

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1970

tom 16

nr 2

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

M. Jankowski

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1970
tom XVI
zeszyt 2

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

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

Komitet Redakcyjny
Redaktor — Zofia Lassota
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1970

Nakład 2,090 (1951+139)	Oddano do składania 24.I.1970 r.
Ark. wyd. 12,5 ark. druk. 10,5	Podpisano do druku w maju 1970 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w czerwcu 1970 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 136/70 K-43

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

ZOFIA TYNECKA*

Mechanizm działania penicyliny na komórkę bakteryjną

The Mechanism of Action of Penicillin on Bacterial Cell

The recent view on the mechanism of penicillin action on biosynthesis of bacterial cell wall is discussed.

Od czasu wykrycia penicyliny przez Fleminga (11) wiele uwagi poświęcono mechanizmowi jej działania na komórkę bakteryjną. Z wczesnego okresu badań pochodzą informacje dotyczące zmian morfologicznych i fizjologicznych, pojawiających się w komórce pod wpływem tego antybiotyku. Wykazano, że penicylina działa bakteriostatycznie i bakteriobójczo na drobnoustroje Gramdodatnie nie wywierając nawet w większych stężeniach działania na bakterie Gramujemne, z wyjątkiem rodzaju *Neisseria* (11). Stwierdzono ponadto, że penicylina jest bakteriobójcza tylko dla komórek znajdujących się w fazie wzrostu (18). Już w roku 1945 Duguid (9) przypuszczał, że pojawianie się „dziwnych” form bakterii pod wpływem penicyliny może być spowodowane utratą integralności struktury powierzchniowej komórki bakteryjnej. Wyosobnienie ściany komórkowej bakterii oraz badania nad jej strukturą i biosyntezą potwierdziły te przypuszczenia i zapoczątkowały okres intensywnych badań nad działaniem penicyliny na komórkę bakteryjną.

I. Ściana komórki bakteryjnej i wpływ penicyliny na jej biosyntezę

Ściana jest zewnętrzną strukturą komórki bakteryjnej, mającą istotne znaczenie dla jej normalnego funkcjonowania. Chroni wnętrze komórki, otoczone cienką błoną cytoplazmatyczną, przed wpływami środowiska oraz nadaje komórce charakterystyczny dla danego gatunku kształt. Budowa ściany komórkowej bakterii Gramdodatnich i Gramujemnych wykazuje zasadnicze różnice; niezależnie od tego spotyka się różnice wśród poszczególnych rodzajów czy gatunków. Podstawową strukturą ściany, wspólną dla wszystkich bakterii, jest wielkocząsteczkowy polimer

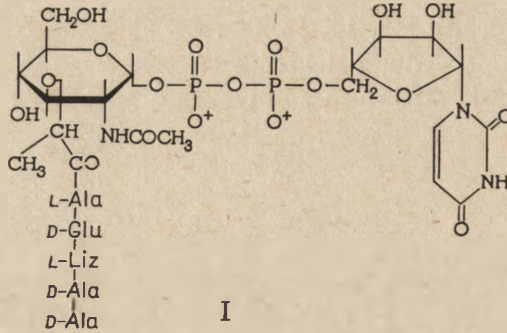
* Dr, Zakład Mikrobiologii, Akademia Medyczna, Lublin.

składający się z łańcuchów polisacharydowych, zawierających dwa aminocukry ułożone na przemian: N-acetyloglukozoaminę i kwas N-acetylmuraminowy, połączone wiązaniami glikozydowymi β -1,4 (44, 45). Z grupą -COOH kwasu muraminowego połączony jest krótki łańcuch peptydowy, składający się najczęściej z L- i D-alaniny, kwasu D-glutaminowego oraz L-lizyny lub jednego z izomerów kwasu dwuaminopimelinowego (53, 55). Łańcuchy te są połączone między sobą bezpośrednio, jak na przykład w *Escherichia coli* i *Micrococcus lysodeicticus*, lub za pomocą mostka peptydowego, jak w ścianach *Staphylococcus aureus* (16, 32). Kowalencyjnie powiązane komponenty podstawowego polimeru ściany tworzą trójwymiarową strukturę o silnej konstrukcji, charakteryzuje się ona dużą opornością mechaniczną przeciwstawiając się bardzo wysokiemu ciśnieniu (około 20 atmosfer) panującemu we wnętrzu komórki bakteryjnej. Uszkodzenie tej struktury prowadzi do zaburzenia funkcji błony cytoplazmatycznej i w konsekwencji do lizy komórki. Zaproponowano różne nazwy uwzględniające polisacharydowo-peptydowy charakter tego dotychczas nigdzie nie spotykanego polimeru: mukopeptyd (28), glikozaminopeptyd (7), peptydoglikan (60) oraz mureina przez analogię do proteiny (72).

W ścianach bakteryjnych znaleziono również inne polimery. U bakterii Gramdodatnich mukopeptyd stanowi zasadniczy element ściany (około 50—90%); obok niego występują kwasy teichojowe (6) oraz u niektórych bakterii kwasy teichuronowe (49). Ściany bakterii Gramujemnych mają nieco bardziej złożoną strukturę; charakteryzują się znaczną zawartością lipidów. Składają się z trzech warstw: lipoproteidowej, lipopolisacharydowej oraz mukopeptydowej, tzw. warstwy „R” (ang. *rigid*), stanowiącej zaledwie 5—15% (72).

Informacje o strukturze mukopeptydu pochodzą głównie z badań nad ścianą komórkową trzech mikroorganizmów — *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeicticus* oraz *Escherichia coli*. Strukturę tego polimeru określono na podstawie analizy produktów trawienia wyodrębnionych ścian za pomocą lizozymu, działającego na wiązanie β -1,4 pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozoaminą (13, 45, 47, 51, 52, 54). Stosowano w tym celu również inne enzymy bakteriologiczne, na przykład amidazę N-acetylmuramylo-L-alaniny i peptydazy rozrywające wiązania pomiędzy D-alaniną i mostkiem peptydowym, biorącym udział w zsięciu (14, 15, 35, 46, 58, 66). Mukopeptyd ścian *Escherichia coli* jest rozkładany przez lizozym na fragmenty o niskim ciężarze cząsteczkowym (43). Badanie struktury tych fragmentów wykazało, że są to głównie dwusacharydo-tetrapeptydy lub ich dimery (42, 47, 72). We i d e l i P e l z e r (72) sugerowali na podstawie tych wyników, że w ścianach *Escherichia coli* nie wszystkie reszty kwasu muraminowego są podstawione łańcuchami tetrapeptydowymi i tylko połowa tych jednostek peptydowych jest wzajemnie ze sobą połączona wiązaniami krzyżowymi. Dzięki temu struktura ściany tych bakterii jest luźna, co znajduje wyraz we wrażli-

(21, 41). Park i Strominger (41, 62) przypuszczali, że nukleotydy te są prekursorami ściany i gromadzą się wskutek zahamowania jej syntezy. W ślad za tym wzrosło zainteresowanie biosyntezą mukopeptydu *Staphylococcus aureus* jako modelu do badań nad mechanizmem działania

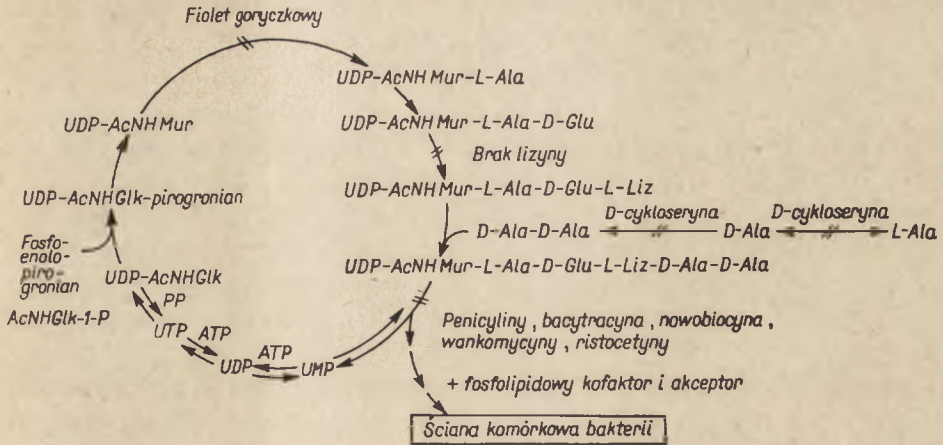


penicyliny. Przeprowadzono badania na całych komórkach (17, 27, 28, 67, 70, 73) i w układach izolowanych (1, 7, 19, 20, 22, 33, 34). Mukopeptyd ścian bakteryjnych jest syntetyzowany w łańcuchu reakcji przebiegających z udziałem około 30—50 enzymów (22). Mandelstam i Rogers (27, 28) oraz Hancock i Park (17) wykazali, że synteza tego polimeru może zachodzić w obecności chloramfenikolu, inhibitora syntezy białka. Rogers i Jeliaszewicz (48) ustalili, że stężenie penicyliny potrzebne do zahamowania syntezy mukopeptydu *Staphylococcus aureus* odpowiada stężeniu, w którym ustaje wzrost komórek. Biosynteza ściany *Staphylococcus aureus* przebiega w trzech etapach:

- 1) utworzenie prekursorów ściany: UDP-N-acetylmuramylo-pentapeptydu i UDP-N-acetyloglucozamininy,
- 2) utworzenie liniowych łańcuchów mukopeptydowych,
- 3) zsięciowanie liniowych łańcuchów mukopeptydowych.

Ito i Strominger (19, 20) przeprowadzili syntezę prekursorów ściany w układzie bezkomórkowym stosując częściowo oczyszczone enzymy z błon cytoplazmatycznych *Staphylococcus aureus* oraz zaproponowali mechanizm tej syntezy (schemat 2).

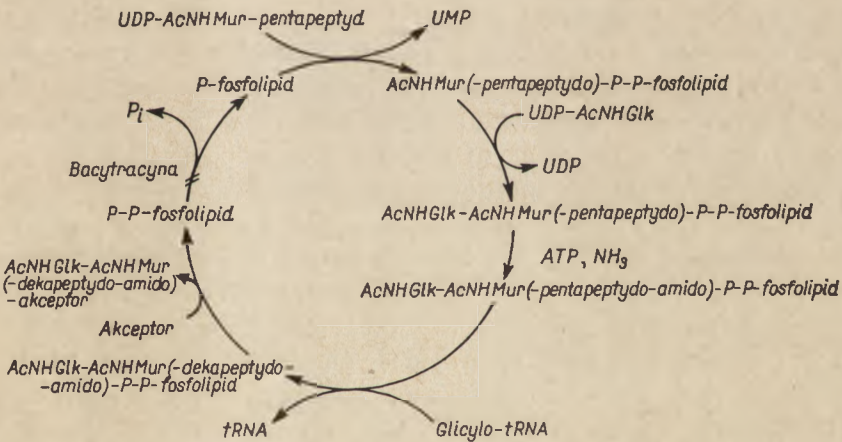
Reakcja fosforylacji prowadzi do utworzenia z UDP UTP. Następnie zachodzi aktywacja N-acetyloglucozamininy, z której tworzy się kwas UDP-N-acetylmuraminowy. Do tego związku kolejno przyłączają się aminokwasy. W dołączeniu dwupeptydu D-ala-D-ala bierze udział racemaza i syntetaza D-alaniny, dla których D-cykloseryna jest kompetycyjnym inhibitorem (36, 59). Aktywność wszystkich enzymów jest zależna od obecności ATP i kationów Mn^{2+} lub Mg^{2+} . Nie ma dotychczas dowodów uczestniczenia RNA w jakimkolwiek etapie syntezy pentapeptydu. Ostatecznym produktem reakcji pierwszego etapu jest UDP-N-acetylmuramylo-pentapeptyd zawierający jako końcową grupę -D-alanylo-D-alaninę.



Schemat 2. Biosynteza nukleotydowych prekursorów mukopeptydu ściany komórkowej *Staphylococcus aureus* według Stromingera i wsp. (60)

UDP-AcNHMur — kwas urydynodwufosfo-N-acetylmuraminowy
UDP-AcNHMur — kwas urydynodwufosfo-N-acetylmuraminowy

Drugi etap syntezy mukopeptydu badano również w układzie bezkomórkowym używając frakcji enzymatycznej z komórek *Staphylococcus aureus* i *Micrococcus lysodeicticus* (1, 2, 7, 33, 34, 63, 64). Z prekursorów mukopeptydu — UDP-N-acetylmuramylo-pentapeptydu i N-acetylglukozyaminy powstają liniowe łańcuchy mukopeptydowe (schemat 3) (1, 7, 34).



Schemat 3. Biosynteza liniowych łańcuchów mukopeptydowych ściany komórkowej *Staphylococcus aureus* według Stromingera i wsp. (60)

AcNHGlik — N-acetylglukozyamina AcNHMur — kwas N-acetylmuraminowy

W pierwszej reakcji następuje przeniesienie fosfo-N-acetylmuramylo-pentapeptydu z UDP-N-acetylmuramylo-pentapeptydu na obecny w membranie glicerofosfatydowy nośnik o charakterze kardiolipiny (60) i powstaje N-acetylmuramylo(-pentapeptydo)-P-P-fosfolipid (1, 3, 8)

oraz UMP i nieorganiczny fosforan (1, 2, 34). Część mukopeptydowa jest związana z lipidem za pomocą mostka pirofosforanowego. Jak wykazali Neuhaus i Struve (37, 63) reakcja ta jest odwracalna i po dodaniu UMP może być przesunięta w lewo. Na utworzony kompleks przenoszona jest z kolei N-acetyloglukozoamina z UDP-acetyloglukozaminy i powstaje dwusacharydo(-pentapeptydo)-P-P-fosfolipid z jednoczesnym uwolnieniem UDP (1, 65). Prawdopodobnie struktura dwusacharydu jest następująca: O-(acetylo- β -glukozoaminylo)-1,4(-N-acetylomuramylo)-pentapeptyd (39). W dalszym etapie grupa karboksylowa kwasu glutaminowego ulega amidacji w obecności ATP (46, 57, 61, 67), a następnie przyłącza się pięć reszt glicyny z glicylo-tRNA (3, 7, 33). W reakcji następnej dwusacharydo-pentapeptydo-pentaglicyna jest przenoszona z nośnika lipidowego na akceptor, którym jest najprawdopodobniej jeszcze niekompletny łańcuch oligomukopeptydowy (60). W reakcji tej uwalnia się nieorganiczny fosforan oraz fosfolipid, który jest zdolny do ponownego wejścia do cyklu.

Meadow i wsp. (34) oraz Anderson i wsp. (2) wykazali, że penicylina nie hamuje syntezy łańcuchów polisacharydowo-peptydowych w układzie bezkomórkowym. Ten etap jest hamowany przez bacytracynę, rystocetynę i wankomycynę. Dwa ostatnie antybiotyki hamują prawdopodobnie końcową reakcję syntezy — przeniesienie dwusacharydo-dekapeptydowych jednostek na akceptor (11), natomiast bacytracyna hamuje defosforylację P-P-fosfolipidu, wpływając w ten sposób na funkcjonowanie cyklu lipidowego nośnika (56).

Polimeryzacja prekursorów *in vitro* prowadzi do powstania produktu zawierającego dwie cząsteczki D-alaniny w peptydzie oraz otwarty łańcuch pentaglicynowy (1, 2, 70). Z badań nad strukturą mukopeptydu ściany *Staphylococcus aureus* wynika, że polimer ten zawiera tylko jedną cząsteczkę D-alaniny w peptydzie i niewielką ilość wolnych grup aminowych glicyny. Zatem w dalszym etapie syntezy, podczas zsięciowania liniowych łańcuchów mukopeptydowych musi zachodzić odłączenie jednej cząsteczki D-alaniny z równoczesnym zamknięciem się mostka pentaglicynowego. Ponieważ penicylina nie hamuje żadnej z reakcji prowadzących do syntezy tych liniowych łańcuchów mukopeptydowych, przypuszczano, że działa ona na etapie zsięciowania mukopeptydu. Po raz pierwszy taki pogląd wyraził Martin (30) opierając się na wynikach badań nad strukturą ścian komórek *Proteus mirabilis* oraz form L indukowanych za pomocą penicyliny. Ponieważ formy L wykazywały obecność wszystkich składników ściany, autor wysunął przypuszczenie, że przekształcenie się pałeczkowatych komórek *Proteus mirabilis* w kuliste formy jest wynikiem braku wiązań krzyżowych w mukopeptydzie syntetyzowanym w obecności penicyliny (31).

Wiese i Park (73) badali wpływ penicyliny na zsięciowanie liniowych łańcuchów mukopeptydowych w komórkach *Staphylococcus aureus* określając wbudowywanie ^3H -alaniny do ścian i oznaczając liczbę

wolnych grup aminowych ^{14}C -glicyny w mukopeptydzie. Syntetyzowany w obecności penicyliny mukopeptyd zawierał znacznie więcej cząsteczek D-alaniny i odpowiednio więcej wolnych grup aminowych glicyny. Badania te udowodniły, że wiązanie krzyżowe w ścianie *Staphylococcus aureus* tworzy się z udziałem końcowej cząsteczki D-alaniny i ϵ -aminowej grupy L-lizyny, a penicylina jest inhibitorem tej reakcji.

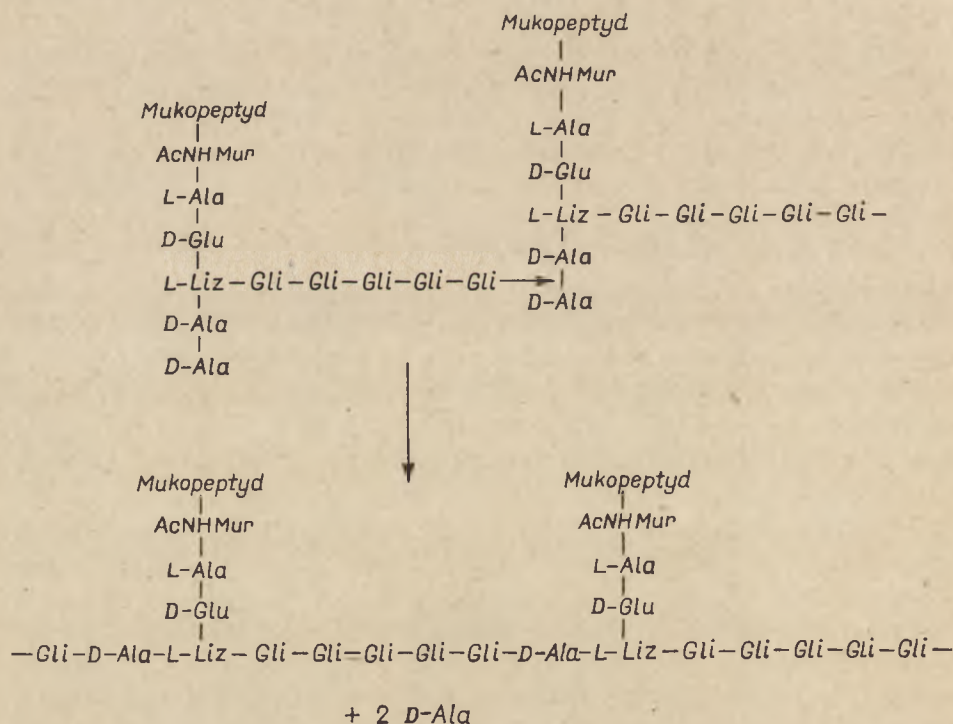
Badania nad wpływem penicyliny na biosyntezę ściany komórkowej *Staphylococcus aureus in vivo* prowadzili również Tipper i Strominger (67, 70). Na komórki działało penicyliną (0,08—20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), potem dodawano do nich ^{14}C -glicynę i inkubowano przez około 30 minut. Uzyskane po rozbiciu komórek ściany poddawano enzymatycznej hydrolizie, a następnie rozdzielano na kolumnie *Sephadex G-25*, uzyskując trzy frakcje: oligomerów, dimerów i monomerów. We frakcjach określano ilość ^{14}C -glicyny wbudowywanej do mukopeptydu. W obecności 0,086 μg penicyliny na 1 ml hodowli ilość ^{14}C -glicyny we wszystkich frakcjach stanowiła 50% ilości we frakcji z komórek kontrolnych. Procent ten jest jeszcze mniejszy przy stosowaniu większych stężeń penicyliny. Rozmieszczenie radioaktywności w poszczególnych frakcjach zależy od użytego stężenia penicyliny. W obecności 0,086 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicyliny około 50—60% ^{14}C -glicyny przechodziło do frakcji zawierającej monomery, wobec 10% w takiej samej frakcji z materiału kontrolnego. Ilość glicyny we frakcji oligomerów wynosiła 20—30%, a w kontroli 75%. Zaobserwowano odwrotną zależność między stężeniem penicyliny a ilością gromadzących się monomerów; najwięcej monomerów powstało, gdy stężenie penicyliny było niższe niż 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a najmniej w obecności 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Syntezę oligomerów penicylina częściowo hamuje już w małych stężeniach, a całkowicie w stężeniach 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i wyższych.

W toku dalszych badań Tipper i Strominger (70) przedstawili dowody, że niezsięciowane monomery są bezpośrednimi prekursorami mukopeptydu. Po 30 sekundach inkubacji komórek z ^{14}C -glicyną piętno odnajdowano wyłącznie w monomerach, a po 3 minutach już w oligomerach. Monomery, uzyskane zarówno z komórek inkubowanych w obecności penicyliny, jak i z komórek kontrolnych (zawierających normalnie około 7% monomerów), mają w pentapeptydzie trzy cząsteczki alaniny: jedną o konfiguracji L i dwie D. Jedna D-alanina ma wolną grupę karboksylową; ponadto w monomerze występują wolne grupy aminowe glicyny. Natomiast normalny polimer zawiera tylko jedną cząsteczkę D-alaniny i śladowe ilości wolnych grup aminowych glicyny. Badania Tippera i Stromingera (70) dowodzą bezspornie, że penicylina hamuje zsięciowanie liniowych łańcuchów mukopetydowych w komórkach *Staphylococcus aureus*. Pogląd ten potwierdzili Fitz-James i Hancock (10), którzy zaobserwowali w mikroskopie elektronowym włóknisty materiał — prawdopodobnie niezsięciowany mukopeptyd — tworzący się w punkcie wzrostu ściany komórkowej w obecności penicyliny. Również

Lark i wsp. (25) zauważyli podobny materiał w komórkach w obecności nadmiaru D-alaniny lub innych D-aminokwasów, a więc w warunkach, w których prawdopodobnie reakcja zsięciowania ulega odwróceniu.

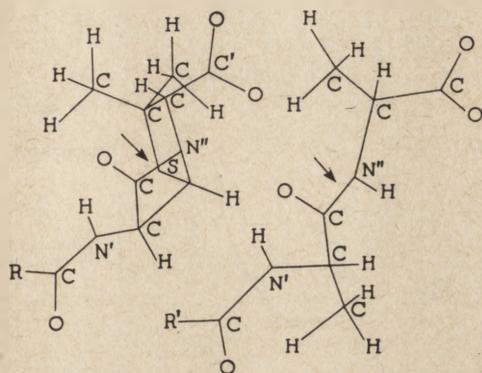
II. Mechanizm działania penicyliny na transpeptydację

Miejszem syntezy prekursorów ściany jest wewnątrz komórki (69). W drugim etapie syntezy ściany bierze udział fosfolipidowy nośnik, który przenosi poprzez błonę jednostki dwusacharydo-peptydowe i włącza je do powstającej ściany. Wszystkie etapy prowadzące do syntezy liniowych łańcuchów mukopeptydowych zachodzą przy udziale ATP oraz kationów Mn^{2+} i Mg^{2+} . Ostatni etap syntezy ściany — zsięciowanie liniowych łańcuchów mukopeptydowych — przebiega na zewnątrz błony cytoplazmatycznej. Ponieważ w tym obszarze nie mogą zachodzić wysokoenergetyczne reakcje z uwagi na brak ATP, przyjęto, że wiązanie peptydowe, prowadzące do zsięciowania mukopeptydu, powstaje wskutek transpeptydacji (73). Energia wiązania końcowej D-alaniny umożliwia przebieg tej reakcji. Reakcję transpeptydacji w komórkach *Staphylococcus aureus* (60) przedstawia schemat 4.



Schemat 4. Trzeci etap syntezy ściany komórkowej *Staphylococcus aureus* — transpeptydacja liniowych łańcuchów mukopeptydowych według Stromingera i wsp. (60)

Ustalając mechanizm hamowania transpeptydacji przez penicylinę brano pod uwagę analogię struktur penicyliny i fragmentu liniowego mukopeptydu (67,73). Na podstawie analizy modeli cząsteczkowych (rysunek 1) Tipper i Strominger (67) wysunęli hipotezę, że penicylina jest strukturalnym analogiem D-alanylo-D-alaniny, końcowego ugrupowania pentapeptydu w niez sieciowanym mukopeptydzie.

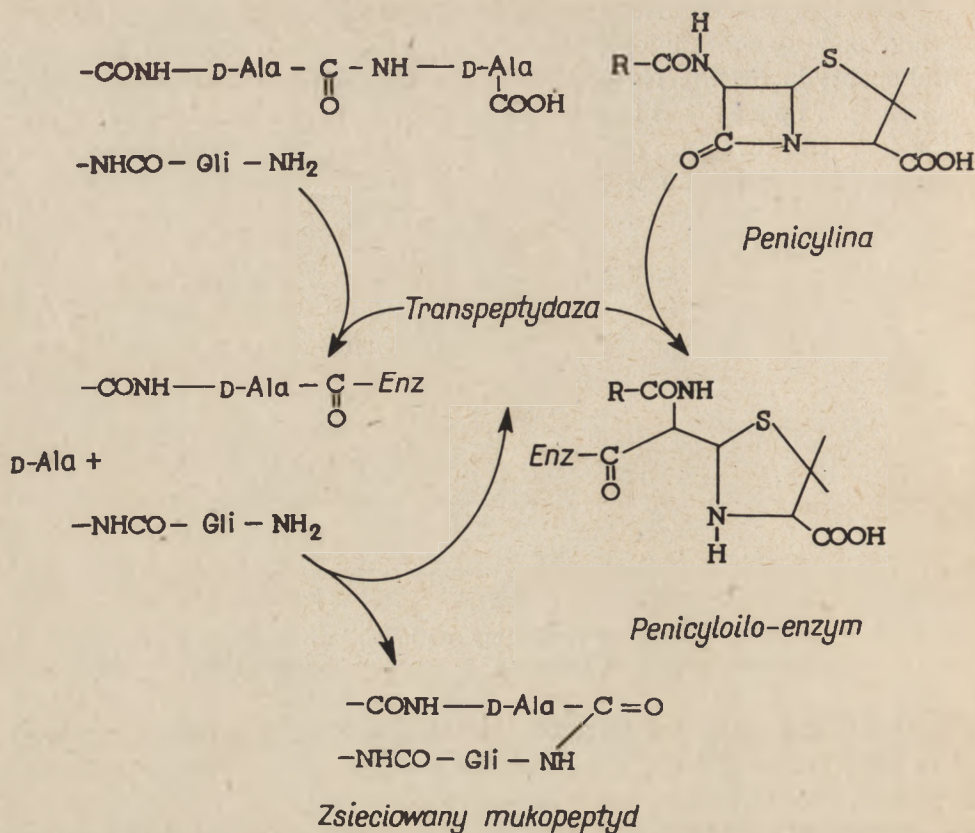


Rysunek 1. Modele przestrzenne penicyliny (na lewo) i dwupeptydu D-alanylo-D-alaniny według Tippera i Stromingera (67).

Penicylina jest wprawdzie cyklicznym dwupeptydem L-cysteiny i D-waliny, lecz modele cząsteczkowe penicyliny i D-alanylo-D-alaniny wykazują uderzające podobieństwo. Wysoce reaktywne wiązanie $-CO-N-$ w pierścieniu β -laktamowym penicyliny znajduje się w tej samej pozycji co wiązanie peptydowe, biorące udział w transpeptydacji. Tipper i Strominger (67) uważają, że penicylina, działając jako strukturalny analog normalnego substratu transpeptydacji, acyluje transpeptydazę katalizującą z sieciowanie mukopeptydu. Mechanizm hamowania transpeptydacji przez penicylinę w komórkach *Staphylococcus aureus* (67) przedstawiono na schemacie 5.

W pierwszym etapie transpeptydaza katalizuje rozerwanie wiązania peptydowego D-alanylo-D-alaniny z zachowaniem energii wiązania w kompleksie D-alanina-enzym. Następnie reszta D-alaniny zostaje przeniesiona na aminowy koniec łańcucha pentaglicynowego i mostek pentaglicynowy, łączący dwa łańcuchy peptydowe, zamyka się. Penicylina łącząc się z transpeptydazą acyluje wrażliwe miejsca enzymu, przy czym otwiera się pierścień β -laktamowy. Tworzy się kompleks penicylina-enzym, co prowadzi do zahamowania reakcji transpeptydacji.

Brano pod uwagę także możliwość innego sposobu działania penicyliny na transpeptydację. Przypuszczano, że penicylina może być przeniesiona z kompleksu penicylina-enzym do aminowego końca pentaglicyny, co uniemożliwiłoby syntezę wiązań krzyżowych. Jednak, jak wykazali Tipper i Strominger (70) niez sieciowane monomery, gromadzące



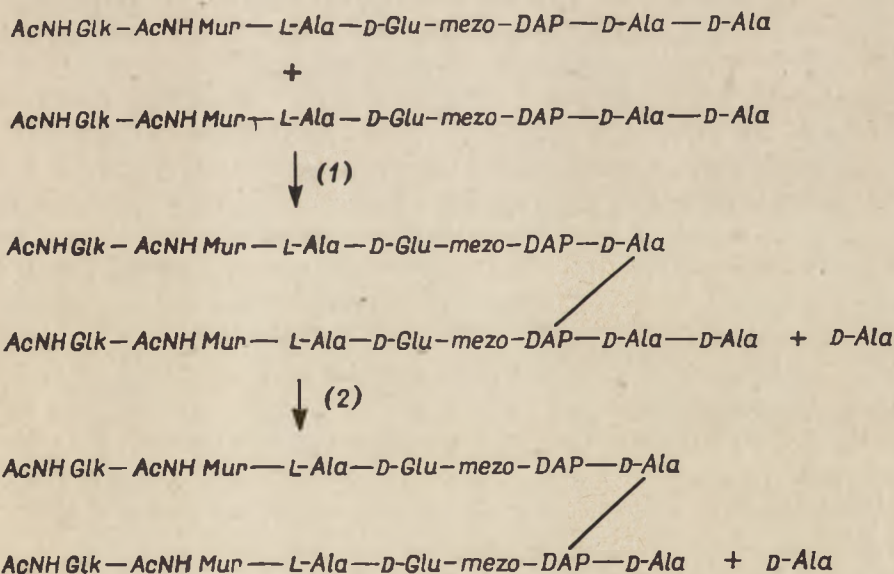
Schemat 5. Mechanizm hamowania transpeptydacji przez penicylinę według Tippera i Stromingera (67)

się w komórkach *Staphylococcus aureus* w obecności penicyliny, zawierają łańcuch glicynowy z wolną grupą aminową. Potwierdzono to analizując ściany komórek *Staphylococcus aureus* znakowane za pomocą ^{14}C -penicyliny G. Ściany te zawierały tylko około 0,3% wyjściowej radioaktywności. Ściany hydrolizowano lizozymem z *Chalaropsis spp.* i frakcjonowano na kolumnie *Sephadex G-25*. Niezsieciowane monomery stanowiły 32% całości mukopeptydu, lecz zawierały tylko 2% całej radioaktywności ściany, co stanowi około 0,004% wyjściowej radioaktywności. Pozostałe piętno związane było z materiałem o wysokim ciężarze cząsteczkowym. Ta niesłychanie mała ilość ^{14}C -penicyliny związanej z monomerami świadczy o niespecyficzności reakcji wiązania się penicyliny z grupą aminową łańcucha pentaglicynowego w niezsieciowanym monomerze.

Rogers i Tynecka (50) badali rozmieszczenie radioaktywności w komórkach *Staphylococcus aureus* inkubowanych w buforze fosforanowym w obecności ^{14}C -penicyliny. Znakowane komórki rozbijano mechanicznie i wirowano w ultrawirówce w gradiencie chlorku cezu. Otrzymano

pasma składające się z fragmentów błony cytoplazmatycznej i rybosomów, które zawierało około 90% wyjściowej radioaktywności. Pozostałe piętno odnajdowano w osadzie, składającym się z nierozbitych komórek. Frakcja ścian komórkowych nie zawierała ^{14}C . Wykluczono także możliwość wiązania się ^{14}C -penicyliny z rybosomami. Uzyskane wyniki świadczą, że receptory penicyliny znajdują się w błonie cytoplazmatycznej i są natury białkowej. Tipper i Strominger (70) nie badali wprawdzie wiązania się penicyliny z błoną cytoplazmatyczną komórek *Staphylococcus aureus*, wykazali jednak, że antybiotyk ten nie wiąże się ze ścianą komórkową. Ponieważ w błonie cytoplazmatycznej występuje wiele enzymów, istnieje pewna możliwość, że materiał białkowy wiążący ^{14}C -penicylinę jest właśnie enzymem katalizującym ostatni etap syntezy ściany. Nie udało się jednak dotychczas otrzymać *in vitro* zsięzionego mukopeptydu w układzie zawierającym frakcję enzymatyczną, uzyskaną z membran *Staphylococcus aureus*. Synteza ściany *in vitro* zawsze zatrzymywała się na etapie liniowych łańcuchów mukopeptydowych. Jest to o tyle niezrozumiałe, że taka sama frakcja uzyskana z błon cytoplazmatycznych *Escherichia coli* przez Izaki i wsp. (22, 23) oraz przez Araki i wsp. (4, 5) katalizowała syntezę zsięzionego mukopeptydu z UDP-N-acetylmuramylo-pentapeptydu i UDP-N-acetyloglucozaminu.

Zsięzowanie mukopeptydu ścian *Escherichia coli* zachodzi bezpośrednio między łańcuchami peptydowymi bez udziału dodatkowego aminokwasu wiążącego (72). Izaki i wsp. (22, 23) wykazali, że w końcowym



Schemat 6. Synteza zsięzionych dimerów w komórkach *Escherichia coli* katalizowana przez: 1) transpeptydazę mukopeptydową oraz 2) karboksypeptydazę D-alaniny

AcNHGlc — N-acetyloglucozamina; AcNHMur — kwas N-acetylmuraminowy

etapie syntezy mukopeptydu *in vitro* przebiega transpeptydacja z uwolnieniem jednej cząsteczki D-alaniny z łańcucha peptydowego. Równocześnie karboksypeptydaza D-alaniny odłącza końcową D-alaninę z sąsiedniego pentapeptydu. Tworzenie się zsięciowanych dimerów z liniowych łańcuchów polisacharydowo-peptydowych u *Escherichia coli* (23) przedstawia schemat 6.

Dimer składa się z dwóch jednostek dwusacharydo-czteropeptydowych. Łańcuch peptydowy każdej jednostki zawiera cztery aminokwasy w następującej sekwencji: L-Ala-D-Glu-mezo-DAP-D-Ala. Wiązanie krzyżowe biegnie od końcowej grupy karboksylowej jednego łańcucha peptydowego do grupy ϵ -aminowej kwasu dwuaminopimelinowego sąsiedniego łańcucha. Transpeptydacja może przebiegać w odwrotnym kierunku po dodaniu D-alaniny, innych D-aminokwasów lub glicyny i nie wymaga dodatkowego źródła energii. Odłączanie D-alaniny przez karboksypeptydazę utrudnia prawdopodobnie tworzenie się w ścianach *Escherichia coli* większych oligomerów niż dimery (72). W komórkach *Styphylcoccus aureus* nie zawierających karboksypeptydazy D-alaniny, stwierdza się obecność wyższych oligomerów, prawdopodobnie dekamerów (70). G h u y s e n i S t r o m i n g e r (14) oraz W e i d e l i P e l z e r (72) uważają, że karboksypeptydaza odłącza D-alaninę na jednym z etapów poprzedzających syntezę liniowych łańcuchów mukopeptydowych. Substratem dla tego enzymu jest prawdopodobnie UDP-N-acetylmuramylo-pentapeptyd (23). Podczas wyodrębniania i oczyszczania karboksypeptydazy D-alaniny z komórek *Escherichia coli* I z a k i i S t r o m i n g e r (24) wykryli inny enzym — karboksypeptydazę D-alaniny II, która odłącza cząsteczkę D-alaniny z UDP-N-acetylmuramylo-tetrapeptydu.

Badając wpływ penicylin i cefalosporyn na syntezę mukopeptydu *in vitro* I z a k i i w s p. (23) zaobserwowali, że antybiotyki te hamują uwalnianie się D-alaniny. W obecności penicyliny G i cefalotyny ilość D-alaniny w mukopeptydzie podwaja się, w obecności innych penicylin, penbrytyny i metycyliny hamowaniu uwalniania D-alaniny nie towarzyszyło istotne zwiększanie się ilości D-alaniny w produkcie. I z a k i i w s p. (23) badali własności fizykochemiczne normalnego produktu oraz produktu syntetyzowanego w obecności penicyliny. Po naniesieniu na bibułę produkt tworzący się w obecności penicyliny, w odróżnieniu od normalnego mukopeptydu, można wymywać wodą lub rozcieńczonym HCl. Po ogrzewaniu wodnego roztworu normalnego produktu 75% związku sedymentowało podczas wirowania w 1000 g równocześnie ze zdenaturowanym białkiem. Natomiast około 80—90% produktu syntetyzowanego w obecności penicyliny pozostawało w roztworze.

I z a k i i w s p. (23) wykazali, że penicylina hamuje transpeptydazę nieodwracalnie, natomiast karboksypeptydazę D-alaniny odwracalnie; aktywność enzymu można przywrócić działając penicylinazą lub wymywając penicylinę. Transpeptydazę penicylina hamuje w takich stężeniach jakie

hamują wzrost komórek (22, 23), natomiast karboksypeptydazę D-alaniny w stężeniach znacznie niższych od tych. Wydaje się więc, że bakterioobójcze działanie penicyliny nie jest związane z hamowaniem karboksypeptydazy. I z a k i i S t r o m i n g e r (24) podkreślają, że fakt ten, jak również niewrażliwość karboksypeptydazy D-alaniny II na penicylinę, jest pewnym potwierdzeniem, że penicylina jest strukturalnym analogiem acylo-D-alanylo-D-alaniny, ponieważ działa w sposób specyficzny tylko na transpeptydazę. Analiza ścian komórkowych bakterii hodowanych w obecności dostatecznie niskich stężeń penicyliny, które hamując karboksypeptydazę nie inaktywowałyby transpeptydazy — pozwoli, być może, na poznanie znaczenia tego enzymu dla życia komórki.

W świetle przedstawionych badań należy przyjąć, że penicylina hamuje ostatni etap biosyntezy ściany bakteryjnej — zsięciowanie liniowych łańcuchów mukopeptydowych. Pogląd ten jest dostatecznie udokumentowany zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. W obecności małych stężeń penicyliny wzrost komórek *Staphylococcus* odbywa się przez jakiś krótki okres czasu i wtedy gromadzą się niezsięciowane monomery — bezpośrednie prekursory ściany (70). Dalsza inkubacja prowadzi do lizy komórek, ponieważ pozbawiona wiązań krzyżowych ściana nie stanowi dostatecznej ochrony dla błony cytoplazmatycznej.

Rozważając mechanizm hamowania syntezy ściany przez penicylinę należy podkreślić, że hipoteza Tippera i Stromingera (67) jest na obecnym etapie badań przekonująca. Wydaje się, że wyodrębnianie i oczyszczenie transpeptydazy z komórek *Staphylococcus aureus* pozwoli na całkowite wyjaśnienie mechanizmu działania penicyliny na biosyntezę ściany komórkowej.

LITERATURA

1. Anderson J. S., Matsuhashi M., Haskin M. A., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 881 (1965).
2. Anderson J. S., Meadow P. M., Haskin M. A., Strominger J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 487 (1966).
3. Anderson J. S., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 516 (1965).
4. Araki Y., Shimada A., Ito E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 518 (1966).
5. Araki Y., Shimai R., Shimada A., Ishimoto N., Ito E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 466 (1966).
6. Armstrong J. J., Baddiely J., Buchanan J. C., Carss B., Greenberg G. R., *J. Chem. Soc. str.* 4344 (1958).
7. Chatterjee A. N., Park J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 9 (1964).
8. Dietrich C. P., Matsuhashi M., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 619 (1965).
9. Duguid J. P., *Edinburgh Med. J.* **53**, 401 (1945).

10. Fitz-James P., Hancock R., *J. Cell. Biol.* **26**, 657 (1965).
11. Fleming A., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **10**, 226 (1929).
12. Ghuysen J. M., Leyh-Bouille M., Dierickx L., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 286 (1962).
13. Ghuysen J. M., Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 462 (1960).
14. Ghuysen J. M., Strominger J. L., *Biochemistry* **2**, 1110 (1963).
15. Ghuysen J. M., Tipper D. J., Birge C. H., Strominger J. L., *Biochemistry* **4**, 2245 (1965).
16. Ghuysen J. M., Tipper D. J., Strominger J. L., Abstr. VI Int. Congr. Biochem. New York, str. 508, 1964.
17. Hancock R., Park J. T., *Nature* **181**, 1050 (1958).
18. Hobbey G. L., Meyer K., Chafee E., *Proc. Soc. Exptl. Bioch. Med.* **50**, 281 (1942).
19. Ito E., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2689 (1962).
20. Ito E., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2696 (1962).
21. Ito E., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **239**, 210 (1964).
22. Izaki K., Matsushashi M., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 656 (1966).
23. Izaki K., Matsushashi M., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3180 (1968).
24. Izaki K., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3193 (1968).
25. Lark C., Bradley D., Lark K. G., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 278 (1963).
26. Lederberg J., *Bacteriol.* **73**, 144 (1957).
27. Mandelstam J., Rogers H. J., *Nature* **181**, 956 (1958).
28. Mandelstam J., Rogers H. J., *Biochem. J.* **72**, 654 (1959).
29. Mandelstam J., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 466 (1961).
30. Martin H. H., *J. Gen. Microbiol.* **36**, 441 (1964).
31. Martin H. H., Proc. 6th Intern. Congr. Biochem., New York, str. 518 (1964).
32. Martin M. K., Sword C. P., *Bacteriol. Proc.* **29**, (1963).
33. Matsushashi M., Dietrich C. P., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 587 (1965).
34. Meadow P. M., Anderson J. S., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 382 (1964).
35. Munoz E., Ghuysen J. M., Leyh-Bouille M., Petit J. F., Heymann H., Bricas E., Lefrancier P., *Biochemistry* **5**, 3748 (1966).
36. Neuhaus F. C., Lynch J. L., *Biochemistry* **3**, 471 (1964).
37. Neuhaus F. C., Struve W. G., *Biochemistry* **4**, 120 (1965).
38. Park J. T., *J. Biol. Chem.* **194**, 877, 885, 897 (1952).
39. Park J. T., 16th Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge, XVI, 1966.
40. Park J. T., Johnson M., *J. Biol. Chem.* **179**, 585 (1949).
41. Park J. T., Strominger J. L., *Science* **125**, 99 (1957).
42. Pelzer H., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 229 (1962).
43. Pelzer H., Maass D., Weidel W., *Naturwissenschaften* **50**, 722 (1963).
44. Perkins H. R., *Biochem. J.* **74**, 182 (1960).
45. Perkins H. R., Rogers H. J., *Biochem. J.* **72**, 647 (1959).
46. Petit J. F., Munoz E., Ghuysen J. M., *Biochemistry* **5**, 2764 (1966).
47. Primosigh J., Pelzer H., Maass D., Weidel W., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 68 (1961).
48. Rogers H. J., Jeliaszewicz J., *Biochem. J.* **81**, 576 (1961).
49. Rogers H. J., Perkins H. R., Cell Walls and Membranes, E. and F. N. Spon Ltd., Londyn, 1968.
50. Rogers H. J., Tynecka Z., w druku

51. Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 495 (1956).
52. Salton M. R. J., Proc. 2nd Symposium on Fleming Lysozyme, Milan, 1961.
53. Salton M. R. J., *The Bacterial Cell Wall*, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam, Londyn, New York, 1964.
54. Salton M. R. J., Ghuysen J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 552 (1959).
55. Salton M. R. J., Pavlik J. G., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 398 (1960)
56. Siewert G., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 767 (1967).
57. Siewert G., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 783 (1968).
58. Strominger J. L., Ghuysen J. M., *Science* **156**, 213 (1967).
59. Strominger J. L., Ito E., Threnn R. H., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 998 (1960).
60. Strominger J. L., Izaki K., Matsubashi M., Tipper D. J., *Federation Proc.* **26**, 9 (1967).
61. Strominger J. L., Matsubashi M., Anderson J. S., Dietrich C. P., Meadow P. M., Katz W., Siewert S., Gilbert J. M., *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1966.
62. Strominger J. L., Park J. T., Thompson R. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 3263 (1959).
63. Struve W. G., Neuhaus F. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 6 (1965).
64. Struve W. G., Sinha R. K., Neuhaus F. C., *Biochemistry* **5**, 82 (1966).
65. Tipper D. J., *Federation Proc.* **25**, 344 (1966).
66. Tipper D. J., Ghuysen J. M., Strominger J. L., *Biochemistry* **4**, 468 (1965).
67. Tipper D. J., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1133 (1965).
68. Tipper D. J., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 48 (1966).
69. Tipper D. J., Strominger J. L., Ensign J. C., *Biochemistry* **6**, 906 (1967).
70. Tipper D. J., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3169 (1968).
71. Weibul C., *J. Bacteriol.* **66**, 688 (1953).
72. Weidel W., Pelzer H., *Advan. Enzymol.* **26**, 193 (1964).
73. Wiese E. M. Jr., Park J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 75 (1965).

BOGDAN SZUKALSKI*

Metabolizm i mechanizmy regulujące sekrecję aldosteronu

Metabolism and Regulation of Secretion of Aldosterone

Biosynthesis and catabolism of aldosterone and mechanisms regulating the secretion of this hormone are presented and discussed.

W roku 1940 Swann (100) wysunął hipotezę, że warstwa kłębkowa kory nadnerczy wytwarza substancję biologicznie czynną, regulującą gospodarkę elektrolitami w ustroju. Doniósł on również, że usunięcie przysadki mózgowej nie wpływa na sekrecję tej substancji przez nadnercza. W 10 lat później Deming i Luetscher (23) stwierdzili, że ekstrakt sterydów otrzymany z moczu ludzi cierpiących na obrzęki, powoduje retencję sodu u szczurów pozbawionych nadnerczy. Podobne działanie wykazywała tzw. „bezpostaciowa frakcja” wyciągu z kory nadnerczy, stanowiąca pozostałość po krystalizacji znanych związków sterydowych. Jej badaniem zajęli się w roku 1950 Simpson i wsp. (93, 94), którzy używając bardzo nowoczesnych wówczas metod: chromatografii bibułowej i techniki izotopowej, wykonali szereg znakomitych prac analitycznych, zakończonych w roku 1953 wyodrębnieniem czystego aldosteronu (I). W następnym roku zespół Reichsteina (95, 96) ustalił strukturę aldosteronu, który w odróżnieniu od innych naturalnych sterydów zawiera grupę aldehydową. Wykrycie tej grupy było utrudnione, gdyż tworzy ona z grupą hydroksylową w pozycji 11 wiązanie półacetalowe (II), maskujące jej właściwości.

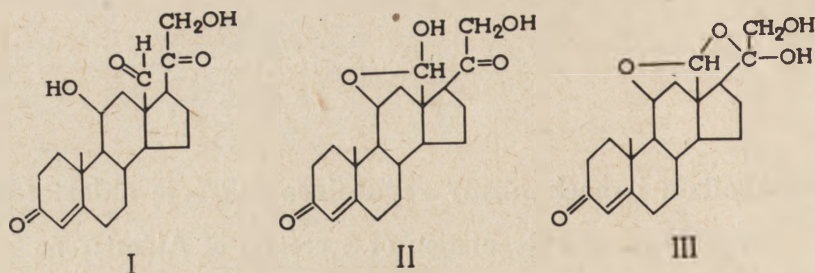
Grupa hydroksylowa przy C-18 może ponadto tworzyć półketal z grupą ketonową przy C-20 (III) (patrz wzory str. 170).

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki te osiągnięto w stosunkowo krótkim czasie używając zaledwie 57 mg krystalicznego aldosteronu, otrzymanego z 1000 kg nadnerczy wołowych. Większość reakcji degradacji przy ustalaniu struktury aldosteronu przeprowadzono na 10 mg, a nawet mniejszych próbkach substancji, co stanowi swego rodzaju rekord i świadczy o mistrzostwie ekipy Reichsteina.

* Doc. dr habil., Zakład Biologii, Instytut Farmaceutyczny, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: ACTH — hormon adrenokortykotropowy; DOC — dezoksykortykosteron albo kortekson; THAlDo — czterohydroaldosteron; THA — czterohydro-11-dehydrokortykosteron; 18-hydroksy-THA — 18-hydroksyczterohydro-11-dehydrokortykosteron.

Ostatnim akordem badań strukturalnych, stanowiącym piękne potwierdzenie prawdziwości wzoru ustalonego przez Reichsteina, była pełna



synteza aldosteronu, wykonana w 1955 roku przez Schmidlina i wsp. (87, 114).

Aldosteron jest hormonem uczestniczącym w regulacji gospodarki wodno-mineralnej ustroju. Podany w ilości 0,5—2 mg/dobę wywołuje retencję sodu, a tym samym wzrost ilości płynu w zbiorniku pozakomórkowym, obniża zawartość jonów potasowych w tkankach i w osoczu oraz zwiększa wydalanie tych kationów z moczem.

Wpływ aldosteronu na gospodarkę mineralną ustroju jest około 500 razy silniejszy od kortyzolu i około 100 razy od korteksonu, a zatem uzyskanie efektu wywieranego przez 200 μ g aldosteronu (tyle wynosi jego sekrecja dobowa u człowieka) wymagałoby użycia 100mg kortyzolu. Aldosteron wpływa również na przemianę węglowodanową, ale trzykrotnie słabiej niż kortyzol.

I. Biosynteza aldosteronu

W celu poznania prekursorów aldosteronu wykonano w latach 1955—1964 wiele doświadczeń (3, 11, 25, 74, 117), w których inkubowano nadnercza z różnymi związkami sterydowymi, uczestniczącymi w biosyntezie innych hormonów kory nadnercza. Okazało się, że homogenaty i skrawki nadnerczy wołu i żaby mogą przeprowadzać biosyntezę aldosteronu z progesteronu (IV), korteksonu (V) i kortykosteronu (VI) (schemat 1). Doniesiono również o istnieniu innych prekursorów aldosteronu. K a h n t i wsp. (48) otrzymali 18-hydroksykortekson (VII) przez inkubację korteksonu z homogenatami nadnerczy wołu, a P e r o n (78) wyodrębnił go z nadnerczy szczura oraz po inkubacji nadnerczy z progesteronem. D o m i n g u e z i wsp. (24) po inkubacji progesteronu lub korteksonu z nadnerczami szczura wyodrębnili ze środowiska inkubacyjnego 18-aldokortekson (VIII). T r a v i s i F a r r e l l (102), którzy inkubowali nadnercza wołu z progesteronem, korteksonem i kortykosteronem, znakowanymi 14 C, uzyskali dla progesteronu najwyższy procent przemiany w aldosteron. Znakowany 18-hydroksykortykosteron otrzymano w wyniku

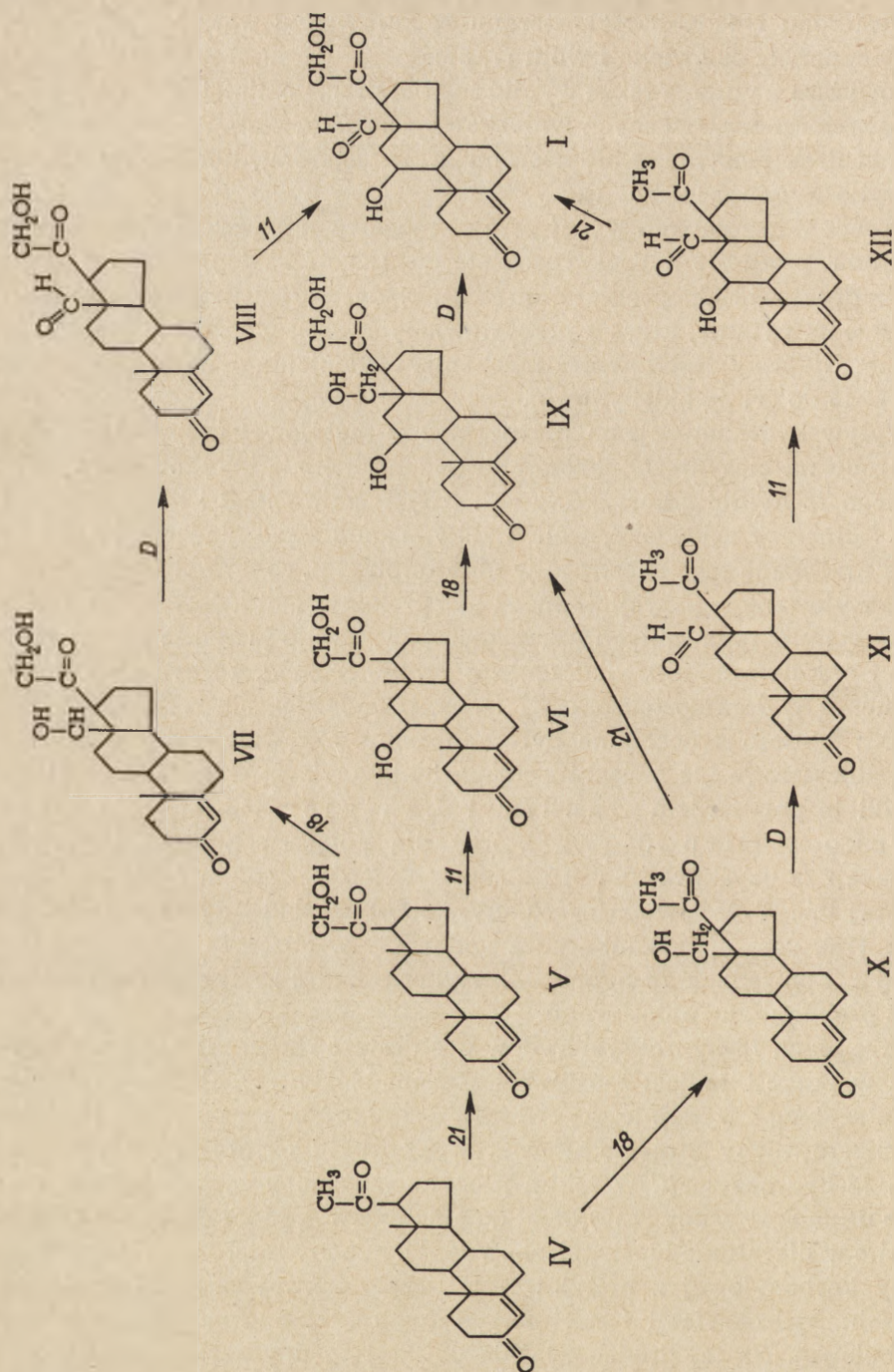
inkubacji $17\text{-}^3\text{H}$ -progesteronu z nadnerczami szczura (77, 78) oraz $4\text{-}^{14}\text{C}$ -progesteronu i $4\text{-}^{14}\text{C}$ -kortykosteronu ze skrawkami warstwy kłębkowej kory nadnerczy człowieka i wołu (7, 86).

Powyższe wyniki, a także wyniki innych prac, pominiętych tu, ale prowadzących do analogicznych wniosków, pozwalają zestawić schemat możliwych dróg biosyntezy aldosteronu z progesteronu, korteksonu (DOC) i kortykosteronu (schemat 1).

Oprócz wspomnianych wyżej przejść możliwa jest jeszcze droga z progesteronu przez 18-hydroksyprogesteron (X), 18-aldoprogesteron (XI) i 11-hydroksy-18-aldoprogesteron (XII). Nadal jednak trudno jest odpowiedzieć na pytanie, która z przedstawionych dróg biosyntezy jest drogą główną. Niejasny jest również mechanizm utleniania grupy alkoholowej przy C-18 do grupy aldehydowej.

Wpływ hydroksylacji angularnej grupy metylowej przy C-13 kortykosteronu na biosyntezę aldosteronu badano metodą inkubowania syntetycznego 18-hydroksykortykosteronu (IX) ze skrawkami i homogenatami kory nadnerczy człowieka, wołu i żaby. Zanotowano niewielką, ale wyraźną przemianę tego substratu w aldosteron (70), co dowodzi, że sterydy hydroksylowane w pozycji 18 mogą być prekursorami aldosteronu. Z kortykosteronu w tych samych warunkach powstawało jednakże 17—81 razy więcej aldosteronu. Doświadczenia z progesteronem, 18-hydroksyprogesteronem (X) oraz korteksonem i 18-hydroksykorteksonem dały podobne wyniki: 18-dezoksypochodne były znacznie efektywniejszymi prekursorami aldosteronu niż związki z grupą hydroksylową w pozycji 18 (108). Wyniki te potwierdzili Sandor i Lanthier (85, 86) oraz Stachenko i Giroud (99), którzy dla połączeń hydroksylowanych w pozycji 18 uzyskiwali bardzo niską wydajność przemiany, nie przekraczającej 1%. Wyższą wydajność (3,8% i 10%) uzyskał jedynie Pasquallini (73), używając tkankę guza nadnerczy w obecności NAD. Nie porównywał on jednak 18-hydroksykortykosteronu z kortykosteronem i innymi prekursorami aldosteronu.

Przemiana 18-hydroksysterydów w aldosteron wskazuje, że hydroksylacja w pozycji 18 jest możliwym etapem biosyntezy aldosteronu. Jednakże szybsze i wydajniejsze tworzenie się hormonu z połączeń 18-dezoksy sugerowałoby istnienie alternatywnej drogi biosyntezy, nie wymagającej 18-hydroksylacji. W takim procesie musiałoby zachodzić jednoetapowe utlenianie grupy metylowej do aldehydowej, które dotąd nie zostało opisane w literaturze biochemicznej. Jedyne znany mechanizm biosyntezy grupy karbonylowej z metylowej lub metylenowej zachodzi w dwóch etapach: hydroksylacji i następującego po niej odwodorowania grupy alkoholowej. Na tej drodze właśnie powstają grupy karbonylowe sterydów, których biosyntezę już w pełni wyjaśniono. Przyjęcie hipotezy o innym mechanizmie powstawania grupy aldehydowej aldosteronu byłoby zatem ryzykowne.



Schemat 1. Drogi biosyntezy aldosteronu

Cyfry nad strzałkami oznaczają atomy węgla w pierścieniu ulegające hydroksylacji.; D oznacza działanie 18-hydroksydehydrogenazy

Bardziej prawdopodobną przyczyną zaobserwowanych faktów jest występowanie 18-hydroksysterydów w postaci cyklicznych 18—20 półketalu, co wynika z ich widm w podczerwieni, zachowania się wobec czynników acetylujących i z szybkości utleniania przez sole tetrazoliowe (71, 88, 108). Formy cykliczne są odporniejsze na utlenianie chemiczne, mogą więc być także odporniejsze na enzymatyczne odwodorowanie. Jednakże cykliczna forma półketalowa, która jest z pewnością formą dominującą w syntetycznym 18-hydroksykortykosteronie dodawanym do środowiska inkubacyjnego, nie musi powstawać także wtedy, gdy kortykosteron ulega enzymatycznej hydroksylacji w pozycji 18. W tych warunkach tworzy się prawdopodobnie głównie postać α -ketolowa, która łatwo ulega działaniu dehydrogenazy i przechodzi w aldosteron.

Za słuszością takiego tłumaczenia przemawia wykrycie przez Ulicka i wsp. (106) zespołu zmian poziomu kortykosterydów w moczu, charakteryzującego się wysoką zawartością 18-hydroksykortykosteronu i kortykosteronu oraz brakiem aldosteronu. Zmiany te świadczą o bloku metabolicznym 18-hydroksydehydrogenazy, która w warunkach prawidłowych, tj. u zdrowego człowieka, katalizuje przemianę 18-hydroksykortykosteronu w aldosteron. Brak 18-hydroksyprogesteronu i 18-hydroksykorteksonu wskazywałby na to, że bezpośrednim prekursorem aldosteronu jest 18-hydroksykortykosteron, a zatem główna droga biosyntezy biegnie przez progesteron, kortekson, kortykosteron i 18-hydroksykortykosteron. Inne przemiany dostarczałyby jedynie substratów dla tego łańcucha przemian.

Wypada podkreślić, że doniesienie Ulicka i wsp. (106) o defekcie enzymatycznym w biosyntezie aldosteronu nie jest pierwszym spostrzeżeniem na ten temat. Nadmierną utratę sodu z moczem wskutek braku lub niedoboru aldosteronu, nie związaną z wrodzonym przerostem nadnerczy ani chorobą Addisona, stwierdzono niejednokrotnie u dzieci, co znalazło wyraz w licznych publikacjach (57, 80, 82, 83, 84). W niektórych przypadkach zjawisko to było prawdopodobnie spowodowane niewrażliwością nerki na działanie mineralokortykosterydów (57, 83), jednakże w innych zaobserwowano wybiórczy hypoaldosteronizm (82, 84). W roku 1964 Visser i Cost (115) opisali przypadek zwiększenia wydalania w moczu kortykosteronu i jego metabolitów przy jednoczesnym braku aldosteronu i pierwsi wysunęli hipotezę o bloku enzymatycznym 18-hydroksylazy.

Spośród wielu czynników wywierających wpływ na biosyntezę aldosteronu na szczególną uwagę zasługują: hormon adrenokortykotropowy (ACTH), układ renina-angiotensyna oraz jony sodu i potasu.

1. Wpływ hormonu adrenokortykotropowego

ACTH, hormon tropowy o naturze polipeptydowej, wytwarzany przez przedni płat przysadki mózgowej, wywiera silny wpływ na korę nad-

nerczy, stymulując procesy biosyntezy hormonów sterydowych. Mechanizm tego działania nie jest dotychczas ostatecznie wyjaśniony, wiadomo jednak, że ACTH działa tu pośrednio, wpływając na syntezę zred. NADP, który jest koenzymem wszystkich reakcji hydroksylacji sterydów. ACTH aktywuje fosforylasy, co wzmacnia metabolizm glikogenu w nadnerczach i powoduje wzrost ilości glukozy-6-fosforanu. Utlenianiu glukozy-6-fosforanu do kwasu fosfoglukonowego towarzyszy redukcja NADP.

Schemat ten dotyczy głównie syntezy tzw. glukokortykosterydów, tzn. hormonów kory nadnercza wywierających wpływ na metabolizm węglowodanów (kortyzol, kortyzon i kortykosteron). Dla aldosteronu mechanizm jest prawdopodobnie inny, chociaż obecnie nie ulega wątpliwości, że ACTH pobudza również wytwarzanie aldosteronu u człowieka (16, 44), szczura (98) i psa (32). Davis (19) stwierdził, że można zmniejszyć sekrecję aldosteronu podając wysokie dawki kortyzolu, który na zasadzie sprzężenia zwrotnego obniża produkcję ACTH w przysadce. Ten sam autor zaobserwował spadek produkcji aldosteronu po hypofizektomii i wzrost jej pod wpływem podawania ACTH. Jednakże wielokrotne iniekcje hormonu kortykotropowego powodowały zarówno u człowieka jak i u psa osłabienie czynności sekrecyjnej warstwy kłębkowej kory (104), co tłumaczy normalny poziom aldosteronu u chorych z zespołem Cushinga (5). Wypada jeszcze dodać, że u zwierząt na diecie ubogiej w sole sodowe wpływ ACTH na sekrecję aldosteronu jest znacznie silniejszy (37, 38).

Stymulujące działanie ACTH na produkcję aldosteronu wykazano również *in vitro*, przy użyciu gruczolaka usuniętego pacjentowi z zespołem Conna* (18). Barthé i wsp. (4) badali sekrecję aldosteronu i 18-hydroksykortykosteronu u szczura pozbawionego przysadki po podaniu syntetycznego ACTH (tzw. 1—24-kortykotropina) i międzynarodowego standardu tego hormonu, stwierdzając nieznaczny wzrost produkcji obu sterydów.

Kaplan i Bartter (49), inkubując warstwę kłębkową nadnerczy szczura z różnymi związkami sterydowymi w obecności ACTH, stwierdzili, że biosynteza aldosteronu nasila się po dodaniu cholesterolu, nie ulega natomiast zmianie po dodaniu progesteronu i kortykosteronu. Może to sugerować, że ACTH działa na jeden z wczesnych etapów biogenezy aldosteronu.

Jednakże donoszono również, że hypofizektomia nie powoduje atrofii warstwy kłębkowej kory nadnerczy, wytwarzającej aldosteron, i że po wycięciu przysadki nadnercza nadal kontrolują gospodarkę wodno-mineralną ustroju za pośrednictwem aldosteronu (100, 113).

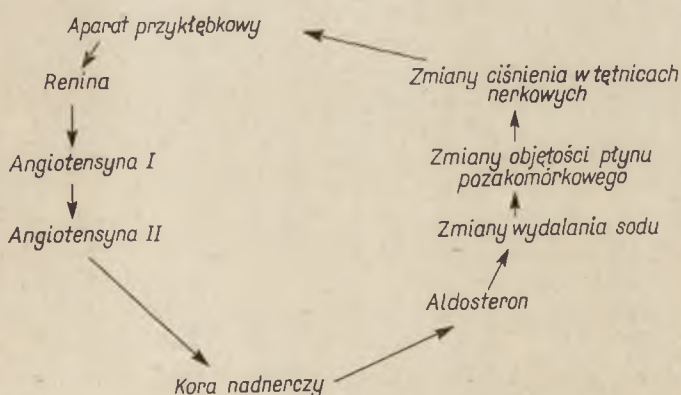
* Zespół Conna, czyli hyperaldosteronizm pierwotny, wywołany najczęściej gruczolakiem warstwy kłębkowej kory nadnerczy produkującym nadmierne ilości aldosteronu, charakteryzuje się nadciśnieniem tętniczym, wielomoczem, osłabieniem mięśniowym i alkalozą hypokaliemiczną.

Podsumowując te liczne i nie zawsze zgodne doniesienia można powiedzieć, że wytworzenie przez nadnercza ilości hormonu niezbędnej do utrzymania równowagi elektrolitów w ustroju nie wymaga udziału ACTH, jednakże stymulujący wpływ kortykotropiny na produkcję aldosteronu jest bezsporny i dotyczy prawdopodobnie jednego z przejść między cholesterolem i progesteronem. Ilość egzogennej lub endogennej kortykotropiny, niezbędna do wywołania wyraźnego efektu, jest znacznie większa od ilości powodującej maksymalne wydzielanie glukokortykosteroidów.

2. Wpływ angiotensyny II, sodu i potasu

Bardzo istotną rolę w regulacji sekrecji aldosteronu odgrywa układ renina-angiotensyna. Enzym renina powstaje w komórkach przykłębkowych, leżących w ścianie naczyń doprowadzających krew do kłębków nerkowych i odszczepia od hipertensynogenu, białka osocza z grupy α_2 -globulin, deka-peptyd nazwany angiotensyną I. Sekwencja reszt aminokwasowych w cząsteczce angiotensyny I jest następująca: Asp-Arg-Wal-Tyr-Wal-His-Pro-Fen-His-Leu. Występujący w osoczu enzym odszczepia od tego deka-peptydu dwie reszty aminokwasowe His-Leu, a pozostały oktapeptyd, noszący nazwę angiotensyny II lub hipertensyny, wykazuje silne działanie presyjne i jest uważany za czynnik patogeny w chorobie nadciśnieniowej.

Aktywacja aparatu przykłębkowego, do którego należą komórki produkujące reninę, wywołana spadkiem ukrwienia nerek, zwiększa ilość reniny w krwi. Prowadzi to do wzmożonego wytwarzania angiotensyny II, która z jednej strony powoduje skurcz mięśniówki naczyń krwionośnych, a z drugiej strony wpływa na warstwę kłębkową kory nadnerczy, stymulując sekrecję aldosteronu (schemat 2).

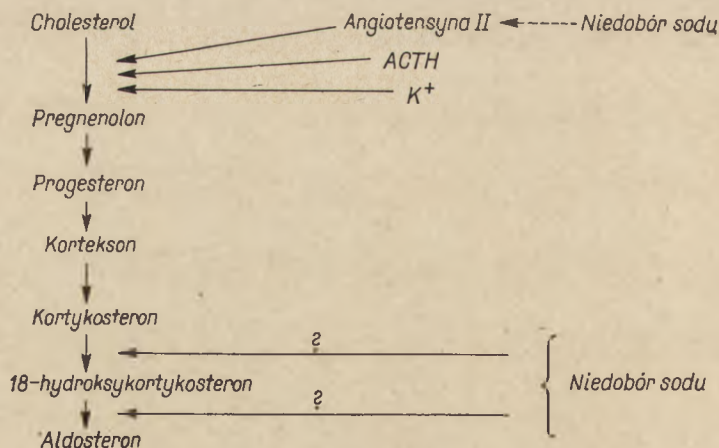


Schemat 2. Przepuszczalny mechanizm regulujący sekrecję aldosteronu

Jest zatem rzeczą obecnie dowiedzioną, że angiotensyna II wzmacnia wytwarzanie aldosteronu przez nadnercza, przy czym wpływ ten zaobserwowano nie tylko u człowieka (8, 67), ale również u psa zdrowego (71) i pozbawionego przysadki mózgowej (13). Fizjologiczny i biochemiczny mechanizm działania angiotensyny II, poznany tylko częściowo i ciągle jeszcze kontrowersyjny, wiąże się ściśle z wpływem jonów sodowych (20, 55), na produkcję aldosteronu. Ogólnie uważa się, że angiotensyna II jest fizjologicznym pośrednikiem w mechanizmie pobudzenia sekrecji aldosteronu przez niedobór sodu (6).

Próby ustalenia miejsca działania niedoboru sodu na biosyntezę aldosteronu dały sprzeczne wyniki. Bledsoe i wsp. (10) drogą pośrednią doszli do wniosku, że działanie to ma miejsce na etapie poprzedzającym tworzenie się korteksonu, co jest zgodne ze spostrzeżeniem innych autorów, że również angiotensyna II stymuluje raczej przemianę cholesterolu w pregnenolon (49, 66), lub nawet tworzenia się cholesterolu (59) niż reakcje powstawania aldosteronu z progesteronu, korteksonu i kortykosteronu. Z drugiej strony tkanka nadnerczy psów, utrzymywanych na diecie z deficytem sodu, przekształca w aldosteron więcej progesteronu, korteksonu i kortykosteronu niż nadnercza psów otrzymujących nadmiar sodu (22). Więcej aldosteronu powstaje również z kortykosteronu w obecności mitochondriów nadnerczy szczurów z deficytem sodu niż kontrolnych (62).

Można zatem sądzić, że sód działa również na inny etap biosyntezy aldosteronu — przemianę korteksonu i kortykosteronu w aldosteron, o czym świadczą także efekty wywołane u szczurów zwiększoną podażą sodu (57, 67): 1. obniżenie produkcji aldosteronu zarówno w obecności czynników stymulujących, jak i przy ich braku, 2. obniżenie przemiany progesteronu, 11β -hydroksyprogesteronu, korteksonu i kortykosteronu w aldosteron, 3. obniżenie przemiany pregnenolonu w aldosteron, 4. mniej



Schemat. 3. Wpływ różnych czynników na poszczególne etapy biosyntezy aldosteronu. Strzałki ciągłe oznaczają pobudzenie bezpośrednie, a strzałka przerywana — pobudzenie pośrednie

wyraźne obniżenie przemiany progesteronu w 18-hydroksykortykosteron niż w aldosteron, 5. wzrost produkcji dwóch biologicznych prekursorów aldosteronu, tj. kortykosteronu i korteksonu (schemat 3). Wszystkie te fakty dadzą się wytłumaczyć hamującym wpływem nadmiaru jonów sodu na aktywność jednego lub obu enzymów biorących udział w przemianie kortykosteronu w aldosteron, tj. 18-hydroksylazy i 18-hydroksydehydrogenazy kortykosteronu.

Dane doświadczalne przemawiają zatem za istnieniem dwóch mechanizmów działania niedoboru sodu na biosyntezę aldosteronu: 1. poprzez aktywację wczesnych etapów biogenezy aldosteronu za pośrednictwem zwiększonej ilości krążącej angiotensyny II, 2. poprzez aktywację jednego lub obu enzymów, uczestniczących w przemianie kortykosteronu w aldosteron. Mechanizm pierwszy można uznać za udowodniony, wiadomo bowiem, że niedobór sodu prowadzi do wzrostu poziomu reniny (42) oraz angiotensyny II (89), która bezpośrednio stymuluje sekrecję aldosteronu (19). Natomiast wpływ zmian wchłaniania sodu na aktywność 18-hydroksylazy i 18-hydroksydehydrogenazy wymaga dalszych badań.

Jeśli idzie o jony potasu, to pobudzają one bezpośrednio sekrecję aldosteronu *in vivo* (9, 21) oraz *in vitro*, nasilając prawdopodobnie przemianę cholesterolu w pregnenolon w warstwie kłębkowej nadnerczy (66).

3. Wpływ ośrodkowego układu nerwowego

W roku 1956 Rauschkolb i Farrell (81) zaobserwowali obniżenie produkcji aldosteronu po usunięciu mózgowia u psa i na tej podstawie wysunęli hipotezę o występowaniu w międzymózgowiu czynnika stymulującego sekrecję aldosteronu, który nazwano adrenoglomerulotropiną (26), od zona glomerulosa — warstwa kłębkowa nadnerczy.

W ciągu następnych lat trzy grupy badaczy doniosły niezależnie od siebie, że sekrecja aldosteronu przez korę nadnerczy, badana *in vitro*, zwiększa się pod wpływem ekstraktów szyszynki i międzymózgowia (46, 47, 53, 60). Podawanie ludziom ekstraktów szyszynki wołu powodowało również wzmożenie sekrecji aldosteronu (41). Ponadto zaobserwowano zmiany histologiczne warstwy kłębkowej kory nadnerczy, świadczące o wzroście jej aktywności sekrecyjnej, po podaniu ekstraktów szyszynki (28, 50), a Giacomelli (40) doniósł, że usunięcie szyszynki wywołuje atrofię warstwy kory nadnerczy produkującej aldosteron. Czynnikiem pobudzającym sekrecję aldosteronu miała być wyodrębniona z szyszynki przez Farrella i McIsaaca (30) pochodna pirydonindolu: 1-metylo-6-metoksy-1,2,3,4-czterohydrokarbolina. Pojawiały się jednak również doniesienia świadczące o hamującym wpływie ekstraktów szyszynki na czynność wydzielniczą warstwy kłębkowej kory nadnerczy (31, 65), które posłużyły za podstawę hipotezy, że szyszynka produkuje zarówno substancję stymulującą jak i hamującą sekrecję aldosteronu (27).

Inhibitorem, według Farrella (29), jest ubichinon, który występuje jednak nie tylko w tkance szyszynki ale również w wielu innych tkankach. Problem ten wymaga zatem dalszych badań, gdyż obecnie — poza niewątpliwym udziałem przysadki mózgowej wytwarzającej ACTH — udział mózgowia w regulacji wytwarzania aldosteronu jest niejasny.

4. Wpływ innych czynników

Od dawna wiadomo, że podczas ciąży wzrasta wydalanie aldosteronu z moczem a Jones i wsp. (45) stwierdzili, że wzrasta również jego sekrecja. Badania sekrecji hormonu w różnych okresach ciąży prowadzili Sims i wsp. (97, 116) wykazując, że w 15 tygodniu sekrecja ta jest dwukrotnie wyższa niż na początku i wzrasta stopniowo aż do 22 tygodnia. Między 22 i 35 tygodniem ciąży sekrecja hormonu utrzymuje się na stałym poziomie, a następnie wzrasta aż do porodu. W 32 tygodniu wynosi ona około $1000\mu\text{g}/\text{dobę}$ przy normie wynoszącej dla fazy folikularnej $85\text{—}216\mu\text{g}/\text{dobę}$. W 36—37 tygodniu sekrecja wynosi już $1321\mu/\text{dobę}$ a w 38—39 tygodniu — $1586\mu/\text{dobę}$ (54). Równoległe do wzrostu sekrecji aldosteronu wzrasta aktywność reniny w osoczu (12, 39, 43).

Jednym z czynników warunkujących wzrost sekrecji aldosteronu podczas ciąży jest z pewnością progesteron, o którym wiadomo, że sprzyja wydalaniu sodu z moczem, a podawany kobietom nieciążarnym wywołuje wyraźny wzrost sekrecji aldosteronu (116). Podczas ciąży stężenie progesteronu w płynach biologicznych zwiększa się znacznie w wyniku wydzielniczej czynności łożyska, uruchamiając mechanizm przeciwdziałający nadmiernej ucieczce sodu z ustroju w postaci wzmożonej sekrecji aldosteronu.

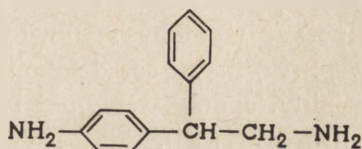
Hormony wytwarzane przez łożysko mogą również wpływać na białka transportujące aldosteron, analogicznie do ich działania na transkortynę. Wreszcie wzrost sekrecji aldosteronu może być również wywołany stratami sodu powstałymi w wyniku zwiększonej filtracji kłębkowej podczas ciąży (97).

II. Antagoniści aldosteronu i związki blokujące jego biosyntezę

Osiągnięty w ciągu ostatnich lat postęp w dziedzinie badań nad metabolizmem hormonów sterydowych pozwala obecnie na poszukiwanie związków syntetycznych, blokujących selektywnie różne etapy biosyntezy. Piśmiennictwo dotyczące połączeń tego typu jest dość obszerne, podobnie jak i lista zbadanych preparatów. Znaczna ich część nie została użyta w celach leczniczych z powodu niebezpiecznych objawów ubocznych, ale oddały one i oddają nadal cenne usługi w badaniach pa-

tologii kory nadnerczy, prowadzonych na zwierzętach. Niektóre preparaty znalazły jednak zastosowanie w klinice do leczenia różnego typu nadczynności i nowotworów kory.

Preparaty blokujące biosyntezę hormonów sterydowych wywierają również, zależnie od lokalizacji bloku, mniejszy lub większy wpływ na produkcję aldosteronu. Spośród związków oznaczających się wyraźnym działaniem hamującym biosyntezę aldosteronu warto wymienić 2-(*p*-aminofenyl)-2-fenyletyloaminę (XIII), znaną jako preparat SK i F-12185 oraz kwas *n*-formylochitozanowielosiarkowy (preparat RO-1-8307 firmy Roche).



XIII

SKF-12185 hamuje czynność nadnerczy u szczurów i świnek morskich oraz zapobiega wzrostowi poziomu kortykosterydów we krwi zwierząt poddanych stressowi. Dłuższe podawanie preparatu powoduje u szczurów objawy niedoczynności kory nadnerczy. Podobny wpływ wywiera on również na nadnercza ludzkie, zmniejszając sekrecję kortyzolu i aldosteronu, co prowadzi do kompensacyjnego wzrostu ilości krążącego ACTH i 11-dezoksykortykosterydów: korteksolonu i korteksonu (DOC).

Wyniki większości prac przemawiają za tym, że preparat hamuje proces hydroksylacji sterydów w pozycji 11 β (35, 36), wywołując gromadzenie się DOC. Fakt ten wyjaśnia dlaczego, mimo spadku wydalania aldosteronu, nadciśnienie tętnicze nadal się utrzymuje nawet wówczas, gdy biologiczne i kliniczne objawy hypokaliemii, spowodowanej nadmierną produkcją aldosteronu przez chore nadnercza, ulegają normalizacji. Wypływa to z własności gromadzącego się DOC, wywierającego silniejsze niż aldosteron działanie tensyjne, a słabszy wpływ na retencję sodu i wydalanie potasu. Jest to poważny mankament leku, gdyż zastępuje on hyperaldosteronizm zwiększonym wytwarzaniem DOC. Jednakże wskutek słabszego od aldosteronu wpływu DOC na gospodarkę elektrolitową, preparat zmniejsza hypokaliemię i może stanowić cenne uzupełnienie terapii przedoperacyjnej zespołu Conna (35, 103).

Dzięki obszernym badaniom Majora i wsp. (61) wiadomo, że heparyna i substancje pokrewne — tzw. heparynoidy — są inhibitorami sekrecji aldosteronu. Szczególnie zainteresowanie wzbudził ostatnio preparat RO-1-8307 (ester *n*-formylochitozanowielosiarkowy) o budowie zbliżonej do heparyny, ale o słabszym od niej działaniu przeciwwązkowym. Hamuje on wybiórczo syntezę aldosteronu, nie wpływając na

powstawanie kortyzolu i innych 17-hydroksykortykosterydów (2, 15, 34). Oznaczenia prekursorów aldosteronu w moczu po podaniu preparatu ujawniły wzrost ilości kortykosteronu przy jednoczesnym spadku wydalania aldosteronu i 18-hydroksykortykosteronu, co mogłoby wskazywać, że miejscem działania preparatu jest przejście między kortykosteronem i aldosteronem.

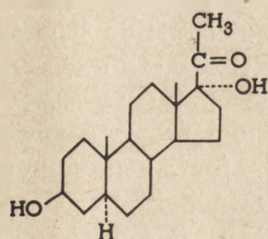
S h a r m a i wsp. (91) sądzą, że dzięki właściwościom chelatującym RO-1-8307 usuwa ze środowiska jony wapnia, niezbędne do prawidłowego przebiegu ostatnich etapów biosyntezy aldosteronu. Inne tłumaczenie działania preparatu zakłada jego hamujący wpływ na przemianę reniny w angiotensynę, która jest silnym stymulatorem sekrecji aldosteronu. Potwierdzenie tej hipotezy mogłoby stanowić zaobserwowane *in vitro* przez S e a l e y a i wsp. (90) hamujące działanie heparyny na powstawanie angiotensyny z reniny. Jednakże wyniki badań *in vivo* nie przemawiają za tym mechanizmem (1, 34).

Pomimo skutecznej blokady syntezy aldosteronu przez RO-1-8307 i zachęcających wyników klinicznych, uzyskanych przy leczeniu zespołu Conna, wartość lecznicza tego preparatu wydaje się ograniczona z powodu niskiego usytuowania bloku. Wywołuje on bowiem gromadzenie się dużych ilości prekursorów aldosteronu: kortykosteronu i DOC, odznaczających się dość silnym działaniem fizjologicznym. Zwłaszcza DOC, mający wprawdzie słabsze, ale analogiczne do aldosteronu, właściwości zatrzymywania sodu w ustroju, może zniweczyć cały efekt zablokowania syntezy aldosteronu. Dlatego podczas leczenia tym preparatem zespołu Conna, zanotowano jedynie minimalne zmiany wydalania elektrolitów, mimo znacznego spadku sekrecji aldosteronu (15, 90).

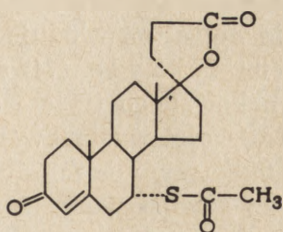
Znane są również związki znoszące wybiórczo wpływ aldosteronu na jony sodu. N e h e r i wsp. (68, 69) otrzymali z nadnerczy świni połączenie o budowie sterydowej, zwiększające wydalanie sodu z moczem, a więc działające antagonistycznie w stosunku do aldosteronu. Jest to 3β , 16α -dwuhydroksy- 5α -pregnan-20-on (XIV), określane często skrótem SEF (ang. *sodium excreting factor*). Podobne działanie posiadają jego izomery: 3α , 16α -dwuhydroksy- 5α -pregnan-20-on i 3α , 16α -dwuhydroksy- 5β -pregnan-20-on.

Do antagonistów aldosteronu należą również niektóre syntetyczne związki o budowie spirolaktonów (14, 118). Najbardziej znany jest lakton kwasu 3-(3-keto- 7α -acetylotio- 17β -hydroksy-4-androstenylo- 17α)propionowego (XV), wprowadzony przez amerykańską firmę Searle pod nazwą *Aldactonu* oraz bardzo zbliżony do niego pod względem struktury chemicznej *Phanuran* (XVI). Spirolaktyny nie zmieniają czynności kory nadnerczy, lecz działają jedynie na dystalne kanaliki nerkowe (17). Są one czynne tylko przy nadmiernej sekrecji aldosteronu, co zdecydowało o ich zastosowaniu leczniczym — jako środków usuwających obrzęki, powstałe w wyniku nadczynności warstwy kłębkowej kory. Natomiast

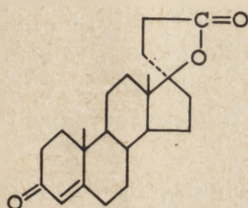
pochodna pterydyny: 2,4,7-trójamino-6-fenylpterydyna (XVII), jest inhibitorem mniej swoistym, gdyż jej wpływ na wydalanie sodu z moczem ujawnia się również przy braku aldosteronu (58).



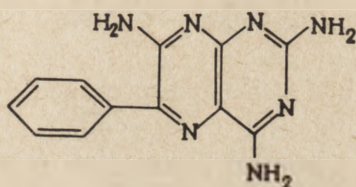
XIV



XV



XVI



XVII

III. Katabolizm aldosteronu

Sekrecja dobowa aldosteronu przez nadnercza człowieka, oznaczona metodami izotopowymi, wynosi 40—330 μ g, średnio 200 μ g (92). Jest ona około dziesięciokrotnie niższa od sekrecji korytykosteronu, wynoszącej 2mg na dobę i około stokrotnie od sekrecji kortyzolu (około 20mg na dobę). W warunkach patologicznych sekrecja może ulegać dużym zmianom: np. u pacjentów z aldosteronizmem pierwotnym wzrasta pięciokrotnie, a w zaawansowanej chorobie nadciśnieniowej może dochodzić do 10mg na dobę (56).

Stężenie aldosteronu w osoczu ludzi zdrowych jest bardzo niskie, wynosi bowiem zaledwie 0,04—0,08 μ g na 100ml. U chorych z marskością wątroby i przerostem nadnerczy liczby te są 2 do 3 razy większe. To samo dotyczy ludzi pozostających na diecie ubogiej w NaCl. Około 65% aldosteronu osocza związane jest z białkami. Opisano dwa typy takich połączeń: z α -globuliną osocza, tzw. transkortyną oraz z albuminami (63). D a u g h a d a y i wsp. (16) sugerują, że dominującą formą występowania hormonu w osoczu są jego połączenia z albuminami.

Po dożylnym podaniu znakowanego aldosteronu można śledzić przemiany, jakim ulega on w organizmie. W ten sposób zmierzono tzw. okres biologicznego półtrwania tj. czas, w którym stężenie podanego dożylnie

aldosteronu spada we krwi do połowy. U człowieka wynosi on około 20 minut (101), u psa 28 minut (19). W niektórych stanach chorobowych zanotowano wydłużenie okresu biologicznego półtrwania. I tak w marskości wątroby wzrasta on do 80 minut, a w chorobie Addisona — do 30 minut. Usunięcie wątroby powoduje jego wzrost do 200 minut (19).

Pasqualini i Jayle (74) stwierdzili, że w 50 minut po dożylnym podaniu znakowanego trytem aldosteronu 0,3—0,34% wprowadzonej promieniotwórczości występowało we krwi w postaci wolnego aldosteronu 0,08—0,09% — w postaci glukozydouronianu aldosteronu, a 1,3—1,5% — w postaci glukozydouronianu THAldo.

Aldosteron przechodzi do moczu w postaci wolnej i w postaci sprzężonej, wrażliwej na działanie 1N mocnego kwasu, a niewrażliwej na β -glukuronidazę, oraz jako połączenie ulegające rozkładowi pod wpływem β -glukuronidazy. Underwood i Tait (112) ustalili, że połączeniem wrażliwym na kwas jest glukozydouronian aldosteronu, w którym reszta kwasu glukuronowego przyłączona jest do atomu węgla w pozycji 18. Związek ulegający hydrolizie pod działaniem β -glukuronidazy jest 3-glukozydouronianem aldosteronu.

Ogólny procent promieniotwórczości przechodzącej do moczu po podaniu znakowanego hormonu wynosi według Flooda i wsp. (33) 75 do 89 w ciągu pierwszych 24 godzin, a 4,6 do 18 — w ciągu następnej doby. Peterson (79) podaje wartość 70% po pierwszych 24 godzinach. Frakcjonowanie metabolitów, wydalonych w moczu w ciągu pierwszej doby po iniekcji znakowanego aldosteronu, wykazało, że 0,1 do 0,6% promieniotwórczości występuje w postaci wolnego aldosteronu, 7 do 12% jako 18-glukozydouronian, 20 do 35% jako 3-glukozydouronian czterohydroaldosteronu i 7 do 11% jako inne metabolity (72).

Dobowe wydalanie aldosteronu w moczu w różnych okresach życia człowieka, u kobiet w ciąży oraz po leczeniu angiotensyną zestawiono w tablicy 1. Podano tam również wartości wydalania 5 β ,3 α -THAldo

Tablica 1

Wydalanie aldosteronu i czterohydroaldosteronu w moczu

Wiek badanych	Aldosteron		THAldo	Literatura
	$\mu\text{g}/\text{dobę}$	$\mu\text{g}/\text{dobę}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{dobę}$	
Poniżej roku	2,1	0,24	—	64
1—5 lat	3,5	0,23	—	64
6—10 lat	4,9	0,17	—	64
11—15 lat	6,5	0,13	—	64
16—20 lat	6,6	0,10	—	64
21—30 lat	7,5	0,10	20—30	75
W ciąży	50—300	—	150—800	116
Po podaniu angiotensyny II	23—68	—	—	116

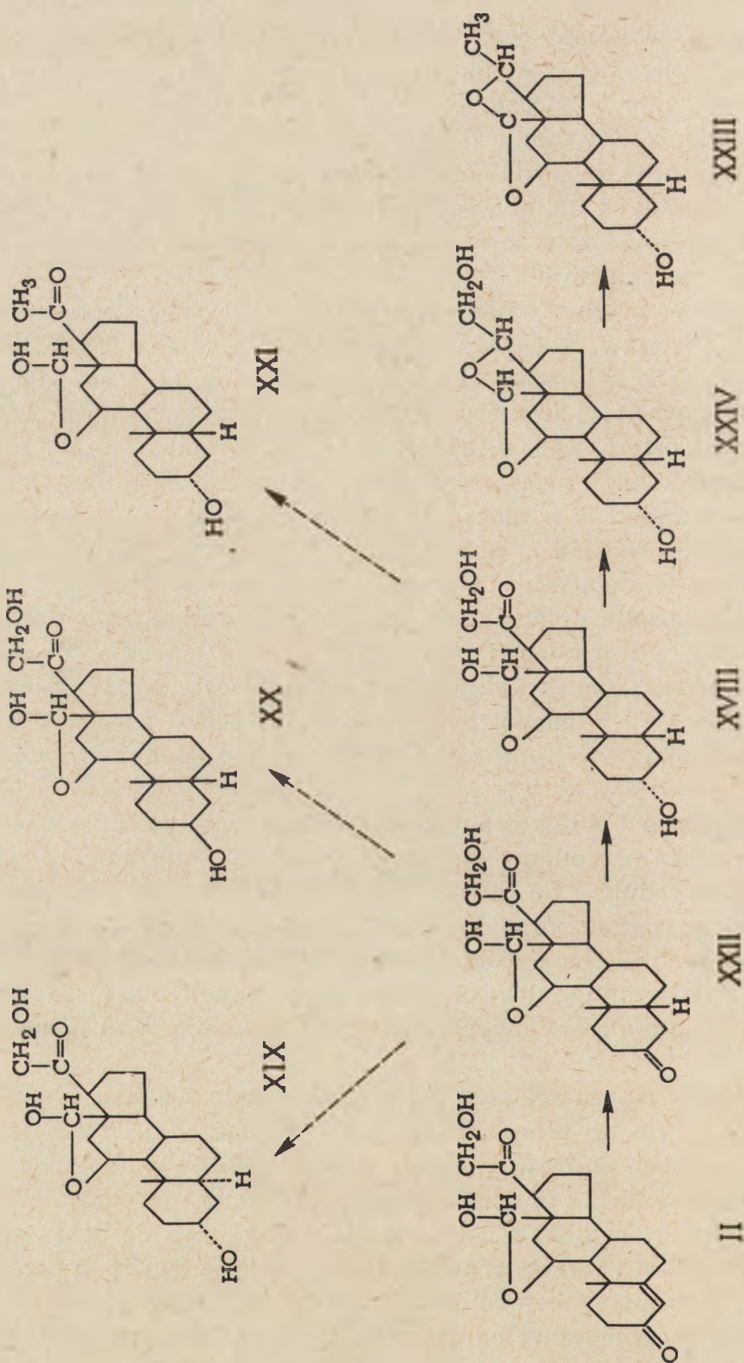
(XVIII) — głównego metabolitu aldosteronu (schemat 4) wykrytego w moczu przez Ulicka i Kusch Vettera (108). THAlDo, podobnie jak aldosteron, wydalany jest w moczu głównie w postaci glukozydouronianu. Metabolit ten ma duże znaczenie diagnostyczne, gdyż jego dobowe wydalanie w moczu, około pięciokrotnie wyższe niż aldosteronu, jest zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w patologii nadnerczy proporcjonalne do wydalania aldosteronu. Dlatego w wielu klinikach endokrynologicznych, m.in. w dużym ośrodku paryskim — *Fondation de Recherche en Endocrinologie*, zastąpiono oznaczanie aldosteronu nieco prostszym oznaczeniem THAlDo.

W moczu wykryto również dwa inne izomeryczne czterohydroaldosterony: 5α , 3α , tzw. allo-THAlDo (XIX) i 5β , 3β , tzw. 3-THAlDo (XX) (51, 52), jednakże w znacznie mniejszych ilościach, bo stanowiących zaledwie 1% zawartości izomeru 5β , 3α . Cztery z możliwych izomerów czterohydroaldosteronu — 5α , 3β -THAlDo — otrzymali Pechet i wsp. (76) podczas inkubacji aldosteronu z homogenatami wątroby szczura. Ponadto zidentyfikowano w moczu 21-dezoksy-THAlDo (XXI) oraz 5β -dwuhydroaldosteron (XXII).

Wszystkie te połączenia występują w moczu w postaci półacetalu, w których wiązanie półacetalowe powstało z grupy aldehydowej przy C-18 i grupy hydroksylowej przy C-11. Zidentyfikowano również dwa metabolity aldosteronu z pełnymi wiązaniami acetalowymi między węglami 11, 18, i 20 a mianowicie: $11\rightarrow 18\leftarrow 20$, acetal 21-dezoksysześciohydroaldosteronu (XXIII) oraz $11\rightarrow 18\leftarrow 20$ acetal sześciohydroaldosteronu (XXIV).

Na podstawie opublikowanych dotychczas wyników można przyjąć że główna droga przemian metabolicznych aldosteronu biegnie przez kolejne procesy redukcji do dwuhydroaldosteronu, czterohydroaldosteronu i wreszcie do sześciohydroaldosteronu, analogicznie do przemian kortyzolu i kortyzonu. Jedyna różnica polega na tym, że w cząsteczkach metabolitów aldosteronu, dzięki obecności grupy aldehydowej usytuowanej w pobliżu grup hydroksylowych, tworzą się wiązania typu półacetalu lub acetalu.

Wykrycie w moczu acetalu 21-dezoksysześciohydroaldosteronu świadczy jednak o tym, że proces redukcji, po przyłączeniu do cząsteczki aldosteronu sześciu atomów wodoru, może iść dalej, obejmując grupę alkoholową przy C-21 i przekształcając ją w rodnik metylowy. Warto dodać, że zarówno acetal sześciohydroaldosteronu jak i 21-dezoksysześciohydroaldosteronu, wykryte w moczu, należą do szeregu 5β , a zatem przemiana aldosteronu w metabolity szeregu 5β jest dominującym szlakiem metabolicznym. Nietypowe odgałęzienie głównej drogi metabolicznej stanowi redukcja grupy alkoholowej przy C-21 w czterohydroaldosteronie do grupy metylowej z wytworzeniem 21-dezoksy-THAlDo (XXI). Kataboliczne przemiany aldosteronu przedstawia schemat 4.



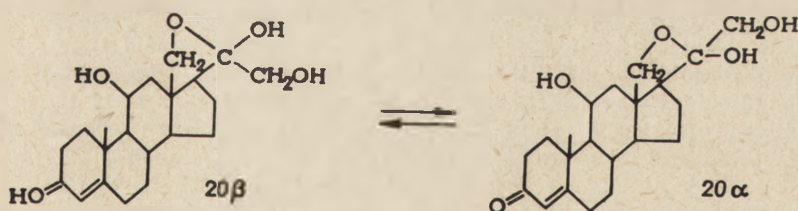
Schemat 4. Katabolizm aldosteronu

Trzeba podkreślić, że metabolizm aldosteronu jest stereospecyficzny, gdyż po podaniu racematu jedynie forma D, będąca formą naturalną, ulega metabolizmowi. Natomiast formy L nie znaleziono w moczu ani po hydrolizie kwaśnej ani enzymatycznej (105).

Badania zespołu Ulicka dostarczyły w ciągu ostatnich lat interesujących danych na temat sekrecji i metabolizmu 18-hydroksykortykosteronu. W roku 1957 badacze ci wyodrębnili z moczu ludzkiego nowy związek sterydowy, który z uwagi na tlenową funkcję przy C-18 i proporcjonalne do aldosteronu wydalanie uznali za metabolit tego hormonu (110). Dokładniejsze badania chromatograficzne ujawniły, że nowa substancja jest mieszaniną dwóch związków: 3 α , 5 β -THAldo oraz 18-hydroksy-czterohydro-11-dehydrokortykosteronu (18-hydroksy-THA) (108). Po dożylnym podaniu znakowanego aldosteronu, promieniotwórczość, która przeszła do moczu, związana była tylko z THAldo, co dowodzi, że 18-hydroksy-THA nie jest metabolitem aldosteronu. Autorzy wysunęli sugestię, że jest to metabolit 18-hydroksykortykosteronu, wykrytego wcześniej w nadnerczach ropuchy (107).

Hipotezę tę potwierdziły doświadczenia ze znakowanym 18-hydroksykortykosteronem, z którego powstawał i przechodził do moczu znakowany 18-hydroksy-THA. Dodatkowy dowód stanowią niemal jednakowe aktywności właściwe 18-hydroksykortykosteronu i 18-hydroksy-THA, znalezione w moczu.

18-Hydroksykortykosteron, podobnie jak aldosteron, a w odróżnieniu od innych hormonów kory, wytwarzany jest głównie przez warstwę kłębkową. Jego sekrecja dobową wynosi 145—460 μ g, średnio 300 μ g, jest więc znacznie wyższa od sekrecji aldosteronu (109). Może on występować w trzech formach izomerycznych (86, 111): α -ketolowej (IX) i dwóch cyklicznych formach półketalowych — 20 α i 20 β (schemat 5).

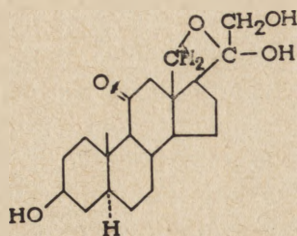


Schemat 5. Formy półketalowe 18-hydroksykortykosteronu

W wątrobie 18-hydroksykortykosteron ulega przemianom w 18-hydroksy-THA (XXV), polegającej na redukcji układu Δ^4 -3-keto, analogicznie do innych hormonów kory, oraz na utlenieniu do grupy ketonowej hydroksylu przy C-11.

Wydalanie dobowe 18-hydroksy-THA wynosi około 140 μ g, a zatem ponad dwukrotnie przewyższa wydalanie THAldo.

Porównywano wartości sekrecji 18-hydroksykortykosteronu i aldosteronu w różnych warunkach (108). I tak, pod wpływem niedoboru sodu, którego podaż w diecie obniżono do 10Eq/dobę, zarówno sekrecja 18-hydroksykortykosteronu jak i aldosteronu ulegała 3-5-krotnemu wzrostowi w stosunku do wartości kontrolnych.



XXV

Po podaniu 25 j.ACTH zanotowano jednakowy, około dwukrotny, wzrost sekrecji aldosteronu i 18-hydroksykortykosteronu. Natomiast sekrecja glukokortykosterydów w tych samych warunkach wzrastała przynajmniej pięciokrotnie.

W różnych przypadkach pierwotnego i wtórnego aldosteronizmu zanotowano także paralelizm między sekrecją 18-hydroksykortykosteronu i aldosteronu. Gdy sekrecja aldosteronu była prawidłowa, nie ulegała również zmianie sekrecja 18-hydroksykortykosteronu, natomiast każdemu obniżeniu lub wzrostowi sekrecji aldosteronu towarzyszył proporcjonalny spadek lub wzrost sekrecji 18-hydroksykortykosteronu.

Nazwy systematyczne sterydów wymienionych w pracy

- Aldosteron: 11 β ,21-dwuhydroksy-4-pregnan-3,20-dion-18-al.
 Dwuhydroaldosteron: 11 β ,21-dwuhydroksy-5 β -pregnan-3,20-dion-18-al.
 Czterohydroaldosteron: 3 α ,11 β ,21-trójhidroksy-5 β -pregnan-20-on-18-al.
 Alio-czterohydroaldosteron: 3 α ,11 β ,21-trójhidroksy-5 α -pregnan-20-on-18-al.
 3 β -czterohydroaldosteron: 3 β ,11 β ,21-trójhidroksy-5 β -pregnan-20-on-18-al.
 3 β -allo-czterohydroaldosteron: 3 β ,11 β ,21-trójhidroksy-5 α -pregnan-20-on-18-al.
 21-dezoksyczterohydroaldosteron: 3 α -11 β -dwuhydroksy-5 β -pregnan-20-on-18-al.
 21-dezoksysesćciohydroaldosteron: 3 α ,11 β ,20-trójhidroksy-5 β -pregnan-18-al.
 Progesteron: 4-pregnen-3,20-dion.
 18-hydroksyprogesteron: 18-hydroksy-4-pregnen-3,20-dion.
 18-aldoprogesteron: 4-pregnen-3,20-dion-18-al.
 11-hydroksy-18-aldoprogesteron: 11 β -hydroksy-4-pregnen-3,20-dion-18-al.
 Pregnenolon: 3 β -hydroksy-5-pregnen-20-on.
 Kortekson (dezoksykortykosteron): 21-hydroksy-4-pregnen-3,20-dion.
 18-hydroksykortekson: 18,21-dwuhydroksy-4-pregnen-3,20-dion.
 18-aldokortekson: 21-hydroksy-4-pregnen-3,20-dion-18-al.
 Korteksolon: 17 α ,21-dwuhydroksy-4-pregnen-3-,20-dion.
 Kortykosteron: 11 β ,21-dwuhydroksy-4-pregnen-3,20-dion.
 18-hydroksykortykosteron: 11 β ,18,21-trójhidroksy-4-pregnen-3,20-dion.

18-hydroksyczterohydro-11-dehydrokortykosteron: 3 α ,18,21-trójhydroksy-5 β -pregnan-11,20-dion.

Cholesterol: 3 β -hydroksy-5-cholesten.

11 \rightarrow 18 \leftarrow 20 acetal 21-dezoksyseszióhydroaldosteronu: 11 \rightarrow 18 \leftarrow 20 acetal 3 α ,11 β , 20-trójhydroksy-5 β -pregnan-18-al.

11 \rightarrow 18 \leftarrow 20 acetal sześcióhydroaldosteronu: 11 \rightarrow 18 \leftarrow 20 acetal, 3 α , 11 β , 20,21-czterohydroksy-5 β -pregnan-18-al.

LITERATURA

1. Abbott E. C., Gornall A. G., Sutherland D. J., Stiefel M., Laidlaw J. C., *Can. Med. Assoc. J.* **94**, 1155 (1966).
2. Abbott E. C., Monkhouse F. C., Steiner J. W., Laidlaw J. C., *Endocrinology* **78**, 651 (1966).
3. Ayres P. J., Eichhorn J., Hechter O., Saba N., Tait J. F., Tait S. A., *Acta Endocrinol.* **33**, 27 (1960).
4. Barthe P., Desaulles P. A., Schar B., Staehelin M., *Nature* **202**, 908 (1964).
5. Biglieri E. G., Hane S., Slaton P. E., Forsham P. H., *J. Clin. Invest.* **42**, 516 (1963).
6. Binnion P. F., Davis J. O., Brown T. C., Olichney M., *Am. J. Physiol.* **208**, 655 (1965).
7. Birmingham M. K., Ward P. J., *J. Biol. Chem.* **236**, 1661 (1961).
8. Biron P., Koiw E., Nowaczyński W., Brouillet J., Genest J., *J. Clin. Invest.* **40**, 338 (1961).
9. Blair-West J. R., Coghlan J. P., Denton D. A., Goding J. R., Wintour M., Wright R., *Rec. Progr. Hormone Res.* **19**, 311 (1963).
10. Bledsoe T., Island D. P., Liddle G. W., *J. Clin. Invest.* **45**, 524 (1966).
11. Brode E., Grant J. K., Symington T., *Acta Endocrinol.* **41**, 411 (1962).
12. Brown J. J., Davies D. L., Doak P. B., Lever A. F., Robertson J. I., *Brit. Med. J.* **1**, 505 (1966).
13. Carpenter C., Davis J., Ayers C. R., *J. Clin. Invest.* **40**, 2026 (1961).
14. Cella J. A., Kagawa C., *Chem. Eng. News* **37**, 16 (1959).
15. Conn J. W., Rovner D. R., Cohen E. L., Anderson J. E., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 527 (1966).
16. Daughaday W. H., Halloszy J., Mariz I. K., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 53 (1961).
17. Davidson E. T., Coppage W. S., Island D. P., Liddle G. W., *J. Lab. Clin. Med.* **58**, 505 (1961).
18. Davignon J., Tremblay G., Nowaczyński W., *Acta Endocrinol.* **38**, 207 (1961).
19. Davis J. O., *Rec. Progr. Hormone Res.* **17**, 293 (1961).
20. Davis J. O., *The Adrenal Cortex*, red. A. Eisenstein, Boston 1967, str. 203.
21. Davis J. O., Urquhart J., Higgins J. T. jr., *J. Clin. Invest.* **42**, 597 (1963).
22. Dawis W. W., Burwell L. L., Kelley G., Casper A. G., Bartter F. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 218 (1966).
23. Deming Q. B., Luetscher J. A., jr., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **73**, 171 (1950).
24. Dominguez O. V., Urry D. W., Samuels L. T., *Federation Proc.* **20**, 180 (1961).

25. Farrell G. L., *Physiol. Rev.* **38**, 709 (1958).
26. Farrell G. L., *Circulation* **21**, 1009 (1960).
27. Farrell G. L., *Federation Proc.* **19**, 601 (1960).
28. Farrell G. L., *Rec. Progr. Hormone Res.* **17**, 340 (1961).
29. Farrell G. L., Symposium on Aldosterone, red. E. E. Baulieu i P. Robel, Oxford, 1964, str. 243.
30. Farrell G. L., McIsaac W., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 543 (1961).
31. Farrell G. L., McIsaac W., Taylor A. N., *Exc. Med. Found.* nr 14 (1962).
32. Farrell G. L., Rauschkolb E., Koletsky S., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **15**, 852 (1955).
33. Flood C., Layne D. S., Ramcharan S., Rossipal E., Tait J. F., Tait S. A., *Acta Endocrinol.* **36**, 237 (1961).
34. Ford H. C., Bailey R. E., *Steroids* **7**, 30 (1966).
35. Gabrilove J. L., Nicolis G. L., Gallagher T. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 1337 (1967).
36. Gabrilove J. L., Nicolis G. L., Gallagher T. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 1550 (1967).
37. Ganong W. F., Biglieri E. G., Mulrow P. J., *Rec. Progr. Hormone Res.* **22**, 381 (1966).
38. Ganong W. F., Boryczka A. T., Shackelford R., Clark R. M., Converse R. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **118**, 792 (1965).
39. Genest J., de Champlain J., Boucher R., Veyrat R., Koiw E., *Pathol. Biol.* **13**, 21 (1965).
40. Giacomelli F., *Endokrinologie* **42**, 144 (1962).
41. Giordano G., Balestreri R., *Ann. Endocrinol.* **24**, 331 (1963).
42. Gross F., Symposium on Aldosterone, red. E. E. Baulieu i P. Robel, Oxford 1964, str. 307.
43. Gross F., *Geburtslehre und Frauenheilkunde* **26**, 141 (1966).
44. Hernando L., Crabbe J., Ross E., Reddy W., Renold A., Nelson D., Thorn G. W., *Metab. Clin. Exptl.* **6**, 518 (1957).
45. Jones K., Lloyd-Jones R., Riondel A., Tait J. F., Tait S. A., Bulbrook R., Greenwood F. C., *Acta Endocrinol.* **30**, 321 (1959).
46. Jouan P., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **254**, 2680 (1962).
47. Jouan P., *Ann. Endocrinol.* **24**, 365 (1963).
48. Kahnt F. W., Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **38**, 1237 (1955).
49. Kaplan N. M., Bartter F. C., *J. Clin. Invest.* **41**, 715 (1962).
50. Keller A., Piotti L. E., Romani J. D., *Ann. Endocrinol.* **22**, 82 (1961).
51. Kelly W. G., Bandi L., Lieberman S., *Biochemistry* **2**, 1249 (1963).
52. Kelly W. G., Bandi L., Shoolery J. N., Lieberman S., *Biochemistry* **1**, 172 (1962).
53. Kovacs K., David M. A., Weisz P., *Med. Exptl.* **3**, 113 (1960).
54. Laidlaw J., Ruse J., Gornall A., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 161 (1962).
55. Laragh J. H., Kelly W. G., Advances in Metabolic Disorders, red. R. Levine i R. Luft, New York 1964, str. 217.
56. Laragh J. H., Ulick S., Januszewicz W., Deming Q. B., Kelly W. G., Lieberman S., *J. Clin. Invest.* **39**, 1091 (1960).
57. Lelong M., Alagille D., Philippe C., Gentil C., Gabilan J., *Rev. Franc. Etud. Clin. Biol.* **5**, 558 (1960).
58. Liddle G. W., *Metabolism* **10**, 1021 (1961).

59. Lommer D., Wolff H. P., *Experientia* **22**, 699 (1966).
60. Lucis O. J., Dyrenfurth I., Venning E. H., *Can. J. Biochem.* **39**, 901 (1961).
61. Majoor C. L., Schlatmann R. J., Jansen A. P., Prenen H., *Clin. Chim. Acta* **5**, 591 (1960).
62. Marusic E. T., Mulrow P., *J. Clin. Invest.* **46**, 1092 (1967).
63. Meyer C. J., Layne D. S., Tait J. F., Pincus G., *J. Clin. Invest.* **40**, 1663 (1961).
64. Minnick M. C., *Metabolism* **15**, 359 (1966).
65. Mulrow P. J., Ganong W., Boryczka A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **112**, 7 (1963).
66. Müller J., *Acta Endocrinol.* **52**, 515 (1966).
67. Müller J., *Acta Endocrinol.* **58**, 27 (1968).
68. Neher R., Desaulles P., Wisher E., Wieland P., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **42**, 132 (1959).
69. Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **43**, 623 (1960).
70. Nicolis G., Ulick S., *Endocrinology* **76**, 514 (1965).
71. Pappo R., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1010 (1959).
72. Pasqualini J. R., *Nature* **198**, 1095 (1963).
73. Pasqualini J. R., *Nature* **201**, 501 (1964).
74. Pasqualini J. R., Jayle M. F., Intern. Symp. Steroids, Rzym 1963, str. 29.
75. Pasqualini J. R., Legrand J. C., Jayle M. F., *Acta Endocrinol.* **34**, 67 (1963).
76. Pechet M., Hesse R., Kohler H., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5251 (1960).
77. Peron F. G., *Endocrinology* **69**, 39 (1961).
78. Peron F. G., *Endocrinology* **70**, 386 (1962).
79. Peterson R. E., *Rec. Progr. Hormone Res.* **15**, 231 (1959).
80. Raine D., Roy J., *Arch. Dis. Childhood* **37**, 548 (1962).
81. Rasuchkolb E. W., Farrell G. L., *Endocrinology* **59**, 526 (1956).
82. Roussel A., Levon B., Sinclair L., Oberholzer V. G., *Arch. Dis. Childhood* **38**, 313 (1963).
83. Royer P., Habib R., Mathieu H., *Problemes Actuels de Nephrologie Infantile*, Editions Medicales Flammarion Paryż 1963, str. 147.
84. Royer P., Lestradet C. H., de Menibus C., Vermeil G., *Ann. Pediat.* **8**, 133 (1961).
85. Sandor T., Lanthier A., Intern. Congress Hormonal Steroids, Mediolan 1962. *Excerpta Medica, Int. Congress Series*, Nr 51, str. 139.
86. Sandor T., Lanthier A., *Acta Endocrinol.* **42**, 355 (1963).
87. Schmidlin J., Anner G., Billeter J. R., Wettstein A., *Experientia* **11**, 365 (1955).
88. Schmidlin J., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta* **43**, 973 (1960).
89. Scornik O. A., Paladini A. C., *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 269 (1964).
90. Sealey J. E., Gerten J. N., Ledingham J. G., Laragh J. H., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 699 (1967).
91. Sharma D. C., Nerenbert C., Dorfman R. I., Proc. Forth-Ninth Meeting of the Endocrine Society, 1967, str. 34.
92. Siegenthaler W., Dowdy A., Luetscher J. Jr., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **22**, 172 (1962).
93. Simpson S. A., Tait J. F., *Endocrinology* **50**, 150 (1952).
94. Simpson S. A., Tait J. F., Wettstein A., Neher R., von Euw J., Reichstein T., *Experientia* **9**, 333 (1953).

95. Simpson S. A., Tait J. F., Wettstein A., Neher R., von Euw J., Schindler O., Reichstein T., *Experientia* **10**, 132 (1954).
96. Simpson S. A., Tait J. F., Wettstein A., Neher R., von Euw J., Schindler O., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **37**, 1200 (1954).
97. Sims E. A., Meeker C., Gray M. J., Watanabe M., Solomon S., Aldosterone, red. E. Baulieu i P. Robel, Oxford 1964.
98. Singer B., Stack-Dunne M. P., *J. Endocrinol.* **12**, 130 (1955).
99. Stachenko J., Giroud C. J., Intern. Symp. on Adrenal Cortex and Adrenal Cortical Hormones, Ghent 1962, str. 77.
100. Swann H. G., *Physiol. Rev.* **20**, 493 (1940).
101. Tait J. F., Tait S. A., Little B., Laumas K., *J. Clin. Invest.* **39**, 72 (1961).
102. Travis R. H., Farrell G. L., *Endocrinology* **63**, 882 (1958).
103. Tucci J. R., Espiner E. A., Jagger P. I., Laufer D. P., Thorn G. W., *Clin. Res.* **14**, 478 (1966).
104. Tucci J. R., Espiner E. A., Laufer D. P., Jagger P., *Clin. Res.* **14**, 289 (1966).
105. Ulick S., *J. Biol. Chem.* **236**, 680 (1961).
106. Ulick S., Gauthier E., Kusch Vetter J., Markello J. R., Yaffe S., Lowe C., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 669 (1964).
107. Ulick S., Kusch Vetter K., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 6421 (1960).
108. Ulick S., Kusch Vetter K., *J. Biol. Chem.* **237**, 3364 (1962).
109. Ulick S., Kusch Vetter K., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**, 1015 (1965).
110. Ulick S., Lieberman S., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6567 (1957).
111. Ulick S., Nicolis G. L., Kusch Vetter K., Symposium on Aldosterone, Praga 1963, str. 3.
112. Underwood R. H., Tait J. F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 1110 (1964).
113. Venning E., Carballeira A., Dyrenfurth I., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **14**, 784 (1954).
114. Vischer E., Schmidlin J., Wettstein A., *Experientia* **12**, 50 (1956).
115. Visser H. K., Cost W. S., *Acta Endocrinol. Suppl.* **89**, 31 (1964).
116. Watanabe M., Meeker C. I., Gray M. J., Sims E., Solomon S., *J. Clin. Invest.* **42**, 1619 (1963).
117. Wettstein A., Kahnt F. W., Neher R., *Ciba Found. Colloq. Endocrinol.* **8**, 170 (1955).
118. Wetzel A., Schulz E., *Deut. Apoth. Z.* **104**, 252 (1964).

JERZY TROJANOWSKI *

Toksohormon

Toxohormone

A review of toxohormone concept, bioassay and preparation is presented.

Obserwacja przebiegu choroby nowotworowej ujawnia na pewnym etapie jej zaawansowania stan tzw. charłactwa, ogólnego wyniszczenia organizmu, będącego często bezpośrednią przyczyną śmierci chorego organizmu. Występująca przy tym anemia oraz zaburzenia w ogólnym metabolizmie żelaza zwróciły uwagę na możliwość istnienia pewnych czynników humoralnych, wytwarzanych w tkance nowotworowej i odpowiedzialnych przynajmniej częściowo za powstawanie opisanych stanów patofizjologicznych w organizmie nosiciela nowotworu. Poszukiwania toksyn nowotworowych weszły na wyraźny tor z chwilą, gdy zauważono u zwierząt z chorobą nowotworową znaczną obniżkę poziomu katalazy wątrobowej (2). Dalszy postęp przyniosło stwierdzenie Greensteina i wsp. (9), że spadek aktywności katalazy wątrobowej jest proporcjonalny do ciężaru guza nowotworowego oraz że operacyjne usunięcie guza przywraca normalny poziom tego enzymu.

W roku 1948 Nakahara i Fukuoaka (26) zaproponowali nazwę „toksohormon” dla czynnika obecnego w wyciągu z tkanki nowotworowej, powodującego obniżenie aktywności katalazy w wątrobie. Nazwa miała sugerować podobieństwo tej substancji do hormonów, gdy chodzi o zdalne oddziaływanie na drodze wydzielania wewnętrznego przez żywe komórki i komórki nowotworu (27), a jednocześnie podkreśla toksyczny, hamujący normalną funkcję komórek wątroby, efekt tego wydzielania.

Obszerny artykuł przeglądowy relacjonujący niektóre współczesne poglądy na funkcję i właściwości toksohormonu ogłosił w roku 1967 Nakahara (25).

I. Oznaczanie toksohormonu

Zasada oznaczania polega na dootrzewnowym wprowadzeniu preparatu toksohormonu a następnie określeniu procentowego obniżenia ak-

* Prof. dr, Katedra Biochemii UMCS, Lublin.

tywności katalazy w wątrobie zwierzęcia po upływie 24 godz. od iniekcji. Za wiarygodny efekt pozytywny uważa się conajmniej 50% spadek aktywności katalazy wątrobowej w stosunku do kontroli. N a k a h a r a (25) poleca metodę oznaczania aktywności katalazowej przy użyciu siarczanu tytanylu. Wątrobę homogenizuje się z 99 objętościami wody w temperaturze 0°. Porcję homogenatu, odpowiadającą 0,2% wagi wątroby, pobiera się do oznaczenia katalazy. Substrat przygotowuje się w postaci rozcieńzonego roztworu H_2O_2 w buforze fosforanowym o pH 7. Odpowiedni roztwór siarczanu tytanylu otrzymuje się przez rozcieńczenie nasyconego roztworu tej soli roztworem 2N H_2SO_4 w stosunku 1 : 5. Próbkę odpowiednio rozcieńzonego homogenatu wątroby dodaje się do roztworu substratu, miesza przez minutę na łaźni lodowej i dodaje następnie roztwór siarczanu tytanylu. Po upływie 30—60 min. oznacza się fotometrycznie powstający żółty barwnik przy 425nm. Równolegle przeprowadza się próbę kontrolną bez dodatku homogenatu. Aktywność katalazową wyraża się w postaci stałej reakcji $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$, gdzie t —

czas reakcji, a — początkowe stężenie substratu, x — ubytek substratu w jednostce czasu. Do oznaczenia obniżenia aktywności katalazy w wątrobie najczęściej bywa używana metoda Eulera-Josephsona (25). W tej metodzie do roztworu 0,1N H_2O_2 przy pH 6,8 dodaje się próbkę odpowiednio rozcieńzonego supernatantu z homogenatu wątroby zwierzęcia, któremu wstrzyknięto przed 24 godz. preparat toksohormonu. Po upływie 3, 6, 9... itd. minut od rozpoczęcia reakcji, pobiera się porcję mieszaniny reagującej i zatrzymuje reakcję enzymatyczną przez silne zakwaszenie. Ilość nierozłożonego H_2O_2 oznacza się przez miareczkowanie próbki roztworem 0,005N $KMnO_4$ w temperaturze 0°. Wyniki oznaczeń interpoluje się na zerowy czas reakcji i przedstawia w postaci stałej k jak w poprzedniej metodzie. Aktywność właściwą katalazy wyraża się w jed-

nostkach umownych: Kat. f. = $\frac{k_0}{g \text{ białka w ml}}$ (Kat. f. od niem. *Katalasefähigkeit*).

W niektórych pracach jako kryterium skutków działania toksohormonu przyjęto obniżkę żelaza w surowicy krwi tętnicznej o 50%. Żelazo można oznaczać metodą Barkana i Walkera (1), polegającą na przeprowadzeniu do roztworu żelaza związanego z białkami surowicy i sprzęgnięciu z terpirydyną na kompleks, który można oznaczyć fotometrycznie przy 552nm. Rzadziej stosowaną metodą oznaczania aktywności toksohormonu jest określenie obniżki poziomu pirolazy tryptofanowej w wątrobie zwierzęcia po upływie 12 godz. od iniekcji dootrzewnowej. Aktywność pirolazy tryptofanowej oznacza się metodą K n o x a (17).

II. Otrzymywanie toksohormonu

Pierwsza opisana w literaturze metoda preparowania toksohormonu według Nakahary i Fukuoka (26) polega na ekstrakcji rozdrobnionej tkanki nowotworowej wodą na wrzącej łaźni wodnej przez 1—2 godz. Przed ekstrakcją wodną materiał odtłuszcza się eterem. Po odwirowaniu wyciągu wodnego do supernatantu dodaje się podwójną ilość absolutnego etanolu schłodzonego do temperatury 0°. Powstający biały osad surowego toksohormonu odwirowuje się i suszy pod próżnią. Trojanowski i wsp. (41) wprowadzili dalsze etapy oczyszczania surowego preparatu otrzymanego powyższą metodą. Zastosowano frakcjonowane wysalanie siarczanem amonu, dializę a następnie sączenie przez *Sephadex G-25* w układzie zawierającym bufor o pH 6,8 oraz 1,2M NaCl. Preparat uzyskany z nowotworu melanoma rozdzielał się podczas tego sączenia na 5 frakcji aktywnych toksohormonalnie. Najaktywniejsza frakcja obniżała aktywność katalazy wątrobowej o 50% w dawkach 0,003mg/g ciężaru zwierzęcia. Przybliżone oznaczenie ciężaru cząsteczkowego metodą filtracji na żelu *Sephadex* dały wartości w granicach 5 000—10 000 dla poszczególnych frakcji uzyskanych z bezpigmentowej odmiany czerniaka. Wspólną cechą wszystkich frakcji toksohormonu z badanego materiału była nieznaczna zawartość aminokwasów aromatycznych.

O no i wsp. (36) wprowadzili zamiast ekstrakcji wodą homogenizowanie tkanki z acetonem. Proszek acetonowy ekstrahowano następnie mieszaniną 9 obj. metanolu + 6 obj. kwasu octowego lodowatego w temperaturze 75° pod chłodnicą zwrotną. Ekstrakt po odwirowaniu miesza się z równą objętością eteru, co powoduje wytrącanie osadu toksohormonu tzw. frakcji O. Dalsze oczyszczanie tego preparatu uzyskano przez frakcjonowane wytrącanie etanolem. Maksymalnie oczyszczona frakcja przy stężeniu alkoholu 86,2% powodowała znamienne obniżenie aktywności katalazy w wątrobie myszy w dawkach 10 mg. Zaletą opisanej metody jest uwolnienie preparatu toksohormonu od kwasów nukleinowych.

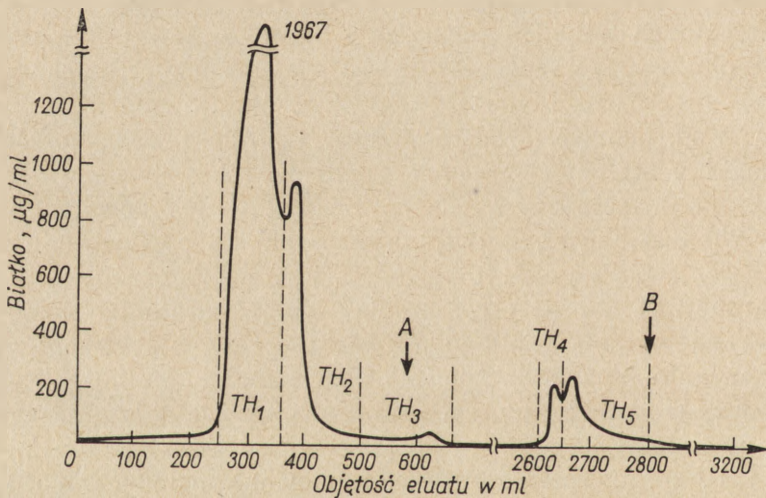
F u j i i i wsp. (5) zastosowali zmodyfikowaną metodę O n o (37) do otrzymania tzw. frakcji zasadowych białek z tkanek nowotworowych. Proszek acetonowy rozpuszczano w rozcieńczonym HCl i po odwirowaniu części nierozpuszczalnej do supernatantu dodano równą objętość nasyconego kwasu pikrynowego. Powstający żółty osad zawieszano w 10-krotnej objętości alkoholu z dodatkiem 3% HCl. Nierozpuszczalny materiał odwirowywano, przemywano acetonem i suszono pod próżnią. Tak otrzymany preparat powodował znamienne obniżenie aktywności katalazy wątrobowej w dawkach rzędu 1—5 mg a równocześnie obniżał poziom żelaza w osoczu krwi.

Dalszy postęp w oczyszczeniu toksohormonu uzyskali Y u n o k i i G r i f f i n (43) stosując chromatografię na jonicie. Surowy preparat otrzymany metodą proszku acetonowego (36) rozdzielano na kolumnie

z *Amberlite XE 64*. Eluowano buforem glicynowym o pH 9,4 zawierającym 0,1M NaCl. Uzyskano 3 frakcje w stopniu oczyszczenia 1 000—10 000 razy, aktywne w dawkach rzędu 20 μ g.

Zagadnienie infekcji bakteryjnej nowotworu, jako domniemanego źródła toksohormonu, było podnoszone przez *Kampschmidt* i *Schultz* (14, 15). Pogląd ten został zakwestionowany przez wielu badaczy. *Matsuoka* i wsp. (22) dodawali do wolnej od bakterii tkanki nowotworowej 1mg bakterii *Salmonella* na 1g tkanki. Wyodrębniono następnie toksohormon z tkanki nowotworowej zawierającej bakterie oraz wolnej od nich i wykazano brak istotnych różnic w aktywności i wydajności.

Nixon i *Zinman* (32) wyodrębnili toksohormon z absolutnie sterylnych guzów nowotworowych w warunkach ściśle aseptycznych. Surowy preparat otrzymany wg metody *Yunoki* i *Griffina* (42) rozdzielono następnie na *Amberlite XE 64* na 5 frakcji. Krzywą elucji przedstawia rysunek 1.



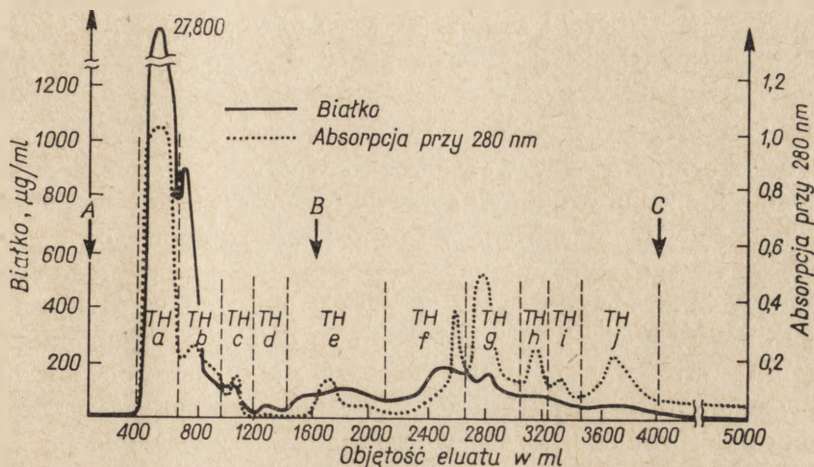
Rys. 1. Profil elucji z *Amberlite XE-64* preparatu toksohormonu z ludzkiej śledziony białaczkowej

Elucja początkowo buforem; glicyna — 0,1M NaCl, pH 9,4, od punktu A — wzrastający gradientem NaOH, od punktu B — roztworem 0,1n NaOH; wg (32)

Każda z w/w frakcji rozdzielala się następnie na *Sephadex G25* na trzy podfrakcje. Tak otrzymane preparaty wykazywały niejednakową aktywność w obniżaniu poziomu żelaza surowicy *in vivo*, przy czym najaktywniejsza frakcja powodowała znamienne obniżkę w dawce rzędu 100 μ g.

Ci sami autorzy (32) rozdzielili surowy preparat toksohormonu na *DEAE*-celulozie na 10 frakcji, z których każda mogła być podzielona

na podfrakcje drogą filtracji przez *Sephadex G25*. Profil elucji z *DEAE*-celulozy przedstawia rysunek 2.



Rys. 2. Profil elucji z *DEAE*-celulozy preparatu toksohormonu wyizolowanego z ludzkiej śledziny białaczkowej

A — eluowano buforem octanowym w gradiencie od 0,05M do 0,1M, B — zwiększono gradient tegoż buforu od 0,1M do 1M, C — eluowano buforem 1M; wg (32)

Znamienną obniżkę żelaza surowicy dawało 6 otrzymanych w ten sposób podfrakcji w dawkach 100µg. Na marginesie tych doświadczeń warto zauważyć, że sam octan sodu zastrzyknięty dootrzewnowo szczurowi powodował pewną obniżkę poziomu żelaza w surowicy. Stawia to pod znakiem zapytania przynajmniej część wyników w/w autorów, gdyż pewne frakcje były zanieczyszczone octanem sodu, używanym w toku preparowania.

Ostateczne wykluczenie udziału bakterii w wytwarzaniu toksohormonu przyniosły doświadczenia przeprowadzone na myszach absolutnie wolnych od bakterii i ich przetrwalników (30). Po zaszczepieniu takich zwierząt nowotworem w warunkach sterylnych można było po pewnym czasie wyodrębnić z rozwijających się guzów konwencjonalny preparat toksohormonu.

Również wirusy nie mają prawdopodobnie zdolności wytwarzania lub stymulowania produkcji toksohormonu w tkance nowotworowej (34).

Jak widać z przytoczonych przykładów metod otrzymywania toksohormonu, wybór metody ma istotne znaczenie dla biologicznej aktywności preparatu.

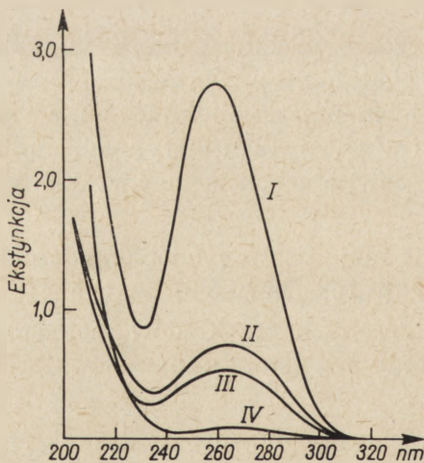
Szczegółowe badania porównawcze w tym kierunku przeprowadził Hozhizima (10). W jego doświadczeniach toksohormon wyodrębniony przy zastosowaniu ekstrakcji metanolem i kwasem octowym wg metody Ono (36), powodował równoległe obniżenie aktywności katal-

lasy, zawartości żelaza niehemowego (ferrytyny) i kwasu L-askorbinowego w wątrobie myszy. Natomiast preparat przygotowany dawniejszą metodą precypitacji alkoholem wg Nakahara i Fukuoka (26) nie wpływał na stężenie kwasu L-askorbinowego w wątrobie. Ten ostatni preparat powodował wprawdzie obniżkę poziomu katalazy i ferrytyny w wątrobie, jednak zmiany tych czynników nie były równoległe. Na marginesie tych doświadczeń warto zauważyć, że zmiany poziomu kwasu L-askorbinowego w wątrobie pod wpływem toksohormonu mogą mieć związek z zaburzeniami w syntezie ferrytyny, która na etapie wbu-dowywania żelaza wymaga właśnie kwasu L-askorbinowego.

Z powyższego przeglądu wynika, że dawniej stosowane metody otrzymywania toksohormonu dawały preparaty aktywne w dawkach rzędu 1 mg. Nowsze metody z zastosowaniem chromatografii na jonitach (42) lub sączenia przez *Sephadex* (41) zwiększyły aktywność biologiczną preparatów około 1000 razy. Najczystsze frakcje chromatograficzne toksohormonu dają 50% obniżki aktywności katalazy w wątrobie już w dawkach rzędu 0,001 mg.

III. Właściwości chemiczne toksohormonu

Dostatecznie oczyszczone preparaty toksohormonu udało się uzyskać dopiero niedawno i dlatego niewiele wiadomo o jego właściwościach. Najwcześniej zainteresowano się własnościami optycznymi i stwierdzono, że widmo absorpcji preparatu toksohormonu zmienia się w miarę uwalniania go od kwasów nukleinowych (rysunek 3).



Rys. 3. Krzywe absorpcji w UV dla RNA i frakcji toksohormonu wg (36)

I — RNA, II — surowy toksohormon bez frakcji TO, III — surowy toksohormon, IV — frakcja TO, stężenie próbek wynosiło 0,1 mg/ml

Skład aminokwasowy i lipidowy frakcji toksohormonu, uzyskanej na kolumnie z *Amberlite XE64* badali Yunoki i Griffin (42). Około 80% przypadło na polipeptydy, przy czym najwięcej znaleziono w nich leucyny, alaniny, kwasu glutaminowego i asparaginowego. Niewielka była zawartość tyrozyny i fenyloalaniny, nie stwierdzono tryptofanu. Pozostałe 20% stanowiły fosfolipidy, wśród których występowało około 20% tłuszczowców obojętnych i 80% lipidów polarnych. W skład lipidów polarnych wchodziły: cefaliny, lecytyny, sfingomieliny i lizolecytyny, w skład tłuszczowców obojętnych: estry trójglicerydów i cholesterolu. Określono też niektóre właściwości fizyczne tej frakcji. Maksimum absorpcji przypadło przy 220nm, natomiast zarówno przy 260 jak i 280nm absorpcja była niewielka. Próba ultrawierowania dała rozmyty kształt krzywej sedymentacji, na podstawie której można jednak sądzić o niewielkim ciężarze cząsteczkowym frakcji. Oznaczenia N-końcowego aminokwasu doprowadziły do ustalenia, że jest nim arginina. Ciężar cząsteczkowy obliczony na podstawie zawartości N-końcowej argininy wynosił dla poszczególnych frakcji: 4 200, 5 700 i 6 400. Enzymatyczna lub kwasowa hydroliza frakcji toksohormonu udowodniła, że dla jego aktywności istotna jest nienaruszona struktura peptydowa. Rola komponenty lipidowej w aktywności toksohormonu nie została ostatecznie ustalona.

Zgodne z wynikami Yunoki i Griffina (42) są również oznaczenia ciężarów cząsteczkowych frakcji toksohormonu z czerniaka uzyskane w naszej pracowni (41). Wstępne ustalenia dla niektórych frakcji rozdzielonych sączeniem przez *Sephadex* dały następujące przykładowe wartości: 5 000, 9 000, 12 000.

Nakahara i Fukuoka (28) są zdania, że istnieją dializujące formy toksohormonu. Autorzy poddali dializie wyciąg wodny z tkanki nowotworowej i stwierdzili, że dializat powodował obniżkę katalazy wątrobowej w dawce 50mg. Niedializująca część materiału z tkanki nowotworowej poddawana była następnie trawieniu papainą lub pepsyną. Po trawieniu uzyskiwano dalsze porcje dializującej formy toksohormonu o aktywności równorzędnej z pierwszym dializatem. Autorzy sugerują, że dializująca postać toksohormonu stanowi podstawową formę tej substancji, z której powstawać mogą wtórnie agregaty niedializujące.

Topografią toksohormonu w komórce nowotworowej interesowali się Nakagawa i Nakagawa (24). Główną część toksohormonu stwierdzono w supernatancie mikrosomalnym, natomiast frakcja jądrowa i mitochondrialna były praktycznie nieaktywne.

IV. Biosynteza toksohormonu

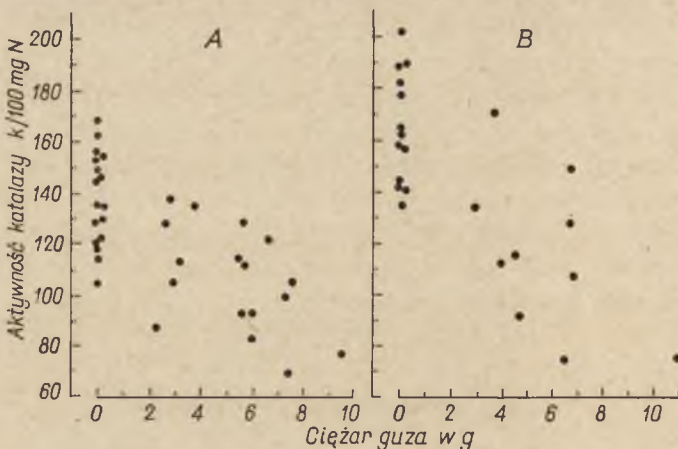
Nakahara i Fukuoka (29) wykazali, że podczas inkubacji skrawków tkanki nowotworowej z dodatkiem aminokwasów i ATP po-

wstają substancje o aktywności toksohormonalnej, podczas gdy w analogicznym układzie kontrolnym z normalną tkanką takich substancji nie stwierdzono. Ze względu na małą wydajność wyniki te były trudne do powtórzenia a ponadto autorzy nie mogli wyizolować powstającej aktywnej frakcji. W powyższym doświadczeniu użyto następującego zestawu aminokwasów: 1mg alaniny, proliny, argininy, fenyloalaniny i kwasu asparaginowego, 1mg lizyny i tyleż leucyny oraz 4mg kwasu glutaminowego. Zestaw powyższy dobrano na tej podstawie, że powodował on wzrost aktywności toksohormonu w tkance nowotworowej *in vivo*.

Na uwagę zasługuje krótkie doniesienie Olivaresa i wsp. (35) na temat obecności czynnika podobnego do toksohormonu w autolizatach normalnych tkanek zwierzęcych jak mięsień, wątroba, nerka i płuca. Czynniki wyodrębnione z 96-godzinnego autolizatu obniżały aktywność katalazy wątrobowej *in vivo* w dawkach 25mg. Analogiczne preparaty z tkanek nie poddanych autolizie nie przejawiały żadnej aktywności depresyjnej, nawet w podwójnych dawkach. Autorzy sugerują, że procesy autolizy mogą być także przyczyną pojawiania się toksohormonu w nowotworach.

Również Nixon i Zinman (32) wyodrębnili drogą chromatografii na Amberlite XE64 z normalnej ludzkiej śledziony dwie frakcje, które powodowały, podobnie jak toksohormon, obniżkę poziomu żelaza w osoczu. Natomiast ze śledziony białaczkowej otrzymali 5 frakcji, lecz o znacznie większej aktywności. Podobne wyniki podają Yunoki i Griffin (43), posługując się tą samą metodą i tym samym materiałem.

Powyższe obserwacje zdają się wskazywać, że nowotwór jest głównym, lecz nie wyłącznym producentem toksyn, wywołujących depresję katalazy. Pewne wątpliwości budził fakt, że większość prac nad tokso-



Rys. 4. Aktywność katalazy wątrobowej u myszy ze spontanicznym nowotworem sutka (A) oraz z nowotworem indukowanym 20-metylocholantrinem (B); wg (31)

hormonem wykonano na przeszczepialnych guzach nowotworowych paszowanych na zwierzętach laboratoryjnych. Jednakże Nakahara i wsp. (31) wykazali obniżenie aktywności katalazy w wątrobie również w układzie autochtonicznym — u zwierząt ze spontanicznym, względnie indukowanym chemicznie, ale pierwotnym nowotworem. W obu przypadkach stwierdzono wyraźną, progresywną depresję katalazy wątrobowej w zależności od ciężaru guza (rysunek 4).

Wyodrębniony z autologicznych guzów nowotworowych preparat toksohormonu zastrzyknięty myszy zdrowej dawał również obniżkę katalazy w wątrobie.

V. Toksohormon jako czynnik humoralny

Zdalny efekt obniżania aktywności katalazy wątrobowej przez toksohormon wymaga przyjęcia hipotezy humoralnego przenoszenia tego czynnika.

Lucke i wsp. (19) stwierdzili metodą parabiozy, że aktywność katalazy wątrobowej jest obniżona u obu partnerów parabiotycznych w jednakowym stopniu, mimo że tylko jeden z partnerów był nosicielem nowotworu.

Dotychczas nie udało się wyodrębnić toksohormonu z krwi zwierząt chorych na nowotwór, zapewne ze względu na bardzo małe jego stężenie w krwi, nie wykrywalne obecnymi metodami. Jednak dyfundowanie toksohormonu do płynów ustrojowych wyraźnie stwierdza się w przypadku nowotworów wysiękowych.

Masamune i wsp. (20, 21) wyodrębnili z płynu różnych nowotworów wysiękowych glikoproteidy, wykazujące wyraźny efekt toksohormonalny w wątrobie *in vivo*. Płyny wysiękowe były zagęszczane pod próżnią a następnie wytrącano z nich osad toksohormonu nadmiarem alkoholu. Dalsze oczyszczenie osiągnięto przez frakcjonowanie roztworem siarczanu amonu. Z 1 litra płynu wysiękowego otrzymano około 1mg preparatu homogennego w ultrawirówce i w elektroforezie. Zawierał on 13,5% azotu, 1,5% heksozoaminy, 1,3% mannozy oraz 0,6% glukozy. Aktywność toksohormonalną w teście katalazowym wykazywały dawki 5mg.

Przeprowadzono również próby wyodrębnienia substancji o aktywności toksohormonalnej z moczu chorych na nowotwór. W tym celu Nakagawa (23) zastosował wytrącanie benzoesanem sodu przy pH 4—4,3. Po ekstrakcji osadu acetonem a potem eterem, preparat rozpuszczano w rozcieńczonym NaOH, zobojętniano i wytrącano etanolem. Produkt wyodrębniony z około 200ml moczu wystarczał do uzyskania pozytywnego efektu toksohormonalnego w teście wątrobowym. Z moczu normalnego nie udaje się otrzymać podobnego produktu.

Sato i Yunoki (39) zastosowali do wyodrębniania substancji aktywnej toksohormonalnie z moczu metodę adsorpcji na kaolinie. Substancje zaadsorbowane na kaolinie eluowano przy pH 9, eluat zakwaszano do pH 5 i wytrącano z niego aktywną substancję 4-krotną objętością acetonu. Preparat dawał wyraźny efekt w teście wątrobowym. Gdy w ten sam sposób preparowano mocz pacjentów, którym nowotwór został usunięty operacyjnie, efektu wątrobowego nie stwierdzono. Autorzy uważają, że wyodrębniony przez nich czynnik z moczu jest identyczny z toksohormonem z guza nowotworowego.

VI. Hamowanie syntezy katalazy pod wpływem toksohormonu

Już Greenstein w roku 1943 (8) zauważył, że w warunkach *in vitro* w obecności wyciągów lub skrawków tkanki nowotworowej nie stwierdza się hamowania katalazy. Endo i wsp. (4) sprawdzali wpływ toksohormonu na krystaliczną katalazę. Z preparatem toksohormonu, który w dawkach 10mg powodował obniżenie aktywności katalazy w wątrobie myszy *in vivo*, inkubowano krystaliczną katalazę przez 2 godz. w temp. 0° i nie stwierdzono hamowania jej aktywności. Sprawdzone również, że *in vitro* szybkości spontanicznej inaktywacji katalazy z wątroby zwierzęcia chorego na nowotwór i wątroby normalnej wyrażone w postaci stałej k , były praktycznie jednakowe (8).

Najbardziej prawdopodobnym mechanizmem działania toksohormonu wydaje się zatem jego wpływ na syntezę katalazy *in vivo*.

Price (38) oraz Hozumi i Sugimura (13) przeprowadzali porównawcze badania nad hamowaniem biosyntezy katalazy wątrobowej u myszy i stwierdzili niemal identyczne stałe reakcji dla następujących inhibitorów: 3-amino-1,2,4-triazolu, alliloizopropyloacetamidu i alliloizopropyloacetylokarbamidu. Hozumi i Sugimura (13) porównali efekt toksohormonu i wymienionych inhibitorów. Niskocząsteczkowe inhibitory powodowały całkowite zablokowanie syntezy, natomiast toksohormon doprowadzał najwyżej do 50%-ego spadku poziomu katalazy. Podawano też zwierzętom równocześnie inhibitory allilowe i dawkę toksohormonu, wystarczającą do spowodowania depresji katalazy wątrobowej. Po 24 godz. od podania łącznie alliloizopropylo-acetamidu i toksohormonu, aktywność katalazy była niższa, niż w przypadku podania samego inhibitora allilowego. Z kolei doprowadzono do zera poziom katalazy w wątrobie myszy wstrzykując 3-amino-1,2,4-triazol w dawce 1g/1kg wagi ciała a następnie badano wpływ podawania oczyszczonego preparatu toksohormonu na szybkość regeneracji katalazy. Toksohormon podawano przez 5 dni w dawkach wystarczających do wywołania depresji katalazy wątrobowej. U zwierząt, którym podano wyłącznie inhibitor triazolowy regeneracja normalnego poziomu katalazy po 96 godz. osiągnęła

stan bliski normy ($k = 2$). U zwierząt, którym podano inhibitor triazolowy a następnie toksohormon, poziom katalazy po 96 godz. był znacznie niższy (wartość $k = 1,5$). Wyniki te przemawiają za blokowaniem syntezy katalazy przez toksohormon.

Hozumi i wsp. (11) podjęli próbę udowodnienia tezy, że obniżka aktywności katalazy wątrobowej pod wpływem toksohormonu jest proporcjonalna do aktualnego stężenia białka enzymu katalazy w wątrobie. Posługiwano się metodą ilościowej immunochemicznej precypitacji. Surowicę antykatalazową otrzymano przy użyciu oczyszczonego preparatu katalazy wątrobowej mysiej. Z surowicy tej wyodrębniono frakcję γ -globulinową metodą chromatografii na DEAE-celulozie. W konwencjonalnym teście wątrobowym wprowadzono dawkę 20mg preparatu toksohormonu, obniżając aktywność katalazy ze 183 do 125 jednostek. Zawartość białka katalazowego w wątrobie, oznaczona równocześnie metodą precypitacyjną, obniżała się z 91,3 μ g N do 68,9 μ g. Gdy dawkę toksohormonu podwyższono do 30 μ g, aktywność katalazowa malała średnio do 110 jednostek, zaś ilość precypitującej katalazy — do 59,7 μ g N. W badanym zakresie udowodniono zatem zależność proporcjonalną obu tych wielkości.

Obara i Ono (33) przeprowadzili doświadczenia modelowe nad wpływem toksohormonu na metabolizm białkowy *in vitro*. W układzie zawierającym toksohormon, radioaktywną leucynę i roztwór Krebsa-Ringera inkubowano przez 90 min. w temperaturze 37° świeżo wyluskaną soczewkę z oka szczura. Surowy preparat toksohormonu był przygotowywany metodą Nakahara i Fukuoka (26) a następnie znacznie oczyszczony wg metody Ono (36) i wreszcie frakcjonowany na karboksymetylocelulozie. Sprawdzone przedtem zdolność tego preparatu do znamienego obniżania *in vivo* katalazy w wątrobie. W opisanym układzie *in vitro* włączanie znacznej leucyny do soczewki oka zmniejszało się proporcjonalnie do ilości wprowadzonego preparatu toksohormonu. Skutki takie obserwowano w pewnych granicach stężeń toksohormonu, przy czym wyraźny efekt powodowała dawka 40 μ g/ml.

Fujii i wsp. (5) wykazali, że preparat toksohormonu obniża nie tylko poziom katalazy ale także i pirolazy tryptofanowej w wątrobie. Od dawna wiadomo, że pirolaza tryptofanowa w wątrobie daje się wydatnie indukować przez dootrzewnowe podanie kortyzonu (16, 18). Jednakże u szczurów z wątrobiakiem indukcji takiej nie daje się stwierdzić (3).

Te spostrzeżenia były punktem wyjścia w doświadczeniach Shiba i wsp. (40), którzy zastosowali technikę perfuzji izolowanej wątroby szczura do badania indukcji pirolazy tryptofanowej pod wpływem hydrokortyzonu i toksohormonu. Gdy w 60ml krwi rozpuszczono 3mg tego hormonu i prowadzono perfuzję normalnej wątroby przez 6 godz., uzyskano 4-krotny wzrost aktywności pirolazy tryptofanowej. W tych sa-

mych warunkach perfuzji poziom pirolazy w wątrobie wyizolowanej ze szczura z mięsakorakiem Walkera nie ulegał podwyższeniu. Również wprowadzenie preparatu tokshormonu do krwi podczas perfuzji znosiło indukujący wpływ hydrokortyzonu na pirolazę w wątrobie normalnej. Podobne efekty uzyskiwał w doświadczeniach z puromycyną Green-gard (7), który stwierdził, że ten antymetabolit syntezy białka znosi indukujący wpływ kortyzonu na pirolazę tryptofanową.

W dawniejszej literaturze (6) spotyka się sugestie na temat zaburzeń metabolizmu ferroporfiryn w chorobie nowotworowej. Ono i wsp. (37) stwierdzili u szczurów z przeszczepialnym mięsakiem znaczny wzrost zawartości wolnej protoporfiryny w wątrobie (około 87%), a podawanie toksohormonu w dawkach wywołujących depresję katalazy powodowało zwyżkę poziomu wolnej porfiryny w wątrobie (średnio o 40%). Niezależnie od tego obserwowano wzrost poziomu porfiryny w gruczole Harderiana i koproporfiryny w moczu. Natomiast nie udało się wykazać wpływu toksohormonu na zawartość porfiryny w normalnych erytrocytach, co można tłumaczyć większą trwałością biologiczną hemoglobiny w porównaniu z katalazą. Jednakże u zwierząt z nowotworem z towarzyszącą anemią stwierdzono wzrost wolnej porfiryny w erytrocytach.

Spostrzeżenia te wymagają dalszego potwierdzenia, gdyż znane są poglądy przeciwne. Np. Hozumi i Ohashi (12) twierdzą, że toksohormon nie hamuje wbudowywania Fe do protoporfiryny ani *in vivo*, ani *in vitro*.

LITERATURA

1. Barkan G., Walker B. S., *J. Biol. Chem.* **135**, 37 (1940).
2. Blumenthal F., Brahn B., *Z. Krebsforsch.* **8**, 436 (1910).
3. Cho Y. S., Pitot H. C., Morris H. P., *Cancer Res.* **24**, 52 (1964).
4. Endo H., Sugimura T., Ono T., Konno K., *Gann* **46**, 51 (1955).
5. Fujii S., Kawachi T., Okuda H., Haga B., Yamamura Y., *Gann* **51**, 223 (1960).
6. Fukuoka F., Nakahara W., *Gann* **42**, 55 (1951).
7. Greengard O., Smith M. A., Acs G., *J. Biol. Chem.* **238**, 1548 (1963).
8. Greenstein J. P., *J. Nat. Cancer Inst.* **5**, 397 (1943).
9. Greenstein J. P., Jenrette W. V., What J., *J. Nat. Cancer Inst.* **2**, 283 (1941).
10. Hoshizima H., *Gann* **49**, 171 (1958).
11. Hozumi M., Matsuoka K., Sugimura T., *Gann* **58**, 555 (1967).
12. Hozumi M., Ohashi M., *Gann* **52**, 327 (1961).
13. Hozumi M., Sugimura T., *Gann* **53**, 183 (1952).
14. Kampschmidt R. F., *Cancer Res.* **25**, 34 (1965).
15. Kampschmidt R. F., Schultz G. A., *Cancer Res.* **23**, 751 (1963).
16. Knox W. E., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **32**, 462 (1951).
17. Knox W. E., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, tom II, str. 242.

18. Knox W. E., Auerbach V. H., *J. Biol. Chem.* **211**, 307 (1955).
19. Lucke B., Berwick M., Zeckwer I., *J. Nat. Cancer Inst.* **13**, 681 (1962).
20. Masamune H., Kamiyama S., Abe S., Haga M., Kaketa H., *Tohoku J. Exptl. Med.* **69**, 245 (1959).
21. Masamune H., Tsuiki S., Kamiyama S., Haga M., Kawasaki H., Kaketa H., Abe S., *Tohoku J. Exptl. Med.* **67**, 309 (1953).
22. Matsuoka K., Hozumi M., Koyama K., Kawachi T., Nagao M., Sugimura T., *Gann* **55**, 411 (1964).
23. Nakagawa S., *Proc. Japan Acad.* **28**, 305 (1952).
24. Nakagawa S., Nakagawa S., *Proc. Japan Acad.* **32**, 298 (1956).
25. Nakahara W., w *Methods in Cancer Research*, Academic Press, New York 1967, str. 203.
26. Nakahara W., Fukuoka F., *Japan Med. J.* **1**, 271 (1948).
27. Nakahara W., Fukuoka F., *Gann* **40**, 45 (1949).
28. Nakahara W., Fukuoka F., *Gann* **45**, 67 (1954).
29. Nakahara W., Fukuoka F., *Gann* **45**, 77 (1954).
30. Nakahara W., Hozumi M., Pollard M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **123**, 124 (1966).
31. Nakahara W., Tanaka T., Tokuzen R., Fukuoka F., *Gann* **57**, 621 (1966).
32. Nixon J. C., Zinman B., *Can. J. Biochem.* **44**, 1069 (1966).
33. Obara K., Ono S., *Yokohama Med. Bull.* **16**, 237 (1965).
34. Ohashi M., *Gann* **52**, 179 (1961).
35. Olivares J., Callao V., Montoya E., *Science* **157**, 327 (1967).
36. Ono T., Sugimura T., Umeda M., *Gann* **46**, 617 (1955).
37. Ono T., Umeda M., Sugimura T., *Gann* **47**, 171 (1956).
38. Price V. E., Rechcigi M. Jr., Hartly R. W. Jr., *Nature* **189**, 62 (1961).
39. Sato H., Yunoki K., *Acta Med. Univ. Kagoshima* **1**, 50 (1958).
40. Shiba S., Matsuyoshi H., Miyatake M., *Gann* **56**, 121 (1965).
41. Trojanowski J., Benesz M., Grabowska A., *Materiały VII Zjazdu PTBioch.*, Wrocław 1969, str. 104.
42. Yunoki K., Griffin A. C., *Cancer Res.* **20**, 537 (1960).
43. Yunoki K., Griffin A. C., *Cancer Res.* **21**, 533 (1961).

KRYSTYNA KONOPKA*

Funkcja transferryny

Function of Transferrin

The present state of knowledge concerning the structure and the function of transferrin is reviewed.

Badania budowy i funkcji białek stanowią istotny etap wyjaśniania mechanizmu ich działania, a co za tym idzie ich biologicznego znaczenia. Stosunkowo mało wiadomo jednak o grupie białek osocza biorących w ustroju udział w transporcie substancji o małym ciężarze cząsteczkowym. Duże zainteresowanie w tej grupie białek budzi transferryna (Tf), która jest nośnikiem transportującym żelazo od miejsc absorpcji jelitowej i rozpadu Hb do szpiku i innych tkanek wymagających żelaza oraz do magazynów tkankowych, a u kobiet ciężarnych do łożyska. Ostatnie badania struktury i funkcji tego białka wykazały, że nie jest ono jedynie biernym nośnikiem, ale odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu Fe (28).

I. Właściwości transferryny

Obecność w osoczu białka odznaczającego się zdolnością wiązania żelaza wykazali Holmberg i Laurell (41) oraz Schade i Caroline (91). Przypuszczali oni, że odgrywa ono rolę w transporcie żelaza w ustroju i reguluje wchłanianie tego pierwiastka w przewodzie pokarmowym. W 1947 roku białko to otrzymano po raz pierwszy w formie krystalicznej (95) i nazwano je transferryną lub siderofiliną (59).

Transferryna jest β_{15} -globuliną osocza o ciężarze cząsteczkowym 73 200 — 76 000 (87) zawierającą 15,4% azotu i 5,9% węglowodanów (9).

Punkt izoelektryczny znajduje się w pH 5,9 (59). 1mg białka zawiera

* Lek. med, mgr biochemii, Dział Laboratoryjny Stacji Krwiodawstwa, Łódź

Wykaz stosowanych skrótów: L.I.B.C. — utajona zdolność wiązania żelaza przez białka surowicy (ang. *latent iron binding capacity*), T.I.B.C. — całkowita zdolność wiązania żelaza przez białka surowicy (ang. *total iron binding capacity*), Tf — transferryna, Tf(Fe) — kompleks transferryny z jednym atomem żelaza, Tf(Fe)₂ — kompleks transferryny z dwoma atomami żelaza, USS — układ siateczkowo-śródbłonkowy

1,25 — 1,35 μ g Fe (81). Cząsteczka bezbarwnej apotransferryny ma dwa oddzielne miejsca wiązania żelaza, z których każde zdolne jest do przyłączenia jednego atomu Fe³⁺ (22). Odległość między atomami żelaza w kompleksie Tf(Fe)₂ wynosi ponad 9 Å, co wyklucza możliwość ich interakcji (1). Kompleks transferryny z żelazem ma intensywne różowe zabarwienie z maksimum absorpcji przy 470nm (1). Cząsteczka Tf może przyłączać także jony Cu²⁺, Mg²⁺ i Zn²⁺, ale trwałość uzyskanych kompleksów jest niewielka (1, 55, 59, 80, 99). Część węglowodanowa transferryny zawiera kwas sialowy, galaktozę, mannozę i heksozoaminę w stosunku molowym 4:8:4:8 (93). Nie wyjaśniono dotychczas roli czterech bocznych łańcuchów kwasu sialowego, które znajdują się w cząsteczce Tf (43). Analizę składu aminokwasowego ludzkiej transferryny przeprowadzili P a r k e r i B e a r n (75) oraz R o o p (88). Pod wpływem 8M roztworu mocznika cząsteczka Tf ulega dysocjacji na dwie różne podjednostki, których ciężar cząsteczkowy równa się w przybliżeniu połowie ciężaru natywnej cząsteczki. N-końcowymi aminokwasami otrzymanych podjednostek są walina i seryna (50, 51). W a n g i S u t t o n (100) sugerują, że podjednostki różnią się między sobą składem aminokwasowym i każda z nich może przyłączać jeden atom Fe³⁺. Wartości pK stałych równowagi reakcji wiązania żelaza dla tych podjednostek wynoszą: pK₁ = 27,7 i pK₂ = 30,3 przy pH 7,4 (19). Kompleks transferryny z żelazem, stabilny w zakresie pH 7,5 — 10,0, dysocjuje w pH 4,0 (80).

Ponieważ w osoczu ilość miejsc wiążących Fe transferryny jest większa od ilości jonów tego metalu, toksyczne żelazo jonowe w warunkach prawidłowych w osoczu nie występuje (32). W wiązaniu Fe od obu podjednostek biorą prawdopodobnie udział trzy cząsteczki tyrozyny i dwie histydyny (1, 97), ale oba miejsca wiążące mają odmienną budowę przestrzenną. Atomy Fe związane z transferryną nie ulegają wymianie pomiędzy sobą, ani w obrębie jednej cząsteczki ani między różnymi cząsteczkami Tf (27, 71, 96).

M o n t r e u i l i w s p . (66) wyosobnili białko o typie transferryny z mleka kobiecego i nazwali je laktosiderofiliną. Białko o bardzo podobnych właściwościach opisano także w płynie mózgowo-rdzeniowym (16, 29, 75). Białka wiążące żelazo występują również u minogów (8) i ryb (64), ale budowa ich nie jest dokładnie określona, natomiast białka w osoczu ptaków i ssaków są bardzo podobne do ludzkiej Tf (13, 44). Występująca w jajach konalbumina ma dwa miejsca wiązania Fe³⁺ (44, 102). Jest ona glikoproteidem o ciężarze cząsteczkowym 85 000, nie zawierającym kwasu sialowego (107).

Syntezę transferryny reguluje szereg allelicznych genów. Olbrzymia większość ludzi posiada genotyp Tf^C/Tf^C, czego przejawem fenotypowym jest obecność w surowicy pojedynczej frakcji transferrynowej tzw. transferryny C. Dotychczas opisano 17 rzadkich odmian Tf (4) różniących się ruchliwością elektroforetyczną na żelu skrobiowym. Do nieco częstszych

odmian należą jedynie B₂ (u białych), B₁₋₀ (u Indian), D₁ (u Murzynów) i D_{Chi} (u Chińczyków i Finów) (90). Różnice w budowie odmian transferryn odpowiadają mutacjom punktowym. Badając Tf D₁ metodą *finger printing* stwierdzono, że od prawidłowej Tf C różni się on jednym aminokwasem, a mianowicie miejsce kwasu asparaginowego w transferrynie C zajmuje reszta glicyny w Tf D₁ (100, 101). Mutacja w transferrynie B₂ dotyczy innego punktu łańcucha i polega na podstawieniu reszty glicyny resztą kwasu glutaminowego, a w Tf D_{Chi} na podstawieniu histydyny lizyną lub arginina (101). Zdolność wiązania żelaza przez różne odmiany transferryny jest jednakowa.

Brak transferryny w surowicy (atransferrynemia) jest rzadkim zaburzeniem genetycznym, opisanym dotychczas w pojedynczych przypadkach (14, 38, 85). Na obraz kliniczny atransferrynemii składa się niedokrwistość z niedoboru Fe i hemosyderoza. U osobników heterozygotycznych nie stwierdzono objawów klinicznych, pomimo obniżenia zawartości Tf w osoczu (9).

II. Tkankowe magazyny żelaza

Organizm ludzki zawiera 3—5g żelaza. W przewodzie pokarmowym wchłania się dziennie 0,6 do 1,8mg Fe, co stanowi 11⁰/₀—14⁰/₀ żelaza pochodzenia pokarmowego. W tym samym czasie całkowite wydalanie Fe z organizmu wynosi 0,5 do 1,0mg. U kobiet miesiączkujących ilość ta wzrasta średnio o 0,7mg, co powoduje dwu lub trzykrotne zwiększenie absorpcji jelitowej Fe (67). Na żelazo tkankowe składa się Fe funkcyjne (Hb, mioglobina, enzymy o budowie żelazoprotein) oraz Fe magazynowe (ferrytyna, hemosydera) (2, 103).

1. Ferrytyna

Ferrytyna występuje głównie w wątrobie, śledzionie, nerkach i błonie śluzowej jelit. Nie ma jej w krwi obwodowej w stanach prawidłowych (2, 103). Ferrytyna jest rozpuszczalnym w wodzie połączeniem apoferrytyny z Fe³⁺. Apoferrytyna jest γ_1 -globuliną zbudowaną z 18—20 podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 25 000 (103). Wewnątrz białkowej otoczki znajdują się micide złożone z Fe, Fe(OH)₃ i fosforanów o składzie (FeOCH)₈ (FeOPO₃H₂) (35). Ciężar cząsteczkowy ferrytyny zależy od zawartości żelaza i dla frakcji bogatych we Fe wynosi 800 000—860 000 (103).

2. Hemosydera

Hemosydera jest nierozpuszczalna w wodzie, zawiera 7,5⁰/₀—45,0⁰/₀ Fe³⁺ pod postacią Fe(OH)₃. W skład ziaren hemosyderyny wchodzi kil-

ka białek, między innymi apoferrytyna, oraz kwasy tłuszczowe, cholesterol, węglowodany i związki o budowie hemowej (103). Przypuszcza się, że ziarna hemosyderyny mogą być przeładowanymi żelazem organellami komórkowymi, na przykład mitochondriami (63). Natomiast Shoden i Sturgeon (94) zdefiniowali hemosyderynę wątroby królika jako amorficzne zagęszczenie cząsteczek zawierających głównie $\text{Fe}(\text{OH})_3$ w agregacie białkowym, które powstaje, być może w wodniczkach podczas rozpadu białkowej części ferrytyny.

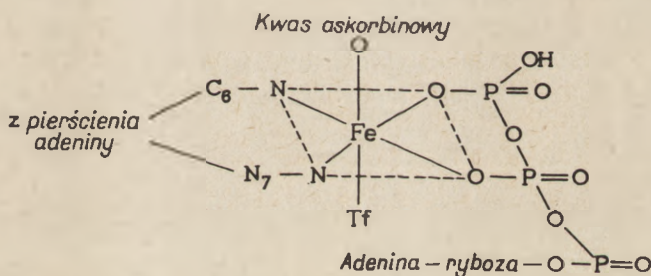
III. Wbudowywanie żelaza do tkanek

W warunkach prawidłowych około 90% Fe pobieranego przez dojrzewające w szpiku krwinki czerwone pochodzi z erytrocytów, które ulegają rozpadowi w układzie siateczkowo-śródbłonkowym (USS) głównie wątroby i śledziony (52). Wymiana żelaza między hemoglobina a magazynami jest bardzo powolna. Fe pochodzące z rozpadu hemu jest częściowo magazynowane w komórkach USS pod postacią ferrytyny, ale etap ten jest ściśle sprzężony z wymaganiami erytropoezy. Opisane przez Bessis i Breton-Gorius (5) zjawisko rofeocytozy odgrywa w warunkach prawidłowych niewielką rolę w przenoszeniu Fe do dojrzewającej krwinki. Zail i wsp. (110) wykazali, że zawiesina szpiku, podobnie jak wyodrębnione retikulocyty, może syntetyzować ferrytynę z zewnątrzkomórkowych aminokwasów i żelaza związanego z Tf. Synteza ta zachodzi w obrębie stromy krwinki. Pojawienie się ferrytyny w obwodowej części erytroblasta nie jest więc dowodem, że nastąpiło przeniesienie ferrytyny z komórek USS na drodze rofeocytozy. W erytrocytach krążących ferrytyny nie zidentyfikowano.

1. Mechanizm uwalniania żelaza z transferyny

Wiadomo obecnie, że Tf przekazuje Fe niedojrzalej krwince czerwonej w sposób, umożliwiający jego wykorzystanie do budowy hemu a jednocześnie zapobiegający niepotrzebnej, a prawdopodobnie i toksycznej, akumulacji Fe w dojrzałych erytrocytach. Hemolizaty retikulocytów mogą wbudowywać wolne Fe do hemu, ale nie zużywają żelaza związanego z Tf. Istotną rolę w mechanizmie uwalniania metalu z połączenia z białkiem odgrywa zatem błona komórkowa (25, 52). Podczas inkubacji retikulocytów i dojrzałych erytrocytów z FeCl_3 , żelazo jest pobierane z jednakową szybkością, ale nie jest silnie wiązane i wbudowywanie do hemu zachodzi z niską wydajnością. Proces ten ulega zahamowaniu pod wpływem związków chelatujących Fe (44). Natomiast Tf przekazuje żelazo tylko prekursorom erytrocytów (28, 58), w procesie tym nie pojawia się wolny jon Fe i związki chelatujące żelazo nie mają wpływu na po-

bieranie żelaza przez krwinki. Interesujące jest stwierdzenie, że komórki USS nie mogą pobierać Fe z Tf (110). Inkubując erytrocyty ze znakowanym kompleksem transferryiny z żelazem przekonano się, że na powierzchni niedojrzałych erytrocytów znajdują się specyficzne receptory dla Tf, których ilość zmniejsza się w czasie dojrzewania i znika całkowicie w krwinkach nie syntetyzujących Hb (45, 69). Natura i działanie tych receptorów nie jest znane, są one czułe na działanie trypsyny i wymagają do swojej czynności aktywności metabolicznej krwinki. Połączenie cząsteczki Tf z receptorem powoduje prawdopodobnie zmianę konformacji białka, która ułatwia przechodzenie Fe do komórki (efekt allosteryczny) (27, 28, 65). Mechanizm uwalniania Fe z transferryiny nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony (52, 72). Z badań Mazura i wsp. (62) nad wbudowywaniem Fe przez skrawki wątroby wynikałoby, że kwas askorbinowy i ATP tworzą z Fe kompleks, z którego metal jest bezpośrednio wbudowywany w cząsteczkę apoferryiny. Prawdopodobnie proces wiązania kompleksu transferryiny z żelazem z powierzchnią komórki nie wymaga ATP, natomiast usunięcie żelaza z tego kompleksu wymaga obecności związku o dużym powinowactwie do Fe. Związkiem tym może być ATP (34). Kwas askorbinowy działa przypuszczalnie jako czynnik redukujący Fe^{3+} związane z Tf. Powstaje kompleks: ATP, kwas askorbinowy i Fe, który zawiera 2 mole ATP na 1 mol kwasu askorbinowego (schemat 1).



Schemat 1. Budowa kompleksu: ATP-kwas askorbinowy-Fe według Mazura, Greena i Carletona (62)

Redukcja żelaza osłabia jego wiązanie z Tf i uwalnia kompleks Fe-ATP, który ulega dysocjacji, co jest połączone z reakcją rozpadu ATP, do ADP i uwolnieniem nieorganicznego fosforanu P_i . Natomiast cząsteczka Tf wraca do krążenia.

Morgan i Laurell (72) sugerowali podobny mechanizm dla prekursorów erytrocytów. Badali wpływ inkubacji z ATP i kwasem askorbinowym na wbudowywanie Fe do retikulocytów i ich cieni. W zastosowanych stężeniach ATP i kwas askorbinowy nie wywierały wpływu na pobieranie Fe przez nienaruszone retikulocyty (błona komórkowa krwinki jest nieprzepuszczalna dla nukleotydów), powodowały natomiast

znaczny wzrost inkorporacji do cieni krwinek. Wbudowywanie Fe do retikulocyty jest pobudzane przez glukozę i hamowane przez związki blokujące metabolizm węglowodanowy (44).

We wcześniejszych stadiach rozwoju erythrocyty włączanie żelaza może być szybsze niż synteza hemoglobiny, co stwarza względny nadmiar niehemowego Fe. W miarę dojrzewania krwinki pobieranie żelaza jest coraz wolniejsze, aż wreszcie ustaje całkowicie. Starsze retikulocyty nie włączają już Fe z Tf, ale są zdolne do syntezy hemu z zewnątrzkomórkowej glicyny, przy czym Fe mogłoby być dostarczane z „rezerwy” wewnątrzkomórkowej (72).

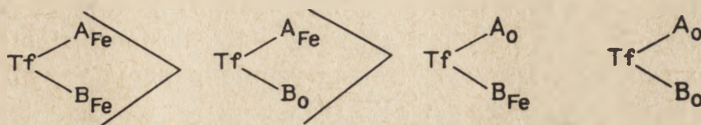
Ogólna ilość Tf krążącej w osoczu wynosi 7 do 10g, co odpowiada 3mg Fe (21). Z komórkami szpiku związane jest około 20mg transferryny, jej stężenie w krwi równa się 0,25g⁰/o (9). Ponieważ każda cząsteczka Tf połączona jest z powierzchnią komórki przez około 1 minutę, dzienny dopływ Fe do komórek erytroidalnych wynosi 30 do 40mg żelaza, co stanowi ilość 10 razy większą niż całkowita ilość Fe związana z transferryną w osoczu (28). Wielkość ta, nazwana osoczym transportem żelaza stanowi miarę aktywności erythropoetycznej szpiku. Okres półtrwania Fe w osoczu jest bardzo krótki; wynosi on 60 do 120 minut (92).

Los Fe po wbudowaniu do erythroblastu czy retikulocyty oraz natura żelazowych prekursorów hemu w obrębie krwinek czerwonych nie są dokładnie poznane (36, 61, 79, 110). Stroma dojrziałych, normalnych erythrocytów ludzkich zawiera około 1μg niehemowego Fe/ml masy krwinkowej (44). Część tego żelaza może być połączona z ATP w kompleks o wzorze (ATP)₂Fe (33, 54), ale rola tego połączenia nie jest dotychczas wyjaśniona.

2. Rola transferryny w regulacji metabolizmu żelaza

Badania nad mechanizmem działania Tf wykazały, że pewna ilość jej cząsteczek uwalniana z powierzchni retikulocyty zawiera nadal żelazo (71). Nasuwało to przypuszczenie, że tylko jeden z dwóch atomów Fe połączonych z cząsteczką Tf jest wbudowywany do krwinki. J a n d l i K a t z (45) stwierdzili, że kompleks transferryny z żelazem ma większe powinowactwo do receptorów na powierzchni retikulocyty niż cząsteczki apotransferryny. Prawdopodobnie jest to spowodowane zmianami konformacji w cząsteczce białka zachodzącymi po połączeniu z metalem, przy czym zmiany te zależą od ilości atomów Fe w kompleksie (27). Retikulocyty pobierają Fe z cząsteczek Tf(Fe)₂ 10 razy szybciej niż z Tf(Fe), co może być spowodowane różnicą w kształcie i ładunku cząsteczek. Hipotezę o odmienności strukturalnej obu miejsc wiążących żelazo także fakt, że Fe związane z jednym z dwóch miejsc wiążących żelazo jest wybiórczo wychwytywane przez krwinki. Jakkolwiek dane te po-

chodzą z doświadczeń *in vitro*, z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że zjawiska mają podobny przebieg *in vivo*. Żelazo osocza nie tworzyłoby zatem jednolitej puli (28). Jeżeli komórki szpiku pobierają Fe z jego kompleksu z Tf wybiórczo z jednego z miejsc wiążących, to rozmieszczenie żelaza w krążącej transferrynie winno zależeć od aktywności erytropoetycznej szpiku. Rozmieszczenie Fe w krążącym białku będzie odmienne w stanach wysokiej i niskiej aktywności erytropoetycznej, pomimo że % wysycenia Tf żelazem może być jednakowy. Jeżeli szpik jest aktywny, to większość cząsteczek jest połączona tylko z jednym atomem Fe, a miejsce „zorientowane” do erytroblastu pozostaje wolne (schemat 2).



Schemat 2. Rodzaje cząsteczek Tf uszeregowane według zmniejszającej się zdolności uwalniania Fe do prekursorów krwinek czerwonych według Fletchera i Huehnsa (28)

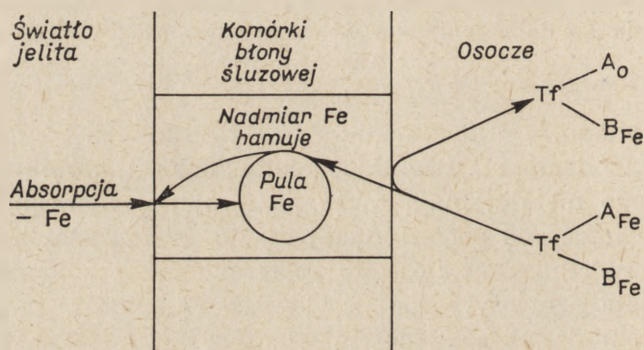
A i B — miejsca wiązania Fe, A — miejsce „zorientowane” do erytroblastu

Niewiele wiadomo o uwalnianiu Fe z Tf do innych tkanek biorących udział w metabolizmie Fe. Prawdopodobnie komórki, które mają zdolność pobierania tego metalu, mają także na swojej powierzchni receptory, których ilość zależy od potrzeb danej tkanki. W ten sposób ilość receptorów mogłaby regulować ilość Fe pobieraną przez komórkę. Komórki USS i dojrzałe erytrocyty nie posiadające receptorów na swojej powierzchni, nie mają także zdolności pobierania żelaza (28).

Specyficzną tkanką, która wymaga dużych ilości Fe i pobiera je z osocza, jest łożysko. Podczas ciąży poziom Fe w osoczu jest stały lub obniża się, a całkowita ilość Tf wzrasta dwukrotnie, co prowadzi do obniżenia % nasycenia białka żelazem (24, 68). Może to powodować większą mobilizację Fe z magazynów tkankowych i zwiększone wchłanianie Fe w jelitach. Znajdujące się w łożysku receptory mogą wiązać mniej nasyconą żelazem Tf bardziej wydajnie, niż receptory na powierzchni prekursorów erytrocytów. Mechanizm ten wyjaśnia ucieczkę Fe do płodu od matki, która sama znajduje się w stanie deficytu Fe (28). Po stronie płodowej łożyska poziom Fe w surowicy jest stosunkowo wysoki, a poziom Tf niski, co daje duży stopień nasycenia procentowego i sprzyja odkładaniu Fe w magazynach płodu (77). Ponieważ doświadczenia z transferryną znakowaną ¹³¹J wykazały że przez łożysko przechodzą bardzo niewielkie ilości Tf, żelazo musi być odłączone od matczynej transferryny i przeniesione do płodu poprzez jakiś pośredni system transportowy (20, 31).

Pozostałe dwa procesy związane z metabolizmem Fe, w których transferryna może odgrywać istotną rolę, to wchłanianie żelaza w przewodzie pokarmowym i magazynowanie Fe w tkankach. Przemiany zachodzące

w tych tkankach muszą być ze sobą w jakiś sposób powiązane. Podwyższona aktywność erytropoetyczna prowadzi do zwiększonej absorpcji Fe i do większej mobilizacji Fe z magazynów (11), a stan magazynów wpływa na wchłanianie żelaza w jelitach (74, 106). Poszukiwania czynnika humoralnego, który warunkowałby powyższe korelacje, nie dały rezultatu (6). Ponieważ jednak, jak zauważono poprzednio, erytropoeza i stan magazynów wpływają na rozmieszczenie Fe w krążącej Tf, Fletcher i Huehns (28) wysunęli hipotezę, że to właśnie usytuowanie atomów Fe w cząsteczce białka może być czynnikiem regulującym absorpcję Fe w przewodzie pokarmowym. Według tej hipotezy żelazo związane z transferyną, (tzw. *messenger iron*) może być bądź przekazywane magazynom ferrytynowym, jak na schemacie 3, bądź erytroblastom. Hipoteza ta rozszerza koncepcję *messenger iron* wysuniętą przez Weintrauba, Conrada i Crosby'ego (17, 104).



Schemat 3. Kontrola absorpcji żelaza przez Tf według Fletchera i Huehnsa (28)

A i B — miejsce wiązania Fe, A — miejsce „zorientowania” do erytroblastu

Fletcher i Huehns (27, 28) przypuszczali, że wbudowywana do ferrytyny w błonie śluzowej jelita frakcja Fe może być tą samą frakcją żelaza osocza, która jest wybiórczo wychwytywana przez krwinki — byłoby to Fe z miejsca A w kompleksie Tf(Fe)₂ (schemat 3). Zwiększona aktywność erytropoetyczna powoduje szybsze przechodzenie tej frakcji Fe do erytroblastów, a zatem zmniejsza ilość ferrytyny powstającej w komórkach błony śluzowej jelita, co z kolei pociąga za sobą większą absorpcję Fe. Z drugiej strony to miejsce wiążące żelazo w cząsteczce Tf, z którego metal jest wybiórczo wychwytywany przez niedojrzałe krwinki czerwone w szpiku, łatwiej wiąże Fe z komórek błony śluzowej jelita lub magazynów. Doświadczenia z dożylnym i doustnym podawaniem żelaza potwierdziły istnienie takich powiązań erytropoezy z absorpcją. Fe wprowadzone dożylnie przylęcza się równomiernie do Tf i wskutek tego jest pobierane przez szpik później niż żelazo podane doustnie. To ostatnie wiąże się z transferyną w miejscu, z którego jest szybciej wbudowywane do krwinek.

Fletcher i Huehns (27) sądzą, że drugie miejsce wiążące żelazo w cząsteczce transferryiny jest rodzajem magazynu Fe, chociaż może ono także oddawać Fe retikulocytom. Ilość cząsteczek Tf, w których oba miejsca wiążące są wysycone żelazem odzwierciedla zarówno poziom erytropoezy, jak i stan magazynów i z kolei determinuje ilość Fe wbudowywanego w komórki błony śluzowej jelit (schemat 3). Dalsze zwiększenie absorpcji może być spowodowane wzrostem stężenia Tf, na przykład w okresie ciąży i w niedoborze Tf, co zmniejsza ilość całkowicie wysyconych cząsteczek transferryiny i zwiększa ilość miejsc, które pobierają żelazo z komórek magazynów i z komórek błony śluzowej jelit (24, 55, 56, 68). Układ wrotny naczyń w obrębie jamy brzusznej jest tego rodzaju, że absorpcja Fe w jelitach, o ile zachodzi, zapobiega opróżnieniu magazynów w wątrobie. Mechanizm ten, przydatny w przypadku zwiększonego zapotrzebowania na żelazo przy wzmożonej erytropoezie, może w pewnych przypadkach prowadzić do nadmiernej akumulacji Fe w organizmie (12, 23).

Na zakończenie należałoby dodać, że istnieje bardzo niewiele danych o mechanizmie uwalniania Fe z tkanek i łączeniu go z cząsteczką transferryiny. Marston i Allen (60) oraz Lee i wsp. (58) wysunęli hipotezę, że do prawidłowego uwalniania Fe z tkanek niezbędna jest miedź. Ponieważ przechodzenie żelaza z tkanek do osocza wymaga enzymatycznego utlenienia Fe^{2+} , ceruloplazmina osocza, która jest oksydazą (78) mogłaby katalizować tę reakcję. U zwierząt z doświadczalnym niedoborem miedzi ilość Fe w magazynach i w komórkach błony śluzowej jelit zwiększa się (58), ale u chorych z niedoborem ceruloplazminy (choroba Wilsona) nie występują zaburzenia metabolizmu żelaza. Szybkość powstawania kompleksu transferryiny z żelazem badali Ross i wsp. (89). Przypuszczają oni, że utlenianie Fe^{2+} może zachodzić już po wytworzeniu kompleksu z Tf.

Przedstawione tutaj aktualne poglądy na zagadnienie funkcji transferryiny, jako czynnika regulującego metabolizm żelaza, nie wyczerpują zagadnienia. W ostatnim rozdziale zestawiono dane na temat zachowania się transferryiny w zaburzeniach metabolizmu żelaza i białek ustrojowych.

IV. Zachowanie się transferryiny w stanach patologicznych

Poziom Tf w osoczu lub surowicy można oznaczyć bezpośrednio metodą immunoelektroforezy lub pośrednio określając zdolność wiązania Fe przez białka surowicy *in vitro* lub *in vivo* (26, 32, 84, 91). Według Holmberga i Laurella (42) oraz Wuhrmanna i Jasińskiego (108, 109) w warunkach prawidłowych zdolność wiązania Fe nie jest całkowicie wykorzystana i tzw. współczynnik nasycenia transfer-

ryny przez żelazo wynosi 30%—33%. Podczas oznaczania poziomu Tf metodami chemicznymi odróżnia się zdolność wiązania żelaza tzw. całkowitą (ang. *total iron binding capacity* — T.I.B.C.) oraz utajoną (ang. *latent iron binding capacity* — L.I.B.C.) (9). T.I.B.C. w stanach prawidłowych wynosi 315 do 380 μ g Fe/100 ml surowicy (55, 82). Jest to suma stężenia żelaza osoczowego i L.I.B.C. W badaniach kinetyki metabolizmu Fe i Tf coraz częściej używa się izotopów żelaza ^{55}Fe i ^{59}Fe oraz transferryny znakowanej ^{125}J lub ^{131}J (47, 70, 80). Oznaczanie poziomu Fe w surowicy, L.I.B.C. i T.I.B.C. oraz stężenia Tf, a także badania kinetyki mogą odgrywać zasadniczą rolę w diagnostyce chorób przebiegających z zaburzeniami metabolizmu Fe i gospodarki białkowej w ustroju.

1. Niedokrwistości

Anemia z niedoboru żelaza przebiega z obniżeniem poziomu Fe w surowicy, oraz podwyższeniem T.I.B.C. i L.I.B.C. Współczynnik nasycenia transferryny osoczowej przez żelazo może wynosić nawet poniżej 10% (18, 37). W anemiach sideropenicznych Gelati i Salvatore (30) oraz Mukherjee i Mukherjee (73) stwierdzili obniżenie stężenia Fe do 40 μ g/100 ml surowicy, przy średnim poziomie T.I.B.C. od 406 do 433 μ g/100 ml surowicy. Określenie poziomu Tf pozwala także na ujawnienie niedoboru żelaza mniejszego stopnia, w którym obniżenie poziomu żelaza osoczowego i Hb jest niewielkie oraz umożliwia wykrycie tzw. utajonego deficytu Fe (40). Utajony niedobór żelaza z niskim lub prawidłowym poziomem Fe w surowicy i zwiększoną T.I.B.C., bez obniżenia poziomu hemoglobiny i liczby erytrocytów w krwi krążącej, może być spowodowany dietą ubogą w Fe, zmniejszoną absorpcją żelaza z przewodu pokarmowego, utratą krwi lub zwiększonym zapotrzebowaniem ustroju na przykład w okresie ciąży, na ten pierwiastek (40, 111). Charakterystyczne dla powyższych stanów podwyższenie poziomu Tf zwiększa ilość miejsc pobierających Fe z komórek magazynów i błony śluzowej jelit.

Transferryna może odgrywać rolę w nieswoistej odporności humoralnej; wiążąc Fe hamuje rozwój drobnoustrojów (57) oraz wirusów (105). W chorobach zakaźnych oraz po wstrzyknięciu endotoksyn bardzo często dochodzi do niedokrwistości sideropenicznej z niskim poziomem T.I.B.C., oraz do odkładania się złogów hemosyderyny w szpiku (2, 46, 52, 111). Patogeneza tej niedokrwistości nie jest całkowicie wyjaśniona. Wbudowywanie ^{59}Fe podanego dożylnie w postaci kompleksu transferryny z żelazem jest prawidłowe, natomiast wbudowywanie uwalnianego z rozpadłych krwinek czerwonych Fe do erytroblastów jest zwolnione. Prowadzi to do powstania anemii niedobarwliwej z niedoboru żelaza przy przeładowanych magazynach. Opisane zmiany są prawdopodobnie spowodowane nieswoistą stymulacją USS głównie wątroby

i śledziona, co pociąga za sobą częściowe zahamowanie procesu uwalniania Fe z komórek USS do osocza. Występuje tu zjawisko rozkojarzenia anabolizmu i katabolizmu Fe. Przy obniżeniu stężenia Tf w osoczu zmniejsza się wchłanianie żelaza w przewodzie pokarmowym, co zapobiega w pewnym stopniu dalszemu przeładowaniu magazynów, a jednocześnie zmniejsza się także pobieranie żelaza z magazynów (52).

Anemię sideropeniczną z obniżoną T.I.B.C. opisano także w stanach rozrostowych układu krwiotwórczego oraz w przebiegu choroby nowotworowej (30, 52, 83). Patogeneza powyższej niedokrwistości nie jest wyjaśniona.

W anemiach hemolitycznych poziom Fe w surowicy podwyższa się, a T.I.B.C. spada, co powoduje większe wysycenie transferryny żelazem. U chorych z niedokrwistością aplastyczną poziom T.I.B.C. podwyższa się (59).

2. Sideroza

Morgan i Finch (70) wywoływali doświadczalną siderozę u królików podając im dekstran-Fe. Po upływie 4 lat u zwierząt tych określono zawartość tkankowego i osoczowego żelaza i Tf, oraz przeprowadzono badania kinetyczne, przy użyciu ^{55}Fe , ^{59}Fe i transferryny króliczej znakowanej ^{131}J . Zwierzęta z wywołaną siderozą miały podwyższony poziom Fe tkankowego, zaznaczony najwyraźniej w wątrobie, śledzionie i w nerkach, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Badania histologiczne wątroby ujawniły rozszerzone przestrzenie wrotne wypełnione hemosyderyną i brak objawów marskości. Ziarna hemosyderyny znajdowano także w śledzionie i w nerkach. U królików przeciążonych żelazem stężenie Fe osoczowego było podwyższone, a T.I.B.C. znacznie obniżona, co pociągało za sobą prawie całkowite wysycenie transferryny przez żelazo. Powodowało to większe pobieranie Fe przez komórki narządów mięsnych z kompleksu transferryny z żelazem. Przyczyną spadku T.I.B.C. było obniżenie całkowitej ilości Tf w ustroju, przy prawidłowym jej rozmieszczeniu w przestrzeniach wewnątrz i zewnątrznaczyniowych. Jest to prawdopodobnie spowodowane zahamowaniem syntezy Tf w wątrobie, na skutek ewentualnego uszkodzenia komórek mięszu przez złoży hemosyderyny.

Podobne zmiany w siderozie potransfuzyjnej opisał Cazał (15). Wielokrotne przetoczenia krwi, które nie są poprzedzone jej utratą, mogą doprowadzić do przeciążenia magazynów i spowodować bądź to zwykłą siderozę bez ciężkich powikłań, bądź to siderozę powikłaną, identyczną z hemochromatozą idiopatyczną, z ciężkimi zaburzeniami wątrobowymi, trzustkowymi, krążeniowymi i endokrynologicznymi. Z autopsji wielokrotnych biorców krwi wynika, że niepowikłana sideroza potransfuzyjna przeciąża głównie komórki USS. W przypadkach powikłanej si-

derozy, która występuje rzadziej i po długotrwałym, wielokrotnym leczeniu przetaczaniem krwi obraz kliniczny charakteryzują: pigmentacja skóry, napady bólów wątrobowych i hepatomegalia. Nadmiar żelaza powoduje martwicę najbardziej przeładowanych komórek, a następnie przerastanie narządu tkanką łączną.

3. Stany chorobowe przebiegające z niedoborem białek surowicy

Niedobór białek może wystąpić w przebiegu chorób wątroby, stanów zapalnych przewodu pokarmowego, oraz w nerczycach (9). Ponieważ synteza transferryny przebiega w wątrobie (53, 108), w schorzeniach tego narządu wielokrotnie opisywano zmiany T.I.B.C. i L.I.B.C. (10, 76, 98). U chorych z ostrym zapaleniem wątroby następuje podwyższenie T.I.B.C., która powraca do normy w okresie zdrowienia, zachowując się jak „enzym wskaźnikowy”. Natomiast w przebiegu marskości wątroby stężenie Fe w osoczu spada w niewielkim stopniu oraz obniża się T.I.B.C.

Jensen i wsp. (47) badali metabolizm Tf znakowanej ^{51}Cr w zespole nerczycowym i gastroenteropatiach przebiegających z utratą białka. Wyniki uzyskane u 9 zdrowych osobników stanowiły kontrolę. W obu grupach przeprowadzono także badania stosując znakowaną albuminę. Zdecydowana większość pacjentów z zespołem nerczycowym wydalą z moczem białka osocza o niskim ciężarze cząsteczkowym (albuminy, haptoglobiny, transferryna) (9, 86). U 8 chorych z nerczycą wykazano zmniejszenie stężenia Tf w surowicy do 163 mg/100 ml (średnia wartość dla grupy kontrolnej — 214 mg/100 ml), oraz szybsze znikanie białka z osocza wskutek rozpadu i wydalania przez nerki. Synteza transferryny była szybsza: 17 do 33 mg/kg/dzień w porównaniu z kontrolą (16 mg/kg/dzień). U 15 pacjentów z chorobami przewodu pokarmowego uzyskano podobne wyniki, ale nie stwierdzono zwiększenia endogennej utraty białka. Stężenie Tf w surowicy u tych chorych wynosiło 72 do 200 mg/100 ml, a szybkość syntezy 11 do 49 mg/kg/dzień. W obu zespołach chorobowych wykazano korelację szybkości znikania Tf i albuminy z osocza, przy braku korelacji ich stężeń. Jest to wynikiem większego przyspieszenia syntezy transferryny. Synteza Tf jest szybsza w zespole nerczycowym średnio o 58%, a w gastroenteropatiach o 69%, podczas gdy wartości te dla albuminy wynoszą 32% i 39%. Zaobserwowano także korelację między znikaniem transferryny z osocza a jej syntezą w wątrobie. Nierozstrzygniętym zagadnieniem pozostaje zwiększony katabolizm białek w zespole nerczycowym (3, 39, 48, 49). Ponieważ objawu tego nie stwierdzono w gastroenteropatiach, Jensen i wsp. (48, 49) przypuszczają, że w nerczycy zachodzi rozpad białek pochodzenia nerkowego. Obniżony poziom Tf w przebiegu niedoborów białkowych może być przyczyną zaburzeń metabolizmu Fe prowadząc do niedokrwistości niedobarwliwej i siderozy narządowej (9).

4. Hemochromatoza

Samoistna hemochromatoza jest rzadkim cierpieniem dziedzicznym występującym rodzinnie, zwłaszcza u mężczyzn. Chorobę tę cechuje podwyższony poziom żelaza w osoczu przy zmniejszonej utajonej zdolności wiązania żelaza oraz przyspieszenie wchłaniania Fe w jelicie i znaczne zwiększenie ilości żelaza magazynowego rzędu 20—58g. Objawy kliniczne zależne są od umiejscowienia złogów Fe. Opisywano przerostową marskość wątroby, zwyrodnieniowe zmiany włókniste trzustki z ciężką cukrzycą, niewydolność krążenia pochodzenia sercowego oraz wciągnięcie w sprawę chorobową kory nadnerczy. Brązowe zabarwienie skóry może być przyczyną błędnego rozpoznania pelagry lub choroby Addisona. Dokładne rozpoznanie można ustalić jedynie na drodze biopsji po ilościowym oznaczeniu zawartości żelaza, przy czym zawartość ferrytyny może przekraczać normę nawet 100-krotnie (92).

Blanc i Vannotti (7) zajmowali się metabolizmem transferryny w idiopatycznej hemochromatozie i stwierdzili, że genetycznie uwarunkowaną anormalnością w tym schorzeniu jest statystycznie znamienny spadek stężenia Tf w osoczu. Samoistna hemochromatoza byłaby więc wrodzoną hypotransferrynemią. Dalsze obniżenie Tf może być spowodowane „siderotycznym” uszkodzeniem komórek wątroby. Wrodzone obniżenie stężenia transferryny nie tłumaczy jednak w jaki sposób dochodzi w tym schorzeniu do zwiększenia szybkości wchłaniania Fe w przewodzie pokarmowym, ponieważ według ostatniej hipotezy Fletcherera i Huehnsa (27, 28) wysycenie Tf przez żelazo, powinno hamować absorpcję tego pierwiastka w jelicie.

LITERATURA

1. Aaasa R., Malmstrom B. G., Saltman P., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 203 (1963).
2. Aleksandrowicz J., Lisiewicz J., Układ krwiotwórczy w chorobach zakaźnych, PZWL, Warszawa 1966.
3. Andersen S. B., Jarnum S., Jensen H., Rossing N., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, 42 (1968).
4. Bearn A. G., Cleve H., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, New York, 1966.
5. Bessis M., Breton-Gorius J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 503 (1957).
6. Beutler E., Bittenweiser E., *J. Lab. Clin. Med.* **55**, 274 (1960).
7. Blanc B., Vannotti A., *Nature* **212**, 480 (1966).
8. Boffa G. A., Fine J. M., Drilhon A., Amouch P., *Nature* **214**, 700 (1967).
9. Bogdanikowa B., Murawski K., Rozpoznawanie zmian w białkach krwi, PZWL, Warszawa 1968.

10. Bothwell T. M., Ellis B. C., Doorn-Wittkamp H. V., *J. Lab. Clin. Med.* **45**, 167 (1955).
11. Bothwell T. M., Pirzio Biroli G., Finch C. A., *J. Lab. Clin. Med.* **51**, 24 (1958).
12. Brain M. C., Herdan A., *Brit. J. Haematol.* **11**, 107 (1965).
13. Buettner-Janusch J., *Nature* **192**, 632 (1961).
14. Cap J., Lehotska V., Mayerova A., *Cesk. Pediat.* **23**, 1020 (1968).
15. Casal P., *Transfusion* **8**, Suppl. **1**, 217 (1965).
16. Clausen J., Munkmer T., *Nature* **189**, 60 (1961).
17. Crosby W. H., Series Haematologica 6, red. Sven Bjorkman, Malmo 1965. Iron Metabolism.
18. Davies S., Levin B., Oberholze V. G., *J. Clin. Pathol.* **5**, 312 (1952).
19. Davis B., Saltman P., Benson S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 56 (1962).
20. Douglas T. A., Reuton J. P., Wright R., *Am. J. Obstet. Gynecol.* **102**, 1169 (1968).
21. Dreyfus J. C., Schapira G., *Bull. Soc. Chim. Biol. Franc.* **37**, 541 (1955).
22. Ehrenberg A., Laurell C. B., *Acta Chem. Scand.* **9**, 68 (1955).
23. Erlandson M. E., Walden B., Stern G., *Blood* **19**, 359 (1962).
24. Fay I., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *J. Clin. Invest.* **28**, 487 (1949).
25. Finch C. A., Hosain F., Morgan E. H., Marsaglia G., Giblett E., Hillman R. S., Series Haematologica 6, Iron Metabolism, red. Sven E. Bjorkman, Malmo 1965.
26. Fischl J., Cohen S., *Clin. Chim. Acta* **7**, 121 (1962).
27. Fletcher J., Huehns E. R., *Nature* **215**, 584 (1967).
28. Fletcher J., Huehns E. R., *Nature* **218**, 1211 (1968).
29. Frick E., *Klin. Wochschr.* **41**, 75 (1963).
30. Gelati M., Salvatore V., *Ateneo Parmense* **32**, 40 (1961).
31. Gitlin D., Kumate J., Urrusti J., Morales C., *J. Clin. Invest.* **43**, 1938 (1964).
32. Gitlow S. E., Beyers M. R., *J. Lab. Clin. Med.* **39**, 337 (1952).
33. Goucher Ch. R., Taylor J. F., *Federation Proc.* **20**, 355 (1961).
34. Goucher Ch. R., Taylor J. F., *J. Biol. Chem.* **239**, 2251 (1964).
35. Granick S., *Chem. Rev.* **38**, 379 (1946).
36. Greenough W. B., Peters T., Thomas D., *J. Clin. Invest.* **41**, 1116 (1962).
37. Heilmeyer L., *Deut. Med. Wochschr.* **79**, 280 (1954).
38. Heilmeyer L., Keller W., Vivell O., Keiderling W., *Deut. Med. Wochschr.* **86**, 1745 (1961).
39. Heilmeyer L., Merker H., Wetzels H. P., Klemm D., *Deut. Med. Wochschr.* **90**, 1649 (1965).
40. Heinrich H. C., *Lancet* **2**, 460 (1968).
41. Holmberg C. G., Laurell C. B., *Acta Physiol. Scand.* **10**, 307 (1945).
42. Holmberg C. G., Laurell C. B., *Acta Chem. Scand.* **2**, 550 (1948).
43. Jamieson G. A., *J. Biol. Chem.* **240**, 2914 (1965).
44. Jandl J. H., Inman J. K., Simmons R. L., Allen D. W., *J. Clin. Invest.* **38**, 161 (1959).
45. Jandl J. H., Katz J. H., *J. Clin. Invest.* **42**, 314 (1963).
46. Jarnum S., Lassen N. A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **13**, 357 (1961).
47. Jensen H., Bro-Jorgensen K., Jarnum S., Olesen H., Minna Yssing, *Scand. Clin. Lab. Invest.* **21**, 293 (1968).

48. Jensen H., Jarnum S., Hansen J. P. H., *Nephron* 3, 209 (1966).
49. Jensen H., Rossing N., Andersen S., Jarnum S., *Clin. Sci.* 33, 445 (1967).
50. Jeppson J. O., Sjoquist J., Proc. VI Int. Congr. Biochem. (Abstract) II 1964.
51. Jeppson J. O., Sjoquist J., *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier, Amsterdam 1966, t. 14, str. 87.
52. Katz J. H., *Series Haematologica* 6, Iron Metabolism, red. Sven E. Bjorkman, Malmo, 1965.
53. Kausen A. R., Gerald P. S., Diamond L. K., *Nature* 194, 27 (1962).
54. Konopka K., Leyko W., Gondko R., Sidorczyk Z., Fabjanowska Z., Szwedowska M., *Clin. Chim. Acta* 24, 359 (1969).
55. Laurell C. B., *Acta Physiol. Scand.* 14, Suppl. 46 (1947).
56. Laurell C. B., *Blood* 6, 183 (1951).
57. Laurell C. B., *Verh Deut. Ges. F. Inn. Med.* 70, 112 (1964).
58. Lee G. R., Lukens J., Nacht S., Cartwright G. E., *J. Clin. Invest.* 47, 2058 (1968).
59. Liwandowski Ju. A., *Probl. Gematol.* 12, 57 (1967).
60. Marston H. R., Allen H. S., *Nature* 215, 645 (1967).
61. Mazanowska A., *Post. Biochem.* 9, 336 (1963).
62. Mazur A., Green S., Carleton A., *J. Biol. Chem.* 235, 595 (1960).
63. Mc Kay R. H., Fineberg R. A., *Arch. Biochem. Biophys.* 104, 496 (1964).
64. Moller D., Naerdla G., *Nature* 210, 317 (1966).
65. Monod J., Changeoux J. P., Jacob F., *J. Mol. Biol.* 6, 306 (1963).
66. Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S., *Biochim. Biophys. Acta* 45, 413 (1960).
67. Moore C. V., *Series Haematologica* 6, Iron Metabolism, red. Sven E. Bjorkman, Malmo 1965.
68. Morgan E. H., *Aust. J. Sci.* 24, 87 (1961).
69. Morgan E. H., *Brit. J. Haematol.* 10, 442 (1964).
70. Morgan E. H., Finch C. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 122, 92 (1966).
71. Morgan E. H., Huehns E. R., Finch C. A., *Am. J. Physiol.* 210, 579 (1966).
72. Morgan E. H., Laurell C. B., *Brit. J. Haematol.* 9, 471 (1963).
73. Mukherjee C., Mukherjee S. K., *J. Indian Med. Ass.* 23, 1 (1953).
74. Noyes W. D., Bothwell T. H., Finch C. A., *Brit. J. Haematol.* 6, 43 (1960).
75. Parker W. C., Bearn A. G., *J. Exptl. Med.* 115, 83 (1962).
76. Peterson R. S., Ettinger R. H., *Am. J. Med.* 15, 518 (1953).
77. Pollycove M., *Seminars Haematol.* 3, 235 (1966).
78. Prasał Z., *Post. Biochem.* 13, 43 (1967).
79. Primosigh J. V., Donnall E., *J. Clin. Invest.* 47, 1473 (1968).
80. Putnam F. W., *The Proteins* red. H. Neurath, New York i Londyn 1965, t. 3, str. 211.
81. Rath C. E., Finch C. A., *J. Clin. Invest.* 28, 79 (1949).
82. Rath C. E., Finch C. A., Caton W., *Surg. Gynecol. Obstet.* 90, 329 (1950).
83. Rechenberger J., *Deut. Z. Verdau-u. Stoffwechsekr.* 16, 162 (1956).
84. Ressler V. N., Zak B., *Am. J. Clin. Pathol.* 30, 87 (1953).
85. Riegel C., Thomas D., *New. Engl. J. Med.* 255, 434 (1956).
86. Rifkind D., Kravetz H. M., Knight V., *New. Engl. J. Med.* 165, 115 (1961).
87. Roberts R. C., Makey D. G., Seal U. S., *J. Biol. Chem.* 241, 4907 (1966).

88. Roop W. E., *Federation Proc.* **22**, 649 (1963).
89. Ross J., Kochwa S., Wasserman L. R., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 70 (1968).
90. Ruoslahti E., Seppala I. J., Simons K., *Nature* **220**, 480 (1968).
91. Schade A. L., Caroline L., *Science* **104**, 340 (1946).
92. Schoen R., Sudhof H., Diagnostyka biochemiczna w różnicowaniu chorób wewnętrznych, PZWL, Warszawa 1967.
93. Schultze H. E., Schmidtberger R., Haupt H., *Biochem. Z.* **329**, 490 (1958).
94. Shoden A., Sturgeon Ph., *Acta Haematol.* **23**, 376 (1960).
95. Surgenor D. M., Koechlin B. A., Strong L. E., *J. Clin. Invest.* **28**, 73 (1949).
96. Turnbull A., Giblett E. R., *J. Lab. Clin. Med.* **57**, 450 (1961).
97. Vallee B. L., Ulmer D. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 331 (1962).
98. Vannotti A., Blanc B., *Schweiz. Med. Wochschr.* **931**, 1189 (1962).
99. Ventura S., *Haematologica* **37**, 749 (1953).
100. Wang A. C., Sutton H. E., *Science* **149**, 435 (1965).
101. Wang A. C., Sutton H. E., Howard P. N., *Biochem. Genet.* **1**, 55 (1967).
102. Warner R. C., Weber I., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5094 (1953).
103. Weinfeld A., *Acta Med. Scand. Suppl.* str. 427 (1964).
104. Weintraub L. R., Conrad M. E., Crosby W. H., *J. Clin. Invest.* **43**, 40 (1964).
105. West C. D., Hong R., *Pediat.* **60**, 430 (1962).
106. Wheby M. S., Jones L. J., Crosby W. H., *J. Clin. Invest.* **43**, 1433 (1964).
107. Williams J. W., *Biochem. J.* **83**, 355 (1962).
108. Wuhrmann F., Jasiński B., *Schweiz. Med. Wochschr.* **83**, 661 (1953).
109. Wuhrmann F., Jasiński B., *Klin. Wochschr.* **33**, 97 (1955).
110. Zail S. S., Charleton R. W., Torrance J. D., Bothwell T. H., *J. Clin. Invest.* **43**, 670 (1964).
111. Zilva J. F., *Lancet* **1**, 636 (1968).

ANDRZEJ L. PAWLAK*

Wpływ kwasu 2,3-dwufosfoglicerynowego na wydajność przenoszenia tlenu przez hemoglobinę

Function of 2,3-Diphosphoglyceric Acid in Control of the Efficiency of Oxygen Transport by Hemoglobin

Changes in hemoglobin oxygen affinity induced by 2,3-diphosphoglyceric acid and ATP are discussed with the reference to the efficiency of oxygen transport by red blood cells *in vivo*.

Wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone, czyli różnica utlenowania krwi tętniczej i krwi żyłnej zależy z jednej strony od ciśnienia parcjalnego tlenu w tkankach, z drugiej — od powinowactwa hemoglobiny do tlenu. Krwinki zawierające hemoglobiny o zmienionej sekwencji aminokwasów i o zwiększonym powinowactwie do tlenu odznaczają się mniejszą wydajnością przenoszenia tlenu niż krwinki z prawidłową hemoglobiną.

Na możliwość regulacji powinowactwa prawidłowej hemoglobiny do tlenu wskazywały jego przejściowe zmiany w przebiegu chorób nabytych. Zmniejszenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu i wzrost wydajności przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone zaobserwowano w przypadkach niedokrwistości (12, 19), przewlekłych stanów niedotlenienia (12), nadczynności tarczycy (13) i marskości wątroby (19). W przypadkach choroby Bürgera powinowactwo hemoglobiny do tlenu jest zwiększone (1). Wzrost powinowactwa hemoglobiny do tlenu stwierdzono również w przechowywanej krwi konserwowanej (24). Miarą powinowactwa hemoglobiny do tlenu jest ciśnienie parcjalne tlenu, przy którym hemoglobina jest utlenowana w 50% (p 1/2). Interakcja hemów, która również wpływa na wydajność przenoszenia tlenu przez hemoglobinę, nie zmienia się w wymienionych stanach — z wyjątkiem hemoglobin patologicznych.

Ostatnio wyjaśniono mechanizm zmian powinowactwa hemoglobiny do tlenu w przebiegu niedotleniania i w czasie przechowywania krwi kon-

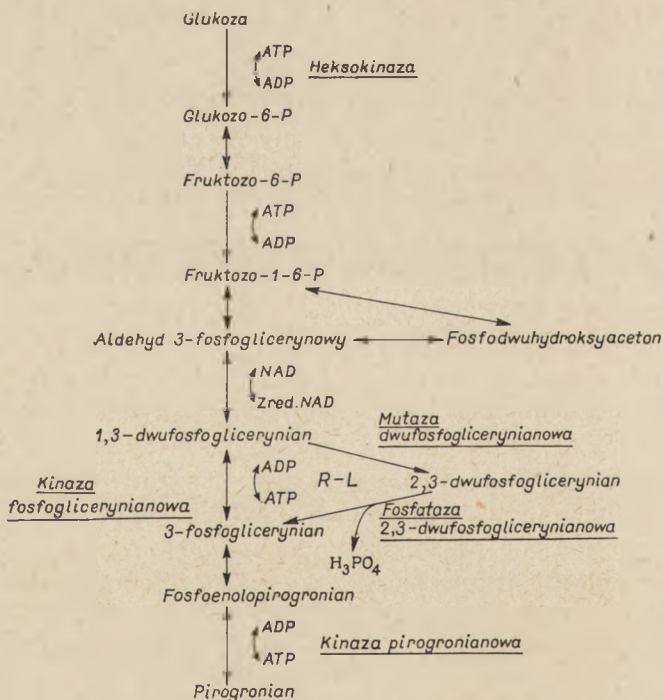
* Dr med., Zakład Genetyki Człowieka, Akademia Medyczna, Poznań

Wykaz stosowanych skrótów: ACD — cytrynian sodu 1,32 g, kwas cytrynowy 0,48 g, glukoza 1,4 g, woda destylowana do 100,0 ml, pH 5,0 w 20°C; CPD — cytrynian sodu 2,6 g, NaH₂PO₄·H₂O 0,277 g, glukoza 2,5 g, woda destylowana do 100,0 ml, pH 5,75 w 20°C; 2,3-DPG — kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy; IHP — sześćfosforan inozytolu; pO₂ — ciśnienie parcjalne tlenu; pCO₂ — ciśnienie parcjalne CO₂.

serwowanej. Zmiany te zależą od wpływu kwasu 2,3-dwufosfoglicerynowego (2,3-DPG) i ATP na czynność hemoglobiny. Poznany mechanizm bierze udział w regulacji wydajności przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone.

I. Wpływ kwasu 2,3-dwufosfoglicerynowego i ATP na powinowactwo hemoglobiny do tlenu

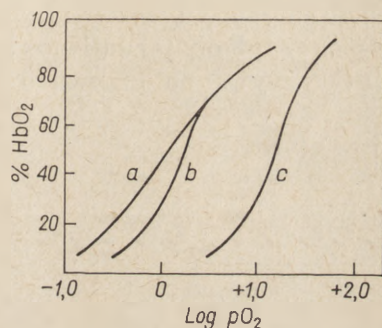
Przełomowe znaczenie dla poznania mechanizmu regulacji powinowactwa hemoglobiny do tlenu miało wykrycie różnic w zdolności wiązania związków fosforanowych występujących w krwinkach czerwonych (2,3-DPG, ATP) przez hemoglobinę odtlenowaną i utlenowaną. 2,3-DPG występuje w erytrocytach w stężeniu znacznie większym, aniżeli w komórkach innych tkanek. Syntezę i rozkład tego związku opisano jako charakterystyczną dla krwinek czerwonych drogę metaboliczną (20) (schemat 1). Stężenie 2,3-DPG w krwinkach czerwonych wynosi około $4,5 \times 10^{-3} \text{M}$ (ATP — $1,5\text{--}2,5 \times 10^{-3} \text{M}$). Jest ono regulowane przez szereg reakcji. 2,3-DPG hamuje heksokinazę zajmując miejsce ATP i w ten sposób może wpływać na szybkość glikolizy w krwince czerwonej (schemat 1). 2,3-DPG hamuje również mutazę dwufosfoglicerynianową, katali-



Schemat 1. Glikoliza w krwince czerwonej człowieka; R-L — cykl Rapoporta-Lueberinga (20)

zującą jego syntezę. Prawdopodobnie w wymienionych reakcjach bierze udział tylko wolny 2,3-DPG, dlatego wiązanie tego związku z hemoglobina ma kluczowe znaczenie w regulacji jego stężenia w krwinkach czerwonych (4).

Hemoglobina występuje w krwinkach czerwonych w stężeniu około $5 \times 10^{-3} M$. Jest ona tetramerem składającym się z dwóch łańcuchów α i z dwóch łańcuchów β . Łańcuchy te wykazują duże podobieństwo wielkości, kształtu i składu aminokwasów z mioglobina. Z czwartorzędowej struktury hemoglobiny wynika jednak szereg różnic w czynności wiązania tlenu przez hemoglobina i mioglobina. Krzywa powinowactwa hemoglobiny do tlenu ma kształt sigmoidalny, a krzywa powinowactwa mioglobiny — hiperboliczny. Hemoglobina ma mniejsze powinowactwo do tlenu aniżeli mioglobina (rysunek 1) oraz zmienia je w zależności od pH (efekt Bohra).



Rys. 1. Krzywe wiązania tlenu przez mioglobina (a), hemoglobina oczyszczoną (b) oraz hemoglobina w krwinkach czerwonych (c) (4)

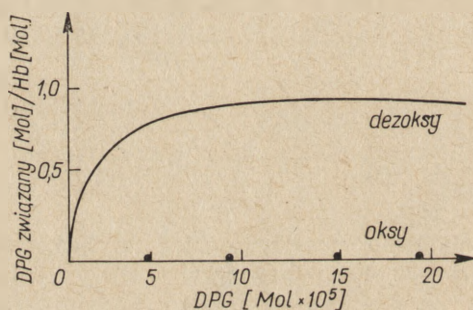
Najnowsze badania Benesch'ów i wsp. (4, 5) wykazały, że sama czwartorzędowa struktura hemoglobiny nie tłumaczy mniejszego, w porównaniu z mioglobina, powinowactwa hemoglobiny do tlenu. Hemoglobina oczyszczona, wolna od organicznych związków fosforowych wykazuje znacznie większe powinowactwo do tlenu od hemoglobiny w krwinkach czerwonych. Krzywa powinowactwa oczyszczonej hemoglobiny zachowuje sigmoidalny kształt, jednak w odcinku końcowym pokrywa się ona z krzywą powinowactwa mioglobiny do tlenu (rysunek 1). Dodanie równomolarnej ilości 2,3-DPG do roztworu oczyszczonej, nie zawierającej fosforu hemoglobiny zmniejsza jej powinowactwo do tlenu do wartości oznaczonych w pełnej krwi. Sugeruje to, że w krwinkach czerwonych małe powinowactwo hemoglobiny do tlenu jest również spowodowane dużym stężeniem 2,3-DPG. Krwinki czerwone większości gatunków ssaków zawierają znaczne ilości 2,3-DPG i u tych gatunków powinowactwo oczyszczonej hemoglobiny do tlenu obniża się pod wpływem 2,3-DPG. W krwinkach czerwonych owcy nie stwierdza się gromadzenia tego związ-

ku, a hemoglobina tego gatunku ma niskie, nie zmieniające się po dodaniu 2,3-DPG powinowactwo do tlenu również po oczyszczeniu (4).

U ptaków i żółwi w krwinkach czerwonych gromadzi się inny związek fosforanowy odznaczający się również właściwością zmniejszania powinowactwa hemoglobiny do tlenu — sześcioposforan inozytolu (IHP). Mniejsze niż u ssaków powinowactwo do tlenu i odpowiednio większa wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone tych zwierząt zależą od wpływu IHP na hemoglobinę. Roztwory oczyszczonych hemoglobin kurczęcia i człowieka po dodaniu IHP wykazywały podobne powinowactwo do tlenu jak krew ptaków, natomiast po dodaniu 2,3-DPG — powinowactwo typowe dla krwi ludzkiej (5).

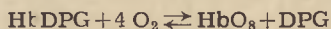
II. Mechanizm działania 2,3-DPG na powinowactwo hemoglobiny do tlenu

Badania nad wiązaniem 2,3-DPG przez hemoglobinę A wykazały, że związek ten tworzy kompleksy tylko z jej odtlenowaną formą (rysunek 2). Wskazuje to, że 2,3-DPG wpływa na krzywą dysocjacji hemoglobiny



Rys. 2. Krzywa wiązania 2,3-DPG przez hemoglobinę odtlenowaną (deoksy) i utlenowaną (oksy) (6)

i tlenu obniżając powinowactwo hemoglobiny odtlenowanej do tlenu. Ponieważ stany utlenowania hemoglobiny i jej związania z 2,3-DPG wyłączają się wzajemnie, reakcję utlenowania hemoglobiny w obecności 2,3-DPG można przedstawić następująco (4):



Wiązanie 1 mola 2,3-DPG przez 1 mol hemoglobiny odtlenowanej sugeruje, że w tetramerze hemoglobiny występuje tylko jedno miejsce wiązania 2,3-DPG. Przypuszcza się, że dysocjacja tetramery hemoglobiny powoduje rozbicie miejsca wiązania 2,3-DPG. Brak wiązania 2,3-DPG przez hemoglobinę utlenowaną należy zatem łączyć z dysocjacją tej ostatniej na dimery. Tetramer łańcuchów β charakterystyczny dla α -talasemii — hemoglobina H, która po utlenowaniu zachowuje strukturę tetramery, wiąże 2,3-DPG zarówno przed jak i po utlenowaniu (4).

Na swoistość mechanizmu wiązania 2,3-DPG przez hemoglobinę odtlenowaną wskazuje mniejsza zdolność hemoglobiny płodowej (Hb F) do wiązania tego związku w porównaniu z hemoglobiną A (22). Ponieważ zawartość 2,3-DPG w płodowych krwinkach czerwonych jest zbliżona do prawidłowego poziomu w krwinkach czerwonych dorosłego człowieka, mniejsza zdolność wiązania 2,3-DPG przez hemoglobinę płodową jest prawdopodobnie przyczyną ich zwiększonego, w porównaniu z krwinkami czerwonymi dorosłego człowieka powinowactwa do tlenu (14).

III. Zmiany ilości 2,3-DPG w krwince czerwonej i powinowactwa hemoglobiny do tlenu *in vivo* oraz w krwi konserwowanej

Lenfant i wsp. (15) stwierdzili, że zmiany ciśnienia parcjalnego tlenu pO_2 w powietrzu oddechowym powodują u badanych osób zmiany zawartości 2,3-DPG w krwinkach czerwonych i powinowactwa tych krwinek do tlenu. Badani nie wykazywali zmian pH krwi, co wyłącza możliwość zmian powinowactwa hemoglobiny do tlenu zależnych od efektu Bohra. Autorzy sądzą, że zmiany powinowactwa hemoglobiny do tlenu są wynikiem zmian zawartości 2,3-DPG w krwinkach czerwonych. Adaptacyjna zmiana stężenia 2,3-DPG oraz krzywej wiązania tlenu przez hemoglobinę w krwinkach badanej osoby występowała w pełnym natężeniu w czasie 24 do 48 godzin od wywołującej ją, trwałej zmiany pO_2 w powietrzu oddechowym. W przypadku wzrostu pO_2 następowało obniżenie poziomu 2,3-DPG i zwiększenie powinowactwa krwinek do tlenu, w przypadku obniżenia pO_2 — zwiększenie poziomu 2,3-DPG i obniżenie powinowactwa erytrocytów do tlenu.

Przypuszcza się, że mechanizm opisanych zmian, wyjaśniający ich adaptacyjne znaczenie, jest następujący. W warunkach obniżonego pO_2 w tkankach, w erytrocytach występują większe ilości odtlenowanej hemoglobiny, wskutek czego większe ilości 2,3-DPG i ATP wiążą się z hemoglobiną. W warunkach beztlenowych glikoliza w krwinkach czerwonych ulega przyspieszeniu, co prawdopodobnie jest spowodowane zmniejszeniem stężenia 2,3-DPG i ATP nie związanych z hemoglobiną. W wyniku przyspieszenia glikolizy i wytwarzania 2,3-DPG oraz ATP, całkowita ilość tych związków w krwinkach czerwonych zwiększa się w warunkach obniżonego pO_2 . Wzrost całkowitego stężenia 2,3-DPG i ATP w krwinkach czerwonych powoduje zmniejszenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu i zwiększenie wydajności przenoszenia tlenu przez krwinkę czerwoną (3). Uzyskane tą drogą zwiększenie pO_2 w tkankach ma charakter reakcji homeostatycznej.

W przypadkach wrodzonych niesferocytowych niedokrwistości hemolitycznych, spowodowanych niedoborem aktywności kinazy pirogronianowej w krwinkach czerwonych (schemat 1), ilość 2,3-DPG w tych krwin-

kach może być dwukrotnie większa niż w erytrocytach normalnych. Jednocześnie powinowactwo hemoglobiny do tlenu jest obniżone, a wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone zwiększona. Krew chorego która zawierała zaledwie 9g hemoglobiny w 100ml, miała taką samą zdolność przenoszenia tlenu jak krew normalna o zawartości 15g hemoglobiny w 100ml (18).

Większa w porównaniu z dojrzałymi krwinkami zawartość 2,3-DPG w retikulocytach i w młodych krwinkach czerwonych jest przyczyną mniejszego powinowactwa ich hemoglobiny do tlenu. Oznacza to, że po pobudzeniu erytropoezy, krew bogata w retikulocyty i młode erytrocyty, przenosi tlen wydajniej, aniżeli krew z normalną populacją krwinek czerwonych (9). W krwi konserwowanej stężenie ATP i 2,3-DPG zmniejsza się. W pierwszych dwóch tygodniach przechowywania ilość 2,3-DPG zmniejsza się do 15% wartości początkowej; stężenie ATP zmniejsza się po dłuższym okresie przechowywania krwi konserwowanej ACD (7). Zmianom tym towarzyszy wzrost powinowactwa przechowywanej krwi do tlenu. Po inkubacji konserwowanych krwinek czerwonych w temperaturze 37°C z dodatkiem inozyny lub po przetoczeniu konserwowanej krwi stężenie 2,3-DPG w erytrocytach zwiększa się, a powinowactwo hemoglobiny do tlenu — zmniejsza, co przemawia za przyczynowym związkiem pomiędzy tymi dwoma zmianami (9, 23).

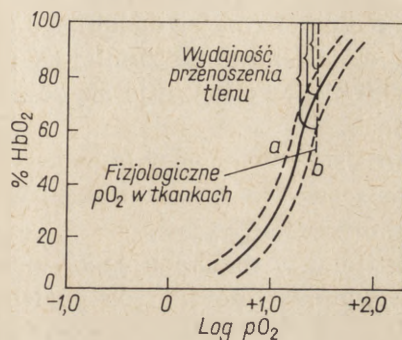
Badania niedokrwistości, którym towarzyszyło zmniejszenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu są gorzej udokumentowane (12). Tylko w niektórych przypadkach wykazano zwiększenie stężenia organicznych związków fosforu w krwinkach czerwonych, co wskazywałoby na 2,3-DPG, jako czynnik warunkujący zmianę powinowactwa hemoglobiny do tlenu (15).

IV. Wpływ 2,3-DPG i zmian powinowactwa hemoglobiny do tlenu na wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone

W warunkach fizjologicznych stałe pO_2 w tkankach, niezależne od zmian szybkości zużycia tlenu, zależy przede wszystkim od właściwego współdziałania krążenia i oddychania. Zmiany szybkości erytropoezy występują dopiero w przebiegu przewlekłego niedotlenienia.

Wpływ zmian powinowactwa hemoglobiny do tlenu na wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone był znany od dawna. Przy prawidłowej perfuzji i wymianie gazów w płucach utlenowanie krwi tętniczej wynosi blisko 100%, a wydajność przenoszenia tlenu zależy od utlenowania hemoglobiny w warunkach pO_2 , pCO_2 i pH występujących w tkankach. W danych warunkach przesunięcie krzywej wiązania tlenu przez hemoglobinę w lewo — zmniejsza wydajność przenoszenia

tlenu (rysunek 3). W przypadkach niektórych hemoglobin patologicznych, charakteryzujących się trwałym przesunięciem krzywej utlenowania hemoglobiny w lewo, występuje w wyniku przyspieszonej erytropoezy kompensacyjna hiperglobulia. Do takich hemoglobin należą: Hb Chesapeake (11), Hb Capetown (16), Hb Yakima (17) i Hb Kempsey (21). W przypadku hemoglobiny Kansas, która ma zmniejszone powinowactwo do tlenu, nie zaobserwowano objawów zwiększonej zdolności przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone (8). Prawdopodobnie brak interakcji hemów w tym przypadku zmniejsza wydajność przenoszenia tlenu przez hemoglobinę.



Rys. 3. Zmiany powinowactwa hemoglobiny do tlenu i wydajności przenoszenia tlenu w zależności od stężenia 2,3-DPG w krwinkach czerwonych

a) zmniejszenie stężenia 2,3-DPG i przesunięcie krzywej dysocjacji hemoglobiny i tlenu w lewo; b) zwiększenie stężenia 2,3-DPG i przesunięcie krzywej dysocjacji hemoglobiny i tlenu w prawo

CO_2 i pH wpływają na powinowactwo hemoglobiny do tlenu podobnie jak 2,3-DPG. Hemoglobina utlenowana ma znacznie mniejsze powinowactwo do tych ligandów w porównaniu z hemoglobina odutlenowaną. Fizjologiczne obniżenie pH i zwiększenie pCO_2 we krwi w naczyniach włosowatych zwiększa wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki. Ponieważ fizjologiczne wartości pH i pCO_2 w tkankach zmieniają się w wąskich granicach, trudno ocenić znaczenie tych parametrów dla regulacji powinowactwa hemoglobiny do tlenu. W stanach patologicznych, a także w przypadkach stosowania hipotermii lub kontrolowanego oddechu, mogą w tkankach i w krwinkach czerwonych wystąpić zmiany pH i pCO_2 , wpływające w pewnym stopniu na powinowactwo hemoglobiny do tlenu (2). W fizjologicznych warunkach podstawowym mechanizmem regulującym powinowactwo hemoglobiny do tlenu jest jednak prawdopodobnie opisanie działanie 2,3-DPG.

W stanach obniżonego pO_2 w tkankach, wydajność przenoszenia tlenu przez hemoglobinę jest zwiększona, jeśli utlenowanie krwi tętniczej jest prawidłowe (zwiększone odutlenowanie krwi żyłnej). Zwiększone wiązanie 2,3-DPG przez odutlenowaną hemoglobinę powoduje wytwarzanie

większych ilości tego związku oraz obniżenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu (przesunięcie krzywej wiązania tlenu przez hemoglobinę w prawo) (3). Zwiększona w wyniku tych zmian wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone (rysunek 3) umożliwia zwiększenie pO_2 w tkankach.

Przeciwnie — zwiększone utlenowanie krwi żyłnej przy zmniejszonym zapotrzebowaniu na tlen zmniejsza ilość 2,3-DPG związanego z hemoglobiną. Synteza tego związku zostaje zahamowana, czego następstwem jest zwiększone powinowactwo hemoglobiny do tlenu i mniejsza wydajność przenoszenia tlenu (przesunięcie krzywej wiązania tlenu przez hemoglobinę w lewo, rysunek 3). Reakcja krwinek czerwonych na zmiany utlenowania ma więc *in vivo* charakter dodatniego sprzężenia zwrotnego: utlenowanie zwiększa, a odtlenowanie zmniejsza powinowactwo hemoglobiny do tlenu. Sprzężenie to obserwuje się również *in vitro* w nieuszkodzonych erytrocytach.

Znaczenie zwiększania się powinowactwa hemoglobiny do tlenu w czasie przechowywania konserwowanej krwi dla jej wartości leczniczej nie zostało dotychczas jednoznacznie wyjaśnione. Uwarunkowane tą zmianą utrudnienie oddawania tlenu w tkankach znika w miarę zwiększania się stężenia 2,3-DPG w krwinkach czerwonych po ich przetoczeniu. Szybkość regeneracji 2,3-DPG przez krwinki czerwone jest ograniczona szybkością glikolizy. Jeżeli przy użyciu 2 mM glukozy/godz./11 krwinek czerwonych 1/4 tej glukozy zostanie przekształcona w 2,3-DPG, szybkość syntezy 2,3-DPG wyniesie 1,0mM/godz./11 krwinek czerwonych. Oznaczałoby to możliwość regeneracji około 20% prawidłowej ilości 2,3-DPG w krwince czerwonej w czasie 1 godziny (25). Przymuszczalnie jednak przetoczone krwinki wytwarzają 2,3-DPG znacznie wolniej (7, 25). W czasie pierwszej doby po przetoczeniu obserwowano regenerację połowy brakującego 2,3-DPG, jednak dalszy wzrost stężenia tego związku w przetoczonych krwinkach czerwonych trwał do 10 dni (23). Szybkość regeneracji 2,3-DPG w przetoczonej krwi prawdopodobnie zależy do pewnego stopnia od metabolizmu biorcy i może być zmniejszona w niektórych stanach chorobowych. Również w przypadkach przetaczania dużych ilości krwi konserwowanej dłuższe utrzymywanie się zwiększonego powinowactwa przetoczonych krwinek do tlenu może wpływać niekorzystnie na przebieg leczenia krwią.

Duże znaczenie z omówionych wyżej względów mają poszukiwania takich sposobów konserwowania krwi, które najdłużej utrzymują wysoką zawartość 2,3-DPG w przechowywanych krwinkach. Wykazano, że w krwi konserwowanej za pomocą ACD stężenie 2,3-DPG spada do połowy wartości początkowej w ciągu 7 dni, natomiast w krwi konserwowanej za pomocą ACD z dodatkiem inozyny — w ciągu 12 dni (9). Również CPD lepiej zachowuje poziom 2,3-DPG w krwi konserwowanej aniżeli ACD (10). W krwi o wyższym *pH* poziom 2,3-DPG obniża się wolniej, jednak

w tych warunkach szybciej zmniejsza się stężenie ATP — związku niezbędnego dla przeżycia krwinek czerwonych po przetoczeniu (7). Aktualnie stosowane sposoby konserwacji krwi zmuszają więc do stosowania świeżej krwi w przypadkach przetaczania dużych jej ilości.

Na zakończenie można wspomnieć o interesującej możliwości wywołania zmian stężenia 2,3-DPG w krwinkach czerwonych *in vivo*. Farmakologiczne regulowanie wydajności przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone pozwoliłoby na znaczne skrócenie czasu potrzebnego na przystosowanie ustroju do warunków zmienionego zapotrzebowania na tlen (4).

LITERATURA

1. Astrup P., *Lancet* **2**, 1152 (1964).
2. Astrup P., Engel K., Severinghaus J. W., Munson E., *Scand. J. Clin. Invest.* **17**, 515 (1965).
3. Benesch R., Benesch R. E., *Science* **160**, 83 (1968).
4. Benesch R., Benesch R. E., *Nature* **221**, 618 (1969).
5. Benesch R., Benesch R. E., Chi Ing Yu, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 526 (1968).
6. Benesch R., Benesch R. E., Enoki Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 1102 (1968).
7. Beutler E., Meul A., Wood L. A., *Transfusion* **9**, 109 (1969).
8. Bonaventura J., Riggs A., *J. Biol. Chem.* **243**, 980 (1968).
9. Bunn H. F., May M. H., Kocholaty W. F., Shields C. E., *J. Clin. Invest.* **48**, 311 (1969).
10. Chanutin A., *Transfusion* **7**, 120 (1967).
11. Clegg J. B., Naughton M. A., Weatherall D. J., *J. Mol. Biol.* **19**, 91 (1966).
12. Edwards M. J., Novy M. J., Walters C. L., Metcalfe J., *J. Clin. Invest.* **47**, 1851 (1968).
13. Gahlenbeck H., Bartels H., *Klin. Wochschr.* **46**, 547 (1968).
14. Hasselhorst G., Stromberger K., *Z. Geburtsh. Gynekol.* **98**, 49 (1930).
15. Lenfant C., Torrance J., English E., Finch C. A., Reynafarie C., Ramos J., Faura J., *J. Clin. Invest.* **47**, 2652 (1968).
16. Lines J. G., McIntosh R., *Nature* **215**, 297 (1967).
17. Miles J. N., Miles J. E., Metcalfe J., *J. Clin. Invest.* **46**, 1848 (1967).
18. Mourdjinis A., Walters C., Edwards M. J., Koler R. D., Vonderheiden B., Metcalfe J., *Clin. Res.* (w druku — cyt. wg 4).
19. Mulhausen R., Astrup P., Kejlidsen K., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **20**, 291 (1967).
20. Rapoport S., Luebering J., *J. Biol. Chem.* **196**, 583 (1952).
21. Reed C. S., Hampson R., Gordon S., Jones R. T., Novy M. J., Brimhall B., Edwards M. J., Koler R. D., *Blood* **31**, 623 (1969).
22. Tyouma J., Shimizu K., *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 404 (1969).
23. Valeri R., Hirsch N. M., *J. Lab. Clin. Med.* **73**, 722 (1969).
24. Valtis D. J., Kennedy A. C., *Lancet* **1**, 119 (1954).
25. Verdier de C. H., *Vox Sanguinis* **16**, 361 (1969).

GRAŻYNA PALAMARCZYK*, JOANNA RYTKA**

Metody badania struktury centrum aktywnego enzymów

The Methods of Enzyme Active Site Investigation

Some kinetic and chemical methods of enzyme active site investigation are described.

Centrum aktywne enzymu, stanowiące jedynie niewielki fragment cząsteczki białkowej, bierze bezpośredni udział w reakcji enzymatycznej. Rodzaj aminokwasów znajdujących się w centrum aktywnym oraz budowa przestrzenna białka decydują o powinowactwie enzymu do substratu, a więc o jego aktywności katalitycznej.

W reakcji enzymu z substratem biorą udział polarne ugrupowania bocznych łańcuchów aminokwasów: grupy karboksylowe kwasu asparaginowego, glutaminowego i C-końcowych aminokwasów, ϵ -aminowe lizyny i α -aminowe N-końcowych aminokwasów, hydroksylowe tyrozyny, seryny i treoniny, amidowe asparaginy, glutaminy i C-końcowych amidów, imidazolowa grupa histydyny, tiolowa cysteiny, tioeterowa metioniny i guanidynowa grupa argininy (16, 57, 64).

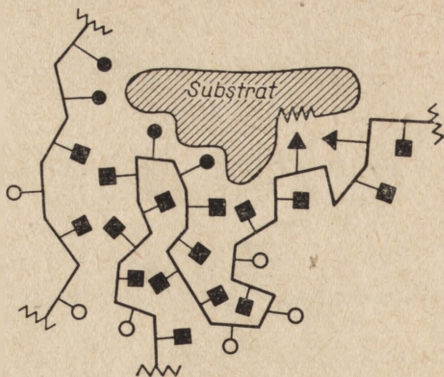
Ze względu na udział w reakcji enzymatycznej aminokwasy wchodzące w skład enzymów podzielono na 4 grupy (39): aminokwasy kontaktowe, biorące bezpośredni udział w reakcji wiązania enzymu z substratem, aminokwasy pomocnicze znajdujące się w obszarze centrum aktywnego, niezbędne dla aktywności enzymów, mimo iż nie reagują bezpośrednio z substratem, aminokwasy współdziałające, stabilizujące określoną strukturę przestrzenną centrum aktywnego oraz aminokwasy, które można modyfikować lub usuwać bez wpływu na aktywność enzymu (schemat 1).

Rodzaj czynnych reszt aminokwasowych, biorących udział w reakcji katalizowanej przez dany enzym, można określić za pomocą metod trzech rodzajów. Są to:

* Dr, Katedra Warzywnictwa Wydział Ogrodniczy, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

** Dr, Katedra Biochemii, Akademia Medyczna, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: NEM — imid kwasu N-etylmaleinowego, PCMB — *p*-chlorortęciobenzoesan, PCMS — *p*-chlorortęciosulfonian, DFP — fluorek fosforanu dwuizopropylowego, DHT — dwuazo-1-H-tetrazol.



Schemat 1. Hipotetyczny model centrum aktywnego enzymów zaproponowany przez Koshlanda (39)

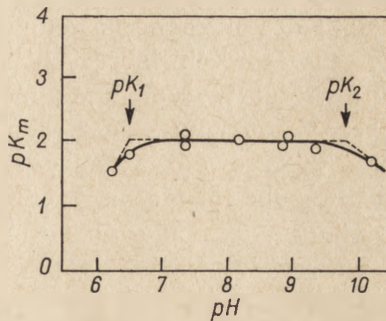
Poszczególne oznaczenia (o, ●, ■, ▲) przedstawiają różne rodzaje reszt aminokwasowych biorących udział w tworzeniu jego struktury

- I. Metody kinetyczne, polegające na badaniu zależności szybkości reakcji enzymatycznej i powinowactwa enzymu do substratu od pH i temperatury.
- II. Metody bezpośredniego znakowania centrum aktywnego substratem lub pseudosubstratem.
- III. Metody blokowania lub modyfikacji czynnych grup aminokwasów specyficznymi odczynnikami i badanie wpływu modyfikacji na aktywność enzymu.

I. Kinetyczne metody wyznaczania grup czynnych enzymu z wartości pK i ΔH_i

Opisana przez Dixona (12, 13) metoda określania grup czynnych enzymu, ulegających jonizacji w toku reakcji, należy do pośrednich metod badania centrum aktywnego. Polega ona na określaniu wartości stałej Michaelisa (K_m) w zależności od pH . Jej podstawowym założeniem jest zależność wartości K_m od stanu dysocjacji substratu (S), enzymu (E) i kompleksu enzym-substrat (ES). Zgodnie z tym założeniem każda zmiana ładunku zachodząca podczas reakcji enzymatycznej powoduje załamanie się krzywej przedstawiającej zależność $-\log K_m$ (pK) od pH . Otrzymane punkty przegięcia krzywej odpowiadają wartościom pK ($-\log$ ze stałych dysocjacji enzymu, substratu lub kompleksu ES). Załamanie krzywej w dół odpowiada wartości pK enzymu lub substratu, natomiast przegięcie w górę odpowiada wartości pK kompleksu ES (12). Dla aminohydrolazy L-argininy (rysunek 1) przegięcia krzywej ekstrapolowane do osi odciętych dają wartość pK około 7 i 10. $pK = 10$ odpow-

wiada stałej dysocjacji grup aminowych substratu, a $pK = 7$ — stałą dysocjacji grupy czynnej enzymu.



Rys. 1. Zależność wartości pK_m od pH dla aminohydrolazy L-argininy
Punkty pK_1 i pK_2 odpowiadają stałej dysocjacji grup czynnych enzymu i substratu

Z wartości pK w funkcji pH wnioskowano także między innymi o obecności grupy imidazolowej w centrum aktywnym trypsyny, oraz o obecności grupy imidazolowej, α -aminowej lub ϵ -aminowej i sulfhydrylowej w centrum aktywnym trombiny (61). Stwierdzono również, że aktywność katalityczna δ -chymotrypsyny w alkalicznym pH jest zależna od obecności dysocjującej grupy aminowej, która należy do N-końcowej L-izoleucyny (35).

Wartości stałych reakcji enzymatycznych K_m i szybkości maksymalnej V zależą również od temperatury. Wyznaczanie ciepła jonizacji (ΔH_i) dysocjujących grup jest uzupełniającą metodą określania rodzaju reszt aminokwasowych znajdujących się w centrum aktywnym. Wartość ΔH_i oblicza się zgodnie ze wzorem (12):

$$\Delta H_i = -2,303 RT^2 \cdot \frac{dpK}{dT}$$

badając zależność pK enzymu od temperatury.

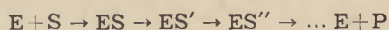
Dla α i β grup karboksylowych wartość ΔH_i wynosi około 1500 kal/mol, dla ugrupowania fenolowego i imidazolowego 6 000—7 000 kal/mol, zaś dla grup α i ϵ -aminowych oraz grupy guanidynowej aż 10 000—13 000 kal/mol (13).

Opisane metody kinetycznej identyfikacji grup czynnych enzymu pozwalają jedynie na ogólną orientację co do rodzaju tych grup. Wiadomo bowiem, że wartości pK i ΔH_i zależą w znacznym stopniu od obecności innych charakterystycznych ugrupowań białka, nie biorących bezpośredniego udziału w reakcji enzymatycznej. Ostateczna interpretacja wyników otrzymanych drogą wyznaczania stałych kinetycznych powinna być zatem poparta innymi, bardziej bezpośrednimi metodami.

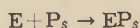
II. Bezpośrednie znakowanie centrum aktywnego enzymów substratem lub pseudosubstratem

Metoda badania centrum aktywnego za pomocą znakowania substratem lub pseudosubstratem dostarcza bezpośrednich informacji zarówno o charakterze reszt aminokwasowych, biorących udział w wiązaniu substratu, jak i o rodzaju wiązania. Metodę tę można stosować jedynie wtedy, jeżeli w toku reakcji enzymu z substratem tworzy się wiązanie kowalencyjne. Tworzenie się tego rodzaju połączeń jest wprawdzie dosyć częste, ale kompleks enzym-substrat można wyodrębnić tylko wtedy, gdy utworzone wiązanie jest termodynamicznie i kinetycznie stabilne oraz nie ulega rozpadowi podczas izolowania kompleksu. Za pomocą bezpośredniego znakowania substratem Grazi i wsp. (23) wykazali obecność lizyny w centrum aktywnym aldolazy i transaldolazy. Otrzymali oni stabilne kompleksy tych enzymów z dwuhydroksyacetonem, fosforanem dwuhydroksyacetonu i 6-fosfofruktozą. Wyodrębnienie ich w tym przypadku było możliwe, ponieważ ϵ -aminowa grupa lizyny w centrum aktywnym tworzy z grupą karbonylową substratu trwałe wiązanie kowalencyjne dając połączenie typu zasady Schiffa. Okazało się przy tym, że kompleks transaldolazy ze szczepu drożdżowego *Torulopsis utilis* z substratem (6-fosfofruktozą) zawiera tylko jedno wiązanie typu zasady Schiffa (5).

Często stosuje się także znakowanie centrum aktywnego pseudosubstratem. Nazwą tą określa się związek ściśle zbliżony do substratu pod względem składu chemicznego, struktury płaskiej i przestrzennej. Jego grupy reaktywne muszą się znajdować w pozycjach analogicznych do zajmowanych w substracie naturalnym, tak, aby łączyły się z tymi samymi grupami reaktywnymi enzymu. Różnica pomiędzy substratem (S) a pseudosubstratem (P_s) powinna wystąpić dopiero w efekcie końcowym. Przy użyciu substratu naturalnego po szeregu reakcji pośrednich odłącza się produkt końcowy (P):



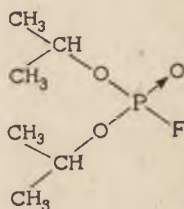
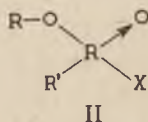
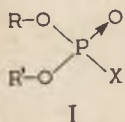
W przypadku pseudosubstratu następuje nieodwracalne jego połączenie się z enzymem:



Pseudosubstratami dla enzymów o aktywności esterazowej, cholinoesterazowej, acetylocholinoesterazowej oraz dla chymotrypsyny, trypsyny, trombiny i niektórych lipaz (2, 41, 43) są organiczne związki fosforu o ogólnych wzorach I i II. Spośród nich najczęściej stosowanym do znakowania centrum aktywnego jest fluorek fosforanu dwuizopropylowego (DFP) (III).

Wymienione wyżej enzymy reagują z DFP w stosunku 1:1 (33). Substrat i inhibitory kompetycyjne ochraniają enzym przed inaktywującym

działaniem DFP co wskazuje, że pseudosubstrat przyłącza się w miejscu wiązania substratu (34). Chymotrypsyna tworzy z DFP nieaktywną, mo-



nofosforanową pochodną (DFP-chymotrypsynę), którą otrzymano w postaci krystalicznej. Wykazuje ona taką samą ruchliwość elektroforetyczną, szybkość sedimentacji i skład aminokwasowy co białko natywne. DFP reaguje tylko z chymotrypsyną w aktywnej konfiguracji. W wyniku hydrolizy ^{32}P -DFP-chymotrypsyny otrzymano $\text{Ser}^{32}\text{PO}_4$ oraz peptydy: $\text{SerPO}_4\text{-Gli}$, $\text{Asp-SerPO}_4\text{-Gli}$, Gli-Asp-SerPO_4 (63, 64, 65). W ten sposób stwierdzono, że w centrum aktywnym chymotrypsyny grupa -OH seryny bierze bezpośredni udział w wiązaniu substratu oraz ustalono sekwencję aminokwasów wokół aktywnej seryny.

DFP fosforyluje także aktywną grupę -OH seryny w trypsynie. Reakcja nie zachodzi w obecności pseudosubstratów: *N*-tozylo-*L*-argininy i ϵ -aminokapronianu heksylowego. Wskazuje to, że fosforylacji ulega grupa czynna znajdująca się w centrum aktywnym trypsyny (44). Stosując jako pseudosubstrat pochodne *N*-tozylo-*L*-fenyloalaniny stwierdzono w centrum aktywnym enzymów proteolitycznych obecność dwóch reszt imidazolowych histydyny zbliżonych przestrzennie do aktywnej seryny (46, 65).

Pochodne substratu zastosowano również w badaniach nad rodzajem grup czynnych decydujących o aktywności rybonukleazy i dezoksyrybonukleazy u *Staphylococcus aureus* (9).

III. Metody chemicznej modyfikacji grup czynnych w enzymach

Metody te polegają na modyfikacji grup czynnych w enzymach lub ich blokowaniu specyficznymi odczynnikami i następnie na ustalaniu zależności między ilością zmodyfikowanego aminokwasu a zmianą aktywności enzymu. Do modyfikacji stosuje się odczynniki działające wybiórczo na określone reszty aminokwasowe, przy czym reakcja powinna być

możliwa do przeprowadzenia w niskiej temperaturze, w pH 4—8, powinna przebiegać w stosunkach stechiometrycznych i być odwracalna. Zalecane jest stosowanie odczynników o stosunkowo niskim ciężarze cząsteczkowym, aby wykluczyć możliwość oddziaływania przestrzennego. Proces modyfikowania enzymu powinien być poprzedzony kontrolnymi badaniami jego stabilności.

Jeżeli modyfikacja przebiega zgodnie z równaniem I-go rzędu (warunek ten można spełnić stosując nadmiar odczynnika modyfikującego, lub utrzymując jego stałe stężenie w czasie doświadczenia), to interpretację otrzymanych wyników ułatwia opracowana przez R a y a i K o s h l a n d a (54, 55) metoda kinetycznej analizy straty aktywności katalizycznej i sprzężonej z nią reakcji modyfikacji aminokwasów. Zasadę tej metody ilustruje hipotetyczny model enzymu, w którego centrum aktywnym znajduje się n aminokwasów $X_1, X_2, X_3 \dots X_n$. Zmiana aktywności enzymu w czasie działania odczynnikami modyfikującymi może być wyrażona za pomocą wzoru:

$$\frac{A}{A_0} = \frac{X_1}{X_{1_0}} + \frac{X_2}{X_{2_0}} + \frac{X_3}{X_{3_0}} + \dots + \frac{X_n}{X_{n_0}}$$

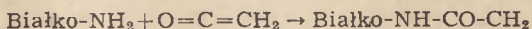
gdzie A_0 — aktywność w czasie 0, A — aktywność w czasie t , X_0 — stężenie aminokwasów w czasie 0, X_1, X_2, \dots, X_n — stężenie aminokwasów w czasie t . Stosunek $X/X_0 = 1$ oznacza, że aminokwas w danej reakcji nie ulega modyfikacji i nie można w ten sposób potwierdzić jego udziału w katalizowanej reakcji. Jeżeli szybkość modyfikacji aminokwasu jest większa aniżeli szybkość inaktywacji enzymu ($X/X_0 > A/A_0$) to aminokwas taki jest niezbędny dla jego aktywności. Bezpośredni udział w reakcji enzymatycznej biorą tylko te aminokwasy, które ulegają modyfikacji z szybkością mniejszą lub równą szybkości inaktywacji enzymu ($X/X_0 \leq A/A_0$).

Należy podkreślić, że całkowita lub częściowa inaktywacja enzymu w czasie modyfikacji może być także wynikiem zniszczenia struktury trzeciorzędowej białka na skutek zastosowania drastycznych warunków reakcji lub naruszenia struktury centrum aktywnego pomimo, że charakterystyczne grupy czynne nie uległy modyfikacji. Ponadto w wyniku reakcji z modyfikującym odczynnikiem w centrum aktywnym enzymu występować mogą niewielkie zmiany rozkładu ładunku na powierzchni cząsteczki enzymu lub zmiany konformacji białka.

W dalszym ciągu artykułu omówione będą niektóre najczęściej stosowane metody chemicznej modyfikacji enzymów. Ze względu na ograniczoną specyficzność odczynników, które znalazły zastosowanie do badania centrum aktywnego opisane metody zgrupowano według rodzaju stosowanej reakcji, a nie rodzaju zmodyfikowanych grup czynnych aminokwasów.

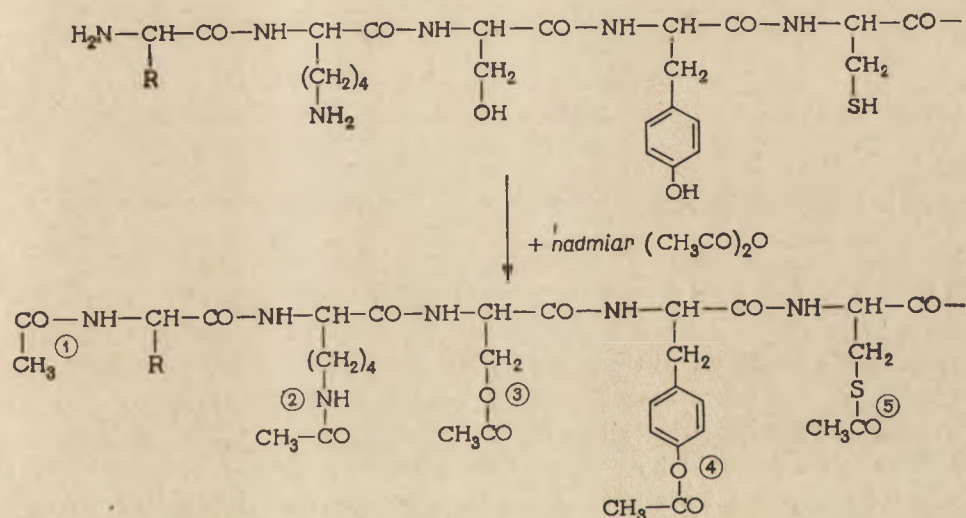
1. Acylowanie

Acylowanie lub acetylowanie jest jedną z metod modyfikacji grup aminowych. Reakcję przeprowadza się najczęściej za pomocą ketenu ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$) lub bezwodnika kwasu octowego $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$. Reakcja z ketenem zachodzi w pH alkalicznym według schematu:



Przeprowadzenie grupy aminowej w acetyloaminową pod wpływem bezwodnika kwasu octowego zachodzi w pH 5—7 i w temperaturze 0° , w tych warunkach acetylowaniu ulega około 95% grup aminowych (52).

Poza grupami aminowymi, które najłatwiej reagują z ketenem, acetylacji ulegają także grupy tiolowe cysteiny oraz hydroksylowe tyrozyny i seryny (24). Reagują one również z bezwodnikiem kwasu octowego, szczególnie łatwo w pH alkalicznym, tworząc wiązania estrowe, które są jednak znacznie mniej trwałe aniżeli N-acetylowe. Przebieg reakcji przedstawiono na schemacie 2 (16, 52).



Schemat 2. Reakcje acetylowania poszczególnych grup czynnych aminokwasów

①, ② — wiązania N-acetylowe, w pH 5—7 stabilne jak wiązania peptydowe, ③ — wiązanie O-acetylowe, w pH 10 ulegające rozpadowi pod wpływem NH_4OH z odtworzeniem grupy $-\text{OH}$ seryny, ④, ⑤ — wiązanie O-acetylowe, w pH 11 ulegające rozpadowi z odtworzeniem grup $-\text{OH}$ tyrozyny i $-\text{SH}$ cysteiny

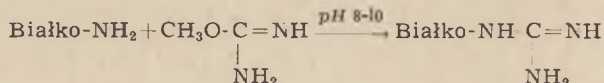
Acetylowanie bezwodnikiem kwasu octowego karboksypeptydazy A powoduje całkowite zahamowanie aktywności peptydazowej tego enzymu i równoczesny, sześciokrotny wzrost jego aktywności esterazowej. Ten sam efekt daje acylowanie bezwodnikami kwasów n-izomasłowego, n-walerianowego i propionowego oraz N-acetyloimidazolem. Zmiany aktywności są wywołane modyfikacją dwóch grup $-\text{OH}$ tyrozyny (69). Stosując metodę acetylowania stwierdzono również udział grup hydroksylo-

wych tyrozyny w reakcji katalizowanej przez pepsynę (27) i dwufosforan fruktozy (50).

Acetyloimidazol zastosowano do badania grup czynnych warunkujących reakcję katalizowaną przez nukleazę otrzymaną ze szczepu *Staphylococcus aureus*. Pod wpływem acetyloimidazolu zachodzi acetylacja 5 reszt tyrozyny i 9—10 reszt lizyny. Reakcji tej towarzyszy całkowita utrata aktywności DNA-zowej i RNA-zowej enzymu. W obecności inhibitora kompetycyjnego, 3'5'-dwufosforanu deoksytymidyny, tylko 2 reszty tyrozyny oraz 8—9 reszt lizyny ulega reakcji czemu nie towarzyszy utrata aktywności enzymu (10). Wynik ten sugeruje udział reszt tyrozyny w reakcji katalizowanej przez tę nukleazę bakteryjną. Baddiley i wsp. (1) użyli jako odczynnika acylującego N,S-dwuacetyloetanoloaminy, która reaguje specyficznie z grupami aminowymi. Jednakże długi czas trwania reakcji i wysokie pH (9—10) znacznie zmniejsza możliwości stosowania tego odczynnika do modyfikacji enzymów.

2. Modyfikacje O-metyloizomocznikiem i formaldehydem

O-metyloizomocznik jest odczynnikiem modyfikującym specyficznie grupy aminowe, a zwłaszcza łatwo reaguje z grupami ε-aminowymi lizyny (6). Reakcja, z lizyną prowadzi do powstania homoargininy:



Klee i Richards (37) zastosowali O-metyloizomocznik do modyfikacji rybonukleazy z trzustki wołu. W wyniku reakcji dziesięć reszt lizyny ulega podstawieniu bez utraty aktywności enzymu, a dopiero modyfikacja częściowo zamaskowanej i trudno dostępnej reszty lizyny, w pozycji 41 powoduje całkowitą inaktywację enzymu.

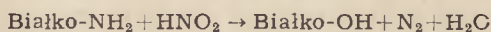
Reakcja z formaldehydem, określana jako hydroksymetylowanie, jest charakterystyczna zwłaszcza dla grupy guanidynowej argininy. Grupa ta, jako bardziej zasadowa od grupy aminowej, ulega acylowaniu jedynie w drastycznych warunkach prowadzących do denaturacji białka (15). Dlatego też modyfikację reszt argininy w białkach enzymatycznych przeprowadza się głównie za pomocą formaldehydu, który jest jednym z niewielu odczynników reagujących z arginina w łagodnych warunkach pH i temperatury. Niestety formaldehyd reaguje również z grupami aminowymi, tiolowymi i hydroksylowymi.

3. Reakcje z fluorodwunitrobenzenem i kwasem azotawym

Do modyfikacji grup aminowych w enzymach wykorzystano także reakcję z fluorodwunitrobenzenem, stosowaną do znakowania N-końco-

wych aminokwasów w badaniach sekwencji białek (62). Modyfikacja karboksypeptydazy A tym odczynnikiem pozwoliła na wykluczenie możliwości udziału grup aminowych w centrum aktywnym enzymu (69). Fluorodwunitrobenzen, podobnie jak O-metyloizomocznik, powoduje całkowitą inaktywację rybonukleazy A w wyniku modyfikacji grupy ε-aminowej lizyny w pozycji 41 (29).

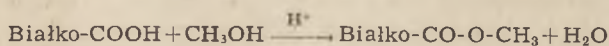
W reakcji białek z kwasem azotawym grupy aminowe ulegają dezaminacji:



Reakcja ta zachodzi w niskim *pH* i w związku z tym często towarzyszy jej denaturacja białka (26). W *pH* 4 grupa aminowa nie ulega dezaminacji, natomiast modyfikowane są reszty tyrozyny i tryptofanu. Działanie kwasem azotawym na trzustkową pankreato-peptydazę (EC.3.4.4.7.) powoduje dezaminację grupy aminowej N-końcowej waliny i równocześnie enzym ulega inaktywacji z szybkością proporcjonalną do wzrostu stężenia kwasu (20, 21). Dezaminacja N-końcowej izoleucyny w trypsynie także inaktywuje enzym. Przypuszcza się, że rola aminowej grupy N-końcowej izoleucyny w trypsynie polega na stabilizacji centrum aktywnego (46).

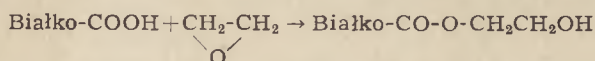
4. Estryfikacja

Reakcja ta dotyczy wolnych grup karboksylowych w białkach. Najłatwiej estryfikować alkoholem w środowisku kwasu solnego (16):



Reakcja ta jednak powoduje denaturację wielu białek, a co za tym idzie niespecyficzną inaktywację enzymów.

Ekstryfikację można również przeprowadzać tlenkami alkilenów (epoksydami). Reakcja ta zachodzi w roztworach wodnych i w łagodniejszych warunkach, niż estryfikacja alkoholami, jednakże jest mniej specyficzna i alkilowaniu ulegają również grupy aminowe, fenolowe i tiolowe. Reakcja estryfikacji za pomocą epoksydów zachodzi według schematu:

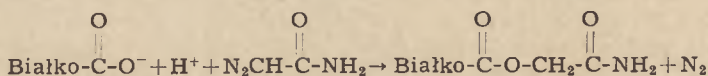


Przebieg reakcji zależy w znacznym stopniu od *pH*. Grupy karboksylowe reagują najszybciej w środowisku kwaśnym.

Do estryfikacji grup karboksylowych w enzymach zastosowano również bromek fenacylu. Związek ten i jego pochodne hamują specyficznie aktywność pepsyny. Reakcja zachodzi stechiometrycznie w stosunku 1:1. Inaktywację enzymu powoduje zmodyfikowanie grupy β-karboksylowej kwasu asparaginowego. Kwas asparaginowy znajduje się prawdopodobnie w obszarze centrum aktywnego w pobliżu aminokwasów kon-

taktowych i podstawienie jego grupy β -karboksylowej maskuje przestrzennie te aminokwasy.

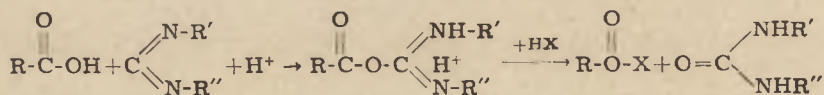
Klasycznym związkiem stosowanym do estryfikacji grup karboksylowych jest dwuazometan, który, jako związek bardzo reaktywny, metyluje także wolne grupy aminowe i fenolowe (52). Podstawienie atomu węgla w dwuazometanie elektrododatnią grupą $-\text{CO}-\text{NH}_2$ znacznie zmniejsza jego reaktywność. Powstały w ten sposób dwuazoacetamid reaguje jedynie z grupami karboksylowymi i tiolowymi, przy czym grupę $-\text{SH}$ można ochronić przed modyfikacją przez odwracalne zablokowanie stechiometryczną ilością rtęcio-metanu (14). Reakcja estryfikacji grup karboksylowych dwuazoacetamidem przebiega następująco:



Modyfikację grup karboksylowych białka dwuazoacetamidem zastosowano między innymi do badań nad reaktywnością poszczególnych grup karboksylowych w cząsteczce α -chymotrypsynogenu (14).

Z innych dwuazowych pochodnych do estryfikacji grup karboksylowych zastosowano ester metylowy dwuazoacetylo-DL-norleucyny. Odczynnik ten nadaje się szczególnie do wykrywania grup karboksylowych w centrum aktywnym pepsyny, ponieważ jest równocześnie analogiem substratu (53). Do estryfikacji grup karboksylowych w cząsteczce rybonukleazy zastosowano amid dwuazoacetyloglicyny (56).

Horae i Koshland (30) opracowali metodę modyfikacji grupy karboksylowej, polegającą na jej aktywacji przez rozpuszczalny w wodzie karbodwuimid, a następnie na reakcji z nukleofilowym związkiem (HX), na przykład estrem metylowym glicyny:



Reakcje te można przeprowadzać w obecności mocznika i chlorowodoru guanidyny, co ma istotne znaczenie w modyfikacji grup zamaskowanych. Glicynę w odczynniku modyfikującym można zastąpić aminokwasami rzadko występującymi w białkach. Metoda ta może być wykorzystana do badania struktury przestrzennej centrum aktywnego ze względu na zmienne podstawniki R' i R'' . Posługując się tą metodą, Horae i Koshland (30) uzyskali zestryfikowanie 96% grup karboksylowych w rybonukleazie i insulynie.

5. Utlenianie

Największą wrażliwość na działanie związków utleniających, jak nadtlenki, tlen, ozon, żelazicyjanek potasu, jodobenzoesan i inne, wykazują

reszty tryptofanu, metioniny, cysteiny i tyrozyny. Davidson i Westley (11) stwierdzili obecność reszty tryptofanowej w centrum aktywnym siarkotransferazy tiosiarczanowej (EC.2.8.1.1.) stosując utlenianie białka N-bromoimidem kwasu bursztynowego, który reaguje przede wszystkim z pierścieniem indolowym (19, 47). Przebieg reakcji utleniania lizozymu, trypsyny i chymotrypsyny nadtlaniem wodoru w roztworze dwuwęglanu zawierającym dioksan wykazał, że szybkość utleniania łatwiej i trudniej dostępnych rzeszt tryptofanowych jest funkcją stężenia H_2O_2 . Pozwoliło to rozróżnić w badanych enzymach reszty tryptofanowe o różnej reaktywności (24).

Zdolność łatwego utleniania się jest jedną z najbardziej charakterystycznych reakcji dla grupy tiolowej cysteiny. Utlenianie może przebiegać w dwojaki sposób: albo zachodzi utlenienie do wiązania dwusiarczowego, przy czym reakcja ta może być odwracalna, albo zastosowanie silniejszych odczynników utleniających prowadzi nieodwracalnie do powstania sulfonianów (67). Utlenianie reszt tiolowych w cząsteczce cytochromu b_2 powoduje inaktywację tego enzymu na skutek agregacji białka i dysocjacji flawiny. Jednakże reakcję utleniania rzadko wykorzystuje się do indentyfikacji grupy tiolowej w centrach aktywnych enzymów ze względu na to, że istnieje cały szereg reakcji bardziej specyficznych dla grup -SH.

6. Fotooksydacja

Metodę modyfikacji aminokwasów na drodze fotooksydacji opracowali Weil i wsp. (71, 72, 73). Wykorzystali oni znane od dawna zjawisko tzw. „fotodynamicznego działania barwników”, polegające na zdolności uczulania przez niektóre barwniki systemów biologicznych na światło widzialne. Pod wpływem światła widzialnego w obecności tlenu i błękitu metylenowego utlenianiu ulega pięć aminokwasów: histydyna, tryptofan, tyrozyna, metionina i cysteina. Najszybciej modyfikacji ulegają pierwsze dwa aminokwasy. Fotooksydacja grup czynnych wyżej wymienionych aminokwasów zachodzi bardzo szybko w warunkach pH i temperatury optymalnych dla stabilności większości enzymów, co stawia ją w rzędzie najlepszych metod badania centrum aktywnego. Fotooksydacja odpowiada reakcji I-go rzędu. Zachodzi w ten sam sposób dla wolnych aminokwasów jak i związanych w białku. Analiza końcowych produktów modyfikacji wykazała, że podczas fotooksydacji zmianie nie ulegają ani grupy karboksylowe ani aminowe. Fotooksydacja nie powoduje żadnych zmian fizykochemicznych własności białek jak lepkość, rozpuszczalność (3, 71, 73). Za pomocą fotooksydacji krystalicznego lizozymu stwierdzono udział histydyny i tryptofanu w budowie centrum aktywnego tego enzymu (72). Wyniki te były zgodne z danymi otrzymanymi innymi metodami. Dzięki

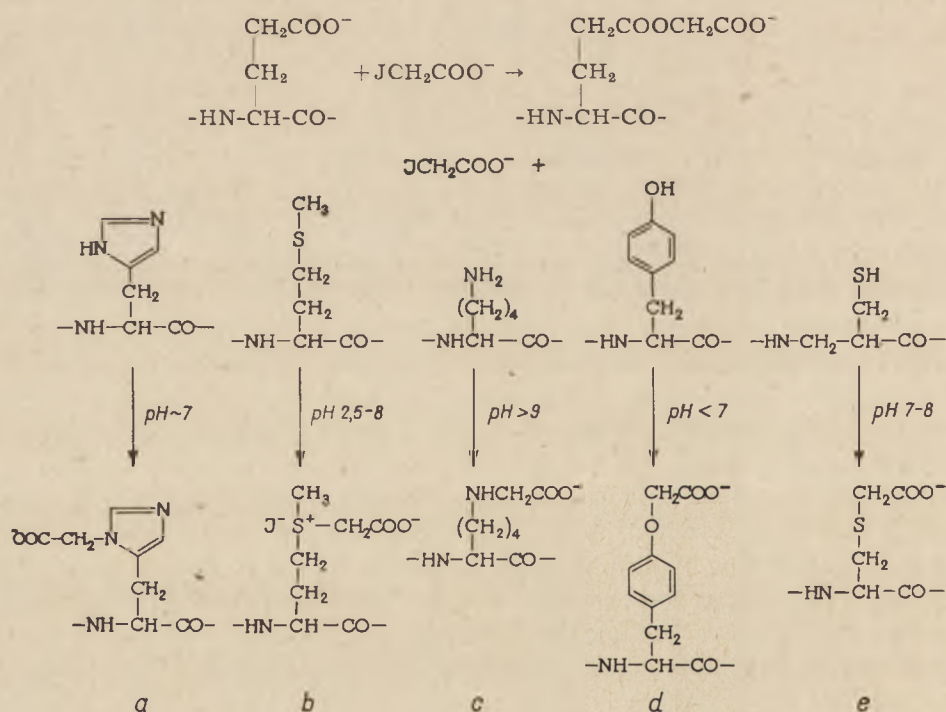
zastosowaniu omawianej metody stwierdzono, że ATP-azową aktywność miozynu A warunkują reszta histydynowa i dwie grupy tiolowe (68).

Ray i Koshland (54, 55) zastosowali metodę fotooksydacji do badania centrum aktywnego fosfoglukomutazy oraz α -chymotrypsyny. Ponadto stwierdzono, że selektywnej fotooksydacji może ulegać metionina w środowisku kwasu mrówkowego lub octowego (36).

7. Alkilowanie

Alkilowanie grup czynnych białek można przeprowadzić jodkiem lub bromkiem etylu, dwumetylosiarczanem i dwuazometanem. Hydroksyalkilowanie przeprowadza się za pomocą tlenków alkilenów, a karboksyalkilowanie — α -chlorowco-kwasami. Ze wszystkich tych metod najlepiej teoretycznie opracowane jest karboksyalkilowanie, a szczególnie karboksymetylowanie tj. modyfikacja kwasem chlorowcooctowym lub jego amidem.

Początkowo karboksymetylowanie stosowano do wykrywania grup tiolowych. Dalsze badania wykazały, że w białkach poza grupami -SH reagują również czynne grupy histydyny, tyrozyny, metioniny i lizyny (4, 37, 38) (schemat 3) oraz wolne grupy karboksylowe, które ulegają es-



Schemat 3. Modyfikacja aminokwasów: a) histydyny, b) metioniny, c) lizyny, d) tyrozyny, e) cysteiny, za pomocą jodokwasu

tryfikacji. Modyfikację na drodze karboksymetylacji można przeprowadzić w szerokim zakresie pH , a reaktywność poszczególnych grup czynnych aminokwasów w znacznym stopniu zależy od stężenia jonów wodorowych, co zwiększa selektywność metody.

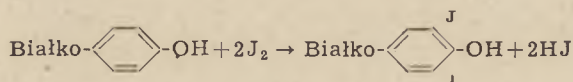
Rybonukleazę A modyfikowano bromokwasami różniącymi się długością łańcucha i konfiguracją optyczną: D i L bromooctanem, D- i L- α -bromopropionianem, D- i L- α -bromomaślanem oraz amidem kwasu jodooctowego. Alkilowaniu ulegają przede wszystkim trzy aminokwasy, a mianowicie histydyna w pozycji 12 i 119 oraz lizyna w pozycji 41, które prawdopodobnie biorą udział w katalitycznym działaniu rybonukleazy. Z bromooctanem reaguje głównie ϵ -aminowa grupa lizyny. D-izomery kwasów reagują z N-3 histydyny w pozycji 12 a L-izomery z N-1 histydyny w pozycji 119. Wyniki tych doświadczeń nasuwają przypuszczenie, że odległe od siebie w łańcuchu peptydowym aminokwasy w pozycjach 12, 41, 119 w układzie przestrzennym cząsteczki znajdują się blisko siebie (w odległości 7—10 Å), a ich reaktywność zależy od wzajemnego oddziaływania (8, 18, 25).

Za pomocą reakcji alkilacji stwierdzono obecność reaktywnej grupy tiolowej w centrum aktywnym enzymów proteolitycznych papainy i ficyny (22).

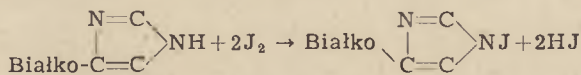
Do alkilowania centrum aktywnego karboksypeptydazy B zastosowano pochodne substratu N-acyloaminokwasów. Inaktywacja enzymu spowodowana była modyfikacją tyrozyny (49). Dzięki metodzie alkilowania wykazano między innymi udział wolnych grup -SH w katalitycznym działaniu dehydrogenazy 6-fosfoglukonianu (59) i pierścienia imidazolowego histydyny w centrum aktywnym anhydrazy B (74).

8. Jodowanie

Rozcieńczony roztwór jodu reaguje z białkami szybko i w niskiej temperaturze. Utlenia on grupy tiolowe oraz podstawia dwa atomy wodoru w ugrupowaniu hydroksyfenylowym tyrozyny:



i atom wodoru w grupie NH histydyny:



Jodowaniu może ulegać także reszta tryptofanu.

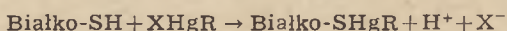
Przebieg reakcji zależy od pH . W pH około 3 zachodzi utlenianie grup -SH, wraz ze wzrostem pH zaczyna przeważać reakcja podstawienia, a w pH powyżej 5 zachodzi tylko podstawienie (26). Modyfikacja przez jodowanie powoduje nieodwracalną inaktywację aminopeptydazy z nerki

świni. Znakowanie radioaktywnym jodem ^{131}J wykazało, że jedynym aminokwasem, który ulega jodowaniu jest tyrozyna (70).

W rybonukleazie jodowaniu ulegają trzy ugrupowania hydroksyfenylowe i 119 reszta imidazolowa histydyny (7). Poszczególne reszty tyrozyny wykazują różną reaktywność w stosunku do jodu. Najszybciej reaguje tyrozyna w pozycji 115, w układzie przestrzennym cząsteczki zbliżona do histydyny 119 (17, 28). Inkubacja peroksydazy z jodem powoduje powstawanie mono- i dwupodstawionych reszt tyrozyny w cząsteczce enzymu (45).

9. Reakcje z chlorowcopochodnymi organicznych związków rtęci i N-etyloimidem kwasu maleinowego (NEM)

Organiczne związki rtęci typu R-HgX jak *p*-chlorortęciobenzoesan (PCMB), *p*-chlorortęciosulfonian (PCMS), metylortęciojodan należą do najbardziej specyficznych i najaktywniejszych odczynników stosowanych do modyfikacji grup tiolowych, chociaż znane są również ich reakcje z resztą imidazolową histydyny (40). Podstawienie grupy tiolowej przez organiczne związki rtęci zachodzi zgodnie z reakcją:



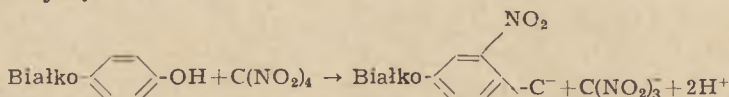
Związki typu PCMB i PCMS pozwalają na wykrycie grup tiolowych zarówno łatwo dostępnych jak i zamaskowanych (16).

N-etyloimid kwasu maleinowego (NEM), podobnie jak i związki organiczne rtęci należy do najbardziej specyficznych odczynników na grupy tiolowe (15). Dzięki stosowaniu tych związków stwierdzono między innymi obecność grupy tiolowej w centrum aktywnym dehydrogenazy zred. NAD (42).

10. Nitrowanie

Reakcję nitrowania charakterystyczną dla reszty tyrozynowej przeprowadza się za pomocą kwasu azotowego. Ze względu na denaturujące własności tego silnego kwasu reakcja nie znalazła zastosowania do modyfikacji enzymów.

Do nitrowania reszt tyrozyłowych w białkach Riordan i wsp. (57, 58, 66) zastosowali czteronitrometan. W wyniku reakcji otrzymuje się 3-nitrotyrozynę:



Wprowadzenie chromoforowej grupy nitrowej do cząsteczki białka powoduje zmianę jego widma absorpcyjnego dzięki czemu przebieg reakcji można śledzić metodą spektrofotometryczną (66). Działając czteronitrometanem na karboksypeptydazę wykazano obecność grupy -OH tyrozyny w centrum aktywnym tego enzymu.

Poza tyrozyną z czteronitrometanem reaguje jedynie cysteina, która

ulega utlenieniu. Reakcja ta zachodzi tylko w środowisku kwaśnym, a nitrowanie tyrozyny tylko w pH 7 (57).

11. Sprzęganie z solami dwuazoniowymi

Reakcja sprzęgania ze związkami dwuazowymi jest charakterystyczna dla histydyny i tyrozyny oraz grup tiolowych cysteiny, pierścienia indolowego tryptofanu, ϵ -aminowej grupy lizyny oraz, jeżeli lizyna jest N-końcowym aminokwasem, jej α -aminowej grupy. Pierwszym związkiem dwuazoniowym zastosowanym do badań białek był zdwuazowany kwas sulfanilowy (48).

Barwne produkty powstawały w wyniku sprzęgania tego kwasu z resztami histydyny i tyrozyny, które ulegają tej reakcji najszybciej i w warunkach optymalnych dla stabilności enzymów. Zdwuazowany kwas sulfanilowy zastosowano między innymi w badaniach centrum aktywnego fruktozo-dwufosfatazy z wątroby królika (51, 52) wykazując obecność czynnych reszt tyrozylowych warunkujących hydrolityczną aktywność i wrażliwość enzymu na działanie AMP, jego allosterycznego inhibitora.

Związkiem dwuazowym specyficznie działającym na reszty histydyny jest dwuazo-1-H-tetrazol (DHT). Odczynnik wykazujący bardzo dużą reaktywność w stosunku do histydyny, daje barwną pochodną histydyno-dwuazo-1-H-tetrazolu o maksimum absorpcji przy 480 nm. DHT reaguje również z tyroziną, ale znacznie wolniej, a poza tym pochodne tyrozyny wykazują znacznie mniejszą absorpcję światła z maksimum przy 550 nm. DHT nie daje z białkami żadnych innych barwnych produktów ubocznych, dzięki czemu można stosować duże stężenia odczynnika (31, 32). Badając wpływ DHT na rybonukleazę z trzustki wołu potwierdzono wyniki dotychczasowych badań nad udziałem histydyny w pozycji 12 i 119 w katalitycznym działaniu enzymu. Za pomocą dwuazowej pochodnej tetrazolu wykazano także udział reszt histydynowych w aktywności lizozymu i proteinaz; DHT zastosowano również do badań centrum aktywnego karboksypeptydazy A (31).

Jak wynika z przedstawionego powyżej przeglądu metod stosowanych do badania grup czynnych centrum aktywnego enzymów dobór właściwych odczynników oraz warunków reakcji jest decydujący dla uzyskania jednoznacznych wyników. W zasadzie nie ma odczynników specyficznych na określone grupy funkcyjne, dlatego też dla uzyskania danych o roli poszczególnych reszt aminokwasowych w katalizie enzymatycznej niezbędne jest porównawcze stosowanie różnych metod modyfikacji enzymów zarówno kinetycznych jak i chemicznych.

Należy dodać, że ostatnio zaczęto stosować metody badania jądrowego rezonansu magnetycznego grup czynnych w enzymach (60), które na przyszłość mogą znaleźć szersze zastosowanie w określaniu struktury centrum aktywnego.

LITERATURA

1. Baddiley J., Kekwick R. A., Thain E. M., *Nature* **470**, 968 (1952).
2. Balls A. K., Jansen E. F., *Advan. Enzymol.* **13**, 321 (1952).
3. Barnard E. A., Stein W. D., *Advan. Enzymol.* **20**, 51 (1962).
4. Bradshaw R. A., Robinson G. W., Hass G. H., Hill R. L., *J. Biol. Chem.* **244**, 1755 (1969).
5. Brand K., Harecker B. L., *Z. Anal. Chemie* **243**, 6409 (1968).
6. Chervenka Ch. H., Wilcox P. E., *J. Biol. Chem.* **222**, 635 (1956).
7. Covelli I., Wolft J., *J. Biol. Chem.* **241**, 4444 (1966).
8. Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **238**, 2421 (1961).
9. Cuatrecasas P., Fucks S., Anfinsen Ch. B., *J. Biol. Chem.* **242**, 4759 (1967).
10. Cuatrecasas P., Fucks S., Anfinsen Ch. B., *Biochim. Biophys. Acta* **159**, 417 (1968).
11. Davidson B., Westley J., *J. Biol. Chem.* **240**, 4463 (1965).
12. Dixon M., *Biochim. J.* **55**, 161 (1953).
13. Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, Longmans, Greens and CO, London-New York-Toronto 1958, str. 62.
14. Doscher M. S., Wilcox P. E., *J. Biol. Chem.* **236**, 1328 (1961).
15. Fraenkel-Conrat H., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom 4, str. 247.
16. Fraenkel-Conrat H., w *Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florin, E. H. Stotz, Elsevier Publishing Company, Wormerveer-Amsterdam 1963, tom 7, str. 56.
17. Friedman M. E., Sheraga H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 566 (1966).
18. Fruchter G., Creatfield A. M., *J. Biol. Chem.* **242**, 5807 (1967).
19. Fuller R., *Chem. Rev.* **63**, 21 (1963).
20. Gertler A., Hofmann T., *J. Biol. Chem.* **242**, 2522 (1967).
21. Gertler A., Hofmann T., *J. Biol. Chem.* **242**, 8322 (1967).
22. Gerwin B. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 4212 (1967).
23. Grazi E., Rowley P. T., Cheng T., Tchola O., Horecker B. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 38 (1962).
24. Hashimori Y., Horinishi H., *Biochim. Biophys. Acta* **346**, 93 (1964).
25. Heinrickson R. L., *J. Biol. Chem.* **241**, 1393 (1966).
26. Herriot R. M., *Advan. Protein Chem.* **3**, 170 (1952).
27. Herriot R. M., *J. Gen. Physiol.* **19**, 283 (1953).
28. Herriot R. M., w *Symposium on the Mechanism of Enzyme Action*, red. W. D. McElroy, B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore 1954, str. 24.
29. Hirs C. H. W., Halman M., Kycia J. H., w *Biological Structure and Function*, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, Academic Press, Londyn-New York 1961, tom 1, str. 41.
30. Horae D. G., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **242**, 2447 (1967).
31. Horinishi H., Hashimori Y., Kunharak O., Shibata K., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 477 (1964).
32. Horinishi H., Takenaka O., Shibata K., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 371 (1966).
33. Jansen E. F., Balls A. K., *J. Biol. Chem.* **194**, 721 (1952).
34. Kariban D., Laurent G. J., Labouesse B., *Eur. J. Biochem.* **5**, 260 (1968).
35. Kartha G., Bello J., Henker O., *Nature* **213**, 865 (1967).

36. Kennedy E. P., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **228**, 419 (1957).
37. Klee W. E., Richards F. M., *J. Biol. Chem.* **229**, 489 (1957).
38. Korman S., Clarke H. T., *J. Biol. Chem.* **221**, 133 (1956).
39. Koshland D. E., *Science* **142**, 1533 (1963).
40. Leads S. J., w *Analytical Methods in Protein Chemistry*, red. Alexander P., Lundgren M. P., Pergamon Press, Londyn 1966, tom 4, str. 33.
41. Mackworth J. W., Webb E. G., *Biochem. J.* **42**, 91 (1948).
42. Mersmann H., Luthy J., Singer T. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 43 (1966).
43. Miller K. O., Vunakis H. V., *J. Biol. Chem.* **223**, 227 (1957).
44. Muramatu M., Fuja S., *J. Biochemistry* **65**, 17 (1969).
45. Nunez J., Poranues J., *Eur. J. Biochem.* **5**, 114 (1968).
46. Oppenheimer H. L., Labouesse B., Hess G. P., *J. Biol. Chem.* **241**, 2720 (1966).
47. Pathornik A., Lawson W. B., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4747 (1958).
48. Pauly H. Z., *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.* **42**, 508 (1904).
49. Plummer T. H. Jr., Lawson W. B., *J. Biol. Chem.* **241**, 1648 (1966).
50. Pontremoli S., Grazi E., Accorsi A., *Biochemistry* **5**, 3568 (1966).
51. Pontremoli S., Grazi E., Accorsi A., *J. Biol. Chem.* **242**, 61 (1967).
52. Putnam F. W., w *The Proteins*, red. H. Neurath, Bailey K., Academic Press, New York 1953, tom I B, str. 893.
53. Rajagoplan T. G., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **241**, 4295 (1966).
54. Ray W. J., Koshland D. E., *Brookhaven Symp. Biol.* **13**, 135 (1960).
55. Ray W. J., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **237**, 2493 (1962).
56. Riehm J. P., Sheraga H. A., *Biochemistry* **4**, 722 (1965).
57. Riordan J. F., Sokolovsky M., Vallee B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4205 (1966).
58. Riordan J. F., Sokolovsky M., Vallee B. L., *Biochemistry* **6**, 358 (1967).
59. Rippa M., Grazi E., Pontremoli S., *J. Biol. Chem.* **241**, 1632 (1966).
60. Roterjans M., Witzel H., *Eur. J. Biochem.* **9**, 118 (1969).
61. Ronwin E., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 326 (1959).
62. Sanger F., *Advan. Protein Chem.* **7**, 1 (1952).
63. Schaffer N. K., May S. C., Sumneron W. H., *J. Biol. Chem.* **206**, 201 (1954).
64. Schaffer N. K., Simet L., Harshman S., Engle R. R., Drisko R. W., *J. Biol. Chem.* **225**, 197 (1957).
65. Smith R. A., Liener J. E., *J. Biol. Chem.* **242**, 4037 (1967).
66. Sokolovsky M., Riordan J. F., Valle B. L., *Biochemistry* **5**, 3582 (1966).
67. Sri Ram J., Bier M., Maurer P., *Advan. Enzymol.* **24**, 105 (1962).
68. Stracker A., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 598 (1965).
69. Vallee B. L., *Federation Proc.* **23**, 8 (1964).
70. Wacksmuth E. D., *Biochem. Z.* **346**, 446 (1967).
71. Weil L., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 57 (1965).
72. Weil L., Buchert A. R., Maner J., *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 245 (1952).
73. Weil L., Gordon W. G., Buchert A. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 301 (1952).
74. Whitney P. L., Nyman P. O., Malstrom B. G., *J. Biol. Chem.* **242**, 4212 (1967).

MAGDALENA IRENA BUKOWSKA*

Owoalbumina

Ovalbumin

Present views on the chemical composition and structure of peptide as well as sugar moieties of ovalbumin are reviewed. Some suggestions on the heterogeneity of this protein are given.

Albumina stanowi 50⁰/₀ białka jaja kurzego. Po raz pierwszy uzyskał ją w formie krystalicznej Hofmeister w roku 1890 stosując wysalanie siarczanem amonu. Obecnie najczęściej otrzymuje się ją za pomocą metody Kekwicka i Cannana (42) z roku 1936, polegającej na wysalaniu siarczanem sodu. Tak uzyskany preparat, nawet po kilkakrotnym powtarzaniu procesu wytrącania, zawiera śladowe ilości owomukoidu.

Mimo, że owoalbumina jest jednym z najlepiej poznanych glikoproteidów, wiadomości o jej strukturze, funkcji i biosyntezie są jeszcze bardzo niekompletne. W roku 1966 Neuberger i Marshall (61) omówili niektóre zagadnienia związane ze strukturą owoalbuminy.

I. Własności owoalbuminy

Masa cząsteczkowa owoalbuminy, obliczona jako średnia z wartości uzyskanych różnymi metodami, wynosi 45 000. Białko to jest zbudowane z części peptydowej i cukrowej, przy czym przyjmuje się obecność jednego łańcucha polipeptydowego i jednego fragmentu oligosacharydowego. W tablicy 1 zebrano aktualne dane o jakościowym i ilościowym składzie owoalbuminy.

Charakterystyczna jest duża ilość reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego, co nadaje białku charakter kwaśny, wyrażający się punktem izoelektrycznym w *pH* 4,6. Również seryna, alanina i leucyna występują

* Mgr, Katedra Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wykaz stosowanych skrótów: AcNHG1k — N-acetyloglukozoamina, Man — mannoza

Tablica 1

Skład jakościowy i ilościowy owoalbuminy

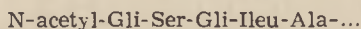
Składnik	Ilość reszt na mol białka (45 000)	Pozycja literatury
Kwas glutaminowy	52	61
Seryna	36	61, 84
Alanina	35	61
Kwas asparaginowy	32	61
Leucyna	32	61
Walina	28	61
Izoleucyna	25	61
Fenylalanina	21	61
Lizyna	20	61, 79, 84
Glicyna	19	61
Metionina	16	61
Treonina	16	61
Arginina	15	61
Prolina	14	61
Tyrozyna	9	61
Histydyna	7	61
Tryptofan	3	61
Cystyna	1 1 2	2, 3, 61, 84, 87,
Cysteina	5 6 lub 4	2, 3, 61, 84, 87
N-acetyloglukozos- amina	2—5	6, 12, 17, 26, 30, 31, 33, 40, 44, 45, 61, 63, 84
Mannoza	4—6	6, 12, 17, 26, 30, 31, 33, 40, 44, 45, 61, 63, 84
Grupy acetylowe	4	32
Kwas fosforowy	0—2	48, 61, 66, 67
Azot amidowy	31±1	32, 61, 76
Siarka całkowita	23	61
Azot całkowity	507	61

w dużych ilościach. W wolnej elektroforezie owoalbumina wykazuje heterogenność rozdzielając się na trzy frakcje różniące się zawartością kwasu fosforowego (48, 66, 67). Punkt izoelektryczny pI frakcji A_1 wynosi 4,58, frakcji A_2 — 4,65 i frakcji A_3 — 4,75 (68). Według niektórych autorów cząsteczki owoalbuminy różnią się ilością mostków dwusiarczkowych (2, 3). Jedne z tych cząsteczek mają prawdopodobnie pojedyncze wiązanie dwusiarczkowe i 6 wolnych grup tiolowych, inne — dwa mostki dwusiarczkowe i 4 reszty cysteiny. Większość autorów donosi jednak o występowaniu tylko 7 reszt cysteiny w owoalbuminie. Zgadza się to z ilością siarki ogólnej, która wynosi 23 atomy na cząsteczkę białka, z czego reszty metioniny zawierają 16 atomów. Sądzi się, że heterogenność owoalbuminy wynika ze zmienności składnika cukrowego (5, 16, 17, 47), zbudowanego z mannozy i N-acetyloglukozoaminy.

II. Część peptydowa

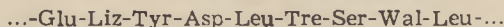
W początkowym okresie badań nad sekwencją aminokwasów w owoalbuminie nie stwierdzono wolnych reszt C- i N-końcowych (83) i przypuszczano, że owoalbumina występuje bądź jako cykliczny łańcuch polipeptydowy, bądź też, że oba końce tego łańcucha są maskowane przez składnik cukrowy (79). Niu i Fraenkel-Conrat (62) stosując hydrazynolizę wykazali obecność C-końcowej proliny. Inni autorzy, działając karboksypeptydazą (77), wykryli, że C-końcowym aminokwasem jest alanina. Prawdopodobnie jednak alanina była uwalniana jako C-końcowa z łańcucha bocznego przez śladowe ilości subtilopeptydazy A lub enzymu o podobnej specyficzności, którym był zanieczyszczony preparat karboksypeptydazy. Przyjmuje się więc ogólnie, że aminokwasem C-końcowym w owoalbuminie jest prolina w sekwencji ...-Wal-Ser-Pro (62).

Budowę N-końca łańcucha w pewnym stopniu wyjaśnili Johansen i wsp. (32). Autorzy ci uwolnili z 1 mola owoalbuminy 4 mole kwasu octowego, z których tylko trzy były związane ze składnikiem cukrowym. Zdaniem autorów czwarty acetyl blokuje aminokwas N-końcowy. Niedługo potem Marshall i Neuberger (55) wyodrębnili wolne od cukrów acetylopeptydy, zawierające 0,8 mola grup acetylowych na 1 mol białka. Przyjęto zatem, że końcowa grupa aminowa występuje w formie zacytylowanej. Sekwencję aminokwasów przy N-końcu określił Narita (58) (I).



I

Dzięki badaniu struktury glikopeptydów (33, 45, 53, 63) poznano sekwencję aminokwasów w pobliżu składnika cukrowego (II).



oligosacharyd

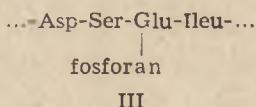
II.

Wykrywane przez niektórych autorów pewne odchylenia od tej sekwencji (13, 33) mogą wynikać z różnic genetycznych.

Po hydrolizie owoalbuminy trypsyną i zakwaszeniu do pH 4,7, połowa produktów tworzy osad, zwany frakcją T-I (37). Zawiera ona 85—90%_o cukrów obecnych w owoalbuminie (39). Nie wykazano w tej frakcji wolnych grup -SH, natomiast istnieją mostki -S-S- (38), które odgrywają główną rolę w stabilizacji agregatów. Frakcja T-I uzyskana z utlenionej owoalbuminy zawiera jedynie 0,5%_o cukrów. Rozbicie wiązań -S-S- powoduje więc uwolnienie glikopeptydów i przejście ich do roztworu (31).

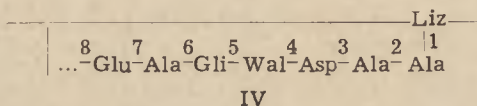
Wykazano, że część łańcucha peptydowego, związana bezpośrednio ze składnikiem cukrowym, nie zawiera reszty kwasu fosforowego. Jedna

z dwóch reszt fosforanowych występujących w cząsteczkach frakcji A₁ jest przyłączona do grupy hydroksylowej seryny, znajdującej się w sekwencji określonej wzorem III. Położenie tego fosfopeptydu jest nieznane.



Badaniem peptydów, w których występują cystyna i cysteina, zajmowali się Anfinsen i Flavin (1, 25). Wykazali oni obecność dwupeptydów zawierających cysteinę połączoną z różnymi aminokwasami, nie stwierdzili jednak w jaki sposób są one wbudowane w łańcuch polipeptydowy. Zawartość siarki w tych peptydach nie zgadza się z ilością tego pierwiastka oznaczoną w owoalbuminie przez innych autorów. W oparciu o te wyniki Neuberger i Marshall (61) sformułowali hipotetyczny wzór fragmentu cząsteczki owoalbuminy, zawierający 12 grup -SH.

Liczni autorzy (1, 48, 77, 85) sądzą, że w owoalbuminie istnieje boczny łańcuch peptydowy, tworzący pętlę z łańcuchem głównym. Pętla ta składa się co najmniej z 7 reszt aminokwasowych o sekwencji podanej wzorem IV.



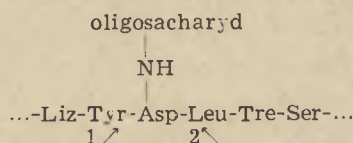
Ten heptapeptyd łączy się przez C-kończącą alaninę z ε-aminową grupą lizyny. Natomiast N-koniec tego peptydu jest prawdopodobnie związany z β- lub γ-karboksyłową grupą kwasu asparaginowego lub glutaminowego. Pod działaniem subtilopeptydazy A i enzymów o podobnej specyficzności wiązania w pętli heptapeptydowej ulegają rozerwaniu i powstają różne odmiany owoalbuminy. Krystalizują one w formie charakterystycznych blaszek i dlatego nazwano je plakalbuminami (48). Powstawanie plakalbumin jest poprzedzone przez stadium, w którym w cząsteczce owoalbuminy rozrywa się wiązanie „1” (wzór IV) (78). Tak zwana plakalbumina I powstaje przez enzymatyczne rozerwanie dodatkowo wiązania „3” — z równoczesnym odszczepieniem dwupeptydu Ala-Ala. Plakalbumina II powstaje dzięki rozerwaniu wiązań „3” i „7”, co prowadzi do utworzenia peptydów Ala-Ala i Ala-Gli-Wal-Asp, lub tylko wiązania „7”, czemu towarzyszy tworzenie heksapeptydu. Wreszcie plakalbumina C tworzy się wskutek odszczepienia tylko alaniny. Plakalbumina II ma nieco wyższy punkt izoelektryczny i odmienną ruchliwość elektroforetyczną (64, 65) od owoalbuminy rodzimej. Podczas sączenia na żelu (81) zachowuje się jednak identycznie jak owoalbumina i ma również niezmiennione własności antygenowe, mimo że struktura trzeciorzędowa jest nieco zaburzona. Smith (73) porównał zachowanie się owoalbuminy i plakalbuminy w elektroforesie na żelu poliakrylamidowym w 8M moczniku. Owoalbumina daje

pojedynczy prążek, natomiast w przypadku plakalbuminy występuje dodatkowa komponenta o większej ruchliwości. Komponenta ta jest peptydem zbudowanym z około 33 reszt aminokwasowych, związanym prawdopodobnie z resztą cząsteczki wiązaniem niekowalencyjnym.

III. Część cukrowa

W roku 1893 Pavy wykazał w hydrolizacie alkalicznym białka jaja kurzego duże ilości cukrów. Ich obecność potwierdził Eicholz w roku 1898 używając oczyszczonej albuminy; otrzymał on substancje redukujące odczynnik Fehlinga i dające osazony. Seemann wyodrębnił z hydrolizatu krystalicznej owoalbuminy glukozoaminę, a Jellinek i Fraenkel oraz Levene i Mori także mannozę. Autorzy ci sądzili, że obydwa monosacharydy pochodzą z owomukoidu obecnego w preparacie owoalbuminy. Dopiero w 1929 roku Rimmington (60) ostatecznie udowodnił obecność mannozy i glukozoaminy w owoalbuminie.

Mannozę i glukozoaminę w owoalbuminie oznaczano różnymi metodami — głównie kolorymetrycznie, przy czym niektórzy autorzy hydrolizowali całą cząsteczkę owoalbuminy, inni natomiast — wyodrębniony uprzednio fragment oligosacharydowy w połączeniu z kwasem asparaginowym, wiążącym go z częścią peptydową (6, 26, 33). Glikopeptydy otrzymywano z owoalbuminy różnymi metodami (26, 31, 36, 45, 60, 63). Wszystkie polegają na wstępnej degradacji białka przez trawienie go enzymami proteolitycznymi soku trzustkowego (31, 35), pepsyną (33), trypsyną i chymotrypsyną (21, 33, 36, 63), papainą (26, 45) i pronazą (7, 26). Glikopeptydy wyodrębniano głównie za pomocą chromatografii na różnych wymiennikach jonowych i sączenia molekularnego (7, 26, 36, 45). Otrzymane w ten sposób glikopeptydy oprócz kwasu asparaginowego, bezpośrednio związanego ze składnikiem cukrowym, zawierają jednak w znacznych ilościach inne aminokwasy, przede wszystkim leucynę, serynę i treoninę. Dużą trudność sprawiało otrzymanie fragmentu zbudowanego tylko z oligosacharydu i reszty kwasu asparaginowego (28, 32, 33). Można go otrzymać działając na wyodrębnione glikopeptydy karboksypeptydazą A lub powtórnie pronazą (36). Enzym ten, jeżeli działa na całą cząsteczkę owoalbuminy, rozszczepia ilościowo wiązanie Tyr-Asp, natomiast przy powtórnym działaniu — wiązanie Asp-Leu (strzałki 1 i 2 we wzorze V).



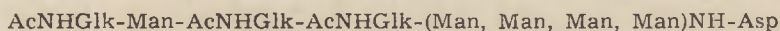
V

Przez działanie na białko papainą otrzymuje się mieszaninę glikopeptydów, w których wiązanie Tyr-Asp jest odporne na działanie pronazy (27, 45).

Większość autorów stwierdza we fragmencie oligosacharyd-kwas asparaginowy obecność 5 reszt mannozy i 3 glukozoaminy (6, 12, 26, 28, 33, 36, 40, 63). Inni natomiast podają odmienne wartości stosunku mannozy do glukozoaminy, a mianowicie 4:2 (31), 6:3 (45) i 6:4 (30). Również ciężar cząsteczkowy tego fragmentu oznaczany różnymi metodami odbiega od wartości teoretycznej, obliczonej z uwzględnieniem 5 reszt mannozy, 3 reszt glukozoaminy i 1 reszty kwasu asparaginowego (27, 33, 36, 46, 60). Za homogenicznością połączenia oligosacharyd-kwas asparaginowy przemawia jego zachowanie podczas elektroforezy na bibule oraz na kolumnach celulozowych (36), jak również uwalnianie dokładnie 1 mola N-acetyloglukoaminy z teoretycznie obliczonej gramocząsteczki tego związku (34). Jednakże badania innych autorów sugerują jego heterogeniczność uwarunkowaną różnicami w obrębie składnika cukrowego. Używając kolumn *Dowex 50×2 Cunnigham* i wsp. (16) otrzymali z preparatu owoalbuminy trawionej pepsyną cztery frakcje różniące się zawartością cukrów. Podobnie rozdzielały się glikopeptydy otrzymane po trawieniu owoalbuminy trypsyną, chymotrypsyną i karboksypeptydazą, przy czym wykluczono obecność jedno- i dwusacharydów. Fragmenty oligosacharyd-kwas asparaginowy z krystalicznej owoalbuminy trawionej pronazą ci sami autorzy (17) rozdzielili na pięć frakcji różniących się zawartością cukrów. *Lewry* i wsp. (47) otrzymali natomiast tylko dwie frakcje, w których stosunek mannozy do glukozoaminy wynosił 5:3 i 5:5. Prawdopodobnie dwie dodatkowe cząsteczki glukozoaminy znajdują się na końcu łańcucha polisacharydowego. Wskazuje na to odszczepianie za pomocą β -N-glukoaminidazy większej ilości glukozoaminy z frakcji „5:5” niż z frakcji „5:3”. Również *Bhoyroo* i *Marshall* (5) potwierdzili heterogeniczność składnika cukrowego. Rozdzielając na *Dowex 50×2* mieszaninę glikopeptydów, uzyskaną po jednorazowym trawieniu owoalbuminy pronazą, otrzymali siedem frakcji ze stosunkiem mannozy do glukoaminy: 2,05, 2,54, 1,43, 1,96, 2,64, 3,31 i 2,26. Równocześnie stwierdzili w tych samych warunkach homogeniczność fragmentu oligosacharyd-kwas asparaginowy otrzymanego metodą *Fletcher* i wsp. (27). Przyjmują równocześnie heterogeniczność składnika cukrowego owoalbuminy i sugerują, że jest ona uwarunkowana genetycznie. Należy jednak zwrócić uwagę, że w tych dwóch doświadczeniach autorzy stosowali różne metody otrzymywania glikopeptydów. Przyczyną wykrywania różnych ilości cukrów może być też występowanie w poszczególnych jajach kilku różniących się zawartością cukrów frakcji owoalbuminy w różnych stężeniach.

Sposób wzajemnego powiązania monosacharydów w składniku cukrowym badano stosując oczyszczony fragment oligosacharyd-kwas asparaginowy. *Fletcher* i wsp. (26) na podstawie wyników ilościowego

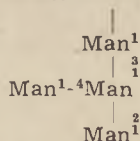
utleniania nadjodanem doszli do wniosku, że składnik cukrowy jest zbudowany liniowo albo ma najwyżej jeden punkt rozgałęzienia. *Clamp i Hough* (12) za pomocą N-acetylo- β -D-glukozaaminidazy zdołali odszczepić jeden mol N-acetyloglukozoaminy, co wskazuje, że na nieredukującym końcu składnika cukrowego znajduje się jedna reszta tego cukru. Po działaniu na fragment oligosacharyd-kwas asparaginowy emulsyną ze słodkich migdałów, rozdzieleniu hydrolizatu na węglu drzewnym i przeanalizowaniu uzyskanych składników, *Montgomery i wsp.* (46, 56) zaproponowali dla składnika cukrowego sekwencję monosacharydów (VI).



VI

Clamp i Hough (13) uważają, że owoalbumina zawiera pojedynczą grupę prostetyczną, przyłączoną końcem redukującym do części peptydowej. Ma ona strukturę rozgałęzionego łańcucha, którego końce stanowią: D-mannoza i N-acetyloglukozoamina. Końcowa D-mannoza połączona jest z pozostałą częścią oligosacharydu przez conajmniej jedną resztę mannozy.

Posługując się klasyczną techniką metylacji, utleniania nadjodanem i stosując trzy kolejne degradacje *Smitha*, *Montgomery i wsp.* (57) wykryli w części cukrowej trzy końce nieredukujące. Tworzą je: 1 reszta N-acetyloglukozoaminy i 2 reszty D-mannozy, przy czym te ostatnie wchodzi w skład tetramannozyłowej części składnika cukrowego. Według tych autorów, oligosacharyd ma strukturę łańcucha dwukrotnie rozgałęzionego (wzór VII).

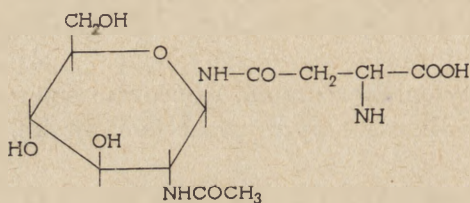


VII

W dalszym ciągu istnieją jednak rozbieżności co do ilości rozgałęzień oligosacharydu oraz jakości cukrów stanowiących końce nieredukujące. *Clamp i Hough* (13) oraz *Fletcher i wsp.* (26) przyjmują obecność tylko jednego rozgałęzienia. *Lewry i wsp.* (47) zakładają terminalne położenie przynajmniej jednej z dwóch dodatkowych reszt N-acetyloglukozoaminy.

Hydrolizat fragmentu oligosacharyd-kwas asparaginowy rozdziela się podczas elektroforezy na kolumnie celulozowej na pięć frakcji, z których jedna zawiera połączenie glukozoamina-kwas asparaginowy (7). Po uzyskaniu tego związku w formie krystalicznej, nie stwierdzono w nim

obecności mannozy, a za pomocą hydrolizy i chromatografii wykazano, że jest zbudowany z jednego mola kwasu asparaginowego, jednego mola glukozoaminy i jednego mola amoniaku. Połączenie glukozoamina-kwas asparaginowy nie daje reakcji charakterystycznych dla wolnych grup aldehydowych, co wskazuje na zablokowanie hydroksylu glikozydowego. Ruchliwość elektroforetyczna, bardzo podobna do ruchliwości aminokwasów obojętnych, jest uwarunkowana prawdopodobnie zablokowaniem grupy aminowej glukozoaminy, która jest zacetylowana, jak w białku rodzimym. Poza tym Fletcher i wsp. (52) stwierdzili, że w wiązaniu bierze udział β -karboksylowa grupa kwasu asparaginowego. Szereg danych wskazuje więc, że połączenie kwasu asparaginowego i N-acetyloglukozoaminy ma postać 2-acetamido-(1-L- β -aspartamido)-1,2-dwudoksy- β -D-glukozy (wzór VIII):



VIII

Porównanie właściwości wyodrębnionego z owoalbuminy połączenia glukozoamina-kwas asparaginowy z właściwościami jednego z syntetycznych związków (52) potwierdziło tę budowę. Oba związki zachowały się identycznie w czasie elektroforezy i chromatografii oraz wykazały podobną stabilność w środowisku kwaśnym i zasadowym.

IV. Wiązania dwusiarczkowe i grupy tiolowe

Owoalbumina jest nietrwała w temperaturze pokojowej, ale można tworzyć bardziej trwałe pochodne przez modyfikowanie grup -SH w resztach cysteiny. W owoalbuminie grupy -SH reagują z jodem i niektórymi innymi substancjami rozpuszczalnymi w niepolarnych rozpuszczalnikach, ale nie mogą być utleniane żelazicyjankiem i tlenem cząsteczkowym. Po denaturacji grupy te stają się bardzo aktywne (43, 86). Przypuszczalnie w rodzimej owoalbuminie grupy -SH są osłonięte przez różne, częściowo niepolarne fragmenty łańcucha, co nie wyklucza reakcji z odczynnikami na grupy -SH, ale je w różnym stopniu utrudnia (41).

Do badań ilości i roli grup -SH oraz wiązań -S-S- w owoalbuminie stosowano jej pochodne powstające przez utlenianie jodem. W toku tej reakcji, której końcowy punkt wykazywano potencjometrycznie (87) lub

spektrofotometrycznie (18), do cząsteczki białka przyłącza się 5—7 atomów jodu. Metodą amperometryczną jedni autorzy wykazali obecność 4 wolnych grup -SH (22), inni — 5 (4). Przypuszcza się, że różnice są spowodowane bardzo słabą aktywnością jednej z grup -SH, co daje błędy przy miareczkowaniu (2). Trzy grupy -SH reagują z jodem szybko, pozostałe nie są aktywne. Możliwe jest również tworzenie wiązań -S-S- po utlenieniu jodem. Stwierdzono, że wiązania te tworzą się tylko w obrębie cząsteczek, ponieważ nie zmienia się ciężar cząsteczkowy, co wykazano przez ultrawirowanie (18) i osmometrycznie (2). Także zwiększoną wrażliwość owoalbuminy na denaturację (termiczną lub mocznikiem), występującą po utlenieniu jodem, można tłumaczyć tworzeniem wewnątrzcząsteczkowych wiązań -S-S-, powstających z równoczesnym rozerwaniem niektórych wiązań wodorowych i hydrofobowych. Nowe wiązania nie zastępują rozerwanych i w cząsteczce powstają naprężenia ułatwiające denaturację (3).

Według Winzora i Creetha (87) w rodzimej owoalbuminie występują dwa wiązania -S-S-, natomiast Belicer i Łobaczewska (3) przyjmują średnio 1,5 wiązania na 1 cząsteczkę. Ta ostatnia wartość sugeruje heterogenność owoalbuminy uwarunkowaną ilością mostków -S-S-. Ponieważ trzy reagujące z jodem grupy -SH po utlenieniu tworzą ilościowo wiązania -S-S-, można wnioskować, że 50% cząsteczek owoalbuminy zawiera dwie tego typu grupy -SH, a 50% — cztery. Czwarta grupa -SH, powoli reagująca z jodem stanowi 0,5 mola -S-S-; prawdopodobnie połowa wszystkich cząsteczek zawiera po dwie takie grupy -SH. Piąta grupa -SH występuje w cząsteczce pojedynczo i nie tworzy wiązań -S-S-. Ilość 1,5 mola -S-S- na 1 mol białka oznaczałaby zatem, że połowa cząsteczek owoalbuminy zawiera jedno wiązanie -S-S-, a połowa — dwa. Istnienie dwóch frakcji owoalbuminy różniących się szybkością denaturacji (72, 74, 75) może także sugerować heterogenność związaną z ilością wiązań -S-S- stabilizujących cząsteczkę białka. Ponieważ kolejność aminokwasów jest przypuszczalnie identyczna we wszystkich cząsteczkach owoalbuminy i każda zawiera 8 reszt półcystyny i cysteiny, więc w połowie cząsteczek występowałaby jedna reszta cystyny i sześć cysteiny, a w połowie — dwie reszty cystyny i cztery cysteiny. W tym drugim przypadku przekształcenie dwóch reszt cysteiny w jedną resztę cystyny powodowałoby niewielką modyfikację łańcucha polipeptydowego. Zarówno Winzor i Creeth (87) jak i Belicer i Łobaczewska (3) uważają, że w cząsteczce owoalbuminy występuje 8 atomów siarki; inni autorzy wykazali tylko 7 atomów.

Zmodyfikowana przez utlenienie jodem owoalbumina jest bezbarwna lub żółtawa, krystalizuje jak rodzime białko, jest podobnie rozkładana przez trypsynę, jest stabilna w temperaturze pokojowej i zawiera do-

datkową grupę zjonizowaną o pK około 6. Choć kąt skręcenia płaszczyzny polaryzacji jest prawie niezmieniony, rozpuszczalność białka jest mniejsza, a zatem zmiany jego trzeciorzędowej struktury mogą być spowodowane ujawnieniem początkowo zamaskowanych reszt niepolarnych. Struktura drugorzędowa natomiast pozostaje niezmieniona (14, 19, 20, 87). Z produktu, powstającego przy utlenianiu owoalbuminy jodem, można odtworzyć rodzime białko działając merkaptanem o niskim ciężarze cząsteczkowym, na przykład 2-merkaptoetyloaminą (19).

V. Reszty kwasu fosforowego

Longsworth i wsp. (49) rozdzielili owoalbuminę za pomocą wolnej elektroforezy na dwie frakcje. Frakcję bardziej ruchliwą, stanowiącą około 70% białka określili jako A_1 , pozostałą jako A_2 . Linderstrøm-Lang i Ottesen (48) przypuszczali, że przyczyną tego rozdziału albuminy jest obecność dwóch reszt kwasu fosforowego w cząsteczkach białka we frakcji A_1 , oraz jednej reszty we frakcji A_2 . Perlmann (66, 67) potwierdziła te wyniki wykazując równocześnie obecność jeszcze jednej frakcji, A_3 , nie zawierającej fosforu. Aby sprawdzić, czy ruchliwość frakcji jest uzależniona od zawartości reszt kwasu fosforowego i ustalić typ ich wiązania, Perlmann działała na frakcję A_1 fosfomonoesterazą z prostaty, rozszczepiającą wiązania estrowe kwasu fosforowego. Enzym ten usuwa jedną resztę fosforanową z cząsteczek owoalbuminy frakcji A_1 , przy czym powstające białko jest identyczne z białkiem frakcji A_2 . Fosfataza z ziemniaków lub z jelit powodują natomiast kompletną defosforylację z utworzeniem substancji odpowiadającej własnościami elektroforetycznymi frakcji A_3 .

Perlmann wykazała, że jedna reszta kwasu fosforowego jest przyłączana wiązaniem O-P, co następnie potwierdził Flavin (23, 24) wyodrębniając fosfoserynę z częściowego hydrolizatu owoalbuminy. Natura drugiego wiązania nie jest znana. Flavin przypuszcza, że druga reszta fosforanowa jest również przyłączona do seryny, lecz odmienna sekwencja aminokwasów wokół tej reszty stwarza inne warunki działania dla fosfomonoesterazy. Perlmann (67) natomiast sugeruje możliwość występowania wiązania N-P z grupą guanidynową argininy lub ϵ -aminową lizyny. Możliwość występowania dwuestru w owoalbuminie wykluczono, obserwując jej zachowanie wobec kolejnego działania dwuesterazy jadu węża i fosfatazy prostaty.

Trzy frakcje owoalbuminy różniące się zawartością reszt kwasu fosforowego uzyskali także Rhodes i wsp. (68) przeprowadzając bezpośrednio rozdział białka jaja kurzego za pomocą chromatografii jonowy-

miennej na kolumnie z *CM*-celulozy. *Bukowska* (8) stwierdziła, że metodą tą można otrzymać nawet pięć frakcji, nie rozstrzygnęła jednak w czym tkwi przyczyna dodatkowej heterogenności. *Steven i Tristram* (79) stosując elektroforezę na żelu skrobiowym otrzymali trzy frakcje owoalbuminy, a *Lush* (50), w identycznych warunkach, sześć frakcji. Być może dodatkowe rozdziały frakcji różniących się zawartością fosforu następują z powodu różnic części węglowodanowej lub peptydowej. Przypuszcza się, że różna liczba frakcji owoalbuminy może być warunkowana genetycznie (50, 80) a także hormonalnie, gdyż stwierdzono różnice w owoalbuminie pochodzącej z jaj tej samej kury (8, 80).

VI. Uwagi końcowe

Strukturę pierwszorzędową części peptydowej owoalbuminy pozna no zaledwie w paru kilkuaminokwasowych fragmentach; dyskusyjna jest zawartość, sposób związania i rola grup tiolowych i reszt fosforowych. Struktura składnika cukrowego przedstawia w dalszym ciągu szereg wątpliwości. Wydaje się, że głównym powodem tych rozbieżności jest heterogenność owoalbuminy, nie uwzględniana w badaniach strukturalnych.

Owoalbuminie przypisuje się różne funkcje biologiczne. Najprawdopodobniej stanowi ona główny materiał energetyczny i budulcowy dla rozwijającego się zarodka (9, 10, 11, 29, 70). Niektórzy autorzy nie potwierdzają jednak dominującej roli owoalbuminy, lecz wykazują proporcjonalne zużywanie wszystkich białek zawartych w białku jaja (54). Wiadomo, że owoalbumina jest inhibitorem lizozymu (15) oraz przypuszcza się, że odgrywa ona rolę w wiązaniu wapnia. Ta ostatnia funkcja kojarzy się z wykryciem przez niektórych autorów (69) w cząsteczce owoalbuminy podjednostek, występujących w równowadze z dimerem. Przesuwanie równowagi układu dimer-monomer mogłoby mieć rzeczywiście znaczenie w regulowaniu poziomu wapnia. Rola składnika cukrowego jest zupełnie nieznana, wykazano tylko, że nie warunkuje on wraz z bezpośrednio związaną z nim częścią łańcucha peptydowego własności antygenowych (82).

Biosynteza owoalbuminy nie jest całkowicie wyjaśniona. Wiadomo, że białko to jest syntetyzowane w jajowodzie (51), że proces ten rozpoczyna się od zacetylowanego N-końca (59) i pozostaje pod kontrolą estrogenów, progesteronu i hormonów przysadkowych (51). Grupy fosforanowe są prawdopodobnie włączane po całkowitym zakończeniu syntezy łańcucha polipeptydowego, wykazano bowiem (71), że białko frakcji nie zawierającej fosforanu jest produktem przejściowym w syntezie białek pozostałych frakcji.

LITERATURA

1. Anfinsen C. B., Redfield R. R., *Advan. Protein Chem.* **11**, 1 (1956).
2. Belicer W. A., Łobaczewska O. W., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **131**, 199 (1960).
3. Belicer W. A., Łobaczewska O. W., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **137**, 1226 (1961).
4. Benesch R. E., Jardy A., Benesch R., *J. Biol. Chem.* **216**, 663 (1955).
5. Bhoyroo V. D., Marshall R. D., *Biochem. J.* **97**, 18P (1965).
6. Bogdanov V., Kaverzneva E., Andreyeva A., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 168 (1962).
7. Bogdanov V., Kaverzneva E., Andreyeva A., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 69 (1964).
8. Bukowska M. I., Materiały Zjazdowe VII-go Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław 1969.
9. Carinci P., Manzoli-Guidotti L., *J. Embryol. Exptl. Morphol.* **19**, 95 (1968).
10. Carinci P., Manzoli-Guidotti L., *J. Embryol. Exptl. Morphol.* **20**, 107 (1968).
11. Carinci P., Wegelin I., Manzoli-Guidotti L., *Sperimentale* **116**, 191 (1966).
12. Clamp J. R., Hough L., *Chem. Ind. (London)* str. 82 (1963).
13. Clamp J. R., Hough L., *Biochem. J.* **94**, 502 (1965).
14. Creeth J. M., Winzor D. J., *Biochem. J.* **83**, 566 (1962).
15. Cunningham F. E., Lineneaver H., *Poultry Sci.* **46**, 1471 (1967).
16. Cunningham L. W., Clouse R. W., Ford J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 379 (1963).
17. Cunningham L. W., Ford J. D., Rainey J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 233 (1965).
18. Cunningham L. W., Nuenke B. J., *J. Biol. Chem.* **234**, 1447 (1959).
19. Cunningham L. W., Nuenke B. J., *J. Biol. Chem.* **235**, 1711 (1960).
20. Cunningham L. W., Nuenke B. J., *J. Biol. Chem.* **236**, 1716 (1961).
21. Cunningham L. W., Nuenke B. J., Nuenke R. H., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 660 (1957).
22. Cunningham L. W., Nuenke B. J., Strayhorn W. D., *J. Biol. Chem.* **228**, 835 (1957).
23. Flavin M., *J. Biol. Chem.* **210**, 771 (1954).
24. Flavin M., *Nature* **173**, 214 (1954).
25. Flavin M., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* **211**, 375 (1954).
26. Fletcher A. P., Marks G. S., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **87**, 265 (1963).
27. Fletcher A. P., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochim Biophys. Acta* **71**, 505 (1963).
28. François C., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **83**, 335 (1962).
29. Hasegawa S., Taguchi I., Hasegawa H. T., (1956) cytowani w Carinci P., Manzoli-Guidotti L., *J. Embryol. Exptl. Morphol.* **20**, 107 (1968).
30. Hörmann H., Gollwitzer R., *Ann. Chem.* **655**, 178 (1962).
31. Jevons F. R., *Nature* **181**, 1346 (1958).
32. Johansen P. G., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **77**, 239 (1960).

33. Johansen P. G., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **78**, 518 (1961).
34. Kaufman H. H., Marshall R. D., Abstr. 6-th Intern. Congress of Biochemistry — New York 1964, Pergamon Press Oxford, tom II, str. 159.
35. Kawierzniowa E. D., Bogdanow W. P., *Biochimija* **26**, 105 (1961).
36. Kawierzniowa E. D., Bogdanow W. P., *Biochimija* **27**, 273 (1962).
37. Kawierzniowa E. D., Szmakowa F. W., *Biochimija* **31**, 380 (1966).
38. Kawierzniowa E. D., Szmakowa F. W., Andriejewa A. P., *Biochimija* **31**, 993 (1966).
39. Kawierzniowa E. D., Szmakowa F. W., Andriejewa A. P., *Biochimija* **32**, 964 (1967).
40. Kawierzniowa E. D., Tsi D F., *Biochimija* **26**, 420 (1961).
41. Kay C. M., March M. M., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 262 (1959).
42. Kekwick R. A., Cannan R. K., *Biochem. J.* **30**, 227 (1936).
43. Kolthoff J. M., Anastasi A., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4248 (1958).
44. Lee Y. C., Montgomery R., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 265 (1961).
45. Lee Y. C., Montgomery R., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 9 (1962).
46. Lee Y. C., Wu Y.-C., Montgomery R., *Biochem. J.* **91**, 9c (1962).
47. Lewry G. A., Conche J. Hay A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 150 (1966).
48. Linderstrøm-Lang K., Ottesen M., *Nature* **159**, 807 (1947).
49. Longsworth L. G., Cannan R. K., McInnes D. A., *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 2580 (1940).
50. Lush I. E., *Genet. Res. Camb.* **5**, 257 (1964).
51. Mandeles S., Ducay E. D., *J. Biol. Chem.* **237**, 3196 (1962).
52. Marks G. S., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **87**, 274 (1963).
53. Marks G. S., Marshall R. D., Neuberger A., Papkoff H., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 340 (1962).
54. Marshall M. E., Deutsch H. F., *J. Biol. Chem.* **185**, 156 (1950).
55. Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **78**, 31P (1961).
56. Montgomery R., Lee Y. C., Wu Y.-C., *Biochemistry* **4**, 566 (1965).
57. Montgomery R., Wu Y.-C., Lee Y. C., *Biochemistry* **4**, 578 (1965).
58. Narita K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 160 (1961).
59. Narita K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 430 (1968).
60. Neuberger A., *Biochem. J.* **32**, 1435 (1938).
61. Neuberger A., Marshall R. D., w Glycoproteins, red. A. Gottschalk, Elsevier Publishing Co., Amsterdam 1966, BBA Library, tom V, str. 299.
62. Niu C.-I., Fraenkel-Conrat H., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5832 (1955).
63. Nuenke R. H., Cunningham L. W., *J. Biol. Chem.* **236**, 2452 (1961).
64. Ottesen M., Wollenberger A., *Nature* **170**, 801 (1952).
65. Perlmann G. E., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 1146 (1949).
66. Perlmann G. E., w Phosphorus Metabolism, red. W. D. McElroy i B. Glass, John Hopkins, Press, Baltimore 1952, tom II, str. 167.
67. Perlmann G. E., *Advan. Protein Chem.* **10**, 1 (1955).
68. Rhodes M. B., Azari P. R., Feeney R. E., *J. Biol. Chem.* **230**, 399 (1958).
69. Riley D. P., Herbert D., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 374 (1950).
70. Rupe C. O., Farmer C. J., *J. Biol. Chem.* **219**, 899 (1955).
71. Sanger F., Hocquard E., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 606 (1962).
72. Smith M. B., *Australian J. Biol. Sci.* **17**, 261 (1964).
73. Smith M. B., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 263 (1968).
74. Smith M. B., Bach J. F., *Nature* **193**, 878 (1962).
75. Smith M. B., Bach J. F., *Australian J. Biol. Sci.* **18**, 365 (1965).

76. Spiro M. J., Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 1507 (1962).
77. Steinberg D., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 4217 (1952).
78. Steinberg D., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4875 (1953).
79. Steven F. S., Tristram G. R., *Biochem. J.* **70**, 179 (1958).
80. Stratil A., *Folia Biol. (Praha)* **13**, 476 (1967).
81. Szmakowa F. W., Kawierzniowa E. D., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **182**, 217 (1968).
82. Szmakowa F. W., Kawierzniowa E. D., *Biochimija* **34**, 556 (1969).
83. Tristram G. R., w *The Proteins*, red. H. Neurath i K. Bailey, Academic Press, New York 1954, tom I, str. 181.
84. Tristram G. R., Smith R. H., *Advan. Protein Chem.* **18**, 227 (1963).
85. Warner R. C., w *The Proteins*, red. H. Neurath i K. Bailey, Academic Press, New York 1954, tom II, str. 443.
86. Warner R. C., Levy M., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5735 (1958).
87. Winzor D. J., Creeth J. M., *Biochem. J.* **83**, 559 (1962).

JACEK BARTKOWIAK*, LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ**

Niejednorodność histonów

Heterogeneity of histones

The isolation, fractionation, chemical composition and specificity of histones are presented according to recent data.

I. Występowanie histonów

Histony stanowią składnik białkowy dezoksyrybonukleoproteidów (DNP) komórek somatycznych zwierząt i wyższych roślin. Ich odkrycie i nazwa wiążą się z pracownią Hoppe-Seylera w Tybindze oraz z nazwiskiem Alberta Kossela z Rostocku, który w 1884 roku wyizolował białko zasadowe z jąder komórkowych erytrocytów ptasich. W następnych dziesięcioleciach metodami preparatywnymi lub cytochemicznymi stwierdzono obecność histonów w bardzo wielu tkankach roślinnych, zwierzęcych i ludzkich, zarówno patologicznych jak i prawidłowych. Tablica 1 podaje zestawienie tkanek i gatunków, w których po raz pierwszy zbadaano histony w ostatnich 3 latach. Jest ona uzupełnieniem wykazów opracowanych przez Phillipsa (86) i Kłyszewko (60).

Od wielu lat trwają spory na temat występowania histonów w komórkach bakteryjnych. U nielicznych tylko gatunków bakterii udało się je wykryć i scharakteryzować (por. poz. 60). Pewny zdawałoby się fakt występowania nukleohistonu u *Escherichia coli* opisany przez Palmade'a i innych w 1961 roku (por. poz. 60) poddali ostatnio w wątpliwość R a a f i B o n n e r (92). Wyizolowali oni wprawdzie wysokocząsteczkowy DNP (85S) z lizatów komórek *E. coli*, jednak składnik białkowy tego kompleksu (związany elektrostatycznie z DNA) zawierał na 100 moli wszystkich reszt aminokwasowych zaledwie 15 moli aminokwasów zasadowych i ponad 20 moli aminokwasów dwukarboksylowych. Nie posiadał on także zdolności stabilizowania DNA wobec termicznej denaturacji. Z podo-

* Mgr, Zakład Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

** Doc. dr, Zakład Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wykaz stosowanych skrótów: DNP — dezoksyrybonukleoproteid, NH — nukleohiston, DNH — dezoksyrybonukleohiston, GAR — histon glicyno-argininowy, AL — histon argininowo-lizynowy, TCA — kwas trójchlorooctowy.

Tablica 1

Występowanie histonów (dane z lat 1967—1969)

Tkanka	Gatunek	Literatura
Rośliny:		109
gametofit i sporofit	<i>Allomyces arbuscula</i>	
liście	<i>Nicotiana tabacum</i>	118
kiełki	<i>Phaseolus vulgaris</i>	103
Jaja	<i>Arabacia punctulata</i>	80
	<i>Paracentrotus lividus</i>	
	<i>Echinus esculentus</i>	
Erythrocyty	gołąb, gęś, indyk, mewa	77
Śledziona		
Szpik		
Skóra	kurzy embrion	59
Sperma	<i>Emerita analoga</i>	113
Wątrobo-trzustka	<i>Mytilus edulis</i>	14
Yoshida ascites hepa- toma	szczur	99
Chromosomy komó- rek ślinianki	<i>Drosophila virillis</i>	37
Mikro- i makrojądra komórkowe	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	38
Erythrocyty	<i>Caranax hippos</i>	24
Fibroblasty	kura	6
Hodowla tkankowa		
komórek jajnikowych	chomik	39
Gruczoły mleczne	szczur, królik	107
Przedni i tylny gru- czoł przedny	<i>Bombyx mori</i> L. (larwa)	29
Komórki tuczne	mysz	41

bieństwa składu aminokwasowego tego białka i białka całkowitego bakterii można przypuszczać, że otrzymywany z *E. coli* kompleks DNA-białko jest artefaktem bądź też spełnia zupełnie inną rolę biologiczną niż DNP wyższych organizmów.

Nie został też jeszcze rozwiązany problem pozachromosomowego występowania histonów. Białka zasadowe rybosomów cytoplazmatycznych, mimo iż zbliżone wieloma własnościami do histonów, stanowią jednak zwłaszcza pod względem metabolicznym odrębną klasę białek. Bezsporny jest natomiast fakt „wędrówki” histonów z jądra do cytoplazmy i odwrotnie podczas przemian rozwojowych pewnych komórek. Np. ostatnie prace Vaughna i wsp. (113, 114) zawierają dane o zmianach typu, zawartości i lokalizacji białek histonowych w spermatozoidach kraba *Emerita analoga*. Doskonalenie metod wyodrębniania histonów przyniesie zapewne wyjaśnienie wielu wątpliwości.

II. Izolowanie histonów

Dotychczas nie udało się otrzymać histonu w jednorodnej postaci ani w stanie krystalicznym. Wszystkie niemal metody wyodrębniania są zbyt drastyczne i pociągają za sobą większą lub mniejszą hydrolizę lub denaturację tego białka.

Metody wyodrębniania histonów całkowitych można ująć w 2 grupy: a) ekstrakcję soli histonów (z DNP, jąder komórkowych lub tkanki) rozcieńczonymi roztworami mocnych kwasów oraz b) dysocjację nukleohistonu roztworami soli obojętnych o dużej sile jonowej i wyodrębnianie poszczególnych składników wyjściowego kompleksu.

Przy izolowaniu i charakterystyce histonów ważne są cztery momenty: a) podatność na degradację enzymatyczną, b) łatwość asocjowania z innymi białkami jądrowymi i cytoplazmatycznymi, c) tendencja do agregacji białek histonowych przy pH wyższych od 4,5, d) specyficzne własności różnych materiałów biologicznych, utrudniające porównywanie wyników analiz preparatów histonowych.

Zmniejszenie enzymatycznej degradacji histonów nadal zajmuje wiele uwagi licznych badaczy. Publikowane obecnie prace rozszerzają znane już w zasadzie zabiegi, hamujące aktywność proteaz. Furlan i Jericijo (30) badając preparaty DNP z grasicy cielęcej stwierdzili, że istnieją 2 typy proteaz rozbijających histony: enzym działający w pH 7,8 zlokalizowany wyłącznie w jądrze i proteaza o optymalnym pH 4,4 pochodząca zapewne z zanieczyszczeń preparatów jądrowych przez całe komórki. Proteaza o optymalnym pH 7,8 hydrolizuje wszystkie 3 główne frakcje histonowe ale najbardziej podatny jest histon lizynowy. Aktywność jej można całkowicie zahamować ogrzewając DNP przez 20 min. w 85° . Okazało się też, że na szybkość hydrolizy histonów wpływają wartość pH i siła jonowa środowiska, przy czym maksymalna szybkość trawienia zbiega się z najmniejszą rozpuszczalnością DNP.

Ci sami autorzy (31) donieśli następnie, że naturalnym składnikiem chromatyny grasicy cielęcej jest obojętna proteaza o ciężarze cząsteczkowym około 24 000. Enzym ten wytrąca się z roztworu chromatyny w 1M NaCl po obniżeniu siły jonowej i przy zachowaniu neutralnego pH . Udało się także przy niskich wartościach pH wyekstrahować tę proteazę z nukleohistonu (NH). Siła powiązania jej z DNA jest słabsza niż siły łączące histony z DNA.

Dounce i Ickowicz (23) potwierdzili poprzednie przypuszczenia, że przed izolowaniem histonów z jąder komórkowych należy usuwać frakcję globulinową i to najlepiej stosując 0,8% NaCl o pH niższym niż 5,6. Z tak przygotowanego materiału uzyskuje się znacznie więcej białka histonowego i resztkowego niż przy stosowaniu 0,9% NaCl i pH 7,0 (optymalna aktywność katepsyn). Stellwagen i wsp. (108) wykazali, że podczas preparowania jąder komórkowych czy DNP może dochodzić do

daleko posuniętych zmian w histonach. Jednogodzinna inkubacja jąder komórkowych czy DNP w obojętnym pH, w obecności 5mM MgCl₂ w 37° powodowała pojawianie się dodatkowych frakcji przy rozdziale histonu F1 na CM-celulozie oraz elektroforezie w żelu poliakrylamidowym. Frakcje te były najprawdopodobniej produktami proteolitycznego rozpadu rodzimego histonu. Autorzy ci podkreślają konieczność ostrożnego podchodzenia do zagadnienia niejednorodności białek histonowych.

Pan y i m i wsp. (83) twierdzą, że najlepszym sposobem zapobiegania proteolizie histonów podczas preparatyki jest dodawanie dwuizopropylodifluorofosforanu (DFP) lub Na₂S. Harbers i Spaar (42) stwierdzili, że obecność alkoholu oktylowego zmniejsza wrażliwość nukleohistonu na denaturację termiczną.

Wyodrębnianie histonów z jąder komórkowych pozwala wprawdzie uzyskać bardziej czyste preparaty niż z całej tkanki jednak podczas izolowania jąder zachodzą znaczne straty materiału i pojawiają się dodatkowe możliwości degradacji enzymatycznej. W związku z tym najczęściej izoluje się histony bezpośrednio z tkanek, a z jąder komórkowych wówczas, gdy badana tkanka jest uboga w materiał jądrowy. Uzyskanie w odpowiedniej ilości jąder wolnych od zanieczyszczeń cytoplazmatycznych jest trudne. Stellwagen i Cole (106) badali białko histonowe z jąder komórkowych gruczołów mlecznych szczura i królika i stwierdzili, że mimo oczyszczania frakcji jądrowej przez wirowanie gradientowe w sacharozie lub traktowania jej 0,5% Tritonem X-100 histon argininy eluowany z kolumny Amberlite IRC-50 ciągle wykazywał wyraźną domieszkę białka niehistonowego. Są oni zdania, że jedynie stopniowe traktowanie jąder komórkowych roztworami kwasów o coraz niższych wartościach pH (patrz Murray (71)) zapobiega zanieczyszczeniom niehistonowym. Skuteczne jest też według nich przemywanie surowego preparatu DNP organicznymi rozpuszczalnikami (50% etanol, 70% etanol, aceton i eter).

Dializa DNP w 1M NaCl wobec 6 objętości H₂O (116) pozwala uzyskać zrekonstruowany nukleohiston, podczas gdy białko kwaśne pozostaje w roztworze; histon ekstrahowany z takiego NH jest dużo czystszy.

Ostatnio zajęto się też wpływem mechanicznej obróbki jąder komórkowych czy nukleohistonu na stan frakcji histonowych. Neelin (77) badając erythrocyty ptasie wykazał, że sposób izolowania jąder (różny skład roztworów podstawowych sacharozoy) i lizy tych organelli (zamrażanie i odmrażanie, stosowanie saponiny czy lizolecytyny) nie wpływa na obrazy elektroforetyczne histonów.

III. Frakcjonowanie histonów

Obecnie stosowane metody frakcjonowania histonów można ująć w trzy podstawowe klasy: 1) selektywna ekstrakcja, 2) selektywne strą-

canie oraz 3) chromatografia jonowymienna i filtracyjna, przy czym w praktyce prawie z reguły łączy się różne procedury w jeden system. Przyjęto podział histonów na 4 zasadnicze typy: histon silnie lizynowy (F1) o stosunku Liz/Arg > 4 , histony umiarkowanie lizynowe (F2a i F2b), dla których stosunek Liz/Arg = 1—4 oraz histon argininowy posiadający stosunek Liz/Arg < 1 .

1. Selektywna ekstrakcja

Metody określane mianem frakcjonowanej, selektywnej ekstrakcji opierają się na różnej sile wiązania poszczególnych komponent histonowych z DNA, co pozwala selektywnie odrywać z DNP różne frakcje histonowe przez stosowanie roztworów o coraz wyższej sile jonowej. Od dawna (por. poz. 60) znana była podatność histonu silnie lizynowego na działanie różnych czynników (np. 0,6M NaCl), powodujących dysocjację DNP.

Ostatnio Georgiev i wsp. (32) wykazali, że DNP izolowany za pomocą 0,6M NaCl z komórek raka Ehrlicha i grasicy cielęcej jest stabilny w szerokim zakresie stężeń NaCl a jego składnik białkowy nie zawiera frakcji lizynowej. W obrazie z mikroskopu elektronowego widać pojedyncze łańcuchy o średnicy 30—40 Å odpowiadające najprawdopodobniej pojedynczym cząsteczkom DNP. Natomiast przy ekstrakcji DNP roztworami o niskich siłach jonowych otrzymuje się preparaty dające w mikroskopie elektronowym obraz włókien o średnicy 100 Å. Zgodnie z badaniami Littau'a i wsp. (por. poz. 60) wydaje się, że właśnie histon lizynowy ma swój udział w zmienności rodzimego DNP w różnych warunkach i odgrywa decydującą rolę w utrzymaniu jego nadcząsteczkowej struktury.

Faulhaber i Bernardi (28) rozdzielając preparaty DNP na kolumnach z hydroksyapatytu stwierdzili, że przy stężeniu buforu fosforanowego 0,07—0,1M wymywał się składnik białkowy, pochodzący z dysocjacji DNP, a w zakresie stężeń 0,2—0,3M — właściwy dezoksyrybonukleoproteid. Ilość wymywanego białka a także jego molowy stosunek Liz/Arg zależały od stężenia KCl w buforze (tabl. 2).

Tablica 2

Stosunek Liz/Arg w białku usuwanym z DNP przy różnych stężeniach KCl podczas rozdzielania na hydroksyapatycie (28)

	DNP niezdisocjowany	Stężenie KCl			
		0,75M	1,0M	2,0M	3,0M
$\frac{\text{Liz}}{\text{Arg}}$	1,4	4,0	3,4	1,5	1,0

Dane te potwierdzają, że histon lizynowy usuwany jest z DNP najłatwiej.

Fambrough i Bonner (25) zaobserwowali, że podczas dializy wodnego roztworu nukleohistonu z kiejków grochu wobec roztworu NaCl w zakresie stężeń poniżej 0,3M dysocjacja w ogóle nie zachodzi, przy stężeniu 0,5—0,6M NaCl odłącza się histon silnie lizynowy a pozostałe frakcje oddysocjują w zakresie stężeń 0,5—1,5M NaCl. Otrzymane w ten sposób różne typy histonów wykazywały duże zanieczyszczenia krzyżowe.

Oddysocjowanie frakcji histonowych z DNP okazało się procesem odwracalnym a zrekonstruowany dezoksyrybonukleoproteid ma wiele cech analogicznych do rodzimego DNP (85). Rekonstrukcję DNP można osiągnąć przez dializę składników nukleohistonu, rozpuszczonych w wodzie, wobec roztworów NaCl o stężeniu poniżej 3,5M w ciągu 17 godz. przy 2°.

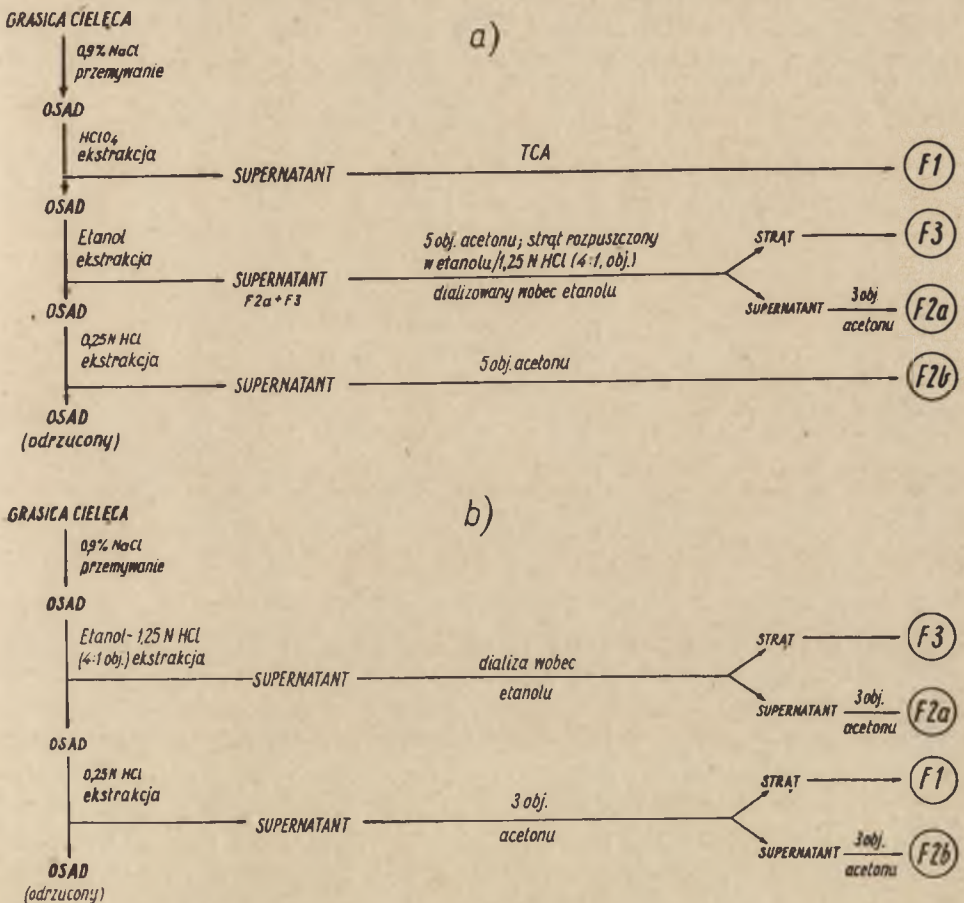
Ciekawe są badania Martinova i Spitkovsky'ego (66, 67) nad dysocjacją pod wpływem promieni X nukleohistonu grasicy cielejcej. Okazało się, że najłatwiej oddysocjowywała frakcja silnie lizynowa F1, najtrudniej zaś frakcja argininowa F3. Fakt, że frakcja F3 zawierająca siarkę, a więc potencjalne źródło pierwotnych wolnych rodników, jest mniej wrażliwa sugeruje, że jest osłonięta przez frakcję lizynową rozciągającą się na powierzchni superspirali nukleo-histonu grasicy.

Przytoczone powyżej dane uzasadniają słuszność poszukiwań specyficznych metod izolowania różnych frakcji histonowych na skalę preparatywną, wykorzystujących różny stopień związania oraz różną ich lokalizację w DNP.

Metody selektywnej ekstrakcji są szczególnie wygodne, gdyż już we wstępnej fazie można uzyskać duże ilości częściowo rozfrakcjonowanych histonów. Na szczególną uwagę zasługują dwa warianty (schemat 1a i b) powszechnie obecnie stosowanej metody Johnsa (50) z 1964 roku.

W roku 1967 Johns (53) opublikował nową metodę selektywnej ekstrakcji frakcji F2a z DNP grasicy cielejcej przy pH 7,0. Obojętny odczyn środowiska jest tu bardzo istotny, zapobiega bowiem destrukcji kompleksu DNP pozbawionego frakcji F2a, co umożliwia dalsze jego wykorzystanie np. jako matrycy dla syntezy RNA i określenie, jak usunięcie frakcji F2a wpływa na aktywność tej syntezy. W omawianej metodzie z jąder komórkowych wolnych od RNP i odwodnionych ekstrahuje się selektywnie frakcję F2a mieszaniną etanol:H₂O (stos. obj. 3:1) zawierającą 10% chlorowodoru guanidyny i doprowadzoną do pH 7,0. Zamiast 10% chlorowodoru guanidyny można stosować 2% NaCl, jednak dobra rozpuszczalność chlorowodoru guanidyny w acetonie ułatwia jego usunięcie z preparatów. Roztwór frakcji F2a można poddać dalszemu frakcjonowaniu dwoma sposobami. W pierwszym po zakwaszeniu ekstraktu stężonym HCl (ok. 1,8 ml na 100 ml ekstraktu) wytrąca się podfrakcję F2a2 dodając 1,75 objętości acetonu, a podfrakcję F2a1 przez dodanie do supernatantu 2/3 objętości acetonu. W sposobie drugim dodanie do obojętnego roztworu 1 objętości acetonu wytrąca podfrakcję F2a2, a wymieszanie

supernatantu z 1 objętością acetonu podfrakcją F2a1. Podfrakcje uzyskane w pH 7,0 zawierają domieszki niebiałkowe. Produkty uzyskane obydwoma sposobami nie różnią się jednak składem aminokwasowym i zachowaniem w elektroforezie od preparatów podfrakcji otrzymanych metodą Phillipsa i Johnsa (88). W tej ostatniej metodzie lepsze wyniki uzyskuje się, gdy frakcję F2a1 wytrąca się przez dłuższy czas (1 godz.) w 35°, a frakcję F2a2 osadza się w temperaturze pokojowej (87).



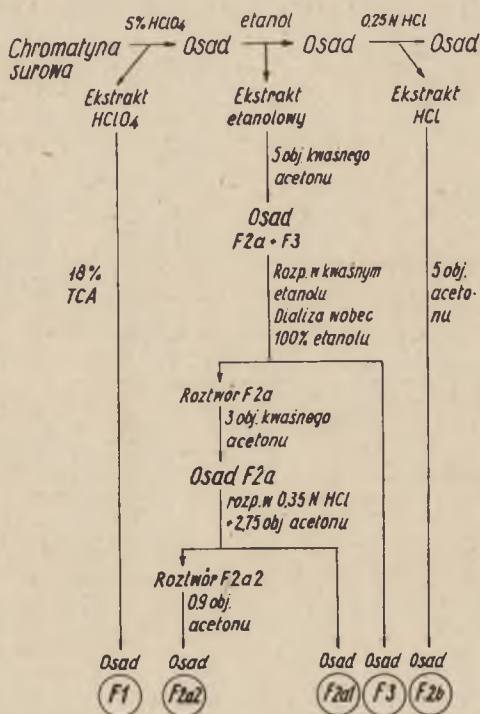
Schemat 1. Frakcjonowanie histonu grasicy cielęcej metodą selektywnej ekstrakcji wg Johnsa (50)

a) I wariant, b) II wariant

Ord i Stocken (79) rozdzielili frakcję argininową F3 dializując kwasoalkoholowy ekstrakt zawierający histony F3 i F2a, wobec alkoholu absolutnego. Osad wytrącony podczas pierwszych 2—3 godzin dializy wobec 3 objętości etanolu oznaczyli jako podfrakcję F3-1, zaś osad powstający w czasie dalszej 17 godzinnej dializy wobec 100 objętości etanolu — jako podfrakcję F3-2. Preparat F3-1 był czasami zanieczyszczono-

ny frakcją F1, którą wymywano 5% HClO_4 . Podfrakcje F3-1 i F3-2 różniły się zawartością grup sulfhydrylowych i reszt fosforanowych.

Ostatnio Gurley i Hardin (39) podali metodę izolowania pięciu głównych frakcji histonowych z hodowli tkanek chomika (schemat 2), opartą na I wariacie metody Johnsa (50).



Schemat 2. Selektywna ekstrakcja 5 frakcji histonowych z komórek jajnikowych chomika hodowanych *in vitro*, wg Gurley'a i Hardin (39)

Fracje otrzymywane metodami selektywnej ekstrakcji często zawierają domieszki zarówno innych frakcji histonowych jak i białek niehistonowych. Różni autorzy podają więc zabiegi, pozwalające oczyścić otrzymywane preparaty. I tak frakcję F3 oczyszczano przez rozpuszczenie jej w mieszaninie etanol — 1,25N HCl (stos. obj. 4:1) i dializę wobec etanolu absolutnego (51). Histon silnie lizynowy oczyszczano rozpuszczając go w 5% TCA i odrzucając nierozpuszczalne w tych warunkach domieszki (20). Histon F1 wytrącony następnie w 20% TCA można ekstrahować do 5% HClO_4 i po dializie otrzymać czysty preparat (81). Frakcje histonowe z tkanek ludzkich otrzymane według I metody Johnsa można oczyszczać odrzucając osady pozostałe po rozpuszczeniu wytrąconego i wysuszonego kompleksu F2a, F3 w mieszaninie etanol — 1,25N HCl (stos. obj. 4:1), a kompleksu F1, F2b w 0,25N HCl (64).

Murra y (71) opracował metodę stopniowego usuwania frakcji histonowych z surowego DNP grasicy cielęcej roztworami o coraz niższym pH

a następnie (73) przystosował ją do frakcjonowanej ekstrakcji histonów z jądrzystych erytrocytów ptasich. Według M u r r a y' a (71) DNP rozpuszczony w roztworze o niskiej sile jonowej lub w 1M NaCl zakwasza się 3,5N H₂SO₄ do pożądanego pH i ekstrahuje w temperaturze 2—5°. Po odwirowaniu wytrąca się z supernatantu etanolem (2,5 obj.) frakcję histonową a osad ponownie rozpuszcza się i traktuje jak poprzednio tyle, że przy niższym pH. Metoda ta daje powtarzalne wyniki tak w mikroskali jak i w skali preparatywnej. M u r r a y i wsp. (73) potwierdzili obserwacje, że najslabiej związane są z DNA histony lizynowe a najsilniej histony argininowe (tabl. 3).

Tablica 3

Fracje histonowe usuwane z DNP na drodze ekstrakcji roztworami o coraz niższym pH (73)

pH	Histony z erytrocytów kurczęcia (oznaczenie frakcji według rozdziału na <i>Ambertlite IRC-50</i>)	Histony z grasicy (oznaczenie frakcji według metody selektywnej ekstrakcji (53))
2,1—2,5	Ia, Ib, Ic	F1
1,8—2,1	V (typowa dla jądrzystych erytrocytów)	—
1,3—1,8	IIb	F2a2, F2b
1,0—1,4	III, IV	F2a1, F3

W pH powyżej 2,5 histony nie rozpuszczają się, natomiast ulega ekstrakcji większość niehistonowych białek rozpuszczalnych w kwasach dzięki czemu właściwe frakcje histonowe zawierają znacznie mniej tych zanieczyszczeń. Zastosowanie do ekstrakcji roztworów HCl lub buforu octanowego zamiast H₂SO₄ nie zmienia składu aminokwasowego ani zachowania się poszczególnych frakcji histonowych w elektroforezie.

Preparaty uzyskane drogą selektywnego usuwania frakcji histonowych z DNP są bardziej wartościowe przy badaniu roli tych frakcji w aktywności matrycowej DNP niż produkty asocjacji DNA z konkretnym typem histonu, których struktura i organizacja znacznie odbiega od rodzimej makrocząsteczki. Jednakże w niskich pH w temperaturze 2—5° teoretycznie możliwa jest depurynizacja DNA a uszkodzeniom tym można zapobiec pracując w temperaturze poniżej -0,4°. M u r r a y (72) przeprowadził zatem stopniową ekstrakcję kwaśną w temperaturze od -0,5° do -1,0° uzyskując frakcje histonowe identyczne z otrzymanymi w temperaturze powyżej 0°.

Metodę M u r r a y' a (71) zastosowała D i c k (19) do ekstrakcji z *Vicia faba* frakcji histonowych w pH 2,8; 1,8; 1,4; 0,6. D i c k i J o h n s (21) wykazali też, że stosowane powszechnie utrwalanie preparatów cytologicznych 45% CH₃COOH lub mieszaniną etanol — CH₃COOH (stos. obj.

3:1) powoduje odszczepienie białek histonowych. Roztwór 45% CH_3COOH ekstrahował z DNP grasicy cielęcej 55% całkowitego histonu (głównie F1, F2a2 i nieco F3), zaś układ etanol — CH_3COOH tylko 7—8% całkowitego histonu (głównie F2a1 i trochę F2a2 oraz F3). Ilość histonu usuniętego z DNP w ciągu 30 sek. była taka sama jak w ciągu 18 godz. co świadczy o znacznej szybkości tego procesu.

2. Selektywne strącanie

Rozdział histonów całkowitych przez selektywne strącanie (por. poz. 60) obecnie stosowany jest sporadycznie.

G o f s h t e i n w 1967 roku (34) frakcjonował przez wytrącanie acetonem całkowite histony ze spoczynkowych zarodków i kiełków pszenicy. W 1968 roku T i d w e l l i wsp. (111) opublikowali sposób rozdziału całkowitego histonu z wątroby szczura na drodze selektywnego strącania acetonem w temperaturze 25°. Uzyskali oni tą drogą pięć frakcji. Okazało się, że frakcje AF-1, AF-2 i AF-3 to histony lizynowe, frakcja AF-4 jest typowym histonem argininowym bogatym w glicynę (GAR od ang. *glycine-arginine rich*) a frakcja AF-5 jest histonem argininowym. Frakcje AF-3, AF-4 i AF-5 zawierały duży odsetek pochodnych metylowych lizyny a frakcje AF-1 i AF-2 nie zawierały ich w ogóle.

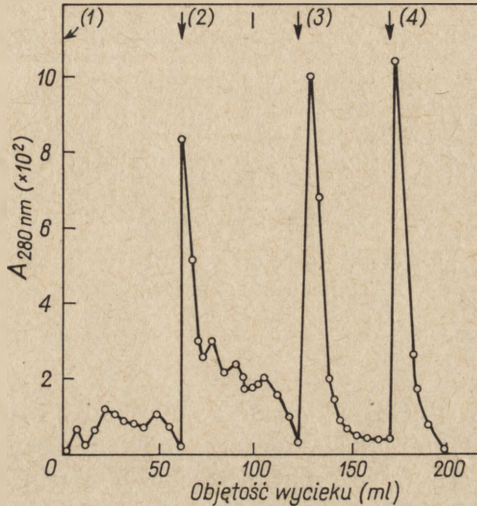
J o h n s (54) zastosował wytrącanie acetonem do frakcjonowania histonów F2b otrzymanych za pomocą selektywnej ekstrakcji. Frakcja ta ma stosunek Liz/Arg = 2, stanowi około 20—25% całkowitego histonu grasicy, zawiera dużo reszt seryny, a 75% wszystkich N-końcowych aminokwasów stanowi prolina. W żelu skrobiowym frakcja F2b wędruje jako jeden główny prążek z pewną ilością delikatnych stref dodatkowych. Przez wytrącanie różnymi stężeniami acetonu Johns uzyskał 5 podfrakcji: A, B, C, D i E. Analiza składu aminokwasowego i grup N-końcowych wykazała, że podfrakcje D i E są to zanieczyszczenia histonami argininowymi, które pochodzą z procesu ekstrakcji i stanowią 15% frakcji F2b. Podfrakcje B i C zawierały więcej N-terminalnej proliny (74—84%), niż podfrakcja A (ok. 30%), nie były jednak jednorodne elektroforetycznie (szczególnie największa frakcja B).

3. Chromatografia jonowymienna i filtracyjna

Chromatografia jonowymienna. W rozdzielach chromatograficznych histonów stosowane są najczęściej *Amberlite IRC-50* i karboksymetyloceluloza (*CM-celuloza*).

K i n k a d e i C o l e (57, 58) rozdzielili na amberlicie frakcję lizynową z grasicy cielęcej, uzyskaną przez ekstrakcję 10% TCA na 4 podfrakcje. Zmodyfikowali oni technikę rozdziału podaną przez S a t a k e 'a i wsp.

(95) zmniejszając wymiary kolumny ($2,3 \times 15$ lub 30 cm) i stosując „płytki” gradient chlorowodoru guanidyny ($8-10^0/0$). Otrzymane frakcje różniły się zawartością argininy, waliny i niewielkimi zmianami w mapach peptydowych, zrobionych metodą „odbitki bliźniaczej”. Metoda Kinkade’a i Cole’a (57) jest obecnie szeroko stosowana w porównawczych badaniach histonów lizynowych i argininowych izolowanych z różnych materiałów.

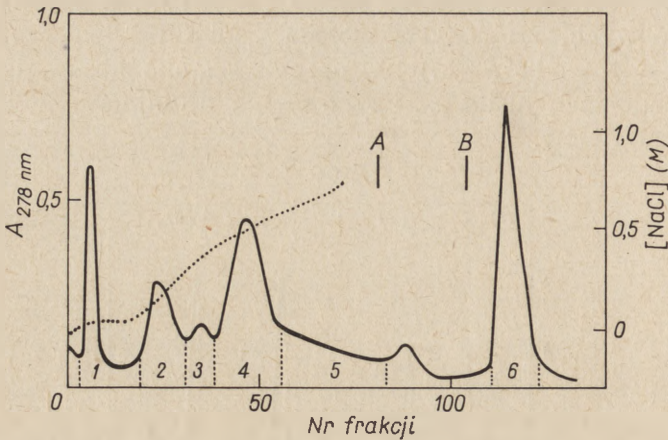


Rys. 1. Chromatografia na *CM*-celulozie ($4 \times 0,9$ cm) histonu grasicy cielęcej wg (78). Ilość białka: 10 mg, Bufory do elucji: (1) — $0,1M$ $CH_3COOH + 0,05M$ $NaOH$, pH 4,2, (2) — $0,1M$ $CH_3COOH + 0,03M$ $NaOH + 0,35M$ $NaCl$, pH 4,2, (3) — $0,01N$ HCl , (4) — $0,02N$ HCl

Nohara i wsp. (78) zmodyfikowali metodę frakcjonowania histonów na *CM*-celulozie, opisaną przez Johnsa i wsp. (56). Zastosowali oni mniejszą kolumnę oraz zmienili skład dwóch pierwszych buforów elucyjnych. Zmodyfikowana metoda umożliwia rozdział małych (10 mg) ilości histonu i szybką kontrolę uzyskiwanych preparatów histonowych (rysunek 1).

Johns (54) opracował metodę rozdziału na *CM*-celulozie (rysunek 2) podfrakcji „acetonowej” B stanowiącej główny składnik frakcji F2b. Gradientem stężeń $NaCl$ (od 0 do $1M$) w $0,01M$ buforze boranowym o pH 9,0 wymywa się z kolumny $50^0/0$ nałożonego białka, a resztę odzyskuje się za pomocą $1N$ HCl . Z sześciu uzyskanych w ten sposób składników podfrakcji B trzy pierwsze zawierały dużo aminokwasów kwaśnych ($25-30$ mol $0/0$) i glicynę jako N-terminalną resztę, z tym, że trzeci składnik był bogatszy od poprzednich w alaninę; składniki 4 i 6 reprezentowały typowy, główny histon frakcji F2b z N-terminalną proliną, ale różniły się od siebie zawartością asparaginy i glutaminy co w połączeniu z procesami agregacyjnymi (bardzo wysokie pH) powodowało zapewne obserwowaną elucję w dwóch

szczytach; składnik 5 był bardzo niewielki i nie udało się odzyskać z niego białka.



Rys. 2. Chromatografia na *CM*-celulozie (13×3 cm) frakcji F2b (Frakcja B ze strącania acetonem (54).

Linia ciągła przedstawia absorpcję w 278 nm, linia przerywana — molowość NaCl. Rozpuszczalnik A: 0,01M bufor boranowy o pH 9,0 zawierający 2M NaCl. Rozpuszczalnik B: 1N HCl.

Myulberg i wsp. (74) wykazali, że odmienny rozdział na *CM*-celulozie histonów z różnych materiałów (np. embrion kurzy i grasica kurcząt) spowodowany jest różnym rozmiarem zanieczyszczeń zależnym od specyficznej podatności tkanek na zabiegi ekstrakcyjne.

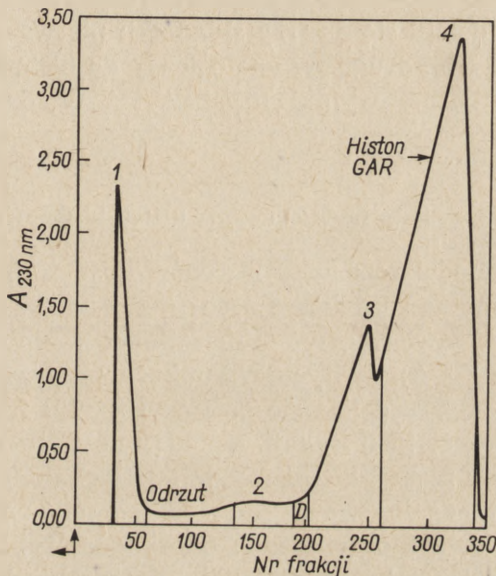
Ostatnio Iwaisenshu (47) opracowali nową metodę rozdziału histonów na *CM*-celulozie. Łączą w niej ekstrakcyjne działanie etanolu z wpływem deagregacyjnym kwasu mrówkowego. Rozdzielili oni całkowity histon grasicy cielęcej na 5 frakcji prowadząc elucję roztworem etanolu, o liniowo obniżającym się stężeniu, w 2,6M HCOOH zawierającym 0,1M mrówczan sodu. Białka histonowe wymywały się w zakresie stężeń 70%—45% etanolu przy czym szybciej eluowały się w tych warunkach histony argininowe. Metoda ta nadaje się szczególnie dobrze do rozdziału zasadniczych frakcji histonowych na bardziej jednorodne komponenty.

Chromatografia filtracyjna. Sączenie molekularne na żelach dekstranowych, w celu frakcjonowania histonów zostało wprowadzone dużo później od chromatografii jonowymiennej (por. poz. 60).

Mauritzen i wsp. (69) rozfrakcjonowali histon argininowy otrzymany na drodze agregacji z płodowej grasicy cieląt, na pięć składników, stosując rozdział na żelu *Sephadex G-100* (300×7 cm) i używając 0,01N HCl, jako eluentu. Analiza składu aminokwasowego i obrazy elektroforetyczne wykazały, że szczyt nr 4 odpowiadał histonowi bogatemu w argininę i lizynę, tzw. AL-histonowi (jest on analogiczny z histonem β_6 lub F2a2). Szczyt nr 5 był natomiast histonem bogatym w glicynę i argininę,

tw. GAR histonem (odpowiada histonowi β_1 lub F2a1). Szczyty nr 1 i 2 odpowiadały histonom o stosunku $Liz/Arg \approx 1$.

Starbuck i wsp. (104), kontynuując badania Mauritzena i wsp. rozdzielali na żelu *Sephadex G-100* frakcje F2a (rysunek 3) i F3 otrzymane metodą Johnsa (50). Kompleks histonowy F2a nałożony na kolumnę po deagregacji w 0,05N HCl z 8M mocznikiem rozdzielał się na cztery szczyty. Szczyt nr 4 reprezentował GAR-histon i stanowił 70% odzyskiwanego białka. Po rechromatografii w tych samych warunkach uzyskiwano produkt o 90% czystości, oceniając wg kryterium N-terminalnych aminokwasów. Drobnopeptydowe zanieczyszczenia usuwano następnie na żelu *Sephadex G-25* uzyskując ostatecznie homogeny GAR-histon o 96% czystości.



Rys. 3. Chromatografia filtracyjna na żelu *Sephadex G-100* (300×7,6 cm) frakcji F2a grasicy cielęcej (104)

Ilość białka: 2–3,5 g; pojemność złoza: 13,5 l; objętość próbki: 40 ml; eluent: 0,01M HCl

W analogiczny sposób otrzymano jednorodny AL histon o czystości 96% poprzez rozdział kompleksu histonowego F3. Bliższa analiza rozdziału frakcji F2a i F3 na żelu *Sephadex G-100* wykazała, że zawierają one identyczne zasadnicze składniki ale w różnych proporcjach ilościowych przy czym GAR-histon, występujący w przewodzie we frakcji F2a zawierał pochodne metylowe lizyny, histon AL natomiast, typowy dla frakcji F3, był tych grup pozbawiony.

Sautiere i wsp. (96) rozdzielili frakcję argininową z *CM*-celulozy na drodze sączenia przez żel *Sephadex G-100*, przy użyciu 1M HCOOH jako eluentu. Otrzymali oni 3 składniki różniące się ilością argininy oraz wartością stosunku Liz/Arg przy czym ostatni składnik zawierający naj-

więcej argininy (16,6 mol %) przy stosunku Liz/Arg = 0,65 był homogeny elektroforetycznie w żelu skrobiowym. Ci sami autorzy (97) rozdzielili następnie histon lizynowy z grasicy cielęcej drogą sączenia przez *Sephadex G-110* w 6M moczniku i elucji roztworem 0,02N HCl z 4M mocznikiem. Uzyskali w ten sposób 2 składniki o mniejszej masie cząsteczkowej niż histon wyjściowy. Składniki te okazały się jednorodne w elektroforesie w żelu skrobiowym.

Murray i wsp. (73) odzyskiwali frakcje histonowe erytrocytów kurczęcia z eluatów z kolumny *Amberlite CG-50* usuwając z nich chlorowodorek guanidyny drogą sączenia przez *Bio Gel P-2*. Następnie na kolumnie zawierającej *Bio Gel P-60* rozfrakcjonowali oni składnik IIB na dwie podfrakcje odpowiadające histonom F2a2 i F2b. W tym samym układzie ale w obecności β -merkaptoetanolu, kompleks argininowy, ekstrahowany z tkanki w pH 1,0 dzielił się na trzy składniki: pierwszy stanowił zanieczyszczenie frakcją IIB₁, drugi był analogiczny do histonu F3, a trzeci do frakcji F2a1. Identyczne wyniki uzyskali też Vidali i Neelin (115).

4. Inne metody frakcjonowania białek histonowych

Interesującą metodą rozdziału histonów jest technika Butlera i wsp. (9). Polega ona na rozdziale przeciwprądowym w aparacie Towersa i wsp. w układzie zawierającym butan-2-ol i wodny roztwór kwasu trójchlorooctowego (TCA). W tych warunkach przy zastosowaniu 0,7% TCA, histon całkowicie rozdziela się na trzy szczyty: frakcję F1, frakcję F2b i mieszaninę pozostałych frakcji. Metoda ta okazała się też przydatna do dalszego rozdziału frakcji histonowych, wyodrębnionych innymi metodami. I tak z frakcji bogatej w argininę wyodrębniono (stosując 0,5—0,6% TCA) trzy składniki, z których jeden odpowiadał typowemu histonowi argininowemu F3, drugi był analogiczny do frakcji F2a2 a trzeci, co stwierdzono po raz pierwszy, był składnikiem lizynowym o stosunku Liz/Arg w granicach 1,5—2,0. Frakcję F2a2 rozdzielało na dwie podfrakcje nie różniące się składem aminokwasowym, a frakcję F2b na dwa składniki o odmiennej zawartości lizyny, wysoce homogenne wg kryterium N-końcowych aminokwasów. Można sądzić, że technika Butlera i wsp. znajdzie zastosowanie przy otrzymywaniu w skali preparatywnej frakcji histonowych wolnych od zanieczyszczeń krzyżowych, których nie dało się usunąć metodami stosowanymi do tej pory. Bardzo zbliżone rezultaty uzyskali Koki i wsp. (63), którzy metodą rozdziału przeciwprądowego porównywali histony grasicy cielęcej z histonami tylnych gruczołów przednich jedwabnika.

Mauritzen i wsp. (69) otrzymali z płodowej grasicy cielęcej kompleks frakcji argininowych przy pomocy techniki, wykorzystującej szczególnie i typową dla histonów argininowych tendencję do agregacji przy

wyższych wartościach pH i siły jonowej. Z 2% roztworu całkowitego histonu o pH 7,0 (w obecności dwuizopropylodifluorofosforanu jako inhibitora proteaz) wytrącali oni mieszaninę histonu argininowego i umiarkowanie lizynowego przez dodanie etanolu do stężenia 17%. W roztworze pozostawał histon lizynowy. Frakcję argininową wyodrębniano następnie przez rozpuszczenie wytrąconej mieszaniny w 0,01N HCl i agregację w 2M NaCl (pH 8,1) w ciągu 48 godz. Zagregowany histon oczyszczano przez ponowne rozpuszczenie w 0,5N HCl, dializę wobec wody i powtórna agregację w 4M NaCl (pH 4,0). Końcowy produkt rozpuszczano w 0,01N HCl, dializowano wobec wody, sączono przez *Millipore* i liofilizowano. Tę metodę z niewielkimi tylko zmianami zastosowali *Bellaïr* i *Mauritzen* (3) do otrzymywania histonu bogatego w argininę z jądrzastych erytrocytów, wątroby i śledziony kurczęcia.

IV. Analiza chemiczna histonów

Histony i ich frakcje uzyskiwane z różnych materiałów różnymi sposobami preparowania i frakcjonowania, porównuje się przez określenie ich składu aminokwasowego, oznaczenie N- i C-końcowych aminokwasów czy zestawienie wyników chromatografii i elektroforezy peptydów, otrzymanych przez trawienie białek histonowych trypsyną i chymotrypsyną (por. poz. 60). Najpełniejszy obraz jednak daje ustalenie sekwencji aminokwasów w cząsteczce histonowej. Ostatni rok przyniósł w tej dziedzinie rewelacyjny wręcz postęp.

Kinkade i *Cole* (58) badali peptydy trzech podfrakcji histonu lizynowego otrzymanych na *Amberlite IRC-50*. Każda z uzyskanych podfrakcji dawała po trawieniu trypsyną 50—55 peptydów. 5—10 z nich było różnych dla różnych frakcji. Peptydy zawierające tyrozynę, fenyloalaninę i argininę były wspólne dla wszystkich frakcji.

Fambrough i *Bonner* (27) porównywali histony argininowe z grasicy i kielków grochu na podstawie map peptydowych i stwierdzili, że są one homologiczne (schemat 3a i b). Minimalne różnice w zawartości cysteiny były zapewne spowodowane zanieczyszczeniami białkami nie-histonowymi.

Phillips (87) badał peptydy otrzymane w wyniku trawienia histonów F2a1 i F2a2 z grasicy cielęcej. Wykazał on, że zablokowanie grup N-końcowych obu tych histonów polega na zacetylowaniu N-końcowego aminokwasu oraz, że oba mają tę samą N-terminalną sekwencję: N-acetyl-Ser-Gli-Arg. Zdaniem *Phillipsa* wszystkie grupy acetylowe badanych histonów występują w postaci takiego właśnie N-końcowego zespołu. Natomiast peptyd N-końcowy histonu F1 jest na pewno odmienny ale jego sekwencja nie została jeszcze poznana. Analiza innych peptydów w 3 przypadkach wykazała, że N-terminalną resztą jest kwas pirolidynokarboksy-

lowy. Być może jest to forma obecna i w rodzimym białku. Warto tu przypomnieć, że frakcje histonowe F1 i F2a z różnych źródeł mają zablokowane N-końcowe aminokwasy, natomiast N-terminalną resztą frakcji F2b jest prolina a frakcji F3 — alanina.

Badając lokalizację grup acetylowych w histonie F2a1 Gershey i wsp. (33) uzyskali odmienne wyniki niż Phillips (87). Ze znakowanej octanem grasicy szczura wyizolowali oni frakcje histonowe, poddali je trawieniu trypsyną i pronazą a po rozdzieleniu i analizie peptydów stwierdzili, że cała radioaktywność była w ϵ -N-acetylolizynie. Acetylacja zachodziła głównie w histonach argininowych, w których N-końcowe grupy acetylowe stanowiły tylko znikomą część reszt acetylowych obecnych w białku w postaci połączeń z ϵ -N-acetylolizyną. Problem acetylacji histonów odpowiada ściśle zagadnieniu metylacji tych białek. Prace Hempla i wsp. (43, 44) wykazały, że oprócz reszt ϵ -N-mono- i ϵ -N-dwumetylolizyny w histonach z różnych tkanek szczura, grasicy cielęcej i komórek raka Ehrlicha występuje też ϵ -N-trójmetylowa pochodna lizyny. Zawartość jej jest wyższa w histonach argininowych (F2a i F3). Przykładowo frakcja F3 zawiera 0,36 mol^o/_o ϵ -N-monometylolizyny, 0,41 mol^o/_o ϵ -N-dwumetylolizyny i 0,17mol^o/_o ϵ -N-trójmetylozolinę. Dwumetylowa pochodna lizyny także i w innych frakcjach występuje w największych ilościach. Wykrycie tak zmodyfikowanych aminokwasów w białku histonowym ułatwia ustalenie sekwencji aminokwasowej histonu, gdyż takie aminokwasy są wyraźnymi punktami orientacyjnymi.

Badania C-końcowych aminokwasów ze względu na trudności metodyczne, przez długi okres były bardzo niekompletne. Ciekawe są rezultaty prac Phillipsa i Simpsona (89), którzy oznaczyli C-terminalne reszty pięciu głównych frakcji histonowych grasicy cielęcej i szczurzej, posługując się metodami hydrazynolizy, działaniem karboksypeptydaz i techniką izotopową. Okazało się, że w obu materiałach C-końcowe aminokwasy są identyczne: lizyna w F1, F2a2 i F2b, w F2a1 — glicyna, a w F3 — alanina. Oznaczyli oni również C-terminalne sekwencje w F1 (-Liz-Ala-Liz) w F2a2 (-Wal-Gli-Ala-Arg-His-Liz) i w F3 (-Arg-Ala).

Ostateczne ustalenie pełnej sekwencji aminokwasów było dziełem dwóch ośrodków: laboratorium kierowanego przez Buscha i zespołu pracującego pod kierunkiem Bonnera.

W ośrodku Buscha od kilku lat prowadzono prace nad GAR-histonem. Wstępne badania Mauritzena i wsp. (69) oraz Starbucka i wsp. (104) doprowadziły do uzyskania jednorodnej frakcji glicynowo-argininowej. Sautiere i wsp. (98) rozbili GAR-histon bromkiem cyjanu na 2 peptydy. Mniejszy peptyd zawierający 18 aminokwasów okazał się obszarem C-końcowym. Jego N-terminalnym aminokwasem był kwas asparaginowy (podczas gdy dla całkowitego GAR-histonu jest nim acetyloseryna) natomiast C-końcowym — układ Gli-Gli-COOH, identyczny

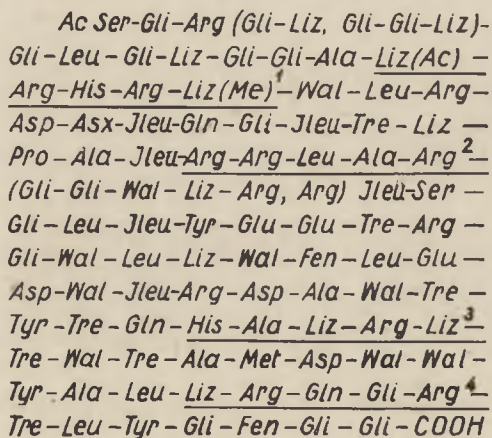


Schemat 3. Mapy peptydów uzyskanych działaniem trypsyny z histonu IV kielków grochu (a) i histonu IV grasicy cielęcej (b) (27)

z C-kończącą sekwencją GAR-histonu. Peptyd ten zawierał 2 z 4 reszt tyrozyny i 1 z 2 reszt fenyloalaniny, jakie są w GAR-histonie. Po trawieniu peptydy rozdzielano wstępnie na kolumnie z *Sephadex G-100* a potem frakcjonowano je na jonowymieniaczach *Aminex A-4* lub *Aminex A-5* w gradiencie buforu pirydyna — kwas mrówkowy.

Sporządzano też mapy peptydowe metodą zstępującej chromatografii na bibule *Whatman 3 MM* w ciągu 16 godz. w układzie n-butanol-pirydyna- $\text{CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ (15:12:3:10). Ostatecznie ustalono całą sekwencję tego osiemnastopeptydu: Asp-Wal-Wal-Tyr-Ala-Leu-Liz-Arg-Glu-Gli-Arg-Tre-Leu-Tyr-Gli-Fen-Gli-Gli-COOH. Ma on reszty zasadowe rozłożone równomiernie i zawiera więcej aromatycznych aminokwasów niż pozostałość cząsteczki. Zespół badaczy z *Quagliarottim* (91) na czele posługując się takimi samymi metodami ustalił sekwencję połowy cząsteczki GAR-histonu. Była to C-terminalna część licząca 53 aminokwasy i skupiająca wszystkie aromatyczne reszty aminokwasowe GAR-histonu.

Krótko potem ci sami badacze (105) opublikowali pełną sekwencję GAR-histonu grasicy cielęcej (schemat 4).



Schemat 4. Sekwencja aminokwasowa GAR-histonu grasicy cielęcej (105)

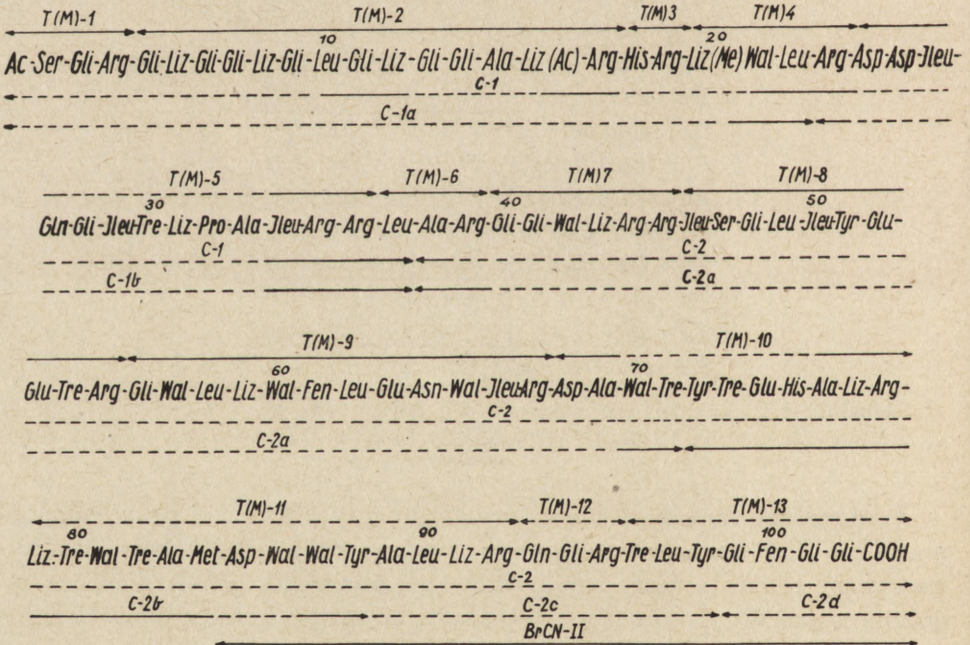
Ac — grupa acetylowa, Me — grupa metylowa, Asx — kwas asparaginowy (jak wykazała dalsza analiza)

Podkreślone na schemacie cztery fragmenty cząsteczki prawdopodobnie decydują o rozpoznaniu miejsca połączenia z DNA. Ciekawe jest symetryczne ułożenie reszt zmodyfikowanej Liz względem Arg i His, widoczne w pierwszym obszarze. Właściwie wszystkie zmodyfikowane reszty aminokwasowe są zgrupowane w N-kończącym fragmencie, natomiast aminokwasy aromatyczne w odcinku C-kończącym.

Desai i wsp. (18) w tej samej pracowni, podjęli próbę porównania sekwencji aminokwasów obszaru C-końcowego GAR-histonów wyizolowa-

nych z mięsaka limfatycznego, wątrobiaka Novikoffa i płodowej grasicy cielęcej. Skład aminokwasowy C-końcowego peptydu był identyczny we wszystkich przypadkach. Okazało się też, że i sekwencja aminokwasów jest w tym obszarze GAR-histonu jednakowa. Być może odpowiada ona także sekwencji analogicznego białka z kielków grochu, gdyż skład aminokwasowy histonu z tego materiału jest taki sam, jak wymienionych poprzednio.

Drugim ośrodkiem, z którego w 1969 roku opublikowano pełną sekwencję białka histonowego było laboratorium Bonnera. De Lange i wsp. (16) zbadali sekwencję C-końcowego 19-aminokwasowego peptydu histonu argininowego (IV) z grasicy cielęcej a także sekwencję aminokwasową z analogicznego peptydu z kielków grochu. Obie sekwencje okazały się identyczne. De Lange i wsp. (17) opublikowali następnie już pełną sekwencję argininowego histonu IV z grasicy cielęcej. Trawiąc trypsyną i chymotrypsyną histon poddawany lub nie działaniu bezwodnika kwasu maleinowego otrzymywali oni szereg dużych i małych peptydów, które fragmentami „zachodziły na siebie”. Wnikliwa analiza pozwoliła ustalić kolejność wszystkich 102 aminokwasów (schemat 5).



Schemat 5. Pełna sekwencja aminokwasowa histonu IV grasicy cielęcej (17)

Linie pełne (w strzałkach) wskazują reszty aminokwasowe, których pozycję ustalono przez badanie sekwencji peptydów uzyskanych działaniem trypsyny — T (M) oraz chymotrypsyny (C); linie przerywane — reszty oznaczone tylko za pomocą analizy składu aminokwasowego. Ac — grupa acetylowa, Me — grupa metylowa

Zidentyfikowano dwa zmodyfikowane aminokwasy, tj. ϵ -N-metylolizynę i ϵ -N-acetylolizynę. Ustalono, że są one usytuowane na krańcach 5-aminokwasowego peptydu zawierającego tylko reszty zasadowe, a zaczynającego się od 16-ego aminokwasu, licząc od N-końcowego aminokwasu: Liz (Ac)-Arg-His-Arg-Liz (Me).

Rozmieszczenie reszt różnych typów w histonie IV jest nierównomierne i sugeruje wysoką specyficzność i unikalność konformacji. N-końcowy fragment cząsteczki jest bogaty w aminokwasy z ładunkami dodatnimi, podczas gdy obszar C-końcowy zawiera większość aromatycznych i innych hydrofobowych aminokwasów oraz ładunki ujemne. Takie rozmieszczenie sugeruje, że N-końcowa część histonu może być głównym miejscem powiązania z DNA, a C-końcowy fragment nadaje białku specyficzną konformację. Ustalono także, że ciężar cząsteczkowy histonu IV wynosi 11 280, a jego punkt izoelektryczny jest powyżej 12. Wzdłuż cząsteczki tego białka obserwować można bardzo podobne fragmenty, co nasunęło autorom przypuszczenie, że gen kodujący ten histon powstał przez powielenie jednego wyjściowego fragmentu DNA.

W 1969 roku I w a i i wsp. (46) podali sekwencję 125 aminokwasów histonu umiarkowanie lizynowego z grasicy cielęcej otrzymanego w czystej jednorodnej postaci na drodze chromatografii na CM-celulozie zgodnie z metodą I w a i i wsp. (47). Była to tzw. frakcja Fb2-C4. Dyskutując rozmieszczenie różnych aminokwasów autorzy sugerują, że obszary N- i C-końcowe omawianego histonu mają za zadanie przytwierdzenie cząsteczki do DNA, natomiast obszar środkowy specyficznie oddziałuje z innymi czynnikami, zaangażowanymi w procesy represji derepresji.

V. Fizykochemiczna analiza histonów

Szersze zastosowanie metod fizykochemicznych i biofizycznych jest warunkiem lepszego poznania histonów umożliwiając głębsze wniknięcie w niejednorodną strukturę tych białek i określenie ich konformacji.

1. Elektroforeza histonów

Badania elektroforetyczne histonów obejmują elektroforezę swobodną, bibułową, w żelu skrobiowym i poliakrylamidowym. W ciągu ostatnich lat nie pojawiły się nowe oryginalne opracowania stosujące elektroforezę swobodną czy bibułową do rozdzielania i analizy histonów. Może warto wspomnieć tylko o pracy Bauera i Beheima (2), którzy opisali chromatograficzny rozdział histonu na bibule przy zmianie rozpuszczalników co 15 min. Rozpuszczalnikami były roztwory NaCl lub HCl o stopniowo malejącym stężeniu. Przy typowym układzie (NaCl: 4M —

2M — 1M — 0,1M — 0,01M oraz H₂O) histon grasicy cielęcej dzielił się na 8 pasm a histon z raka Walkera na 4 strefy.

Elektroforeza w polioctanie celulozy. Techniki stosujące jako nośnik polioctan celulozy okazały się dogodne i są często wykorzystywane we współczesnych badaniach histonów drogą elektroforezy. Yoichi i Tokuzo (118) zastosowali ten nośnik do rozdziału histonu z liści tytoniu. Białko наносили w 0,01N HCl, elektrolitem był natomiast 0,4% roztwór KCl w 0,01N HCl. Czas trwania elektroforezy wynosił 30 min. i pozwalał na wyodrębnienie 10 składników, grupujących się w dwie strefy. Tidwell i wsp. (111) prowadzili elektroforezę całkowitego histonu z wątroby szczura na polioctanie celulozy przez 2 godz. przy spadku napięcia 12V/cm, stosując jako elektrolit 0,05M bufor weronalowy o pH 9,0, zawierający 8M mocznik. Po wybarwieniu 2% roztworem zieleni trwałej w buforze weronalowym, utrwaleniu w kwasie pikrynowym i usunięciu nadmiaru barwnika metanolem, paski nośnika zawierające odpowiednie frakcje histonowe wycinano, eluowano mieszaniną aceton-etanol-kwas octowy (3:3:1) i oznaczano pochłanianie eluatów przy 625 nm.

Elektroforeza w żelu skrobiowym. Połączenie rozdziału białek w polu elektrycznym z efektem tzw. sita molekularnego, jakim okazał się odpowiednio przyrządzony żel, zwiększyło bardzo zdolności rozdzielcze (por. poz. 60). Obecnie elektroforeza w żelu skrobiowym stosowana jest powszechnie. Z ciekawszych modyfikacji wymienić należy pracę Hnilicy i wsp. (45), którzy dodając do elektrolitu niewielkie ilości (0,2—0,6M) chlorku amonu uzyskiwali polepszone rozdziały, bez „ogonów”. Stwierdzili oni, że ilość frakcji silnie lizynowej (F1) oraz umiarkowanie lizynowej (F2a2) jest prawie jednakowa we wszystkich badanych tkankach (grasica cielęca, śledziona szczura, komórki hepatomy oraz normalna i regenerująca wątroba szczura). Natomiast ilość najbardziej ruchliwej frakcji F2a1 jest najbardziej zmienna: w wątrobie i grasicy utrzymuje się na jednakowym poziomie, w komórkach nowotworowych ulega obniżeniu, a w tkankach o szybkich podziałach komórkowych (regenerująca wątroba) poziom jej jest najwyższy.

Johns (55), dodając do elektrolitu (0,01N HCl) TCA do stężenia 0,01N przy pH 1,8, rozdzielił frakcję F2a1 i F2a2. Frakcja pierwsza zostawała na starcie, co spowodowane było najprawdopodobniej przez efekt agregacji, wywołany kwasem trójchlorooctowym.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym. W ostatnich latach ta metoda frakcjonowania histonów zdobyła duże uznanie. Żele poliakrylamidowe są termostabilne i praktycznie proces rozdziału w nich nie zmienia się w szerokim zakresie wartości pH. Jest to szczególnie ważne przy pracy nad histonami, gdyż umożliwia rozdział w niskich pH, co pozwala ograniczyć zjawiska agregacji, a także działanie enzymów proteolitycznych. Z ostatnich lat należy wymienić prace Vandea i wsp. (112),

którzy stosując 10% żel poliakrylamidowy i 0,1M bufor octanowy o pH 4,0 po 16 godz. elektroforezy rozdzielili całkowity histon grasicy cielęcej na 20, a frakcję F3 na 6 składników. W pozostałych frakcjach F1, F2a i F2b stwierdzili obecność 1 głównego pasma oraz pewnej niewielkiej ilości słabo zaznaczonych stref. Zbliżone wyniki uzyskali Macpherson i Murray (65) prowadząc elektroforezę frakcji histonowych otrzymanych w wyniku chromatografii jonowymiennej na Amberlite IRC-50. Najlepszy okazał się 0,01N bufor octanowy o pH 4,1. Jednakże obserwowane przez nich duże ilości białka nie wchodzącego do żelu (w przypadku frakcji bogatych w argininę) świadczyły o intensywnej w tych warunkach agregacji histonów argininowych.

Gurley i Shephard (40, 100) zastosowali tzw. rozdziały łączone, używając dwóch różnych buforów o pH 4,0: 0,3M roztworu waliny do napełnienia naczynia anodowego oraz 0,3M roztworu glicyny do naczynia katodowego. Prowadzili oni elektroforezę w różnym czasie (60—90 min.) przy nanoszeniu różnych ilości białka (60—400 µg) na żel. Przy wprowadzaniu znacznej ilości histonu otrzymywano w ciągu 60 min. dobry rozdział frakcji szybko wędrujących. Zmniejszenie ilości nanoszonego białka i wydłużenie czasu elektroforezy do 90 min. pozwalało rozdzielić dobrze strefy w obrębie frakcji o niskiej ruchliwości elektroforetycznej. Zestawienie wyników różnych rozdziałów tego samego preparatu histonu grasicy pozwoliło autorom wyodrębnić 34 strefy. Za pomocą opracowanej przez siebie metody autorzy porównywali niejednorodność frakcji histonowych uzyskiwanych różnymi metodami frakcjonowania (selektywna ekstrakcja według Johnsa (50), rozdział na Amberlite IRC-50, usuwanie stopniowe z DNP przy różnych pH). Jakościowo podobne rozdziały poszczególnych frakcji, z zaznaczonymi jedynie pewnymi zmianami ilościowymi pozwalają sądzić, że duża niejednorodność badanych białek histonowych nie jest spowodowana błędami preparatyki.

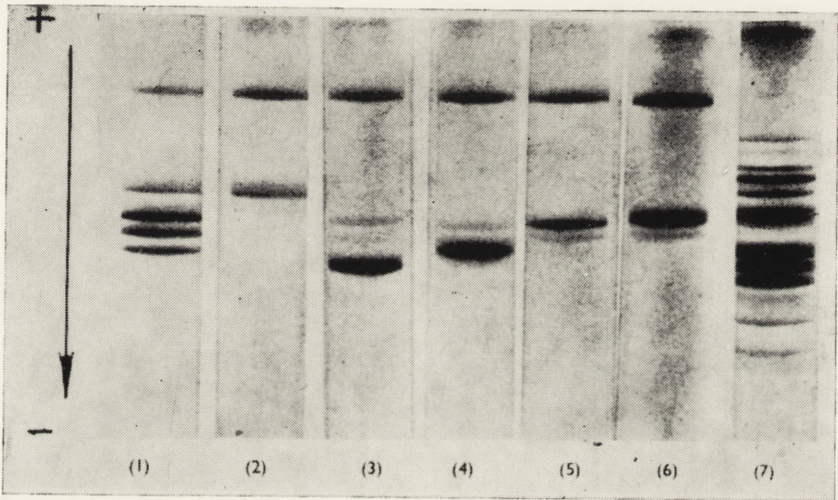
Równocześnie ukazała się też praca Debabova i Rebentisha (15), którzy prowadzili rozdział histonów w nieco odmiennych warunkach (polimeryzacja żelu poliakrylamidowego z dwumetyloaminopropionitrylu zamiast N,N,N',N'-czterometyloetylenodwuaminy, 0,37M roztwór glicyny o pH 4,0, czas elektroforezy 4 godz., odbarwienie żelu za pomocą 7% CH₃COOH bez usuwania nadmiaru barwnika w polu elektrycznym). W obrazie elektroforetycznym dla całkowitego histonu z grasicy cielęcej wyodrębniali oni 4 strefy. Strefa A posiadała minimalną ruchliwość i 1—2 oddzielne prążki. Strefa B zawierała od 1 do 3, a strefa W — od 2 do 3 pasm o pośredniej ruchliwości elektroforetycznej. Kilka szybko wędrujących w żelu frakcji stanowiło strefę G. Dobra powtarzalność umożliwiła autorom zastosowanie tej techniki do porównania histonów z różnych źródeł oraz do określenia wpływu procesów izolowania jąder komórkowych na niejednorodność preparatów histonowych. Nie stwierdzili oni różnic zależnych od wieku zwierzęcia, zaobserwowali

natomiast pewne różnice, szczególnie ilościowe, między histonami z grasicy cielęcej a histonami grasicy szczurzej i komórek raka puchlinowego Ehrlicha. Proces izolowania jąder jak się zdaje nie wpływa na obraz elektroforetyczny całkowitego histonu, ale istotne zmiany (zmniejszenie ilości prążków i zawartości białka w strefach B i W na korzyść szybko wędrujących frakcji strefy G) pojawiają się jeżeli grasicę, z której wyodrębniono histony poddano zamrożeniu i odmrożeniu.

Rebentish i Debabov (93) posłużyli się następnie swoją metodą do porównania frakcji histonowych z chromatografii na *CM*-celulozie (f1, f2, f3) z histonami otrzymanymi metodą selektywnej ekstrakcji według Johnsa (50) (F1, F2a, F2b, F3). Obraz elektroforetyczny frakcji f1 był zbliżony do obrazu otrzymanego dla histonu F1, wykazywał jednak jej większą homogenność. Elektroferogramy frakcji F2a i F3 były podobne do siebie a także do obrazów frakcji f2 i f3 z *CM*-celulozy. Frakcja F2b wykazywała 2 zasadnicze strefy, odpowiadające podstawowym prążkom o maksymalnej i pośredniej ruchliwości w histonie całkowitym. Ogólnie zaobserwowano we frakcjach otrzymanych metodą ekstrakcji istnienie pewnej ilości słabo ruchliwych składników reprezentujących najprawdopodobniej agregaty powstałe podczas preparatyki tych frakcji. Autorzy wykazali ponadto, że zwiększenie stężenia żelu i obecność 6M mocznika w czasie elektroforezy nie polepsza rozdziału a przedłuża wydatnie jego czas, stosowanie zaś żelów o niższym usieciowaniu daje znacznie gorsze wyniki. To spostrzeżenie oraz fakt, że większa ruchliwość elektroforetyczna frakcji histonowych nie jest skolerowana ze zmianami w sile wiązania się ich na kolumnach jonowymiennych sugeruje, że decydującą rolę w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym odgrywają siły molekularne oraz stosunek ładunku elektrycznego histonów do ich masy, a rozdział zależy od kształtu i rozmiaru cząsteczek. Na zwiększenie zdolności rozdzielczej w elektroforezie dyskowej wpływa zapewne tworzenie przez rozdzielane białko ultracienkich błon startowych.

Gofshtein i Sidorov (36) rozdzielili za pomocą elektroforezy w 15%_w żelu poliakrylamidowym całkowity histon z DNP kielków pszenicy na 10—11 składników dowodząc tym samym niejednorodności histonów pochodzenia roślinnego. Gofshtein (35) badał też tą techniką frakcje histonowe z zarodków i kielków pszenicy otrzymane przez wytrącanie acetonem.

Johns (52) zaproponował prowadzenie rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym przy *pH* 2,4, co miało zapobiec agregacji histonów argininowych, która następuje w *pH* około 4,0. Spolimeryzowany żel doprowadza się do *pH* 2,4 w rurkach, w których będzie on użyty do rozdziału, wypełniając naczynia elektrodowe 0,01N CH_3COOH i przepuszczając prąd o napięciu 175V przez 3—4 godz. Po takim zrównoważeniu kwas octowy w żelu jest 0,9N. Właściwa elektroforeza prowadzona również w 0,01N CH_3COOH trwała 4—5 godz. przy natężeniu 50—



Rys. 4. Elektroforeza histonów grasicy cielęcej w żelu poliakrylamidowym przy pH 2,4 wg Johnsa (52).

(1) Pełny histon (20 μg); (2) F1 (8 μg); (3) F2a1 (8 μg); (4) F2a2 (8 μg); (5) F2b (8 μg); (6) F3 (8 μg); (7) rybosomalne białko wątroby szczura (100 μg). Wędrowka od + do -.

55mA na rurkę (rysunek 4). Całkowity histon z grasicy cielęcej dzieli się w tych warunkach tak, że najbardziej ruchliwa jest frakcja F2a1, po niej wędruje frakcja F2a2, trzeci prążek odpowiada frakcjom F2 i F2b, a najbliższej startu znajduje się frakcja F1. Ruchliwość elektroforetyczną porównywano posługując się jako wzorcem albuminą surowicy.

Johns (52) podał też metodę ilościowego oznaczania białka w prążkach elektroforetycznych. Według tej metody prążek wycięty z żelu oziębionego w mieszaninie stały CO₂-etanol, rozgniatą się w probówce z DMSO i po 2 godz. ogrzewaniu w 50° wiruje się a klarowny supernatant oznacza się spektrofotometrycznie przy 600 nm. Johns podawał wyniki w odsetkach w stosunku do sumy intensywności barwy wszystkich prążków w danym żelu. Bezwzględna ilość białka natomiast oznaczał z krzywej wzorcowej uzyskanej na podstawie elektroforetycznego rozdziału standardowych ilości badanej frakcji. Zdaniem Johnsa duża niejednorodność frakcji histonowych jest spowodowana efektami agregacyjnymi i zanieczyszczeniami krzyżowymi. Omówioną wyżej metodę elektroforezy według Johnsa zmodyfikowali następnie Dick i Johns (20) przystosowując ją do badań biosyntezy głównych frakcji histonowych grasicy szczerzej. Przed dodaniem nadsiarczanu sodu doprowadzali oni pH mieszaniny polimeryzacyjnej do 3,0, dzięki czemu uniezależniali się od wahań odczynu handlowych preparatów akrylamidu. Ponadto barwili oni żele czernią alizarynową w 30% etanolu w ciągu 18 godz., a nadmiar barwnika usuwali przez płukanie w 40% etanolu w 60° przez 24 godz. W celu oznaczenia piętna izotopowego białko z wycinków żelu ekstrahowali 6N HCl w 90° przez 3 godz. po czym wyciągi odparowywali i rozpuszczali w wodzie.

Fambrough i Bonner (26) opisali technikę preparatywnej elektroforezy dyskowej w żelu poliakrylamidowym, która zapewniła całkowite odzyskiwanie czystych elektroforetycznie frakcji histonowych chromatyny kielków grochu. W aparacie *Canalco-Prep. Disc* stosowali oni 7,5% żel poliakrylamidowy z 6M mocznikiem i buforem alaninowym o pH 4,3. Rozdział 1—3mg histonu (30—40mA, szybkość elucji 60 ml/godz.) trwał 3—4 godzin. Panyim i Chalkley (82) podali modyfikację elektroforezy w żelu poliakrylamidowym umożliwiającą rozdzielenie frakcji, których ruchliwość różniła się tylko o 1%.

Metoda elektroforezy w żelu poliakrylamidowym zapewnia lepsze poznanie niejednorodności fizykochemicznej białek histonowych; jest to technika dogodna, umożliwiająca szybkie porównanie różnych metod frakcyjnego izolowania histonów, kontrolowanie jednorodności i rodności otrzymanych preparatów oraz wypowiedanie się na temat gatunkowej i tkankowej specyficzności tych białek.

2. Inne metody fizykochemiczne

Ważną rolę w badaniu histonów odegrała analiza zachowania się tych białek w ultrawirówce analitycznej. Technika sedymentacyjna pozwala frakcjonować histony z różnych materiałów a także oznaczać masy cząsteczkowe różnych frakcji (por. poz. 60). W nowszej literaturze brak wprawdzie nowych opracowań metodycznych w tym zakresie ale wielu badaczy bada histony w ultrawirówce analitycznej, posługując się tradycyjnymi metodami.

Sz szczególnie interesujących danych o konformacji cząsteczek histonów dostarczają badania optycznej rotacyjnej dyspersji i lepkości tych białek, a także analiza spektrofotometryczna. Jirgensons i wsp. (49) zaobserwowali, że lepkość frakcji lizynowej i prolinowej jest większa niż innych typów histonów a lepkość wodnych roztworów frakcji lizynowej znacznie silniej maleje pod wpływem jonów PO_4^{3-} i SO_4^{2-} niż jednowartościowych anionów np. Cl^- i CH_3COO^- . Wszystkie frakcje zachowują się jak gibkie, liniowe polielektrolity.

Jirgensons (48) zajmował się także pomiarami optycznej rotacyjnej dyspersji w zakresie fal 190—240nm i obserwował bardzo wyraźne zmiany konformacyjne białek histonowych, szczególnie bogatych w lizynę, pod wpływem alkoholu n-propylowego i detergentów, objawiające się silnymi przesunięciami w widmach dyspersyjnych. Winkelman (117) porównywał konformację całkowitego histonu i jego frakcji analizując te białka spektrofotometrycznie, po traktowaniu ich purpurą Biebricha, oraz spektrofluorymetrycznie, po zadziałaniu czterofenyloporfinosiarczanem. Brak widocznych różnic w obu widmach skłonił go do wniosku o równoważności pewnych cech struktury II- i III-rzędowej tych preparatów.

Również metoda spektroskopii w podczerwieni została zaadaptowana do charakteryzowania frakcji histonowych (75) a Blazsek (5) zastosował technikę polarograficzną do wykrywania zanieczyszczeń frakcji lizynowych i umiarkowanie lizynowych białkiem niehistonowym lub histonami zawierającymi grupy sulfhydrylowe. Ta ostatnia metoda ma duże szanse jako sposób oceny czystości preparatów histonowych.

VII. Specyficzność histonów

Przy wyjaśnianiu zagadnień związanych z rolą histonów w genetycznej i metabolicznej funkcji jądra komórkowego na czołowe miejsce wysuwa się sprawa gatunkowej i tkankowej specyficzności histonów. Konsekwencją pierwotnych hipotez, przypisujących wyłącznie histonom funkcję bezpośrednich represorów genowych był pogląd, że stopień różnico-

wania komórkowego jest zależny od specyficzności frakcji histonowych. Poszukiwania doświadczalnych dowodów nie dały jednak jednoznacznej odpowiedzi. Prace Butlera, Johnsa, Lawrence'a, Simpson, Vendrely'ego Lindsay'a oraz Cohna i Quatrano (por. poz. 60) wykazują na bardzo różnorodnym materiale zwierzęcym i roślinnym, że histony tego samego typu komórek nie zmieniają się w zależności od gatunku i że brak jest także różnic między histonami różnych tkanek tego samego gatunku. Wielu jednak uczonych w oparciu o równie szeroki materiał badawczy przytaczało wiarygodne dowody na istnienie specyficzności gatunkowej i tkankowej histonów. Należy tu wymienić prace Stedmanów, Neelina i Butlera, Buscha, Bellaira i Mauritzena, Neidle'a i Waelscha, Klyszejko, Kobayashi, Hirschbein i Iwai (por. poz. 60).

Obecnie jest rzeczą niewątpliwą, że w kierowaniu aktywnością genetyczną zasadniczą rolę odgrywają bardziej złożone, dynamiczne systemy, w których histony są tylko jednym ze składników a ich niejednorodność nie musi warunkować zmienności komórkowej. Jednak specyficzność histonów nie jest traktowana jako zagadnienie uboczne. Rozwój metod preparatywnego otrzymywania homogennych frakcji histonowych oraz coraz udatniejsze próby poznania struktury pierwszorzędowej tych białek pozwalają uchwycić bardziej subtelne lecz ważne różnice między poszczególnymi cząsteczkami.

We współczesnych badaniach nad specyficznością histonów można wyróżnić kilka kierunków. Jedne badania dążą do uchwycenia różnic między histonami tkanek somatycznych a histonami tkanek embrionalnych czy szybko dzielących się, drugie skupiają się na analizie histonów tkanek skrajnie wyspecjalizowanych np. z trwale zablokowanym układem syntezy RNA i replikacji DNA, jeszcze inne są badaniami porównawczymi histonów z różnych tkanek różnych gatunków zwierząt i roślin, uwzględniającymi stany fizjologiczne organizmu oraz wpływ czynników zewnętrznych.

Najchętniej badanym modelem są histony dojrzałych erytrocytów kurczęcia, komórek o prostej budowie cytoplazmy i mało skondensowanym jądrze, w których nie odbywa się proces odnowy DNA ani synteza RNA, a powstaje zasadniczo tylko jeden rodzaj białka — hemoglobina. Prace na tym materiale zapoczątkowali Stedmanowie w 1950 roku a kontynuowali między innymi Neelin i wsp., Bellair i Mauritzen oraz Hnilica (por. poz. 60), znajdując różnice w obrazie chromatograficznym, elektroforetycznym i składzie aminokwasowym histonów erytrocytów w porównaniu z histonami grasicy cielęcej, uważanymi za wzorcowe. Z najnowszych badań na tym materiale wymienić należy pracę Bellaira i Mauritzena (3), którzy izolowali β histony z erytrocytów, a także z wątroby i śledziony kurczęcia oraz grasicy wołowej. Frakcjonowanie na żelu *Sephadex G-100* i *G-200* wykazało ilościowe

różnice dla różnych tkanek, choć skład aminokwasowy głównych komponent (β_5 — β_7) był zbliżony.

Bardzo ciekawe wyniki osiągnęli Murray i wsp. (73) w preparatyce szeregu histonów erytrocytów kurzczenia na dużą i małą skalę metodą selektywnej stopniowej ekstrakcji roztworami o coraz niższych wartościach *pH*. Roztwory o *pH* 1,8—2,1 ekstrahowały homogenną frakcję (V) bogatą w serynę, która na podstawie chromatografii na *Amberlite CG-50* i składu aminokwasowego została zidentyfikowana z tzw. frakcją 5 Neelina (76), a na drodze elektroforezy w żelu skrobiowym z tzw. strefą 15 Purkayasthy'ego i Neelina (90), tj. z komponentami typowymi dla histonów erytrocytów kurzczenia. Murray i wsp. (73) dowiedli także, iż wbrew opiniom innych (76, 90) histony argininowe (frakcje III i IV z chromatografii na *Amberlite IRC-50*) występują w całkowitym histonie z erytrocytów kurzczenia. Frakcje te trudno poddają się ekstrakcji i można je wyodrębnić dopiero roztworami o *pH* < 1,0. Zbliżone wyniki i wnioski ogłosili też inni badacze (77, 115). Neelin (77) wykazał istnienie typowej dla erytrocytów kurzczenia elektroforetycznej strefy 15 także w histonach z erytrocytów innych gatunków ptaków (gołąb, mewa, kaczka, indyk, gęś) przy braku jej w innych tkankach (śledziona, szpik) tych zwierząt. Frakcja ta występowała zarówno w retikulocytach jak w dojrzałych czerwonych krwinkach, niezależnie od stanu odżywienia, płci, wieku i temperatury w warunkach hodowlanych. Zaobserwował on jedynie pewne ilościowe różnice w zawartości tej frakcji u różnych gatunków ptaków. Neelin (77) potwierdził ponadto występowanie w erytrocytach ptasich histonów argininowych, a także udowodnił, że tzw. strefa „f” (ang. *fast*), o bardzo dużej ruchliwości w żelu, a typowa dla histonu całkowitego ze szpiku ptaków, odpowiada zasadowemu materiałowi peptydowemu z granulocytów kwasochłonnych, które ulegają cytolizie podczas preparatyki. Vidali i Neelin (115) sugerują, że różnice dotyczące histonów argininowych z erytrocytów ptasich oraz z innych tkanek różnych gatunków zwierząt mogą być spowodowane nieuwzględnianiem w metodach izolowania tkankowej specyficzności związania poszczególnych histonów w materiale jądrowym.

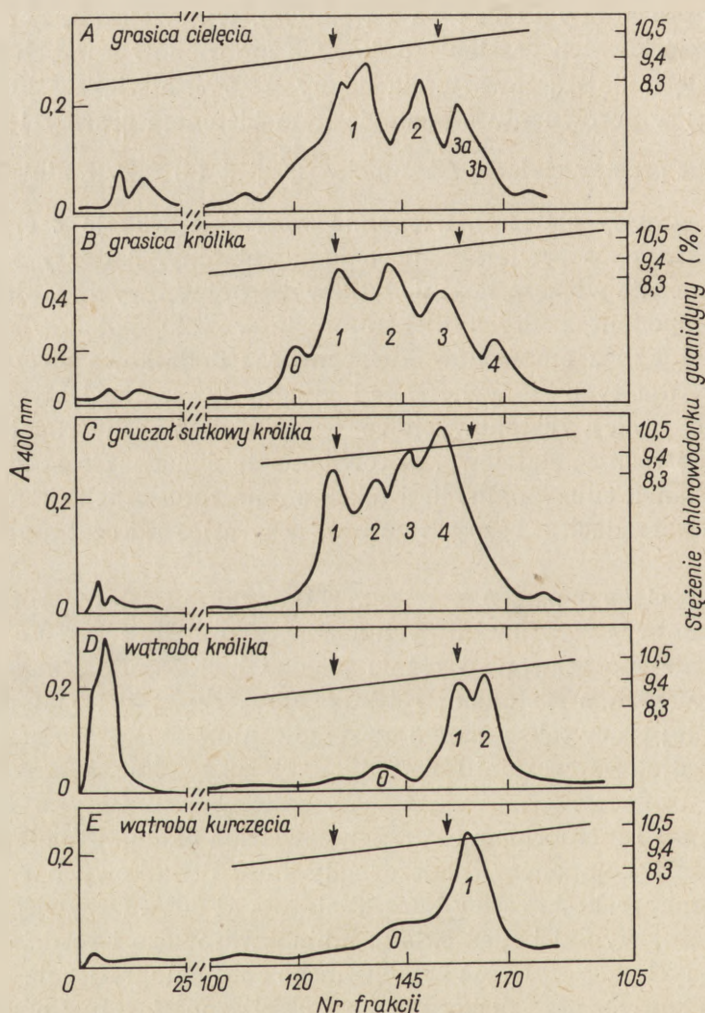
Ciekawe rozszerzenie tych badań na jądrzaste erytrocyty zwierząt innych gromad przyniosła praca Edwardsa i Hnilicy (24), którzy na drodze filtracji na żelu *Spehadex G-75* wyodrębnili frakcję F2c (inne oznaczenie frakcji V czy strefy 15, wprowadzone przez Hnilicę) także z erytrocytów płaza (*Rana catesbeiana*) i ryby (*Caranax hippos*). Różniły się one składem aminokwasowym, posiadały jednak typową wysoką zawartość seryny (ok. 12%), lizynę jako C-końcowy aminokwas, a jako reszty N-końcowe (najczęściej acetylowane) — treoninę oraz w małych ilościach inne aminokwasy. Autorzy ci nie znaleźli frakcji F2c w histonach z innych tkanek zwierząt badanych, co zgodne jest z obserwacjami Palau'a i Butlera (84), dotyczącymi histonów wątroby pstrąga.

Można oczekiwać interesujących wyników badań dotyczących zmian w histonach podczas embriogenezy. Jednak Kischer i Hnilica (59) podali, że rozdziały elektroforetyczne w żelu skrobiowym histonów mózgu i skóry 7-, 10- i 14-dniowych embrionów kurzych były bardzo zbliżone do histonów grasicy cielęcej. Jedyne różnicami była niższa zawartość lizyny a zwiększona ilość aminokwasów dwukarboksylowych histonów tkanek embrionalnych w porównaniu z histonem grasicy oraz pewne wzrastanie sumy aminokwasów zasadowych w histonach skóry w miarę postępowania procesu różnicowania. Dużo bogatszy materiał przyniosła praca Myulberga i wsp. (74). Wykazali oni, że frakcja F1 z jąder komórkowych grasicy 5-dniowych ambrionów kurzych charakteryzowała się mniejszą zawartością lizyny (28,5%) a większą ilością argininy (8,4%) w porównaniu z analogicznym histonem grasicy 1-dniowych kurcząt oraz grasicy cielęcej (stosunek $\frac{\text{Liz}}{\text{Arg}}$ jest 1,8 razy mniejszy niż dla frakcji F1 grasicy cielęcej), a ogólnie wszystkie frakcje z erytrocytów embrionu kurczęcia zawierały nieco mniej alaniny. Autorzy zaobserwowali też znacznie większą ilość dodatkowych (minorowych) wolno wędrujących komponent podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym frakcji F1 i F2b z embrionów kurzych oraz dodatkowe strefy o dużej ruchliwości dla tych samych frakcji grasicy kurcząt. Elektroferogramy pozostałych frakcji histonowych ze wszystkich trzech źródeł wykazywały istotne różnice ilościowe. Porównania te świadczą o specyficzności histonów tkanek embrionalnych a także o odmienności ich składu w analogicznych narządach u różnych gatunków (grasica kurcząt a grasica cieląt).

Ostatnio Champagne i wsp. (11) wykazali istotne różnice między histonami erytrocytów kurzych a grasiczymi. Dick i Johns (22) natomiast nie zaobserwowali różnic między histonami normalnych erytrocytów kurzych a histonami retikulocytów. Specyfikę materiału podkreślały w tej pracy także dane o występowaniu podczas procesu ekstrakcyjnego według II wariantu metody Johnsa (50) znacznych różnic w stopniu zanieczyszczeń krzyżowych między izolowanymi frakcjami. I tak frakcja F1 z embrionów kurzych zawierała około 15% obcych chromatograficznie komponent, podczas gdy ilość dodatkowych składników w analogicznej frakcji grasicy kurcząt sięgała aż 50%. Oczywiście przytoczone powyżej wyniki badań składu aminokwasowego i rozdziałów elektroforetycznych dotyczyły już homogennego chromatograficznie materiału.

Z wielu innych prac dowodzących specyficzności gatunkowej i tkankowej histonów wymienić należy badania Kłyszewko-Stefanowicz z 1968 roku (61, 62) wskazujące na różnice w składzie aminokwasowym głównych frakcji histonowych z trzustki wołu i szczurów w porównaniu z histonem grasicy cielęcej (m.in. duża zawartość lizyny we frakcji F1).

Interesującym wydaje się fakt, że wielu badaczy zaobserwowało największe różnice w obrębie frakcji silnie lizynowej, najbardziej labilnej pod względem związania w nukleohistonie i posiadającej największe zdolności blokowania aktywności polimerazy RNA zależnej od DNA. Bustin i Cole (8) wykazali różnice pomiędzy frakcjami ekstrahowanymi 5% TCA (7) z grasicy, gruczołów mlecznych i wątroby królika oraz z wątroby kurczęcia i grasicy cielęcej. Różnice te dotyczyły ilości szczytów otrzymywanych w rozdziale tej frakcji na Amberlite IRC-50 według



Rys. 5. Chromatografia na kolumnie z Amberlite IRC-50 silnie lizynowych histonów z różnych tkanek (8).

A, 80 mg grasicy cielęcej; B, 80 mg grasicy królika; C, 80 mg gruczołów sutkowych królika; D, 22 mg wątroby kurczęcia; E, 26 mg wątroby królika. Ekstrakt wątroby kurczęcia był chromatografowany na kolumnie 15×2,3 cm; wszystkie inne na kolumnie 30×2,3 cm. Strzałki wykazują stężenie chlorowodoru guanidyny 9,4 i 9,9%. Szczyty numerowane dla grasicy cielęcej odpowiadają frakcjom I, II, IIIa i IIIb otrzymanym według Kinka d'e'a i Col'e'a (57).

Kin kade' a i Cole' a (57) (np. pięć szczytów dla histonu F1 z grasicy królika a 3 szczyty w histonie F1 z grasicy cielęcej) oraz ilościowego rozmieszczenia białka w obrębie tych szczytów (gruczoły mleczne a grasicy królika) (rysunek 5).

Również analiza składu aminokwasowego i obraz elektroforezy w żelu poliakrylamidowym dowodzą typowości gatunkowej i narządowej histonu lizynowego. Do podobnych wniosków doszli Stellwagen i Cole na podstawie porównania frakcji F1 a także histonów argininowych oraz histonów umiarkowanie lizynowych z gruczołów mlecznych oraz grasicy królika i szczura (107). Zwracają oni jednak uwagę na łatwość pomylenia faktycznych różnic związanych ze specyficznością histonów z efektami spowodowanymi różną podatnością frakcji histonowych, szczególnie argininowych, na zabiegi wyodrębniania ich z tkanki w zależności od badanego materiału (zanieczyszczenia krzyżowe, ekstrahowanie łącznie z histonami także białek niehistonowych). Stellwagen i Cole (107) zaobserwowali także wpływ aktualnej funkcji danego narządu na skład frakcji histonowych. Stwierdzili oni różnice w charakterze rozdziału na *Amberlite IRC-50* frakcji lizynowej z gruczołów mlecznych królika pochodzących z samic ciężarnych, samic z zanikowym procesem laktacji oraz samic nieciążarnych.

Interesujące są wyniki doświadczeń Sidorovej (101) porównującej histony F1 z wątroby i śledziony królików prawidłowych i immunizowanych globuliną końską. Efekt wzmożonej pod wpływem antygeny syntezy białka i zwiększona szybkość mitoz komórek limfoidalnych objawiają się zmianami jakościowymi i ilościowymi w rozdziale elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym.

Berlowitz i Birnstiel (4) porównywali histony z *Xenopus laevis* typu dzikiego i mutanta bezjąderekowego z histonami grasicy cielęcej. Różnice były bardzo wyraźne: typ dziki *X. laevis* nie posiadał frakcji F2b i F2a, a u mutantu brak było frakcji F1, histon F2b występował w znikomych ilościach a zawartość F2a była mocno zmniejszona, co prowadziło do zdecydowanej przewagi frakcji argininowej.

O zwiększonej zawartości argininy i aminokwasów kwaśnych a zmniejszonej ilości lizyny we frakcjach F1 i F2b z wątrobo-trzustki mięczaka *Mytilus edulis* w porównaniu z histonami grasicy cielęcej donieśli C o z c o l l n e l a i S u b i r a n a (14).

Gorovsky i Woodard (38) donieśli, że w histonach z mikrojąder i makrojąder *Tetrahymena pyriformis* metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym stwierdza się poza frakcjami wspólnymi dla obu również i komponenty typowe tylko dla danej struktury. Różnice te wpływają zapewne z braku syntezy RNA i z heterochromatyzacji obserwowanych w mikrojądrach.

Wiele prac poświęcono też histonom z tkanek roślinnych. Yoichi i Hirai (118) stwierdzili metodą elektroforezy na octanie celulozy, że

histon z liści tytoniu zawiera dużo mniej frakcji argininowych niż histony zwierzęce. Zampetti-Bosseler (120) stosując rozdziały elektroforetyczne w poliakrylamidzie zaobserwowała mniejszą niejednorodność histonów z korzeni cebuli w porównaniu z histonami zwierzęcymi, mniejszą zawartość lizyny w porównaniu z innymi histonami roślinnymi oraz mniejszą ilość argininy w zestawieniu z histonem grasicy cielęcej. Dick (19) doniosła, że histony z *Vicia faba* otrzymane metodą stopniowej ekstrakcji przy coraz niższych wartościach pH według Murraya (71) były podobne do frakcji uzyskiwanych z grasicy cielęcej, choć zawartość argininy nie przekraczała w nich 9%, co nie pozwoliło na określenie żadnej frakcji mianem histonu argininowego. Zaobserwowała ona również występowanie we frakcji ekstrahującej się przy pH 1,4 niezidentyfikowanego aminokwasu nie będącego metylową pochodną lizyny.

Bardzo ciekawych danych dostarczyły wspomniane już badania Gofshaina (34, 35). Stosując strącanie acetonem wyodrębnił on 2 frakcje, A i B, w histonach całkowitych ze spoczynkowych zarodków pszenicy i z 2-godzinnych kielków pszenicy. Okazało się, że frakcja A z zarodków odpowiadała histonowi F1, a frakcja B — histonowi F2a, choć zaznaczały się różnice w zawartości szeregu aminokwasów w porównaniu z analogicznymi frakcjami grasicy cieląt. Natomiast frakcje A i B z kielków odpowiadały histonom F2a i F3. Podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym stwierdzono wyraźne różnice głównie ilościowe między całkowitymi histonami a także frakcjami A i B z zarodków i kielków. Porównano też włączanie ^{14}C -lizyny u 22- i 28-godzinnych izolowanych kielków pszenicy i stwierdzono, że u pierwszych piętno grupowało się głównie w strefach odpowiadających histonom lizynowym, podczas gdy u drugich, stanowiących model tkanki o zahamowanych procesach wzrostu i syntezy biochemicznej, znakowały się głównie histony argininowe. Autor wysuwa też hipotezę, że elektroforetyczna frakcja 5 jest tą, której pojawienie łączy się z aktywnością procesów wzrostu przy kiełkowaniu.

Różny stopień niejednorodności histonów roślinnych potwierdzili Fambrough i Bonner (26) badając te białka z pączków grochu metodą preparatywnej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Autorzy ci porównali następnie (27) argininowe histony (frakcja III i IV) pączków grochu i grasicy cielęcej. Homogenne frakcje z obu materiałów wykazywały duże podobieństwo elektroforetyczne. Wykryto jednak różnice w manie zawierała też ϵ -N-metylolizyny a frakcja III posiadała 1 resztę cysteiny na cząsteczkę białka, wobec dwóch takich reszt we frakcji III histonu pach peptydowych tych histonów (3 różne peptydy na 29 we frakcji III i 5 różnych peptydów na 32 we frakcji IV). Frakcja IV z pączków grochu grasicy. To sprawiło, że histon grasicy wykazywał większe tendencje do agregacji dając trimery i tetramery, podczas gdy ta frakcja z grochu tworzyć mogła jedynie dimery.

W ostatnich czasach pojawiły się też prace mówiące o braku specyficzności histonów. Między innymi C o m i n g s (13) nie stwierdził różnic między histonami limfocytów prawidłowych i stymulowanych fitohemaglutyniną. Nie obserwował on też różnic między histonami z komórek inter- i metafazowych. A s z m a r i n i w s p. (1) wyizolowali z mózgu byka 4 zasadnicze frakcje histonowe, które nie różniły się składem aminokwasowym od odpowiednich frakcji z grasicy. C h a n d a i w s p. (12) nie stwierdzili różnic związanych z dojrzewaniem mózgu. C h a l k l e y i P a n y i m (10) otrzymali identyczny obraz elektroforetyczny dla histonów z różnych tkanek cielęcia. M a c G u i l l i v r a y (64) badając pięć tkanek ludzkich o zróżnicowanej aktywności biologicznej (grasica, wątroba, łożysko, leukocyty obwodowe i rak oskrzelowy) nie znalazł różnic w składzie aminokwasowym, w grupach N-końcowych i obrazach elektroforetycznych między tymi tkankami ani też przy porównaniu ich z histonem grasicy cielęcej. Stwierdził także, że przedwczesne i błędne były jego poprzednie wnioski, iż granulocyty zawierają jakąś specyficzną frakcję histonową. Wreszcie D i c k i J o h n s (20) wskazali na brak różnic między frakcjami histonowymi grasicy szczurów i cieląt.

Wydaje się, że bardzo wiele w rozwiązywaniu problemów specyficzności wnieść mogą metody immunologiczne i biofizyczne. Prace immunoelektroforetyczne i immunoelektrofluorescencyjne R ü m k e' e g o i S l u y s e r a (94) wykazały antygenność histonów wątroby szczura i dowiodły specyficzności antygenowej poszczególnych frakcji liczbowych. F u k u z a w a i S h i m u r a (29) kontynuując swoje prace sprzed dwóch lat porównywali histony całkowite z tylnego i środkowego gruczołu przedniego larwy jedwabnika *Bombyx mori* L. oraz grasicy cieląt. Krzyżowe badania każdego z tych histonów, jako antygenów z różnymi surowicami zawierającymi odpowiednie przeciwciała przeciwko tym histonom, prowadzone metodami precypitacji, immunoelektroforezy oraz testów dyfuzyjnych, wykazały niezbicie, że histony grasicy są różne od histonów gruczołów przednich larwy jedwabnika. Zaznaczyła się także wyraźna specyficzność narządowa pozwalająca odróżnić histon ze środkowego gruczołu przedniego od histonu gruczołu tylnego (odpowiada to być może temu, że tylny gruczoł produkuje fibroinę, a środkowy — serycyne).

N a b i e r u c h i n i w s p. (75) metodą różnicowej spektrofotometrii w podczerwieni wykazali różnice w widmach frakcji histonowych z grasicy cieląt, wątroby szczurów i bydła rogatego, komórek raka Ehrlicha oraz erytrocytów gołębia.

Pojawienie się nowych hipotez, próbujących wyjaśnić mechanizm regulowania aktywności genetycznej materiału jądrowego na drodze zmian konformacyjnych histonów, wywołanych przez różne czynniki fosforylujące, acetylujące, metylujące czy utleniające sprawiło, że badacze zaczęli porównywać frakcje histonowe również pod tym względem (68, 70, 79, 80, 102, 110).

LITERATURA

1. Aszmarin I. P., Sadikova N. V., Djurnbaum V. J., Stiepanova J. S., *Ukr. Biochim. Zurn.* **39**, 593 (1967).
2. Bauer K., Beheim P., *Z. Krebsforsch.* **69**, 230 (1967).
3. Bellair J. T., Mauritzen C. M., *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 263 (1967).
4. Berlowitz L., Birnstiel M. L., *Science* **156**, 78 (1967).
5. Blazsek V. A., *Anal. Biochem.* **18**, 572 (1967).
6. Bukrinskaja A. G., Burduczeva O., Gitelman A. K., *Wopr. Med. Chim.* **13**, 355 (1967).
7. Bustin M. M., Cole R. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 457 (1968).
8. Bustin M. M., Cole R. D., *J. Biol. Chem.* **243**, 4500 (1968).
9. Butler J. A. V., Power D. F., Palau J., *Biochem. J.* **102**, 539 (1967).
10. Chalkley R., Panyim S., *Federation Proc.* **28**, 3260 (1969).
11. Champagne M., Mazen A., Xavier W., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 1261 (1969).
12. Chanda S. K., Davis J. M., Himwich W. A., Sargeant S. M., *Federation Proc.* **28**, 272 (1969).
13. Comings D. E., *J. Cell Biol.* **35**, 699 (1967).
14. Cozcollnela C., Subirana J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 242 (1968).
15. Debabov V. G., Rebentish B. A., *Biochimija* **31**, 943 (1966).
16. De Lange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **243**, 5906 (1968).
17. De Lange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **244**, 319 (1969).
18. Desai L., Ogawa Y., Mauritzen C. M., Taylor C. W., Starbuck W. C., *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 146 (1969).
19. Dick C., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 431 (1968).
20. Dick C., Johns E. W., *Biochim. Biophys. Acta* **174**, 380 (1968).
21. Dick C., Johns E. W., *Exptl. Cell Res.* **51**, 626 (1968).
22. Dick C., Johns E. W., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 414 (1969).
23. Dounce A. L., Ickowicz R., *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 210 (1969).
24. Edwards L. J., Hnilica L. S., *Experientia* **24**, 228 (1968).
25. Fambrough D. M., Bonner J., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 601 (1968).
26. Fambrough D. M., Bonner J., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 113 (1968).
27. Fambrough D. M., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **243**, 4434 (1968).
28. Faulhaber I., Bernardi G., *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 561 (1967).
29. Fukuzawa C., Shimura K., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 618 (1968).
30. Furlan M., Jericijo M., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 135 (1967).
31. Furlan M., Jericijo M., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 145 (1967).
32. Georgev G. P., Ilin J. V., Tichonienko A. S., Dobbert N. N., Ananieva L. N., *Mol. Biol.* **1**, 815 (1967).
33. Gershey E. L., Vidali G., Allfrey V. G., *J. Biol. Chem.* **243**, 5018 (1968).
34. Gofshtein L. V., *Biochimija* **32**, 959 (1967).
35. Gofshtein L. V., *Biochimija* **33**, 823 (1968).
36. Gofshtein L. V., Sidorov V. J., *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **167**, 121 (1966).
37. Gorovsky M. A., Woodard J., *J. Cell. Biol.* **33**, 723 (1967).
38. Gorovsky M. A., Woodard J., *J. Cell. Biol.* **39**, 54a (1968).
39. Gurley L. R., Hardin J. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 285 (1968).
40. Gurley L. R., Shepherd G. R., *Anal. Biochem.* **14**, 364 (1966).
41. Hancock R., *J. Mol. Biol.* **40**, 457 (1969).

42. Harbers E., Spaar U., *Naturwissenschaften* **53**, 477 (1966).
43. Hempel K., Lange H. W., *Naturwissenschaften* **55**, 37 (1968).
44. Hempel K., Lange H. W., Birkofer L., *Z. Physiol. Chem.* **349**, 603 (1968).
45. Hnilica L. S., Edwards L. J., Illey A. E., *Biochim. Biophys. Acta* **124**, 109 (1966).
46. Iwai K., Ishikawa K., Hayashi H., w *Histones and Gene Function The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969*, str. 11.
47. Iwai K., Senshu T., w *Histones and Gene Function The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969* r. str. 1.
48. Jirgensons B., *J. Biol. Chem.* **242**, 912 (1967).
49. Jirgensons B., Hnilica L. S., Capatillo S. C., *Makromol. Chem.* **97**, 216 (1966).
50. Johns E. W., *Biochem. J.* **92**, 55 (1964).
51. Johns E. W., w *The Nucleus — Metabolism and Radiosensitivity 1966*, str. 115.
52. Johns E. W., *Biochem. J.* **104**, 78 (1967).
53. Johns E. W., *Biochem. J.* **105**, 611 (1967).
54. Johns E. W., *Eur. J. Biochem.* **4**, 437 (1968).
55. Johns E. W., *J. Chromatog.* **34**, 429 (1968).
56. Johns E. W., Phillips D. M. P., Simson P., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **77**, 631 (1960).
57. Kinkade J. M. Jr., Cole R. D., *J. Biol. Chem.* **241**, 5790 (1966).
58. Kinkade J. M. Jr., Cole R. D., *J. Biol. Chem.* **241**, 5798 (1966).
59. Kischer C. W., Hnilica L. S., *Exptl. Cell Res.* **48**, 424 (1967).
60. Klyszejko L., *Histony PWN Warszawa 1967*.
61. Klyszejko-Stefanowicz L., Khouvine Y., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 1245 (1968).
62. Klyszejko-Stefanowicz L., Khouvine Y., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **D266**, 1073 (1968).
63. Koki Y., Michiteru Y., Shimura K., *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 129 (1968).
64. Mac Guillivray A. J., *Biochem. J.* **110**, 181 (1968).
65. Macpherson A., Murray K., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 574 (1965).
66. Martinov E. V., Spitkovsky D., *Radiobiologija* **7**, 315 (1967).
67. Martinov E. V., Spitkovsky D., *Radiobiologija* **7**, 455 (1967).
68. Masahiko K., Tagashira Y., Nagata C., *J. Biochem.* **64**, 81 (1968).
69. Mauritzen C. M., Starbuck C. W., Saroja I. S., Taylor C. W., Busch H., *J. Biol. Chem.* **242**, 2240 (1967).
70. Meisler M. H., Mc Cluer R. H., *Science* **154**, 896 (1966).
71. Murray K., *J. Mol. Biol.* **15**, 409 (1966).
72. Murray K., *J. Mol. Biol.* **39**, 125 (1969).
73. Murray K., Vidali G., Neelin J. M., *Biochem. J.* **107**, 207 (1968).
74. Myulberg A. A., Djurnbaum V. J., Rosenfeld O. K., Szarygin A. A., Aszmarin I. P., *Biochimija* **33**, 774 (1968).
75. Nabieruchin J. I., Lavrinenko I. A., Komarova M. L., Tomson V. P., *Biofizika* **12**, 968 (1967).
76. Neelin J. M., w *The Nucleohistones*, red. Bonner J. i Tso P., San Francisco 1964.
77. Neelin J. M., *Can. J. Biochem.* **43**, 241 (1968).
78. Nohara H., Takahasi T., Ogata K., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 529 (1968).
79. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **102**, 631 (1967).
80. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **107**, 403 (1968).
81. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **112**, 81 (1969).

82. Panyim S., Chalkley R., *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337 (1969).
83. Panyim S., Jensen R. H., Chalkley R., *Excerpta Medica Biochem.* **22**, 65 (1969).
84. Palau J., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **100**, 779 (1966).
85. Palau J., Pardon J. F., Richards B. M., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 633 (1967).
86. Phillips D. M. P., *Progr. Biophys. Chem.* **12**, 211 (1962).
87. Phillips D. M. P., *Biochem. J.* **107**, 135 (1968).
88. Phillips D. M. P., Johns E. W., *Biochem. J.* **94**, 127 (1965).
89. Phillips D. M. P., Simpson P., *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 154 (1969).
90. Purkayasthy R., Neelin J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 468 (1966).
91. Quagliariotti G., Ogawa Y., Taylor C. W., Sautiere P., Jordan J., Starbuck W. C., Busch H., *J. Biol. Chem.* **244**, 796 (1969).
92. Raaf J., Bonner J., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 567 (1968).
93. Rebentish B. A., Debabov V. G., *Biochimija* **32**, 169 (1967).
94. Rümke P., Slyuser M., *Biochem. J.* **101**, 1C (1966).
95. Satake K., Rasmussen P. S., Luck J. M., *J. Biol. Chem.* **235**, 2801 (1960).
96. Sautiere P., Dautrevaux M., Biserte G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 821 (1965).
97. Sautiere P., Dautrevaux M., Biserte G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**, 253 (1966).
98. Sautiere P., Starbuck W. C., Roth C., Busch H., *J. Biol. Chem.* **243**, 5899 (1968).
99. Sekiguchi T., Sekiguchi F., Matsudaira H., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 693 (1967).
100. Shepherd G. R., Gurley L. R., *Anal. Biochem.* **14**, 356 (1966).
101. Sidorova E. V., *Biochimija* **33**, 1197 (1968).
102. Slyser M., *J. Mol. Biol.* **22**, 411 (1966).
103. Spelsberg T. C., Sarkissian I. V., *Phytochemistry* **7**, 2083 (1968).
104. Starbuck W. C., Mauritzen C. M., Taylor C. W., Saroja I. S., Busch H., *J. Biol. Chem.* **234**, 2038 (1968).
105. Starbuck W. C., Ogawa Y., Quagliariotti G., Taylor C. W., Jordan J., Busch H., *Federation Proc.* **28**, 662 (1969).
106. Stellwagen R. H., Cole R. D., *J. Biol. Chem.* **243**, 4452 (1968).
107. Stellwagen R. H., Cole R. D., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4456 (1968).
108. Stellwagen R. H., Reid B. R., Cole R. D., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 581 (1968).
109. Stumm C., vant Went J. L., *Experientia* **24**, 1112 (1968).
110. Sunaga K., Koide S. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 342 (1967).
111. Tidwell T., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *J. Biol. Chem.* **243**, 707 (1968).
112. Vande W., Vande G. F., Davis F. F., *Anal. Biochem.* **12**, 444 (1965).
113. Vaughn J. C., *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 477 (1968).
114. Vaughn J. C., Chaitoff J., Delon R., Garland C., Thomson L., *Exptl. Cell Res.* **54**, 362 (1969).
115. Vidali G., Neelin J. M., *Eur. J. Biochem.* **5**, 330 (1968).
116. Wang T. Y., Johns E. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 176 (1968).
117. Winkelman J., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 577 (1967).
118. Yoichi N., Hirai T., *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* **33**, 187 (1967).
119. Yokotsuka K., Yoshida M., Shimura K., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 595 (1966).
120. Zampetti-Bosseler F., *Bull. Cl. Sci. Acad. Roy. Belg.* **53**, 1189 (1967).

ADDENDUM

Po oddaniu niniejszego artykułu do druku De Lange i wsp. z pracowni Bonnera (*J. Biol. Chem.* **244**, 5669 (1969)) opublikowali kompletną sekwencję 102 aminokwasów IV histonu z kiełków grochu. W porównaniu z analogicznym IV histonem z grasicy cielęcej jedyne różnice dotyczą zamiany w pozycjach 60, 77 i 20 reszt waliny, lizyny i metylowanej lizyny histonu grasicznego na izoleucynę, argininę i lizynę, odpowiednio, w histonie z kiełków grochu. Ponadto ϵ -N-acetylolizyna w IV histonie grasicy występuje w 50% cząsteczek i to tylko w pozycji 16, podczas gdy w odpowiednim białku z kiełków grochu tylko 6% cząsteczek histonowych jest acetylowanych na resztach lizyny w pozycjach 16, 5, 8 lub 12. Być może te niewielkie różnice powodują już odmienność funkcjonalną obu histonów.

Na uwagę zasługują wyniki ilościowej elektroforezy szeregu histonów w żelu poliakrylamidowym, prowadzonej przez Panyima i Chalkley'a (*Biochemistry* **8**, 3972 (1969)) w dwojakich warunkach (0,6×8,5 cm 130 V, 3,5 godz. oraz 0,6×25 cm, 200 V, 16 godz.). Na krótszej drodze autorzy otrzymywali 5 komponentów odpowiadających głównym frakcjom histonowym (F1, F2a1, F2a2, F2b, F3), co pozostaje w zgodzie z ostatnimi pracami Toczko (*Acta Biochim. Pol.* **16**, 365 (1969)) oraz Nelsona i Yunisa (*Exptl. Cell Res.* **57**, 311 (1969)). Ilość komponentów wzrastała do 10—12 w przypadku rozdziału elektroforetycznego na drodze dłuższej przy czym różnice między histonami szeregu tkanek cielęcia (grasica, śledziona, śluzówka jelita i macicy, płuca, mózg, wątroba, nerki) ograniczały się do histonu silnie lizynowego. Tkankowe i gatunkowe różnice między histonami 4 gatunków kręgowców (wątroba i grasica cielęcia oraz chomika, wątroba i erytrocyty kurczęcia oraz żaby) we wspomnianych badaniach Nelsona i Yunisa (1969) dotyczyły frakcji silnie lizynowej (F1) oraz bogatej w serynę (F2c).

Należałoby wymienić również opracowaną przez Johnsa i Diggle'a (*Eur. J. Biochem.* **11**, 495 (1969)) technikę otrzymywania na skalę preparatywną histonu F2c, specyficznego dla erytrocytów jądrzastych.

RECENZJE

Beiträge zur klinischen und biochemischen Pharmacologie, red. Cl. Pfister, VEB Verlag Volk u. Gesundheit, Berlin 1969

Książka stanowi 22 tom Sympozjum Niemieckiego Towarzystwa Medycyny Doświadczalnej. Obejmuje materiały wygłoszone na 9 Zjeździe Farmakologów Niemieckich w Dreźnie w 1967 roku.

Różnorodny zbiór 79 referatów, w przeważającej części autorów niemieckich, zawiera kilka rozważań teoretycznych o funkcji i celach farmakologii klinicznej oraz farmakokinetyki (K. Feller oraz L. Dettli i P. Spring), a także zasługujący na uwagę referat K. J. Nettera „Oksydatywne reakcje odbudowy leków”, dotyczący losów różnych leków w ustroju — głównie zaś reakcji enzymatycznych w wątrobie. W zasadzie leki ulegają tym samym typom reakcji, co substancje pokarmowe, a więc hydroksylacji, sprzęganiu, hydrolizie, redukcji itp., ale różnorodność chemiczna leków bądź ich metabolitów stanowi dla badacza kopalnię tematów, zaś dla klinicysty i co ważniejsze — pacjenta źródło licznych komplikacji wskutek interakcji leków, zaburzeń przemian enzymatycznych itd.

Inny referat zasługujący na wzmiankę, to praca M. Kramera i K. Kolba dotycząca farmakokinetyki radioaktywnych anti-androgenów (Cyproteron i octan Cyproteronu) w badaniach na ludziach. Związki tego typu są podawane w stanach nadprodukcji testosteronu (np. w przypadku nowotworów prostaty). Po podaniu doustnym anti-androgenów stwierdzono szybsze przechodzenie przez wątrobę octanu cyproteronu niż cyproteronu, jednakowe stałe podziału krew—mocz dla obydwu związków oraz podobne szybkości przechodzenia z tkanek do krwi. Interesujący w tej pracy jest fakt posługiwania się komputerem w obliczeniach kinetycznych dla leków.

W konkluzji — książka, stanowiąca zbiór referatów z różnych dziedzin farmakologii klinicznej, biochemicznej czy klasycznej nie będzie interesowała większości biochemików. Dla nielicznych natomiast stanowi przestrożę, iż materiały najciekawszych nawet zjazdów winny być przed opublikowaniem należycie uporządkowane, nie wspominając o rozsądnej tendencji — by obrady lub zjazdy naukowe podporządkować uprzednio tematycznie. Lepiej mniej, lecz dokładniej i głębiej. Mankamentem książki jest również późne jej wydanie — bez mała dwa lata od daty Zjazdu.

J. Wysokowski

KOMUNIKAT NR 2

Komitet Organizacyjny uprzejmie zawiadamia, że termin Zjazdu Przeciwgruźliczego został zmieniony. XVII Polski Zjazd Przeciwgruźliczy odbędzie się w Łodzi, w nowym terminie 3—5 września 1970 roku. Uroczyste otwarcie Zjazdu odbędzie się w dniu 2 września o godz. 17.00. Wstępny program obrad Zjazdu przedstawia się następująco:

3 września — Tematy główne: Przewlekłe zapalenie oskrzeli i rozedma płuc u chorych po przebytej gruźlicy płuc. Przewlekłe nieswoiste choroby płuc w Polsce.

Obrady sekcji Mikrobiologicznej.

4 września — Temat główny: Modyfikacja chemioterapii gruźlicy. Walne Zgromadzenie członków Polskiego Towarzystwa Ftizjopneumonologicznego. Obrady w Sekcji Fizjopatologii Oddychania.

5 września — Temat główny: Postępy w diagnostyce chorób płucnych ze szczególnym uwzględnieniem gruźlicy płuc.

Obrady w sekcji dziecięcej.

Obrady Społecznych Komitetów do Walki z Gruźlicą.

Zamknięcie Zjazdu nastąpi w dniu 5 września o godz. 13.30. Dokładna tematyka obrad w sekcjach oraz nazwiska i adresy kierowników tematów, jak również terminy zgłaszania doniesień podane zostały w poprzednim komunikacie.

Warunkiem uczestnictwa w Zjeździe jest nadesłanie karty zgłoszenia oraz opłaty za uczestnictwo w terminie do dnia 30 kwietnia 1970 roku, na adres Komitetu Organizacyjnego. Opłata za uczestnictwo wynosi:

dla członków Polskiego Towarzystwa Ftizjopneumonologicznego	— 150 zł
dla nienależących do Towarzystwa	— 200 zł
dla osób towarzyszących	— 100 zł

Adres Komitetu Organizacyjnego XVII Polskiego Zjazdu Przeciwgruźliczego: Łódź ul. Okólna 177/9, tel. 594 60, konto: PKO-Łódź 7-9-344.

Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
Lek med. *Barbara Rozental*

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
Doc. dr med. *Wacław Sosnowski*

SPRAWOZDANIA

III Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów Durham (płn. Karolina) U.S.A. 13—18.X.1969 r.

Sympozjum odbyło się w dniach 13—18.X.1969 r. w *Duke Univeristy, Medical Center*, Durham. Organizatorem był Profesor Henry Kamin z Oddziału Biochemii Uniwersytetu Duke oraz Komitet Organizacyjny w osobach: P. Cerletti (Włochy), P. Hemmerich (N.R.F.), V. Massey (U.S.A.), D. B. McCormick (U.S.A.), C. Veeger (Holandia) i K. Yagi (Japonia).

Podobnie jak dwa pierwsze Sympozja, w Amsterdamie (1965 r.) i w Nagoya (1967 r.), Sympozjum w Durham zostało zorganizowane pod protektoratem i z funduszków Międzynarodowej Unii Biochemicznej (*I.U.B.*). Spotkanie miało charakter zamknięty i wzięło w nim udział 60 uczestników zaproszonych przez Organizatorów z następujących krajów: U.S.A. — 41, Japonii — 4, Włoch — 3, Szwecji — 3, Francji — 2, Anglii — 2, N.R.F. — 2, Polski — 1, Holandii — 2.

W czasie Sympozjum wygłoszono 35 referatów po 25 minut każdy. Na dyskusję przeznaczono teoretycznie około 1/3 czasu trwania referatów, praktycznie jednak trwała ona znacznie dłużej. Tematykę Sympozjum stanowiły referaty podzielone na następujące grupy:

- 1) Chemia flawin i rodników flawinowych (8),
- 2) Chemia pojedyncza flawoproteidów (9),
- 3) Reakcje flawin i flawoproteidów z tlenem (5),
- 4) Hydroksylazy (5),
- 5) Żelazoflawoproteidy (4),
- 6) Flawoproteidy mitochondrialne (5).

Autor sprawozdania wygłosił referat pt.: „Izolowanie i niektóre właściwości flawoproteidów zawierających FMN i FAD, biorących udział w utlenianiu zredukowanego NAD w łańcuchu oddechowym”, w którym przedstawił wyniki kilkuletnich badań, prowadzonych pod jego kierunkiem w Zakładzie Enzymatyki Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Materiały sympozjum — referaty i rejestrowana dyskusja — ukażą się drukiem w wydaniu książkowym pod redakcją Profesora H. Kamina.

Z. Kaniuga

VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu

W dniach 18—20 września 1969 roku odbył się we Wrocławiu VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady toczyły się w salach wykładowych Wyższej Szkoły Rolniczej, a otwarcie Zjazdu miało miejsce w auli Politechniki Wrocławskiej. W Zjeździe wzięło udział 550 uczestników, w tym 34 osoby z ZSRR, Węgier, Rumunii i Belgii.

Otwarcia Zjazdu dokonał prof. dr T. Baranowski, który nawiązał do 25-lecia PRL oraz 100-nej rocznicy urodzin Leona Marchlewskiego, znanego biochemika krakowskiego, po czym Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr Z. Zielińska przedstawiła rozwój Towarzystwa w ubiegłym dziesięcioleciu. Następnie zostały wygłoszone dwa wykłady inauguracyjne, pierwszy z nich pt. „Związek między budową a funkcją białek” wygłosił prof. dr T. Baranowski, a drugi pt. „Molekularne podłoże zjawiska odporności” — prof. dr K. Zakrzewski.

Obrazy Zjazdu odbywały się w dwóch Sympozjach oraz w pięciu Sekcjach. Na Sympozjum „Peptydazy i Peptydy” zgłoszono 4 referaty i 37 doniesień. Większość referatów i komunikatów na tym Sympozjum wygłoszono po angielsku. Umożliwiło to ożywioną dyskusję, w której wzięło udział obok uczestników krajowych także wielu gości z zagranicy. Na Sympozjum „Biochemia mięśni” zgłoszono jeden referat i 19 doniesień. Na sekcjach „Enzymy I i II” zgłoszono jeden referat i 64 doniesień. W pozostałych sekcjach ilość zgłoszonych doniesień była następująca: Białka — 48 i jeden referat, Metabolizm — 45, Różne — 29, Kwasy Nukleinowe — 20. Ogółem na Zjazd zgłoszono 7 referatów i 262 doniesień. Liczba referatów i doniesień nadesłanych przez poszczególne ośrodki kształtowała się następująco: Warszawa — 79, Łódź — 38, Wrocław — 36, Lublin — 18, Kraków — 15, Białystok — 12, Poznań — 12, Gdańsk — 11, Katowice — 9, Olsztyn — 3, Szczecin — 3, Bydgoszcz — 2, Toruń — 2 oraz NRD — 12, Węgry — 5, ZSRR — 6, Rumunia — 3, Belgia — 1. Poza tym przedstawiciele firm: *Pharmacia* i *LKB* wygłosili trzy wykłady. Streszczenia doniesień i referatów opublikowano w specjalnym wydaniu i dostarczono uczestnikom przed Zjazdem. Z inicjatywy Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na Zjeździe po raz pierwszy odbył się konkurs na najlepsze prace przedstawione przez młodych pracowników naukowych.

Obok sal obrad czynnych było kilka bufetów. Duże halle przy salach wykładowych umożliwiały spotkania uczestników Zjazdu, nawiązanie kontaktów oraz dyskusje.

Przy Zjeździe zorganizowano wystawę aparatury i odczynników laboratoryjnych. W wystawie wzięły udział firmy krajowe (*POCh, Polfa, Biomed*) oraz zagraniczne (*Pharmacia, LKB* ze Szwecji, *Quickfit* z Anglii).

Większość przybyłych do Wrocławia uczestników Zjazdu została zakwaterowana w Hotelu Studenckim „Dwudziestolatka” znajdującym się w pobliżu miejsca obrad Zjazdu. Uczestnicy korzystali ze stołówek, do której byli przewożeni autokarem z Hotelu oraz z miejsca obrad.

Po zakończeniu obrad zorganizowano dla uczestników trzy wycieczki. Trasa jednej z nich (półtoradniowej) prowadziła przez Jelenią Górę, Śnieżkę, Szklarską Porębę i Swidnicę. Nocleg uczestnicy spędzili w Kotlinie Małego Stawu w pięknie położonym Schronisku „Samotnia”. Trasa drugiej wycieczki (całodniowej) przebiegała przez Ząbkowice, Karlów, szczyt Strzeliniec, Kudowę, Duszniki. Uczestnicy trzeciej wycieczki zwiedzili zabytki historyczne Wrocławia i nowe dzielnice miasta. Wśród uczestników rozprowadzono także bilety do opery, filharmonii i teatrów wrocławskich.

Piękna pogoda w czasie Zjazdu we Wrocławiu przyczyniła się do uprzyjemnienia pobytu gościom, którzy pozostawili bardzo miłe wspomnienia u gospodarzy.

Organizatorzy korzystając ze sposobności pragną podziękować Przewodniczącym poszczególnych sekcji za ich cenny udział w organizacji obrad.

Za Komitet Organizacyjny
J. Kwiatkowska
A. Szewczuk

Sprawozdanie z sympozjum „Peptydazy i Peptydy”, odbytego w czasie VII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu

W obradach sympozjum „Peptydazy i Peptydy” udział brali pracownicy naukowcy zarówno z Polski jak i z NRD, Związku Radzieckiego, Rumunii i Belgii. Szczególnie licznie reprezentowany był ośrodek z Halle/Saale, Instytut Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu im. Marcina Lutera, kierowany przez znanego badacza aminopeptydaz, prof. dr H. Hansona.

W czasie trwania sympozjum wygłoszono cztery 30-minutowe referaty i 29 komunikatów. Pierwszy dzień sympozjum poświęcony był problemowi γ -glutamylotranspeptydazy (GGTP). Ośrodek wrocławski (przede wszystkim doc. dr A. Szewczuk) może się poszczycić bardzo dużymi osiągnięciami w badaniu właściwości tego enzymu i wprowadzaniu go do diagnostyki schorzeń wątroby.

Dr J. Swinnen z Belgii przedstawił wyniki wskazujące na istnienie 3-ch typów reakcji, w których udział bierze GGTP: hydroliza γ -glutamylowych peptydów, tworzenie peptydów γ -glutamylowych typu glu-glu oraz transpeptydacja z tworzeniem γ -glutamylowych połączeń z innymi aminokwasami. Zagadnienie syntezy γ -glutamylotranspeptydazy w bakteriach, w zależności od stosowanych pożywek, omówili doc. A. Szewczuk i M. Mulczyk. Wykazali oni istnienie różnych izoenzymów γ -glutamylotranspeptydazy zależnie od stosowanego podłoża. Dalsze badania nad diagnostyczną przydatnością GGTP przedstawili dr I. Apostolescu z Rumunii oraz dr E. Gorzkowski ze Szczecina.

Bardzo interesujący był drugi dzień sympozjum. Prof. Hanson wraz ze współpracownikami (Halle, NRD) przedstawili referaty i komunikaty omawiające aminopeptydazy soczewki oka i nerek. Omówili oni problem specyficzności i różnorodności typów aminopeptydaz, mechanizm ich działania oraz rolę jonów Mn^{2+} i Zn^{2+} . Potwierdzili oni wyniki innych badaczy, że leucyloaminopeptydazy z soczewki oka i z nerek są enzymami wymagającymi dla swej aktywności obecności dwóch metali: trwale związanego cynku oraz manganu dodawanego do mieszaniny reakcyjnej.

Rozmieszczenie pirolidonylopeptydazy w różnych tkankach zwierzęcych przedstawili doc. A. Szewczuk i J. Kwiatkowska z Wrocławia. Enzym ten jest bardzo interesujący ze względu na możliwość stosowania go do odszczepiania N-końcowych reszt kwasu pirolidonylokarboksylowego z białek.

Badania nad rozszczepianiem hormonów przysadkowych przez peptydazy *in vivo* i *in vitro* przedstawili dr H. J. Hutter z Rostocku, NRD, i dr T. Barth z Pragi, Czechosłowacja. Badacze ci wykazali, że hormony przysadki mogą być rozszczepiane przez różne peptydazy, a stopień hydrolizy uwarunkowany jest strukturą poszczególnych hormonów.

Dr Y. N. Ilyina i L. P. Vaskova z Instytutu Bacha z Moskwy, ZSRR, przedstawiły wyniki badań autolizy chymotrypsyny i wpływu siarczanu dodecyłu na konformację chymotrypsyny.

Peptydazy lisosomów omówili dr A. Kirschke i wsp. z Halle, NRD, oraz dr T. Kurecki i wsp. z Warszawy. Autorzy przedstawili wyniki badań nad typami i specyficznością lisosomalnych peptydaz oraz nad ich działaniem na substraty białkowe.

Stosunkowo dużą ilość komunikatów poświęcono zagadnieniom oczyszczania i badania właściwości peptydaz z bakterii (dr J. Kędzis, dr J. Jakubowska i wsp., dr H. Oberman z Łodzi, dr K. Zielińska i wsp. z Warszawy). Zainteresowanie tymi enzymami wzbudziła możliwość wykorzystania ich jako jednej z cech taksonomicznych mikroorganizmów oraz do badania sekwencji aminokwasów w białkach, a także stosowania ich w przemyśle spożywczym.

Pozostałe komunikaty dotyczyły peptydaz z różnych tkanek oraz mechanizmu rozszczepiania fibrynogenu przez różne peptydazy. Pewna ilość komunikatów poświęcona była metodom stosowanym w chemii peptydów, syntezie i badaniom konformacji peptydów.

W sumie sympozjum było interesujące i pozwoliło zapoznać się z wynikami prac prowadzonych w Kraju i u sąsiadów, w NRD i ZSRR. Poziom reprezentowanych prac był bardzo różny, ale na ogół zadawalający, a niejednokrotnie nawet bardzo wysoki.

J. Lisowski

Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1967—1969

Sprawozdanie Zarządu Głównego na VI Walne Zebranie we Wrocławiu w dniu 19 września 1969 r.

Zgodnie ze Statutem (§ 4) zadaniem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jest popieranie rozwoju biochemii i jej popularyzacja. Dla osiągnięcia swych celów (§ 5) w oparciu o społeczną pracę członków, PTBiochemiczne organizuje zjazdy, sympozja, zebrania naukowe, odczyty, wykłady i konkursy; wydaje i popiera czasopisma naukowe, książki i publikacje z zakresu biochemii; opiniuje o stanie i potrzebach biochemii polskiej i występuje w jej sprawach wobec władz; utrzymuje łączność z pokrewnymi stowarzyszeniami w kraju i za granicą oraz korzysta z subwencji władz i instytucji publicznych na swoje cele i powołuje komisje do wykonywania poszczególnych zadań. Terenem działalności Towarzystwa jest Polska Rzeczypospolita Ludowa (§ 2).

W okresie sprawozdawczym statutowa działalność PTBioch. przedstawia się następująco:

Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z 797 w roku 1967 wzrosła do 865 członków (15.IX.69), zrzeszonych nadal w 11 Oddziałach terenowych. Najlichnieszym Oddziałem Towarzystwa jest Warszawa (275), drugim z kolei Poznań (96), a następnie Wrocław (79), Łódź (76), Kraków (55), Lublin (53), Górny Śląsk (52), Szczecin (50), Gdańsk (48), Białystok (43) i Olsztyn (38), Toruń jest nadal jedynym ośrodkiem akademickim posiadającym katedrę biochemii, w którym dotąd nie ma Oddziału Towarzystwa.

Budżet Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zamykał się po stronie kosztów w roku 1967 kwotą 563 tysięcy złotych, w roku 1968 — kwotą 620 tysięcy złotych, w roku bieżącym zaś planowane koszty sięgają 646 tys. złotych. Wydatki były zawsze równoważone dochodami ze składek członkowskich i ze sprzedaży publikacji oraz z dotacji Polskiej Akademii Nauk. Dotacja w roku 1967 stanowiła 62,5% ogólnego budżetu, w roku 1968 — 66,4%. Wzrost kosztów w roku 1968 w porównaniu z rokiem 1967 był konsekwencją kosztów organizacji międzynarodowego sympozjum, na cel ten jednak Towarzystwo uzyskało za pośrednictwem Polskiej Akademii Nauk i Ministerstwa Spraw Zagranicznych dodatkową dotację UNESCO w wysokości 119 tys. złotych. Rozliczenie z tej dotacji zostanie zamknięte w roku bieżącym po wydaniu drukiem tomu obejmującego pełne teksty prac zreferowanych podczas sympozjum na temat Biosyntezy Białka.

Wśród wydatków Towarzystwa najwyższą pozycję, podobnie jak w latach ubiegłych stanowiły nakłady na wydawnictwa (ok. 55%) oraz koszty zjazdów (ok. 20%). Koszty działalności statutowej Oddziałów tj. koszty zebrań i odczytów, oraz delegacje prelegentów, a także koszty kursów i konferencji specjalistycznych i wy-

kładów popularno-naukowych stanowiły całą niemal pozostałość wydatków (blisko 20%), ponieważ koszty administracyjne PTBioch. nie przekraczały 8% ogólnej kwoty wydatków.

Jako pasywa należy wymienić niepunktualność niektórych członków PTBioch. w przekazywaniu składek i opłat za prenumeratę. Zmusiło to Zarząd Główny do skreślenia w roku 1968 22 osób, a w roku 1969 już 5 osób z listy członków PTBioch. Pomimo to, ogólna kwota zadłużenia członków z tytułu zaległych składek wynosi aktualnie 5260 zł, a zadłużenie z tytułu nieopłaconych prenumerat 13.472 zł. Podkreślić należy, że w kwotach tych nie są wykazane należności za niedopłacone opłaty członkowskie w b.r. Szczególnie przykry jest fakt, że kilku-nastu członków zalega od kilku lat z opłatą za prenumeratę.

Zebrania naukowe w Oddziałach, Komisje specjalistyczne PTBioch., konferencje, sympozja i zjazdy. Głównym forum spotkań dyskusyjnych członków Towarzystwa są nadal zebrania naukowe w Oddziałach oraz doroczne, krajowe zjazdy PTBiochemicznego. W ostatnich latach obserwuje się wyraźny spadek frekwencji na wewnętrznych posiedzeniach w dużej części naszych Oddziałów, a ogólnie biorąc i coraz liczniejszy udział w Zjazdach Towarzystwa. Referaty o tematyce ogólnej cieszyły się na ogół większym zainteresowaniem niż oryginalne prace o wąskiej tematyce — jeśli liczba uczestników jest jakąś miarą zainteresowania tematem. Wydaje się jednak, że jest to efekt ciągle niedoskonałego redagowania referatów, które, zawierając konkretne wyniki własnej pracy referentów, mogą zainteresować szerokie grono biochemików, gdy przedstawiają, równocześnie ogólniejsze problemy. Diagnoza ta oparta jest między innymi o fakt, że największą frekwencję notowano na zebraniach z referatami wybitnych specjalistów w omawianej dziedzinie, niezależnie od tego czy referent pochodzi z miejscowego czy zamiejscowego ośrodka.

W okresie ostatnich dwóch lat według danych wykazanych w sprawozdaniach Oddziałów łączna liczba referatów wygłoszonych w Oddziałach sięgała 120, z czego 20% stanowiły referaty wygłoszone na zebraniach Oddziału Łódzkiego. W tym ośrodku ponadto, z inicjatywy miejscowej, odbyła się w kwietniu 1968 roku konferencja okrągłego stołu na temat Biochemii Krwinki Czerwonej (11 referatów), a w Szczecinie w czerwcu 1969 roku został zorganizowany przez Oddział Towarzystwa wspólnie z Pomorską Akademią Medyczną „Dzień Biochemiczny PAM” (22 doniesienia + 3 referaty programowe), w których uczestniczyło około 150 osób.

Oddział Górnośląski Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizował (październik 1968) przy udziale Oddziałów innych Towarzystw naukowych konferencję okrągłego stołu na temat: „Nauka, zawód, etyka w medycynie”. Nad przebiegiem dyskusji czuwała pięciu znanych profesorów z różnych ośrodków krajowych. Liczba uczestników sięgała kilkuset osób. Z inicjatywy Komisji Naukowej Komitetu Biochemicznego odbyły się zorganizowane wspólnie z PTBioch. dwie konferencje na temat struktury białka w marcu 1968 r. w Krakowie i w grudniu 1968 r. w Warszawie (po około 30 uczestników).

Komisja Fotobiologiczna PTBiochemicznego, która powstała w grudniu 1965 roku dla popierania i popularyzacji badań fotobiologicznych zorganizowała w okresie sprawozdawczym dwa sympozja (w Poznaniu 13—14.X.1967 i Lublinie 15—16.IX.69) przy udziale około 50 osób. Komisja Utleniania Biologicznych jest w trakcie organizacji, najbliższe sympozjum w tej dziedzinie odbędzie się w roku przyszłym podczas dorocznego Zjazdu Towarzystwa.

Doroczne Zjazdy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego mają już swoją rangę, a liczny udział młodej kadry nadaje im charakter bardzo dynamiczny. Wielką troską Towarzystwa jest uzyskanie większych niż dotąd funduszy na delegacje dla

młodych uczestników Zjazdu; w bieżącym roku kwota na ten cel nie dosięga 10.000 złotych. VI Zjazd Towarzystwa w dniach 25—27 lipca ub. roku zorganizowany był na terenie WSR w Kortowie przez Kolegów z Oddziału Olsztyńskiego. W ramach Zjazdu zorganizowano Sympozjum Międzynarodowe na temat biosyntezy białek (sprawozdanie ze Zjazdu i Sympozjum ukaże się w III zeszytce „Postępów Biochemii” w r.b.). Ogólna liczba uczestników — 413 osób. VII Zjazd PTBiochemicznego trwa właśnie, a tematem są „Peptydy i Peptydazy”. Sprawozdanie ze Zjazdu ukaże się również w kwartalniku. VIII Zjazd planowany jest w roku przyszłym w Szczecinie: termin 28—30 maja narzucony został Towarzystwu przez możliwości korzystania z bazy hotelowej na terenie m. Szczecina. W czasie Zjazdu oprócz doniesień na tematy wolne projektowane są dwa sympozja: jedno na temat izoenzymów, drugie na temat utleniania biologicznych.

Zjazdy międzynarodowe, a szczególnie Zjazdy Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (*FEBS*), stanowią niezmiernie ważne i szersze od krajowego forum konfrontacji wysiłków i osiągnięć w dziedzinie biochemii. Wiemy wszyscy, że Polskie Towarzystwo Biochemiczne jest jednym z Towarzystw-założycieli *FEBS*, a każdy członek PTBioch. jest członkiem Federacji. Niestety, jak dotąd III Zjazd *FEBS* w Warszawie był jedyną możliwością udziału liczego grona polskich biochemików w zjeździe *FEBS*. Pomimo usilnych starań Zarządu Głównego organizowana w 1968 roku poprzez Spółdzielnię Turystyczną „Gromada” zbiorowa wycieczka członków PTBiochemicznego do CSRS na V Zjazd *FEBS* została, jak wiadomo, odwołana niemal w przeddzień wyjazdu. W konsekwencji w V Zjeździe *FEBS* w Pradze wzięło udział 25 biochemików z Polski.

W bieżącym roku z upoważnienia Polskiej Akademii Nauk, Zarząd Główny PTBioch. współdziałał w koordynacji ustalenia składu delegacji na VI Zjazd *FEBS* do Madrytu. Nie zmieniło to jednak faktu, że w Zjeździe tym biochemię polską reprezentowało tylko 8 Kolegów na ogólną liczbę uczestników blisko 2500. Liczby te mówią same za siebie, zwłaszcza gdy się zważy, że Polskie Towarzystwo Biochemiczne jest czwartym co do liczebności Towarzystwem członkowskim Federacji oraz, że delegacje innych krajów socjalistycznych były znacznie bardziej reprezentatywne. W kwietniu dwóch przedstawicieli PTBiochemicznego reprezentowało polskie akademie medyczne na konferencji zorganizowanej z ramienia *FEBS* dla przedyskutowania kształcenia studentów medycyny w zakresie biochemii (Sprawozdanie w *Postęпах Biochemii*). Jedna osoba wzięła udział w Szkole *FEBS* na temat: „Separation of Macromolecules and Particles” w Uppsali w 1969 roku.

Działalność szkoleniowa, Kursy i wystawy specjalistyczne. Z inicjatywy Kolegów Oddziału Warszawskiego przy twórczej i wydatnej pracy Kolegów z Oddziału Gdańskiego, Krakowskiego, Łódzkiego odbył się w styczniu 1968 roku w Warszawie kurs techniki rozdzielania białek i kwasów nukleinowych przy zastosowaniu elektroforezy na żelach poliakrylamidowych. W kursie wzięło udział ponad 90 Kolegów z różnych placówek i ośrodków całego kraju.

W maju 1969 roku dwóch członków Towarzystwa uczestniczyło w Bułgarii w kursie rozdzielania kwasów nukleinowych za pomocą elektroforezy na żelach agarowych.

W marcu 1969 roku Towarzystwo zorganizowało w Warszawie wystawę aparatury produkowanej przez f-my *MSE* w Wielkiej Brytanii i *LKB* ze Szwecji. W ramach wystawy przedstawiciele firm demonstrowali użytkowanie prezentowanej aparatury i wygłosili specjalistyczne wykłady. W maju 1969 roku również w Warszawie odbyła się podobna prezentacja automatycznych analizatorów aminokwasów i kwasów nukleinowych japońskiej firmy *JEOL*.

Wysoka frekwencja uczestników oraz liczne głosy uznania dla celowości zorganizowanych kursów wskazują na pilną potrzebę szkolenia w zakresie różnych technik laboratoryjnych w naszym środowisku biochemicznym. Wydaje się jednak,

iz w przyszłości słuszniej będzie powtarzać kursy w większych ośrodkach niż organizować kursy centralne. Pociąga to bowiem wobec licznych zgłoszeń limitowanie liczby uczestników z poszczególnych ośrodków. W bieżącym roku mimo pewnego ograniczenia liczby przyjętych frekwencja była tak wysoka, że nie wszyscy byli w stanie wystarczająco korzystać z wykładów i pokazów. Wystawa aparatury firm *Farmacia*, *LKB*, *Quickfit* oraz *POLFA*, *POCh.* i *Biomed* otwarta jest właśnie z okazji VII Zjazdu PTBioch. w salach WSR w Wrocławiu.

Pierwsza środowiskowa wystawa-kurs aparatury analitycznej i pomiarowej oraz szkła laboratoryjnego (firm *MSE*, *LKB* i *Quickfit*) odbędzie się jeszcze we wrześniu b.r. w Łodzi z inicjatywy Oddziału PTBiochemicznego.

Cenną również inicjatywę wykazali Koledzy z Oddziału w Szczecinie, a mianowicie korzystając z wizyt prelegentów organizowali oni spotkania metodyczne dla omówienia niektórych specjalistycznych technik badawczych.

Na terenie Oddziału PTBioch. w Poznaniu wygłoszono 14-godzinny cykl wykładów dla młodych biochemików na temat biosyntezy białka i kwasów nukleinowych.

Kursy podstaw biochemii. Działalność szkoleniowa PTBioch. nie ograniczała się do własnego środowiska biochemicznego, lecz objęła również pracowników innych środowisk. V kolejny kurs PODSTAW BIOCHEMII zorganizowano wspólnie z kołem NOT w 1968 r. dla Pracowników Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie. Wykłady w ilości 30 godzin odbywały się raz w tygodniu przy frekwencji około 300 osób. Dalsze kursy VII i VIII, po 50 godzin każdy, zorganizowano na prośbę Centr. Ośr. Metodycznego Ministerstwa Oświaty i Szk. Wyższego (w kwietniu 1968 roku w Miedzeszynie i w maju 1969 r. w Sulejówku). Wzięło w nich udział 95 i 50 nauczycieli z liceów ogólnokształcących z całego kraju. Wykłady prowadzili głównie Koledzy z Oddziału Warszawskiego (lecz nie wyłącznie). Ponadto w r. 1968 przeprowadzono serię wykładów dla nauczycieli m.st. Warszawy, a w 1969 r. z terenu Szczecina oraz Torunia.

Postępy Biochemii. W Komitecie Redakcyjnym pracowały: doc. dr Z. Lassota (Redaktor) i dr hab. M. M. Jeżewska (Sekretarz). Skład Rady Redakcyjnej powiększył się w 1969 roku o dwie osoby. Obecnie w Radzie pracują: prof. B. Filipowicz (przewodniczący) prof. J. Chmiel, prof. W. Gajewski, prof. Z. Kasprzyk, prof. W. Mejbaum, prof. J. Pawelkiewicz, doc. T. Szczepkowski, prof. J. Trojanowski i doc. K. L. Wierzchowski (członkowie).

Decyzją Głównego Urzędu Kontroli Prasy z dnia 9.I.1968 r. objętość wydawnicza *Postępów* została oficjalnie powiększona o 5 arkuszy i wynosi 45 arkuszy wydawniczych rocznie. Faktyczna objętość wydawnicza *Postępów* wynosiła 45 arkuszy już w roku 1967. Nakład czasopisma wzrósł z 1500 egz. w roku 1967 do nieco ponad 2000 egz. w latach 1968 i 1969.

Koszt wydawania 1 arkusza wynosi ok. 6500 zł. w czym usługi PWN (obsługa wydawnicza, papier, druk i oprawa) stanowią ponad 60%, honoraria autorskie i honoraria grafików ok. 30%, a honoraria redakcji i recenzentów ok. 10%. Różnica pomiędzy kosztami wydawniczymi a wpływami ze sprzedaży pokrywana jest z dotacji PAN. Siegała ona 200.000 zł w roku 1967, a w latach następnych zmalała do około 170.000 złotych.

W XIII tomie (1967) opublikowano 33 prace, w tomie XIV (1968) 37 prac a w tomie XV (1969) ukazały się 32 prace. Ponadto publikowano sprawozdania ze Zjazdów i konferencji, recenzje książek oraz komunikaty i sprawozdania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

W okresie od początku 1967 roku do 15 września 1969 roku nadesłano do teki redakcyjnej 95 artykułów, z czego 12 prac nie przyjęto, bądź to wskutek ujemnej opinii recenzentów, bądź też (co przeważało), ponieważ prace nadesłane miały charakter doświadczalny.

Redakcja nadal wysyła czasopismo do ośrodków, które zapewniają cytowanie artykułów w międzynarodowych biuletynach dokumentacyjnych, a także prowadzi wymianę z niektórymi Ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą.

Działalność wydawnicza.

Kwartalnik wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne.

W serii wydawniczej Monografie Biochemiczne ukazało się w okresie sprawozdawczym 7 tomów, w tym 2 monografie specjalnie napisane dla naszego Wydawnictwa. Ostatni tom nosi kolejną liczbę 20, dwa dalsze tomy są w druku. Ogólny koszt wydanych ostatnio tomów sięga 140 tys. złotych.

Monografie Biochemiczne powołane do publikacji monograficznie zredagowanych rozpraw habilitacyjnych nie posiadały *ipso facto* własnego programu, a opublikowane już tomy, dalsze znajdujące się w druku oraz zgłoszone do wydawnictwa charakteryzuje bardzo rozstrzelona tematyka. Wśród członków PTBioch. i do Bibliotek różnych zakładów naukowych rozprowadza się 270 egz. co stanowi ok. 70% całego nakładu (400 egz.). Analiza jednak zamówień na poszczególne tomy i kontrola remanentów wykazują, że Monografie o tematyce bardzo wąskiej zalegają magazyn T-wa, podczas, gdy nakłady Monografii o tematyce ogólnej są na wyczerpaniu. W związku z tym, Zarząd Główny niejednokrotnie rozważał sprawę zmiany założeń serii wydawniczej — Monografie Biochemiczne i proponuje, aby przekształcić ją stopniowo w wydawnictwo publikujące monograficzne opracowania najnowszych osiągnięć biochemii oraz (lub też) łączną publikację kilku prac o związanej tematyce pozostawiając jednak na razie możliwość publikowania rozpraw habilitacyjnych. ZG PTBioch. przedstawia tę sprawę na forum Walnego Zebrania i prosi o zgłaszanie tematów, których opracowanie i wydanie w serii Monografie Biochemiczne byłoby celowe, informując równocześnie, że zgłoszono już temat: mechanizm działania antybiotyków.

W wydaniu książkowym ukaże się niebawem zbiór pełnych prac przedstawionych w ubiegłym roku, podczas Międzynarodowego Sympozjum na temat biosyn-tezy białka. Książka ta pod tytułem „Protein Biosynthesis, structure and function of micromolecules and subcellular elements” publikowana jest w drukarni Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie w nakładzie 500 egzemplarzy o objętości 13 arkuszy.

Nagrody konkursowe. Do roku 1967 Polskie Towarzystwo Biochemiczne przyznawało dorocznie w drodze konkursu dwie nagrody: nagrodę im. J. K. Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną, wykonaną w kraju a opublikowaną w poprzednim roku kalendarzowym oraz nagrodę im. B. Skarżyńskiego za najlepszą pracę przeglądową, opublikowaną w *Postęпах Biochemii* w poprzednim roku kalendarzowym. Poczynając od 1968 roku PTBioch. przyznaje również nagrody za prace referowane na Zjazdach Biochemicznych. Fundusze na te nagrody uzyskało Towarzystwo wzamian za kwotę przeznaczoną dawniej na krajowe stypendia naukowe dla młodych biochemików. Od 1968 roku bowiem w wyniku odnośnego zarządzenia Ministerstwa Finansów, Towarzystwa Naukowe straciły prawo udzielania stypendiów.

W 1967 r. wysokość nagrody im. J. K. Parnasa wynosiła 4000 zł., w 1968 r. — 5000 zł, nagroda zaś im. B. Skarżyńskiego w obu latach 3000 zł. Za prace referowane na zjazdach w 1968 roku, których pełne teksty z pełną dokumentacją wpłynęły do Zarządu Gł. przed końcem tegoż roku przyznano 3 nagrody na sumę 8350 zł. Zgodnie z nowym regulaminem nagrody za najlepsze prace przedstawione na dorocznym Zjeździe PTBiochemicznego przyznawane będą poczynając od roku bieżącego wyłącznie młodemu biochemikom, którzy nie ukończyli 30 lat i których pracy nie firmuje jako współautor, samodzielny pracownik naukowy. Liczbę nagród i ich wysokość

ustali Zarząd Główny przed imiennym przyznaniem nagród. Na fundusz nagród posiada w b.r. PTBioch. łącznie kwotę 17.000 złotych.

Posiedzenia i dyżury Zarządu Głównego. W okresie minionej V kadencji odbyło się 6 plenarnych posiedzeń ZG, w tym 2 z udziałem Przewodniczących Oddziałów. Komisja Statutowa powołana przez ZG opracowała wnioski dla Walnego Zebrania precyzując niektóre punkty Statutu, a Komisja Regulaminów opracowała zatwierdzone następnie przez ZG regulaminy nagród PTBioch. Dla załatwienia różnych bieżących spraw organizacyjnych i administracyjnych odbyło się 9 protokółowanych posiedzeń prezydium Z.G. Dyżury członków ZG w siedzibie Towarzystwa odbywały się co tydzień w piątki zgodnie z praktyką lat ubiegłych. Personel biura stanowią: Gł. Księgowa — 1/2 etatu, sekretarka — 3/4 etatu i goniec-sprzątaczką (1/2 etatu).

PREZES

prof. dr Zofia Zielińska

Wyciąg z protokołu z VI Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

VI Zwyczajne Walne Zebranie P.T.Bioch. odbyło się we Wrocławiu w dniu 19.IX.1969 r. Obecnych było 185 członków. Przewodniczącym zebrania wybrano prof. dr T. Baranowskiego, a sekretarzem doc. dr W. Dobryszkę. Po przyjęciu porządku dziennego oraz protokołu z V Walnego zebrania odbyły się wybory komisji-matki i komisji skrutacyjnej. W skład Komisji matki weszli: doc. dr K. Bojanowska-Raczyńska, dr Grzelakowska-Sztabert i prof. dr J. Trojanowski. Przewodniczącym 14 osobowej komisji skrutacyjnej wybrano doc. dr J. Lisowskiego. Następnie prof. dr Z. Zielińska złożyła sprawozdanie z działalności Towarzystwa (opublikowane oddzielnie), a doc. dr Z. Lassota z działalności komitetu redakcyjnego *Postępów Biochemii* stwierdzając, że czasopismo wydawane jest obecnie w ilości 2000 egzemplarzy a objętości 45 arkuszy wydawniczych. Prof. dr K. Zakrzewski złożył sprawozdanie Komisji Rewizyjnej stwierdzające, że w pracy Zarządu Głównego P.T. Bioch. nie było uchybień w działalności finansowej i statutowej. Wyrażając uznanie dla pracy Zarządu Głównego prof. dr K. Zakrzewski zgłosił wniosek o udzielenie Zarządowi absolutorium. Wniosek ten został przyjęty jednogłośnie, a prof. dr T. Baranowski w imieniu wszystkich obecnych złożył ustępującemu Zarządowi podziękowanie za wielką i efektywną pracę.

Zgodnie z porządkiem dziennym dokonano następnie wyboru nowych władz Towarzystwa. Na 185 obecnych oddano 184 ważne głosy wybierając na stanowisko prezesa ponownie prof. dr Z. Zielińską, a na stanowisko wiceprezesa doc. dr T. Borkowskiego. Na członków i zastępców członków Zarządu Głównego wybrano z jednej 20 osobowej listy 14 osób, a mianowicie: doc. dr A. Morawieckiego z Wrocławia, doc. dr A. Koją z Krakowa, dr A. Mazanowską z Warszawy, doc. dr K. Jerzykowskiego z Katowic, doc. dr Żelewskiego z Gdańska, dr hab. A. M. Dancewicza z Warszawy, dr Gregorzyczkę ze Szczecina, dr B. Zacharę z Łodzi, dr W. Walerycha z Poznania, doc. dr P. Masłowskiego z Torunia, doc. dr T. Chojnackiego z Warszawy, doc. dr J. Kościelaka z Warszawy, dr D. Hulanicką z Warszawy i doc. dr J. Kwiatkowską z Wrocławia.

W skład Komisji Rewizyjnej weszli prof. dr K. Zakrzewski, doc. dr T. Szczepkowski i doc. dr W. Bicz.

W dyskusji poruszano sprawę współpracy z innymi towarzystwami naukowymi (prof. dr Gumiński), która w opinii prof. Zielińskiej mogła by przyjąć ramy utworze-

nia komisji problemowych, jeśli taka będzie inicjatywa grupy członków towarzystwa, lecz według doc. Raczyńskiej-Bojanowskiej nie powinna przyjąć formy tworzenia sekcji towarzystwa. Kierunek tworzenia komisji problemowej podjęła grupa zajmująca się problemami utleniania biologicznego i taką formę mogliby też podjąć biofizycy. Tę ostatnią sugestię wysunęła prof. Zielińska w odpowiedzi na propozycję doc. Morawieckiego i wniosek pisemny prof. Hellera o zmiany statutowe mówiące o zrzeszeniu biochemików i biofizyków. Rozwiązałyby to wstępnie sprawę działalności biofizyków w ramach towarzystwa bez konieczności zmian statutowych. Prof. Stella Niemierko apelowała do Władz Towarzystwa o wzmocnienie wysiłków w sprawie wpływu na delegowanie biochemików na zjazdy zagraniczne. W dyskusji na temat budżetu Towarzystwa i ograniczonych funduszy na nagrody i delegacje dr Witwicki proponował, aby zobligować przyszły Zarząd do dokonania wszelkich niezbędnych kroków i zabiegów aby kwoty zarówno na delegacje jak i na nagrody dla młodszych pracowników naukowych zostały powiększone w sposób wydatny, proporcjonalny do potrzeb naszego Towarzystwa.

Przewodniczący Komisji Statutowej prof. Zydomo odczytał projekt zmian statutowych, które w głosowaniu jawnym przyjęte zostały jednomyślnie w brzmieniu podanym wszystkim członkom Towarzystwa w oddzielnym komunikacie.

Po wyczerpaniu wszystkich punktów porządku dziennego przewodniczący Zebrania zamknął VI Walne Zebranie P.T.Bioch.

Wyciąg sporządził
Dr A. M. Dancewicz
Z-ca Sekr. P.T.Bioch.

KOMUNIKATY

Nagrody przyznane w 1969

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z prawdziwą przyjemnością powiadamia Czytelników o przyznaniu dorocznych nagród Towarzystwa:

Nagroda Imienia Bolesława Skarżyńskiego

w wysokości 3000 zł została przyznana dr Mirosławie Piechowskiej za artykuł pt. *Transformacja bakterii* opublikowany w *Postęпах Biochemii*, 14, 561 (1968).

Nagroda Imienia Jakuba Parnasa

w wysokości 5000 zł została przyznana prof. dr Kazimierzowi Zakrzewskiemu i dr Halinie Goch za pracę doświadczalną pt. *Human serum albumin; tyrosyl residues and strongly binding sites* opublikowaną w *Biochemistry* 7, 1835 (1968).

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego dla młodych biochemików za prace przedstawione na VII Zjeździe PTBiochemicznego we Wrocławiu, wrzesień 1969 r.

I nagroda (2000 zł)

Józef Kędziora — The properties of protease and its isolation from *Aspergillus fumigatus*

Nagrody-wyróżnienia (1000 zł)

Marek Kłoczewiak i Grażyna Dudek — Comparison of macromolecular endproducts of fibrinogen and fibrin proteolysis by plasmin

Jan Szopa — Histony bogate w lizynę i ich kompleksy z DNA

Jerzy A. Sokal — Zmiany zawartości i stanu oksydoredukcyjnego dwunukleotydów nikotynowo-adeninowych w tkankach szczurów w ostrym zatruciu czterochlorkiem ołowiu

Anna Radomińska-Pyrek, Anna Kruszewska i Zdzisław Matysiak — Nukleotydy cytydynowe w biosyntezie fosfolipidów u *Neurospora crassa*

Irena Lorenc-Kubis i Antoni Polanowski — Aktywność antyproteolityczna białek nasion żyta i wiechliny łąkowej

Małgorzata Manteuffel-Cymborowska i Barbara Grzelakowska-Sztabert — Hamowanie reduktazy dehydrofolanowej przez 4-amino i azo-homologi folanu

Michał Komoszyński i Jadwiga Gniot-Szulżycka — Immunoelektroforetycznie jednorodny preparat arylosulfatazy A łożyska ludzkiego

Komunikat nr 1/70 Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ogłasza konkurs na eksperymentalne prace biochemiczne przedstawione przez młodych pracowników nauki na VIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Zasady tego konkursu są następujące:

- wiek referenta nie przekraczający lat 30-tu
- stanowisko referenta nie przekraczające szczebla st. asyst.
- wśród współautorów nie ma samodzielnego pracownika naukowo-badawczego.

Prace do konkursu należy zgłaszać do Komitetu Organizacyjnego VIII Zjazdu, Szczecin, Laboratorium PSK, ul. Powstańców 72. Pełny tekst pracy winien być dostarczony Sekretariatowi Zjazdu w czasie trwania obrad. Zgłoszenie winno być sygnowane przez Kierownika Zespołu lub placówki, w której praca została wykonana. W ocenie prac konkursowych uwzględnione będą takie elementy jak: atrakcyjność tematu, wybór metody oraz sposób prezentacji pracy na Zjeździe.

W kwietniu 1969 roku powstało Polskie Towarzystwo Badań Radiacyjnych im. Marii Skłodowskiej-Curie. Celem Towarzystwa (§ 6 statutu) jest popieranie rozwoju badań radiacyjnych tj. badań nad działaniem promieniowania na materię żywą i nieożywioną oraz ich popularyzacja. Prezes — prof. dr J. K r o h, V-Prezisi: doc. dr M. K o p e ć i p i k dr T. O b a r a, Sekretarz — dr J. B e e r, adres: Warszawa 91, ul. Dorodna 16, Instytut Badań Jądrowych.

KOMITET ORGANIZACYJNY
XVII ZJAZD
POLSKIE TOWARZYSTWO
MIKROBIOLOGÓW

Warszawa, ul. Chocimska 24
tel. 45-30-20; 45-32-21

Komunikat nr 2

Zgodnie z informacją podaną w Komunikacie Nr 1 przypominamy, że XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów odbędzie się w Warszawie w dniach od 9 do 12 września 1970 r.

Program naukowy Zjazdu, uzgodniony z Zarządem Głównym PTM, obejmuje przedpołudniowe obrady plenarne, na których w ciągu czterech dni zostanie wygłoszone kilkanaście wykładów. Tematy wykładów będą w następnym komunikacie. W godzinach popołudniowych odbędą się obrady w następujących sesjach tematycznych.

1. Struktura i funkcja ściany i błony komórkowej drobnoustrojów
2. Metabolizm lipidowy i wielocukrowy drobnoustrojów
3. Mechanizm wrażliwości i oporności drobnoustrojów na antybiotyki i chemioterapeutyki
4. Mutageneza i przekazywanie materiału genetycznego u drobnoustrojów
5. Rekombinacja genetyczna u drobnoustrojów
6. Epizomy bakteryjne
7. Struktura i biosynteza przeciwciał
8. Immunochemia antygenów drobnoustrojowych
9. Immunosupresja
10. Autoimmunizacja
11. Fagi wirulentne i lizogenne drobnoustrojów
12. Właściwości biologiczne a chorobotwórczość ziarnkowców Gramdodatnich

13. Właściwości biologiczne a chorobotwórczość jelitowych pałeczek Gramujemnych
14. Etiologia i immunologia chorób wenerycznych
15. Wrażliwość bakterii na działanie chemioterapeutyków
16. Nowe metody w diagnostyce mikrobiologicznej
17. Grzybice
18. Mikrobiologiczne zakażenia leków i ich kontrola
19. Swoiste i nieswoiste substancje przeciwwirusowe
20. Szczepionki wirusowe
21. Epidemiologia zakażeń wirusowych
22. Wirusy onkogenne
23. Replikacja DNA i RNA wirusów
24. Metabolizm i genetyka drobnoustrojów stosowanych w przemyśle
25. Mikrobiologiczna kontrola produktów żywnościowych
26. Korozyjne działanie drobnoustrojów
27. Drobnoustroje jako źródło enzymów do celów przemysłowych
28. Grzybicze zakażenia żywności i pasz
29. Równowaga biologiczna środowisk naturalnych
30. Mikrobiologia wody i oczyszczania ścieków
31. Mikrobiologia chorób odzwierzęcych

Obrady w sesjach będą obejmowały wprowadzający wykład moderatora sesji oraz doniesienia z prac doświadczalnych.

Zgłaszanie uczestnictwa w Zjeździe oraz doniesień na obrady sesji tematycznych odbędzie się w dwóch etapach; w pierwszym — należy do dnia 31 stycznia 1970 r. zgłosić zamiar udziału w Zjeździe, tj. nadesłać dokładnie wypełniony druk „Zgłoszenie uczestnictwa”, a w drugim — do dnia 15 marca 1970 r. należy nadesłać streszczenia doniesień. Streszczenia, nie przekraczające 30 wierszy znormalizowanego maszynopisu, należy nadesłać w trzech egzemplarzach na adres Komitetu Organizacyjnego Zjazdu. Streszczenia nadesłane po 15 marca nie zostaną umieszczone w materiałach zjazdowych. Zmiana terminu nadsyłania streszczeń, podanego w Komunikacie nr 1, została podyktowana względami technicznymi. Streszczenia będą stanowiły podstawę do zakwalifikowania doniesień na Zjazd. O włączeniu doniesienia do programu Zjazdu i o czasie przyznanym na wygłoszenie doniesienia (od 5 do 15 min.) zainteresowane osoby zostaną powiadomione listownie. O ostatecznym układzie i liczbie sesji tematycznych Komitet Organizacyjny zadecyduje po nadesłaniu streszczeń doniesień, tj. po 15 marca 1970 r.

Organizatorzy Zjazdu zapewniają uczestnikom wygłaszającym doniesienia możliwość wyświetlenia przezroczy formatu 50×50 mm.

Komunikat nr 3, zawierający informacje o kosztach uczestnictwa w Zjeździe, zakwaterowania oraz udziału w bankiecie, zostanie wysłany do osób, które zgłoszą zamiar swego uczestnictwa w Zjeździe na druku załączonym do niniejszego komunikatu.

ZA KOMITET ORGANIZACYJNY XVII ZJAZDU PTM

SEKRETARZ
Dr *Cecylia Zak*

PRZEWODNICZĄCY
Doc. dr *Janusz Jeljaszewicz*

SPIS TREŚCI

Z. Tynecka — Mechanizm działania penicyliny na komórkę bakteryjną . . .	153
B. Szukalski — Metabolizm i regulacja sekrecji aldosteronu . . .	169
J. Trojanowski — Toksohormon	191
K. Konopka — Funkcja transferryny	205
A. L. Pawlak — Wpływ kwasu 2,3-dwufosfoglicerynowego na wydajność przenoszenia tlenu przez hemoglobinę	221
G. Palamarczyk, J. Rytka — Metody badania struktury centrum ak- tywnego enzymów	231
M. I. Bukowska — Owoalbumina	249
J. Bartkowiak, L. Kłyszajko-Stefanowicz — Niejednorodność histonów	263
Recenzje książek (J. Wysokowski)	299
III Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów, Durham, USA, 13-18 X 1969 (Z. Kaniuga)	301
VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu (J. Kwiat- kowska, A. Szewczuk)	301
Sprawozdanie z sympozjum „Peptydazy i Peptydy”, odbytego w czasie VII Zja- zdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu (J. Lisowski)	303
Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1967—1969 (Z. Zielińska)	304
Wyciąg z protokołu z VI Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (A. M. Dancewicz)	309
Komunikat nr 1/70 Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	312
Komunikat nr 2 Komitetu Organizacyjnego XVII Zjazdu Polskiego Towarzy- stwa Mikrobiologów	312

W 3 zeszytcie tego tomu ukażą się:

1. Zależność między budową a funkcją białek, T. Baranowski
2. Biologiczna aktywność histonów, L. Kłyszajko-Stefanowicz, J. Bartkowiak
3. Denaturacja białka jako zmiana jego struktury, L. Myszkowski
4. Regulacja cyklu skurczowo — rozkurczowego mięśni szkieletowych, R. Dąbrow-
ska, W. Drabikowski
5. Stan badań nad kwasem pangamowym, J. Janicki, J. Skupin, A. Giec
6. Metabolizm glikogenu i mechanizmy jego regulacji, J. Hutny
7. Hormony owadzie, M. J. Piechowska, Z. Sienkiewicz, M. Bielińska

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1970

ARTICLES IN POLISH

Volume 16

Number 2

Z. Tynecka — The Mechanism of Action of Penicillin on Bacterial Cell (Dep. Microbiol., Med. School, Lublin)	153
B. Szukalski — Metabolism and Regulation of Secretion of Aldosterone (Dep. Biol. Inst. Pharm., Warszawa)	169
J. Trojanowski — Toxohormone (Dep. Biochem. UMCS, Lublin)	191
K. Konopka — Function of Transferrin (Blood Transf. Center, Łódź)	205
A. L. Pawlak — Function of 2,3-Diphosphoglyceric Acid in Control of the Efficiency of Oxygen Transport by Hemoglobin (Dep. Human Gen., Med. School, Poznań)	221
G. Palamarczyk, J. Ryłka — The Methods of Enzyme Active Site Investigation (Dep. Horticult., High School Agricul., Warszawa; Dep. Biochem., Med. School, Warszawa)	231
M. I. Bukowska — Ovalbumin (Dep. Biochem. Biophys. Univ., Kraków)	249
J. Bartkowiak, L. Kłyszajko-Stefanowicz — Heterogeneity of histones (Dep. Gen. Biochem. Univ., Łódź)	263
Chronicle	299

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO
NAUKOWE

informuje,

że w 1969 roku ukazały się w serii

„**PODSTAWY BIOLOGII WSPÓŁCZESNEJ**“

następujące publikacje:

E. Baldwin

WSTĘP DO BIOCHEMII

1969, s. 184 zł 15.—

D.E. Grodzieński

RADIOBIOLOGIA

1969, s. 316 zł 22.—

A.G. Loewy, Ph. Siekevitz

STRUKTURA I FUNKCJE KOMÓRKI

1969, s. 300 zł 20.—

E.P. Odun

EKOLOGIA

1969, s. 220 zł 15.—

V.B. Wigglesworth

FIZJOLOGIA OWADÓW

1969, s. 194 zł 15.—

Do nabycia we wszystkich księgarniach !!!

OD REDAKCJI

W spisie treści zamieszczonym na okładce zeszytu 1/70 wydrukowano omylnie:

K. Wiśniewski, R. Farbiszewski — Udział lipidów i lipoproteidów
w procesie hemostazy 51

zamiast:

K. Wiśniewski — działanie „transportowe” insuliny a synteza białek 33
K. Worowski, R. Farbiszewski — Udział lipidów i lipoproteidów
w procesie hemostazy 51

Za ten błąd przepraszamy autorów i czytelników.

Przypominamy Czytelnikom,

że znajdują się jeszcze w sprzedaży

książki PWN

z serii

PODSTAWY BIOLOGII WSPÓŁCZESNEJ

Seria obejmuje zwięzłe opracowania poświęcone poszczególnym dziedzinom nauk biologicznych. Tomy napisane przez najwybitniejszych specjalistów przynoszą przegląd współczesnego stanu wiedzy biologicznej z uwzględnieniem najnowszych odkryć.

H. C. Bold ŚWIAT ROŚLIN

1966, s. 163

zł 12.—

V. G. Dethier, E. Steller ZACHOWANIE SIĘ ZWIERZĄT

1966, s. 198

zł 12.—

M. Sussman WZROST I ROZWÓJ ZWIERZĄT

1967, s. 185

zł 12.—

J. M. Barry BIOLOGIA MOLEKULARNA

Geny a regulacja procesów chemicznych żywej komórki

1968, s. 186

zł 15.—

K. M. Smith BIOLOGIA WIRUSÓW

1968, s. 153

zł 12.—

Do nabycia we wszystkich księgarniach !!!

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

SPIS TREŚCI

Z. Tynecka — Mechanizm działania penicyliny na komórkę bakteryjną	153
B. Szukalski — Metabolizm i regulacja sekrecji aldosteronu	169
J. Trojanowski — Toksohormon	191
K. Konopka — Funkcja transferryny	205
A. L. Pawlak — Wpływ kwasu 2,3-dwufosfoglicerynowego na wydajność przenoszenia tlenu przez hemoglobinę	221
G. Palamarczyk, J. Rytka — Metody badania struktury centrum ak- tywnego enzymów	231
M. I. Bukowska — Owoalbumina	249
J. Bartkowiak, L. Kłyszejko-Stefanowicz — Niejednorodność histonów	263
Recenzje książek (<i>J. Wysokowski</i>)	299
III Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów, Durham, USA, 13—18 X 1969 (<i>Z. Kaniuga</i>)	301
VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu (<i>J. Kwiat- kowska, A. Szewczuk</i>)	301
Sprawozdanie z sympozjum „Peptydazy i Peptydy”, odbytego w czasie VII Zja- zdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu (<i>J. Lisowski</i>)	303
Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1967—1969 (<i>Z. Zielińska</i>)	304
Wyciąg z protokołu z VI Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (<i>A. M. Dancewicz</i>)	309
Komunikat nr 1/70 Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	312
Komunikat nr 2 Komitetu Organizacyjnego XVII Zjazdu Polskiego Towarzy- stwa Mikrobiologów	312