białkach kwaśnych dochodzi *in vitro* do wzrostu zawartości wolnych grup SH pod wpływem hydrokortyzonu [12]. Wzrost ten jest jednak znacznie wyraźniejszy w białkach kwaśnych aniżeli w histonach [81]. *In vivo* stwierdzono, że wzrost zawartości grup SH wykazuje ten sam przedział czasowy co wzrost biosyntezy RNA, przy czym występuje on głównie w białkach frakcji rozpuszczalnej w kwasach o masie cząsteczkowej 45 000. Białka nierozpuszczalne w kwasach wykazują wzrost zawartości tych grup we wszystkich frakcjach. Na uwagę zasługuje fakt, że zmiany te nie są spowodowane wzrostem syntezy RNA [23]. Oprócz zmian jakości białek jądra komórki wątrobowej wykazano zarówno *in vivo* [22], jak też *in vitro* [74], wzrost biosyntezy tych białek.

WPLYW NA KWASY NUKLEINOWE

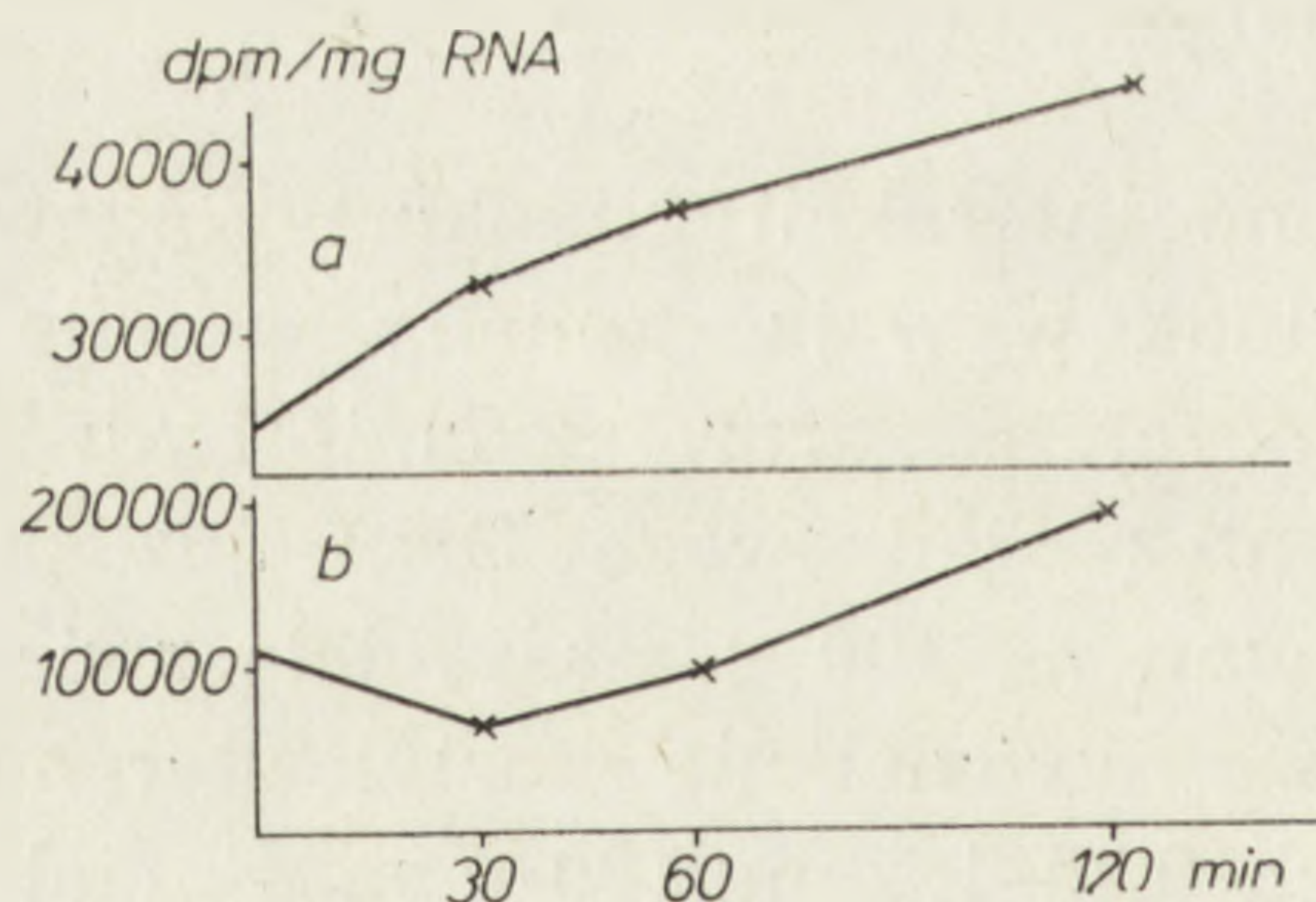
Badaniami izotopowymi nie stwierdzono interakcji glikokortykoidów z cząsteczkami DNA [26]. Mogą one jednak wywołać zmiany w pojedynczej nici DNA [101]. U młodych, rosnących szczurów, podanie hydrokortyzonu wywołuje zahamowanie biosyntezy jądrowego DNA już po podaniu jednorazowym 0,3 mg tego hormonu na 100 g masy ciała zwierzęcia [37]. Warto podkreślić, że dobowe wydzielanie kortykosteronu u młodych szczurów waha się w granicach 0,25–1,5 mg/100 g masy ciała [38]. Depresja biosyntezy DNA u tych zwierząt polega na selektywnym zahamowaniu wbudowywania tymidyny [47, 59] oraz znacznym zmniejszeniu aktywności polimerazy DNA [38].

Zahamowanie biosyntezy DNA pod wpływem hydrokortyzonu obserwuje się również w wątrobie regenerującej po częściowym chirurgicznym usunięciu jej mięszu [35, 67, 68, 72], jednak zmiany te nie są trwałe. Po upływie 36 godzin dochodzi ponownie do wzmożonej biosyntezy

DNA [68]. Spadek biosyntezy DNA w wątrobie regenerującej jest równoległy do spadku aktywności kinazy tymidynowej i kinazy tymidynomonofosforanowej — enzymów kluczowych w biosyntezie DNA [72].

Hormony korowo-nadnerczowe nie wchodzą bezpośrednio w interakcję z kwasami rybonukleinowymi. Wywierają one jednak duży wpływ zarówno na biosyntezę, na okres półtrwania, na własności, jak i na transport nowo zsyntetyzowanych kwasów nukleinowych z jądra do cytoplazmy i innych organelli komórki wątrobowej.

Wzrost zawartości RNA w jądrze komórki wątrobowej pod wpływem glikokortykoidów zaobserwowano już w początkach lat sześćdziesiątych. Podanie hydrokortyzonu szczurom z usuniętymi nadnerczami prowadzi już po upływie 30 minut do dwu- trzykrotnego wzrostu zawartości RNA jądrowego [45]. Wzrost ten jest wynikiem wzmożonej biosyntezy RNA, co wykazano badaniami izotopowymi [28]. Wzmożoną biosyntezę *de novo* kwasów rybonukleinowych obserwuje się w obrębie wszystkich głównych klas [34, 100]. Największemu pobudzeniu ulega biosynteza mRNA, w mniejszym stopniu zaś jądrowy rRNA i RNA cytoplazmatyczny [51]. Czas, jaki upływa od momentu podania hormonu do stwierdzonego wzrostu biosyntezy kwasów nukleinowych, jest różny dla poszczególnych ich rodzajów. U adrenaektomizowanych szczurów stwierdzono po upływie 30 minut wzrost biosyntezy szybkoznakującego się RNA, będącego prawdopodobnie prekursorem mRNA zarówno po podaniu deksametazonu [61], jak i hydrokortyzonu [104], a biosynteza RNA jąderkowego [rRNA] i tRNA jest hamowana. Po upływie 4 godzin dochodzi do spadku biosyntezy prekursorów mRNA [16]. Stymulacja tRNA zachodzi dopiero po upływie 2 godzin [4, 78] i może być selektywna [1]. Te zależności czasowe obrazuje wykres 2.



Wykres 2. Wpływ hydrokortyzonu na biosyntezę jądrowego RNA wg Schmidta i Sekerisa [78]

Po upływie 30 min. od podania hydrokortyzonu (2 mg/100 g masy ciała) dochodzi do wyraźnego wzrostu biosyntezy jądrowego RNA (a), podczas gdy biosynteza jąderkowego RNA (b) jest hamowana. Następnie dochodzi do wzmożonej biosyntezy obydwu tych frakcji

Nie wszystkie jednak frakcje mRNA ulegają w jednakowym stopniu stymulacji. Kidson i Kirby wykazali, że po podaniu hydrokortyzonu dochodzi do selektywnego pobudzenia jednych, przy równoczesnym zahamowaniu biosyntezy innych frakcji mRNA [46]. Stosując technikę hybrydyzacji wykazano również, że hormon ten pobudza biosyntezę nowych rodzajów mRNA, nieobecnych w komórce przed podaniem hor-

monu. Nowo powstały mRNA zawierałby kod dla biosyntezy specyficznych białek, głównie o charakterze enzymatycznym [24, 25].

Oprócz pobudzenia biosyntezy mRNA, hydrokortyzon *in vitro* zwiększa jego aktywność matrycową, mierzoną szybkością wbudowywania znakowanych aminokwasów w rybosomalnym układzie syntetyzującym białko [27, 51, 60, 76, 83]. Należy tu podkreślić, że jądra wątrobowe izolowane od szczurów po adrenalektomii wymagają znacznie mniejszego stężenia hormonu, niż jądra izolowane od szczurów normalnych. Z drugiej strony zbyt duże stężenie hydrokortyzonu w środowisku inkubacyjnym wywiera działanie hamujące na tę aktywność [76].

Podobne wyniki uzyskano inkubując mRNA z jąder komórek wątrobowych szczurów — otrzymujących uprzednio hydrokortyzon — dodając do środowiska układ syntetyzujący białko. Stwierdzono tu wzrost aktywności aminotransferazy tyrozyno-alfa-ketoglutarowej. Dodanie puromycyny lub erytromycyny zapobiega wystąpieniu tego efektu. Przemawia to za tym, że frakcja ta zawiera określoną informację potrzebną do biosyntezy *de novo* tego enzymu [49]. Dodatek oczyszczonego polyA-mRNA wyizolowanego z wątroby szczura — otrzymującego uprzednio hydrokortyzon — znacznie wzmacniał inkorporację L-³H leucyny do białek globularnych. Stosując metody immunologiczne oraz elektroforetyczne z zastosowaniem siarczanu dodecyłu, stwierdzono wśród tych białek obecność głównie oksygenazy tryptofanowej [79].

Adrenalektomia prowadzi u zwierząt doświadczalnych do zmniejszenia okresu półtrwania kwasów rybonukleinowych w jądrach, mitochondriach, siateczce endoplazmatycznej i rybosomach w wątrobie. Podanie hydrokortyzonu przywraca prawidłowy okres półtrwania [62], a nawet wyraźnie go przedłuża [39]. Okres półtrwania nie jest jednakowo przedłużony we wszystkich rodzajach RNA. I tak, dla przykładu, jądrowy rRNA wykazuje znacznie dłuższy okres półtrwania niż rRNA cytoplazmatyczny [83].

WPLYW NA AKTYWNOŚĆ MATRYCOWĄ ORAZ NA POLIMERAZĘ RNA

Wzrost biosyntezy kwasów nukleinowych może być wynikiem bądź to wzmożonej aktywności matrycowej chromatyny, bądź też wykładnikiem zwiększonej aktywności polimerazy RNA.

Wzrost aktywności matrycowej chromatyny został stwierdzony w badaniach *in vitro* [11, 12]. Jest on uzależniony od stężenia glikokortykoidu i przy stężeniu 4 µg/0,5 ml wynosi 10–12% [94]. Wpływ hormonu wskazuje tu na narządową specyficzność, gdyż użycie chromatyny z grasicy szczura nie prowadzi do takiego wzrostu omawianej aktywności [15].

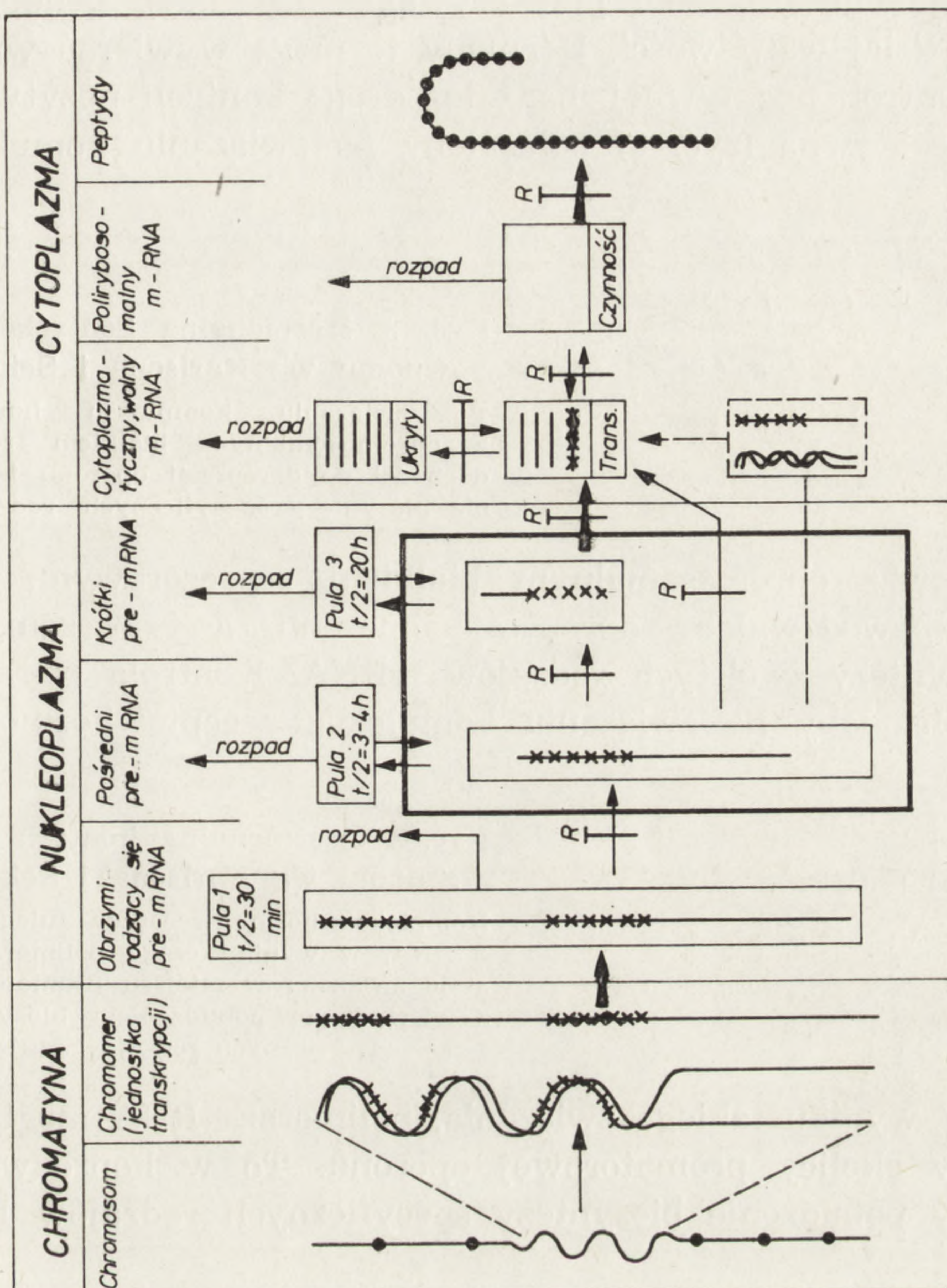
In vitro hydrokortyzon pobudza aktywność polimerazy RNA, niezależnie od wzrostu „pojemności” chromatyny [3, 77]. Inkubując jądra, które uprzednio uległy częściowej lizie w środowisku hypotonicznym

z omawianym hormonem sterydowym, obserwuje się zarówno wzrost aktywności matrycowej chromatyny, jak i wzrost aktywności polimerazy RNA. Używając jednak całkowicie rozpuszczonych jąder, stwierdza się jedynie wzrost aktywności matrycowej chromatyny przy braku wzrostu aktywności polimerazy RNA [11]. Przemawiałoby to za dwustopniowym uchwycem w mechanizmie działania glikokortykoidów.

Nie wszyscy jednak autorzy otrzymali podobne wyniki. Bottoms i wsp. [19] inkubując jądra komórkowe wątroby świni z wolnym hydrokortyzonem oraz wolnymi białkami receptorowymi (bez hormonu), nie uzyskali wzrostu aktywności tego enzymu. Statystycznie znamiennej wzrost aktywności polimerazy RNA wystąpił jednak, gdy do środowiska inkubacyjnego dodano kompleksu receptor-hydrokortyzon. Przemawiałoby to za niezbędnością białek receptorowych w mechanizmie działania tego hormonu, a rozbieżności w wynikach różnych autorów mogłyby być tłumaczone zanieczyszczeniem frakcji jądrowej resztkami cytoplazmy.

Wzrost aktywności polimerazy RNA obserwuje się w badaniach zarówno *in vivo* u zwierząt normalnych, jak i po adrenalektomii [50]. Jednak hydrokortyzon nie stymuluje w jednakowym stopniu aktywności wszystkich rodzajów polimeraz RNA. U szczurów po adrenalektomii pobudzeniu uległa jedynie polimeraza RNA IA i IB w jąderku, podczas gdy polimeraza RNA II i III w nukleoplazmie nie wykazuje zmiany aktywności. U zwierząt po adrenalektomii znacznie wyższą aktywność wykazuje polimeraza RNA IA w stosunku do polimerazy RNA IB, a podanie hydrokortyzonu wywołuje zjawisko odwrotne, tj. znacznie większy wzrost aktywności polimerazy RNA IB w stosunku do polimerazy RNA IA [71]. Pobudzenie aktywności polimeraz jąderkowych doprowadza w konsekwencji do wzrostu biosyntezy jąderkowego RNA, o stałej sedymentacji 45S [41]. Wzrost aktywności tych enzymów pod wpływem glikokortykoidów mógłby odbywać się drogą aktywacji allosterycznej [71]. Przemawia to za możliwością zmiany metabolizmu komórki wątrobowej drogą regulacji aktywności polimeraz RNA — niezależnie od wpływu na aktywność matrycową chromatyny. Możliwe miejsca regulacji biosyntezy mRNA przedstawia ryc. 2 [wg 75].

Na uwagę zasługuje fakt, że nowo syntetyzowane rodzaje RNA zostają szybko transportowane do cytoplazmy komórki wątrobowej [99, 102] oraz że wzmożona biosynteza kwasów rybonukleinowych może być również wynikiem zwiększenia puli nukleotydów w komórce wątrobowej pod wpływem glikokortykoidów. Podanie hydrokortyzonu zwierzęciu powoduje wzrost specyficznej radioaktywności prekursorów nukleotydów rozpuszczalnych w kwasach. Specyficzna radioaktywność nukleotydów urydynowych pozostaje jednak wielkością stałą. Sugeruje to, że hormon ten zwiększa transport tego nukleotydu do wątroby. Aktynomycyna D znosi wbudowywanie orotanu do RNA, nie znosi jed-



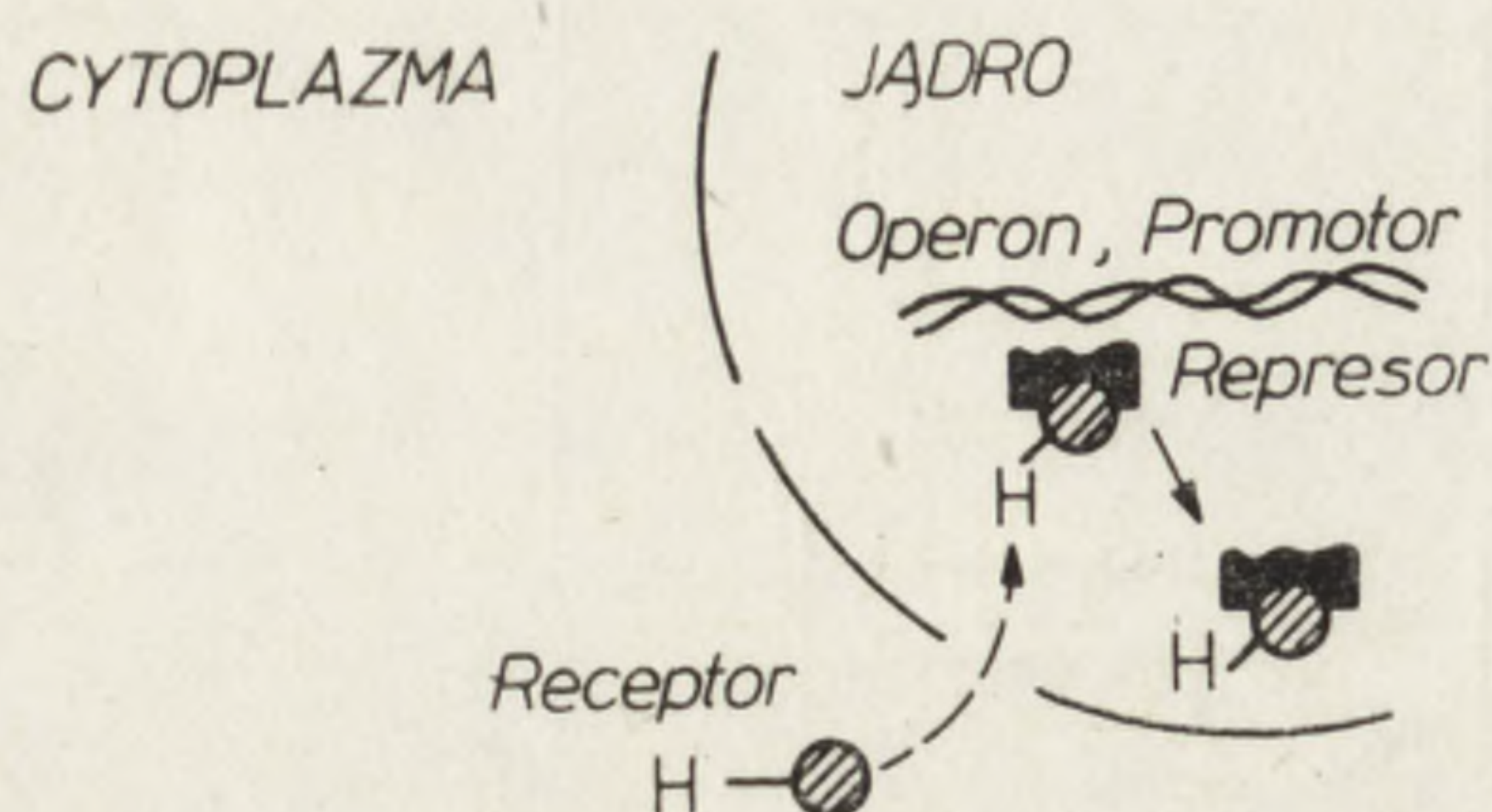
Ryc. 2. Hipotetyczny schemat tworzenia mRNA oraz wewnątrzkomórkowe przekazywanie informacji z DNA do polipeptydów w komórkach zwierzęcych wg Scherrera [75]

Jednostka transkrypcji zawarta w chromomerze (w DNA) jest przepisywana w olbrzymi pre-mRNA (Hn-RNA), zawierający jedną lub kilka informacji. Hn-RNA przechodzi do nukleoplazmy, gdzie jest szybko przemieniany w pośredni pre-mRNA. Podczas tego procesu dochodzi do 50% rozpadu cząsteczki olbrzymiego pre-mRNA. Następne procesy, nim mRNA pojawi się w cytoplazmie, są hipotetyczne i dlatego umieszczono je w przestrzeni oznaczonej na rycinie pogrubioną linią. Prawdopodobnie pośredni pre-mRNA o czasie półtrwania 3—4 godzin ulega rozpadowi do krótkiego pre-mRNA, stosunkowo stabilnego. Cytoplazmatyczny mRNA pojawia się w cytoplazmie najpierw jako forma przejściowa, po czym ulega bądź to przemianie w polirybosomalny mRNA, bądź też zostaje zmagazynowany w puli „informosomalnej”. Nie wykluczony jest również transfer DNA do cytoplazmy (niosący określoną informację) i dlatego tę możliwość oznaczono w przestrzeni ograniczonej pogrubioną linią. Miejsca prawdopodobnej regulacji przez glikokortykoidy zaznaczono pogrubionymi strzałkami

nak wzrostu radioaktywności nukleotydów rozpuszczalnych w kwasach. Wskazywałoby to, że bardzo wczesne efekty działania hormonu mogą nie być związane z procesami transkrypcji [103].

Wpływ glikokortykoidów na metabolizm jądra komórki wątrobowej

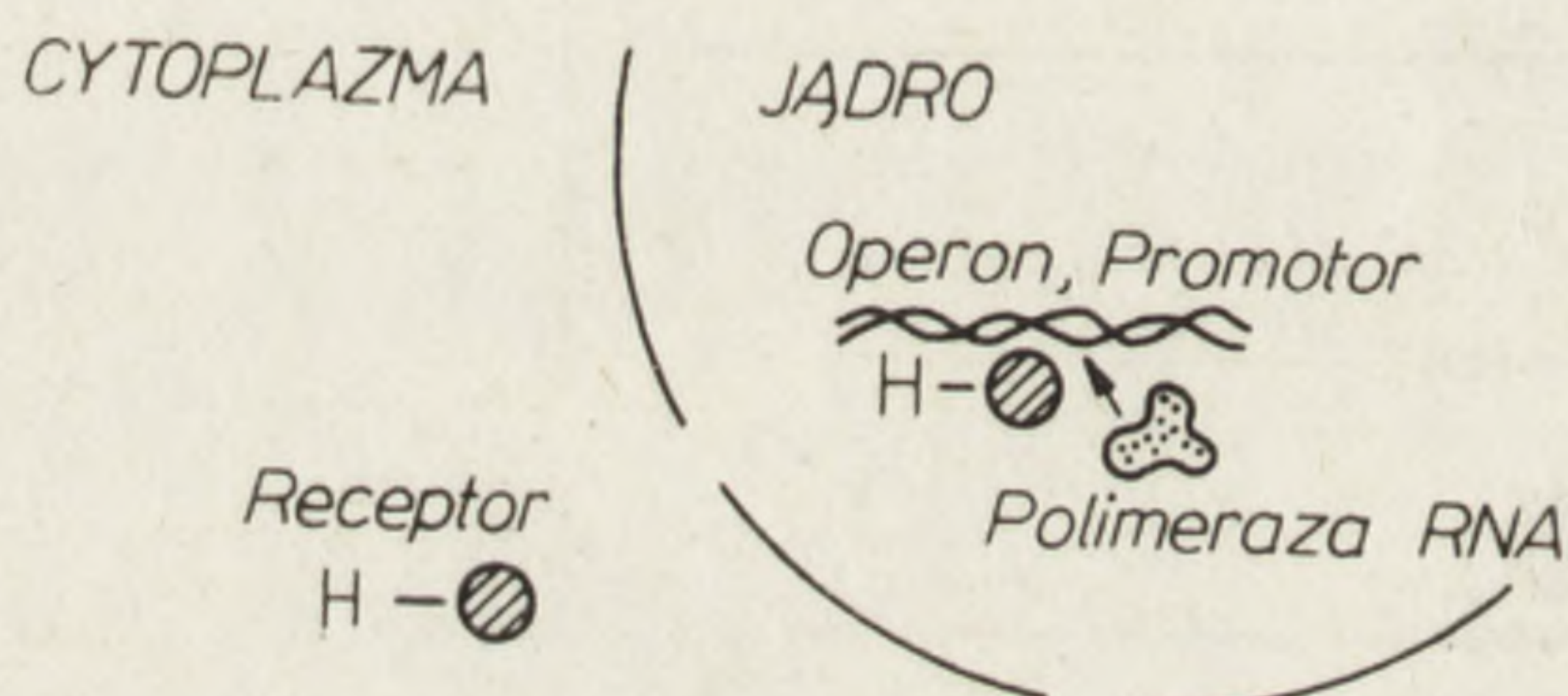
oraz na regulację procesów przekazywania informacji genetycznej nie ulega już dzisiaj wątpliwości. Hormony te mogą wywierać wpływ bądź to drogą kontroli negatywnej, bądź też drogą kontroli pozytywnej [44]. Kontrola negatywna (ryc. 3) polegałaby na związaniu kompleksu hor-



Ryc. 3. Hormonalna kontrola negatywna genomu wg Karlsona i Sekerisa [44]

Po związaniu kompleksu hormon-receptor z chromosomalnym białkiem represorowym, dochodzi do derepresji operonu i do pobudzenia biosyntezy specyficznych rodzajów mRNA

mon-receptor z chromosomalnym białkiem represorowym. Związanie represora spowodowałoby derepresję operonu, a tym samym pobudzenie biosyntezy swoistych rodzajów mRNA. Kontrola pozytywna zaś (ryc. 4) polegałaby na związaniu kompleksu receptor-hormon z DNA



Ryc. 4. Hormonalna kontrola pozytywna genomu wg Karlsona i Sekerisa [44]

Kompleks hormon-receptor ulega związaniu z DNA, w wyniku czego polimeraza RNA zostaje związana w miejscu promotorowym genu z następowym pobudzeniem biosyntezy specyficznych rodzajów mRNA

operonu. W wyniku takiego związania, polimeraza RNA mogłaby zostać związana w okolicy promotorowej operonu. To w konsekwencji spowodowałoby pobudzenie biosyntezy specyficznych rodzajów RNA.

III. WPŁYW NA UKŁAD RYBOSOMALNY

Powszechnie wiadomo, że układ rybosomalny komórki jest miejscem syntezy białek — i to zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. Rybosomy wątroby szczurów po podaniu hydrokortyzonu wykazują *in vitro* [53] i *in vivo* [58] większą zdolność wbudowywania znakowanych aminokwasów w drobiny białek. Ta zwiększona biosynteza białek może być zarówno następstwem pobudzenia procesów transkrypcji (omówionej wcześniej), jak i pobudzeniem procesów translacji.

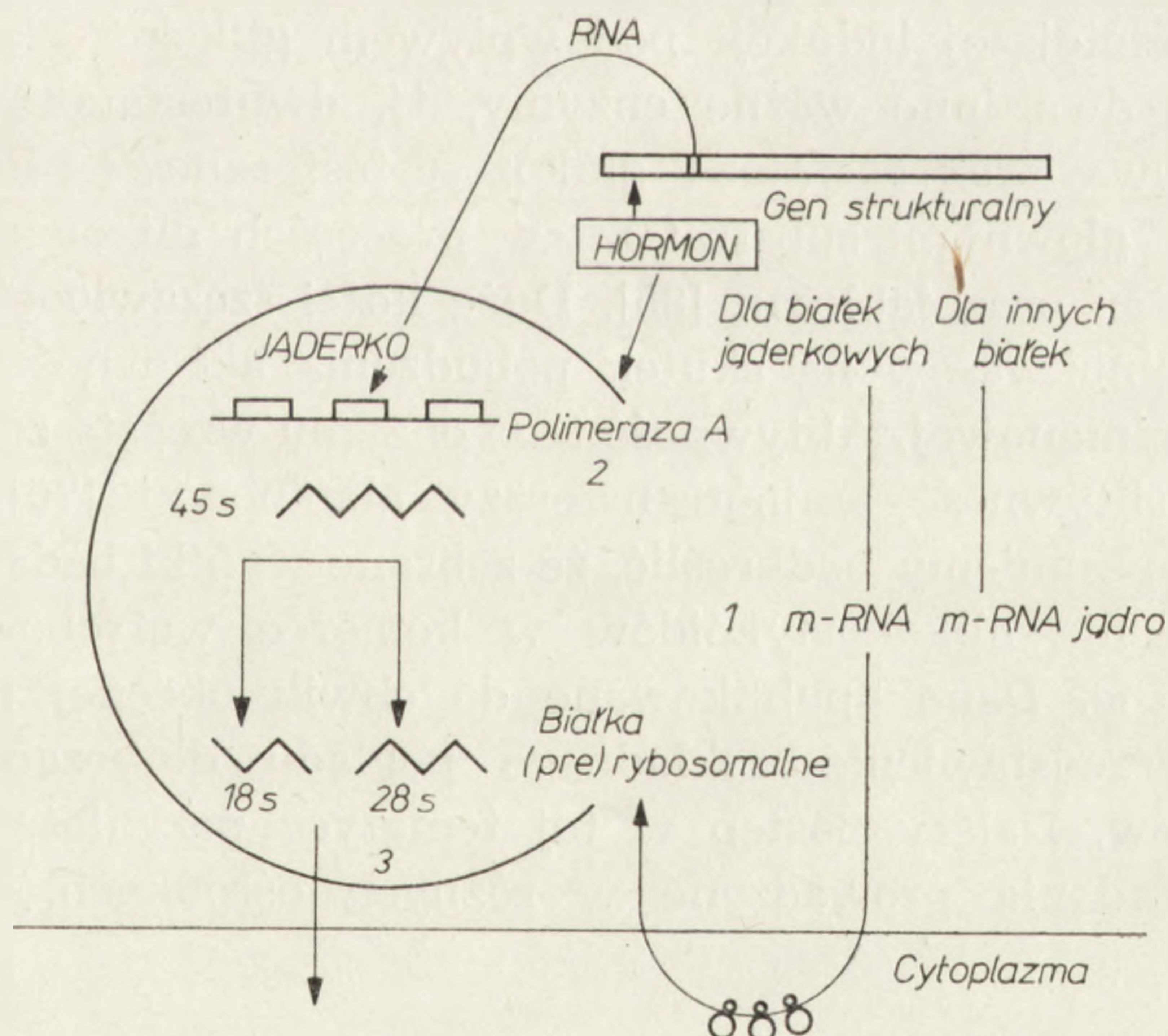
Hydrokortyzon powoduje wzrost ilości polisomów przy równoczesnym zmniejszeniu ilości jednostek mniejszych (mono- i dwusomów) [58]. Efekt ten jest znacznie większy, jeśli uprzednio poda się zwierzęciu aminokwasy [87]. Wzrost ilości polisomów obserwuje się również po podaniu samych aminokwasów, jednak adrenalektomia zapobiega wystąpieniu tego zjawiska [21].

Pobudzenie procesów translacji odbywa się nie tylko poprzez zwięk-

szenie ilości polisomów, lecz również jest wynikiem zwiększenia okresu ich półtrwania.

U szczurów po adrenalektomii podanie hydrokortyzonu zwiększa okres półtrwania mikrosomalnego RNA oraz białek rybosomalnych [39, 66]. Zjawisko to obserwowano zarówno w wolnych rybosomach, jak i rybosomach związanych z retikulum cytoplazmatycznym [40]. Zwiększenie okresu półtrwania tych składników jest wynikiem zmniejszonego ich rozpadu, prawdopodobnie na skutek zmniejszenia się aktywności rybonukleaz pod wpływem hydrokortyzonu [66].

W badaniach przeprowadzonych *in vivo* wykazano zwiększone o 30% wbudowywanie znakowanej leucyny, a także zwiększone wbudowywanie znakowanego orotanu do wszystkich rodzajów rybosomów, tj. 80S, 50S i 30S [36]. W innych badaniach stwierdzono szczególnie wysoką radioaktywność (ok. 200%) we frakcji poniżej 10S, która to frakcja zawiera mRNA. Te i inne badania [65] wskazują na wzrost biosyntezy mRNA (zawartego w 30S rybosomach), a także na przyspieszenie transformacji jąderkowych RNA, tj. 45S RNA oraz 32S RNA do 28S RNA [41]. Pobudzenie procesów posttranskrypcyjnych, w biosyntezie białek wątrobowych, pod wpływem glikokortykoidów mogłoby odbywać się już w jąderku (ryc. 5, wg [84]).



Ryc. 5. Hormonalna regulacja procesów posttranskrypcyjnych w jąderku wg Seckerisa i Schmida [84]

Glikokortykoid wchodząc w interakcję z genomem komórki pobudza biosyntezę mRNA — matrycy do biosyntezy białek rybosomalnych (1). Hormon ten może również wywierać bezpośredni wpływ na aktywność jąderkowych polimeraz RNA, biorących udział w biosyntezie rybosomalnych kwasów rybonukleinowych (2), oraz przyspieszyć transformację 45S RNA do 28 i 18S RNA — integralnych składników rybosomów (3)

UWAGI KOŃCOWE

Główną fizjologiczną funkcją glikokortykoidów w komórce wątrobowej jest pobudzenie procesów glikoneogenetycznych, a tym samym wzmożenie biosyntezy glikogenu. Proces ten zachodzi dzięki aktywacji odpowiednich układów enzymatycznych i to zarówno na obwodzie (w celu dostarczenia substratów), jak i w wątrobie. Już dość dawno stwierdzono wzrost aktywności wielu enzymów w wątrobie pod wpływem glikokortykoidów [69], jednak nie wszystkie z tych enzymów mają kluczowe znaczenie dla glikoneogenezy.

Wzrost aktywności enzymów w wątrobie jest spowodowany ich biosyntezą *de novo*, wykazaną bądź to metodami bezpośrednimi, bądź też pośrednimi. Metody bezpośrednie polegają na mierzeniu szybkości wbudowywania znakowanych aminokwasów w drobiny białek enzymatycznych, a metody pośrednie — na hamowaniu ich aktywności po podaniu inhibitorów biosyntezy białek i kwasów nukleinowych [80]. Pobudzenie biosyntezy *de novo* enzymów polegałoby głównie na pobudzeniu procesów transkrypcji, a w mniejszym stopniu — procesów translacji (omówionych wcześniej).

Enzymy posiadające kluczowe znaczenie w procesach glikoneogenetycznych — to przede wszystkim karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa oraz karboksylaza pirogronianowa. Obydwa te enzymy ulegają znacznie wcześniejszej indukcji pod wpływem glikokortykoidów w wątrobie aniżeli dwa inne ważne enzymy, tj. dwufosfataza fruktozo-1,6-dwufosforanowa oraz fosfataza glukozy-6-fosforanowa. Przemawiałoby to za tym, że głównymi substratami w procesach glikoneogenetycznych są szczawiooctan oraz jabłczan [85]. Duże ilości szczawiooctanu mogłyby powstać z aminokwasów na skutek pobudzenia aktywności aminotransferazy asparaginianowej. Aktywność tego enzymu wzrasta znacznie wcześniej aniżeli aktywność aminotransferazy alaninowej [70].

Kończąc, pragniemy podkreślić, że zebrane wyniki badań nad mechanizmem działania glikokortykoidów w komórce wątrobowej są nadal fragmentaryczne. Dane opublikowane do chwili obecnej nie pozwalają jeszcze na przedstawienie dokładnego poglądu dotyczącego działania tych hormonów. Dalszy postęp w tej tematyce przyniosą niewątpliwie intensywne badania prowadzone w różnych ośrodkach.

LITERATURA

- [1] ALTMAN, K., SOUTHREN, A. L., URETSKY, S. C., ZABOS, P. and ACS, G., Hydrocortisone induction of rat-liver leucyl-transfer RNA and its synthetases, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 3567–3569, 1972.
- [2] ANGELOV, E. Z. und RICHTER, G., Wirkung von Hydrokortison auf die

- Proteinsynthese in Rattenlebermikrosomen, *Acta Biol. Med. Germ.*, **22**: 499–506, 1969.
- [3] BARNABEI, O., ROMANO, B. and DI BOTONTO, G., Early effect of cortisone on the activity of nuclear ribonucleic acid polymerase of rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**: 266–271, 1965.
- [4] BARNABEI, O. and SERENI, F., Cortisol-induced increase of tyrosine alfa-ketoglutarate transaminase in the isolated perfused rat liver and its relation to ribonucleic acid synthesis, *Biochim., Biophys. Acta*, **91**: 239–247, 1964.
- [5] BAXTER, J. D., ROUSSEAU, G. G., BENSON, M. C., GARCEA, R. L., ITO, J. and TOMKINS, G. M., Role of DNA and specific cytoplasmic receptors in glucocorticoid action, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 1892–1896, 1972.
- [6] BAXTER, J. D. and TOMKINS, G. M., The relationship between glucocorticoid binding and tyrosine aminotransferase induction in hepatoma tissue culture cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **65**: 709–715, 1970.
- [7] — Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**: 932–937, 1971.
- [8] BEATO, M., BIESEWIG, D., BRÄNDLE, W. and SEKERIS, C. E., On the mechanism of hormone action. XV. Subcellular distribution and binding of 1,2-³H cortisol in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **192**: 494–507, 1969.
- [9] BEATO, M., BRÄNDLE, W., BIESEWIG, D. and SEKERIS, C. E., On the mechanism of hormone action. XVI. Transfer of 1,2-³H₂ cortisol from cytoplasm to the nucleus of rat-liver cells, *Biochim., Biophys. Acta*, **208**: 125–136, 1970.
- [10] BEATO, M. and FEIGELSON, P., Glucocorticoid-binding proteins of rat cytosol. I. Separation and identification of the binding proteins, *J. Biol. Chem.*, **249**: 7890–7896, 1972.
- [11] BEATO, M., HOMOKI, J., LUKACS, I. and SEKERIS, C. E., On the mechanism of hormone action. X. Increased template activity for RNA synthesis of rat liver nuclei incubated with cortisol in vitro, *Z. Physiol. Chem.*, **349**: 1099–1104, 1968.
- [12] BEATO, M., HOMOKI, J. und SEKERIS, C. E., Über den Angriffspunkt des Cortisols im Zellkern, *Z. Physiol. Chem.*, **349**: 1239–1240, 1968.
- [13] BEATO, M., KALIMI, M. and FEIGELSON, P., Correlation between glucocorticoid binding to specific liver cytosol receptors and enzyme induction in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **47**: 1464–1472, 1972.
- [14] BEATO, M., KALIMI, M., KONSTAM, M. and FEIGELSON, P., Interaction of glucocorticoids with rat liver nuclei. II. Studies on the nature of the cytosol transfer factor and the nuclear acceptor site, *Biochemistry*, **12**: 3372–3379, 1973.
- [15] BEATO, M., SEIFART, K. H. and SEKERIS, C. E., The effect of cortisol on the binding of actinomycin D to and on the template activity of isolated rat liver chromatin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**: 272–284, 1970.
- [16] BERG, T., MORLAND, J. and SEGLEN, P. O., An effect of glucocorticoid hormone on the nuclear ribonucleoprotein of rat liver, *Z. Physiol. Chem.*, **351**: 898–900, 1970.
- [17] BOTTOMS, G. D. and JUNGSMANN, R. A., Effects of corticosterone on phosphorylation of rat liver nuclear proteins in vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **144**: 83–88, 1973.
- [18] BOTTOMS, G. D. and STITH, R. D., Distribution of radioactivity in different tissues of pigs after ³H-hydrocortisone injection, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**: 1133–1136, 1969.
- [19] BOTTOMS, G. D., STITH, R. D. and ROESEL, O. F., Effects of cortisol complexes on RNA polymerase activity in isolated pig liver and thymus nuclei, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**: 946–949, 1972.

- [20] CAFFERY, J., WHICHARD, L. and IRVIN, J. L., Effect of histones on the induction of two liver enzymes by hydrocortisone, *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**: 364–365, 1964.
- [21] CAMMARANO, P., CHINALI, G., GAETANI, S. and SPADONI, M. A., Involvement of adrenal steroids in the changes of polysome organization during feeding of unbalanced amino-acid diets, *Biochim. Biophys. Acta*, **155**: 302–304, 1968.
- [22] DEISSEROTH, A., Effect of puromycin and cortisol pretreatment on the uptake of C₁₄ leucine into the globulins whole histones and residual protein of the rat liver nucleus, *Biochim. Biophys. Acta*, **186**: 092–095, 1969.
- [23] DOENECKE, D., BEATO, M., CONTAGE, L. F. and SEKERIS, C. E., Effect of cortisol on the thiol content of rat liver nuclear proteins, *Biochem. J.*, **126**: 1171–1179, 1972.
- [24] DOENECKE, D. and SEKERIS, C. E., Effects of cortisol on RNA synthesis as detected by hybridization with differentially renaturing DNA species, *FEBS Letters*, **8**: 61–64, 1970.
- [25] DREWS, J. and BRAVERMAN, G., Alterations in the nature of ribonucleic acid synthesis in rat liver during regeneration and after cortisol administration, *J. Biol. Chem.*, **242**: 801–808, 1967.
- [26] DREWS, J. und WACKER, A., Zum Wirkungsmechanismus der Steroidhormone, *Dtsch. Med. Wschr.*, **91**: 178–185, 1966.
- [27] DUKES, P. P., SEKERIS, C. E. and SCHMID, W., On the mechanism of hormone action. VI. Increase in template activity of ribonucleic acid from isolated nuclei incubated in the presence of hormone, *Biochim. Biophys. Acta*, **123**: 126–133, 1966.
- [28] FEIGELSON, P. and FEIGELSON, M., Studies on the mechanism of regulation by cortisone of the metabolism of liver purine and ribonucleic acid, *J. Biol. Chem.*, **238**: 1073–1077, 1963.
- [29] GALLWITZ, D. and SEKERIS, C. E., Stimulation of RNA polymerase activity of rat liver nuclei by cortisol *in vitro* independent of effects on the acetylation and methylation of histones, *FEBS Letters*, **3**: 99–102, 1969.
- [30] GOPALAKRISHNAN, T. V. and SADGOPAL, A., Partial purification of cortisol-binding protein from rat liver cytosol and its role in transcription, *Biochim. Biophys. Acta*, **287**: 164–186, 1972.
- [31] GRAFF, G. V. and HOLT, C., Enzymatic histone modification during the induction of tyrosine aminotransferase with insulin and hydrocortisone, *Biochim. Biophys. Acta*, **299**: 480–484, 1973.
- [32] GREENGARD, O. and ACS, G., The effect of actinomycin on the substrate and hormonal induction of liver enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 652–653, 1962.
- [33] GREENGARD, O., SMITH, M. A. and ACS, G., Relation of cortisone and synthesis of ribonucleic acid to induced and developmental enzyme formation, *J. Biol. Chem.*, **238**: 1548–1551, 1963.
- [34] GREENMAN, D. L., WICKS, W. D. and KENNEY, F. T., Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. II. High molecular weight components, *J. Biol. Chem.*, **240**: 4420–4426, 1965.
- [35] GUZEK, J. W., Effect of adrenocorticotrophic hormone and cortisone on the uptake of tritiated thymidine by regenerating liver tissue in the white rat, *Nature*, **201**: 930–931, 1964.
- [36] HANOUNE, J. and FEIGELSON, P., Turnover of protein and RNA of liver ribosomal components in normal and cortisol-treated rats, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**: 214–223, 1970.

- [37] HENDERSON, I. C., FISCHER, R. E. and LOEB, J. N., Suppression of liver DNA synthesis by cortisone, *Endocrinology*, **88**: 1471–1476, 1971.
- [38] HENDERSON, J. C. and LOEB, J. N., Fall in liver DNA polymerase activity in cortisone treated rats, *Nature*, **228**: 556–557, 1970.
- [39] IZAWA, M. and ICHII, S., Studies on ribonucleic acid turnover in rat organs: Effects of cortisol, actinomycin D and cycloheximide, *Endocr. Jap.*, **19**: 225–228, 1972.
- [40] — RNA turnover in bound and free ribosomes from rat liver: Effects of cortisol, actinomycin D and cycloheximide, *J. Biochem.*, **74**: 623–626, 1973.
- [41] JACOB, S. T., SAJDEL, E. M. and MUNRO, H. N., Regulation of nucleolar RNA metabolism by hydrocortisone, *Eur. J. Biochem.*, **7**: 449–453, 1969.
- [42] KAHL, A., Receptory hormonów sterydowych, *Post. Bioch.*, **19**: 171–193, 1973.
- [43] KALIMI, M., BEATO, M. and FEIGELSON, P., Interaction of glucocorticoids with rat liver nuclei. I. Role of the cytosol proteins, *Biochemistry*, **12**: 3365–3371, 1973.
- [44] KARLSON, P. und SEKERIS, C. E., Wirkungsmechanismus der Steroidhormone, *Dtsch. Med. Wschr.*, **98**: 831–835, 1973.
- [45] KENNEY, F. T. and KULL, F. J., Hydrocortisone-stimulated synthesis of nuclear RNA in enzyme induction, *Biochemistry*, **50**: 493–499, 1963.
- [46] KIDSON, C. and KIRBY, K. S., Selective alteration of mammalian messenger RNA synthesis: evidence for differential action of hormones on gene transcription, *Nature*, **203**: 599–603, 1964.
- [47] KIMBERG D. V. and LOEB, J. N., Differential sensitivity of nuclear and mitochondrial DNA synthesis to suppression by cortisone treatment, *Biochim. Biophys. Acta*, **246**: 412–420, 1971.
- [48] KOBLINSKY, M., BEATO, M., KALIMI, M. and FEIGELSON, P., Glucocorticoid-binding proteins of rat liver cytosol. II. Physical characterization and properties of the binding proteins, *J. Biol. Chem.*, **247**: 7897–7904, 1972.
- [49] LANG, N., HERRLICH, P. and SEKERIS, C. E., On the mechanism of hormone action. VII. Induction by cortisol of a messenger RNA-coding for tyrosine-alfa-ketoglutarate transaminase in an in vitro system, *Acta Endocr.*, **57**: 33–44, 1968.
- [50] LANG, N. and SEKERIS, C. E., Stimulation of RNA-polymerase activity in rat liver by cortisol, *Life Sci.*, **3**: 391–393, 1964.
- [51] — Zum Wirkungsmechanismus der Hormone. III. Einfluss von Cortisol auf den Ribonucleinsäure und Proteinstoffwechsel in Rattenleber, *Z. Physiol. Chem.*, **339**: 238–248, 1964.
- [52] LANGAN, T. A., Phosphorylation of liver histone following the administration of glucagon and insulin, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **64**: 1276–1283, 1969.
- [53] LEON, H. A., ARRHENIUS, E. and HULTIN, T., Effects of glucocorticoid administration on the incorporation of labeled amino-acids into protein by cell-free rat liver systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **63**: 423–433, 1962.
- [54] LITWACK, G., FIALA, E. S. and FILOSA, R. J., Intracellular binding of ¹⁴C hydrocortisone prior to enzymatic induction, *Biochim. Biophys. Acta*, **111**: 569–571, 1965.
- [55] LITWACK, G., FILLER, R., ROSENFELD, S. A., LICHTASH, N., WISHMAN, C. A. and SINGER, S., Liver cytosol corticosteroid binder. II. A hormone receptor, *J. Biol. Chem.*, **248**: 7481–7486, 1973.
- [56] LITWACK, G., KETTERER, B. and ARIAS, I. M., Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions, *Nature*, **234**: 466–467, 1971.
- [57] LITWACK, G. and MOREY, K. S., Cortisol metabolite binder. I. Identity

- with the dimethylaminoazobenzene binding protein of liver cytosol, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **38**: 1141–1148, 1970.
- [58] LOEB, J. N., A double-isotope method for comparing polyribosome populations: Effects of glucocorticoid hormone administration, *Endocrinology*, **92**: 857–861, 1973.
- [59] LOEB, J. N. and YEUNG, L. L., Effects of cortisone on thymidine incorporation by various nonlymphoid tissues of the weanling rat, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **143**: 502–507, 1973.
- [60] LUKACS, J. and SEKERIS, C. E., On the mechanism of hormone action. IX. Stimulation of RNA polymerase activity of rat liver nuclei by cortisol in vitro, *Biochim. Biophys. Acta*, **134**: 85–90, 1967.
- [61] LUND-LARSEN, T. and BERG, T., Effect of heavy-metal ions and dexamethasone on the release of messenger-like ribonucleoprotein from liver nuclei of normal and adrenalectomized, cortisol treated rats, *Z. Physiol. Chem.*, **354**: 1334–1338, 1973.
- [62] MISHRA, R. K. and FELTHAM, L. A. W., Effect of adrenalectomy and of adrenocortical hormones on RNA turnover in a variety of subcellular fractions of rat liver, *Can. J. Biochem.*, **51**: 920–930, 1973.
- [63] MORRIS, D. J. and BARNES, F. W., On the intracellular distribution of 4-¹⁴C cortisol in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **136**: 67–78, 1967.
- [64] MURTHY, L. D., PRADHAN, D. S. and SREENIVASAN, A., Effects of hydrocortisone upon metabolism of histones in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**: 500–510, 1970.
- [65] NIESSING, J. and SEKERIS, C. E., Effect of cortisol on the synthesis of DNA-like RNA contained in 30S ribonucleoprotein particles from rat liver, *Z. Physiol. Chem.*, **351**: 1161, 1970.
- [66] OTTOLENGHI, C. and BARNABEI, O., Reduced breakdown in vivo of liver microsomal ribonucleic acid and protein in rats treated with cortisone, *Endocrinology*, **86**: 949–954, 1970.
- [67] RAAB, K. H. and WEBB, T. E., Inhibition of DNA synthesis in regenerating rat liver by hydrocortisone, *Experientia*, **25**: 1240–1242, 1969.
- [68] RIZZO, A. J., HEILPERN, P. and WEBB, T. E., Temporal changes in DNA and RNA synthesis in the regenerating liver of hydrocortisone — treated rats, *Cancer Res.*, **31**: 876–881, 1971.
- [69] ROSEN, F. and NICHOL, C. A., Corticosteroids and enzyme activity, *Vitam. Horn.*, **21**: 135–214, 1963.
- [70] ROSEN, F., ROBERTS, N. R., BUDNICK, L. E. and NICHOL, C. A., An enzymatic basis for the gluconeogenic action of hydrocortisone, *Science*, **127**: 287–288, 1958.
- [71] SAJDEL, E. M. and JACOB, S. T., Mechanism of early effect of hydrocortisone on the transcriptional process: stimulation on the activities of purified rat liver nucleolar RNA polymerases, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **46**: 707–715, 1971.
- [72] SAKUMA, K. and TERAYAMA, H., Effects of adrenal hormones upon DNA synthesis in regenerating rat liver and tumors, *J. Biochem.*, **61**: 504–511, 1967.
- [73] SARNECKA-KELLER, M., Biologiczne konsekwencje enzymatycznej modyfikacji białek, *Przegląd Lek.*, **29**: 940–947, 1972.
- [74] SCHAUDER, P. and BUCK, M. D., In vitro stimulation of ¹⁴C amino-acid incorporation into protein of isolated rat liver nuclei induced by cortisol pre-treatment, *Biochim. Biophys. Acta*, **240**: 151–153, 1971.
- [75] SCHERRER, K., Messenger RNA in eukaryotic cells: The life history of duck globin messenger RNA, *Acta Endocr.*, (suppl.) **180**: 95–129, 1973.
- [76] SCHMID, W., GALLWITZ, D. and SEKERIS, C. E., On the mechanism of

- hormone action. VIII. Further studies on the effect of cortisol on isolated rat liver nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, **134**: 80–84, 1967.
- [77] SCHMID, W. and SEKERIS, C. E., Nucleolar RNA polymerase after cortisol administration, partial hepatectomy and fasting, *Z. Physiol. Chem.*, **354**: 1239–1240, 1973.
- [78] — Sequential stimulation of extranucleolar and nucleolar RNA synthesis in rat liver by cortisol, *FEBS Letters*, **26**: 109–112, 1972.
- [79] SCHUTZ, G., BEATO, M. and FEIGELSON, P., Messenger RNA for hepatic tryptophan oxygenase; its partial purification, its translation in a heterologous cell-free system and its control by glucocorticoid hormones, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 1218–1221, 1973.
- [80] SEKERIS, C. E., Wirkung der Hormone auf den Zellkern. [w] Wirkungsmechanismen der Hormone, red. P. Karlson, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg und New York 1967, p. 126–151.
- [81] SEKERIS, C. E., BEATO, M., HOMOKI, J. and COUGOTE, L. F., Effect of cortisol on the thiol content of nuclear proteins of isolated rat liver nuclei, *Z. Physiol. Chem.*, **349**: 857–858, 1968.
- [82] SEKERIS, C. E. und LANG, N., Neuere Ergebnisse zum Wirkungsmechanismus von Nebennierenrindenhormonen, *Dtsch. Med. Wschr.*, **90**: 1727–1730, 1965.
- [83] — Stimulation of messenger RNA synthesis in rat liver by cortisol, *Life Sci.*, **3**: 169–173, 1964.
- [84] SEKERIS, C. E. and SCHMID, W., Regulation of transcription by glucocorticosteroids. [w] The biochemistry of gene expression, red. J. K. Pollak J. W. Lee, Artarmon, NSW, 1973, p. 225–241.
- [85] SEUBERT, W., Cortisol als Enzyminduktor mit besonderer Berücksichtigung der Gluconeogenese. [w] Wirkungsmechanismen der Hormone, red. P. Karlson, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg und New York 1967, p. 158–188.
- [86] SHELTON, K. R. and ALLFREY, V. G., Selective synthesis of nuclear acid protein in liver cells stimulated by cortisol, *Nature*, **228**: 132–134, 1970.
- [87] SIDRANSKY, H., WAGLE, D. S. and VERNEY, E., Hepatic protein synthesis in rat force-fed a threonine-devoid diet and treated with cortisone acetate or threonine, *Lab. Invest.*, **20**: 364–370, 1969.
- [88] SILBER, R. H. and PORTER, C. C., Nitrogen balance, liver protein repletion and body composition of cortisone treated rats, *Endocrinology*, **52**: 518–525, 1953.
- [89] SINGER, S., BECKER, J. E. and LITWACK, G., The principal glucocorticoid binding macromolecule in hepatoma cells in culture is similar to glucocorticoid binder II of rat liver cytosol, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**: 943–950, 1973.
- [90] SINGER, S. and LITWACK, G., Effects of age and sex on ³H-cortisol uptake, binding and metabolism in liver and on enzyme induction capacity, *Endocrinology*, **88**: 1448–1455, 1971.
- [91] — Identity of corticosteroid binder. I. With the macromolecule binding 3-methylcholanthrene in liver cytosol in vivo, *Cancer Res.*, **31**: 1364–1368, 1971.
- [92] SLUYSER, M. Mechanism of action of cortisol in rat liver, *Biochem. J.*, **130**: 49P–50P, 1972.
- [93] SNART, R. S., SANYAL, N. N. and AGARWAL, M. K., Binding of corticosterone in rat liver, *J. Endocr.*, **47**: 149–158, 1970.
- [94] STACKHOUSE, H. L., CHETSANGA, C. J. and TAN, C. H., The effect of cortisol on genetic transcription in rat-liver chromatin, *Biochim. Biophys. Acta*, **155**: 159–168, 1968.
- [95] STITH, R. D. and BOTTOMS, G. D., Binding of ³H-cortisol to cytosol and

- nuclear proteins in liver and thymus of pigs, *Gen. Compar. Endocr.*, **19**: 386–391, 1972.
- [96] SUNAGA, K. and KOIDE, S., Structural specificity of the steroids interacting with calf thymus histones, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **26**: 342–348, 1967.
- [97] THOMAS, P. J., Steroid hormones and their receptors, *J. Endocr.*, **57**: 333–359, 1973.
- [98] TSAI, Y. H. and HNILICA, S., Interaction of histone with corticosteroid hormones, *Biochim. Biophys. Acta*, **238**: 277–287, 1971.
- [99] VENKOW, P. V., ANGELOV, E. Z., VALEVA, L. J. and HADJIOLOV, A. A., Early effects of hydrocortisone on rapidly labelled rat liver ribonucleic acids, *Nature*, **213**: 807–809, 1967.
- [100] WICKS, W. D., GREENMAN, D. L. and KENNEY, F. T., Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. I. Transfer ribonucleic acid, *J. Biol. Chem.*, **240**: 4414–4419, 1965.
- [101] YAMAFUJI, K., ILIYAMA, S. and SHINOHARA, K., Mode of action of steroid hormone on deoxyribonucleic acid, *Enzymologia*, **40**: 259–264, 1971.
- [102] YU, F. L. and FEIGELSON, P., A comparative study of RNA synthesis in rat hepatic nuclei and mitochondria under the influence of cortisone, *Biochim. Biophys. Acta*, **213**: 134–141, 1970.
- [103] — Effects of cortisone and actinomycin D upon pyrimidine nucleotide and RNA metabolism in rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**: 152–157, 1969.
- [104] — The sequential stimulation of uracil- rich and guanine- rich RNA species during cortisone induction of hepatic enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **35**: 499–504, 1969.

Otrzymano: 25 października 1974.

Przyjęto: 26 lutego 1975.

*Adres autora: Instytut Biologiczno-Fizjologiczny AM, Zakład Biochemii
ul. K. Marksa 19, 41-808 Zabrze 8.*

ROLA BŁONY KOMÓRKOWEJ W TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Ryszard FARBISZEWSKI i Krzysztof WOROWSKI

Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii
Akademia Medyczna w Białymstoku

Streszczenie. Błona komórkowa, obok innych organeli komórkowych, jest w znacznym stopniu odpowiedzialna za odmienne zachowanie się komórek transformowanych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Szereg czynników zewnętrznych, działających na komórkę, powoduje zmiany w składnikach powierzchniowej warstwy błon komórkowych i w ich strukturze przestrzennej. Powoduje to pojawienie się odmiennych właściwości komórek, jak wzmożona aktywność proliferacyjna, nowe właściwości immunologiczne, łatwość ulegania aglutynacji pod wpływem lektyn, obniżenie aktywności fagocytarnej oraz zmiany przepuszczalności błon komórkowych.

Komórki wykazują pewien zakres autonomii metabolicznej dzięki obecności błon biologicznych, odgraniczających je nawzajem od siebie i od środowiska. Błony komórkowe są strukturami, których właściwości i aktywność enzymatyczna w dużej mierze decydują o wymianie substancji między cytoplazmą a środowiskiem komórki i kontroli procesów metabolicznych komórki.

Budowa chemiczna i struktura błon biologicznych została dość dobrze poznana. Przyczyniło się do tego zastosowanie nowych technik pozwalających na izolowanie błon komórkowych [17, 30, 45, 48, 86] oraz zastosowanie mikroskopu elektronowego i metod optycznych. Model struktury molekularnej błony, jako uporządkowanej i niezmiennej, zaproponowany przez Daniellego i Davsona w 1935 r. [14] uległ w latach sześćdziesiątych pewnym modyfikacjom [44, 62]. Stwierdzono, że błony biologiczne nie są zbudowane według jednego schematu. Liczne spostrzeżenia wskazują na dynamiczny charakter struktury błon, zależny od aktywności metabolicznej komórki i od czynników zewnętrznych działających na powierzchnię błony komórkowej. Cząsteczki budujące błony biologiczne w określonym zakresie odległości przyciągają się wzajemnie siła-

mi van der Waalsa, a łańcuchy glikoproteidowe występujące na powierzchni błony ulegają zmianom konformacyjnym [81, 82]. Przeważająca część białek błon biologicznych wykazuje konfigurację spirali alfa i strukturę przestrzenną kłębka, a tylko niewielka ich część występuje w konfiguracji beta [56]. Oddziaływania jonowe między łańcuchami białek a zrębem lipidowym ulegają nieustannym zmianom [43]. Do utrzymania prawidłowej konformacji składników błon konieczny jest dopływ energii, uzależniony od aktywności metabolicznej komórki.

Błony komórkowe ulegają zmianom pod wpływem czynników modyfikujących strukturę i konformację poszczególnych ich składników. Zmiany te mogą być wywołane przez czynniki wewnątrzkomórkowe, jak zmiana siły jonowej i pH, oraz czynniki wywierające wpływ na komórkę z zewnątrz. Takimi czynnikami mogą być czynniki fizyczne, chemiczne i wirusy. Niektóre z nich w określonych warunkach doprowadzają do transformacji komórki prawidłowej w nowotworową.

Mechanizm transformacji nowotworowej komórki nie jest w pełni poznany. Najwięcej informacji w tym zakresie dostarczyły badania nad transformacją komórek pod wpływem wirusów onkogennych, które charakteryzują się stosunkowo niewielką liczbą genów.

Zmiany powierzchniowe komórek, towarzyszące transformacji wirusowej, zostały ostatnio dokładnie opisane przez Grzelakowską-Sztabert [26].

W niniejszym artykule omówiono różnice w składnikach powierzchniowych błon komórkowych, które mogą być przyczyną odmiennego zachowania się komórek prawidłowych i transformowanych. Szczególną uwagę zwrócono na mechanizmy transformacji komórek zależne od działania enzymów hydrolitycznych, ze szczególnym uwzględnieniem enzymów proteolitycznych.

Stwierdzono, że zmiany w składnikach błon powierzchniowych, zachodzące podczas transformacji, są przyczyną różnic w metabolizmie komórek prawidłowych i transformowanych.

W hodowli *in vitro* stwierdzono, że działanie niektórych czynników transformujących polega na ich interakcji z błonami komórkowymi [46, 60, 74, 75] i aktywacji niektórych enzymów zawartych w błonach komórkowych, m. in. ATP-azy i 5-nukleotydu [75]. Przypuszcza się, że wynikiem działania tych czynników są zmiany konformacyjne niektórych białek błony komórkowej [46]. Zmiany te, łącznie z aktywacją enzymów błony komórkowej, wielu autorów uważa za czynnik stymulujący wzrost i podział komórkowy [40, 57, 75, 76]. Za taką hipotezą przemawia fakt, że hamowanie ouabainą aktywności ATP-azy zapobiega transformacji i podziałowi komórkowemu [57].

Szereg autorów stwierdziło na powierzchni błon komórek transformowanych jakościowe i ilościowe zmiany składników glikoproteidowych i glikolipidowych [4, 8, 27, 38, 71, 80, 83, 84, 87, 88]. W błonach

komórek transformowanych wykazano zmniejszenie zawartości niektórych cukrów i aminocukrów, w szczególności galaktozaminy, N-acetylogalaktozaminy i kwasu sialowego, a wzrost N-acetyloglukozaminy [7, 6, 22, 52]. Truding i wsp. [77] stwierdzili preferencyjne wcielenie znakowanej radioaktywnie glukozaminy i fukozy do glikoproteidów powierzchniowej warstwy błon komórek transformowanych. Bossman i wsp. [3] wiążą te zmiany z podwyższoną aktywnością transferaz glukozy i fukozy. Wydaje się, że zmiany w zawartości cukrów mogą być spowodowane zarówno szybkością inkorporacji w łańcuchy błonowych kompleksów glikolipidowych i glikoproteidowych, jak i różnicami w aktywności glikozydaz.

Brady i Fishman [4] uważają, że zmniejszenie aktywności transferaz glukozy, obserwowane w komórkach myszy transformowanych przez onkogenne wirusy DNA, RNA i przez chemiczne kancerogeny, związane jest z blokowaniem biosyntezy enzymów.

Zagadnieniom transportu cukrów i aminocukrów przez błony komórek transformowanych i nowotworowych poświęcono wiele uwagi [19, 23, 28]. Ostatnio Hatanaka [29] w obszernej pracy poglądowej podsumował badania z tej dziedziny. Autor uważa, że procesowi transformacji neoplastycznej komórek ssaków przez wirusy mięsaka myszy (MSV), wirusy SV-40, wirusy polyoma lub wirusy mięsaka Rousa (RSV) towarzyszy zawsze przyspieszony transport cukrów do komórek, który nie jest związany z ich fosforylacją. Stwierdzono, że wzrost transportu cukrów następuje już w 16 godzinie po zakażeniu hodowli fibroblastów onkogennymi wirusami, podczas gdy zmiany morfologiczne pojawiają się później. Przepuszczalność błony dla innych składników, m. in. urydyny, tymidyny, leucyny lub fosforanów, nie ulega zmianie. Autor uważa na podstawie badań z zastosowaniem inhibitorów transportu cukrów przez błony komórek transformowanych i prawidłowych, że różnice w szybkości przechodzenia tych związków spowodowane są specyficznym uszkodzeniem błony komórek w wyniku działania onkogennych wirusów lub innych czynników działających transformująco na komórkę.

Defendi i Gasic [15] wykazali za pomocą technik histochemicznych wzrost zawartości kwaśnych polisacharydów w powierzchniowej warstwie błon komórek chomika transformowanych wirusem polyoma. Glick i wsp. [21] sugerują istnienie korelacji między zawartością glikopeptydów występujących na powierzchni błon a tworzeniem się nowotworu, jego złośliwością i inwazyjnością. Wymienieni autorzy wykazali, że na powierzchni błon komórek transformowanych kancerogenami chemicznymi pojawiają się specyficzne glikopeptydy zawierające fukozę. Rola tych glikopeptydów jest nieznana, niemniej jednak występowanie znacznych ich ilości w komórkach transformowanych może wskazywać, zdaniem Warrena i wsp. [83, 84], na ich udział w regulacji wzrostu i po-

działu komórkowego. Podobne zmiany zaobserwowano po transformacji wirusowej komórek [6, 83].

Ostatnio Shin i Carraway [72], badając składniki powierzchniowe błon komórek mięsaka 180 i komórek nerki chomika, stwierdzili większą zawartość komponenty glikoproteidowej w błonach komórek mięsaka.

Yamamoto i Terayama [90] potwierdzają wyniki poprzednich autorów co do wzrostu zawartości składników cukrowych w błonach komórkowych i uważają, że heterogenność komponenty mukopolisacharydowej, obecnej na powierzchni błony, jest charakterystyczna dla błony komórek wątrobiaka.

Kimoto i wsp. [41] stwierdzili, że inkubacja cząsteczek koloidalnego żelaza z komórkami prawidłowymi fibroblastów chomika lub z komórkami transformowanymi przez wirusy i komórkami raka wysiękowego Ehrlicha wykazała znaczny spadek aktywności fagocytarnej komórek transformowanych i rakowych. Przyczyna tego zjawiska nie została wyjaśniona. Seno i wsp. [68] oraz Kimoto i wsp. [42] wiążą zmiany w aktywności fagocytarnej ze zmianami składu powierzchniowego błony komórek transformowanych. Zdaniem Kimoto i wsp. [42] aktywność fagocytarna komórek jest ściśle związana z sekwencją specyficznych węglowodanów i resztą hydrofobową lipidów w łańcuchu oligosacharydowym powierzchni komórek. Stwierdzono, że zmniejszenie ładunków elektrostatycznych na powierzchni błony, spowodowane utratą pewnych ilości kwasu sialowego, w wyniku działania neuraminidazą, nie wpływa w decydujący sposób na zdolność fagocytarną komórek. Być może, również inne ujemnie naładowane substancje powierzchni komórek, łącznie ze zmianą składu chemicznego błony komórkowej, są odpowiedzialne za zmniejszoną aktywność fagocytarną. Zmiany w aktywności fagocytarnej komórek stanowiłyby zatem ważną informację, świadczącą o modyfikacjach w molekularnej architekturze powierzchni błon komórek transformowanych.

Odmiennność składu chemicznego powierzchni błon komórek transformowanych znajduje swe odbicie w jej charakterze antygenowym [31, 59]. Własności antygenowe komórek uzależnione są od zawartości na ich powierzchni zarówno glikoproteidów, jak i glikolipidów [49]. Transformowane komórki uzyskują specyficzne antygeny powierzchniowe, antygeny wirusowe, antygeny transplantacyjne specyficzne dla nowotworu oraz antygeny nowotworowo-płodowe, których brak w komórkach prawidłowych.

W tabeli 1 wyszczególnione są swoiste antygeny komórek prawidłowych i transformowanych.

Różnice w strukturze zewnętrznych warstw błon powierzchniowych komórek transformowanych i prawidłowych można stwierdzić przez zastosowanie lektyn [7]. Lektyny są glikoproteidami izolowanymi z nasion wielu roślin [69]. Mają one zdolność aglutynacji pewnych typów

TABELA 1. Różnice immunologiczne fibroblastów 3T3 prawidłowych, transformowanych i traktowanych trypsyną wg [65]

Antygeny	komórki		
	prawidłowe	transformowane	traktowane trypsyną
Transplantacyjne antygeny specyficzne dla nowotworu	—	+	—
Wirusowe antygeny specyficzne dla nowotworu	—	+	—
Antygen błony komórkowej	—	+	+
Antygen Forssmana	—	+	+
Antygen nowotworowo-płodowy	—	+	?

komórek. Ze względu na zdolność związania się z określonymi resztami cukrowymi struktur biologicznych, lektyny można porównać z przeciwciałami. Przeważająca większość komórek transformowanych, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, z łatwością ulega aglutynacji pod wpływem lektyn [36, 37, 69]. Przyjmuje się, że ilość receptorów dla lektyn jest w obu typach komórek jednakowa, odmienna jest jedynie ich lokalizacja na powierzchni błon komórkowych [13]. Stwierdzenie to bazuje na badaniach ze znakowaną trytem ^3H -lektyną i konkanawaliną A znakowaną ^{125}J . Inbar i Sachs [37] zaobserwowali, że konkanawalina A w stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$ aglutynuje komórki białaczkowe, komórki transformowane przez wirusy polyoma i wirusy SV-40, chemiczne kancerogeny oraz promieniowanie X.

Zmiany wrażliwości komórek na działanie lektyn mogą zachodzić również na skutek działania enzymów proteolitycznych [67]. Działanie trypsyną na komórki fibroblastów myszy powoduje pojawienie się na powierzchni komórek antygenów podobnych jak po transformacji wirusami. Wówczas zostają odsłonięte niektóre specyficzne antygeny komórek prawidłowych, takie jak antygen Forssmana i antygen powierzchniowy [10]. Zmieniona powierzchnia komórek umożliwia ich aglutynację przez lektyny [8, 36, 37].

Agglutynacja komórek traktowanych proteazami jest podobna pod wieloma względami do aglutynacji komórek transformowanych przez wirusy i również wydaje się, że mechanizm tego procesu jest identyczny w obu typach komórek [9, 11, 70]. Proteazy powodują odszczepienie glikopeptydów i mukopolisacharydów z warstwy powierzchniowej błony komórkowej. Powoduje to bądź odsłonięcie na powierzchni komórki miejsc wiążących aglutyniny, bądź ich przegrupowanie, doprowadzające do zagęszczenia receptorów w określonych rejonach komórki.

Wrażliwość niektórych komórek na aglutynujące działanie lektyn przedstawia tabela 2.

TABELA 2. Wrażliwość prawidłowych i transformowanych fibroblastów myszy 3T3 na substancje aglutynujące, wyrażona odwrotnością stężenia lektyn w mg/ml przy 1/2 maksymalnej aglutynacji [7, 36, 37]

Substancje aglutynujące	Stężenie lektyn [1/mg/ml]			
	komórki 3T3			
	prawidłowe	traktowane trypsyną	transformowane wirusem SV-40	transformowane wirusem polyoma
Lektyna z kielków pszenicy	1	100	70	100
Konkanawalina A	2	4	50	80
Lektyna z nasion fasoli	1	10	20	100

Wielu autorów przypuszcza, że za zmianę składu chemicznego powierzchni błony komórek nowotworowych mogą być odpowiedzialne enzymy proteolityczne [2, 9, 11, 67, 78]. Schnebli stwierdził, że aktywność proteaz powierzchni błon komórek transformowanych jest 3–10-krotnie wyższa w porównaniu z komórkami prawidłowymi [64]. Wysunięto także przypuszczenia, że aktywność proteolityczna komórek transformowanych jest odpowiedzialna za utratę hamowania wzrostu przez kontakt. Potwierdzeniem tej sugestii są dane, z których wynika, że hamowanie aktywności proteolitycznej komórek przez inhibitory proteaz powoduje częściowy spadek wzrostu komórek [35, 63, 65]. Wyniki zawarte w tabeli 3 wskazują, że niektóre syntetyczne i naturalne inhibitory proteaz hamują wzrost komórek transformowanych, a nie wywierają wpływu na wzrost komórek prawidłowych.

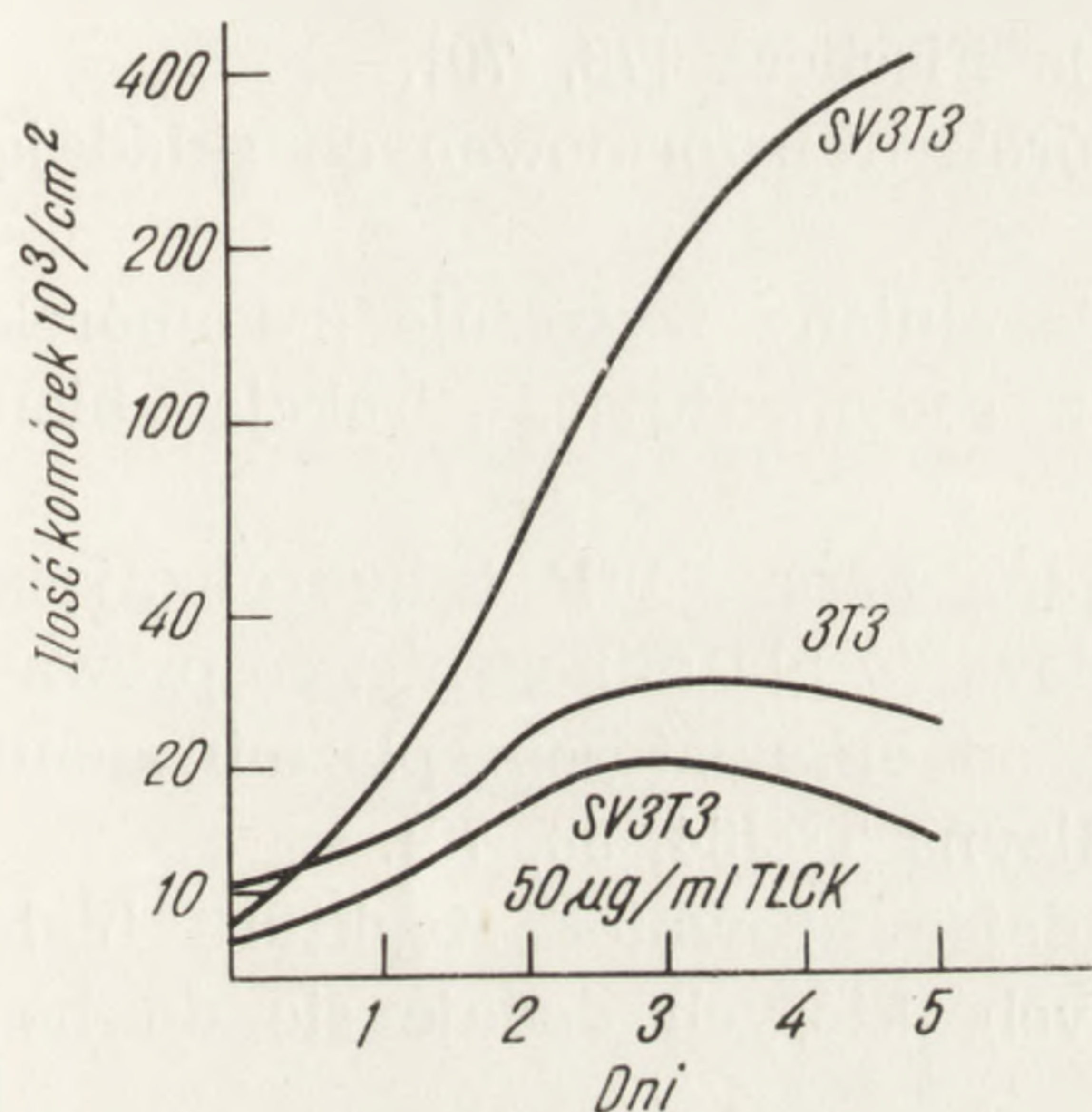
TABELA 3. Hamowanie wzrostu fibroblastów 3T3 myszy przez niektóre inhibitory proteaz wg [11, 65]

Inhibitor	Stężenie końcowe (mg/ml)	% hamowania wzrostu komórek		
		prawidłowych	transformowanych wirusem SV-40	transformowanych wirusem polyoma
Ester metylowy	100	0	—	12
N- α -tosyl-l-argininy (TAME)	200	0	—	47
N- α -tosyl-lizyn-chlorometyloketon (TLCK)	25	0	70	5
	50	0	87	47
N- α -tosyl-feniloalanin-chlorometyloketon (TPCK)	5	0	24	—
	10	2	60	—
Ovomukoid	250	2	14	32
	500	1	30	43
Trasylol	200*	0	18	—

* – j/ml

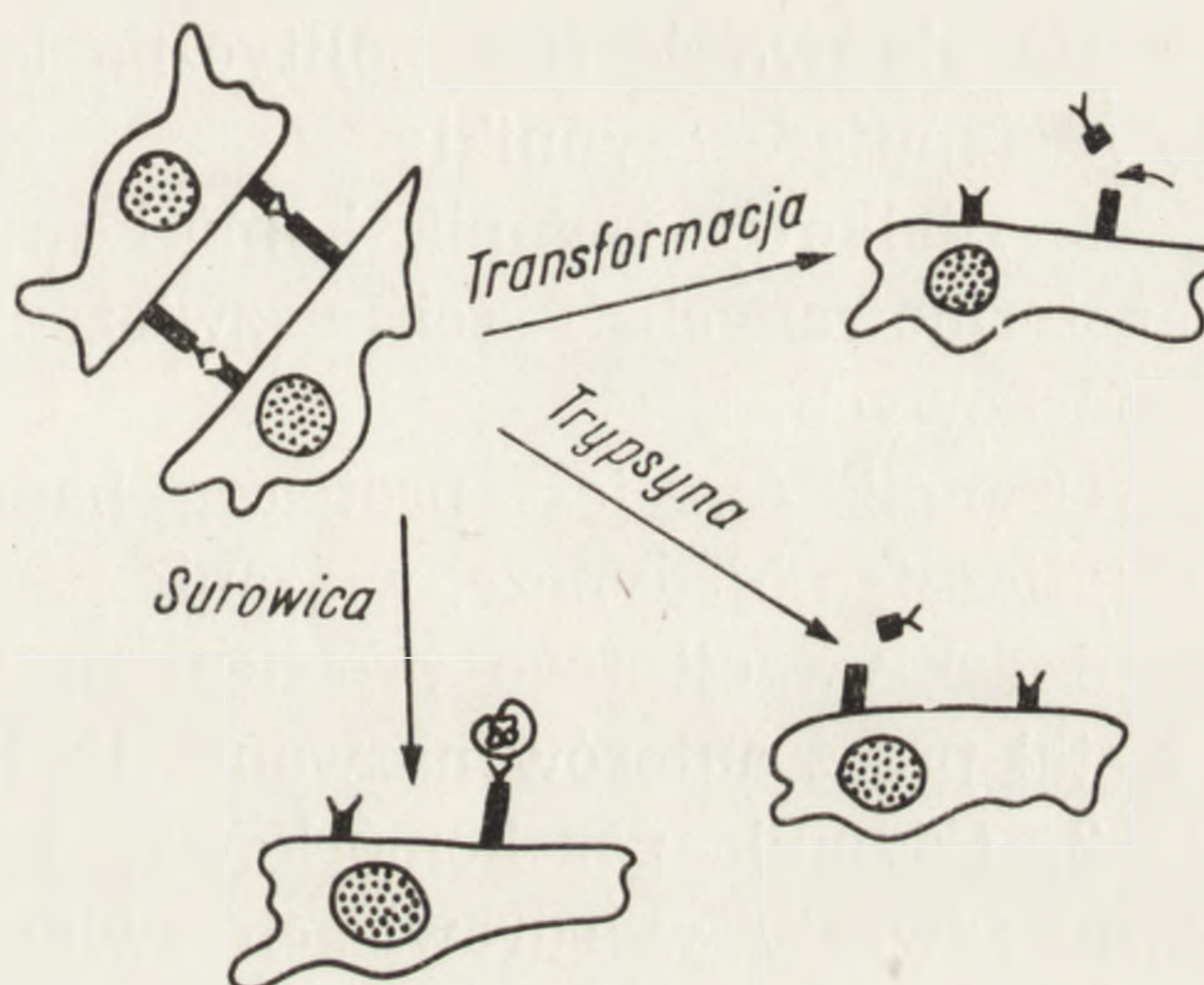
Ostatnio Schnebli i Haemmerli [66] przy użyciu znakowanej ^3H -tymidyny wykazali, że hamowanie cyklu komórkowego przez tosyllizyn-chlorometyloketon (TLCK), który jest syntetycznym inhibitorem pewnych proteaz, polega na blokowaniu fazy mitotycznej bez wpływu na fazę G-1 wzrostu komórek.

Na ryc. 1 przedstawiono hamujące działanie TLCK na wzrost komórek transformowanych. W obecności tego inhibitora krzywa wzrostu komórek transformowanych jest zbliżona do krzywej wzrostu komórek prawidłowych [65].



Ryc. 1. Hamowanie wzrostu fibroblastów 3T3 przez syntetyczny inhibitor proteaz TLCK, wg [65]

3T3 — fibroblasty prawidłowe myszy.
SV3T3 — fibroblasty transformowane wirusem SV-40. SV3T3 — po inkubacji z TLCK (50 µg/ml)



Ryc. 2. Model zmian regulacji wzrostu fibroblastów pod wpływem różnych czynników, wg [65]. Objaśnienia w tekście

Schnebli [66] podał model zmian regulacji wzrostu komórek pod wpływem różnych czynników. Autor ten zakłada istnienie na powierzchni komórek specyficznych receptorów W i Y, koniecznych dla hamowania wzrostu komórek przez kontakt. Interakcja receptora W jednej komórki z receptorem Y drugiej komórki jest sygnałem powodującym zahamowanie ich wzrostu. Model ten wyjaśnia ponadto mechanizm hamowania wzrostu przez kontakt komórek transformowanych enzymami proteolitycznymi. Na skutek zniesienia receptora Y przez te enzymy nie dochodzi do interakcji z miejscem receptora W drugiej komórki i wzrost komórek staje się dzięki temu możliwy.

Interesujące jest również spostrzeżenie, że surowica krwi i insulina znoszą efekt hamowania wzrostu przez kontakt. Schnebli [65] zjawisko to tłumaczy wiązaniem receptora Y przez glikoproteidy surowicy. Mechanizm działania insuliny ma polegać natomiast na aktywacji enzymów proteolitycznych lub aktywacji cyklazy adenylowej [73].

Interesującym problemem związanym z transformacją fibroblastów ssaków przez onkogenne wirusy i chemiczne związki kancerogenne jest pojawienie się aktywności fibrynolitycznej [53, 54, 55, 58, 61, 78, 79]. Po raz pierwszy różnice w aktywności enzymów fibrynolitycznych komórek nowotworowych i prawidłowych zaobserwował Fischer w 1925 r. [18], stwierdzając w tkance nowotworowej mięsaka obecność enzymów powodujących fibrynolizę skrzepu. Zagadnienie aktywności enzymów fibrynolitycznych komórek transformowanych zostało ponownie podjęte w ostatnich latach przez grupę badaczy z Uniwersytetu Rockefellera w Nowym Yorku. W doświadczeniach ze znakowaną radioaktywnie ^{125}J -fibryną potwierdzono obserwacje Fischera [78, 79].

Na aktywność fibrynolityczną komórek transformowanych składają się następujące czynniki:

1. Białkowy czynnik komórkowy, uwalniany wyłącznie z komórek transformowanych i ściśle związany z sedymentującą frakcją błon komórkowych.

Czynnik ten jest proteazą, hamowaną przez DFP i hydrolizującą specyficznie pojedyncze, wiązanie peptydowe w plazminogenu, co prowadzi do aktywacji tego proenzymu; jest on aktywatorem plazminogenu i został przez autorów nazwany fibrynolizyną T^c [54, 58, 79].

2. Czynnik pozakomórkowy, posiadający również strukturę białkową, zawarty w surowicach zwierzęcych, których dodaje się do hodowli fibroblastów.

Nazwany on został przez autorów fibrynolizyną T^s i odpowiada plazminogenowi [55, 61].

Interakcja obu czynników przyczynia się do pojawienia się aktywności fibrynolitycznej komórek transformowanych. Dowodem tego są doświadczenia z eliminacją znakowanego ^{131}J -plazminogenu z medium hodowli komórek transformowanych [55]. Tabela 4 przedstawia aktywność fibrynolityczną prawidłowych i transformowanych fibroblastów zwierzęcych, wyrażoną w % uwolnionych ^{125}J -fibrynopeptydów [54].

Ważną obserwacją, poczynioną przez autorów, było również to, że transformacji nowotworowej wywołanej przez wirusy SV40 towarzy-

TABELA 4. Aktywność fibrynolityczna prawidłowych i transformowanych fibroblastów wg [54]

	% radioaktywności ^{125}J -fibrynopeptydów uwalnianych do medium
Kontrola (bez komórek)	1,20
Prawidłowe fibroblasty chomika	1,40
Fibroblasty chomika transformowane SV-40	31,00
Prawidłowe fibroblasty myszy C57BL	1,65
Fibroblasty myszy C57BL transformowane MSV*	9,60

* — wirus mięsaka myszy

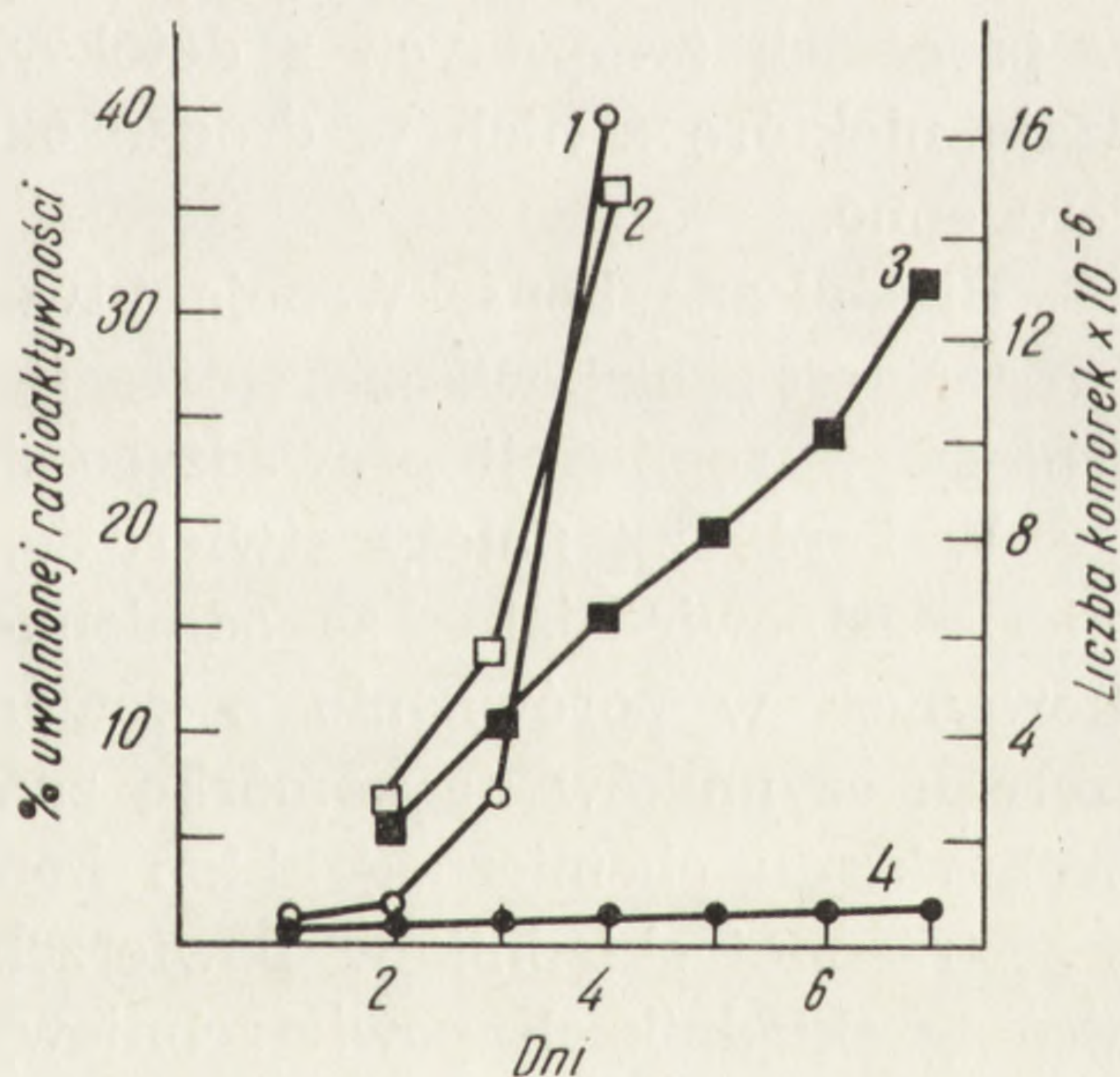
szą zmiany morfologiczne skorelowane z aktywnością fibrynolityczną [53]. Sądzi się więc, że odpowiedzią komórek na działanie transformujące onkogennych wirusów są zmiany morfologiczne i zmiany w aktywności fibrynolitycznej.

Uwalniana z transformowanych komórek fibrynolizyna T^c jest odpowiedzialna za utratę hamowania kontaktowego komórek SV3T3 i za zmiany w szybkości ich migracji i przylegania do podłoża [55]. Ossowski i wsp. sugerują, że powstająca na skutek działania fibrynolizyny T^c plazmina może w sposób ciągły usuwać niektóre składniki powierzchniowe błony komórkowej, zmieniając jej architekturę. Przedstawione poglądy są w dobrej zgodności z hipotezą Schnebliego [66] o uszkodzeniu receptorów na powierzchni błon komórek transformowanych przez proteazy.

Ostatnio pojawiły się prace sugerujące ważną rolę fibrynolizyny T^c we wzroście transformowanych fibroblastów myszy [12]. Wprowadzenie do medium inkubacyjnego syntetycznego inhibitora plazminy, jakim jest kwas E-aminokapronowy (EACA), powoduje zahamowanie aktywności fibrynolitycznej transformowanych fibroblastów, mierzonej uwalnianiem ^{125}J -fibrynopeptydów, i zahamowanie aktywności mitotycznej tych komórek.

Ryc. 3. Wzrost i aktywność fibrynolityczna fibroblastów transformowanych wirusem SV-40, wg [54]

1. Aktywność fibrynolityczna fibroblastów SV3T3, 2. Wzrost fibroblastów SV3T3 po inkubacji z EACA (10 mg/ml), 3. — Wzrost fibroblastów SV3T3, 4. Aktywność fibrynolityczna fibroblastów SV3T3 po inkubacji z EACA (10 mg/ml)



Jest niezmiernie interesujące, że inhibitor ten hamuje wcielenie radioaktywnych aminokwasów, 3H -urydyny i 3H -tymidyny do kompleksów nukleoproteidowych [12]. Zwolnienie szybkości wzrostu komórek SV3T3 przez EACA autorzy tłumaczą zdolnością hamowania syntezy niektórych białek przez ten inhibitor.

Transformacja fibroblastów myszy indukowana przez chemiczne kancerogeny, m. in. przez metylocholanren, powoduje również podobne zmiany morfologiczne i pojawienie się aktywności fibrynolitycznej, jak transformacja wywołana przez onkogenne wirusy [54]. Przemawiałoby

to za istnieniem wspólnego mechanizmu zmian w komórkach ulegających transformacji. W obu przypadkach fibrynolizyna T^c mogłaby być w czasie transformacji uaktywniana lub syntetyzowana drogą indukcji de novo.

Molekularny mechanizm przekształcania komórki prawidłowej w nowotworową przez chemiczne związki kancerogenne nie jest również w pełni poznany, mimo badań wielu autorów [16, 20, 24, 25, 32, 33, 34, 50, 51]. Badania Heidelbergera i wsp. oraz innych autorów [34, 39, 89] wykazały, że związki kancerogenne po połączeniu się z receptorem komórkowym i wnikięciu do wnętrza komórki łączą się bezpośrednio z chromosomalnym DNA, RNA, nukleozydami, nukleotydami, poliribonukleotydami i nukleohistonami albo też ulegają uprzednio przemianie dokonywanej przez mikrosomalne enzymy w aktywne kancerogeny. Taka metaboliczna aktywacja została wykazana m. in. w przypadku benzopyrenu. Inkubacja tego związku z mikrosomami wątroby szczura w obecności NADPH i tlenu powoduje powstawanie produktu, który wiąże się z DNA [20, 24].

Marquardt i Heidelberger stwierdzili, że niektóre związki chemiczne, indukujące wzrost aktywności oksydaz mikrosomalnych, przyspieszają transformację komórek wzbudzaną przez metylocholanren [50]. Zatem mikrosomy, które uważane są powszechnie za organelle biorące udział w procesach związanych z detoksykacją obcych związków, przeprowadzają niektóre z nich w drodze oksydacji w aktywne metabolity kancerogenne.

Biologiczną konsekwencją utworzenia kompleksu DNA-, RNA-kancerogen jest zahamowanie replikacji DNA, bloki lub błędy w transkrypcji i błędy w replikacji prowadzące do mutacji.

W konkluzji należy stwierdzić, że błona komórkowa jest w dużej mierze odpowiedzialna za odmienne zachowanie się komórek transformowanych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Oddziaływanie szeregu czynników na komórkę znajduje swe odzwierciedlenie w zmianach składu chemicznego błon komórkowych i w zmianach struktury przestrzennej składników powierzchniowych błony. Nawet drobne różnice w składnikach powierzchniowych mogą być przyczyną znacznych różnic we właściwościach błon komórkowych. Pociąga to za sobą pojawienie się odmiennych właściwości takich komórek, jak wzmożona aktywność proliferacyjna, zmienione właściwości immunologiczne, łatwość ulegania aglutynacji pod wpływem lektyn, osłabienie aktywności fagocytarnej oraz zmiany w przepuszczalności.

Wydaje się, że badania nad powiązaniem między specyficzną architekturą składników błon komórkowych a metabolizmem i wzrostem komórki powinny wyjaśnić wiele zagadnień dotyczących biologii komórki prawidłowej i transformowanej.

LITERATURA

- [1] BLACK, P. W., WU, H., MEEZAN, E., ROBERTSON, H. T. and ROBBINS, P. W., Antigen and biochemical changes in membranes of virus transformed cells, *Fed. Proc.*, **28**: 567, 1969.
- [2] BOSMANN, H. B., Elevated glycosidases and proteolytic enzymes in cells transformed by RNA tumor virus, *Biochim. Biophys. Acta*, **264**: 339–343, 1972.
- [3] BOSMANN, H. B., HAGOPIAN, A. and EYLAR, E. H., Cellular membranes: the biosynthesis of glycoprotein and glycolipid in HeLa cell membranes, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **130**: 573–583, 1969.
- [4] BRADY, R. O. and FISHMAN, P. H., Biosynthesis of glycolipids in virus-transformed cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **355**: 121–148, 1974.
- [5] BROOKES, P., On the interaction of carcinogens with DNA, *Biochem. Pharmacol.*, **20**: 999–1003, 1971.
- [6] BUCK, C. A., GLICK, M. C. and WARREN, L., A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous sarcoma virus transformed hamster cells, *Biochemistry*, **9**: 4567–4576, 1970.
- [7] BURGER, M. M. and GOLDBERG, A. R., Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **57**: 359–366, 1967.
- [8] BURGER, M. M., A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **62**: 994–1001, 1969.
- [9] — Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth, *Nature*, **227**: 170–171, 1970.
- [10] — Forssman antigen exposed on surface membrane after viral transformation, *Nature, New Biology*, **231**: 125–126, 1971.
- [11] — Current Topics in Cellular Regulation 3, 135–193, red. B. L. Horecker, E. R. Stadtman, Academic Press, New York and London 1971.
- [12] CHOU, I-N., BLACK, P. H. and ROBLIN, R. O., Suppression of fibrinolysin T activity fails to restore density-dependent growth inhibition to SV3T3 cells, *Nature*, **250**: 739–740, 1974.
- [13] CLINE, M. J. and LIVINGSTON, D. C., Binding of 3H-concanavalin A by normal and transformed cells, *Nature, New Biology*, **232**: 155–156, 1971.
- [14] DANIELLI, J. F. and DAVSON, H. A., A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.* **5**: 495–500, 1935.
- [15] DEFENDI, V. and GASIC, G., Surface mucopolisacharides of polyoma transformed cells, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **62**: 23–31, 1963.
- [16] DIPAOLO, J. A., NELSON, R. L. and DONOVAN, P. J., Morphological oncogenic and caryological characteristics of syrian hamster embryo cells transformed in vitro by oncogenic polycyclic hydrocarbons, *Cancer Res.*, **31**: 1118–1123, 1971.
- [17] EVANS, W. H., Fractionation of liver plasma membranes prepared by zonal centrifugation, *Biochem. J.*, **166**: 833–842, 1970.
- [18] FISCHER, A., Beitrag zur Biologie der Gewebezellen. Eine vergleichendbiologische Studie der normalen und malignen Gewebezellen in vitro, *Arch. Entwicklungsmech. Org.*, **104**: 210–261, 1925.
- [19] FOSTER, D. O. and PARDEE, A. B. Transport of aminoacids by confluent 3T3 and polyoma virus-transformed 3T3 cells growing on glass cover slips, *J. Biol. Chem.*, **244**: 2675–2681, 1969.
- [20] GELBOIN, H. V., A microsome-dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA, *Cancer Res.*, **29**: 1272–1276, 1969.
- [21] GLICK, M. C., RABINOWITZ, Z. and SACHS, L., Surface membrane glycopeptides correlated with tumorigenesis, *Biochemistry*, **12**: 4864–4868, 1973.
- [22] GRIMES, W. J., Sialic acid transferases and sialic acid levels in normal and

- transformed cells, *Biochemistry*, **9**: 5083-5092, 1970.
- [23] GRIMES, W. J. and SCHROEDER, J. L., Dibutyl cyclic adenosine 3'5'monophosphate, sugar transport and regulatory control of cell division in normal and transformed cells, *J. Cell. Biol.*, **56**: 487-491, 1973.
- [24] GROVER, P. L. and SIMS, P., Enzyme catalysed reactions of polycyclic hydrocarbons with deoxyribonucleic acid and protein in vitro, *Biochem. J.*, **110**: 159-160, 1968.
- [25] — Interactions of the K-region epoxides of phenantrene and dibenz(a,h)-anthracene with nucleic acids and histone, *Biochem. Pharmacol.*, **19**: 2251-2259, 1970.
- [26] GRZELAKOWSKA-SZTABERT, B., Zmiany powierzchniowe komórek towarzyszące ich transformacji wirusowej, *Post. Biochem.*, **20**: 3-22, 1974.
- [27] HAKOMORI, S. and MURAKAMI, W. T., Glicolipids of hamster fibroblast and derived malignant-transformed cell lines, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **59**: 254-261, 1968.
- [28] HATANAKA, M. and HANAFUSA, H., Analysis of a functional change in membrane in the process of cell transformation by Rous sarcoma virus; Alteration in the characteristics of sugar transport, *Virology*, **41**: 647-652, 1970.
- [29] HATANAKA, M., Transport of sugars in tumor cell membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **355**: 77-104, 1974.
- [30] HAWKINS, C. F. and JACQUEZ, J. A., Rat liver membrane preparations, *Anal. Biochem.*, **49**: 290-293, 1972.
- [31] HÄYRY, P. and DEFENDI, V., Surface antigen(s) of SV40 transformed tumor cells, *Virology*, **41**: 22-29, 1970.
- [32] HEIDELBERGER, C., Chemical carcinogenesis, chemotherapy: Cancers countinuing 'eore challegens — G. H. A clowes memorial lecture, *Cancer Res.*, **30**: 1549-1569, 1970.
- [33] — Studies on the cellular and molecular mechanism of hydrocarbon carcinogenesis, *Eur. J. Cancer*, **6**: 161, 1970.
- [34] — Current trends in chemical cancerogenesis, *Fed. Proc.*, **32**: 2154-2161, 1973.
- [35] HOLLEY, R. W., and KIERMAN, A. J., Contact inhibition of cell division in 3T3 cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **60**: 300-304, 1968.
- [36] INBAR, M., and SACHS, L., Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells, *Nature*, **223**: 710-712, 1969.
- [37] — Interaction of the carbohydratebinding protein concanavalin A with normal and transformed cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **62**: 1418-1425, 1969.
- [38] JONES, P. C., A contractile protein model for cell division, *Nature*, **212**: 365-369, 1966.
- [39] JUNGSMANN, R. A. and SCHWEPPE, J. S., Binding of chemical carcinogens to nuclear proteins of rat liver, *Cancer Res.*, **32**: 952-959, 1972.
- [40] KASOROV, L. B. and FRIEDMAN, H., Enhanced Na K⁺-activated adenosine triphosphatase activity in transformed fibroblasts, *Cancer Res.*, **34**: 1862-1865, 1974.
- [41] KIMOTO, T., YOKAMURA, E., SHIMUZI, Y., YAMAKAWA, M. and SENNO, S., Malignant transformation on human cell in vitro by the SV40 DNA and related alteration in biological activity of cell membranes, *Acta Med. Okayama*, **25**: 77-86, 1971.
- [42] KIMOTO, T., YOKOMURA, E., MORIWAKI, K. and YAMAKAWA, M., Malignant cell transformation by the SV40 DNA and phagocytic activity related to alteration of cell membranes, *Acta Med. Okayama*, **25**: 1-12, 1970.
- [43] KORN, E. D., Current concepts of membrane structure and function, *Fed. Proc.*, **28**: 6-11, 1969.
- [44] KOROHOODA, W., AMBROSE, E. J. and FORESTER, J. A., Some aspects of

- the dynamic characteristics of biological membranes, *Fol. Biol.*, **15**: 371–393, 1967.
- [45] LEVITAN, I. B., MUSHYNSKI, W. E. and RAMINEZ, G., Highly purified synaptosomal membranes from rat brain, *J. Biol. Chem.*, **247**: 5376–5381, 1972.
- [46] LINDAHL-KIESSLING, K. and MATTSON, A., Mechanism of phytohemagglutinin (PHA) action. IV. Effect of some metabolic inhibitors on binding of PHA to lymphocytes and the stimulatory potential of PHA-pretreated cells, *Exp. Cell Res.*, **65**: 307–312, 1971.
- [47] LIS, H., SELA, B. A., SACHS, L. and SHARON, N., Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soyabean agglutinin and animal cell surfaces, *Biochim. Biophys. Acta*, **211**: 582–585, 1970.
- [48] LUTZ, F. and FRIMMER, M., A new method for the isolation of plasma membranes from pig liver, *Z. Physiol. Chem.*, **351**: 1429–1434, 1970.
- [49] MARCUS, D. M. and CASS, L. E., Glycosphingolipids with Levis blood group activity: uptake by human erythrocytes, *Science*, **164**: 553–555, 1969.
- [50] MARQUARDT, H. and HEIDELBERGER, C., Influence of Feeder cells and inducers and inhibition of microsomal mixed-function oxidases on hydrocarbon-induced malignant transformation of cells derived from C3H mouse prostate, *Cancer Res.*, **32**: 721–725, 1972.
- [51] MILLER, J. A., Carcinogenesis by chemicals an overview, **30**: 559–576, 1970.
- [52] OHTA, N., PARDEE, A. B., MCAUSLAN, B. R. and BURGER, M. M., Sialic acid contents and controls of normal and malignant cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **158**: 98–102, 1968.
- [53] OSSOWSKI, L. and RIFKIN, D., Fibrinolysin T: Relationship to morphological and other parameters of transformation in hamster fibroblast cultures, *Fed. Proc.*, **32**: 851, 1973.
- [54] OSSOWSKI, L., UNKELESS, J. C., TOBIA, A., QUIGLEY, J. P., RIFKIN, D. B. and REICH, E., An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. II. Mamalian fibroblast cultures transformed by DNA and RNA tumor viruses, *J. Exp. Med.*, **137**: 112–126, 1973.
- [55] OSSOWSKI, L., QUIGLEY, J. P., KELLERMAN, G. M. and REICH, E., Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Requirement of plasminogen for correlated changes in cellular morphology, colony formation in agar, and cell migration, *J. Exp. Med.*, **138**: 1056–1064, 1973.
- [56] PALLADE, G. E., and Bruns, R. R., Structural modulations of plasmalemmal vesicles, *J. Cell. Biol.*, **37**: 533–549, 1968.
- [57] QUASTEL, M. R. and KAPLAN, J. G.: Early stimulation of potassium uptake in lymphocytes treated with PHA, *Exp. Cell Res.*, **63**: 230–233, 1970.
- [58] QUIGLEY, J. and UNKELESS, J., Fibrinolysin T: purification and characterization of the serum and cellular components, *Fed. Proc.*, **32**: 851, 1973.
- [59] RAPP, F., The role of the viral genome in oncogenesis, *Cancer Res.*, **28**: 1832–1834, 1968.
- [60] RAWLS, W. E., MELNICK, J. L., OLSON, G. B., DENT, P. B. and GOOD, R. A., Effect of amantidine hydrochloride on the response of human lymphocytes to phytohemagglutinin, *Science*, **158**: 506–507, 1967.
- [61] RIFKIN, D. B., LOEB, J. N., MOORE, G. and REICH, E., Properties of plasminogen activators formed by neoplastic human cell cultures, *J. Exp. Med.*, **139**: 1317–1328, 1974.
- [62] ROBERTSON, J. D., The ultrastructure of cell membranes and their derivatives, *Rev. Modern Physics*, **31**: 50–60, 1959.
- [63] SCHNEBLI, H. P. and BURGER, M. M., Selective inhibition of growth of transformed cells by protease inhibitors, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 3825–3827, 1972.

- [64] SCHNEBLI, H. P., A protease-like activity associated with malignant cells, *Schweiz. Med. Wschr.*, **102**: 1194–1197, 1972.
- [65] — Die Rolle der Plasmamembran in der malignen Transformation, *Helv. med. Acta*, **36**: 371–384, 1974.
- [66] SCHNEBLI, H. P. and HAEMMERLI, G., Protease inhibitors do not block transformed cells in the G₁ phase of the cell cycle, *Nature*, **248**: 150–151, 1974.
- [67] SEFTON, B. M. and RUBIN, H., Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes, *Nature*, **227**: 843–845, 1970.
- [68] SENO, S., YOKOMURA, E., KIMOTO, T., SOGABE, K. and ITOH, N., Uptake of metal colloid particles by Ehrlich ascites tumor cell induced by histone, *Proc. Inter. Haemorheology*, red. J. Copley, Pergamon, Oxford and New York 1968, p. 565–568.
- [69] SHARON, N. and LIS, H., Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins, *Science*, **177**: 949–959, 1972.
- [70] SHEPPARD, J. R., LEVINE, A. L. and BURGER, M. M., Cell surface changes after injection with oncogenic viruses: requirement for synthesis of host DNA, *Science*, **172**: 1345–1346, 1971.
- [71] SHIMUZU, S., and FUNACOSHI, I., Carbohydrate composition of the plasma membranes of rats ascites hepatoma, *Biochim. Biophys. Acta* **203**: 167–169, 1970.
- [72] SHIN, B. C. and CARRAWY, K. L., Cell surface constituents of sarcoma 180 ascites tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **330**: 254–268, 1973.
- [73] SHLATZ, L. and MARINETTI, G. V., Hormone-calcium interactions with the plasma membrane of rat liver cells, *Science*, **176**: 175–177, 1972.
- [74] SIVAK, A. and VAN DUUREN, B. L., A cell culture system for the assessment of tumor-promoting activity, *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**: 1091–1097, 1971.
- [75] SIVAK, A., Induction of cell division: role of cell membranes sites, *J. Cell. Phys.*, **80**: 167–173, 1972.
- [76] SIVAK, A., BROOKE, T., MOSSMAN, T. and VAN DUUREN, B. L., Activation of cell membrane enzymes in the stimulation of cell division, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **46**: 605–609, 1972.
- [77] TRUDING, R., SHELANSKI, M. L., DANIELS, M. P. and MORELL, P., Comparison of surface membrane isolated from cultured murine neuroblastoma cells in the differentiated or undifferentiated state, *J. Biol. Chem.*, **249**: 3973–3982, 1974.
- [78] UNKELESS, J. C., TOBIA, A., OSSOWSKI, L., QUIGLEY, J. P., RIFKIN, D. B. and REICH, E., An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. I. Chick embryo fibroblast cultures transformed by avian RNA tumor viruses, *J. Exp. Med.*, **137**: 85–111, 1973.
- [79] — Fibrinolysin T: an enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses, *Fed. Proc.*, **32**: 851, 1973.
- [80] VAN BECK, W. P., SMETS, L. A. and EMMELOT, P., Increased sialic acid density in surface glycoprotein of transformed and malignant cells — a general phenomenon?, *Cancer Res.*, **33**: 2913–2922, 1973.
- [81] WALLACH, D. F. H. and ZAHLER, P. H., Protein conformations in cellular membranes, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56**: 1552–1559, 1966.
- [82] WALLACH, D. F. H. and GORDON, A. S., Lipid-protein interactions in cellular membranes. [w] *Regulatory Functions of Biological Membranes*, red. J. Järnefelt Elsevier, Amsterdam 1968, p. 87–98.
- [83] WARREN, L., FUHRER, J. P. and BUCK, C. A., Surface glycoproteins of normal and transformed cells: A difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyltransferase, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 1838–1842, 1972.

- [84] WARREN, L., CRITCHLEY, D. and MACPHERSON, I., Surface glycoproteins and glicolipids of chicken embryo cells transformed by a temperature-sensitive mutant of Rous carcinoma virus, *Nature*, **235**: 275-278, 1972.
- [85] WEISS, L., The cell periphery, metastasis and other contact phenomena, North Holland, Amsterdam 1967, p. 268-270.
- [86] WEIHING, R. R., MANGANIELLO, V. C., CHIU, R. and PHILLIPS, A. H., Purification of hepatic microsomal membranes, *Biochemistry*, **11**: 3128-3135, 1972.
- [87] WU, H., MEEZAN, E., BLACK, P. H. and ROBBINS P. W., Differences in the composition of particulate fractions from mouse fibroblast 3T3 and SV-40 transformed 3T3, *Fed. Proc.*, **27**: 814, 1968.
- [88] WU, H. C., MEEZAN, E., BLACK, P. H. and ROBBINS, P. H., Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. I. Glucosamine labeling patterns in 3T3, spontaneously transformed 3T3 and SV-40 transformed 3T3 cells, *Biochemistry*, **8**: 2509-2517, 1969.
- [89] WUNDERLICH, V., Mechanismus der chemischen Kancerogenese: Fortschritte und Probleme, *Archiv. Geschwulstforsch.*, **38**: 310-326, 1971.
- [90] YAMAMOTO, K. and TERAYAMA, H., Comparison of cell coat acid mucopolisaccharides of normal liver and various ascites hepatoma cells, *Cancer Res.*, **33**: 2257-2264, 1973.

Otrzymano: 4 listopad 1974.

Przyjęto: 15 luty 1975.

Adres autorów: ul. Mickiewicza 2c, 15-213 Białystok.

KOMUNIKAT

Zgodnie z uchwałą Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Genetycznego, VI Zjazd PTG odbędzie się w Białymstoku w dniach 10–11 września 1976 r.

Porządek obrad przewiduje 3 referaty plenarne, komunikaty i doniesienia naukowe w sekcjach problemowych, sprawozdanie Zarządu Głównego PTG oraz wybory nowych władz.

Komitet Organizacyjny zamierza powołać następujące sekcje:

1. Sekcja Genetyki Ogólnej,
2. Sekcja Dziedziczenia Pozachromosomowego,
3. Sekcja Mutagenezy,
4. Sekcja Genetycznych Podstaw Produkcji Roślinnej,
5. Sekcja Hodowli Zwierzęcej,
6. Sekcja Cytogenetyki,
7. Sekcja Genetyki Klinicznej i Immunogenetyki.

Komitet Organizacyjny VI Zjazdu PTG uprzejmie prosi o nadsyłanie zgłoszeń prac i uczestnictwa do dnia 30 XI 1975 r. oraz do dnia 31 I 1976 r. — streszczeń prac pod adresem:

Komitet Organizacyjny VI Zjazdu
Polskiego Towarzystwa Genetycznego
ul. Warszawska 15, tel. 330-32
15-062 Białystok

Przewodniczący
Komitetu Organizacyjnego VI Zjazdu PTG
Doc. dr habil. Lucjan Wiśniewski

KOMUNIKAT

W dniach od 26 do 28 maja 1976 r. odbędzie się w Poznaniu XIV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików z następującą tematyką:

1. Zmiany cytochemiczne i histochemiczne w zatruciach przemysłowych i rolniczych.
2. Nowe metody cytochemiczne i histochemiczne.
3. Aparat Golgiego.

Termin zgłaszania uczestnictwa i doniesień upływa z dniem 31 grudnia 1975 r.
Adres Komitetu Organizacyjnego:

Doc. dr habil. Mirosław Kozik
Zakład Neuropatologii i Narządów Zmysłów
ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

STRUKTURA BŁON TYLAKOIDÓW

Stanisław WIĘCKOWSKI

Zakład Biochemii Roślin Instytutu Biologii Molekularnej
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. U wszystkich fotoautotrofów tylakoid stanowi podstawową jednostkę strukturalną systemu lamellarnego chloroplastów. U roślin wyższych wyróżnia się tylakoidy granowe i stromy. U glonów struktury te mają znaczne rozmiary i ułożone są wzdłuż dłuższej osi chloroplastu, natomiast w komórkach *Procariota* (fotoautotrofy bakteryjne, sinice) mają one różną postać i nie są oddzielone osłonką od cytoplazmy podstawowej.

W skład błon tylakoidów (lamell) wchodzi lipidy (około 50% suchej masy, głównie glikolipidy i fosfatydyloglicerol), węglowodany (około 8%) i białka (około 42%). Znaczna część białek występuje w postaci agregatów połączonych z substancjami lipidowymi.

Do tej pory nie została poznana organizacja błon tylakoidów na poziomie molekularnym. Wyniki badań nad dyfrakcją promieni X pod małym kątem oraz obserwacje w mikroskopie elektronowym (zwłaszcza przy zastosowaniu techniki kryorytownictwa do przygotowania preparatów) sugerują, że składają się one z dwóch ciągłych warstw lipidowych (części apolarne są skierowane do środka), w których zanurzone są co najmniej dwa rodzaje cząstek. Ponadto niektóre białka enzymatyczne mają być doczepione do powierzchni tych błon.

Istotną rolę w procesie fotosyntezy odgrywają błony, które występują albo w obrębie chloroplastów (w komórkach *Eucariota*), albo na terenie całej cytoplazmy (w komórkach *Procariota*). Błony te tworzą tzw. system lamellarny, którego podstawową jednostkę strukturalną stanowi tylakoid; odpowiada on pojedynczemu pęcherzykowi lub dyskowi [58, 59, 60].

W komórkach roślin naczyniowych występują chloroplasty granowe, w których system lamellarny jest złożony z tylakoidów granowych i tylakoidów stromy (ryc. 1). Występowanie pierwszych jest ograniczone do przestrzeni gran, natomiast drugie zajmują przestrzeń na terenie granum i na terenie stromy. Błony sąsiadujących ze sobą tylakoidów granowych są scementowane, przez co stają się one odporniejsze na dzia-

łanie czynników mechanicznych. Lamelle stromy są pojedyncze i dlatego łatwiej ulegają zniszczeniu w czasie przygotowywania preparatów do badań w mikroskopie elektronowym.

W komórkach glonów występują, często pojedynczo, chloroplasty bezgranowe. System lamellarny nie jest tu zróżnicowany; lamelle, tworząc nieraz wiązki, biegną równolegle do siebie wzdłuż dłuższej osi chloroplastu (ryc. 2a).

W komórkach pochwy wokółwiązkowej u wielu roślin typu C_4 znajdują się chloroplasty, które są pozbawione lub mają zredukowaną liczbę gran; duże tylakoidy układają się wówczas wzdłuż dłuższej osi chloroplastu (patrz [50]).

U sinic poszczególne tylakoidy nie są oddzielone od cytoplazmy podstawowej specjalną osłonką, lecz zajmują przestrzeń na terenie całej cytoplazmy (ryc. 2b), nadając jej zabarwienie zielone lub sine. Dlatego cytoplazmę w komórkach sinic nazywa się często chromoplazmą.

Fotoautotrofy bakteryjne posiadają chromatofory, które odpowiadają pojedynczym tylakoidom u innych roślin [60]. Wygląd chromatoforów jest różny u różnych bakterii. W zestawieniu podanym przez Oelze i Drewsa [74] wyróżniono 8 różnych typów (ryc. 3).

Z analizy wielu elektronogramów wynikałoby, że poszczególne tylakoidy tworzą w pewnym stopniu jednostki niezależne od siebie. Udało się jednak uzyskać dowody wskazujące na istnienie ciągłości błon wewnątrz chloroplastu [37]; tylakoidy łączą się między sobą za pomocą różnej wielkości kanałów. Do tej pory zaproponowano wiele modeli obrazujących przestrzenne ułożenie tylakoidów granowych i stromy. Niektóre z nich zestawiono na ryc. 4. Ciągłość błon wykazano nie tylko w chloroplastach u roślin wyższych, ale także w chloroplastach glonów oraz w chromatoforach bakterii; błony chromatoforów łączą się w komórkach fotoautotrofów bakteryjnych również z wewnętrzną błoną komórkową.

Poznano już względnie dokładnie funkcję omawianego typu błon. Wykazano mianowicie, że uczestniczą one w fotolizie wody (rośliny wyższe, glony), w fotoredukcji $NADP^+$ (NAD^+) i w fotofosforylacji (patrz [105, 108]). W nich są zlokalizowane barwniki fotosyntetyczne i reakcje fotochemiczne fotosyntezy*. Poza lamellami (w stromie chloro-

* U roślin wyższych i glonów w skład każdego łańcucha transportu elektronów wchodzi dwa zespoły barwników, które uczestniczą w dwóch różnych reakcjach fotochemicznych. Zespoły te nazwano fotosystemem I (PS I) i fotosystemem II (PS II). W skład każdego fotosystemu wchodzi centrum reakcji i antena energetyczna. Z kolei centrum reakcji składa się z barwnika (lub zespołu barwników), który dzięki zaabsorbowanej energii świetlnej bezpośrednio uczestniczy w transporcie elektronów. Natomiast energia zaabsorbowana przez barwniki znajdujące się w obrębie anten energetycznych jest przekazywana do centrum reakcji. U bakterii purpurowych występuje tylko jeden typ reakcji fotochemicznej.

plastu) przebiegają reakcje cyklu Calvina, synteza cukrowców i inne procesy w mniejszym stopniu związane z fotosyntezą [29a]. Ze względu na tę specyficzną funkcję, błony tylakoidów muszą różnić się składem chemicznym i organizacją na poziomie molekularnym od innych typów błon. Nie stwierdzono również ich łączności z innymi strukturami błoniastymi komórki (poza wewnętrzną błoną osłonki chloroplastu). Jedynie zewnętrzna błona osłonki chloroplastu może łączyć się z retikulum endoplazmatycznym, zewnętrzną błoną mitochondrialną, plazmolemmą i pęcherzykami diktiosomów [21]. Obserwacje te wskazują również na różne pochodzenie lamell chloroplastowych i innych typów błon wewnątrzkomórkowych [102].

SKŁAD CHEMICZNY LAMELL CHLOROPLASTOWYCH

Substancje lipidowe stanowią około 50% suchej masy chloroplastów. Jedynie w chromatoforach bakterii na ten typ związków przypada 20–40% [98, 5]. W pozostałości po usunięciu lipidów znajduje się około 8% węglowodanów [116, 38], natomiast resztę stanowią głównie białka.

Frację lipidową tworzą (tabl. 1): chlorofile*, karotenoidy (karoteny, ksantofile), chinony (plastochinon**, α -tokoferochinon, witamina K₁), fosfolipidy (fosfatydyloglicerol, fosfatydylocholina), glicerydy obojętne (monogalaktozylodwuglicerydy, dwugalaktozylodwuglicerydy), sulfolipidy i in. Jak wynika również z tabeli 1, związki te występują w różnych ilościach, np. stosunkowo mały procent stanowi fosfatydylocholina — związek charakterystyczny dla innych typów błon. Spośród fosfolipidów najwięcej jest fosfatydyloglicerolu. Glikolipidy stanowią około 4/5 wszystkich tłuszczowców występujących w lamellach, w tym około 90% przypada na mono- i dwugalaktozylodwuglicerydy, natomiast reszta na sulfolipidy.

Z tabeli 1 wynika również, że skład lipidowy błon tylakoidów różni się ilościowo i jakościowo od analogicznego składu osłonki chloroplastu, które zawiera względnie więcej mono- i dwugalaktozylodwuglicerydów, natomiast praktycznie pozbawiona jest sulfolipidów [87]. Ponadto w lamellach nie występują sterole, estry steroli, glikozydosterole, cerebrozydy i in. [51].

Lipidy lamell, zwłaszcza glikolipidy, zawierają dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych (tabl. 2). Najbardziej charakterystyczny jest kwas linolenowy, który poza bakteriami znajduje się w plastydach u wszyst-

* W lamellach barwniki chlorofilowe są powiązane z białkami i występują jako kompleksy chlorofilowo-białkowe lub bakteriochlorofilowo-białkowe. Chlorofil *a* występuje w tych kompleksach w co najmniej trzech formach oznaczonych jako P700, Ca682 i Ca670. W kilku formach występuje również bakteriochlorofil [113].

** U bakterii purpurowych zamiast plastochinonu występuje ubichinon.

TABELA 1. Skład lipidowy osłonki i lamell chloroplastów szpinaku. Wartości podano w % całkowitej zawartości lipidów w suchej masie. Wg zestawienia podanego w pracy R. P. Poincelota [87]

	osłonka	lamelle
monogalaktozydylodwuglicerydy	32,8	22
dwugalaktozydylodwuglicerydy	33,6	15
sulfolipidy	0,8	7
trójgalaktozydylodwuglicerydy	1,5	—
cerebrozydy	2,7	0
sterologlikozydy	1,1	0
acylowane sterologlikozydy	0,8	0
fosfatydylocholina	9,3	2,9
fosfatydyloglicerol	2,9	7,8
fosfatydyloinozytol	1,1	1,3
fosfatydyloetanoloamina	1,4	0
dwufosfatydyloglicerol	0,3	—
lizofosfatydylocholina	0,1	—
sterole	1,9	0
estry steroli	1,8	0
chlorofile	0,8	21
glikolipidy (niezidentyfikowane)	+	—
karotenoidy	+	3
chinony	+	3
kwasy tłuszczowe	śląd	—
estry metylowe kwasów tłuszczowych	śląd	—
trójglicerydy	śląd	—

+ występuje, nie oznaczono ilościowo, — brak informacji

TABELA 2. Kwasy tłuszczowe w mono (MGG)- i dwugalaktozydylodwuglicerydach (DGG) w organizmach z aktywnym aparatem fotosyntetycznym, wartości względne. Wg [9]

	<i>Chlamydomonas reinhardii</i>		<i>Euglena gracilis</i> (hodowla w świetle)		szpinak	
	MGG	DGG	MGG	DGG	MGG	DGG
kwasy palmitynowy	2	52	6	17	1	17
kwasy stearynowy	3	7	1	0	0	0
kwasy oleinowy	13	22	9	19	1	4
kwasy linolowy	6	5	6	12	1	3
kwasy linolenowy	32	2	41	26	26	53
kwasy 4, 7, 10, 13 — C ₁₆	33	0	32	7	30 ⁺	0
całkowita ilość kwasów nasyconych	5	59	7	17	1	17
całkowita ilość kwasów polienasyconych	65	2	75	33	56	53

+ 7, 10, 13 — C₁₆

kich roślin posiadających aktywny aparat fotosyntetyczny [115, 9, 5]. U niektórych roślin istnieje nawet prosta zależność między produkcją tlenu asymilacyjnego a zawartością tego kwasu [5].

Poziom chinonów i ich pochodnych jest również ściśle skorelowany ze stopniem wykształcenia systemu lamellarnego; u roślin etiolowanych związki te pojawiają się w ilościach śladowych [104, 33a].

W błonach tylakoidów znajduje się około 50% białek chloroplastowych, które występują tam jako białka strukturalne* lub enzymatyczne. Wykryto między innymi plastocyjaninę (miedzioproteid), cytochrom *f*, cytochrom *b₆*, cytochrom *b₅₅₉*, ferredoksynę i in. Wyizolowany z liści pietruszki cytochrom *f* posiada ciężar cząsteczkowy około 110 000 daltonów; na każdą cząsteczkę białka przypadają dwie reszty hemowe [22]. Najczęściej na 400–500 cząsteczek chlorofilu przypada po jednej cząsteczce ferredoksyny [11], plastocyjaniny [72], cytochromu *f* [22] i cytochromu *b₆* [8]. W połączeniu z białkiem tylakoidów występują również niezbędne w fotosyntezie takie kationy, jak magnez (nie chlorofilowy), mangan, miedź, żelazo i cynk [24].

Menke i Hirtz [62] analizując widma dichroizmu kołowego fragmentów błon tylakoidów *Anthirrinum majus*, uzyskanych za pomocą ultradźwięków, doszli do wniosku, że 42% białek lamellarnych występuje w postaci alfa-heliks, 40% ma postać statystycznego kłęбка, a 18% posiada strukturę beta.

Dokładniejsza charakterystyka białek lamell chloroplastów jest nieznana, głównie dlatego, że większość z nich jest nierozpuszczalna w roztworach soli, w stężonym roztworze mocznika lub w roztworze guanidyny. Można je rozpuścić za pomocą rozpuszczalników działających bardziej drastycznie, np. w stężonym kwasie mrówkowym [65], w 75% kwasie octowym [4], w roztworze fenolu [4], w wodnym roztworze butanolu [52] lub w wielu detergentach [96]. Rozpuszczalniki te zmieniają jednak strukturę białek, powodując nie tylko denaturację, ale także deagregację cząsteczek. Dlatego wyniki uzyskane w badaniach, w których stosowano wymienione rozpuszczalniki, muszą być interpretowane bardzo ostrożnie.

Białka lamellarne, rozpuszczone w roztworze siarczanu dodecyłu sodu (SDS), można rozdzielić na 10–13 frakcji za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS [25, 53, 54, 89]. Ciężary cząsteczkowe tych frakcji wahają się od 11 000 do 75 000 daltonów, z wyraźną przewagą białek o ciężarze cząsteczkowym około 24 000 daltonów [61]. Liczba terminalnych aminokwasów z wolną grupą karboksylową lub aminową również wskazuje na obecność 10–13 łańcuchów poli-

* Zdaniem wielu badaczy [90, 20, 55] białka strukturalne nie wykazują aktywności enzymatycznej. Mają one posiadać właściwości podobne do białek strukturalnych wyizolowanych z mitochondriów [34, 90, 42]. Inni badacze [93, 94] odnoszą się krytycznie do koncepcji istnienia w ogóle typowych białek strukturalnych.

peptydowych (białek strukturalnych) w błonach tylakoidów [63, 64]. W dwóch frakcjach, uzyskanych za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, białko występuje w połączeniu z chlorofilem. Udało się również udowodnić, że jeden z tych kompleksów, posiadający wysoki stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b*, należy do fotosystemu I, natomiast drugi (z niskim stosunkiem chlorofilu *a* do *b*) ma pochodzić od fotosystemu II [75, 103].

Niektórzy badacze (np. [94]) wyizolowali mniejszą liczbę frakcji białek za pomocą wymienionego typu elektroforezy. Fakty te sugerują, że w różnych warunkach doświadczalnych może mieć miejsce różny stopień deagregacji, z czym łączy się powstanie różnej liczby frakcji białek. Nie jest wykluczone, że niektóre z nich (np. o ciężarze cząsteczkowym 11 000 daltonów) stanowią domieszkę białek nie lamellarnych. Według Parka i współ. [8, 20] ciężar cząsteczkowy formy monomerycznej wynosi około 22 000 daltonów.

Menke [61], traktując chloroplasty dezoksychohanem sodu, a następnie stosując kilkakrotną filtrację na żelach typu Sephadex, wyizolował białko w postaci niezdenaturowanej i pozbawionej detergentu. W ten sposób otrzymał on trzy różne frakcje. W skład frakcji 1 wchodziły agregaty o ciężarze cząsteczkowym około 600 000 daltonów, średnicy 100 Å i grubości 40–50 Å; na każdy agregat przypadało 25 cząsteczek chlorofilu (stosunek chlorofilu *a* do *b* wynosił około 40). Frakcja ta wykazywała aktywność fotosystemu I.

Frakcja 2 zawierała cząstki o ciężarze około 110 000 daltonów wykazujące aktywność PS I i PS II; na każdą cząsteczkę białka przypadała jedna cząsteczka chlorofilu (stosunek chlorofilu *a* do *b* wynosił 3).

W skład frakcji 3, wykazującej aktywność tylko PS II, wchodziło białko o ciężarze cząsteczkowym około 83 000 daltonów. Zawartość chlorofilu *a* i chlorofilu *b* była podobna jak we frakcji 2.

Łatwiej jest wyizolować fikobiliproteidy w postaci niezdenaturowanej z komórek glonów. Fikobiliproteidy (barwniki te występują w gatunkach należących do *Cyanophyta*, *Rhodophyta* i *Cryptophyta*) ekstrahowane są w formie agregatów [28, 30] o następujących ciężarach cząsteczkowych: 220 000–340 000 daltonów (fikoerytryna) lub 180 000–360 000 daltonów (fikocyjanina). Ciężary cząsteczkowe monomerów fikoerytryny i fikocyjaniny wynoszą odpowiednio około 23 000 daltonów i około 30 000 daltonów [44]. Wykazano również, że przynajmniej u niektórych glonów (np. *Synechococcus*, *Aphanocapsa*) w skład każdego monomeru wchodzi jeszcze dwie podjednostki; każda wiąże jedną grupę chromoforową [30].

Próbowano także uzyskać odpowiedź na pytanie, czy białka wchodzące w skład centrów reakcji różnią się swoimi własnościami od kompleksów chlorofilowo-białkowych występujących w obrębie anten energetycznych. Dokładniejsze badania na ten temat przeprowadzono dotychczas na chromatoforach bakterii [73, 78]. Wykazano np., że w skład centrum reakcji

fotokemicznej u bezkarotenoidowych mutantów *Rhodospirillum rubrum* i *Rhodopseudomonas spheroides* wchodzi trzy specyficzne białka o ciężarach cząsteczkowych 27 000, 22 000 i 19 000 daltonów [19, 77]. Białka te, nazwane przez Okamurę i współ. [77] podjednostkami H, M, i L, występują mniej więcej w jednakowych ilościach i mają stanowić około 25% wszystkich białek błon chromatoforów. Zdaniem Okamury i współ. [77] centra reakcji wyizolowane z *Rh. spheroides* R-26 są aktywne fotokemicznie nawet wówczas, gdy w ich skład wchodzi tylko podjednostki M (22 000 daltonów) i L (19 000 daltonów). Interesujące było stwierdzenie, że mutanty *Rh. spheroides*, pozbawione białek wchodzących w skład centrów reakcji, nie posiadają także zdolności do fotosyntezy pomimo obecności bakteriochlorofilu w ich chromatoforach.

Wyizolowane podjednostki z centrów reakcji *Rh. spheroides* R-26 zawierają stosunkowo dużo reszt apolarnych; polarność (sumaryczna zawartość aminokwasów polarnych) tych centrów wynosi 32%. Natomiast analogiczne wartości dla oczyszczonych podjednostek H, L i M wynoszą odpowiednio 38%, 29% i 30%. Różnice te są związane z różnicami w składzie aminokwasowym; w podjednostce L znajduje się przeszło dwukrotnie więcej lizyny niż w podjednostce M, natomiast podjednostka H jest bogatsza w reszty cystynowe. Cysteina występuje w podjednostkach L i H, a brak jej jest w podjednostce M.

Próbowano również wyizolować centra reakcji z tylakoidów chloroplastów roślin wyższych [76, 106a]. Frakcje wzbogacone w PS I lub PS II otrzymuje się traktując chloroplasty roztworem digitoniny [10] lub Tritonu X-100 [107], a następnie stosując wirowanie różnicowe. Częstki wzbogacone w PS I przechodzą do osadu dopiero w czasie wirowania przy przyspieszeniu około 144 000 g w ciągu 1–3 godzin. Natomiast częstki wzbogacone w PS II odwirowuje się zwykle już przy 10 000 g w ciągu 30 min. Dotychczas nie udało się jednak wyizolować oczyszczonych i aktywnych fotokemicznie centrów reakcji PS I i PS II.

Nasuwa się teraz pytanie, czy wszystkie błony znajdujące się wewnątrz chloroplastu mają identyczny skład i pełnią podobną funkcję. Do tej pory nie uzyskano ostatecznej odpowiedzi. Pewną dyskusję budzi problem istnienia ewentualnych różnic między lamellami stromy a lamellami gran. Te dwa typy błon można oddzielić od siebie w wirowaniu różnicowym, po rozbiciu chloroplastów w prasie Frencha [66, 98]. Otrzymane dane wskazują, że lamelle stromy, w porównaniu do lamell gran, posiadają wyższy stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b*, względnie więcej P700, natomiast jest w nich mniejsza zawartość cytochromu b_{559} i około 40% mniej chlorofilu w odniesieniu do ilości białka [1]. Ponadto CF_1 (patrz dalej) ma znajdować się głównie w obrębie lamell stromy [36]. Zdaniem wielu badaczy ([97] i in.) lamelle stromy nie wykazują aktywności PS II. Prawdopodobnie nie są one jednak zupełnie pozbawione aktywności tego fotosystemu [35, 33].

ORGANIZACJA BŁON TYLAKOIDÓW NA POZIOMIE MOLEKULARNYM

Przedstawione fakty wskazują, że pod względem składu chemicznego błony tylakoidów należą do struktur bardzo złożonych. Próbowano również wykorzystać niektóre metody fizyczne w celu otrzymania określonych informacji na temat sposobu ułożenia poszczególnych składników w obrębie tych błon. Badając np. zjawiska dichroizmu liniowego i polaryzacji światła fluorescencyjnego, zdołano określić stopień orientacji przynajmniej niektórych barwników fotosyntetycznych w lamellach ([32, 43] i in). W 1955 r. Goedheer [31] wykazał, że w dużych chloroplastach *Mougeotia* stosunek E_0 do E (gdzie E_0 — wartość ekstynkcji w świetle padającym równoległe do lamell, E — wartość ekstynkcji w świetle padającym prostopadle do powierzchni lamell) w pasmie 680 nm wynosi 1,15. Oznacza to, że przynajmniej część cząsteczek chlorofilu w chloroplastach jest odpowiednio zorientowana w stosunku do powierzchni lamell. Breton i współ. [17, 16], posługując się spektropolarymetrem, porównali widmo absorpcyjne z widmem liniowego dichroizmu zorientowanej zawiesiny chloroplastów i doszli do wniosku, że w formie uporządkowanej występuje P700 i Ca682. Cząsteczki Ca670 są w mniejszym stopniu uporządkowane albo ułożone pod kątem 55° w stosunku do płaszczyzny lamell. Dłuższa oś cząsteczki karotenoidów przebiega również prawie równoległe do powierzchni lamell. Natomiast w chromatoforach *Rh. palustris* cząsteczki karotenoidów są ułożone pod kątem 45° w stosunku do powierzchni błon [15].

Nie tylko barwniki fotosyntetyczne występują w formie uporządkowanej w obrębie błon tylakoidów, ale także białka strukturalne. Breton i współ. [16], badając widma absorpcyjne i dichroizmu liniowego w zakresie 260–290 nm, wykazali istnienie orientacji reszt tryptofanowych; sugerują oni, że alfa-heliksowe odcinki łańcucha polipeptydowego są ułożone równoległe do powierzchni błon.

Jedną z powszechniej stosowanych technik badania struktury i subultrastruktury błon tylakoidów, podobnie jak innych błon cytoplazmatycznych, jest mikroskopia elektronowa. Należy jednak pamiętać, że technika ta jest pomocna w analizie ultrastruktury różnych organelli komórkowych, natomiast może być zawodna w badaniu subultrastruktury. W czasie przygotowywania preparatów, a zwłaszcza odwadniania i utrwalania materiału biologicznego, powstaje wiele artefaktów, które mogą doprowadzić do wyciągania mylnych wniosków. Wielu badaczy jest jednak zdania, że stosując np. technikę kriorytownictwa (ang. freeze-etching) do przygotowania preparatów uzyskuje się najbardziej wiarygodne obrazy w mikroskopie elektronowym.

Steinmann [100], Park i Pon [84] oraz Mühlethaler [68], stosując negatywowe kontrastowanie lub technikę kriorytownictwa, pierwsi zwrócili uwagę na to, że powierzchnia lamell nie jest gładka, lecz pokryta

cząstkami zbudowanymi z 4 podjednostek. Zdaniem Mühlehalera [68] cząstki te są zanurzone do warstwy białek strukturalnych lub tylko do nich przyczepione.

Późniejsze badania doprowadziły do wykrycia czterech typów powierzchni błon (ryc. 5), które różnią się sposobem rozmieszczenia i wielkością cząstek ([67, 86] i in.). Ponieważ łupanie zamrożonych błon przebiega przez hydrofobowe wnętrze [14], należy przypuszczać, że mamy tu do czynienia z dwiema parami komplementarnych powierzchni, które uzyskuje się przez rozłupanie dwóch typów błon (lamell stromy i lamell gran). Na podstawie licznych obserwacji można wnioskować ([69, 14, 33] i in.), że w skład lamell chloroplastów wchodzi dwa rodzaje cząstek: jedne o średnicy około 175 Å i drugie o średnicy około 110 Å. Według Brantona i Parka [14] na każdy μm^2 powierzchni błony tylakoidu u szpinaku przypada około 3860 małych i około 1800 dużych cząstek, razem mają one zajmować około 80% powierzchni tych błon. Wielkość cząstek i gęstość upakowania może być nieco różna u różnych gatunków roślin lub jednostek systematycznych wyższego rzędu [67, 45].

Pendland i Aldrich [86] są zdania, że w chloroplastach *Oocystis morsonii* i być może innych gatunków glonów, większe cząstki występują w obrębie lamell gran; każda ma zajmować przestrzeń w dwóch scementowanych ze sobą lamellach. Natomiast cząstki mniejsze (85–90 Å) mają występować w lamellach stromy i błonach zewnętrznych partii gran, tzn. w obszarze, gdzie nie ma bezpośredniego kontaktu dwóch sąsiadujących ze sobą tylakoidów.

Do tej pory nie poznano funkcji różnych typów cząstek. Arntzen i współ. [2] oraz Sane i współ. [98] przytoczyli dowody wskazujące, że frakcja błon tylakoidów wzbogacona w PS I zawiera również względnie więcej cząstek o średnicy 110 Å, natomiast frakcja wzbogacona w PS II zawiera względnie więcej cząstek dużych*. Wyniki te wymagają jednak potwierdzenia.

W latach 1961–65 Park i współ. [84, 85, 82, 81] opisali cząstki na powierzchni błon tylakoidów chloroplastów utrwalonych w aldehydzie glutarowym i wycieniowanych platyną. W skład każdej cząstki o średnicy około 200 Å i wysokości około 100 Å miały wchodzić 4 podjednostki. Cząstki te zostały nazwane kwantasomami i zdaniem tej grupy badaczy miały odpowiadać jednostkom fotosyntetycznym postulowanym wcześniej

* Cząstki małe, wykazujące aktywność PS I, powinny być zlokalizowane na zewnętrznej powierzchni lamell, do której jest łatwy dostęp z zewnątrz. Dilley i współ. [23] wykazali bowiem, że kwas p-dwuazoniowobenzenosulfonowy, związek nie przechodzący przez błony, reaguje z aktywnymi grupami PS I, a nie znaczący cząstek należących do PS II, co wskazywałoby, że te ostatnie nie znajdują się na zewnętrznej powierzchni błon. Do podobnych wniosków doszli inni autorzy [46, 18] na podstawie badań immunologicznych.

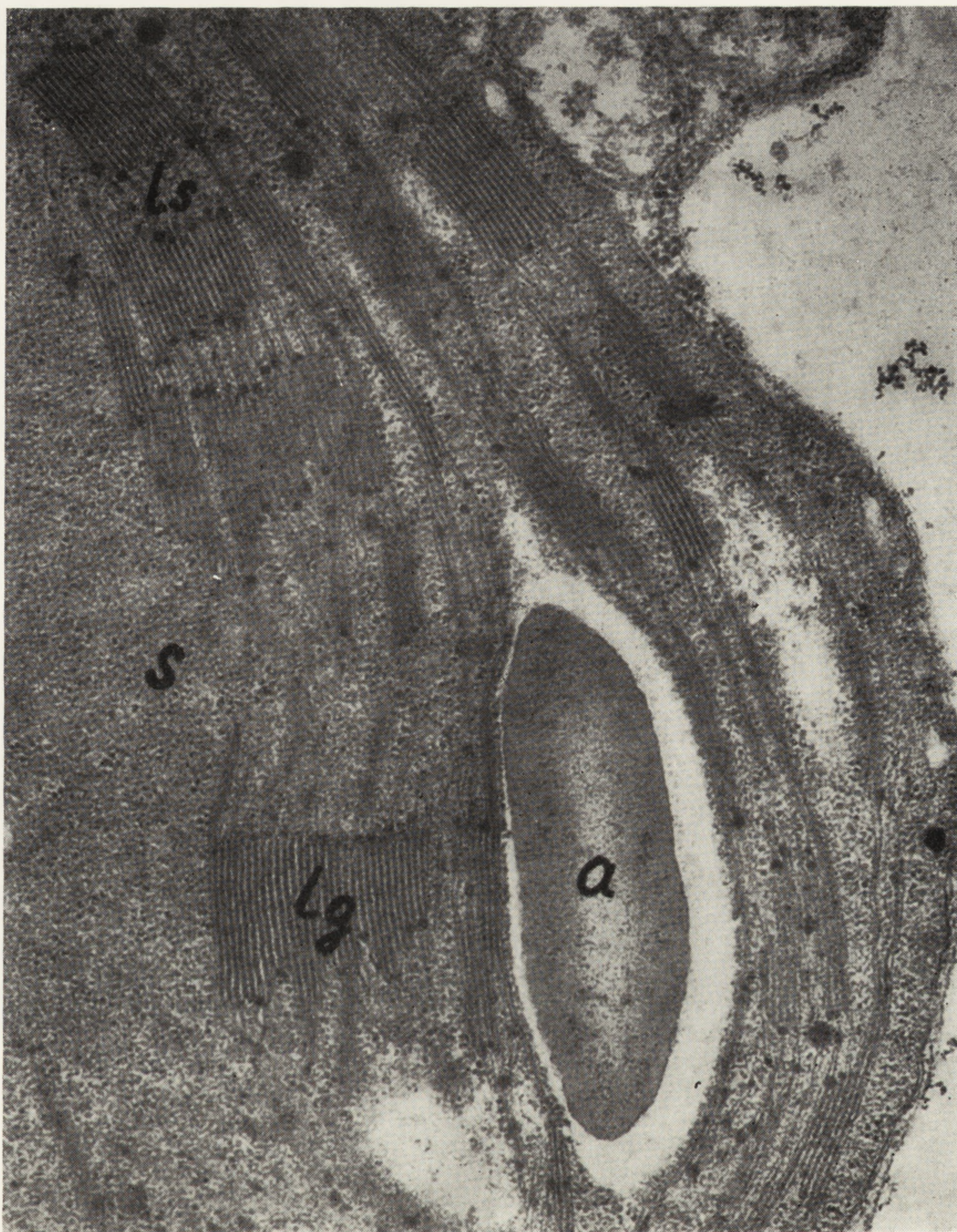
na podstawie badań pośrednich (patrz [114]). Teoria kwantasomów, jako jednostek fotosyntetycznych, została w dużym stopniu podważona przez Howella i Mourianakisa [41]. Badacze ci wykazali, że fotoredukcja błękitu p-jodonitrotetrazolinowego do nierozpuszczalnego formazanu (reakcja Hilla) zachodzi na całej powierzchni lamell, a nie na powierzchni kwantasomów (powstały formazan tworzy miejsca nieprzepuszczalne dla elektronów). Howell i Mourianakis wykazali również, że cząstki przyłączone do powierzchni lamell można usunąć przez przemywanie 1 mM kwasem etylenodwuaminocteroocowym (EDTA) o $\text{pH} = 8,0$. Po wyizolowaniu mają one średnicę około 100 Å [40], współczynnik sedymentacji 13 S [40], ciężar cząsteczkowy około 326 000 [26, 27] i wykazują aktywność ATPazy zależnej od Ca^{2+} . Zostały one nazwane czynnikiem sprzęgającym CF_1 (ang. coupling factor) [3, 57] i uważa się, że *in vivo* uczestniczą w powstawaniu ATP w procesie fotofosforylacji [57]. Czynnikiem ten, występujący w stężeniu 1 mol CF_1 na około 830–890 moli chlorofilu [101], jest przyczepiony do powierzchni błony tylakoidu i dlatego łatwo można go usunąć przez przemywanie roztworem EDTA [3] lub potraktowanie tylakoidów hipertonicznym roztworem sacharozy [101]. Przyjmuje się dzisiaj, że CF_1 występuje na powierzchni lamell chloroplastowych niezależnie od opisanych wcześniej cząstek. Kwantasomy przypuszczalnie odpowiadają większym cząstkom, które pozostały w błonach po usunięciu czynnika sprzęgającego [83].

Stosując metody immunologiczne zdołano wykazać, że CF_1 mieści się na zewnętrznej stronie błony tylakoidu [7], podobnie jak ferredoksyna [39] i reduktaza ferredoksyna-NADP [6].

Niektórzy badacze usiłowali potwierdzić obserwacje w mikroskopie elektronowym za pomocą innych metod. Sadler i współ. [95] wykazali np., że dyfrakcja promieni X pod małym kątem na błonach tylakoidów zależy w dużym stopniu od warunków wilgotnościowych środowiska. Utrzymując wilgotność atmosfery na poziomie 90%, otrzymali oni obrazy dyfrakcji promieni X na błonach tylakoidów chloroplastów *Euglena*, których interpretacja była zgodna z interpretacją elektronogramów błon tylakoidów.

Trzeba jednak dodać, że często podobne obrazy dyfrakcji promieni X na tylakoidach są różnie interpretowane przez różnych badaczy [111, 48, 49, 60, 45]. Menke i Kreutz uważają np., że środkowa część spektrum o nieco większej gęstości elektronowej (w liściach nie odwodnionych zaznacza się ona bardzo słabo, patrz ryc. 6) należy do środka tylakoidu. Natomiast Weier i Benson przypisują ją warstwie pierścieni porfirynowych chlorofilu, które mają znajdować się między dwoma błonami sąsiadującymi ze sobą tylakoidów.

Należy jeszcze nadmienić, że na niesymetryczną strukturę błon chromatoforów wskazują także wyniki badań Pope i współ. [80]. Badacze ci, mierząc dyfrakcję promieni X pod małym kątem na chromatoforach

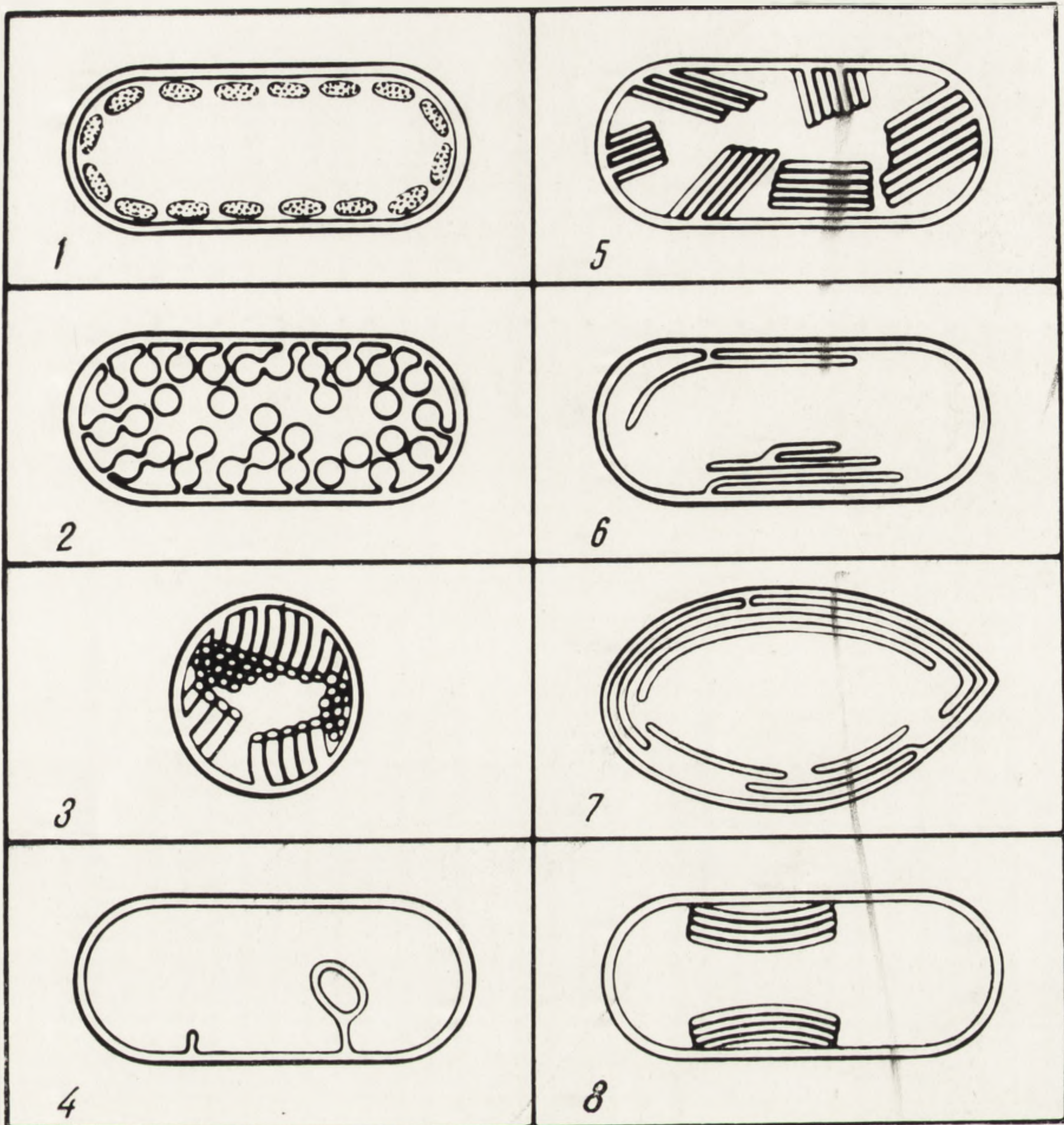


Ryc. 1. Fragment chloroplastu granowego fasoli

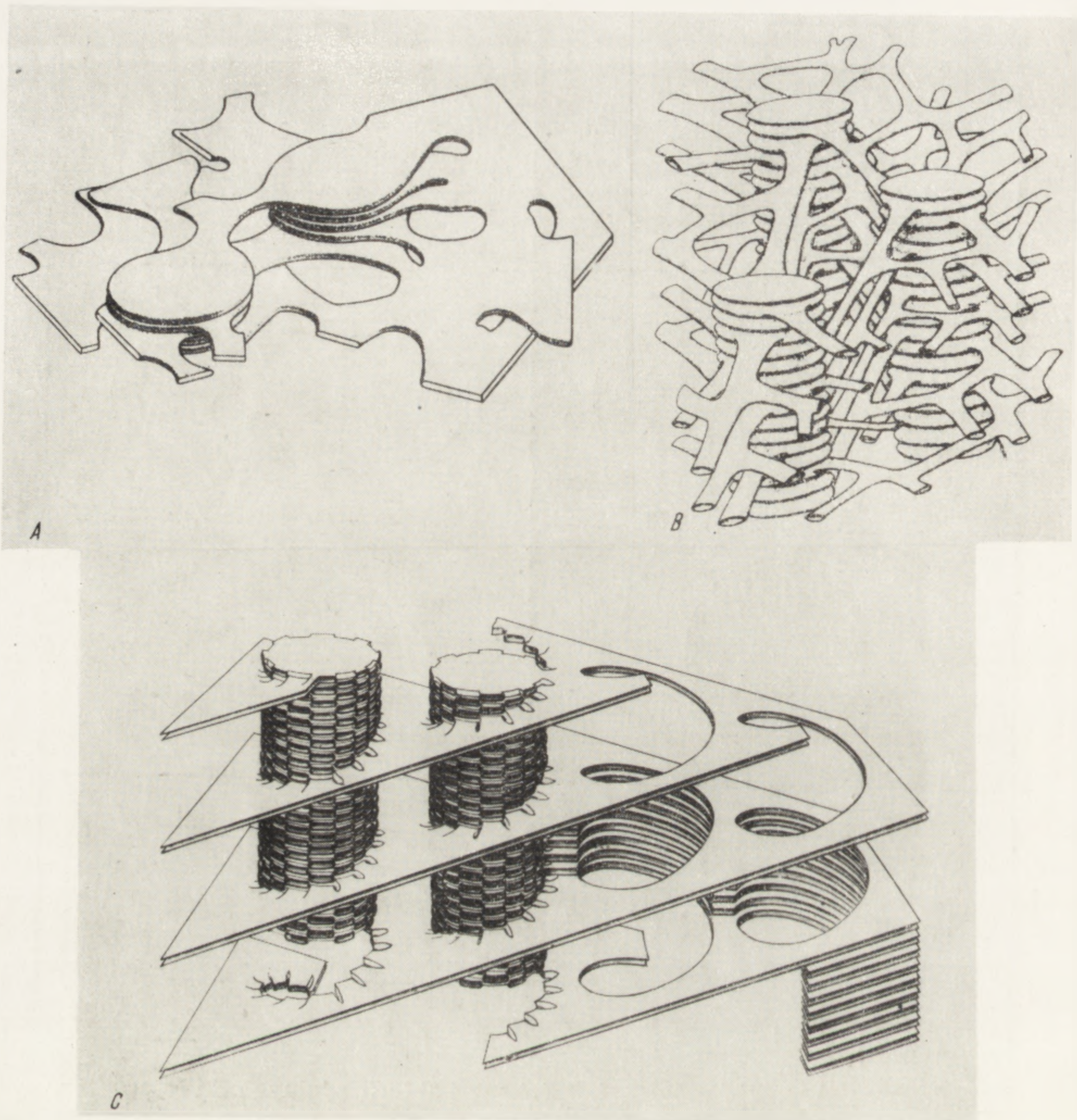
Na terenie stromy występuje system lamellarny zbudowany z tylakoidów granowych i tylakoidów stromy. *lg* — lamelle granowe, *ls* — lamelle stromy, *s* — stroma, *a* — ziarno skrobi asymilacyjnej. Materiał utrwalano czterotlenkiem osmu. Pow. 34 300 × (zdjęcie oryginalne)



Ryc. 2. A — Fragment chloroplastu lamellarnego u brunatnicy *Pylaiella littoralis*. Pow. 50 000 \times . Wg L. V. Evansa, cyt. za [56]. B — Rozproszone w całej cytoplazmie tylakoidy u *Oscillatoria chalybea* (sinica). Pow. 32 400 \times . Wg [60]



Ryc. 3. Typy chromatoforów w komórkach bakterii zdolnych do fotosyntezy
 1 — *Chlorobium limicola*, *Chlorobium thiosulfatophilum*, *Chlorobium phaeobacteroides*, *Chlorobium phaeovibrioides*, *Pelodictyon clathratiforme*, *Pelodictyon aggregatum*, *Chloropseudomonas ethylicum*, *Prosthecochloris aesturii*, 2 — *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodopseudomonas capsulata*, *Chromatium rasa* D, *Chromatium okenii*, *Chromatium weissei*, *Thiospirillum jenense*, *Thiocapsa roseopersicina*, 3 — *Thiocapsa pfennigii*, 4 — *Rhodopseudomonas gelatinosa*, *Rhodospirillum tenue*, 5 — *Rhodospirillum molischianum*, *Rhodospirillum fulvum*, *Ectothiorhodospira*, *Rhodospirillum photometricum*, 6 — *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas acidophila*, 7 — *Rhodomicrobium vannielii*, 8 — *Rhodopseudomonas viridis*. Wg [74]



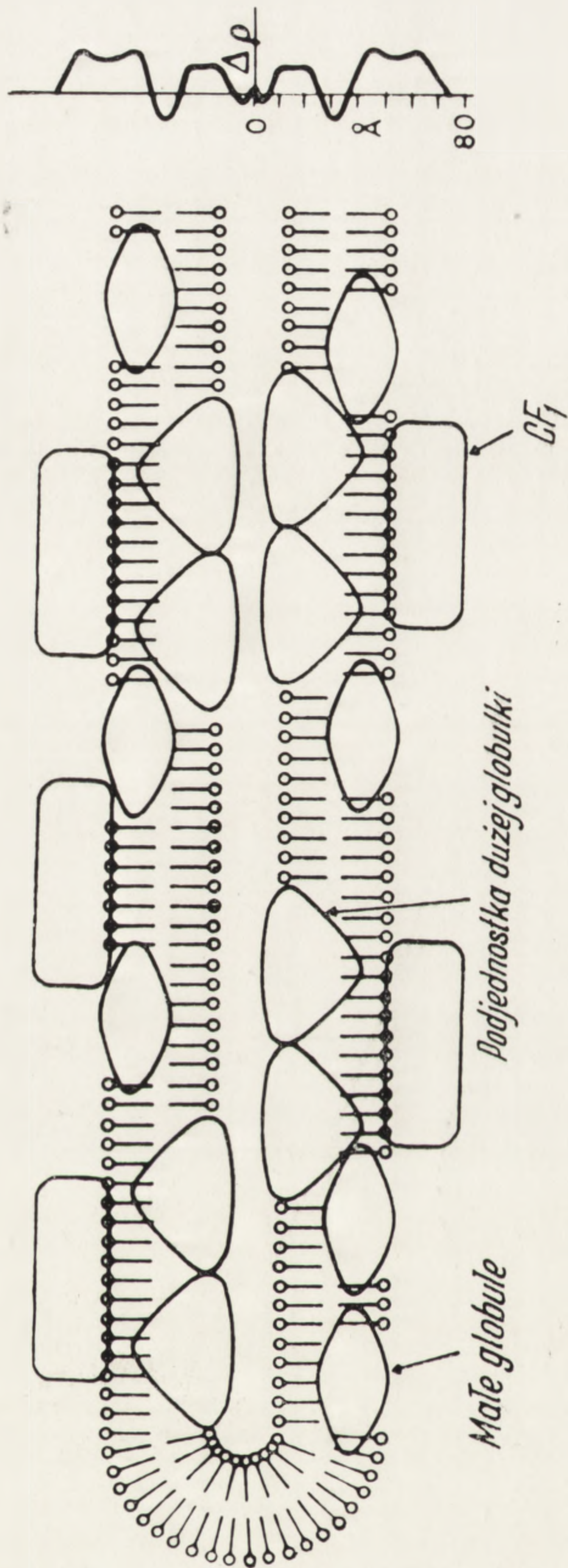
Ryc. 4. Modele przestrzennej struktury systemu lamellarnego chloroplastów granowych

A — wg [110], B — wg [112], C — wg [79]



Ryc. 5. Cztery typy powierzchni (obraz z mikroskopu elektronowego) uzyskane w wyniku rozłupania błon tylakoidów (technika kryorytownictwa) u *Euglena gracilis*

Powierzchnie oznaczone Bs i Cs pochodzą z lamell gran, natomiast powierzchnie Bu i Cu powstały w wyniku rozłupania lamell stromy lub peryferyjnie położonych lamell gran. Strzałka wskazuje kierunek cieniowany. Pow. 64 000 X. Wg [67]



Ryc. 6. Model struktury błony tylakoidu

Po prawej stronie schematu podano wykres obrazujący rozłożenie gęstości elektronowej na podstawie pomiarów dyfrakcji promieni X pod małym kątem. Inne szczegóły podano w tekście. Wg [45]

Rh. spheroides, wykazali, że jedna warstwa o małej gęstości elektronowej znajduje się na stronie wewnętrznej i dwie warstwy o większej gęstości elektronowej są zlokalizowane bliżej powierzchni zewnętrznej.

MODELE BŁON TYLAKOIDÓW

Dotychczas nie udało się nikomu zaproponować modelu przedstawiającego ultrastrukturę lamell chloroplastowych, który nie budziłby zastrzeżeń i którego prawdziwość byłaby dostatecznie udokumentowana doświadczalnie. Koncepcja błony jednostkowej (unit membrane), zaproponowana przez Robertsona [92] dla różnych typów membran, nie została potwierdzona przynajmniej w odniesieniu do błon tylakoidów; istnienie trzech ciągłych warstw zostało zakwestionowane jeszcze w 1961 r. przez Parka i Pona [84].

Dość często cytowanym w piśmiennictwie jest model opracowany przez Weiera i Bensona [111]. Zdaniem tych autorów nie ma wyraźnego odgraniczenia warstwy białkowej od lipidowej; można tylko wyróżnić obszary o większym zagęszczeniu lipidów lub białek. Kompleksy lipoproteidowe występują również w postaci podjednostek, które zdaniem tych badaczy, odpowiadają opisanym wyżej cząstkom. Przeważająca ilość cząsteczek chlorofilu znajduje się w środkowej części podwójnej lamelli, natomiast cytochromy mają być zlokalizowane wewnątrz podjednostek.

Innym przykładem, zasługującym na omówienie, jest model zaproponowany przez Kirka [45]. Autor ten przyjmuje istnienie podwójnej warstwy lipidowej z polarnymi grupami zwróconymi na zewnątrz (ryc. 6). W warstwach tych są zanurzone co najmniej dwa typy cząstek, które opisano wyżej; większe cząstki mają być złożone z czterech podjednostek. Zdaniem autora inne białka (np. CF_1 , ferredoksyna, karboksylaza 1,5-dwufosforybulozy) są tylko przyłączone do zewnętrznej powierzchni błony. Kirk opracował ten model na podstawie wyników badań uzyskanych przez innych badaczy. Wykorzystał on między innymi wyniki obserwacji w mikroskopie elektronowym [12, 13, 14], dane dotyczące struktury i grubości podwójnej warstwy lipidowej [91] oraz wyniki pomiarów dyfrakcji promieni X pod małym kątem na błonach tylakoidów [47, 48]. Autor ten zakłada, że cząsteczki chlorofilu nie tworzą oddzielnej warstwy, lecz że występują w cząstkach w powiązaniu z białkiem.

Z modelu Kirka wynika, że nie całe zewnętrzne partie lamell są zbudowane z substancji białkowych; lipidy mogą kontaktować się bezpośrednio z wnętrzem tylakoidu i ze stromą. Obecność galakto- i sulfolipidów na powierzchni błon tylakoidów udało się wykazać eksperymentalnie za pomocą metod immunologicznych [88].

Na zakończenie należy dodać, że błony tylakoidów należą do struktur dynamicznych. Na przykład po oświetleniu grubość gran zmniejsza się

(w sposób odwracalny) o około 25% [70]. Podobny efekt wywierają jony Mg^{2+} [71]. Wykazano dalej, że światło podobnie jak jony Mg^{2+} powoduje również odwracalne zmiany średnicy cząstek i stopnia ich zagęszczenia. Według Wang i Packera [109], po oświetleniu chloroplastów w środowisku octanu sodu zachodzi 2,2-krotne zagęszczenie cząstek na powierzchni błon, a ich średnica wzrasta o około 25 Å. Prawdopodobnie jest to związane ze zmianami stopnia ich zanurzenia w warstwie ciągłej. Podobne zmiany konformacyjne mogą zachodzić *in vivo* na skutek tworzenia się gradientu stężenia H^+ między wewnętrzną a zewnętrzną stroną błony tylakoidu [109, 29].

LITERATURA

- [1] ALLEN, C. F., GOOD, P., TROSPER, T. and PARK, R. B., Chlorophyll, glycerolipid and protein ratios in spinach chloroplast grana and stroma lamellae, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**: 907–913, 1972.
- [2] ARNTZEN, C. J., DILLEY, R. A. and CRANE, F. L., A comparison of chloroplast membrane surfaces visualized by freeze-etch and negative staining techniques, and ultrastructural characterization of membrane fractions obtained from digitonin-treated spinach chloroplasts, *J. Cell Biol.*, **43**: 16–31, 1969.
- [3] AVRON, M., A coupling factor in photophosphorylation. [w] *La Photosynthèse*, Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1963, p. 543–555.
- [4] BAILEY, J. L., THORNBER, J. P. and WHYBURN A. G., The chemical nature of chloroplast lamellae [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1966, vol. 1, p. 243–255.
- [5] BENSON, A. A., Lipids of chloroplasts. [w] *Structure and Function of Chloroplasts*, red. M. Gibbs, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York 1971, p. 129–148.
- [6] BERZBORN, R., Untersuchungen über die Oberflächenstruktur des Thylakoidsystems der Chloroplasten mit Hilfe von Antikörpern gegen die Ferredoxin-NADP-Reduktase, *Z. Naturforsch.*, **24b**: 436–446, 1969.
- [7] BERZBORN, R., MENKE, W., TREBST, A. and PISTORIUS, E., Über die Hemmung photosynthetischen Reaktionen isolierten Chloroplasten durch Chloroplasten-Antikörper, *Z. Naturforsch.*, **21b**: 1057–1059, 1966.
- [8] BIGGINS, J. and PARK, R. B., Physical properties of spinach chloroplast lamellar proteins, *Plant Physiol.*, **40**: 1109–1115, 1965.
- [9] BLOCH, K., CONSTANTOPOULUS, G., KENYON, C. and NAGAI, J., Lipid metabolism of algae in the light and in the dark. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, London and New York 1967, vol. 2, p. 197–211.
- [10] BOARDMAN, N. K. and ANDERSON, J. M., Isolation from spinach chloroplasts of particles containing different proportions of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* and their possible role in the light reactions of photosynthesis, *Nature*, **203**: 166–167, 1964.
- [11] BÖGER, P. and SAN PIETRO, A., Ferredoxin and cytochrome *f* in *Euglena gracilis*, *Z. Pflanzenphysiol.*, **58**: 70–75, 1967.
- [12] BRANTON, D., Structure of the photosynthetic apparatus. [w] *Photophysiology*, red. A. C. Giese, New York and London 1968, vol. 3, p. 197–224.
- [13] — Membrane structure, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**: 209–238, 1969.

- [14] BRANTON, D. and PARK, R. B., Subunits in chloroplast lamellae, *J. Ultrastruct. Res.*, **19**: 283-303, 1967.
- [15] BRETON, J., The state of chlorophyll and carotenoid in vivo. II — A linear dichroism study of pigment orientation in photosynthetic bacteria, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **59**: 1011-1017, 1974.
- [16] BRETON, J., MICHEL-VILLAZ, M. and PAILLOTIN, G., Orientation of pigments and structural proteins in the photosynthetic membrane of spinach chloroplasts: a linear dichroism study, *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 42-56, 1973.
- [17] BRETON, J. and ROUX, E., Chlorophylls and carotenoids states in vivo. I — A linear dichroism study of pigments orientation in spinach chloroplasts, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**: 557-563, 1971.
- [18] BRIANTAIS, J. M. and PICAUD, M., Immunological evidences for a localization of system I on the outside face and system II on the inside face of the chloroplast lamellae, *FEBS Letters*, **20**: 100-104, 1972.
- [19] CLAYTON, R. K. and HASELKORN, R., Protein components of bacterial photosynthetic membranes, *J. Mol. Biol.*, **68**: 97-105, 1972.
- [20] CRIDDLE, R. S. and PARK, L., Isolation and properties of a structural protein from chloroplasts, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **17**: 74-79, 1964.
- [21] CROTTY, W. J. and LEDBETTER, M. C., Membrane continuities involving chloroplasts and other organelles in plant cells, *Science*, **182**: 839-841, 1973.
- [22] DAVENPORT, H. E. and HILL, R., The preparation and some properties of cytochrome *f*., *Proc. Roy. Soc. B.*, **139**: 327-338, 1952.
- [23] DILLEY, R. A., PETERS, G. A. and SHAW, E. R., A test of the binary chloroplast membrane hypothesis by using a nonpenetrating chemical probe, *p*-(diazonium)-benzenesulfonic acid, *J. Mem. Biol.*, **8**: 163-180, 1972.
- [24] DUVAL, D. and DURANTON, J., Cation localization on plastid membrane proteins from *Zea mays* L., *Photosynthetica*, **8**: 1-8, 1974.
- [25] EYTON, G. and OHAD, I., Biogenesis of chloroplast membranes. VI. Co-operation between cytoplasmic and chloroplast ribosomes in the synthesis of photosynthetic lamellar proteins during the greening process in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* Y-1, *J. Biol. Chem.*, **245**: 4297-4307, 1970.
- [26] FARRON, F., Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase. *Biochemistry*, **9**: 3823-3828, 1970.
- [27] FARRON, F. and RACKER, E., Studies on the mechanism of the conversion of coupling factor 1 from chloroplasts to an active adenosine triphosphatase, *Biochemistry*, **9**: 3828-3836, 1970.
- [28] GANNT, E., Properties and ultrastructure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*, *Plant Physiol.*, **44**: 1629-1638, 1969.
- [29] GIAQUINTA, R. T., DILLEY, R. A. and ANDERSON, B. J., Light potentiation of photosynthetic oxygen evolution inhibition by water soluble chemical modifiers, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**: 1410-1417, 1973.
- [29^a] GIBBS, M., red., *Structure and function of chloroplasts*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York 1971, p. 286.
- [30] GLAZER, A. N. and COHEN-BAZIRE, G., Subunit structure of the phycobili-proteins of blue-green algae, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**: 1398-1401, 1971.
- [31] GOEDHEER, J. C., Orientation of the pigment molecules in the chloroplast, *Biochim. Biophys. Acta* **16**: 471-478, 1955.
- [32] — Fluorescence polarization and other fluorescence properties of chloroplasts and cells in relation to molecular structure. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1966, vol. 1, p. 75-82.
- [33] GOODENOUGH, U. W. and STAEHELIN, L. A., Structural differentiation of stacked and unstacked chloroplast membranes, *J. Cell Biol.*, **48**: 594-619, 1971.

- [33a] GOODWIN, T. W., Biosynthesis by chloroplasts. [w] Structure and Function of Chloroplasts, red. M. Gibbs, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York 1971, p. 215–276, 1971.
- [34] GREEN, D. E., TISDALE, H. D., CRIDDLE, R. S., CHEN, P. Y. and BOCK, R. M., Isolation and properties of the structural protein of mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **5**: 109–114, 1961.
- [35] HALL, D. O., EDGE, H. and KALINA, M., The site of ferricyanide photoreduction in the lamellae of isolated spinach chloroplasts: a cytochemical study, *J. Cell Sci.*, **9**: 289–303, 1971.
- [36] HAUSKA, G. A. and SANE, P. V., The distribution of photosynthetic reactions in the chloroplast lamellar system. II. Latent ATPase, proton pump, cyclic phosphorylation and its sensitivity towards ammonia, *Z. Naturforsch.*, **27b**: 938–942, 1972.
- [37] HESLOP-HARRISON, J., Structure and morphogenesis of lamellar systems in grana-containing chloroplasts. I. Membrane structure and lamellar architecture, *Planta*, **60**: 243–260, 1963.
- [38] HIEDEMANN - VAN WYK, D., Über ein Glykolipopeptid aus Chloroplasten und sein serologisches Verhalten, *Z. Naturforsch.*, **26b**: 1052–1054, 1971.
- [39] HIEDEMANN - VAN WYK, D. and KANNAUGARA, C. G., Localization of ferredoxin in the thylakoid membrane with immunological methods, *Z. Naturforsch.*, **26b**: 46–50, 1971.
- [40] HOWELL, S. H. and MOUDRIANAKIS, E. N., Function of the “quantasome” in the photosynthesis: structure and properties of membrane-bound particles active in the dark reactions of photophosphorylation, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **58**: 1261–1268, 1967.
- [41] — Hill reaction site in chloroplasts membrane: non-participation of the quantasome particle in photoreduction, *J. Mol. Biol.*, **27**: 323–333, 1967.
- [42] HUANG, J.-S., HUANG, P. and GOODMAN, R. N., Reconstitution of a membrane-like structure with structural proteins and lipids isolated from tobacco thylakoid membranes, *Am. J. Bot.*, **60**: 80–85, 1973.
- [43] JUNGE, W. and ECKHOF, A., On the orientation of chlorophyll a_1 in the functional membrane of photosynthesis, *FEBS Letters*, **36**: 207–212, 1973.
- [44] KAO, O. and BERNS, D. S., The monomer molecular weight of C-phycoyanin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **33**: 457–462, 1968.
- [45] KIRK, J. T. O., Chloroplast structure and biogenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**: 161–196, 1971.
- [46] KOENIG, F., MENKE, W., CRAUBNER, H., SCHMID, G. H. and RADUNZ, A., Photochemically active chlorophyll containing proteins from chloroplasts and their localization in the thylakoid membrane, *Z. Naturforsch.*, **27b**: 1225–1238, 1972.
- [47] KREUTZ, W., Über die Tertiärstruktur des Proteins der Chloroplasten lamellen, *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **79**: 34–43, 1966.
- [48] — The structure of the lamellar system of chloroplasts. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1966, vol. 1, p. 83–88.
- [49] — On the molecular mechanism of the proton pump in photosynthesis, *Z. Naturforsch.*, **25b**: 88–94, 1970.
- [50] LAETSCH, W. M., Chloroplast structure relationships in leaves of C_4 plants. [w] *Photosynthesis and Photorespiration*, red. M. D. Hatch, J. Wiley Inc., p. 323–349, 1971.
- [51] LICHTENTHALER, H. K. and PARK, R. B., Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach, *Nature*, **198**: 1070–1072, 1963.

- [52] LOCKSHIN, A. and BURRIS, R. H., Solubilization and properties of chloroplast lamellar protein, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56**: 1564–1570, 1966.
- [53] LÜRSSEN, K., Localisation of protein synthesis during the development of the lamellar system of greening etioplasts, *Z. Naturforsch.*, **26b**: 725–729, 1971.
- [54] MACHOLD, O., Lamellar proteins of green and chlorotic chloroplasts as affected by iron deficiency and antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta*, **238**: 324–331, 1971.
- [55] MANI, R. S. and ZALIK, S., Physicochemical studies of bean and wheat chloroplast structural protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **200**: 132–137, 1970.
- [56] MANTON, I., Some possible significant structural relations between chloroplasts and other cell components. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1966, vol. 1, p. 23–47.
- [57] McCARTY, R. E. and RACKER, E., Effect of coupling factor and its antiserum on photophosphorylation and hydrogen ion transport, *Brookhaven Symp. Biol.*, **19**: 202–212, 1967.
- [58] MENKE, W., Über die Chloroplasten von *Anthoceros punctatus*, *Z. Naturforsch.*, **16b**: 334–336, 1961.
- [59] — Structure and chemistry of plastids, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **13**: 27–44, 1962.
- [60] — The structure of the chloroplasts. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1966, vol. 1, p. 3–18.
- [61] — Proteins of the thylakoid membrane, properties and functions, *Physiol. Vég.*, **11**: 231–238, 1973.
- [62] MENKE, W. and HIRTZ, R. D., The secondary structure of proteins in the thylakoid membrane, *Z. Naturforsch.*, **28c**: 128–130, 1973.
- [63] MENKE, W. and JORDAN, E., Über das lamellare Strukturprotein der Chloroplasten von *Allium porrum*, *Z. Naturforsch.*, **14b**: 234–240, 1959.
- [64] — Über die Wirkung von Carboxypeptidase auf das lamellare Strukturprotein der Chloroplasten von *Allium porrum*, *Z. Naturforsch.*, **14b**: 393–394, 1959.
- [65] MENKE, W. und RUPPEL, H. G., Molekulargewicht, grösse und Gestalt von Proteinen der Thylakoidmembran, *Z. Naturforsch.*, **26b**: 825–831, 1971.
- [66] MICHEL, J. M. and MICHEL-WOLWERTZ, M. R., On the fractionation of the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts. [w] *Progress in Photosynthesis Research*, red. H. Metzner, Tübingen 1969, vol. 1, p. 115–121.
- [67] MILLER, K. R. and STAEHELIN, L. A., Fine structure of the chloroplast membranes of *Euglena gracilis* as revealed by freeze-cleaving and deep-etching techniques, *Protoplasma*, **77**: 55–78, 1973.
- [68] MÜHLETHALER, K., The ultrastructure of the plastid lamellae. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1966, vol. 1, p. 49–64.
- [69] MÜHLETHALER, K., MOOR, H. and SZARKOWSKI, J. W., The ultrastructure of the chloroplast lamellae, *Planta*, **67**: 305–323, 1965.
- [70] MURAKAMI, S. and PACKER, L., Protonation and chloroplast membrane structure, *J. Cell Biol.*, **47**: 332–351, 1970.
- [71] — The role of cations in the organization of chloroplast membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**: 337–347, 1971.
- [72] MURATA, N. and FORK, D. C., Oxidation-reduction reactions of system I particles prepared by French pressure cell treatment of spinach chloroplasts, *Carnegie Inst. Year Book*, **70**: 468–472, 1971.
- [73] NOËL, H., VAN DER REST, M. and GINGRAS, G., Isolation and partial characterization of a P870 reaction center complex from wild type *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **275**: 219–230, 1972.

- [74] OELZE, J. and DREWS, G., Membranes of photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **265**: 209–239, 1972.
- [75] OGAWA, T., OBATA, F. and SHIBATA, K., The pigment proteins in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **111**: 223–234, 1966.
- [76] OGAWA, T. and VERNON, L. P., Chlorophyll *a* forms in partially purified photosynthetic reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **197**: 332–334, 1970.
- [77] OKAMURA, M. Y., STEINER, L. A. and FEHLER, G., Characterization of reaction centers from photosynthetic bacteria. I. Subunit structure of the protein mediating the primary photochemistry in *Rhodospseudomonas spheroides* R-26, *Biochemistry*, **13**: 1394–1403, 1974.
- [78] OLSON, J. M., PHILIPSON, K. D. and SAUER, K., Circular dichroism and absorption spectra of bacteriochlorophyll-protein and reaction center complexes from *Chlorobium thiosulfatophilum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **292**: 206–217, 1973.
- [79] PAOLILLO, D. J., Jr., The three-dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts, *J. Cell Sci.*, **6**: 243–255, 1970.
- [80] PAPE, E. H., MENKE, W., WEICK, D. and HOSEMANN, R., Small angle X-ray scattering of the thylakoid membranes of *Rhodospseudomonas spheroides* in aqueous suspensions, *Biophys. J.*, **14**: 221–232, 1974.
- [81] PARK, R. B., Substructure of chloroplast lamellae, *J. Cell Biol.*, **27**: 151–161, 1965.
- [82] PARK, R. B. and BIGGINS, J., Quantasome: size and composition, *Science*, **144**: 1009–1011, 1964.
- [83] PARK, R. B. and PFEIFHOFER, A. O., The effect of ethylenediaminetetraacetate washing on the structure of spinach thylakoids, *J. Cell Sci.*, **5**: 313–319, 1969.
- [84] PARK, R. B. and PON, N. G., Correlation of structure with function in *Spinacia oleracea* chloroplasts, *J. Mol. Biol.*, **3**: 1–10, 1961.
- [85] — Chemical composition and the substructure of lamellae isolated from *Spinacia oleracea* chloroplasts, *J. Mol. Biol.*, **6**: 105–114, 1963.
- [86] PENDLAND, J. C. and ALDRICH, H. C., Ultrastructural organization of chloroplast thylakoids of the green alga *Oocystis marssonii*, *J. Cell Biol.*, **57**: 306–314, 1973.
- [87] POINCELOT, R. P., Isolation and lipid composition of spinach chloroplast envelope membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**: 134–142, 1973.
- [88] RADUNZ, A. and BERZBORN, R., Antibodies against sulphoquinovosyl-diacyl glycerol and their reactions with chloroplasts, *Z. Naturforsch.*, **25b**: 412–419, 1970.
- [89] REMY, R., Resolution of chloroplast lamellar proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels. Different patterns obtained with fractions enriched in either chlorophyll *a* or chlorophyll *b*, *FEBS Letters*, **13**: 313–317, 1971.
- [90] RICHARDSON, S. H., HULTIN, H. O. and GREEN, D. E., Structural proteins of membrane systems, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50**: 821–827, 1963.
- [91] RIVAS, E. et LUZZATI, V., Polymorphisme des lipides polaires et des galacto-lipides de chloroplastes de maïs, en présence d'eau, *J. Mol. Biol.*, **41**: 261–275, 1960.
- [92] ROBERTSON, J. D., The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. The structure and functions of subcellular components, *Biochem. Soc. Symp.*, **16**: 3–13, 1959.
- [93] ROGERS, L. J. and LEES, D. N., Aggregated states of membrane proteins of photosynthetic organelles. [w] *Proc. 2nd Inter. Congr. Photosynthesis Res.*, red. G. Forti, M. E. Avron and A. Melandri, Dr. W. Junk, The Hague 1972, vol. 2, p. 1565–1573.

- [94] ROGERS, L. J., KERSLEY, J. and LEES, D. N., Physicochemical properties of membrane proteins of photosynthetic organells, *Physiol. Vég.*, **11**: 327-360, 1973.
- [95] SADLER, D. M., LEFORT-TRAN, M. and POUPHILE, M., Structure of photosynthetic membranes of *Euglena* using X-ray diffraction, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 620-629, 1973.
- [96] SAN PIETRO, A., red., *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York and London 1971, vol. 23, cz. A, p. 743.
- [97] SANE, P. V. and PARK, R. B., Distribution of the photosystems between grana and stroma lamellae of spinach chloroplasts, *Plant Physiol.*, **46**: 22 (suppl.), 1970.
- [98] SANE, P. V., GOODCHILD, D. J. and PARK, R. B., Characterisation of chloroplast photosystems 1 and 2 separated by non-detergent method. *Biochim. Biophys. Acta*, **216**: 162-178, 1970.
- [99] STEINER, L. A., OKAMURA, M. Y., LOPES, A. D., MOSKOWITZ, E. and FEHER, G., Characterization of reaction centers from photosynthetic bacteria. II. Amino acid composition of the reaction center protein and its subunits in *Rhodospseudomonas spheroides* R-26, *Biochemistry*, **13**: 1403-1410, 1974.
- [100] STEINMANN, E., An electron microscope study of the lamellar structure of chloroplasts, *Exp. Cell Res.*, **3**: 367-372, 1952.
- [101] STROTMANN, H., HESSE, H. and EDELMANN, K., Quantitative determination of coupling factor CF₁ of chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **314**: 202-210, 1973.
- [102] STRZAŁKA, K. i WIĘCKOWSKI, S., Autonomia genetyczna chloroplastów w świetle badań biochemicznych, *Postępy Biol. Kom.*, **1**: 193-219, 1974.
- [103] THORNER, J. P., GREGORY, R. P. F., SMITH, C. A. and BAILEY, J. L., Studies on the nature of the chloroplast lamellae. I. Preparation and some properties of two chlorophyll-protein complexes, *Biochemistry*, **6**: 391-396, 1967.
- [104] THRELFALL, D. R. and GRIFFITHS, W. T., Biosynthesis of terpenoid quinones. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1967, vol. 2, p. 255-271.
- [105] TREBST, A., Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**: 423-458, 1974.
- [106] VAMBUTAS, V. K. and RACKER, E., Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **240**: 2660-2667, 1965.
- [106a] VERNON, L. P., KLEIN, S., WHITE, F. G., SHAW, E. R. and MAYNE, B. C., Properties of a small photosystem II particle obtained from spinach chloroplasts. [w] *Proc. 2nd Inter. Congr. Photosynthesis Res.*, red. G. Forti, M. Avron, A. Melandri, Dr. W. Junk, The Hague 1972, vol. 1, p. 801-812.
- [107] VERNON, L. P. and SHAW, E. R., Subchloroplast fragments: Triton X-100 method. [w] *Methods in Enzymology*, red. A. San Pietro, London and New York 1971, vol. 23, p. 277-289.
- [108] WANG, J. H., Oxidative and photosynthetic phosphorylation mechanisms, *Science*, **167**: 25-30, 1970.
- [109] WANG, A. Y. I. and PACKER, L., Mobility of membrane particles in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **305**: 488-492, 1973.
- [110] WEHRMEYER, W., Über Membranbildungsprozesse im Chloroplasten, II. Zur Entstehung der Grana durch Membranüberschiebung, *Planta*, **63**: 13-30, 1964.
- [111] WEIER, T. E. and BENSON, A. A., The molecular nature of chloroplast membranes. [w] *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London and New York 1966, vol. 1, p. 91-113.
- [112] WEIER, T. E., STOCKING, C. R., THOMSON, W. W. and DREVER, H., The grana as structural units in chloroplasts of mesophyll of *Nicotiana rustica* and *Phaseolus vulgaris*, *J. Ultrastruct. Res.*, **8**: 122-143, 1963.

- [113] WIĘCKOWSKI, S., Formy chlorofilu in vivo i ich rola w fotosyntezie, *Post. Biochem.*, **13**: 261-273, 1967.
- [114] WILD, A. und EGGLE, K., Die Grösse der photosynthetischen Einheit und ihre Variabilität I. Bestimmung der Grösse der photosynthetischen Einheit, *Beitr. Biol. Pflanzen*, **45**: 213-241, 1968.
- [115] WOLF, F. T., CONIGLIO, J. G. and DAVIS, J. T., Fatty acids of spinach chloroplasts, *Plant Physiol.*, **37**: 83-85, 1962.
- [116] WYK VAN, D., Die Kohlenhydrate im Strukturprotein der Chloroplasten von *Allium porrum*, *Z. Naturforsch.*, **22b**: 690, 1967.

Otrzymano: 7 luty 1975.

Przyjęto: 15 luty 1975.

Adres autora: ul. Grodzka 53, 31-001 Kraków.

OPIS ZJAWISKA TRANSPORTU PRZEZ BŁONY BIOLOGICZNE

Stanisław PRZESTALSKI

Zakład Fizyki i Biofizyki, Instytut Biologii i Biofizyki,
Akademia Rolnicza we Wrocławiu

Streszczenie. W pracy przedstawiono elementarny opis fizykomatematyczny zjawisk przenikania substancji przez błony biologiczne. Wskazano, że opis ten powinien mieć charakter zależności między strumieniem i bodźcami. Omówiono dwa sposoby podejścia do zagadnienia: jeden oparty na równaniu Teorella i drugi, oparty na formalizmie liniowej termodynamiki procesów nieodwracalnych. Następnie przedyskutowano procesy przenikania biernego na przykładach prostej dyfuzji, elektrodyfuzji, filtracji i biernego transportu nośnikowego oraz proces przenikania aktywnego, a także wzajemne sprzężenia między strumieniami w procesach złożonych. Ponadto zwrócono uwagę na ograniczenia przedstawionych metod związanych m. in. z niedostateczną znajomością budowy błon biologicznych i na pewne osiągnięcia w konkretnych problemach biologicznych.

UWAGI OGÓLNE

Badania nad przenikaniem substancji przez błony biologiczne mają na celu poznanie tego procesu jako podstawy wielu fundamentalnych dla biologii zjawisk. Należą do nich m. in. przemiana materii i energii, powstawanie i rozchodzenie się impulsów nerwowych, skurcz mięśnia, zdolność do utrzymywania kontaktu żywej komórki ze środowiskiem. Dzisiejszy stan wiedzy na temat procesu przenikania jest jednak wielce niedoskonały, przede wszystkim ze względu na naszą ubogą znajomość budowy błon biologicznych. Ponieważ z kolei badanie przebiegu procesu przenikania może dostarczyć najbardziej precyzyjnych informacji o strukturze i funkcjach samej błony, powstaje trudna sytuacja. Stwarza ona konieczność badania budowy błon również innymi metodami oraz badania transportu substancji nie tylko poprzez błony biologiczne, lecz również poprzez błony modelowe. Stałe konfrontacje między wynikami niezależnych badań nad strukturą błony i badań nad przenikaniem substancji zarówno przez błony biologiczne, jak i sztuczne pozwalają obecnie formułować pewne hipotezy lub teorie mechanizmu przenikania.

Zanim omówimy problem transportu substancji przez błony, zatrzymajmy się nad pewnymi zagadnieniami podstawowymi, dotyczącymi transportu substancji rozpuszczonej w rozpuszczalniku. Transport substancji rozpuszczonej w elemencie

objętościowym roztworu może być zrealizowany na trzech drogach. Pierwsza możliwość polega na ruchu całego elementu objętościowego (rozpuszczalnika wraz z substancją rozpuszczoną); taki przepływ nazywa się przepływem objętościowym. Druga możliwość — to ruch dyfuzyjny cząstek rozpuszczonych (na ogół cząsteczek lub jonów) zachodzący w wyniku ich ruchu cieplnego, zwany dyfuzją. Niedyfuzyjny ruch substancji rozpuszczonej pod wpływem sił zewnętrznych nazywamy migracją.

Z fizycznego punktu widzenia opis transportu powinien zawierać zależność między strumieniem i bodźcem. Przez strumień substancji rozumiemy liczbowo ilość substancji przechodzącej przez jednostkę powierzchni, prostopadłą do kierunku strumienia w ciągu jednostki czasu

$$(1) \quad I = \frac{dn}{dA dt},$$

gdzie n jest ilością moli, A — powierzchnią, t — czasem.

Zauważmy, że w zagadnieniach transportowych spotykamy się z przenoszeniem nie tylko substancji, lecz np. ciepła, ładunku elektrycznego itd. W tych wszystkich sytuacjach określamy odpowiednie strumienie, które często definiuje się zupełnie podobnie, jak strumień substancji. Strumień ciepła jest np. określony jako stosunek ilości przenieszonego ciepła do powierzchni (prostopadłej do kierunku strumienia) i do czasu, a strumień elektryczności — jako stosunek przenieszonego ładunku elektrycznego do powierzchni i do czasu. Inaczej określamy strumień reakcji chemicznej (zwany również prędkością reakcji chemicznej), a mianowicie jako szybkość zmiany postępu reakcji w jednostce czasu.

Bodźcem nazywamy czynnik wywołujący strumień. W naszych rozważaniach ograniczymy się do takich bodźców, które (poza powinowactwem chemicznym) wyrażają się za pomocą gradientów odpowiednich wielkości. Gradientami takimi są m. in. gradient potencjału chemicznego, który jest bodźcem typowym dla procesu dyfuzji (albo, mówiąc inaczej, jest bodźcem skoniugowanym z procesem dyfuzji), gradient potencjału elektrycznego, typowy dla procesu przepływu prądu elektrycznego, gradient ciśnienia skoniugowany z przepływem objętościowym, gradient potencjału elektrochemicznego, który jest sumą dwóch poprzednich bodźców, gradient temperatury, skoniugowany z przepływem ciepła i powinowactwo chemiczne będące bodźcem wywołującym strumień reakcji chemicznej.

Jeśli strumień oznaczymy symbolem I , a całkowity bodziec występujący w układzie — symbolem X , to możemy powiedzieć, że znamy dany transport, jeśli znamy konkretne wyrażenie typu

$$(2) \quad I = f(X),$$

tzn. jeśli znamy zależność funkcyjną między strumieniem i bodźcem.

Znajomość konkretnej zależności typu (2) umożliwia w zasadzie przewidywanie rozkładu transportowanej substancji w dowolnym miejscu układu i w dowolnym czasie, a w szczególności, przewidywanie rozkładu stężeń między żywą komórką i środowiskiem. Uzyskanie takich wiadomości pozwoliłoby rozwiązać wiele problemów wspomnianych na wstępie, a w każdym razie rzucić nowe światło na zagad-

nienia metabolizmu, generacji i propagacji impulsów nerwowych, skurczu mięśnia, transportu leków poprzez błony komórkowe i tkankowe i wiele innych problemów biologicznych.

Na drodze do ścisłego sformułowania zależności (2) stoją na ogół poważne przeszkody. Przede wszystkim wspomniana uprzednio niedostateczna znajomość budowy błony. I to jest przyczyną, dla której błonę traktujemy często jako czarną skrzynkę i opisujemy procesy przenikania w sposób fenomenologiczny, a nie kinetyczny. Drugą przeszkodą jest brak ogólnej teorii cieczy w ogóle, a teorii roztworów w szczególności. Z tego względu jesteśmy na ogół zmuszeni ograniczać rozważania teoretyczne do roztworów idealnych, nieskończenie rozcieńczonych i zakładać, że współczynnik aktywności jest równy jedności, chociaż np. cytoplazma żywych komórek mało przypomina stan roztworu idealnego. Po trzecie, znane metody matematyczne nie zawsze są wystarczające, aby rozwiązać pewne konkretne równania typu (2). Pomimo tych trudności jesteśmy w chwili obecnej w stanie opisać pewne ważne zagadnienia transportowe zarówno w zakresie transportu biernego, jak i aktywnego.

RÓWNANIE TEORELLA

Strumień (1) może być również określony w inny sposób, a mianowicie w postaci iloczynu prędkości v cząstki transportowej i stężenia molarnego

$$(3) \quad I = vc.$$

Wyrażenie to przedstawia ilość substancji przechodzącej przez jednostkową powierzchnię w jednostce czasu, zawartą w cylindrze o podstawie jednostkowej i o wysokości równej prędkości v . Zauważmy, że równanie (3) zostało zapisane w sposób skalarny, ale ogólnie ma ono charakter wektorowy, gdyż prędkość, a wobec tego i strumień, są wektorami.

Wykorzystując ostatnie równanie (3) oraz pojęcie ruchliwości $u = v/X$, gdzie X jest bodźcem, otrzymujemy wyrażenie

$$(4) \quad I = ucX.$$

Wyrażenie to, wynikające bezpośrednio z definicji strumienia i z definicji ruchliwości, nazywa się równaniem Teorella [26]. Wskazuje ono, że strumień można przedstawić jako iloczyn ruchliwości, stężenia i całkowitego bodźca; może ono służyć jako punkt wyjścia do opisu wielu procesów transportu w zależności od występującego w układzie całkowitego bodźca.

W przypadku nie reagujących ze sobą chemicznie substancji, w roztworach idealnych i w warunkach izotermicznych, potencjał elektrochemiczny ma postać

$$(5) \quad \bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln c + zF\varphi + \bar{V}P,$$

gdzie μ_0 jest potencjałem standardowym, R — stałą gazową, T — temperaturą bezwzględną, c — stężeniem molarnym, z — wartościowością, F — stałą Faradaya,

φ — potencjałem elektrycznym, \bar{V} — objętością molarną, P — ciśnieniem hydrostatycznym, a suma $\mu_0 + RT \ln c$ jest potencjałem chemicznym.

Całkowitym bodźcem w rozważanych warunkach jest gradient potencjału elektrochemicznego, który w jednowymiarowym przypadku (kiedy strumień jest skierowany jedynie wzdłuż osi x) przyjmuje postać

$$X = \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial x},$$

czyli, ze względu na (5),

$$(6) \quad X = -RT \frac{\partial \ln c}{\partial x} - zF \frac{\partial \varphi}{\partial x} - \frac{\partial \bar{V}P}{\partial x}.$$

Podstawiając wyrażenie (6) do wyrażenia (4) otrzymujemy

$$(7) \quad I = -uc \left(RT \frac{\partial \ln c}{\partial x} + zF \frac{\partial \varphi}{\partial x} + \frac{\partial \bar{V}P}{\partial x} \right).$$

Opierając się na tym dość ogólnym wyrażeniu, przedyskutujemy pewne przypadki szczególne.

A. Rozważmy układ, w którym nie występują gradienty potencjału elektrycznego φ i ciśnienia P , a więc jedynym bodźcem jest gradient potencjału chemicznego ($RT \partial \ln c / \partial x$). W tej sytuacji wyrażenie (7) sprowadza się do postaci

$$I = -ucRT \frac{\partial \ln c}{\partial x} \quad \text{lub} \quad I = -ucRT \frac{1}{c} \frac{\partial c}{\partial x},$$

czyli

$$I = -uRT \frac{\partial c}{\partial x}.$$

Oznaczając iloczyn uRT symbolem D ,

$$uRT = D,$$

możemy napisać

$$(8) \quad I = -D \frac{\partial c}{\partial x}.$$

Ostatnie wyrażenie jest dobrze znanym równaniem dyfuzji (pierwszym równaniem Ficka), gdzie D jest współczynnikiem dyfuzji. Jak widzimy, pod wpływem gradientu potencjału chemicznego transport staje się procesem dyfuzyjnym, ponieważ podlega prawu dyfuzji (które może być również wyprowadzone na innej drodze), do którego w tym przypadku sprowadza się równanie Teorella. W ogólności rozwiązanie równania dyfuzji uzależnione jest od warunków początkowych i brzegowych i często jest trudnym zagadnieniem matematycznym.

W przypadku strumienia przepływającego przez błonę oddzielającą dwa dobrze mieszane roztwory o różnych stężeniach c' i c'' , równanie dyfuzji (8) opisuje transport substancji jedynie przez błonę (ze względu na dobre mieszanie, stężenia w każdym z przedziałów są niezależne od miejsca; wewnątrz błony natomiast substancja przenikająca nie ulega mieszanii, lecz dyfuzji dzięki gradientowi stężenia $\partial c/\partial x$, gdzie c jest stężeniem w błonie, w ogólności różnym w różnych przekrojach błony). W szczególności, w stanie stacjonarnym (tzn. kiedy różnica stężeń w układzie nie zmienia się w czasie) równanie dyfuzji przyjmuje szczególnie prostą postać

$$I = -D \frac{\Delta c}{\Delta x},$$

gdzie Δx oznacza grubość błony. Jeśli Δx jest wielkością nieznaną, to najczęściej piszemy

$$I = -P \Delta c,$$

gdzie $P = D/\Delta x$ nazywamy stałą przenikania.

Proces podlegający jedynie prawu dyfuzji nazywany jest dyfuzją prostą. Znana jest dość liczna grupa substancji, które przenikają przez błony żywych komórek zgodnie z prawem prostej dyfuzji. Nie wiadomo jednak, czy substancje te przenikają przez ciągłą fazę fosfolipidową błony, czy też przez hipotetyczne pory błony. Innymi słowy, nie można na podstawie stwierdzenia, że pewien proces podlega prawu dyfuzji, odpowiedzieć na pytanie, czy w błonie cytoplazmatycznej znajdują się pory, czy też nie. Wynika to stąd, że proces dyfuzji wyraża się takim samym prawem niezależnie od tego, czy cząstki dyfundujące przechodzą przez warstwę roztworu wodnego, wypełniającego pory, czy też przez fazę lipidową błony. Ewentualnie różnice mogą się jedynie odbić na liczbowej wartości współczynnika dyfuzji ze względu na możliwe różnice energii aktywacji procesu przenikania substancji przez warstwę wody (lub wodnego roztworu) i warstwę lipidową. Wyłączne badania procesów prostej dyfuzji nie mogą rozstrzygnąć wątpliwości dotyczących istnienia por w błonie.

B. Z kolei rozpatrzmy migrację jonów w układzie, w którym nie występują ani gradient stężenia, ani gradient ciśnienia, a działa jedynie gradient przyłożonego potencjału elektrycznego. W tym przypadku równanie (7) redukuje się do postaci

$$I = -uczF \frac{\partial \varphi}{\partial x},$$

która przedstawia prawo Ohma w roztworach elektrolitycznych.

C. W przypadku równoczesnego działania pola elektrycznego i gradientu potencjału chemicznego, powstały transport nosi nazwę elektrodyfuzji. Należy zauważyć, że w rozważanym przykładzie napięcie elektryczne nie musi pochodzić ze źródła zewnętrznego. Różnica potencjałów elektrycznych powstaje zawsze w wyniku różnic w ruchliwościach różnych rodzajów jonów (potencjał dyfuzyjny). Ponadto w błonach biologicznych (i w wielu błonach sztucznych) występuje potencjał elek-

tryczny pochodzący od nieprzenikających przez błonę jonów i od ładunków związanych z błoną (potencjał Donnana). Suma obydwu potencjałów (wraz z potencjałem pochodzącym z procesów aktywnych) nazywana jest potencjałem membranowym. Transport jonów poprzez błony żywych komórek może mieć charakter elektrodyfuzyjny, bo w układzie żywa komórka—środowisko często może występować równocześnie gradient potencjału chemicznego i gradient potencjału membranowego. W tym przypadku strumień przyjmuje na podstawie wyrażenia (7) postać

$$(9) \quad I = -uRT \frac{\partial c}{\partial x} - ucZF \frac{\partial \varphi}{\partial x}$$

i zawiera, jak widać, wyrażenie charakteryzujące prostą dyfuzję i wyrażenie opisujące elektryczną migrację jonów, w całości reprezentując zjawisko elektrodyfuzji.

Jeśli stężenie i potencjał elektryczny byłyby znanymi funkcjami współrzędnej x , to rozwiązanie równania różniczkowego (9) byłoby jedynie problemem matematycznym. W rzeczywistości, stężenie jonów i profil potencjału wewnątrz błony nie są ani znane, ani mierzalne i wobec tego całkowanie równania (9) wymaga dodatkowych założeń. Jeśli założymy mianowicie, że zarówno stężenie, jak i potencjały membranowe są niezależne od czasu i że wszelkie zmiany zachodzą jedynie w kierunku osi x , która jest prostopadła względem błony, to zarówno stężenie c , jak i potencjał φ są funkcjami jednej zmiennej x i zamiast pochodnych cząstkowych można użyć pochodnych zwykłych

$$I = -uRT \frac{dc}{dx} - ucZF \frac{d\varphi}{dx}$$

Jednym ze znanych rozwiązań ostatniego równania jest rozwiązanie zaproponowane przez Goldmana [5], który przyjął następujące założenia upraszczające: 1. wewnątrz błony pole elektryczne jest stałe; 2. istnieje prosta zależność między potencjałem φ wewnątrz błony (niemierzalnym) i potencjałem U (mierzalnym) na zewnątrz błony w jej pobliżu; 3. przypadek jest stacjonarny; 4. w układzie występują tylko dwa rodzaje jonów: sodu i potasu. Opierając się na tych założeniach otrzymujemy rozwiązanie w postaci równania Goldmana

$$\Delta U = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K]_0 + P_{Na} [Na]_0}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i},$$

gdzie P_K i P_{Na} oznaczają stałe przenikania dla jonów potasu i sodu, a $[K]_0$, $[Na]_0$, $[K]_i$ i $[Na]_i$ oznaczają odpowiednio stężenia jonów potasu i sodu w środowisku zewnętrznym i w środowisku wewnętrznym komórki. Potencjały spoczynkowe komórek nerwowych i mięśni często podlegają w przybliżeniu prawu Goldmana i to jest przyczyną, dla czego to równanie odgrywa istotną rolę w elektrofizjologii. Ostatni przykład ilustruje również jedną z licznych możliwości wykorzystania prawa transportu (a więc zależności między strumieniem i bodźcem) do określenia pewnych ważnych wielkości, np. potencjału spoczynkowego ΔU .

$$(12) \quad \frac{dS}{dt} = \sum I_i X_i > 0,$$

gdzie S jest entropią, t — czasem, dS/dt — zmianą czasową entropii, zwaną produkcją entropii.

Drugą jest *zasada Onsagera*, która wskazuje, że współczynniki krzyżowe są sobie równe: $L_{ik} = L_{ki}$ dla $i \neq k$.

Trzecią jest *zasada Curie*. To ogólne prawo przyrody w zastosowaniu do naszych rozważań może być sformułowane mniej generalnie w sposób następujący: w układach izotropowych przyczyna wektorowa nie może wywołać skutku o charakterze skalarnym i na odwrót. Strumień wektorowy (jakim jest strumień dyfuzyjny) może być wywołany np. bodźcem wektorowym (jakim jest gradient potencjału chemicznego), ale nie może być wywołany bodźcem skalarnym. Problem nie jest banalny, ponieważ wynika stąd m. in., że bodziec chemiczny w postaci powinowactwa chemicznego (które jest wielkością skalarną) nie może wywołać w ośrodku jednorodnym strumienia dyfuzyjnego.

Znajomość układu równań fenomenologicznych dla danego przypadku oraz wymienionych trzech zasad pozwala opisywać różnorodne szczegółowe procesy transportowe.

Rozważmy znany przypadek układu, w którym występują dwa bodźce: gradient potencjału chemicznego i gradient ciśnienia hydrostatycznego i dwa strumienie: strumień dyfuzyjny I_D skoniugowany z pierwszym bodźcem i strumień objętościowy I_v skoniugowany z drugim bodźcem. Równania fenomenologiczne dla tego układu, w którym roztwory przedzielone są błoną, a transport ma charakter procesu stacjonarnego, mają postać

$$(13) \quad \begin{aligned} I_D &= L_{DD}\Delta\pi + L_{Dv}\Delta p, \\ I_v &= L_{vD}\Delta\pi + L_{vv}\Delta p. \end{aligned}$$

Pierwsze z tych równań zostało tu przedstawione w nieco innej formie aniżeli równanie (10) zastosowane do procesu stacjonarnego; jest to podyktowane względami eksperymentalnymi. W stosunku do równania (10) zastąpiono tu $uRT\Delta c/\Delta x$ przez $L_{DD}\Delta\pi$, gdzie $\Delta\pi = RT\Delta c$ jest różnicą ciśnień osmotycznych. Podobne postępowanie wykorzystano w stosunku do drugiego równania (10), też oczywiście dla przepływu stacjonarnego.

Jak widzimy, strumień dyfuzyjny I_D jest zależny nie tylko od bodźca sprzężonego $\Delta\pi$, lecz również od bodźca nieskoniugowanego Δp . Strumień dyfuzyjny zawiera zatem dwie składowe: dyfuzję prostą $L_{DD}\Delta\pi$ i tzw. ultrafiltrację $L_{DP}\Delta p$. Podobnie strumień objętościowy I_v jest zależny nie tylko od skoniugowanego gradientu ciśnienia, lecz również od nieskoniugowanego bodźca $\Delta\pi$ i składa się z dwóch strumieni: osmotycznego $L_{vD}\Delta\pi$ i hydraulicznego $L_{vv}\Delta p$.

Formalizm termodynamiki procesów nieodwracalnych zwraca naszą uwagę na to, że zgodnie z *zasadą Onsagera* $L_{DP} = L_{PD}$, co oznacza, że obydwa strumienie I_D i I_v są wzajemnie sprzężone i w konsekwencji oddziałują na siebie. Istotnie, jeśli np. z drugiego z równań (13) określimy L_{vD} ,

$$L_{vD} = \frac{I_v - L_{vv}\Delta p}{\Delta\pi},$$

to ze względu na relację Onsagera ($L_{vD} = L_{Dv}$) możemy tę wartość podstawić do pierwszego z równań (13):

$$I_D = L_{DD}\Delta\pi + \frac{I_v - L_{vv}\Delta p}{\Delta\pi} \Delta p,$$

co wskazuje na bezpośrednie sprzężenie między obydwoma strumieniami. Jest to bardzo ważny wniosek wynikający jedynie z równań termodynamiki procesów nieodwracalnych, a który nie wynika z równania Teorella.

W podobny sposób można przedyskutować sprzężenia występujące między innymi strumieniami, np. między strumieniem objętościowym I_v i strumieniem jonów I_e . W tym przypadku odpowiednie postępowanie pozwala sformułować następujące równania fenomenologiczne:

$$I_v = L_{11}\Delta p + L_{12}\Delta\varphi,$$

$$I_e = L_{21}\Delta p + L_{22}\Delta\varphi,$$

gdzie φ oznacza potencjał elektryczny, a L_{11} , L_{12} , L_{21} , L_{22} — współczynniki fenomenologiczne. Przedstawione równania są podstawą do wyjaśnienia w sposób fenomenologiczny zjawisk elektrokinetycznych. Na przykład jeśli $\Delta p = 0$, to $I_v = L_{12}\Delta\varphi$ (jest to zjawisko elektroosmozy, przepływ objętościowy pod wpływem gradientu potencjału elektrycznego).

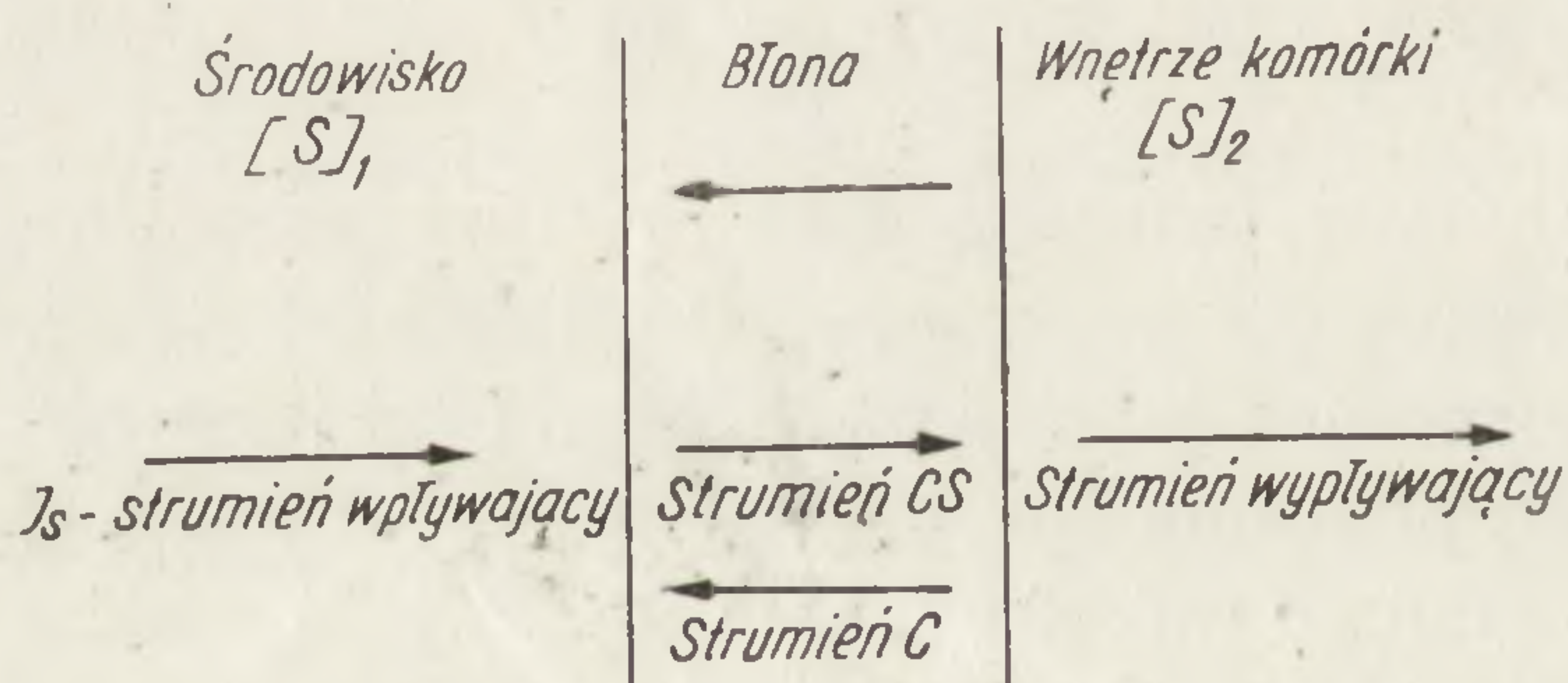
Naszkirowana powyżej zasada liniowej termodynamiki procesów nieodwracalnych stanowi obecnie potężne narzędzie badawcze w problematyce biofizycznej, a w szczególności w zagadnieniach transportu substancji przez błony. Istnieje obszerna literatura tego tematu. Ogólne zasady przedstawione są w licznych opracowaniach, a przede wszystkim w pracach i monografiach twórców teorii [19, 22, 7]; w polskim języku należy wskazać podręczniki i monografie [1, 8, 31]. Biofizyczne zagadnienia transportowe opisane są m. in. w [10, 12, 14, 15, 23] i w nich cytowane są liczne pozycje literaturowe.

BIERNY TRANSPORT NOŚNIKOWY

Dotychczas rozważania ograniczały się do procesów, które ogólnie można nazwać biernymi procesami bežnośnikowymi. Procesy te charakteryzują się tym, że zachodzą samorzutnie, bez udziału dodatkowej energii i niezależnie od istnienia tzw. nośników. Jednakże możemy również przewidywać istnienie innych rodzajów procesów przenikania, a w szczególności bierny transport nośnikowy, zwany też dyfuzją ułatwioną.

Nośnikowy transport bierny, jak każdy transport bierny, odbywa się bez dostarczania energii. Koncepcja nośników powstała w celu wyjaśnienia odstępstwa od prawa dyfuzji biernych procesów przenikania pewnych substancji. Glukoza ma np. pięć grup hydroksylowych, które mogą tworzyć wiązania wodorowe i wymaga przy

dyfuzji przez warstwę lipidową wysokiej energii aktywacji wynoszącej około 20 kcal/mol. Tymczasem wiadomo, że glukoza przenika przez błony różnych rodzajów z dużą łatwością wskazującą znacznie niższą energię aktywacji. Energia aktywacji dla procesu transportu glukozy przez błonę erytrocytów krwi ludzkiej wynosi np. około 4 kcal/mol, a więc jest 5-krotnie mniejsza od energii aktywacji transportu glukozy przez warstwę lipidową. W celu wyjaśnienia nieoczekiwanej dużej prędkości przenikania glukozy i pewnych innych substancji, jak również w celu wyjaśnienia obserwowanego zjawiska nasycenia strumieni tych substancji przy wysokich stężeniach oraz wysokiej selektywności dla pewnych substancji, założono istnienie nośników [18, 30]. Nośnikami są pewne substancje (do dzisiaj w ostateczny sposób niezidentyfikowane, choć w pewnych problemach ich istnienie wydaje się niewątpliwe) obecne tylko wewnątrz błony, które mogą się selektywnie wiązać z cząstkami przenikającymi, tworząc kompleksy. Kompleksy te charakteryzują się niższym współczynnikiem dyfuzji w błonie aniżeli substancja bez nośnika. Rozważmy jeden z możliwych modeli układu nośnikowego. W modelu tym zakładamy, że nośniki są ruchome i że przy jednej z powierzchni błony wiążą się z cząsteczkami substancji transportowej, tworząc kompleksy, które dyfundują przez błonę, następnie ulegają dysocjacji przy drugiej powierzchni błony. Cząsteczki substancji transportowanej przenikają na drugą stronę błony, a nośniki dyfundują z powrotem, gdzie znowu wiążą się z cząsteczkami substancji przenikającej (ryc. 1).



Ryc. 1.

S — substancja przenikająca, [S] — stężenie substancji S, C — nośnik

W stanie stacjonarnym wszystkie strumienie będą sobie równe: strumień wpływający substancji S, strumień kompleksów CS, strumień (w przeciwnym kierunku) swobodnych nośników C po dysocjacji kompleksów CS i strumień wypływającej substancji S. Można wykazać [12], że uwzględniając wszystkie te strumienie i ich bodźce otrzymujemy na produkcję entropii wyrażenie

$$(14) \quad \frac{dS}{dt} = I_s \Delta\mu_s,$$

gdzie I_s jest strumieniem substancji na zewnątrz błony, a $\Delta\mu_s$ — zewnętrzną różnicą potencjałów chemicznych substancji S.

Z termodynamicznego punktu widzenia układ ten charakteryzuje się więc jednym bodźcem. Zależność strumienia od bodźca można przedstawić za pomocą liniowej zależności fenomenologicznej wzorem

$$(15) \quad I_s = L \Delta\mu_s,$$

gdzie L jest współczynnikiem fenomenologicznym.

Ze względu na II zasadę termodynamiki i na warunek (12) z równania (14) wynika, że I_s i $\Delta\mu_s$ muszą mieć ten sam znak (gdyby bowiem miały różne znaki, ich iloczyn byłby ujemny, a więc mniejszy od zera), tzn. że bierny transport nośnikowy odbywa się w kierunku podyktowanym przez zewnętrzny bodziec.

Wszelkie informacje dotyczące nasycenia, specyficzności i selektywności transportu nośnikowego są zawarte we współczynniku fenomenologicznym L (równanie (15)) i nie mogą być uzyskane na drodze czysto termodynamicznej. Aby otrzymać pełne i jawne wyrażenie określające L , musimy dodatkowo wykorzystać model kinetyczny.

TRANSPORT AKTYWNY

Transport aktywny zachodzi na koszt energii metabolicznej, a substancja transportowana może poruszać się wbrew gradientowi potencjału elektrochemicznego. W dalszym ciągu przedyskutujemy podstawy fizyczne tego procesu i możliwość jego opisu w takich samych kategoriach, w jakich to zrobiliśmy poprzednio; nie będziemy natomiast zajmować się sprawami bardziej szczegółowymi, a przede wszystkim nie będziemy omawiać ani identyfikować nośników występujących również w tym procesie (a nie tylko w nośnikowym procesie biernym). Z termodynamicznego punktu widzenia podstawowa różnica między transportem biernym i aktywnym polega na tym, że w pierwszym z nich entropia transportowanych cząsteczek wzrasta, a w drugim — maleje. Transport bierny więc, ze względu na wzrost entropii, odbywa się samorzutnie, spontanicznie. Natomiast transport aktywny, w którym entropia cząsteczek maleje, wymaga dopływu energii z jakiegoś niezależnego źródła, zwykle z takiego źródła, jakim są reakcje metaboliczne. Wobec tego transport aktywny w biologicznych błonach może być określony jako przepływ dyfuzyjny sprzężony z chemicznym procesem metabolicznym. Jednakże według zasady Curie takie sprzężenie między wektorowym strumieniem dyfuzyjnym i skalarnym strumieniem chemicznym w układzie izotropowym jest niemożliwe. Jeśli więc weźmiemy pod uwagę układ, w którym występuje bodziec wektorowy w postaci różnicy ciśnień osmotycznych $\Delta\pi$ i bodziec skalarny w postaci powinowactwa chemicznego A oraz strumień dyfuzyjny I_D i strumień reakcji chemicznej I_r , to formalnie możemy napisać układ równań fenomenologicznych

$$(16) \quad \begin{aligned} I_D &= L_{DD}\Delta\pi + L_{Dr}A, \\ I_r &= L_{rD}\Delta\pi + L_{rr}A \end{aligned}$$

opisujących transport aktywny, gdzie L_{DD} , L_{Dr} , L_{rD} , L_{rr} są odpowiednimi współczynnikami fenomenologicznymi.

W układzie izotropowym, ze względu na zasadę Curie (ponieważ nie ma sprzężeń, więc muszą zanikać współczynniki krzyżowe) równania (16) sprowadzają się do postaci

$$\begin{aligned} I_D &= L_{DD}\Delta\pi, \\ I_r &= L_{rr}A, \end{aligned}$$

co wskazuje, że w ośrodku jednorodnym mogą istnieć jedynie dwa niezależne i nie oddziaływające ze sobą strumienie. Stąd należy wnosić, że gdyby błona komórkowa była tworem izotropowym, żadne procesy aktywne nie mogłyby w niej powstawać. Błona jednak jest układem anizotropowym, charakteryzującym się przestrzenną i strukturalną asymetrią. Z tego względu zasada Curie przestaje obowiązywać i w biologicznych błonach mogą istnieć sprzężenia między dyfuzją i reakcją chemiczną, tak jak wskazuje równanie (16). Równanie (16), podobnie jak wszystkie równania fenomenologiczne, związane jest ściśle z wyrażeniem (12), które w tym przypadku ma postać

$$(17) \quad \frac{dS}{dt} = I_D \Delta\pi + I_r A > 0.$$

Ostatnia nierówność prowadzi do ważnej konkluzji: strumień dyfuzyjny sprzężony z reakcją chemiczną może płynąć w kierunku przeciwnym do kierunku działania jego własnego bodźca. Powierzchowne rozumowanie wskazuje, że strumienie i skojarzone z nimi bodźce mają zawsze ten sam kierunek. Jest to prawdą, ale tylko dla układów, w których występuje jeden zasadniczy bodziec, tak jak to jest np. w przypadku biernego transportu nośnikowego. W tym biernym procesie, jak wynika z wyrażenia (15), dodatni bodziec $\Delta\pi$ wywołuje powstanie dodatniego strumienia I_D , a ujemny bodziec $\Delta\pi$ prowadzi do powstania ujemnego strumienia I_D . Natomiast w układzie, w którym działają dwa bodźce, jak to wskazuje równanie (17), nie istnieje konieczność, aby równocześnie obydwie wyrazy były dodatnie. Jedynie suma obydwu wyrazów musi być większa od 0. Wobec tego jeden z wyrazów może być ujemny, jeśli tylko ten drugi jest dodatni na tyle, że zapewnia dodatnią wartość sumy. Jeśli więc wartość wyrazu metabolicznego $I_r A$ jest dostatecznie duża, to iloczyn $I_D \Delta\pi$ może być ujemny (co oznacza, że kierunki I_D i $\Delta\pi$ są różne) i tym samym może zmniejszać entropię. Ta obserwacja stanowi fizyczną podstawę wyjaśniającą niezrozumiałą dawniej właściwość aktywnego transportu, a mianowicie możliwość przenoszenia się substancji w kierunku od niższego potencjału elektrochemicznego do wyższego potencjału elektrochemicznego i utrzymywanie się różnic tych potencjałów między wnętrzem żywej komórki i ośrodkiem.

Tak więc błona ze względu na swą asymetrię jest odpowiedzialna za sprzężenia między reakcjami metabolicznymi i aktywnym transportem i w konsekwencji jest odpowiedzialna za podstawowe procesy życiowe.

UWAGI KOŃCOWE

W przedstawionym przeglądzie pokazano w prosty sposób możliwości opisu procesów transportu substancji przez błony biologiczne. Wszystkie omówione procesy związane są z dyfuzją, na którą mogą się nakładać różnorodne wpływy.

W najprostszym przypadku możemy rozważać prostą dyfuzję; w innych przypadkach — dyfuzję związaną z wpływem pola elektrycznego (elektrodyfuzja), z wpływem ciśnienia hydrostatycznego (filtracja), z biernym oddziaływaniem z nośnikami (bierny transport nośnikowy), z wpływem reakcji chemicznej (transport aktyw-

ny). Możliwe są oczywiście i inne kombinacje wzajemnych powiązań. Ponadto, na co wskazują równania fenomenologiczne, istnieją powiązania wzajemne między różnorodnymi strumieniami występującymi w układzie.

Wprowadzone uproszczenia mają różny charakter i różne przyczyny. Podejście termodynamiczne np. zostało tu ograniczone do termodynamiki liniowej procesów nieodwracalnych, co jest stosowne przy opisie procesów bliskich stanom równowagi. W ogólności należy jednak rozpatrywać również procesy odległe od takiego stanu. W takiej sytuacji należałoby wykorzystać formalizm nieliniowej termodynamiki procesów nieodwracalnych, w którym m. in. współczynniki fenomenologiczne nie są na ogół wielkościami stałymi.

Rozważane przez nas równania fenomenologiczne podają pewne ogólne prawidłowości; przejście jednak do przypadków szczegółowych natrafia na ogół na poważne trudności. Wynika to przede wszystkim stąd, że w konkretnych sytuacjach wymagana jest znajomość wartości współczynników fenomenologicznych, które związane są z właściwościami błony. Znajomość ich jest jednak niedostateczna. Model błony zaproponowany przez Daniellego i Davsona [16, 17] był w latach następnych wielokrotnie modyfikowany. Poszukiwania modelu, który by mógł zdać sprawę z wszelkich efektów związanych z przenikaniem, trwają nadal. W szczególności nie wiadomo na pewno czy błona stanowi układ ciągły, czy też zawiera nieciągłości w postaci por. Za ostatnią koncepcją przemawiają m. in. dane dotyczące transportu wody [11, 25], jak również badania oddziaływań między lipidami i białkami w błonie [27, 28, 29, 32]. Średnica hipotetycznych por nie przekracza zapewne 10 \AA , a więc transport cząstek byłby hamowany oddziaływaniem ze ściankami por [17]. Z tego względu należałoby uwzględnić różnorodne efekty lepkościowe. Bardzo małe rozmiary por sugerują występowanie w nich wody w zmienionym stanie, mianowicie wody związanej, o właściwościach odmiennych od właściwości wody wolnej [13, 16]. Przeczą temu z kolei m. in. badania [9, 21] wskazujące na znikome ilości wody związanej w żywych komórkach. Ściany kanałów, według koncepcji Passowa [20], wyłożone są związanym ładunkiem elektrycznym, co istotnie wpływa na transport elektrolitów; krytyczne uwagi na ten temat zawarte są m. in. w [6, 24]. Najbardziej chyba powszechnie przyjmuje się obecnie model dynamiczny błony [27], w którym zakłada się jej stale zachodzące zmiany strukturalne pod wpływem różnorodnych czynników. Niezależnie od istnienia względnie braku por w błonie, należy przy rozpatrywaniu zagadnień transportowych uwzględnić wpływ nie mieszających się warstw roztworu stykającego się z powierzchnią błony [4, 11]. Ponadto należy brać pod uwagę istotne różnice w budowie i w składzie chemicznym różnego rodzaju błon.

Wymienione tutaj niektóre z trudności wskazują na to, że pełniejszy opis transportu można będzie zrealizować po uzyskaniu nowych danych dotyczących budowy błon biologicznych. Nie należy jednak zapominać, że coraz doskonalsze opisy transportu pomagają również w zrozumieniu struktury błony i wskazują często kierunek badań eksperymentalnych. Ponadto należy podkreślić, że już obecnie znane zależności opisujące procesy transportu pozwalają lepiej zrozumieć te procesy oraz procesy i zjawiska pochodne.

LITERATURA

- [1] BARANOWSKI B., Nierównowagowa termodynamika w chemii fizycznej, PWN, Warszawa 1974.
- [2] DANIELLI J. F., DAVSON H., A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **5**: 495–508, 1935.
- [3] DAVSON H., DANIELLI J. F., Structure of plasma membranes, [w] *Permeability of natural membranes*, red. J. F. Danielli, Cambridge University Press, 1952.
- [4] GLASER R., Biophysical structure of the cell surface with regard to the regulation of transport processes, I Winter School on Biophysics of Membrane Transport, Szklarska Poręba, Poland, 18–27 II 1974, **3**: 163–208, 1974.
- [5] GOLDMAN D. E., Potential, impedance and rectification in membranes, *J. Gen. Physiol.*, **27**: 73, 1943.
- [6] GOMUŁKIEWICZ J., Wpływ parametrów fizykochemicznych ośrodka na stałą przenikania membrany erytrocytów dla anionów, *Z. N. Ak. Roln. we Wrocławiu*, **100**: 7–47, 1973.
- [7] DE GROOT S. R., MAZUR P., *Non-equilibrium thermodynamics*, J. Wiley, New York 1962.
- [8] GUMIŃSKI K., *Termodynamika procesów nieodwracalnych*, PWN, Warszawa 1962.
- [9] HASL G., PAULY H., Kalorische Eigenschaften des gebunden Wassers in Proteinlösungen, *Biophysik*, **7**: 283–249, 1971.
- [10] HOPE A. B., *Ion transport and membranes*, Butterworths, London 1971, p. 21–33.
- [11] HOUSE C. R., *Water transport in cells and tissues*, Arnold Publ., London 1974, p. 77–103.
- [12] KATCHALSKY A., CURRAN P. F., *Nonequilibrium thermodynamics in biophysics*, Harvard Univ. Press, Cambridge 1965.
- [13] KLOTZ J. M., SHIKAMA K., Nature of urea effects on anion binding by macromolecules, *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**: 551–557, 1968.
- [14] KOTYK A., JANAČEK K., *Cell membrane transport*, Plenum Press, New York and London 1970, p. 118–130.
- [15] LAKSHMINARAYANAI AH N., *Transport phenomena in membranes*, Academic Press, New York and London 1969, p. 104–118.
- [16] MALCEW N. A., O strukturnoi temperaturie žiwoi tkaniej, *Dokł. AN SSSR*, **156**: 695–697, 1964.
- [17] MANNING G. S., The use of molecular models in the analysis of the phenomenological coefficients of flow through membranes, I Winter School on Biophysics of Membrane Transport, Szklarska Poręba, Poland, 18–27 II 1974, **II**: 217–237, 1974.
- [18] NEAME K. D., RICHARDS T. G., *Elementary kinetics of membrane carrier transport*, Blackwell, Oxford, London, Edinburgh and Melbourne 1972.
- [19] ONSAGER L., Reciprocal relations in irreversible processes, I, *Phys. Rev.*, **37**: 405; II, *Phys. Rev.*, **38**: 2265, 1931.
- [20] PASSOW H., Passive ion permeability of the erythrocyte membrane, *Progress Biophys. Mol. Biol.*, **19**: 425–467, 1969.
- [21] PAULY H., Über den physikalisch-chemischen Zustand des Wassers und der Elektrolyte in der lebenden Zelle, *Biophysik*, **10**: 7–32, 1973.
- [22] PRIGOGINE J., *Introduction to the thermodynamics of irreversible processes*, Thomas, Springfield, Illinois, 1955.
- [23] PRZESTALSKI S., Termodynamiczny opis zjawisk transportu substancji przez błony, *Materiały III Seminarium Inst. Biologii Molekularnej UJ nt. Struktura i funkcje błon biologicznych*, Rabka, 17–29 II 1972, 157–170, 1972.
- [24] — On the mechanism of the phosphate ions permeation across the erythrocyte membrane, I Winter School on Biophysics of Membrane Transport, Szklarska Poręba, Poland, 18–27 II 1974, **III**: 333–350, 1974.
- [25] SOLOMON A. K., Characterization of biological membranes by equivalent pores, *J. Gen. Physiol.*, **51**: 335–364, 1968.

- [26] TEORELL T., Transport process and electrical phenomena in ionic membranes. [w] Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, I.A.N. Butler, J. T. Randal, Academic Press, New York 1953, III: 305-369.
- [27] WALLACH D. F. H., The plasma membrane: dynamic perspectives, genetics and pathology, Springer Verlag, London, New York, Heidelberg and Berlin 1972, p. 83-90.
- [28] WEHRLI E., MORSE P. D., Recombination of human erythrocyte apoprotein and lipid, J. Supramolecular Structure, 2: 71-78, 1974.
- [29] WEIBEL E. R., ZÄHLER P., Molekulare Struktur von Zellmembranen, Helv. Med. Acta, 6: 353-369, 1971.
- [30] WILBRANDT W., Carrier diffusion. [w] Biomembranes, Vol. 3, F. Kreuzer, I. F. G. Seegers, Plenum Press, New York and London 1972.
- [31] WIDDAS W. F., Inability of diffusion to account for placental glucose transfer in the sheep and consideration of the kinetic of possible carrier transport, J. Physiol., 118: 23, 1952.
- [32] WIŚNIEWSKI S., STANISZEWSKI B., SZYMANIK R., Termodynamika procesów nierównowagowych, PWN, Warszawa 1973.
- [33] ZÄHLER P., The structure of erythrocyte membrane. [w] Modern Problems of Blood Preservation, Int. Symp. Frankfurt a. M., 17-18 March 1969, Stuttgart 1974, p. 1-13.

Otrzymano: 8 luty 1975.

Przyjęto: 15 luty 1975.

Adres autora: ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przysyłać w dwu egzemplarzach zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron. Maszynopis powinien być jednostronny, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz numeracją stron. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie należy podać, przed tekstem, tytuł pracy, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony). Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, rys. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

- [1] Sachsenmayer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, *Exptl. Cell Res.*, 73: 41-48, 1972.
- [2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] *Histone and Nucleohistones*, red. D. M. P. Philips, Plenum Press. London, New York 1977, 60-64.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod rysunki powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Po tytule należy podać objaśnienia lub uwagę „objaśnienia w tekście”. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonania skrótów nie wpływających na treść pracy.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są wg ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 odbitek artykułu bezpłatnie.

Zamówienie na egzemplarze POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI przyjmuje ORWN PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki.

Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Instytucje państwowe, społeczne, zakłady pracy, szkoły itp., mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie w miejscowych Oddziałach i Delegaturach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Prenumeratorzy indywidualni mogą opłacać w urzędach pocztowych i u listonoszy lub dokonywać wpłat na konto NBP I OM Nr 1641-6-1025, RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki, ul. Hubska 8/14, 50-502 Wrocław (w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty).

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych, ul. Wronia 23, 00-840 W-wa, konto PKO Nr 1-6-100024.

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

Egzemplarze zdezaktualizowane można również nabyć w RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki, ul. Hubska 8/14, 50-502 Wrocław, konto NBP I OM Nr 1641-6-1025.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona - Ruch, 7 Krakowskie Przedmieście, 00-068 Warszawa, P. O. Box 101, POLAND.

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

Indeks 38703/36970

SPIS TREŚCI

J. HEPA, L. KOCHAŃSKI i J. STANOSEK, Naturalne glikokortykoidy a metabolizm komórki wątrobowej .	109
R. FARBISZEWSKI i K. WOROWSKI, Rola błony komórkowej w transformacji nowotworowej	131
S. WIĘCKOWSKI, Struktura błon tylakoidów	147
S. PRZESTALSKI, Opis zjawiska transportu przez błony biologiczne	165