

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1972
tom 18
nr 3

KWARTALNIK

PSTBAH 18(3)
349-536(1972)

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

Załączniki do tekstu. Każdy załącznik należy dołączyć na oddzielnej kartce, 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 „górną” i „dół”.

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 2
tom XVIII
zeszyt 3

KWARTALNIK
PSTBAH 18(3) 349-536 (1972)

P A Ń S T W O W E W Y D A W N I C T W O N A U K O W E

<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 1972

Nakład 2160 (2025+135)	Oddano do składania 28 IV 1972 r.
Ark. wyd. 13,25, druk. 11,75	Podpisano do druku we wrześniu 1972 r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono we wrześniu 1972 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 679/72 A-73

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

ROMAN GONDKO*, BRONISŁAW SLOMIANY**,
KRYSTYNA ŚLASKA***

Strukturalne składniki błon erytrocytów

Structural Components of the Erythrocyte Membrane

This article contains data concerning structural components of the erythrocyte membrane.

Błona komórkowa, integralny składnik żywej komórki, odgrywa istotną rolę w jej metabolizmie, stanowiąc selektywną barierę pomiędzy cytoplazmą a otaczającym środowiskiem. Błona nadaje komórkom charakterystyczny kształt i od niej zależą ich specyficzne właściwości, na przykład grupowe właściwości krwi. Funkcje te niewątpliwie uwarunkowane są budową błony, przestrzennym uporządkowaniem jej strukturalnych składników: tłuszczowców, białek i cukrowców. Wymienione związki tworzą w błonie szereg kompleksów, a niektóre z nich wykazują właściwości enzymatyczne.

Skład i struktura błon nawet tak prostych komórek, jak erythrocyty ssaków (brak jądra i mitochondriów) nie są, jak dotychczas, w pełni poznane. Artykuł niniejszy stanowi przegląd najnowszych danych o budowie i strukturalnych składnikach błony krwinek czerwonych.

I. Struktura błony

Błona erythrocytu jest stosunkowo łatwym do uzyskania modelem do badań budowy i funkcji błon komórkowych. Badania te zapoczątkowali w 1925 roku Gortner i Grendel (33) obserwacją, że lipidy wyekstrahowane z błony mogą pokryć monomolekularną warstwą powierzchnię równą podwójnej powierzchni komórki, z czego wyciągnęli wniosek o obecności w błonie dwóch warstw lipidowych. Przepuszczali oni, że od-

* Dr, Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Fizjologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

** Ph. D., Department of Biochemistry New York Medical College, New York

*** Mgr, Katedra Chemii Ogólnej i Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Łódź

Wykaz stosowanych skrótów: NANA — kwas N-acetyloneuraminowy, NGNA — kwas N-glikozyloneuraminowy

cinki polarne cząsteczek lipidowych znajdujących się naprzeciwko siebie warstw skierowane są na zewnątrz błony, a niepolarne do środka.

Danielli i Davson (18) wykazali, że podwójna warstwa lipidowa ze zwróconymi do siebie hydrofobowymi łańcuchami węglowodorowymi stanowi środkową warstwę błony, pokrytą z dwóch stron zaadsorbowanymi na zewnętrznych powierzchniach lipidów cząsteczkami białka. Ten zasadniczy schemat budowy błony: białko-lipid-białko przyjmowany jest do dziś, a przemawiają za nim dane o pojemności elektrycznej błony (108), napięciu powierzchniowym, przepuszczalności (19), ugięciu promieni i podwójnym załamaniu światła (10, 105).

Aby uzasadnić przepuszczalność błony dla substancji hydrofilnych Danielli (18) przyjął, że białka są wbudowane w warstwę lipidową — przerywają ją w pewnych miejscach i wyścielają utworzone w ten sposób hydrofilne pory. Parpart i Ballantine (87) wysunęli hipotezę mozaikowej struktury błony krwinki czerwonej, w której występują naprzemian elementy białkowe i lipidowe.

Na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym odmienny model budowy błony erythrocytu opracowali Hillier i Hoffman (37). Według nich na sieci utworzonej z fibrylli białkowych o długości 200Å i średnicy 20Å ułożone są płytki lipidowe o średnicy 200—400Å i grubości 30Å. Za lipidowym charakterem tych płytek przemawia możliwość usunięcia ich eterem. Ponadto na ich powierzchni prawdopodobnie znajduje się warstwa luźno związanego białka.

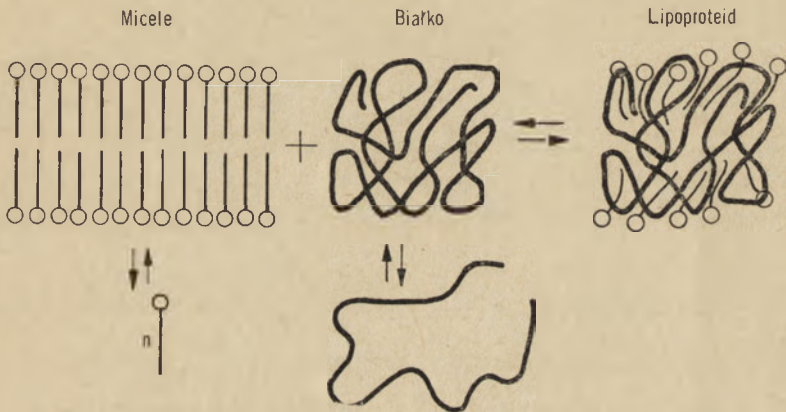
Ponieważ 2—3% hemoglobiny (Hb) nie daje się usunąć z cieni erythrocytów podczas ich przemywania w obojętnym pH przypuszczano, że na wewnętrznej powierzchni błony czerwonych krwinek znajduje się w postaci ciągłej warstwy zaadsorbowana Hb (2, 23).

W latach 50-tych po zastosowaniu do badań mikroskopu elektronowego powstała teoria błony elementarnej (ang. *unit membrane*) Robertsona (99), oparta na modelu Danielli'ego, która nie została jednak potwierdzona doświadczalnie. Nie znaleziono bowiem dowodu na to, iż białko w błonie występuje wyłącznie w konformacji β . Prawdopodobnie wśród składników błony nie ma białka o takiej strukturze drugorzędowej lub stanowi ono tylko niewielką część całkowitego białka błony.

Dane Lenarda i Singera (59) przemawiają za obecnością około 25—30% białka strukturalnego błony w formie α -helikalnej. Według tych autorów białko w formie helisy znajduje się wewnątrz błony, gdzie jest stabilizowane przez hydrofobowe oddziaływanie z lipidami. O niewielkiej zawartości białka o konformacji β w błonach komórkowych donoszą Wallach i Zahler (122). Zgodnie z wysuniętą przez nich hipotezą budowy błon, dwa hydrofilne obszary białkowe są rozdzielone przez pasmo hydrofobowe utworzone z hydrofobowych struktur podobnych do prętów penetrujących błonę. Długość tych struktur byłaby równa szerokości apolarnej kory błony, a stanowiłyby je spiralne segmenty peptydowe, upa-

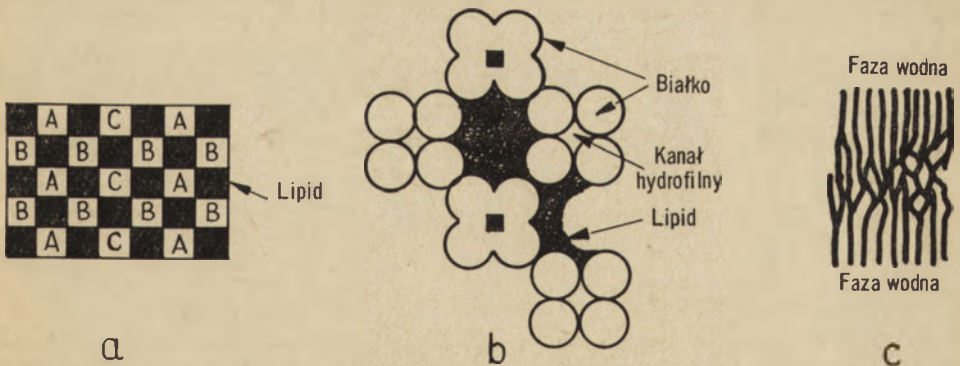
kowane między łańcuchami węglowodorowymi lipidów błony. Jednostki hydrofobowe miałyby występować albo pojedynczo, albo jako agregaty, tworząc mikrotubule, przez które mógłby zachodzić transport. Istnienie różnorodnych konformacji białek strukturalnych błony: α -helikalnej, β -konformacji i innych form helis potwierdzają również badania Greena i wsp. (32).

Pogląd Robertsona (99) o polarnej interakcji między białkiem i lipidem został obecnie zweryfikowany. Według najnowszego ujęcia luźno związane lipidy, to jest całkowity cholesterol i część fosfatydów, utrzymywane są w błonie tylko przez wiązania hydrofobowe, natomiast wiązanie pozostałych fosfatydów, głównie lecytyny i sfingomieliny, warun-



Schemat 1. Model błony komórkowej wg Bensona (cyt. za 135)

Elementy strukturalne błony powstają wskutek dwuwymiarowej agregacji podjednostek lipoproteidowych, w których białka i lipidy związane są hydrofobowo

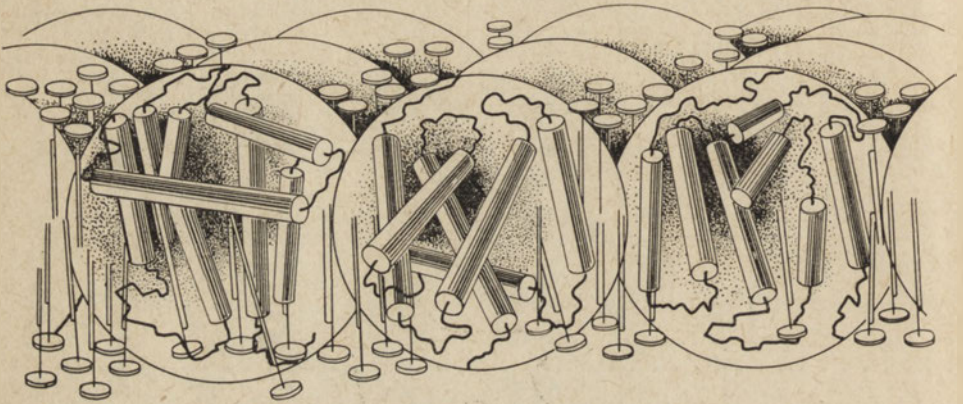


Schemat 2. Struktura błony wg Wallacha (cyt. za 135)

a) Powierzchnia siatki lipoproteidowej błony z trzema typami białka (A, B, C) i penetrującymi je cylindrami lipidowymi, b) Przekrój poprzeczny błony przez obszar apolarny — cztery zasocjowane jednostki białkowe tworzą ściany cylindra lipidowego. Jednostkę białkową, z hydrofobowym kanałem lub bez niego, tworzą cztery spirale. Hydrofobowe części spiral wiążą się z łańcuchami węglowodorowymi fosfatydów

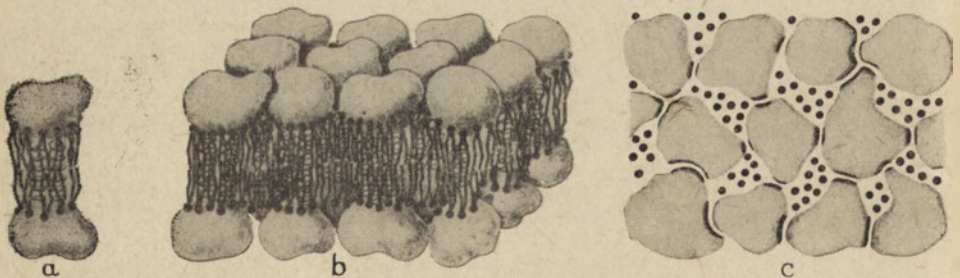
kowałyby polarna interakcja (135). Główną rolę hydrofobowych oddziaływań między białkiem a lipidem w utrzymaniu struktury błony podkreślają Lenard i Singer (59), Wallach i Zahler (122), Green i wsp. (32).

Oddziaływanie wzajemne białko-lipid prowadzić może do dwóch typów agregacji: (a) łączenia się monomerów lub utworzonych z nich podjednostek lipoproteidowych w dwuwymiarową mozaikę membranową (na tym typie agregacji oparta jest większość najnowszych modeli struktury błony), (b) tworzenia się ciągłej sieci białkowo-lipidowej w jednostopniowej reakcji, przez co pojedyncze jednostki lipoproteidowe nie byłyby wy-



Schemat 3. Model błony biologicznej Sjöstranda (cyt. za 135)

Dwuwymiarowa struktura błony utworzona jest ze skupisk kulistych podjednostek będących cząsteczkami białka lub kompleksami lipoproteidowymi. Hydrofobowe reszty aminokwasowe zajmują pola powierzchni wzdłuż równika. Obszary polarne kuli zawierają hydrofilne reszty aminokwasowe co umożliwia agregację podjednostek



Schemat 4. Struktura błony krwinki czerwonej wg Zahlera i Weibela (cyt. za 135)

a) Pojedyncza jednostka cylindryczna złożona z apoproteidu z hydrofilnymi obszarami na obu końcach i centralnym obszarem o strukturze α -spirali i powierzchni hydrofobowej. b) Agregat monomerów lipoproteidowych. c) Powierzchnia błony (widok z góry). Lipidy wypełniają przestrzenie między podjednostkami, tworząc w tych miejscach podwójną warstwę dzięki oddziaływaniu lipid-lipid

Struktura podjednostek sprzyja ich spontanicznej agregacji, co sprawdzono metodą rekombinacji *in vitro* (135)

krywalne (agregacja w koncepcji błony elementarnej). Ilustracją przytoczonych wyników badań nad strukturą błony są modele błon biologicznych przedstawione na schematach 1, 2, 3 i 4. Modele te oparte są na zasadzie agregacji podjednostek lipoproteidowych.

W ostatnich latach zmianie uległy poglądy na czynnik decydujący o indywidualnych charakterystycznych cechach różnych błon. Biodynamika samych lipidów nie może wyjaśnić charakterystycznego składu błony. Bardziej prawdopodobne jest, że lipidy w danej błonie są selekcjonowane i przynajmniej częściowo organizowane przez białka; skład lipidowy błony byłby odzwierciedleniem specyficznego i charakterystycznego układu jej białek (52). Podjednostki lipoproteidowe są, jak się dotychczas sądzi, tworzone przez wiązanie lipidów w sposób określony przez sekwencję aminokwasów w białku, a błony powstają przez odpowiednią agregację lipoproteidów. Jednostką funkcjonalną w błonie jest na pewno białko i ono warunkuje fizjologiczną i biochemiczną funkcję błony i jej strukturę.

Żaden z zaproponowanych dotychczas modeli struktury błony biologicznej nie został przyjęty bez zastrzeżeń. Należy je w dalszym ciągu uważać za hipotezy robocze, gdyż zawierają wiele elementów wymagających udowodnienia. W każdej propozycji współczesnego modelu struktury błony powinny być wzięte pod uwagę następujące fakty: występowanie ponad 50% białek błony w konformacji α -spiralnej, obecność pól hydrofobowych na powierzchni błony, istnienie β -spiralnych obszarów wewnątrz fazy lipidowej, obecność lipoproteidów jako monomerów lub podjednostek zdolnych do samoskupiania się w struktury błonowe drogą dwukierunkowej agregacji.

Badania nad błonami biologicznymi szły także w kierunku ustalenia ich grubości. Gortner i Grendel (33) podali, że zaproponowany przez nich dwuwarstwowy układ lipidowy ma grubość 30Å. Błona o strukturze błony elementarnej Robertsona (białko-lipid-białko) (18) ma grubość 75Å, z czego na każdą warstwę przypada 25Å. Przekonano się, że taką grubość wykazuje większość błon komórek zwierzęcych. W wyniku ostatnich badań oceniono grubość błony plazmatycznej komórek zwierzęcych na 45—210Å (34). Grubość błony erytrocytów wynosi około 50Å, np. 52Å — dla erytrocytów królika (87) i 68Å — dla erytrocytów człowieka (90). Ogólnie przyjmuje się, że grubość błony plazmatycznej wynosi około 60Å (38).

Struktura błony wyznacza szereg jej właściwości, między innymi zachowanie się w polu elektrycznym. Stwierdzono, że pod wpływem różnicy potencjałów zawiesina krwinek czerwonych w środowisku fizjologicznym porusza się w kierunku anody. Ujemny ładunek powierzchniowy, tak zwany potencjał dzeta, jest charakterystyczny dla powierzchni erytrocytowej i w głównej mierze on decyduje o szybkości migracji w polu elektrycznym, choć pewne działanie mogą też wywierać siła jonowa śro-

dowiska oraz adsorpcja jonów o przeciwnych znakach na powierzchni krwinki. Prędkość wędrówki erytrocytów ssaków różnych gatunków zmniejsza się w następującej kolejności: krwinki psa > szczura > kota > > myszy > człowieka > świnki morskiej > świni > królika. Stwierdzono, że naładowane grupy na powierzchni są mocno związane z błoną, gdyż różne czynniki niekorzystnie oddziałujące na komórki nie wpływają na ruchliwość elektroforetyczną. P o n d e r i P o n d e r (91) udowodnili, że cienie erytrocytów przemieszczają się z taką samą szybkością jak całe komórki, co wskazuje, że ujemny ładunek powierzchniowy nie zostaje utracony podczas hemolizy i zależy od składników błony. Dzięki połączeniu metod elektrochemicznych i chemicznych (108) ustalono (6), że jest on związany z obecnością grup karboksylowych kwasu siałowego. Kwas siałowy występuje w połączeniu z białkiem w najbardziej powierzchniowej części błony, co udowodniono działając neuraminidazą, która nie ma zdolności przenikania przez błony. Reszty kwasu siałowego decydują o punkcie izoelektrycznym siałoproteidu przypadającym w pH 3,7—4,8 (123). Powyżej tego pH białko błon jest anionem, poniżej kationem. Stwierdzono, że neuraminidaza i α -amylaza, uwalniające kwas siałowy, powodują spadek ruchliwości elektroforetycznej erytrocytów niektórych zwierząt, redukcję ich ujemnego ładunku powierzchniowego i przesunięcie punktu izoelektrycznego białek błon do wartości pH 5,0—5,5 (64). Potwierdza to pogląd, że ładunek powierzchniowy erytrocytów jest uwarunkowany przez grupy karboksylowe kwasu siałowego (31, 66).

II. Białka stromy

Przez długi okres czasu fundamentalną rolę w błonie przypisywano tłuszczom, o których mamy w obecnej chwili najwięcej danych i im poświęcony jest jeden z następnych rozdziałów. Do niedawna natomiast dane o ilościowym i jakościowym składzie białek błon erytrocytów były skąpe. Pierwszej próby ich identyfikacji dokonał w 1932 roku J o r p e s, który otrzymane po ekstrakcji lipidów z cieni erytrocytów białko nazwał stromatyną (42).

Stromatynę wyodrębnił także B a l l a n t i n e (5). M o s k o w i t z i C a l v i n (81) otrzymane przez zamrożenie cienie przemywali alkalicznymi roztworami, a uzyskany osad białka określili jako strominę, uznając ją za zasadniczy zrąb stromy. Wyodrębniony po ekstrakcji eterem fosfoproteid nazwano eleniną. Dalsza ekstrakcja mieszaniną etanol-eter dała stromatynę (81). Substancję rozpuszczającą się powyżej pH 7 i wytrącającą się w pH 6,4 nazwano białkiem S (40). Białka typu strominy, stromatyny czy eleniny są mieszaninami zdenaturowanych białek stromy.

Charakterystyczną właściwością warunkującą rolę białka jako strukturalnego elementu błon jest jego nierozpuszczalność w warunkach fizjo-

logicznych, co sprawia, że otrzymanie białek błony w stanie natywnym napotyka na ogromne trudności. Znacznym postępowaniem w tej dziedzinie było zastosowanie w ciągu kilku ostatnich lat szeregu metod izolowania białek z cieni pozbawionych hemoglobiny (17, 22, 57, 63, 92).

Powszechne zastosowanie ma działanie na błony *n*-butanolem w obecności lub nieobecności detergentów (63). W tych warunkach 90—95% związków tłuszczowych przechodzi do organicznego rozpuszczalnika, w fazie wodnej pozostaje 85—95% rozpuszczalnego białka (17, 65, 98). Tak otrzymane białka z krwinek człowieka, wołu, świni i owcy precypitują w *pH* 3,7—4,8 przy 32,5—40% nasyceniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50% nasyceniu acetonem oraz podczas zamrażania (64, 98, 136).

Ekstrakcja błon pentanolem prowadzi do otrzymania nienaruszonych lipoproteidów (137). W celu otrzymania białek erytrocytów stosowano frakcjonowane wysalanie siarczanem amonu (17), a także ekstrakcję roztworami o niskiej sile jonowej w obecności ATP (67).

Blumenfeld (11) jako rozpuszczalnika użyła 33% roztwór pirydyny, otrzymując po dializie wobec wody supernatant zawierający 35—40% sialoproteidów. W osadzie natomiast znajdowały się białka nierozpuszczalne i 80% cholesterolu.

Roztwór fenol-kwas mrówkowy-woda (14:3:3 v/v/v) powoduje rozdzielanie lipoproteidów błon na białka i tłuszcze (21). Białka stanowią 50% suchej masy błony (tablica 1), a po ekstrakcji lipidów mieszaniną etanol-eter (3:1) aż 90%, przy czym są to głównie glikoproteidy, których skład aminokwasowy jest prawie niezależny od sposobu preparatyki (4, 11, 102, 106).

Tablica 1

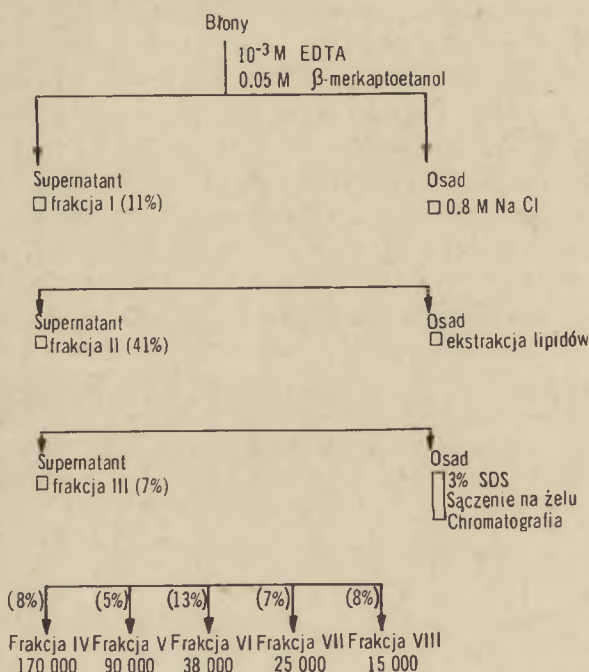
Procentowy skład cieni krwinek czerwonych (102)

Związek	Przed ekstrakcją lipidów (%)	Po ekstrakcji lipidów (%)
Białko	49,2	91
Tłuszcz całkowity	43,6	1,5
Fosfolipidy	32,5	1,5
Cholesterol	11,5	0
Węglowodany	1,2	7,5
Cukry obojętne	4,0	2,5
Heksozoaminy	2,0	2,6
Kwas sialowy	1,2	2,4

Podobieństwo składu aminokwasowego frakcji glikoproteidowej błon krwinek czerwonych i frakcji otrzymanych w podobny sposób z mitochondriów *Neurospora crassa* (129) i serca wołu (61) nasuwało przypuszczenie, że w błonie erytrocytu istnieje grupa białek „strukturalnych” (75). Jednak podobieństwo składu białek rozpuszczalnych z *Escherichia coli*

(111) wskazuje, że sam skład aminokwasowy białek nie jest wystarczającą podstawą takiego przypuszczenia.

Za pomocą stopniowej ekstrakcji EDTA (68) i roztworami soli (77) oraz stosując metody chromatograficzne glikoproteidy błony można rozdzielić na 5 frakcji (schemat 5). Frakcje te nie są jednorodne, jak to stwierdzono za pomocą chromatografii na kolumnach *Sephadex G-200*. Znamienne wpływ na rozpuszczalność glikoproteidów błony miało działanie EDTA. Tylko 18% białek ekstrahowało się w roztworze samej soli, zaś pod działaniem EDTA i soli rozpuściło się 41% białek (103). Jak wiadomo, jedną z właściwości EDTA jest wiązanie wapnia, który w błonach krwinek czerwonych znajduje się w ilości 0,634 $\mu\text{g/ml}$ erytrocytów. Wydaje się, że dwuwartościowe kationy oddziałują jako stabilizatory błony. Burger i wsp. (13) wykazali, że hemoliza erytrocytów wołu zachodzi znacznie szybciej w roztworach pozbawionych dwuwartościowych kationów.



Schemat 5. Preparatyka glikoproteidów, ich procentowa zawartość i masy cząsteczkowe

Podobnie jak w większości rozpuszczalnych w wodzie białek, we frakcjach I, II, III i V procent molowy niepolarnych aminokwasów wynosi 36. W pozostałych frakcjach ten procent wynosi 49. Jeżeli w błonie erytrocytów występują białka „strukturalne”, to są to prawdopodobnie białka frakcji IV, V i VI. Analiza N-końcowych grup wykazała, że poszczególne te frakcje zawierają więcej niż jeden rodzaj łańcucha polipeptydowego.

W celu zidentyfikowania rozmieszczenia w błonie białek wymienionych frakcji zastosowano sól dwuazoninową kwasu sulfanilowego znakowanego ^{35}S , która nie dyfundując przez błonę tworzy połączenie tylko z jej białkami powierzchniowymi. Po poddaniu krwinek czerwonych inkubacji przez 20 minut, białka błon rozdzielono elektroforetycznie, stwierdzając największą ilość impulsów w białku o masie 140 000 i właśnie to białko usytuowane być musi na powierzchni błony (103).

Dodgę i wsp. (22) opracowując metodę otrzymywania cieni erytrocytów przez łagodne wylugowanie hemoglobiny stwierdzili, że skład lipidowy cieni nie odbiega od składu krwinek nienaruszonych.

Po ekstrakcji błon eterem Rosenberg i Guidotti (103) znaleźli w nie zawierającym cholesterolu osadzie białkowym 1—2% fosfolipidu, co wskazywałoby na silne połączenie z białkiem tylko fosfolipidu. Maddy (64) oraz Rega i wsp. (98) wykryli w zliofilizowanej, rozpuszczalnej (po potraktowaniu butanolem) frakcji białkowej 3—5% fosfatydoloseryny, co wskazywałoby, że jest ona silnie związana z białkiem. Wyniki te potwierdzili Zwał i wsp. (136) dla błon erytrocytów różnych ssaków.

Hemoliza ludzkich erytrocytów w kontrolowanych warunkach prowadzi do otrzymania stromy zawierającej wszystkie lipidy i normalną aktywność acetylocholinoesterazy. Podziałanie na tę stromę 1,2M NaCl spowodowało uwolnienie tłuszczu z równoczesnym zanikiem aktywności enzymu. Łatwość z jaką nastąpił zanik właściwości enzymatycznych nasuwa przypuszczenie, że kompleks lipidowo-białkowy umiejscowiony jest na powierzchni błony (77, 78).

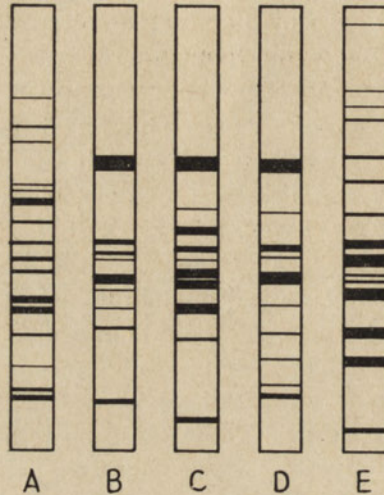
Roelofszen (101) działając na cienie erytrocytów człowieka fosfolipazą C i A zaobserwował znaczny, nieodwracalny spadek aktywności obu ATPaz, co zauważono także po działaniu n-butanolem (64).

Dokładniejsze określenie liczby białek w błonie krwinki jest dosyć trudne. Schrier (107) podaje, że w stromie wykryto aktywność 25 enzymów, a zatem należałoby spodziewać się występowania co najmniej 25 odrębnych frakcji białkowych.

W zależności od stosowanego do ekstrakcji rozpuszczalnika otrzymuje się różną ilość frakcji białkowych w wyniku elektroforezy. Na przykład w błonach erytrocytów świń wykryto od 14—16 frakcji na żelu poliakrylamidowym po zastosowaniu rozpuszczalnika fenolowego, a tylko 9 po traktowaniu butanolem (21, 136). W erytrocytach człowieka wykryto od 8—12 frakcji białkowych na żelu poliakrylamidowym z mocznikiem (102, 136), a 15—25 frakcji na tym samym żelu z 0,1% dodatkiem siarczanu sodowego dodecyłu (SDS). Z krwinek człowieka w żelu skrobiowym otrzymano zaledwie 7 frakcji białkowych (3). Liczbę frakcji białkowych otrzymanych z błon preparowanych według Maddy z erytrocytów zwierząt różnych gatunków przedstawia rysunek 1.

Rozbieżne wartości otrzymano wyznaczając masy cząsteczkowe białek rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie (118, 137). Po ekstrakcji

butanolowej masa cząsteczkowa białek wynosi około 300 000 (64), po ekstrakcji pirydyną jest rzędu 500 000 (11). Znacznie niższe wartości, to jest 50 000, otrzymano po ekstrakcji etanolowo-eterowej (93, 95). Białko cieni erytrocytów po rozpuszczeniu w SDS miało masę cząsteczkową rzędu 40 000 (4).



Rys. 1. Frakcje białkowe erytrocytów: A) szczura, B) świni, C) wołu, D) owcy, E) człowieka (136)

Lenard (58, 59, 60) nienaruszone, otrzymane według Dodge cienie erytrocytów człowieka po dializie wobec 5mM EDTA i 5mM merkaptoetanolu w 2% roztworze SDS poddał elektroforezie uzyskując 14 frakcji białkowych. Cztery z nich stanowiły 60—65% wszystkich białek, a ich masa cząsteczkowa wynosiła od 86 000 do 255 000.

Ostatnio doniesiono o wykryciu w stromie erytrocytów człowieka i wołu tak zwanej frakcji minibiałek. W skład tej frakcji wchodziły peptydy o masie cząsteczkowej 5000. Frakcja ta odgrywa prawdopodobnie dosyć ważną rolę, bowiem znaleziono w niej ponad 50% aminokwasów stromy (55).

Unikając procesu odlipidowania Marchesi i wsp. (67, 68) wyizolowali z błon erytrocytów kurczliwe białko — spektrynę (ang. *spectrin*).

Łagodnie traktowanie erytrocytów trypsyną powoduje odsłonięcie widocznej w mikroskopie elektronowym struktury aktynopodobnej (67, 119). W celu wyodrębnienia tego białka zastosowano więc metodę zbliżoną do metody izolowania aktyny z mięśni. Po dializie wobec ATP i merkaptoetanolu 20% białek cieni erytrocytów można było wyekstrahować wodą, a podstawowy składnik tej frakcji był białkiem homogennym, zasadniczo różnym od aktyny. Przede wszystkim spektryna nie przejawia

właściwości wiązania ATP. Dotychczas spektrynę, która jest białkiem kurczliwym, wyodrębniono z erytrocytów człowieka, konia, świnki, owcy, królika i szczura (68). Białko to zanalizowano pod względem składu aminokwasowego i właściwości fizyko-chemicznych. Skład aminokwasowy spektryny człowieka jest identyczny ze składem spektryny z innych gatunków zwierząt. Zawiera ona $20\mu\text{M}^0/\%$ kwasu glutaminowego i $1\mu\text{M}^0/\%$ cysteiny (tablica 2).

Tablica 2

Skład aminokwasowy spektryny człowieka (68)

Aminokwasy	$\mu\text{M}^0/\%$	Ilość reszt (100 000)
Lizyna	6,7	59,1
Histydyna	2,6	22,9
Arginina	5,8	51,2
S-karboksymetylocysteina	1,1	9,7
Kwas asparaginowy	10,9	96,1
Treonina	3,6	31,8
Seryna	4,1	36,2
Kwas glutaminowy	20,5	180,8
Prolina	2,4	21,2
Glicyna	4,9	43,2
Alanina	9,2	81,1
Walina	4,7	41,5
Metionina	1,7	15,0
Izoleucyna	4,0	35,3
Leucyna	12,4	109,4
Tyrozyna	2,0	17,6
Fenyloalanina	3,0	26,5

Za pomocą reakcji immunologicznej ustalono, że spektryna nie pochodzi z plazmy ani hemolizatu, lecz umiejscowiona jest w błonie komórkowej. Jej minimalna masa cząsteczkowa obliczona na podstawie pomiarów w ultrawirówce i lepkości wynosi około 140 000, a absorpcja $1^0/\%$ roztworu równa się 8,8.

Z zebranych danych wynika, że w błonie erytrocytów występuje około 15—20 różnych białek, w większości w postaci niezupełnie zidentyfikowanych kompleksów gliko-lipido-proteidowych, determinujących strukturalną integralność błony. Niestety używane dotychczas metody otrzymywania białek prawdopodobnie powodują naruszenie ich III-cio rzędowej struktury.

III. Glikoproteidy błony erytrocytów

Większość teorii o budowie błony komórkowej (18, 100, 123) w zasadzie nie rozpatruje wpływu glikolipidów na strukturę i właściwości błony erytrocytów. Z danych o ilości cukrów w błonie komórkowej erytrocytów

wynika, że stanowią one około 8⁰/₀ suchej masy błony. Skład cukrów w krwince człowieka jest następujący: galaktoza i acetylogalaktozamina (AcNHGal) stanowią po 1,8⁰/₀ jej masy, glukoza i acetyloglukozamina (AcNHGlc) po 0,8⁰/₀, fukoza 0,3⁰/₀, mannoza 0,4⁰/₀, a kwas N-acetylneuraminowy (NANA) — 2,1⁰/₀ (127). Glikoproteidy wyodrebnione ze stromy erytrocytów ludzkich zawierają znaczną ilość kwasu sialowego, heksoz i heksozoamin (4, 11, 16).

Ogólnie przyjętą metodą (127) otrzymywania glikoproteidów z błony erytrocytów jest ekstrakcja za pomocą mieszaniny fenolu z wodą (1:1) w temperaturze 65°C. Dalsze oczyszczanie polega na wytrąceniu glikoproteidów alkoholem. Jedną z nowszych metod (11) oparta jest na rozdziale na kolumnach *Sephadex G-200* przy użyciu 33⁰/₀ roztworu pirydyny. Duży ciężar cząsteczkowy tak wyizolowanych glikoproteidów (około 500 000) (8, 9) jest wynikiem agregacji podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 31 000. Agregaty te łatwo ulegają dysocjacji w obecności detergentów jak *Triton x-100* i SDS (80). Na 100g suchej masy otrzymanego glikoproteidu 35⁰/₀ przypada na aminokwasy. Kwas N-acetylneuraminowy stanowi 27,8⁰/₀, z cukrów galaktoza — 13,2⁰/₀, mannoza — 2,6⁰/₀, fukoza — 1,2⁰/₀ i acetyloglukozamina 6,5⁰/₀ (127).

Pod wpływem działania neuraminidazy bakteryjnej lub wirusowej na erytrocyty następuje uwolnienie kwasu sialowego, powodujące zmniejszenie ujemnego ładunku błony erytrocytów (25). Jest to bezpośrednim dowodem, że sialoglikoproteidy są umiejscowione na powierzchni erytrocytów. Trawienie trypsyną powoduje uwolnienie około 40⁰/₀ kwasu sialowego w postaci sialoglikopeptydów (14, 15, 25, 84, 85, 128), które mogą być z łatwością wyizolowane za pomocą chromatografii na *DEAE*-celulozie (128). W zależności od grupy krwi dawcy wykazują one własności antygenowe typu M, N lub MN (7, 14, 44, 80), charakteryzują się brakiem wolnych grup α -aminowych (metoda Sangera) i zawierają 80⁰/₀ cukrów. Powyższe właściwości nasuwają przypuszczenie, że glikopeptydy te pochodzą z łańcucha peptydowego, w którym grupy α -aminowe są zablokowane, w innym bowiem przypadku trawienie trypsyną powodowałoby uwalnianie tych grup. Glikoproteidy M i N wykazują właściwości wiązania wirusa grypy (7, 51).

Wiadomo, że cukry połączone są białkami za pomocą dwu typów wiązań: O- i N-glikozydowych. Wiązanie typu O-glikozydowego tworzy się między anomerycznym węglem N-acetylogalaktozaminy i hydroksylową grupą seryny lub treoniny (44, 89, 113, 128). Pod wpływem działania zasad na to wiązanie następuje β -aliminacja łańcucha oligosacharydowego i tworzenie się związanego z peptydem kwasu α -aminoakrylowego z seryny lub kwasu α -aminokrotonowego z treoniny. W obecności NaBH₄ cukier jest zredukowany do alkoholu, a pozostałe nienasycone aminokwasy są zredukowane do alaniny i kwasu α -aminomasłowego (89). W kolagenach wiąza-

nie typu O-glikozydowego występuje także między galaktozą a hydroksylizyną.

Wiązanie N-glikozydowe między redukującą grupą N-acetyloglukozaminy i amidową grupą asparaginy jest odporne na działanie alkalicznego rozwtoru NaBH_4 i β -asparaginyloglukozaminę można otrzymać jedynie na drodze łagodnej kwaśnej hydrolizy.

Na podstawie dotychczas zebranych danych zaproponowano (127) następujący sposób połączenia glikoproteidu z błoną erytrocytów. Przyjęto, że podstawowa jednostka glikoproteidu (m. cz. 31 000) jest zakotwiczona w błonie erytrocytów za pomocą grupy karboksylowej swej lipofilnej części. Pozostała część glikoproteidu jest utrzymywana w rozciągniętej postaci za pomocą ujemnie naładowanych reszt kwasu sialowego, co jest potwierdzone przez obniżanie się lepkości erytrocytów pod wpływem neuraminidazy. Spiralną konformację glikoproteidowego łańcucha wykluczono także w wyniku badań skręcalności optycznej (41).

IV. Lipidy błony erytrocytów

Przeważająca część tłuszczu występujących w czerwonych ciałkach krwi jest związana z błoną komórkową. W 1940 roku Parpart i Die-man (88) wykazali, że tłuszcze stanowią około 35% suchej masy błon erytrocytów. Najnowsze dane (20, 112) dotyczące składu tłuszczowego błony erytrocytów człowieka przedstawia tablica 3.

Tablica 3

Tłuszczowce erytrocytów ludzkich (20, 112)

Rodzaj tłuszczowca	$\mu\text{M} \times 10^{-19}/\text{krwinkę}$
Cholesterol	3,2
Wolne kwasy tłuszczowe, glicerydy, estry steroli	0,1
Fosfatadylocholina	1,2
Fosfatydyloseryna	0,6
Fosfatydyloetanoloamina	1,1
Fosfoinozytydy	0,03
Sfingomieliny	1,0
Lizolecytyna	0,04
Kwas fosfatydowy	0,04
Glikosfingolipidy	0,2

Erytrocyty w swym cyklu życiowym (120 dni u człowieka) ulegają pewnym strukturalnym i przestrzennym zmianom (71). Młode krwinki zawierają znacznie większą ilość cholesterolu i fosfolipidów (50, 95, 126). Ilość glicerofosfolipidów spada także w miarę przechowywania erytrocytów

(125). Pewne tłuszcze z kolei mogą być adsorbowane przez erytrocyty z plazmy. Przykładem tego jest adsorpcja grupowej substancji krwi typu J^{CS} u bydła (39).

1. Tłuszczowce obojętne

Tłuszczowce obojętne stanowią około 40% całkowitej frakcji tłuszczowej erytrocytów ludzkich. Głównym składnikiem tej frakcji jest niezestryfikowany cholesterol (80—90%) (117). Z badań przeprowadzonych przez Nelsona (83) wynika, że erytrocyty otrzymane z krwi wołu, psa, konia, świni, szczura i owcy zawierają średnio około 28% tłuszczowców obojętnych, z których 99% stanowi cholesterol. Stwierdzono tylko śladowe ilości esterów cholesterolu, trójglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych. Gdy erytrocyty owcy przemyto dziesięciokrotnie buforem fosforanowym, stwierdzono jedynie obecność cholesterolu, a zatem pozostałe tłuszcze są prawdopodobnie adsorbowane na powierzchni błony erytrocytów. Erytrocyty człowieka i psa zawierają natomiast znaczne ilości dwuglicerydów (120).

2. Fosfolipidy

Głównymi fosfolipidami erytrocytów człowieka (125) są: fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna, sfingomieline lizofosfatydy, plazmalogen, fosfoinozytydy, kwasy fosfotydowe i kardiolipiny. Erytrocyty owcy i wołu wyróżniają się dużą zawartością sfingomieline i znikomą ilością fosfatydylocholine. Erytrocyty człowieka, szczura i królika zawierają więcej fosfatydylocholine niż sfingomieline (30,82). Biologiczne znaczenie tych różnic nie zostało, jak dotychczas, wyjaśnione. Fosfolipidy stanowią materiał budulcowy błon komórkowych erytrocytów. W związku z tym zmiany w składzie fosfolipidów mają znaczny wpływ na żywotność i właściwości erytrocytów, co zaobserwowano podczas dłuższej inkubacji i po urazach metabolicznych (97). Usunięcie części tłuszczu z powierzchni erytrocytów powoduje *in vivo* skrócenie ich żywotności i obniżenie odporności na temperaturę.

3. Glikosfingolipidy

Glikosfingolipidy stanowią około 4% całkowitej ilości tłuszczu występujących w błonie erytrocytów ludzkich. W 1951 roku Klenk i Launstein (49), a w rok później Yamakawa i Suzuki (134) wyodrębnili z błony erytrocytów ludzkich glikolipid zawierający galaktozę, glukozę, N-acetylogalaktozaminę, kwas tłuszczowy i sfingozynę, który nazwano globozydem. W tym samym czasie Yamakawa i Suzuki (133) otrzymali z erytrocytów konia nowy rodzaj glikolipidu — hematozyd.

Związek ten oprócz kwasu tłuszczowego, sfingozyny i galaktozy zawierał także kwas N-glikozyloneuraminowy (NGNA). Dalsze badania glikolipidów z erytrocytów konia doprowadziły do wyodrębnienia dwuheksylo-ceramidu, który uważa się za odmianę hematozydu pozbawioną kwasu sialowego (120).

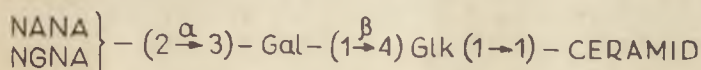
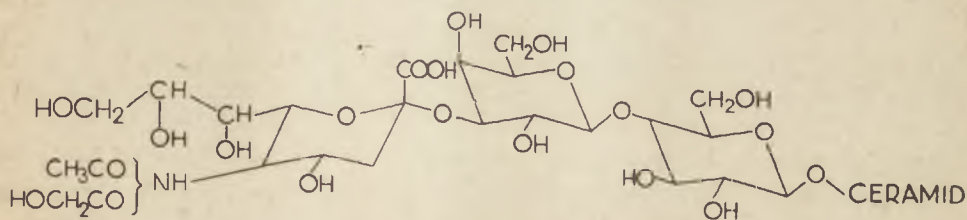
Ze względu na skład cukrów glikosfingolipidy erytrocytów dzielą się na dwie grupy: typu globozydu i typu hematozydu. Glikosfingolipidy typu globozydu, zawierające N-acetylogalaktozoaminę lub N-acetyloglukozaminę są charakterystyczne dla erytrocytów człowieka (AcNHGal-(1→3)-Gal-(1→4)-Gal-(1→4)-Glc-(1→1)-ceramid), świni (AcNHGal-(1→3)-Gal-(1→4)-Gal-(1→4)-Glc-(1→1)-ceramid) (74), królika (Gal-(1→3)-Gal-(1→3)-AcNHGlc-(1→3)-Gal-(1→4)-Glc-(1→1)-ceramid) (24), wołu (Gal-(1→3)-AcNHGlc-(1→4)-Gal-(1→4)-Glc-ceramid) (47), owcy, kozy, świnki morskiej (typ AcNHGal) i osła (typ AcNHGlc). Glikosfingolipidy typu hematozydu występują w erytrocytach konia, psa i kota (tablica 4).

Tablica 4

Budowa glikolipidów typu hematozydu (12, 36, 48)

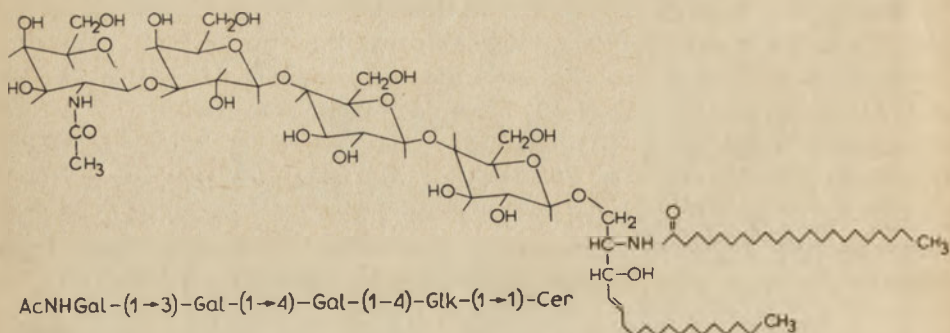
Gatunek	Proponowana struktura
Koń	NGNA-(2 → 3)-Gal-(1 → 4)-Glc-(1 → 1)-ceramid
Pies	NANA-(2 → 3)-Gal-(1 → 4)-Glc-(1 → 1)-ceramid 73% NGNA-(2 → 3)-Gli-(1 → 4)-Glc-(1 → 1)-ceramid 27%
Kot	NGNA-(2 → 3)-NGNA-(2 → 3)-Gal-(1 → 4)-Glc-(1 → 1)-ceramid

Hematozyd z erytrocytów psa został wyodrębniony przez Klenka i Heuera (48) i ma strukturę przedstawioną na schemacie 6. Podobną strukturę ma hematozyd z erytrocytów konia. Niedawno Handa i Yamakawa (36) wykazali, że hematozyd z erytrocytów psa zawiera mieszaninę NGNA i NANA w stosunku 1:2,7. Strukturę globozydu z erytrocytów człowieka opracowali w 1965 roku Yamakawa, Nishimura i Kamimura (132) (schemat 7). Identyczną strukturę ma globozyd z erytrocytów świni (79).

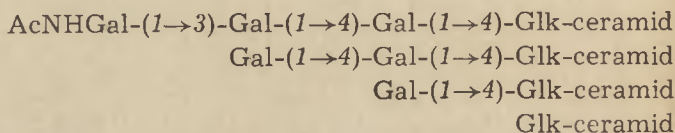


Schemat 6. Struktura hematozydu

W 1963 roku Svennerholm i Svennerholm (115) wyizolowali z krwi człowieka następujące blisko spokrewnione glikolipidy: 1. glikozyloceramid, 2. laktozyloceramid, 3. trójheksozyloceramid i 4. czteroheksozyloceramid. Związki te są typu glikosfingolipidów obojętnych i mają wspólną część glikozyloceramidową.



Schemat 7. Struktura globozydu



Końcówką N-acetylogalaktozoaminę globozydu z erythrocytów człowieka i świni można odszczepić za pomocą β -N-acetyloheksozoaminozydazy, co wskazuje, że wiązanie glikozydowe między N-acetylogalaktozoaminą a galaktozą w tym glikolipidzie jest typu β (79). Podobnie, β -glikozydaza otrzymana z mózgu szczura katalizuje hydrolizę glikozyloceramidu (27, 28), a stosunkowo niespecyficzna β -galaktozydaza katalizuje hydrolizę laktozyloceramidu i galaktozylo-galaktozyloglukozyloceramidu (27, 29). Szczególnie czułą metodę oznaczania ilościowego wyżej wymienionych glikolipidów obojętnych opracowali Vance i Sweeley (121). Metoda ta obejmuje analizę metyloglikozydów (otrzymanych w wyniku kwaśnej metanolizy), przy pomocy chromatografii gazowej.

Erythrocyty świni w porównaniu z erythrocytami człowieka zawierają znacznie większą ilość galaktozylo-galaktozyloglukozyloceramidów i globozydów (117). Interesujące jest, że wykryty w wątrobie człowieka dwugalaktozyloceramid nie występuje w erythrocytach (72).

Pięcioheksozyloceramid jest charakterystycznym glikosfingolipidem erythrocytów królika (24) i nie występuje w erythrocytach ludzkich. Obecnie uważa się, że gangliozydy i grupowe substancje krwi są jedynymi glikolipidowymi składnikami błony erythrocytów człowieka i świni (117). Erythrocyty, w których globozyd jest głównym glikolipidem, zawierają także małe ilości glikosfingolipidów z kwasem sialowym (132).

4. Immunochemiczne właściwości glikosfingolipidów

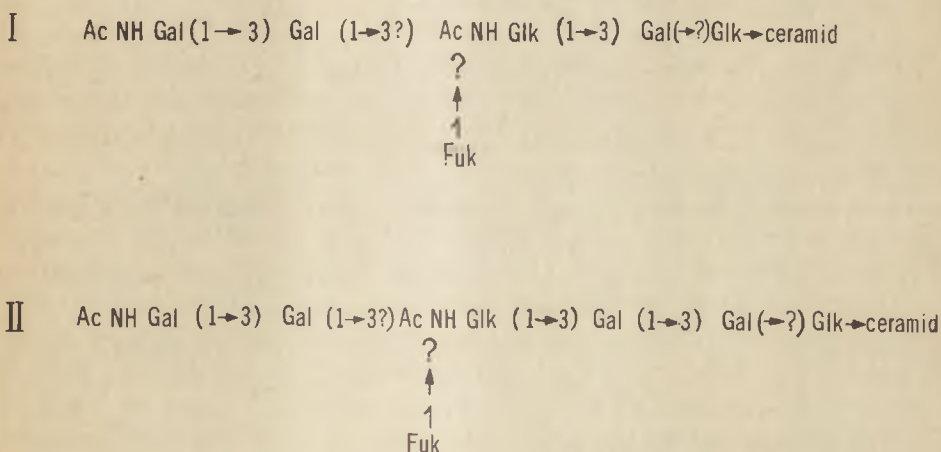
Od czasu wykrycia substancji grupowych krwi u ludzi (56) intensywne badania prowadzono nad antygenami występującymi na powierzchni erytrocytów (43, 124). Z 60-ciu obecnie znanych substancji grupowych krwi co najmniej pięć ma charakter glikolipidowy. W związku z tym badania dotyczące struktury i immunochemicznych właściwości glikosfingolipidów mają istotne znaczenie w zrozumieniu zjawisk zachodzących między innymi podczas aglutynacji erytrocytów i transplantacji organów.

Tablica 5

Skład frakcji glikolipidowych substancji grupowej A (54)

	Stosunek molowy				
	Glk	Gal	Fuk	GlkNH ₂	GalNH ₂
Glikolipid I	1	2	0,91	0,94	0,94
Glikolipid II	1	2,8	1	1	1
Glikolipid III	1	3	0,9	2,6	1,3

W 1953 roku Yamakawa i Lida (130) wyosobnili z erytrocytów człowieka glikosfingolipid, który hamował hemaglutynację erytrocytów danego typu krwi przez odpowiednie przeciwciała. Dalszy rozwój badań nad glikolipidowym charakterem substancji grupowych krwi zawdzięczamy pracy Kościelaka (53), który z erytrocytów ludzkich wyodrębnił glikosfingolipid o właściwościach entygenowych typu A. W 1968 ro-



Schemat 8. Struktura I i II substancji glikolipidowej grupy A

ku Hakamori i Strycharz (35) otrzymali z erytrocytów ludzkich trzy różne frakcje glikolipidowe, wykazujące aktywność substancji grupowej krwi typu A. Każda z nich zawierała galaktozę, glukozę, fukozę, N-acetyloglukozoaminę i N-acetylogalaktozoaminę w stosunku 2,4:1:1:1:1.

Dalszą ich charakterystykę podali Kościelak i wsp. (54) (tablica 5) proponując dla dwu glikolipidowych substancji grupowych A budowę przedstawioną na schemacie 8. Otrzymano także glikolipid wykazujący aktywność grupową krwi typu B (35). Glikolipid ten różni się od glikosfingolipidu o aktywności A tylko brakiem N-acetylogalaktozoaminy. Glikolipid typu O zawiera glukozę, galaktozę, fukozę, N-acetylglukozaaminę i hamuje hemaglutynację erytrocytów typu H i Le^b (35). Dokładna struktura glikosfingolipidów o właściwościach antygenowych substancji grupowych krwi ludzkiej nie jest dotychczas całkowicie udowodniona. Na podstawie podobieństwa stosunków molarnych i składu cukrów w glikolipidach do stosunków i składu cukrów w glikoproteidach (124) wykazujących grupowy charakter typu krwi ludzkiej, zaproponowano następujące wzory strukturalne dla glikolipidów:

Grupa A. AcNHGal-Gal-AcNHGlc-Gal-Glc-sfingolipid



Grupa B. Gal-Gal-AcNHGlc-Gal-Glc-sfingolipid



Grupa H/Le^b. Gal-AcNHGlc-Gal-Glc-sfingolipid



Grupa Le^a. Gal-AcNHGlc-Gal-Glc-sfingolipid



We wszystkich dotychczas wyodrębnionych grupowych substancjach krwi występuje fukoza, która prawdopodobnie jest niezbędna do utrzymania odpowiedniej immunospecyficznej konfiguracji (62). Usunięcie fukozy za pomocą łagodnej kwaśnej hydrolizy powoduje obniżenie aktywności immunologicznej glikolipidów (34). W dalszym ciągu jednak istnieje kontrowersja, co do występowania w erytrocytach glikoproteidowych substancji grupowych krwi. I tak Poulík (94) ekstrahując erytrocyty mieszaniną *n*-butanol-woda otrzymał grupowe substancje A, B i MN w fazie wodnej, co świadczyłoby o ich glikoproteidowym charakterze. Z drugiej strony Hakamori i Strycharz (35) wykazali, że aktywność A, B, H i Le^b jest uwarunkowana przez specyficzne glikosfingolipidy błony erytrocytów. Zarówno glikoproteidy jak i glikolipidy zawierają ten sam łańcuch cukrowy, w związku z czym mogą mieć ten sam antygenowy charakter substancji grupowych krwi. Nie należy jednak wykluczać możliwości, że glikoproteidy są aktywne tylko dlatego, że zawierają niewielką frakcję glikosfingolipidów o wysokiej aktywności antygenowej. Dodatkowe dane o glikosfingolipidowej naturze niektórych substancji grupowych krwi pochodzą z prac nad Le^a i Le^b człowieka (70) i J bydła (39, 109, 113). Gardas

i Kościelak (26) wykazali aktywność grupową A i B zarówno w frakcji glikolipidowej jak i glikoproteidowej.

Glikolipidy o antygenowym charakterze substancji grupowych krwi dzielimy na rozpuszczalne i strukturalne. Rozpuszczalne glikosfingolipidy są adsorbowane, a właściwie wbudowywane do błony w plazmy (69, 70). Do klasy tej należą substancje grupowe Le^a i Le^b człowieka (70) i J bydła (39), R owiec (96) i A świni (1). Strukturalne glikosfingolipidy są syntetyzowane i wbudowywane w błonę erytrocytów w szpiku kostnym. Należą tu grupowe substancje krwi człowieka typu A, B, O.

Jednym z glikosfingolipidów wyodrębnionych z erytrocytów owcy (86) i kota (131) o antygenowym charakterze jest hapten Forssmana. Makita, Suzuki i Yosizawa (66) podali jego strukturalny wzór: $AcNHGal-(1\rightarrow3)-Gal-(1\rightarrow4)-Gal-(1\rightarrow4)-Glc$ -sfingolipid. Haptent ten wykazuje także słabą aktywność substancji grupowej krwi typu A, którą przypisuje się identycznemu zakończeniu łańcucha cukrowego $AcNHGal-(1\rightarrow3)-Gal-$.

Zastosowanie chromatografii gazowej do analizy glikosfingolipidów umożliwiło dokładną analizę kwasów tłuszczowych wchodzących w skład ceramidowej części glikolipidów. Okazało się, że α -hydroksy kwasy tłuszczowe występują w małej ilości lub są nieobecne w glikosfingolipidach erytrocytów (117). Stanowią one natomiast główną grupę kwasów tłuszczowych w glikolipidach wątroby (73), a także w galaktozyloceramidach z mózgu (116).

Glikosfingolipidy erytrocytów świni i leukocytów człowieka zawierają znaczne ilości kwasu palmitynowego i stearynowego (117). Kwas lignocerynowy i nerwonowy zidentyfikowano jako główne kwasy tłuszczowe glikosfingolipidów o antygenowym charakterze substancji grupowych krwi typu A, B, O (35).

Tablica 6

Skład zasad w glikozyloceramidach z surowicy bydła* (110)

Zasady nasycone		Zasady nienasycone	
Undekasfinganina	0,45	Undekasfingenina	0,09
Dodekasfinganina	0,04	Dodekasfingenina	0,08
Tridekasfinganina	0,07	Tridekasfingenina	0,015
Tetradekasfinganina	0,013	Tetradekasfingenina	0,07
Pentadekasfinganina	0,05	Pentadekasfingenina	0,41
Heksadekasfinganina	1,00	Heksadekasfingenina	0,30
Heptadekasfinganina	6,58	Heptadekasfingenina	0,43
Sfinganina	2,84	Sfingenina	7,64
Nonadekasfinganina	0,40	Nonadekasfingenina	0,29
Eikozasfinganina	0,58	Eikozasfingenina	2,37

* wyrażony stosunkiem ilości zasady do ilości heksadekasfinganiny

Dotychczas niewiele zebrano danych o charakterze zasad wchodzących w skład glikosfingolipidów. Gangliozydy wyodrębnione z centralnego ukła-

du nerwowego zawierają mieszaninę sfingeniny i eikozasfingeniny (104, 114), podczas gdy glikosfingolipidy z wątroby ludzkiej zawierają heptadekasfingeninę, sfingeninę i eikozasfingeninę wraz z małą ilością ich nasyconych analogów (45, 46, 76). W erytrocytach człowieka sfingenina jest główną zasadą glikosfingolipidów, a sfinganina stanowi zaledwie 5% (121). Ostatnio podano (110) obszerną charakterystykę zasad wchodzących w skład glikosfingolipidów z krwi bydła (tablica 6). Okazało się, że ilość sfingeniny w stosunku do innych zasad wzrasta wraz z wydłużaniem się heksozydowej części glikosfingolipidów.

LITERATURA

1. Andersen E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **97**, 205 (1962).
2. Anderson H. M., Turner J. C., *J. Clin. Invest.* **39**, 1 (1960).
3. Azen E. A., Orr S., Smithies I., *J. Lab. Clin. Med.* **65**, 440 (1965).
4. Bakerman S., Wasemiller G., *Biochemistry* **6**, 1100 (1967).
5. Ballantine R., *J. Cell. Comp. Physiol.* **23**, 21 (1944).
6. Bangham A. D., Pethica B. A., Seaman G. V. G., *Biochem. J.* **69**, 12 (1958).
7. Baranowski T. E., Lisowska R., Morawiecki A., Romanowska E., Stróżecka K., *Arch. Immunol. Ter. Dośw.* **7**, 15 (1959).
8. Benson A., Seventh Int. Congress of Biochem., Tokyo **3**, 525 (1967).
9. Bezkorovainy A., Springer G. F., Hotta K., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 501 (1966).
10. Bishop C., Surgenor D. M., w *The Red Blood Cell*, Academic Press, New York 1964.
11. Blumenfeld O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 200 (1968).
12. Bosman H. B., Hagopian A., Eylar E. H., *Arch. Biochem.* **128**, 51 (1968).
13. Burger S. P., Fujii T., Hanshan D. J., *Biochemistry* **7**, 3682 (1968).
14. Cook G. M. V., Eylar E. H., *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 57 (1965).
15. Cook G. M. V., Heard D. H., Seaman G. F. V., *Exptl. Cell Res.* **28**, 27 (1962).
16. Copeland P. L., Blumenfeld O. O., *Federation Proc.* **28**, 404 (1969).
17. Criddle R. S., Bock R. M., Green D. E., Tisdalen H., *Biochemistry* **1**, 827 (1962).
18. Danielli J. F., Davson H., *J. Cell Physiol.* **5**, 495 (1935).
19. Danielli J. F., Davson H., w *Biological Membrane Structure*, red. Branton D. i Park R. B., Little Brown Comp., Boston 1968, str. 69.
20. van Deenen L. L. M., de Gier J., Bishop C., Surgenor D. M. w *The Red Blood Cell*, Acad. Press, New York 1964.
21. Demus H., Mehl E., *Biochim. Biophys. Acta* **203**, 291 (1970).
22. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J., *Arch. Biochem.* **100**, 119 (1963).
23. Drabkin D. L., *J. Biol. Chem.* **40**, 373 (1941).
24. Eto T., Ichikawa Y., Nishimura K., Andos., Yamakawa T., *J. Biochem (Tokyo)* **64**, 205 (1968).
25. Eylar E. H., Madoff M. A., Brody O. V., Oncley J. L., *J. Biochem.* **237**, 1992 (1962).
26. Gardas A., Kościelak J., *Vox Sang.* **20**, 137 (1971).

27. Gatt S., *Israel J. Med. Sci.* **1**, 624 (1965).
28. Gatt S., *Biochem. J.* **101**, 687 (1966).
29. Gatt S., Rapport M. M., *Biochem. J.* **101**, 680 (1966).
30. Gier J. de, van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 286 (1961).
31. Glaeser D. M., Mel H. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 77 (1966).
32. Green D. E., Haard N. F., Lenaz G., Silman H. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 277 (1968).
33. Gortner E. M. D., Grendel F., *J. Exptl. Med.* **41**, 439 (1925).
34. Haggis G. H., Michie D., Muir A. R., Roberts K. B., Walker P. B. M., Wstęp do Biologii Molekularnej, PWRL, Warszawa 1968.
35. Hakomori S. I., Strycharz G. D., *Biochemistry* **7**, 1279 (1968).
36. Handa S., Yamakawa T., *Jap. J. Exptl. Med.* **34**, 293 (1964).
37. Hillier J., Hoffman J. P., *J. Cell. Comp. Physiol.* **42**, 203 (1953).
38. Hofman E., *Biochemia dynamiczna*, PWN, Warszawa 1969.
39. Horowitz M. I., Slomiany B. L., w *Blood and Tissue Antigens*, red. D. Aminoff, Academic Press New York 1970, str. 131.
40. Howl C., *J. Immunol.* **66**, 9 (1951).
41. Jirgensons B., Springer G. F., *Science* **162**, 365 (1968).
42. Jorpes E., *Biochem. J.* **26**, 1489 (1932).
43. Kabat E. A., *Blood Group Substances*, Academic Press, New York 1956.
44. Kathan R. H., Adamany A., *J. Biol. Chem.* **242**, 1716 (1967).
45. Karlsson K. A., *Acta Chem. Scand.* **18**, 565 (1964).
46. Karlsson K. A., *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 230 (1968).
47. Khun R., Wiegandt H., *Z. Naturforsch.* **18**, 541 (1963).
48. Klenk E., Heuer K., *Deutsch. Z. Verdau Stoffwechselkr.* **20**, 180 (1960).
49. Klenk E., Lauenstein K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **288**, 220 (1951).
50. Klenk E., Wolter H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **291**, 259 (1952).
51. Klenk E., Uhlenbruck G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **319**, 151 (1960).
52. Korn E. D., *Science* **153**, 1491 (1966).
53. Kościelak J., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 313 (1963).
54. Kościelak J., Piasek A., Górniak H., w *Blood and Tissue Antigens* red. D. Aminoff, Academic Press, New York-London 1970, str. 163.
55. Laico M. T., Ruoslahti E. J., Papermaster D. S., Dreyer W. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **67**, 120 (1970).
56. Landsteiner K., *Z. Bakteriolog.* **27**, 357 (1900).
57. Lauf P. K., Poulik M. D., *Brit. J. Haemat.* **15**, 191 (1968).
58. Lenard W., *Biochemistry* **9**, 1129 (1970).
59. Lenard W., Singer S. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1828 (1966).
60. Lenard W., Singer S. J., *Science* **159**, 738 (1968).
61. Lenaz G., Heard N. F., Silman H. L., Green D. E., *Arch. Biochem.* **128**, 293 (1968).
62. Lloyd K. O., Kabat E. A., Rosenfield R. E., *Biochemistry* **5**, 1902 (1966).
63. Maddy A. H., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 448 (1964).
64. Maddy A. H., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 193 (1966).
65. Maddy A. H., Malcolm B. R., *Science* **150**, 1616 (1965).
66. Makita A., Suzuki C., Yosizawa Z., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 502 (1966).
67. Marchesi S. L., Steers V. T., *Science* **159**, 203 (1968).
68. Marchesi S. L., Steers E., Marchesi V. T., Tillack T. W., *Biochemistry* **9**, 50 (1969).

69. Marcus D. M., Cass L. E., *New Eng. J. Med.* **280**, 994 (1969).
70. Marcus D. M., Cass L. E., *Science* **164**, 553 (1969).
71. Marks P. A., Johnson A. B., Hirschberg E., Banks J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**, 95 (1958).
72. Martensson E., *Acta Chem. Scand.* **17**, 1174 (1963).
73. Martensson E., *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 296 (1966).
74. Matsumoto M., *J. Biochem. (Tokyo)* **43**, 53 (1956).
75. Mazia D., Ruby A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **61**, 1005 (1968).
76. Michalec C., Kolman Z., *Clin. Chim. Acta* **13**, 529 (1966).
77. Mitchell C. D., Hanahan D. J., *Biochemistry* **5**, 51 (1966).
78. Mitchell C. D., Mitchell W. B., Hanahan D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 348 (1965).
79. Miyatake T., Handa S., Yamakawa T., *Jap. J. Exptl. Med.* **38**, 135 (1968).
80. Morawiecki A., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 339 (1964).
81. Moskowitz M., Calvin M., *Exptl. Cell Res.* **3**, 33 (1952).
82. Nelson G. J., *Biochim. Biophys. Acta* **144**, 221 (1967).
83. Nelson G. J., *J. Lipid Res.* **8**, 374 (1967).
84. Ohkuma S., Ikemoto S., *Nature* **212**, 198 (1966).
85. Ohkuma S., Shinohara T., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 169 (1967).
86. Papirmeister B., Mallette M. F., *Arch. Biochem.* **57**, 94 (1955).
87. Parpart A. K., Ballentine R., w *New Tendencies in Physiology and Biochemistry* red. E. Barron, Academic Press, New York 1952, str. 735.
88. Parpart A. K., Dzieman A. J., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant Biol.* **8**, 17 (1940).
89. Pigman W., Downs F., Moschera J., Weiss M. w *Blood and Tissue Antigens*, Academic Press, New York 1970, str. 205.
90. Ponder E., *Hemolysis and Related Phenomena*, E. Grunei, K. Stratton, New York 1943.
91. Ponder E., Ponder R. V., *Rev. Hematol.* **15**, 411 (1960).
92. Poulik M. D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **162**, 211 (1969).
93. Poulik M. D., *Clin. Exp. Immun.* **4**, 165 (1969).
94. Poulik M. D. w *Red Cell Membrane*, red. J. B. Lippincott, Philadelphia Toronto 1969, str. 131.
95. Prankerd R. A. J., *J. Physiol (London)* **193**, 325 (1958).
96. Rasmusen A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **97**, 306 (1962).
97. Reed C. F., Swisher S. N., *J. Clin. Invest.* **45**, 777 (1966).
98. Rega A. F., Weed R. I., Reea C. F., Rothstein A., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 297 (1967).
99. Robertson J. D., *Progr. Biophys. Chem.* **10**, 344 (1960).
100. Robertson J. D., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 421 (1966).
101. Roelofsen B., cyt. w poz. 99.
102. Rosenberg S. A., Guidotti G., *J. Biol. Chem.* **243**, 1985 (1968).
103. Rosenberg S. A., Guidotti G. w *Red Cell Membrane* red. G. A. Jamieson i T. J. Greenwalt, Lippincott Comp., Philadelphia, Toronto, 1969, str. 93.
104. Sambasivarao K., McCluer R. H., *J. Lipid Res.* **5**, 103 (1964).
105. Schmidt E. O., Bear R. S., Clark G. L. w *Biological Membrane Structure*, D. Branton i R.B. Park, Little Brown Comp., Boston 1969, str. 95.
106. Schneiderman L. J., Junga I. G., *Am. J. Physiol.* **210**, 139 (1968).
107. Schrier S. L., *J. Clin. Invest.* **42**, 756 (1963).
108. Schwann B. P., *Advan. Biol. Physiol.* **5**, 147 (1957).
109. Słomiany B. L., Horowitz M. J., 158 ACS Meeting N.Y.C. 1969, abstr. No 189.

110. Slomiany B. L., Horowitz M. J., *Biochim. Biophys. Acta* **218**, 278 (1970).
111. Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* **4**, 394 (1962).
112. Sparks P. S., Beuttler E., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 665 (1965).
113. Springer G. F., Nagi Y., Tegtmeyer H., *Biochemistry* **5**, 3254 (1966).
114. Stancev N. F., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 733 (1962).
115. Svennerholm E., Svennerholm L., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 432 (1963).
116. Svennerholm L., Stalberg-Stenhagen S., *J. Lipid Res.* **9**, 215 (1968).
117. Sweeley C. C., Dawson G., w *Red Cell Membrane*, red. G. A. Jamieson i T. J. Greenwalt, Lippincott, Comp., Philadelphia, Toronto 1969, str. 172.
118. Thorun W., Mehl E., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 132 (1968).
119. Uhlenbruck G., *Nature* **190**, 181 (1961).
120. Vacca J. B., Nims R. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **105**, 100 (1960).
121. Vance E. D., Sweeley C. C., *J. Lipid Res.* **8**, 621 (1967).
122. Wallach D. F. H., Zahler P. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1552 (1966).
123. Wallach D. F. H., Zahler P. H., *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 186 (1968).
124. Watkins W. M., *Science* **152**, 172 (1966).
125. Ways P. O., *J. Lipid Res.* **8**, 518 (1967).
126. Westerman M. P., Pierce L. E., Jensen W. N., *Lab. Clin. Med.* **62**, 394 (1963).
127. Winzler R. J., w *Red Cell Membrane*, red. G. A. Jamieson i T. J. Greenwalt, Lippincott Comp., Philadelphia, Toronto 1969, str. 157.
128. Winzler R. J., Harris E. D., Pekas D. J., Johnson, Weber P., *Biochemistry* **6**, 195 (1967).
129. Woodward D. O., Munkres K. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 872 (1966).
130. Yamakawa R., Lida T., *Jap. J. Exptl. Med.* **23**, 327 (1953).
131. Yamakawa T., Irie R., Iwanaga M., *J. Biochem. (Tokyo)* **48**, 190 (1960).
132. Yamakawa T., Nishimura S., Kamimura M., *Jap. J. Exptl. Med.* **35**, 201 (1965).
133. Yamakawa T., Suzuki S., *J. Biochem. (Tokyo)* **38**, 199 (1951).
134. Yamakawa T., Suzuki S., *J. Biochem. (Tokyo)* **39**, 393 (1952).
135. Zahler P. H., *Experientia* **25**, 449 (1969).
136. Zwaal A. F. R., van Deenen M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 44 (1968).
137. Zwaan J., *Anal. Biochem.* **21**, 155 (1967).

KRZYSZTOF STAROŃ*

Związki fluoryzujące jako wskaźniki zmian konformacyjnych błon związanych z transportem energii

Fluorescent Probes in Investigations of Energy-Linked Membranes Conformational Changes

Fluorescent probes are used as conformational changes indicators. Their applications and proposed mechanisms of response in energized membranes are reviewed in this article.

I. Zmiany strukturalne mitochondriów towarzyszące sprzężonemu transportowi elektronów

Transportowi elektronów w sprzężonych chloroplastach i mitochondriach lub też w ich fragmentach towarzyszy wytworzenie wysokoenergetycznego wiązania między cząsteczką ADP i fosforanem. Na podstawie wyników badań tych procesów przedstawiono przypuszczalne mechanizmy przekształcania energii utlenianych substratów w inne jej formy. W swojej teorii chemicznej Slater (20, 44) zakładał powstanie związku wysokoenergetycznego w wyniku reakcji oksydoredukcyjnej dwóch przenośników elektronów między jednym z nich a bliżej nie określonym uniwersalnym związkiem. Mitchell (20, 31) natomiast zaproponował mechanizm, w którym energia potrzebna do przyłączenia fosforanu do ADP pochodzi z wytworzonej podczas przepływu elektronów różnicy stężeń protonów po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej lub błony chloroplastu. Wreszcie Boyer (8, 9, 38) zwrócił uwagę, że pierwszym etapem fosforylacji może być związane ze zmianami konformacyjnymi przekształcenie

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

Wykaz stosowanych skrótów: ANS — 1-anilinonaftaleno-8-sulfonian, MNS — 2-(N-metyloanilino)-naftaleno-6-sulfonian, NBDCI — 7-chloro-4-nitrobenzo-2-okso-1,3-diazol, PS — pireno-3-sulfonian, FCCP — karbonylocyjanek *p*-trójfluorometoksyfenylohydrazonu

przenośników elektronów w bogatsze energetycznie formy. Proces ten byłby w pewnym sensie analogiczny do procesu zachodzącego w przeciwnym kierunku podczas zmiany konformacji cząsteczki miozyny połączonej z hydrolizą ATP.

Zmiany całej struktury mitochondrium, tak zwane zmiany konfiguracyjne (19), są jednym z efektów reakcji oksydoredukcyjnych zachodzących w jego błonie. Ujawniają się one jako zmiany rozpraszania światła przez zawieszinę mitochondriów i na obrazach z mikroskopu elektronowego. Chance i Packer (15) stwierdzili, że zmiany rozpraszania światła przez zawieszinę mitochondriów wątroby szczura następują bezpośrednio po zmianach oksydoredukcyjnych cytochromu *b*. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego mitochondriów w różnych stanach energetycznych, uzyskane przez Hackenbrocka (22, 23) i Greena (19), przedstawiają co najmniej dwa różne typy ich struktury, określane jako „skondensowane” (ang. *condensed, contracted*) i „spęczniałe” (ang. *swollen, orthodox*). Zmiany stanu energetycznego mitochondriów powodują przejście jednej struktury w drugą. Na tej podstawie Hackenbrock (22, 23) i Green (19) zakładali funkcjonalne powiązanie stanów konfiguracyjnych z procesami transportu energii. Jednakże, o ile zmiany konfiguracyjne są przyczynowo związane z tymi procesami, o tyle same nie warunkują właściwości energetycznych mitochondriów. Utrwalone za pomocą aldehydu glutarowego w określonym stanie konfiguracyjnym mitochondria wykazują zdolność do sprzężonego z procesami energetycznymi gromadzenia wapnia bez względu na to, czy jest to stan „skondensowany” czy też „spęczniały”, choć zdolność ta nie jest jednakowa (36). Wydaje się również, że czas potrzebny na przejście jednej konfiguracji w drugą, jak też czas zmian w rozpraszaniu światła jest zbyt długi w porównaniu do czasu innych procesów związanych z transportem energii (12). Wreszcie przejścia typu „spęczniały” — „skondensowany” nie zachodzą w cząstkach submitochondrialnych, mimo że cząstki te wykazują zdolność do syntezy ATP. Dlatego też zmiany konfiguracyjne są prawdopodobnie raczej następstwem procesów transportu energii niż mają z nimi funkcjonalne powiązanie (6, 14).

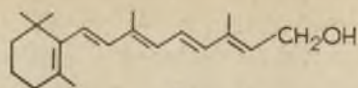
Wspomniana już teoria Boyera (8, 9, 38) zakładała istnienie takiego powiązania ze zmianami strukturalnymi na poziomie niższym niż całe organellum. Założenia Boyera opierały się przede wszystkim na podobieństwach między podstawowymi procesami związanymi z biologicznym przenoszeniem energii, to jest między fosforylacją na poziomie substratu, oksydacyjną fosforylacją i skurczem mięśnia (8) oraz na badaniach nad reakcjami wymiany $P_i \rightleftharpoons ATP$, $ADP \rightleftharpoons ATP$, $P_i \rightleftharpoons HOH$ i $ATP \rightleftharpoons HOH$ w mitochondriach (10). Badania te nie dawały jednak bezpośredniej odpowiedzi na pytanie: czy zmiany konformacyjne błon rzeczywiście mają miejsce i, jeżeli tak, jaki jest ich związek z transportem elektronów oraz procesem fosforylacji. W ciągu kilku ostatnich lat próbowano uzyskać odpowiedź na to pytanie przez zastosowanie fluoryzujących wskaźników zmian kon-

formacyjnych (ang. *fluorescent probes*), czyli związków niskocząsteczkowych, których fluorescencja w kompleksie z makrocząsteczką uwarunkowana jest stanem konformacyjnym tej ostatniej. Używając tego typu wskaźników już poprzednio zaobserwowano ujawniające się jako zmiany parametrów fluorescencji zmiany konformacyjne szeregu białek rozpuszczalnych, jak albuminy (49), białek Bence-Jonesa (18), apohemoglobiny i apomioglobiny (45), miozyny (17), chymotrypsyny (30), pepsynogenu i pepsyny (48), 1-fosfohydrolazy D-fruktozo-1,6-dwufosforanu (1) i innych. Zastosowanie tych wskaźników do badania zmian konformacyjnych związanych ze stanem energetycznym błon mitochondrialnych i chloroplastowych jest przedmiotem tego artykułu.

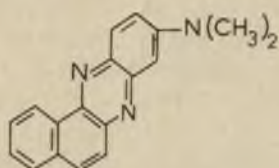
II. Fizykochemiczne podstawy zastosowania wskaźników

Związki zastosowane jako wskaźniki (rysunek 1) wykazują zwykle słabą fluorescencję w wodzie. Wydajność kwantowa oraz widmo fluorescencji zmienia się wraz ze zmianą otoczenia fluoryzującej cząsteczki (40, 46). Śledząc zmiany intensywności fluorescencji wskaźnika wprowadzonego w specyficzne miejsce makrocząsteczki lub błony można więc uzyskać informacje o zmianach zachodzących w najbliższym otoczeniu miejsca wiązania. Omówienie fizykochemicznych podstaw tych procesów można znaleźć w artykule dotyczącym zastosowania fluoryzujących wskaźników do badania zmian konformacyjnych białek (37). Dlatego też tutaj zostaną przedstawione tylko te zjawiska, które odgrywają zasadniczą rolę przy zastosowaniu wskaźników do badania stanu energetycznego błon.

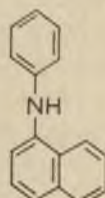
Zmiany parametrów fluorescencji wskaźnika wprowadzonego w określone miejsca makrocząsteczki lub błony łączą się przede wszystkim ze zmianami polarności oraz rozmieszczenia cząsteczek otoczenia wokół wzbudzonej cząsteczki wskaźnika, pozwalającymi na zmiany jej geometrii lub uniemożliwiającymi je. Istnieją związki, na przykład retinol (I), których fluorescencja zależna jest tylko od pierwszego z tych czynników: związki, na przykład 3-dwumetyloaminonaftourodyna (II), których fluorescencję określa drugi czynnik i wreszcie związki, na przykład N-naftylo-N-fenylamina (III), których fluorescencja zależna jest od obu tych parametrów. (39). Ponieważ zmiany konformacyjne mogą powodować zarówno zmiany polarności, jak i rozmieszczenia cząsteczek w otoczeniu miejsca wiązania, do badań używane są najczęściej związki trzeciego typu. Są to przeważnie pochodne N-naftylo-N-fenylaminy, jak 1-anilinaftaleno-8-sulfonian (ANS) (IV), 2-(N-metyloanilino)naftaleno-6-sulfonian (MNS) (V) oraz 2-p-toluidynylonaftaleno-6-sulfonian (TNS). Oprócz pochodnych N-naftylo-N-fenylaminy używane są często pochodne akrydyny, przede wszystkim atebryna (VIII) oraz pochodne fluoresceiny, jak rodamina B (VI) i rodamina 6G (VII) (27).



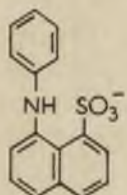
I



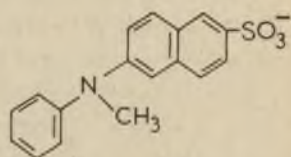
II



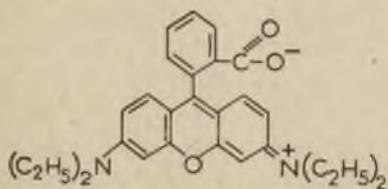
III



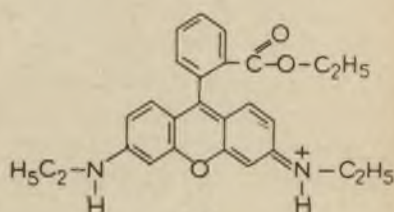
IV



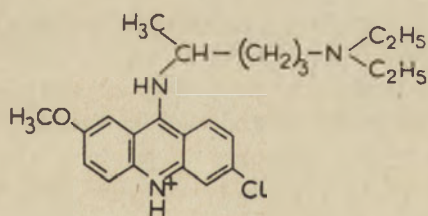
V



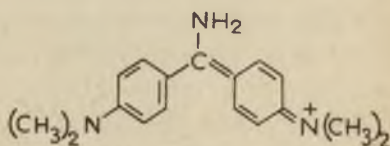
VI



VII



VIII



IX

Rys. 1. Budowa chemiczna niektórych wskaźników

I. retinol, II, 3-dwumetyloaminonaftofluordyna, III, N-1-naftylo-N-fenylaminy, IV, 1-anilino-naftaleno-8-sulfonian (ANS), V, 2-(N-metyloanilino) naftaleno-6-sulfonian (MNS), VI, Rodamina B, VII, Rodamina 6G, VIII, Atebryna, IX, Auramina O

Zmiana intensywności fluorescencji wskaźników typu pireno-3-sulfonianu (PS) zależy od innego niż opisane powyżej procesu. PS, oprócz emisji przy 420nm, charakterystycznej dla formy monomeru, po wytworzeniu dimeru między cząsteczką w stanie podstawowym i cząsteczką w stanie wzbudzonym tzw. ekscimeru (ang. *excimer*) ma zdolność emitowania światła o długości 500nm. Intensywność fluorescencji przy 500nm zależna jest od odległości między cząsteczkami PS. Dlatego też ze zmian intensywności fluorescencji w tym zakresie widma można wnioskować o zmianach objętości miejsca wiązania PS (11, 40).

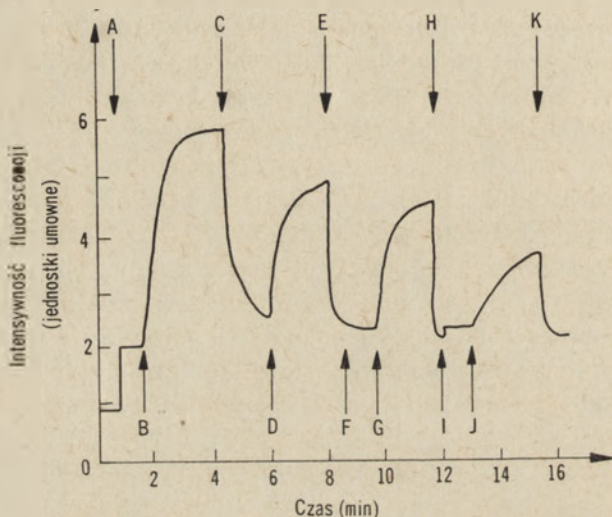
Odrębną grupę wskaźników stanowią związki wiążące się kowalencyjnie ze specyficznymi grupami białka. Przykładem może być łączący się z grupami tiolowymi 7-chloro-4-nitrobenzo-2-okso-1,3-diazol (NBDCI). Jego przydatność jako wskaźnika jest tym większa, że o ile sam NBDCI nie wykazuje fluorescencji, o tyle jego tiolowe pochodne fluoryzują w sposób zależny od właściwości otoczenia (39, 40). Jednakże ta grupa wskaźników znajdowała dotychczas małe zastosowanie w badaniach zmian konformacyjnych błon związanych z procesami energetycznymi.

Jak widać z tego krótkiego przeglądu, zastosowanie fluoryzujących wskaźników do badania zmian zachodzących w błonach może dostarczyć takich informacji, jak zmiany polarności, zmiany rozmieszczenia cząsteczek otoczenia czy też zmiany objętości miejsca wiązania. Badania kinetyczne pozwalają również na rozróżnienie poszczególnych miejsc wiązania i określenia ich dostępności dla cząsteczki wskaźnika. Wreszcie pomiary przenoszenia energii między cząsteczkami wskaźników w obrębie błony pozwalają na określenie odległości między poszczególnymi chromoforami (40).

III. Zależność intensywności fluorescencji wskaźnika od stanu energetycznego błony

Dodatek cząstek submitochondrialnych do roztworu wodnego ANS zwiększa wielokrotnie intensywność fluorescencji, podobnie jak dodanie mniej polarnego rozpuszczalnika, na przykład etanolu (3). Intensywność fluorescencji zależna jest zarówno od stężenia ANS, jak i od stężenia białka. Przy stosowanych zwykle stężeniach ANS (poniżej 100 μ M) nie wykazuje on wpływu na procesy transportu elektronów i fosforylacji (13). Natomiast dodatek substratu oddechowego w obecności tlenu lub dodatek ATP powoduje dalsze zwiększenie intensywności fluorescencji, przy czym proces ten może być powtarzany wielokrotnie (3). Zmiany te są widoczne zarówno podczas funkcjonowania całego łańcucha, jak też tylko pewnych jego fragmentów. Kolejne dodanie zredukcjonowanego NAD, rotenonu, bursztynianu, antymycyny, askorbinianu wraz z siarczanem N-metylofenazyiniowym, cyjanunku oraz ATP wraz z Mg²⁺ powoduje kolejno wzrost i spadek intensywno-

ści fluorescencji (39) (rysunek 2). Dodatek oligomycyny, przez zahamowanie reakcji powodujących rozpraszanie energii w błonie, powoduje dodatkowy wzrost intensywności fluorescencji ANS w obecności substratu oddechowego i tlenu (3, 34). Dodatek niewielkich ilości oligomycyny (ok. 0,1 μ g/mg białka) do cząstek submitochondrialnych otrzymanych w obecności EDTA powoduje wzrost intensywności fluorescencji ANS również pod wpływem dodanego ATP (34). Zmian takich nie obserwuje się lub intensywność fluorescencji osiąga swą początkową wartość w przypadku rozprężenia mitochondriów lub cząstek submitochondrialnych przez dodanie karbonylocyjanu *p*-trójfluorometoksyfenylohydrazonu (FCCP) (2, 13, 39).



Rys. 2. Zmiany intensywności fluorescencji 1-anilino-naftaleno-8-sulfonianu (ANS) w cząstkach submitochondrialnych przeprowadzanych w stan bogatszy energetycznie za pomocą różnych substratów wg (39)

Strzałki oznaczają kolejne wprowadzenie do zawiesiny cząstek submitochondrialnych: A. ANS, B. zredukowanego NAD, C. rotenonu, D. bursztynianu, E. antymycyny A, F. askorbinianu, G. siarczanu N-metylofenazyjowego, H. KCN, I. ATP, J. karbonylocyjanu *p*-trójfluorometoksyfenylohydrazonu (FCCP)

Zmiany intensywności fluorescencji ANS następują bezpośrednio po odpowiednich zmianach oksydoredukcyjnych przenośników łańcucha oddechowego, nie są jednak skorelowane z nimi w czasie. Związana z procesami oksydoredukcyjnymi transllokacja protonów nie wpływa bezpośrednio na fluorescencję ANS wskutek zmiany *pH*, gdyż w warunkach doświadczalnych intensywność fluorescencji ANS zmienia się w niewielkim stopniu w zakresie *pH* 7,4–10,15. Na tej podstawie Azzì i wsp. (3) wysunęli przypuszczenie, że zmiany fluorescencji mają związek z transportem energii, a nie z transportem elektronów. W zgodzie z tym przypuszczeniem

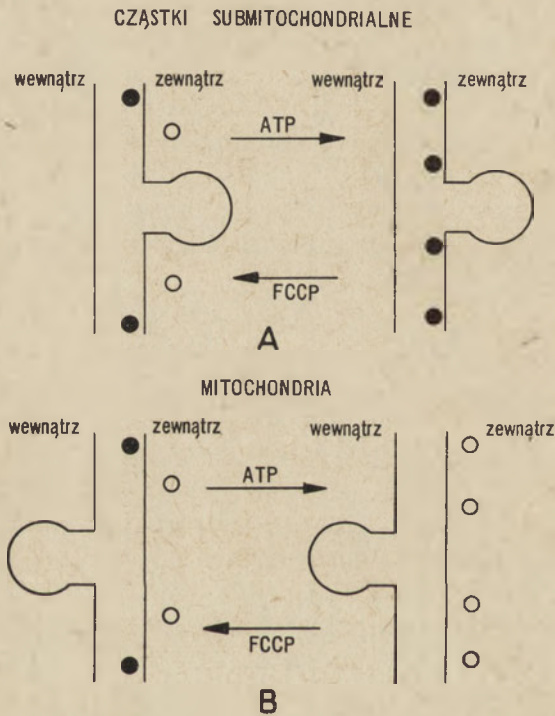
pozostaje brak zmian intensywności fluorescencji w mitochondriach lub cząstkach submitochondrialnych rozprzężonych, jakkolwiek niektóre przenośniki łańcucha oddechowego wydzielone w formie rozpuszczalnej (kompleks cytochromu *c* z fosfolipidami) powodują zmiany intensywności fluorescencji ANS wraz ze zmianą swego stanu oksydoredukcyjnego (4).

Związek między intensywnością fluorescencji ANS a stanem energetycznym błony pozwala na zastosowanie ANS jako wskaźnika takiego stanu, na podobnej zasadzie, jak wykrywanie syntezy ATP, transportu jonów (28), zmian *pH* (20, 31, 33), zmian fluorescencji chlorofilu *a* w chloroplastach (32), zmian właściwości kinetycznych i termodynamicznych cytochromu *b_T* w mitochondriach (16) oraz zmian rozpraszania światła przez zawieszinę mitochondriów lub cząstek submitochondrialnych (14, 35). Takie zastosowanie ANS, jak i innych wskaźników, nie wymaga precyzyjnego określenia charakteru zmian zachodzących w otoczeniu cząsteczki wskaźnika. Jest to natomiast niezbędne przy próbach wnioskowania ze zmian intensywności fluorescencji wskaźnika o zmianach strukturalnych błony. W tym ostatnim wypadku istotne jest rozróżnienie dwóch zasadniczych czynników wpływających na intensywność fluorescencji wskaźnika: pojawiania się nowych miejsc wiązania oraz wzrostu wydajności kwantowej fluorescencji związanego już wskaźnika. Zagadnienia te będą omawiane w następnych rozdziałach.

IV. Zależność intensywności fluorescencji wskaźnika od ilości miejsc wiązania

Wewnętrzna błona mitochondrialna jest strukturą niesymetryczną. Kierunek zmian intensywności fluorescencji ANS w mitochondriach i cząstkach submitochondrialnych, mających odmienną orientację błony, jest różny. Wzrost energii błony cząstek wyrażony jest wzrostem intensywności fluorescencji ANS, a wzrost energii błony mitochondriów jej spadkiem. Natomiast niezjonizowana pochodna ANS, 1-anilinoftaleno-8-sulfonamid, nie wykazuje żadnych zmian intensywności fluorescencji związanych ze wzrostem energii błony. Opierając się na tych spostrzeżeniach Azzari (2) badał zmiany w ilości przyłączonego ujemnie naładowanego ANS oraz kationowego wskaźnika Auraminy-0 (tetrametylodwuaminodwufenyloketoininy) do nienaruszonych mitochondriów oraz cząstek submitochondrialnych pod wpływem dodanego substratu. Zaobserwowane zmiany były zgodne z kierunkiem tworzonego potencjału oraz ładunkiem wskaźnika. Azzari i wsp. (5) stwierdzili dalej, że istnieje ścisła zależność zmian intensywności fluorescencji ANS w cząstkach submitochondrialnych od ilości wskaźnika związanego przez cząstki, jak też od ilości uwalnianej po dodaniu FCCP.

Z badań Skulacheva (25) wynika, że zmiany fluorescencji ANS mogą być wynikiem nieenzymatycznego wzrostu potencjału błony, na przykład wskutek zmiany stężenia potasu w obecności walinomycyny lub zmiany pH po obu stronach błony. Kierunek zmian intensywności fluorescencji nie jest w tym wypadku zależny od orientacji błony, lecz od rozłożenia potencjału po obu jej stronach. Na podstawie tych doświadczeń Skulachev (25, 43) przypuszcza, że zmiany intensywności fluorescencji ANS odpowiadają głównie zmianom ilości barwnika znajdującego się wewnątrz mitochondriów lub cząstek submitochondrialnych. Zmiany te zachodziłyby na skutek związanej z tworzeniem potencjału błony wędrówki ujemnie naładowowanych cząsteczek ANS poprzez błonę mitochondrialną, na



Schemat 1. Model zmian zachodzących w błonie mitochondrialnej, związanych ze zmianą intensywności fluorescencji ANS wg Azziego i wsp. (5)

A — cząstki submitochondrialne, B — mitochondria, białe koła oznaczają niefluoryzujące cząsteczki ANS, koła czarne — fluoryzujące cząsteczki ANS

zasadzie podobnej do wędrówki innych jonów (7, 21, 24, 29). Przy nadmiarze stosowanego wskaźnika w środowisku na zmiany w jego fluorescencji wpływałaby tylko ta część, która przenikałaby do wnętrza mitochondriów lub cząstek submitochondrialnych, jako że część zewnętrzna ulegałaby tylko nieznacznemu rozcieńczeniu.

Przypuszczenia Skulacheva (25, 43) są zgodne z opracowanym

przez A z z i e g o i wsp. (5) modelem zmian zachodzących w błonie mitochondrialnej pod wpływem przejścia w stan o wyższej energii a polegających na zwiększeniu ilości miejsc wiązania wskaźnika (schemat 1). Kierunek ruchu cząsteczek wskaźnika zależy od orientacji błony.

Istnieje jednak szereg faktów, które nie dają się wytłumaczyć taranslokacją ANS przez błonę mitochondrialną. Dlatego też dla ich wyjaśnienia proponowano inne mechanizmy, które przynajmniej za część zmian we fluorescencji wskaźników czynią odpowiedzialnymi zmiany zachodzące w miejscach ich wiązania.

V. Zależność intensywności fluorescencji wskaźnika od zmian zachodzących w miejscu wiązania

Miareczkowanie za pomocą ANS otrzymanych w obecności EDTA cząstek submitochondrialnych w pH 7,4 wykazuje nasycenie preparatu przy ilości 200nmol ANS/mg białka. Biorąc pod uwagę obliczone odległości, konieczne do przeniesienia energii między cząsteczkami ANS, oraz objętości fragmentów błon mitochondrialnych A z z i i wsp. (3) uważają, że wiązanie ANS zachodzi tylko w pewnych miejscach błony, nie zaś na całej jej powierzchni. Kinetyka wiązania ANS oraz innych pochodnych N-naftylo-N-fenyloaminy z błonami wskazuje, że istnieją dwa rodzaje miejsc, różniące się dostępnością i powinowactwem do wiązanej wskaźnika. Pierwszy rodzaj charakteryzuje krótki, rzędu kilku milisekund, półokres wiązania; miejsca drugiego rodzaju wiążą wskaźnik w czasie dłuższym, rzędu kilkunastu lub nawet kilkudziesięciu sekund. Zmiany intensywności fluorescencji wskaźnika występujące jednocześnie ze zmianami stanu energetycznego błony dotyczą wyłącznie miejsc o długim półokresie wiązania wskaźnika (11). Dobór odpowiednich warunków pomiaru, a więc stężenia cząstek submitochondrialnych, pH i siły jonowej pozwala na zmianę udziału poszczególnych miejsc wiązania w ogólnej intensywności fluorescencji wskaźnika (34).

Fakt łączenia się ANS z czystymi białkami wskazywał na możliwość podobnego współdziałania wskaźnika w obrębie błony białkolipidowej. Potwierdzeniem takiego przypuszczenia jest interpretacja widma wzbudzenia ANS lub MNS w kompleksie z cząstkami submitochondrialnymi. W odróżnieniu bowiem od podobnych widm wskaźników w roztworach wodnych lub alkoholowych, widmo kompleksu z cząstkami submitochondrialnymi ma dodatkowe maksimum wzbudzenia w okolicach 280nm, które może być wynikiem przeniesienia energii wzbudzenia z zawartych w białku aminokwasów aromatycznych do cząsteczki wskaźnika. Przeniesienie energii wzbudzenia zachodzi zarówno w miejscach charakteryzujących się krótkim, jak i długim półokresem wiązania. Różnice w procentowym udziale miejsca o krótkim półokresie w ogólnym wzroście intensywności

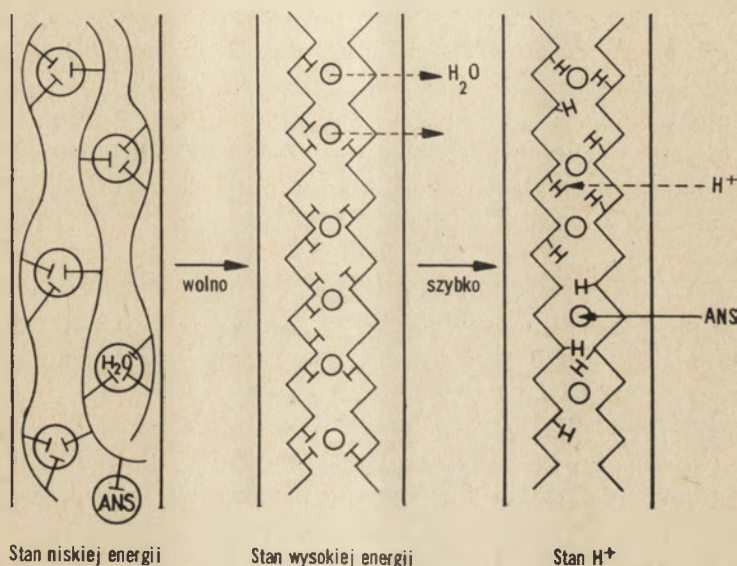
fluorescencji przy wzbudzeniu bezpośrednim i wzbudzeniu z przeniesieniem energii są niewielkie (11).

Według Brocklehursta i Raddy (11, 39) zmiany intensywności fluorescencji wskaźników pod wpływem przejścia cząstek submitochondrialnych w stan bogatszy energetycznie są wynikiem dwóch procesów: pojawiania się nowych, dodatkowych miejsc wiązania wskaźnika oraz wzrostu wydajności kwantowej fluorescencji wskaźnika już związanego. O wzroście wydajności kwantowej fluorescencji związanych cząsteczek wskaźnika pod wpływem przejścia błony w stan bogatszy energetycznie można wnioskować z krzywych miareczkowania wskaźnika cząstkami submitochondrialnymi w różnych stanach energetycznych oraz ze zmian w okresie fluorescencji, następujących pod wpływem zmiany stanu energetycznego. Świadczą o tym również zmiany intensywności fluorescencji powodowane przez rozprężenie cząstek znajdujących się w stanie bogatszym energetycznie. Krzywe spadku intensywności fluorescencji pod wpływem czynnika rozprężającego w zależności od czasu mają dla różnych wskaźników charakter dwustopniowy, przy czym początkowy szybki etap, o półokresie trwania 2—3 sekundy, jest niezależny od rodzaju wskaźnika (11) (dane A z i e g o i wsp. (5) nie potwierdzają tego faktu). O ile więc powolny etap, różny dla poszczególnych wskaźników, może być wynikiem wypływu ich cząsteczek z błony (co potwierdzają badania z rozcieńczeniem kompleksu wskaźnik-cząstka submitochondrialna przez albuminę) o tyle, według Brocklehursta i Raddy (11), szybki etap zmian podczas rozprężania odpowiada prawdopodobnie zmianom struktury błony.

Prace, przeprowadzone przez Raddę (41) nad zmianami intensywności fluorescencji różnych wskaźników w lipidowych micellach pod wpływem czynników zmieniających strukturę micelli, wykazały, że na zmiany intensywności fluorescencji ANS znajdującego się w strukturze wielofazowej, mającej tzw. wodę strukturalną, wpływa w istotny sposób ilość cząsteczek wody przenikających strukturę. W połączeniu z pozostałymi danymi stanowiło to podstawę dla stworzonego przez Raddę (39) modelu, w którym ruch wody związanej strukturalnie, zachodzący pod wpływem zmiany stanu energetycznego błony, jest bezpośrednią przyczyną zmian fluorescencji ANS. Według założeń Raddy (39) przejście błony w stan bogatszy energetycznie związane jest ze zmianami konformacyjnymi białek błony, prowadzącymi do powstania bardziej uporządkowanej struktury. Proces ten, przez zwiększenie ilości wiązań wodorowych między i wewnątrz cząsteczek poszczególnych białek prowadzi do usunięcia części wody z błony. Ta zmiana z kolei powoduje zmianę pK_a ujemnie naładowanych grup na powierzchni międzyfazowej i jednoczesny ruch protonów w głąb błony, co z jednej strony pozwala na wnikanie dodatkowej ilości ANS (zwiększenie powinowactwa do ujemnie naładowanego wskaźnika),

z drugiej zaś, jako skutek zmniejszenia ilości wody strukturalnej, zwiększenie wydajności kwantowej fluorescencji ANS (schemat 2).

Na poparcie tej hipotezy Rad d a (39) przytacza dwa fakty. Pierwszy — to zachowanie się w błonie wskaźnika innego typu niż ANS, piren-3-sulfonianu (11) (patrz rozdz. II). Fluorescencja przy 500nm, charakterystyczna dla wytworzonego ekscimeru, pojawia się podczas dodawania PS do cząstek submitochondrialnych i wzrasta w momencie przejścia cząstek w stan wyższej energii. Wzrost ten tłumaczy się częściowo zwiększeniem wiązania wskaźnika do błony, a częściowo zmniejszeniem objętości określonych obszarów błony, co zgodne jest z hipotezą ruchu cząsteczek wody.



Schemat 2. Model zmian zachodzących w błonie mitochondrialnej, związanych ze zmianą intensywności fluorescencji ANS wg Rad d y (39)

Drugim faktem, świadczącym z jednej strony o lokalizacji ANS na powierzchni międzyfazowej fazy polarnej i niepolarniej, z drugiej zaś o oddziaływaniu wody na cząsteczkę ANS w miejscu jej wiązania, jest efekt izotopowy, występujący przy zastąpieniu cząsteczek H_2O przez D_2O . Efekt ten wykazuje ANS i inne amfolitowe cząsteczki wskaźników, zarówno w wodzie, w micellach lipidowych, jak i w cząstkach submitochondrialnych w obu stanach energetycznych. Nie wykazują go natomiast wskaźniki o charakterze hydrofobowym, jak N-naftylo-N-fenylamina (39).

VI. Swoistość zmian konformacyjnych w II miejscu sprzężenia łańcucha oddechowego

Jak wspomniano w rozdziale III, wzrost intensywności fluorescencji ANS w cząstkach submitochondrialnych jest wynikiem utleniania dowol-

nego substratu lub też hydrolizy ATP (3). Jednakże zależność tego wzrostu od stopnia sprężenia cząstek nie jest we wszystkich wypadkach jednako-
wa. Nordenbrand i Ernster (34) oznaczyli wzrost intensywności fluorescencji ANS w całkowicie sprężonych cząstkach dla różnych substratów, stosując ekstrapolację krzywej zależności wzrostu intensywności fluorescencji od ilości dodawanego czynnika rozprzegającego (FCCP). Tylko w przypadku gdy substratem był bursztynian stan energetyczny cząstek ograniczał oddychanie proporcjonalnie do kinetyki pierwszego rzędu; zależność taka nie występowała w przypadku zastosowania jako substratu zredu. NAD ani askorbinianu wraz z siarczanem N-metylofenazyniowym. Również stosując inhibitory w przypadku utleniania bursztynianu otrzymywano jednakowy wzrost intensywności fluorescencji i kontroli oddechowej tylko przy częściowym zahamowaniu antymycyną A, a więc inhibitorem działającym w okolicach II miejsca sprężenia, lecz nie przy zastosowaniu malonianu lub azydku. Jednocześnie układ utleniający zredu. NAD jest mniej czuły na rozprzeganie przez FCCP niż utleniający bursztynian; układ utleniający askorbinian w obecności siarczanu N-metylofenazyniowego wykazuje większą czułość w stosunku do czynnika rozprzegającego.

Na podstawie tych faktów Nordenbrand i Ernster (34) przypuszczają, że wzrost intensywności fluorescencji ANS odpowiada nie tyle pojawieniu się wysokoenergetycznego pośrednika w dowolnym miejscu sprężenia, lecz powstaniu pewnej puli energetycznej, specyficznie sprzężonej z miejscem II. Wzrost intensywności fluorescencji powodowany przez utlenianie zredu. NAD lub też askorbinianu w obecności siarczanu N-metylofenazyniowego tłumaczy się możliwością powstawania odpowiednich równowag w obrębie puli energetycznej.

Taka interpretacja zmian fluorescencji ANS w błonie mitochondrialnej jest zgodna z innymi faktami świadczącymi o zmianach fizykochemicznych zachodzących w II miejscu fosforylacji łańcucha oddechowego, a ściślej — w obrębie cytochromu b (16).

VII. Uwagi końcowe

Przedstawione w artykule dane dotyczą głównie zastosowania jednego z używanych wskaźników, 1-anilinonaftaleno-8-sulfonianu (ANS), do badania błon mitochondrialnych. Ten bowiem wskaźnik i ten materiał były przede wszystkim stosowane w badaniach nad stanem energetycznym błon. Efekty obserwowane przy zastosowaniu innych wskaźników nie zawsze są identyczne z tymi, jakie można zauważyć przy użyciu ANS. Jest to związane ze swoistością poszczególnych wskaźników, wynikającą z ładunku, polarności czy wielkości cząsteczki. Badania prowadzone na chloroplastach wskazują na większe analogie procesów związanych z syntezą

ATP do zmian obserwowanych za pomocą wskaźników akrydynowych, przede wszystkim atebryny, niż do zmian obserwowanych przy użyciu ANS (27). Tak więc modele przedstawione w tekście nie są uniwersalnymi modelami zachowania się wskaźników w błonach.

Modele te różnią się przede wszystkim uwzględnieniem zmian w strukturze błony obok zmian wynikających z translokacji cząsteczek wskaźnika jako czynników wpływających na fluorescencję ANS. Jest warto podkreślenia, że przedstawiony w rozdziale V model R a d d y (39) przez skorelowanie zmian konformacyjnych z ruchem cząsteczek wody nawiązuje do tych teorii, które wskazują na istotne znaczenie tego procesu w obrębie miejsc fosforylacji (50). Co więcej, występowanie zmian strukturalnych w białkach błon mitochondriów i chloroplastów ostatnio potwierdzono za pomocą innych metod, jak fluorescencja zawartych w białku reszt aminokwasów aromatycznych (26), absorpcja w podczerwieni (47) czy też wymiana protonów między biorącymi udział w fotofosforylacji białkami a otoczeniem w czasie oświetlenia (42).

Wydaje się, że dokładne wyjaśnienie mechanizmu zmian konformacyjnych białek błon oraz umiejscowienie tego procesu w szeregu przemian, prowadzących od utlenienia przENOŚNIKÓW elektronów do syntezy cząsteczki ATP czy też transportu jonów przez błonę, nie będzie możliwe przy zastosowaniu jednego tylko wskaźnika. R a d d a (40) sugeruje kilka możliwych zastosowań wskaźników, które mogłyby być pomocne w rozwiązaniu tych problemów. Po pierwsze — użycie szeregu wskaźników, dostarczających różnych informacji, jak na przykład ANS i PS w przypadku cząstek submitochondrialnych. Dalej — wprowadzenie wskaźników wiążących się w możliwych do zlokalizowania miejscach błony. Wreszcie użycie wskaźników wiążących się kowalencyjnie z białkami błony, które pomimo niespecyficzności miejsca przyłączenia mogą być zlokalizowane przez rozfrakcjonowanie białek błony.

LITERATURA

1. Aoe H., Sarngadharan M. G., Pogell B. M., *J. Biol. Chem.* **245**, 6383 (1970).
2. Azzì A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 254 (1969).
3. Azzì A., Chance B., Radda G. K., Lee C. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **62**, 612 (1969).
4. Azzì A., Fleischer S., Chance B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 322 (1969).
5. Azzì A., Gherardini P., Santato M., *J. Biol. Chem.* **246**, 2035 (1971).
6. Azzone G. F., Azzì A., w *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 332.
7. Bakeeva L. E., Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kuliene V. V.,

- Levitsky D. O., Liberman E. A., Severina I. I., Skulachev V. P., *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 13 (1970).
8. Boyer P. D., w *Oxidases and Related Redox Systems*, red. T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison, John Wiley and Sons Inc., New York 1965, tom 2, str. 994.
 9. Boyer P. D., w *Biological Oxidation*, red. T. P. Singer, Interscience Publishers, New York 1968, str. 193.
 10. Boyer P. D., Bieber L. J., Mitchell R. A., Szabolcsi G., *J. Biol. Chem.* **241**, 5384 (1966).
 11. Brocklehurst J. R., Freedman R. B., Hancock D. J., Radda G. K., *Biochem. J.* **116**, 721 (1970).
 12. Chance B., Azzi A., Lee I. Y., Lee C. P., Mela L., w *Mitochondria. Structure and Function*, red. L. Ernster, Z. Drahota, Academic Press, Londyn 1969, str. 233.
 13. Chance B., Azzi A., Mela L., Radda G. K., Vainio H., *FEBS Letters*, **3**, 10 (1969).
 14. Chance B., Lee C. P., *FEBS Letters* **4**, 181 (1969).
 15. Chance B., Packer L., *Biochem. J.* **68**, 283 (1958).
 16. Chance B., Wilson D. F., Dutton P. L., Erecińska M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 1175 (1970).
 17. Duke J. A., McKay R., Botts J., *Biochim. Biophys. Acta* **126**, 600 (1966).
 18. Gally J. A., Edelman G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 175 (1965).
 19. Green D. E., Asai J., Harris R. A., Penniston J. T., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 684 (1968).
 20. Greville G. D., w *Current Topics in Bioenergetics*, red. D. R. Sanadi, Academic Press, New York 1969, tom 3, str. 1.
 21. Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kadziauskas Y. P., Liberman E. A., Skulachev V. P., Topali V. P., Tsofina L. M., Vladimirova M. A., *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 1 (1970).
 22. Hackenbrock C. R., *J. Cell Biol.* **30**, 269 (1966).
 23. Hackenbrock C. R., *J. Cell Biol.* **37**, 345 (1968).
 24. Isaev P. I., Liberman E. A., Samuilov V. D., Skulachev V. P., Tsofina L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 22 (1970).
 25. Jasaitis A. A., Kuliene V. V., Skulachev V. P., *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 177 (1971).
 26. Katsumata Y., Miyazi A., Ozawa T., *J. Biochem. (Tokyo)*, **68**, 423 (1970).
 27. Kraayenhof R., Katan M. B., *Proc. 2nd Intern. Congress of Photosynthesis Research*, Stresa 1971.
 28. Lehninger A. L., *Biochem. J.* **119**, 129 (1970).
 29. Liberman E. A., Skulachev V. P., *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 30 (1970).
 30. McClure W. O., Edelman G. M., *Biochemistry* **6**, 559 (1967).
 31. Mitchell P., *Biol. Rev.* **41**, 445 (1966).
 32. Murata B., Shugara K., *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 182 (1969).
 33. Neuman J., Jagendorf A. T., *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 109 (1964).
 34. Nordenbrand K., Ernster L., *European J. Biochem.* **18**, 258 (1971).
 35. Packer L., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 12 (1963).
 36. Packer L., *Federation Proc.* **29**, 1533 (1970).
 37. Próchniewicz E., Strzelecka-Gołaszewska H., *Post. Biochem.* **17**, 583 (1971).
 38. Pullman M. E., Schatz G., *Annual Rev. Biochem.* **36**, 539 (1967).
 39. Radda G. K., *Biochem. J.* **122**, 385 (1971).

40. Radda G. K., w *Current Topics in Bioenergetics*, red D. R. Sanadi, Academic Press, New York 1971, tom 4, str. 81
41. Radda G. K., Smith D. S., *FEBS Letters* 9, 287 (1970).
42. Ryrie I. J., Jagendorf A. T., *J. Biol. Chem.* 246, 3771 (1971).
43. Skulachev V. P., *FEBS Letters* 11, 301 (1970).
44. Slater E. C., *Nature* 172, 975 (1953).
45. Stryer L., *J. Mol. Biol.* 13, 482 (1965).
46. Udenfriend S., *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Academic Press, New York 1962, str. 5.
47. Wallach D. F. H., Graham J. M., Abstr, Intern. Symp. Biochem. Biophys. Mitochondrial Membranes, Bressanone 1971.
48. Wang J. L., Edelman G. M., *Federation Proc.* 29, 402 (1970).
49. Weber G., Young L. B., *J. Biol. Chem.* 239, 1415 (1964).
50. Williams R. J. P., w *Current Topics in Bioenergetics*, red. R. D. Sanadi, Academic Press, New York 1969, tom 3. str. 79.

JERZY PETRYNIAK*

Zastosowanie nukleaz do badania struktury i biologicznej aktywności RNA i DNA

Application of Nucleases in Studies on the Structure and Biological Activity of RNA and DNA

The specificity of some nucleases used in studies on the structure of RNA, DNA and synthetic polynucleotides is described. The application of these enzymes for determination of the relationship between the structure and biological activity of nucleic acids is presented.

Czynność biologiczna kwasów nukleinowych uwarunkowana jest ich strukturą, dlatego też poznanie tej struktury stanowi element niezbędny w zrozumieniu wielu podstawowych procesów życiowych. Metody enzymatyczne dzięki dużej wybiórczości nukleaz wobec różnych form strukturalnych kwasów nukleinowych stanowią obecnie niezastąpione narzędzie w analizie kwasów nukleinowych. Pewne fragmenty zagadnień związanych z nukleazami jak również z zastosowaniem ich do badania struktury kwasów nukleinowych były już omawiane w polskim piśmiennictwie (11, 41, 53, 75, 119, 120).

Nukleazy ze względu na położenie rozbijanych wiązań w łańcuchu polinukleotydowym dzielimy na endo- i egzonukleazy. Podział ten ma tylko względną wartość, ponieważ ten sam enzym w zależności od warunków reakcji może działać jak endo- lub egzonukleaza.

Egzonukleazy dzielą się na dwie grupy w zależności od sposobu w jaki rozkładają łańcuch polinukleotydowy. Jedne z nich działają w ten sposób, że jedna cząsteczka enzymu powoduje stopniowy rozkład jednego tylko

* Dr, Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polska Akademia Nauk, Wrocław

Wykaz stosowanych skrótów: lac — laktoza; d(Ap) — kwas dezoksyadenylowy z resztą fosforanową na C-3'; pA — kwas adenylowy z resztą fosforanową na C-5'; d(pC)₄ — czteronukleotyd złożony z kwasu dezoksytydylowego; poli-(A, C, U, G) — liniowy polimer o przypadkowej sekwencji; poli-dA, poli-dT lub (dA)_n·(dT)_n — podwójna spirala, w której jedno pasmo tworzy poli-dA, a drugie pasmo poli-dT; poli-d(A-T)_n lub d(A-T)_n — podwójna spirala, w której każde pasmo zawiera sekwencję dApdTp; d(pXpX) — dwunukleotyd o dowolnej sekwencji, RF — replikatywna forma RNA lub DNA, CMCT — metylo-*p*-tolueonosulfonian-*N*-cykloheksylo-*N'*-(β-morfolinyllo-(4)-etylo)karbodwuimid.

łańcucha polinukleotydowego, aż do zupełnego strawienia tego łańcucha. Po skończeniu hydrolizy jednego łańcucha dana cząsteczka enzymu może rozkładać następny łańcuch (ang. *processive degradation*). Taki mechanizm hydrolizy wykazują: rybonukleaza II z *E. coli*, fosfodwuesteraza z nerek owcy i fosforylaza polinukleotydowa (70, 97). Drugi sposób rozkładu łańcucha polinukleotydowego polega na tym, że jedna i ta sama cząsteczka enzymu zapoczątkowuje hydrolizę jednego łańcucha i nie dokończywszy jej zaczyna rozkładać drugi łańcuch, po chwili trzeci, czwarty itd. W efekcie zupełny rozkład jednego łańcucha katalizowany jest przez wiele cząsteczek tego samego enzymu. Ten mechanizm działania wykazuje nieswoista nukleaza z jadu węży oraz egzonukleaza ze śledziona (96, 102, 104).

W zależności od produktów ich działania dzielimy nukleazy na takie, które tworzą 3'-nukleotydy i oligonukleotydy zakończone resztą fosforanową przy C-3' oraz takie, które prowadzą do powstania 5'-nukleotydów lub oligonukleotydów z resztą fosforanową przy C-5'.

Rybonukleazy można dzielić ponadto na enzymy cyklizujące i niecyklizujące (12). Podział ten pokrywa się z zasadniczymi różnicami w mechanizmie działania obu grup enzymów. Rybonukleazy cyklizujące należą do klasy transferaz, podklasy fosfotransferaz (2.7.). Ich właściwością jest to, że wykorzystują grupę 2'-OH rybozy i zawsze powodują powstanie cyklicznych nukleozydo-2',3'-fosforanów. Ten mechanizm działania wykazują między innymi rybonukleaza trzustkowa, T₁ i rybonukleaza z rajgrasu.

Rybonukleazy niecyklizujące mieszczą się w klasie hydrolaz, podklasie fosfodwuesteraz (3.1.4.). Produktem ich działania są najczęściej nukleozydo-5'-fosforany i rzadziej nukleozydo-3'-fosforany. Przykładem tej grupy enzymów mogą być fosfodwuesterazy z *E. coli*, ze śledziona i z jadu węży.

Nukleazy dzięki dużemu zróżnicowaniu pod względem sposobu działania na różne formy strukturalne kwasów nukleinowych znalazły zastosowanie w badaniach pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej struktury tych kwasów. Wystarczy wspomnieć jaką rolę odegrała pirymidynowa i guaninowa rybonukleaza w ustaleniu sekwencji nukleotydowej alanilowego, tyrozynowego, serynowego i walinowego tRNA (13, 62, 88, 150).

Funkcja biologiczna nukleaz została omówiona w licznych artykułach przeglądowych (6, 12, 74, 81, 107). Przypuszcza się, że rybonukleazy uczestniczą w rozpadzie i, być może, w syntezie RNA, jak również mogą chronić komórkę przed inwazją do jej wnętrza obcego RNA. Dezoksyrybonukleazy biorą prawdopodobnie udział w procesie replikacji DNA, rekombinacji genetycznej, naprawie uszkodzeń powstałych w cząsteczce DNA pod wpływem różnych czynników oraz w restrykcji i modyfikacji DNA.

I. Swoistość rybonukleaz

Aktywność rybonukleazy oraz jej swoistość wobec cząsteczki RNA zależna jest od następujących elementów struktury RNA (15):

- a) rodzaju nukleozydu położonego przy rozrywaniu wiązaniu,
- b) długości łańcucha RNA,
- c) stopnia uporządkowania struktury, to jest od zawartości fragmentów spiralnych,
- d) zawartości fragmentów dwuniciowych,
- e) hybrydyzacji z innymi kwasami nukleinowymi lub polinukleotydami.

Wysoki stopień swoistości wobec poszczególnych nukleotydów wykazuje rybonukleaza trzustkowa, T_1 i U_2 . Rybonukleaza T_1 wyodrębniona z *Aspergillus oryzae* rozszczepia wiązania położone tylko przy nukleotydzie guanylowym. W efekcie jej działania powstają oligonukleotydy zakończone 3'-fosforanem guanozyny i mononukleotydy guanylowe (39, 66, 127, 133, 144). Rybonukleaza trzustkowa rozrywa wybiórczo wiązania znajdujące się przy nukleotydzie pirymidynowym (42, 48, 90, 111, 145, 146). Swoistość rybonukleazy U_2 , wykrytej w *Ustilago sphaerogenes*, jest komplementarna do rybonukleazy trzustkowej. Rybonukleaza U_2 rozszczepia wiązania położone przy nukleotydach purynowych uwalniając 3'-fosforany adenozyiny i guanozyiny (7, 8).

W zależności od wielkości cząsteczki RNA, mamy do czynienia z odmiennym rozmieszczeniem ładunków reszt fosforanowych w tej cząsteczce, z różną jej giętkością, z niejednakowym oddziaływaniem stosu zasad purynowych i pirymidynowych (ang. *base stacking*) oraz z różną ilością wiązań wodorowych. Stwierdzono, że wrażliwość wiązania dwustrowego na enzym jest uzależniona od oddziaływania stosu zasad (42, 146). W związku z tym wiele nukleaz wykazuje różnicę w szybkości rozkładu małych i dużych cząsteczek RNA. Przykładem może służyć nukleaza z mikrokoków rozbijająca wiązania coraz szybciej w miarę skracania się łańcucha polinukleotydowego. Mamy tu do czynienia ze zjawiskiem samoprzyspieszania reakcji (131). Po osiągnięciu pewnego maksimum szybkość reakcji zaczyna maleć w miarę, jak łańcuch ten ulega skróceniu do małych oligonukleotydów. Dwunukleotydy w większości są już odporne na działanie enzymu (76, 105). Z kolei rybonukleaza z *Thiobacillus thioparus* rozbija łańcuch polirybonukleotydowy na fragmenty złożone z jedno-, dwu- i trójnukleotydów (99), a rybonukleaza z mitochondriów wątroby szczura na dwunukleotydy (95). Alkaliczna rybonukleaza II z *E. coli* i rybonukleaza z nerek owcy nie rozkładają oligonukleotydów. Przykładem enzymu, który jest aktywny wobec oligonukleotydów, jest rybonukleaza z mięsaka limfatycznego myszy (87).

Obserwowano też duże różnice we wrażliwości pewnych odcinków RNA na działanie niektórych rybonukleaz. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z odmiennej budowy tych fragmentów. Stwierdzono, że luź-

ne fragmenty cząsteczki RNA łatwiej są atakowane przez enzym niż spirala. Zjawisko to obserwowano w czasie działania rybonukleazy T₁ na tRNA (4, 38, 63) i na rybosomalny RNA (55). Enzym ten działa przede wszystkim na jednoniciowy lub zdenaturowany RNA nie mający spiralnej struktury.

Rybonukleaza z trzustki działa na jednoniciowy RNA. Rozbija ona najpierw wiązania położone w niespiralnym, luźnym fragmencie łańcucha polinukleotydowego. W miarę narastania liczby rozbitych wiązań w łańcuchu, jego uporządkowana struktura ulega rozluźnieniu wskutek osłabienia trwałości utrzymujących ją wiązań i łańcuch taki staje się substratem wrażliwym na działanie enzymu (1, 9, 54, 92).

Również alkaliczna rybonukleaza II z *E. coli* rozkłada wyłącznie jednoniciowy RNA (10, 84, 121, 123). Istnieją dowody, że w natywnym tRNA swoista trzeciorzędowa struktura jego cząsteczek może uczynić je niewrażliwymi początkowo na działanie rybonukleazy A (3, 9, 14, 29, 92).

Oporne na działanie większości rybonukleaz okazały się także dwuniciowe, natywne cząsteczki RNA wyodrębnione z niektórych wirusów (19, 20, 117). Również dwuniciowe struktury, otrzymane przez hybrydyzację cząsteczek rybosomalnego RNA z DNA oraz cząsteczek tRNA z DNA, nie ulegały rozkładowi pod wpływem rybonukleazy z trzustki (51, 58).

Swoistość wobec jednoniciowej struktury w przypadku rybonukleazy trzustkowej dotyczy również syntetycznych polinukleotydów. Enzym nie działa na hybrydowe połączenie poli-G·poli-C. Kompleks ten ma dwuniciową strukturę. Natomiast jednoniciowy poli-C jest trawiony przez enzym (114). Rybonukleaza T₂ z *Aspergillus oryzae* nie rozkłada poli-A w warunkach, które powodują, że polimer ten ma dwuniciową strukturę, tzn. w pH 4,6 i temperaturze 25°C. W tychże samych warunkach enzym rozkłada pochodną tego polimeru poli-N₆-oksyetyloadenyłowy kwas, ponieważ zachowuje on strukturę jednoniciową (61).

Nieswoista nukleaza z jadów węży łatwo hydrolizuje poli-A, poli-U, poli-C i poli-(A, C, U, G) w warunkach, które sprzyjają utrzymaniu tych polinukleotydów w jednoniciowej formie. W tych samych warunkach enzym dużo wolniej rozkłada hybrydowe kompleksy poli-A·poli-U, poli-A·poli-I, poli-C·poli-I, mające strukturę dwuniciową (30).

Z nerek owcy (69) wyodrębniono nukleazę, która hydrolizuje zdenaturowany RNA i DNA, a także poli-A i poli-U do oligonukleotydów zakończonych resztą fosforanową na C-5'. Hydrolizuje również, lecz bardzo wolno, tRNA do cztero- lub pięcionukleotydów. Prawdopodobnie atakowane są tylko luźne, nieuporządkowane odcinki łańcucha tRNA. Trzeba zaznaczyć, że spośród ogromnej ilości znanych rybonukleaz stosunkowo tylko niewielka ich część była badana pod względem swoistości wobec wielkocząsteczkowych form RNA. Spośród zbadanych w tym aspekcie enzymów większość z nich jest bardziej aktywna wobec RNA o strukturze jednoniciowej lub niespiralnej. Czasem wybiórczość ta może być daleko posu-

nięta, jak to już nadmieniono w przypadku rybonukleazy trzustkowej lub rybonukleazy T₁.

II. Zastosowanie rybonukleaz do badania struktury i funkcji biologicznej RNA

Z enzymatycznych metod badania struktury RNA na uwagę zasługuje metoda opracowana przez S a n g e r a i wsp. (113). Podstawę jej stanowi technika rozdziału oligonukleotydów otrzymanych przez trawienie RNA rybonukleazą T₁ lub rybonukleazą trzustkową. Dzięki tej metodzie możliwe było wykrycie subtelných różnic między poszczególnymi rodzajami RNA oraz między zmutowanymi odmianami tego samego RNA w oparciu o technikę mapowania.

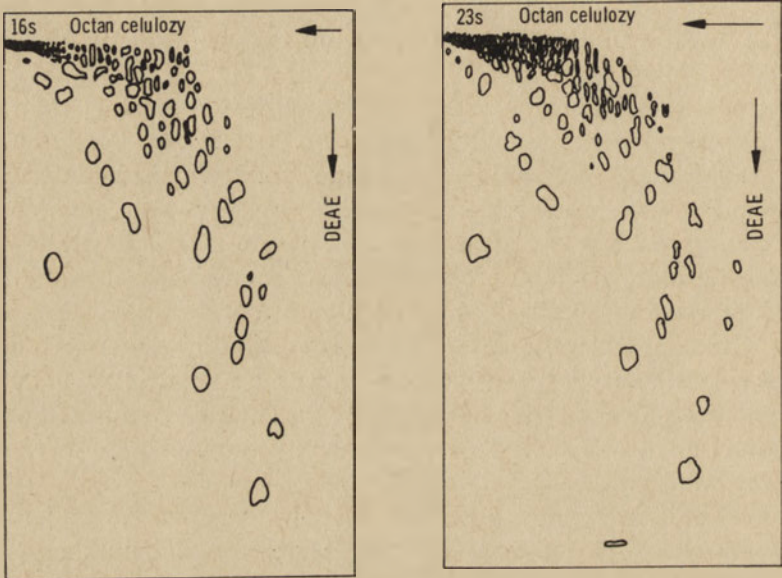
W metodzie tej znakowany radioaktywnym fosforem ³²P RNA trawiono w ściśle określonych warunkach (stosunkowo duże stężenia enzymu i krótki czas trawienia). Mieszaninę trawienną poddawano dwukierunkowej wysokonapięciowej jonoforezie. Najpierw wykonywano jonoforezę na octanie celulozy w pH 3,5, a następnie na bibule z DEAE-celulozy w pH 1,9. Położenie plam na bibule określano za pomocą radioautografii, a ich zawartość eluowano alkalicznym węglanem trójetyloaminy. W wyodrębnionych w ten sposób fragmentach oznaczano skład i sekwencję nukleotydową. Skład nukleotydowy oznaczano za pomocą hydrolizy 0,2N NaOH. Otrzymane po hydrolizie mononukleotydy rozdzielano w wysokonapięciowej jonoforezie w pH 3,5. Ilość poszczególnych nukleotydów oznaczano metodą radioautografii.

Do określenia sekwencji oligonukleotydów otrzymanych po trawieniu RNA rybonukleazą T₁ stosowano dalszą degradację rybonukleazą trzustkową i na odwrót oligonukleotydy otrzymane z RNA działaniem rybonukleazy trzustkowej trawiono dalej rybonukleazą T₁. Ponadto jako uzupełnienie tych dwóch enzymów stosowano nukleazę z *Micrococcus pyogenes* (106) i fosfodwusterazę ze śledziona. Do oznaczenia reszty fosforanowej na C-3' stosowano bakteryjną, alkaliczną fosfomonoesterazę, a na C-5' fosfodwusterazę z jadu węży.

W metodzie tej uzyskano zupełny rozdział jedno-, dwu- i trójnukleotydów. Natomiast spośród 27 możliwych izomerów czteronukleotydów tylko 10 występowało na bibule w formie pojedynczych wyraźnie oddzielonych plam. Pozostałe czteronukleotydy występowały bądź to w formie częściowo rozdzielonych zachodzących na siebie plam bądź też jedna plama zawierała dwa lub trzy izomery. Jeszcze większe trudności napotkano przy rozdziale pięcionukleotydów.

Opracowaną przez siebie metodę Sanger wykorzystał do sporządzenia i porównania map nukleotydowych dwóch składników rRNA z *E. coli*: jednego o współczynniku sedymentacji 16S i drugiego 23S (rysunek 1 i 2)

(113). Wyraźne różnice zaznaczają się już między czteronukleotydami: np.: oligonukleotyd UAAG występuje w składniku 23S i brak go prawie zupełnie w składniku 16S. Sekwencja AUUG występuje tylko w komponencie 16S. Ponadto niektóre oligonukleotydy wspólne dla obu składników występują w niejednakowym stężeniu. Na przykład spośród trzech izomerów $(AC_2)G$, sekwencja CCAG powtarza się częściej w komponencie 16S niż 23S. Jeszcze większe różnice zaznaczają się w obrazie pięcionukleotydów pochodzących z obu komponent. Widać to już po ich ruchliwości oraz składzie nukleotydowym. Stosując tę metodę udało się również wykazać różnice w sekwencji między tRNA z *E. coli* i drożdży (113).



Rys. 1. Rozdział oligonukleotydów otrzymanych po trawieniu rybonukleazą T_1 16S rRNA wg (113)

Dwuwymiarowe frakcjonowanie na octanie celulozy, pH 3,5, 3 kw, 2 godziny i na DEAE-bibule, pH 1,9, 1,5 kw, 4 godziny

Rys. 2. Radioautografia oligonukleotydów otrzymanych po trawieniu rybonukleazą T_1 komponenty 23S rRNA wg (113)

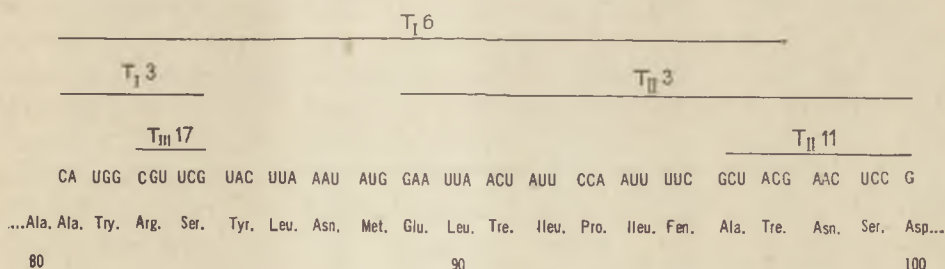
Nieco zmodyfikowaną metodę Sangera zastosowali Adams i wsp. (2) do oznaczenia sekwencji w jednym z cistronów RNA, bakteriofaga R17. W RNA faga zawarta jest informacja dla syntezy trzech białek. Jednym z nich jest białko kapsydu faga. Celem tej pracy było znalezienie sekwencji nukleotydowej w RNA, odpowiadającej znanej sekwencji aminokwasowej w białku kapsydu i w ten sposób sprawdzenie słuszności cech kodu genetycznego. Do wyodrębniania poszukiwanego fragmentu RNA i oznaczenia jego sekwencji zastosowano następującą procedurę. RNA faga znakowano jednolicie ^{32}P i po wyodrębnieniu RNA z hodowli trawiono go

rybonukleazą T_1 . Mieszanie trawienną rozdzielano na octanie celulozy w pH 3,5 z 7M mocznikiem i za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na DEAE-celulozie. Sekwencję nukleotydową oznaczano przez wybiórcze rozszczepienie wiązań dwuustrowych. W tym celu obok swoiście działających rybonukleaz T_1 , U_2 i rybonukleazy trzustkowej stosowano chemiczną modyfikację RNA za pomocą odczynnika karbo-dwuimidowego (CMCT) (52).

Jeżeli na RNA podziałamy CMCT, to zablokujemy w nim resztę urydylową i guanylową. Działając na tak zmodyfikowany RNA rybonukleazą trzustkową można było rozszczepiać w nim wiązania dwuustrowe położone tylko przy reszcie cytydylowej.

Rybonukleaza U_2 w małych stężeniach swoista jest tylko wobec wiązań łączących nukleotydy purynowe. Używając jej do degradacji mieszaniny otrzymanej przez trawienie RNA rybonukleazą T_1 można było rozszczepiać wiązania położone tylko przy nukleotydzie adenyłowym. Adams i wsp. dysponowali więc zestawem metod, które umożliwiały rozbicie tylko jednego rodzaju wiązania. Dzięki temu udało się ustalić sekwencję fragmentu złożonego z 7 tripletów. Oznaczono go literą A.

Następnym etapem w ich pracy było znalezienie większego odcinka RNA, który mieściłby w sobie fragment A. W tym celu w specjalnie dobranych warunkach trawiono RNA rybonukleazą T_1 , a powstałe produkty rozdzielano elektroforetycznie na żelu akrylamidowym. Po znalezieniu pasma, które zawierało fragment A, oznaczono w nim sekwencję 57 nukleotydów. Nukleotydy te wyznaczają sekwencję aminokwasów w położeniu



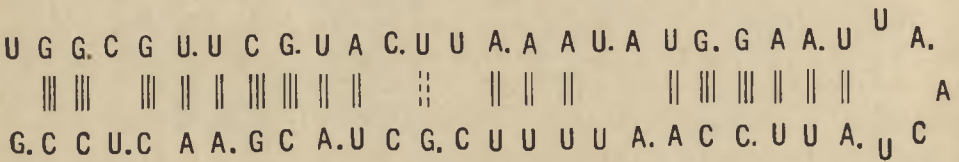
Schemat 1. Sekwencja nukleotydów we fragmencie cistronu białka kapsydu faga R17 wg (2)

Liniami zaznaczono oligonukleotydy otrzymane po trawieniu RNA rybonukleazą T_1 oraz odpowiadające im sekwencje aminokwasów

od 81—99 w białku kapsydu faga (schemat 1). Gdy sekwencję tych 57 nukleotydów zapisano w formie pętli i pętla ta utworzyła podwójną spiralę, to okazało się, że 19 par zasad jest komplementarnych względem siebie (schemat 2). Za tym, że fragment ten może tworzyć podwójną spiralę w cząsteczce RNA przemawia również jego stosunkowo duża odporność na działanie rybonukleazy T_1 . Na podstawie tych doświadczeń Adams

i wsp. wysunęli hipotezę, że sekwencja nukleotydów w RNA musi być tak dobrana, żeby nie tylko kodować sekwencję aminokwasów, ale również żeby utworzyć określoną strukturę drugorzędową.

Spahr i Gesteland (124) wykorzystali endonukleazę IV z *E. coli* w badaniach nad aktywnością biologiczną RNA bakteriofaga R17. RNA faga kieruje syntezą trzech różnych białek: białka stanowiącego osłonkę faga, białka strukturalnego i syntetazy RNA. Badacze ci chcieli ustalić, czy do syntezy *in vitro* każdego z tych białek potrzebna jest cała nienaruszona cząsteczka RNA, czy też po degradacji jej każdy cistron z osobna będzie mógł kierować syntezą właściwego mu białka. Ponadto chcieli



Schemat 2. Drugorzędowa struktura fragmentu cistronu RNA białka kapsydu faga R17 wg (2)

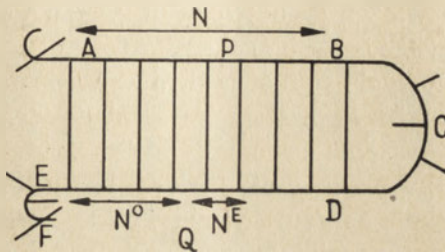
stwierdzić, czy cząsteczka RNA faga pozbawiona wskutek degradacji pierwotnego 5'-końca (pppGp...) może nadal wiązać się z rybosomem i pełnić funkcję matrycy. Pozytywne rozwiązanie tych problemów stanowiłoby podstawę do badań nad miejscem i kolejnością ułożenia cistronu w cząsteczce RNA faga. W specjalnie dobranych warunkach endonukleaza IV rozszczepiała w cząsteczce RNA wiązanie położone mniej więcej w 1/3 odległości od 5'-końca. Otrzymane dwa fragmenty o współczynniku sedymentacji 21S i 15S rozdzielano przez wirowanie w gradiencie sacharozy. Większy z fragmentów, zawierający nowoutworzony 5'-koniec, miał zdolność do syntezy *in vitro* syntetazy RNA oraz białka przypominającego białko osłonki. Mniejszy fragment miał bardzo poważnie upośledzone właściwości matrycy i syntetyzował białko podobne tylko do białka osłonki. Jakkolwiek eksperymenty te nie udzieliły pełnej odpowiedzi na sformułowane przez autorów pytanie, to jednak umożliwiły one ustalenie orientacyjnego położenia cistronów w cząsteczce RNA.

Jednym z węzłowych problemów biochemii kwasów nukleinowych jest wyjaśnienie struktury i roli biologicznej rybosomalnego RNA. Na podstawie właściwości optycznych, hydrodynamicznych oraz dyfrakcji promieni X rybosomalnego RNA wysnuto wniosek, że jego cząsteczka ma częściowo strukturę podwójnej spirali (23, 37, 44, 49, 125, 126).

Cox (31, 32, 34) stwierdził, że badanie degradacji rRNA prowadzone metodami enzymatycznymi oraz alkaliami może dostarczyć dalszych, bardziej szczegółowych informacji o drugorzędowej strukturze RNA. W teoretycznych rozważaniach ustalił zależność między zmianami ciężaru cząsteczkowego w czasie degradacji a strukturą drugorzędową cząsteczki oraz

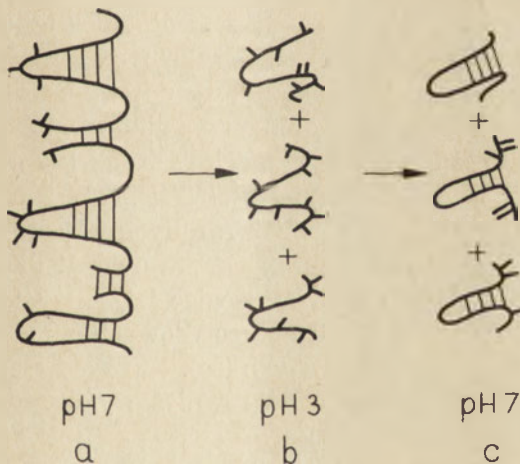
prawdopodobieństwem hydrolitycznego rozbicia wiązań. Wykorzystując te zależności ustalili procentową zawartość struktury spiralnej w cząsteczce rRNA.

Jednopasmowy RNA można rozpatrywać jako zbiór L pętli o strukturze „szpilki do włosów”. Każda pętla stabilizowana jest przez N par zasad, a ponadto zawiera b niesparowanych zasad. Każda pętla dołączona jest do następnej pętli za pomocą c zasad (schemat 3 i 4). W oparciu o statystykę przypadkowej degradacji liniowych polimerów Cox opracował równanie, w którym: $2N + b = \log f / \log (1 - p)$. W równaniu tym f stanowi frakcję



Schemat 3. Hipotetyczna podwójna spirala segmentu rRNA wg (34)

N — jest liczbą sparowanych zasad. b oznacza liczbę reszt tworzących zamknięty koniec pętli BCD, a c jest liczbą reszt łączących jedną podwójną spiralę z następną spiralą. N^0 odpowiada minimalnej liczbie sparowanych zasad niezbędnych do stabilizacji podwójnej spirali. N^E oznacza liczbę sparowanych zasad, które uległy rozerwaniu tylko wskutek ciepła hydrolizy



Schemat 4. Konformacja fragmentów rRNA wyodrębnionych z rybosomu po trawieniu rybonukleazą wg (33)

Zaznaczono konformację przed i po ujawnieniu „zamaskowanych” rozszczepień. a) pomimo rozerwania wiązań dwuściennych pętle „szpilki do włosów” utrzymywane są razem dzięki wiązaniom wodorowym, b) zniszczenie drugorzędowej struktury przez zadziałanie kwasami w temperaturze 0–25°. Wskutek rozerwania wiązań wodorowych dochodzi do degradacji fragmentów, c) po neutralizacji dochodzi jedynie do odtworzenia wiązań wodorowych w pętlach. Nie ma natomiast łączenia się pętli ze sobą

pętli, które zawierają pierwotną nienaruszoną strukturę, a p stanowi prawdopodobieństwo rozbicia wiązania.

Teorię tę Cox rozbudował na tyle, żeby móc wykazać, że liczba reszt pętli ($2N+b$) może być wyznaczona przez frakcjonowanie RNA po hydrolizie i badanie struktury drugorzędowej otrzymanych fragmentów. Fragmenty krótsze niż pętla „szpilki do włosów” nie mogą odtwarzać struktury szpilki (31, 32).

Do degradacji rRNA z retikulocytów królika użyto rybonukleazy trzustkowej. W czasie trawienia zaobserwowano szybki spadek współczynnika sedymentacji do około 3S. Ten szybki spadek ciężaru cząsteczkowego był wynikiem rozerwania wiązań dwuustrowych, czemu towarzyszyła szybka depolimeryzacja RNA. Obok tego zachodziło jeszcze zamaskowane rozerwanie wiązań dwuustrowych, co można było wykazać dopiero po zniszczeniu drugorzędowej struktury powstałych fragmentów przez podgrzanie ich do około 85°C lub zakwaszenie (schemat 4). W efekcie tego zabiegu obserwowano dalszy spadek współczynnika sedymentacji. Równocześnie obserwowano zmiany w widmie denaturacyjnym i obrazie elektroforezy na żelu akrylamidowym. Zmiany w widmie świadczyły o naruszeniu drugorzędowej struktury cząsteczki RNA. Omówione fakty przemawiają za słuszością modelu o strukturze powtarzających się pętli „szpilek do włosów”. Szybki spadek ciężaru cząsteczkowego rRNA jest skutkiem rozbicia wiązań w tych miejscach łańcucha polinukleotydowego, gdzie tworzy on niewielkie odcinki łączące jedną pętlę z drugą, lub też w początkowym fragmencie podwójnej spirali (odcinki FE i APQE na schemacie 3). Ukryte rozszczepienia wiązań powstają w obrębie podwójnej spirali utworzonej przez sparowane zasady oraz szczycie pętli (fragment PBCDQ na schemacie 3). Doświadczenia wykazały, że rybonukleaza rozszczepia wiązania w łańcuchu polinukleotydowym w sposób przypadkowy. Rozerwaniu ulegają wiązania zarówno w jednoniciowych odcinkach jak i w podwójnej spirali. Wynioskowano z tego, że stosunek ilości zamaskowanych rozszczepień (60% do 80% ogólnej ilości wszystkich rozbitych wiązań) do ilości wiązań rozbitych „jawnie” powinien odpowiadać stosunkowi długości podwójnej spirali do długości giętkiego odcinka, a więc jak 2 — 3/1. Przeciętną długość pętli ustalono na 10—20 reszt nukleotydowych, a maksymalnie możliwą długość na 35 reszt nukleotydowych (34).

Rybonukleaza trzustkowa została również wykorzystana przez Coxa (33) do badania struktury rybosomów.

T a k a n a m i i Z u b a y (134) zastosowali rybonukleazę trzustkową do badania oddziaływań między polinukleotydową matrycą a rybosomem. Stwierdzili oni, że oddziaływanie to zachodzi w ściśle określonym obszarze i że tylko niewielki fragment polinukleotydów związany jest z rybosomem. W wykonanym przez nich doświadczeniu poli-U był silnie wiązany nie tylko do rybosomu 70S ale i do rybosomalnej podjednostki 30S. Trawienie rybonukleazą kompleksu poli-U z rybosomem prowadziło do degra-

dacji prawie całego poli-U, z wyjątkiem oligonukleotydu, który był związany z rybosomem i w ten sposób chroniony przed działaniem enzymu. Oligonukleotyd ten zawierał 27 nukleotydów.

Niewrażliwość dwuniciowych form RNA na działanie rybonukleaz miała duże znaczenie w biochemii kwasów nukleinowych. Wykrycie RNA opornego na działanie rybonukleazy trzustkowej (50) skłoniło Montagniera i Sandersa (94) do zbadania jego struktury. Zebrane przez nich dane wskazywały na dwuniciową strukturę cząsteczki RNA. Odkrycie takiej struktury zwróciło uwagę na możliwość replikacji wirusów RNA poprzez bezpośrednie powielanie łańcucha RNA na matrycy RNA. Wykrycie RNA zależnej polimerazy RNA potwierdziło słuszność tej hipotezy (19).

W komórkach zakażonych wirusem znajdowano dwa typy dwuniciowego RNA. Jeden typ przedstawia podwójną spiralę, z której wystaje pojedynczy łańcuch nowopowstającego RNA. Ten typ RNA, tzw. pośrednia replikatywna forma, jest częściowo wrażliwa na działanie rybonukleaz. Wystający jednoniciowy fragment można łatwo usunąć przez trawienie rybonukleazą. Drugi typ, tzw. replikatywna forma, przedstawia wyłącznie podwójną spiralę oporną na działanie rybonukleazy A, B i rybonukleazy T₁. Replikatywną formę RNA można otrzymać z ekstraktów komórek zainfekowanych wirusem po trawieniu ich rybonukleazą (103).

Stabilność podwójnej spirali wirusowego RNA zależy od rodzaju i stężenia jonów występujących w roztworze (58, 110, 117) oraz od rodzaju i ilości sparowanych zasad (21). Rozluźnienie spirali wskutek spadku siły jonowej środowiska powoduje wrażliwość cząsteczki RNA na działanie rybonukleazy. Również wzrost stężenia enzymu prowadzi do degradacji dwuniciowego RNA (19, 20, 94).

Oporne na rybonukleazę dwuniciowe kwasy rybonukleinowe znaleziono w wirusach roślinnych, zwierzęcych i bakteryjnych. Przeglądowe omówienie właściwości dwuniciowych RNA można znaleźć w artykule Ralphi (103).

Brak aktywności rybonukleaz wobec dwuniciowych struktur posłużył do wykrycia hybrydów fagowego DNA z komórkowym RNA produkowanym przez faga. Hiesin i Szjemiakin (60) wykazali, że DNA faga T₂ i znakowany ¹⁴C-adeniną mRNA, otrzymany z zarażonych tym fagiem komórek *E. coli*, dają kompleks nie rozkładany ani przez rybonukleazę ani przez dezoksyrybonukleazę. Geidushek i wsp. (50) w doświadczeniu *in vitro* użyli DNA faga T₂ jako matrycy dla polimerazy RNA. Otrzymali RNA dwuniciowy o właściwościach fizykochemicznych podobnych do DNA. RNA okazał się w pełni oporny na działanie rybonukleazy i dezoksyrybonukleazy.

Niewrażliwość dwuniciowych struktur RNA na rybonukleazy nie jest absolutna. Robertson i wsp. (110) z *E. coli* K 12 wyodrębnili endonukleazę (rybonukleazę III), która rozkłada wyłącznie dwuniciowe RNA.

Produktami jej działania są oligonukleotydy z resztą fosforanową na C-3'. Enzym nie działa na jednoniciowy RNA. Nie rozkłada również ani natywnego ani zdenaturowanego DNA. Endonukleaza związana jest z rybosomami.

Liczne są przykłady zastosowania omówionych zależności do badań funkcji biologicznej RNA, na przykład Bernardi i Cantoni (16) próbowali ustalić zależność między utratą niektórych właściwości biologicznych serynowego tRNA a stopniem degradacji jego cząsteczki podczas trawienia egzonukleazą ze śledziona. Stwierdzili oni, że utrata zdolności wiązania aminokwasów, wiązania AMP, przyłączania tRNA do rybosomu oraz wbudowywania aminokwasów do łańcucha polipeptydowego zależą od czasu trawienia tRNA przez enzym. Wczesne zanikanie zdolności wiązania aminokwasów oraz utrata właściwości substratowych dla CMP-AMP pirofosforylasy świadczą o tym, że nienaruszona grupa hydroksylowa na C-5' ostatniego nukleotydu w łańcuchu tRNA jest konieczna do wymienionych tutaj funkcji. Dane te również przemawiają za słusznością modelu tRNA w kształcie liścia koniczyny, w którym dochodzi do oddziaływania między obu końcami cząsteczki. Natomiast zdolność łączenia się z rybosomami oraz przenoszenie aminokwasów cząsteczka tRNA traci dopiero po rozległej degradacji.

III. Swoistość dezoksyrybonukleaz

Wśród dezoksyrybonukleaz wyróżniamy enzymy o dużej wybiórczości wobec różnych struktur DNA. Należą tu enzymy, które działają bądź na liniową bądź też na kolistą cząsteczkę DNA. W obrębie każdej z tych form dezoksyrybonukleazy mogą jeszcze rozróżniać między jednoniciową lub dwuniciową strukturą cząsteczki DNA. Koliste jedno- lub dwuniciowe cząsteczki DNA nie są rozkładane przez egzonukleazy, natomiast ulegają degradacji pod wpływem endonukleaz (40, 41, 67, 122). Linearne cząsteczki DNA mogą być hydrolizowane przez egzo- i endonukleazy. W dwuniciowym kolistym lub linearnym DNA endonukleazy mogą rozszczepiać wiązania albo w jednej albo w obu niciach (18, 67, 115, 135, 149). Jeżeli w każdym z dwóch łańcuchów podwójnej spirali powstają pęknięcia, ale przemieszczone względem siebie, mówimy o jednoniciowych pęknięciach. Jeżeli obydwa łańcuchy rozrywane są symetrycznie w tym samym miejscu, mamy do czynienia z dwuniciowym pęknięciem.

Wrażliwość cząsteczki DNA na degradujące ją enzymy może być również uwarunkowana stopniem jej polimeryzacji tj. długością łańcucha (68, 139).

Innym czynnikiem określającym swoistość dezoksyrybonukleazy jest prawdopodobnie sekwencja łańcucha polinukleotydowego (91). Wiele procesów biologicznych, jak replikacja DNA, rekombinacja genetyczna, przebiegających z udziałem dezoksyrybonukleaz, wymagałoby rozbicia bardzo

długiego łańcucha polinukleotydu w niewielu ściśle określonych miejscach. Rozbicia tych wiązań mogłyby dokonywać enzymy o bardzo dużej swoistości określonej albo przez sekwencję nukleotydów w łańcuchu, albo przez inne nieznanne dotąd szczegóły struktury DNA. Badanie swoistości dezoksyrybonukleaz wobec sekwencji łańcucha polinukleotydu dostępnymi dzisiaj metodami jest nadzwyczaj trudne. Tym niemniej Messelsonowi i Yuanowi (91) udało się otrzymać z *E. coli* endonukleazę, która powoduje rozszczepianie ściśle określonych wiązań w cząsteczce DNA. Enzym ten powoduje restrykcję DNA faga wnikałego do komórki *E. coli*.

Poznano już właściwości ogromnej ilości dezoksyrybonukleaz pochodzenia zwierzęcego i bakteryjnego. Enzymy te wykazują duży stopień zróżnicowania właściwości enzymatycznych i sposobu działania na cząsteczki DNA w zależności od struktury tych cząsteczek. Spośród dezoksyrybonukleaz zwierzęcych stosunkowo dobrze poznano sposób degradacji cząsteczki DNA przez dezoksyrybonukleazę z trzustki i śledziony.

Dezoksyrybonukleaza I z trzustki rozkłada jedno- i dwuniciowy DNA. Mechanizm działania dezoksyrybonukleazy trzustkowej wyjaśniły prace Schumakera i wsp. (115), Thomasa (135) oraz Vanecko i Laskowskiego (140).

W pierwszym etapie działania dezoksyrybonukleazy występuje tzw. okres utajony (ang. *lag period*), w którym nie pojawiają się produkty trawienia DNA rozpuszczalne w kwasie. Spowodowane to jest tym, że enzym atakuje dwuniciową spiralę DNA na całej długości w sposób nieuporządkowany. Dochodzi do niesymetrycznego rozszczepienia wiązań w obu łańcuchach. Rozerwane wiązania znajdują się w dość dużej odległości od siebie tak, że uniemożliwiają rozpad cząsteczki DNA na mniejsze fragmenty. Rozpad byłby możliwy wtedy, gdy rozerwaniu uległyby wiązania w obu łańcuchach i odległość między nimi nie przekraczałaby dwóch nukleotydów, lub gdyby te wiązania znajdowały się naprzeciw siebie. Takie symetryczne, efektywne pęknięcie pojawia się jeden raz na czterysta rozerwanych wiązań. W miarę zwiększania się ilości dwuspiralnych fragmentów częstość wystąpienia efektywnych rozszczepień rośnie i pojawiają się produkty rozpuszczalne w kwasie.

Rozpad cząsteczki DNA na mniejsze fragmenty i brak okresu utajenia ma miejsce w przypadku jednoniciowego DNA. Wtedy każde rozszczepienie wiązania dwustrowego prowadzi do rozdzielenia fragmentów od siebie. Z analizy kinetyki rozpadu cząsteczki DNA pod wpływem dezoksyrybonukleazy trzustkowej można wnioskować o jedno- lub dwuniciowej strukturze DNA.

Odmienne mechanizm działania przedstawia dezoksyrybonukleaza II ze śledziony. Enzym rozkłada jednoniciowy DNA prawie z taką samą szybkością co dwuniciowy DNA. W jej działaniu można wyróżnić dwa etapy. W pierwszym etapie dochodzi do powstania dwuniciowych, symetrycznych

pęknięć w cząsteczce DNA i następuje jej fragmentaryzacja. W drugim etapie działania dezoksyrybonukleazy II dołącza się jeszcze nieuporządkowane, niesymetryczne rozszczepianie wiązań prowadzące do pojawienia się produktów rozpuszczalnych w kwasie (18). Youngowi i Sinheimerowi (149) działaniem dezoksyrybonukleazy II na DNA faga udało się uzyskać symetryczne rozszczepienie obu łańcuchów w jednym tylko miejscu i przejście kolistej cząsteczki DNA w linearną.

Obfitym źródłem dezoksyrybonukleazy o zróżnicowanej swoistości są pałeczki *E. coli*. Wyodrębniono z niej cztery egzonukleazy i cztery endonukleazy (77, 80, 81).

Egzonukleaza I (79, 82) jest aktywna tylko względem jednoniciowego DNA lub dwuniciowego DNA, poddanego uprzedniej denaturacji termicznej. Enzym rozpoczyna hydrolizę z końca tego łańcucha, który ma wolną grupę -OH na C-3'. W wyniku jego działania powstają 5'-dezoksyrybonukleotydy oraz graniczne dwunukleotydy, nie ulegające już rozkładowi pod wpływem enzymu.

Endonukleaza I z *E. coli* hydrolizuje natywny i zdenaturowany DNA do oligonukleotydów, zakończonych resztą fosforanową na C-5' i grupą hydroksylową na C-3'. Wykazano, że enzym rozpoczyna hydrolizę w ten sposób, że w podwójnej spirali DNA powoduje dwuniciowe symetryczne pęknięcia (17, 129).

Egzonukleaza II jest równocześnie i polimerazą i hydrolazą DNA. Rozkłada ona natywny DNA, zdenaturowany DNA oraz syntetyczne oligo- i polinukleotydy do 5'-dezoksyrybonukleotydów (83). Enzym rozpoczyna hydrolizę od końca łańcucha polinukleotydowego z grupą hydroksylową na C-3'. Klett i wsp. (71) wykazali, że ze wspomnianą polimerazą DNA związana jest równocześnie inna aktywność egzonukleazowa — egzonukleazy VI. Właściwością tego enzymu jest to, że rozpoczyna hydrolizę od 5'-końca DNA, poza tym nie różni się od egzonukleazy II.

Endonukleaza II z *E. coli* działa również na dwuniciowy DNA, ale w ten sposób, że powoduje w cząsteczce DNA ograniczoną liczbę jednoniciowych pęknięć, około 3—4 pęknięć na jeden łańcuch. Ten sposób działania enzymu na DNA faga T₄ i T₇ stwierdzili Friedberg i Goldthwait (45, 46). Endonukleaza II z *E. coli* działa w zmieniony sposób na alkilowany DNA, powodując w nim dwuniciowe pęknięcia. Ponadto alkilowany DNA jest trawiony w większym stopniu niż natywny DNA. W rozlegle alkilowanym DNA pod działaniem enzymu powstaje tylko ograniczona liczba dwuniciowych, symetrycznych pęknięć. Po ograniczonej alkilacji DNA przeważają natomiast niesymetryczne jednoniciowe pęknięcia, przy czym stosunek liczbowy pęknięć jednoniciowych do dwuniciowych wynosi około 3,7 do 1. W dwuniciowym alkilowanym DNA enzym hydrolizuje wiązania fosfodwuestrowe w sąsiedztwie alkilowanej zasady, jeżeli na tym odcinku nie ma jeszcze jednoniciowych pęknięć. Enzym nie działa na zdenatu-

rowany DNA faga T_4 . W dwuspiralnym glukozylowanym DNA powoduje również jednoniciowe pęknięcia (47).

Egzonukleaza III, jest wysoce swoista wobec dwuniciowego DNA. Rozpoczyna hydrolizę z 3' końca łańcucha polinukleotydowego i prowadzi do utworzenia 5'-dezoksyrybonukleotydów. Enzym ma również zdolność odszczępienia reszty fosforanowej na C-3' końcu łańcucha (108, 109).

Egzonukleaza IV (68), jest wybiórcza wobec krótkich fragmentów łańcucha polidezoksyrybonukleotydowego. Oligonukleotydy hydrolizuje 20 razy szybciej niż natywny lub zdenaturowany DNA. Produktami jej działania są 5'-nukleotydy.

Z pałeczek *E. coli* wydzielono również cały szereg dezoksyrybonukleaz pojawiających się po infekcji fagiem T_2 , T_3 , T_4 i fagiem λ . Po zakażeniu fagiem T_2 w ekstraktach *E. coli* znaleziono dwie dezoksyrybonukleazy. Jedna z nich jest egzonukleazą swoistą wobec oligonukleotydów. Hydrolizuje je do 5'-dezoksyrybonukleotydów. Enzym jest mało aktywny wobec natywnego i termicznie zdenaturowanego DNA, natomiast bardzo szybko rozkłada częściowo już zdegradowany DNA (98, 118). Drugi enzym jest endonukleazą, działającą na zdenaturowany DNA. Natywny DNA jest rozkładany z szybkością stanowiącą zaledwie 5% szybkości rozkładu jednoniciowego DNA. Enzym jest hamowany przez tRNA (25).

Po infekcji fagiem T_2 i T_4 stwierdzono w komórkach *E. coli* polimerazy obdarzone właściwością egzonukleolitycznego rozkładu DNA. Produktami ich działania są 5'-dezoksyrybonukleotydy (57, 119).

Sadowski i wsp. (112) oczyścili częściowo dwie endonukleazy pojawiające się w komórkach *E. coli* zainfekowanych fagiem T_4 . Jedna z nich powoduje ograniczoną liczbę jednoniciowych pęknięć w podwójnej spirali DNA i nie działa na jednoniciowy DNA. Nie jest hamowana przez tRNA (65, 112). Druga endonukleaza, oczyszczona ponad 200 razy, jest swoista wobec jednoniciowego DNA. W wyniku jej działania powstają fragmenty o przeciętnej długości łańcucha, odpowiadającej około 700 nukleotydów. Również i ten enzym nie jest hamowany przez tRNA.

W komórkach *E. coli* zakażonych fagiem λ pojawia się egzonukleaza odmienna od dezoksyrybonukleaz znajdujących przed infekcją (72, 143). Pojawienie się enzymu jest ściśle skorelowane z wegetatywnym rozwojem faga. Na przykład komórki lizogenne dla faga λ nie wytwarzają enzymu, gdy zachodzi represja faga. Jeśli jednak dojdzie do indukcji wegetatywnego wzrostu faga, pojawia się enzym. Fizjologiczna rola λ -egzonukleazy nie jest znana. Jednak kinetyka jej pojawiania się po infekcji zdaje się przemawiać za tym, że enzym w jakiś sposób związany jest z syntezą DNA. Jednorodny enzym otrzymano w krystalicznej postaci (109). Oczyszczony preparat enzymu 350 razy szybciej rozkłada natywny DNA z faga T_7 niż zdenaturowany DNA. Działa wyłącznie jako egzonukleaza, uwalniając stopniowo 5'-dezoksyrybonukleotydy. Rozpoczyna hydrolizę z 5' końca

łańcucha polinukleotydu. Szybciej rozkłada łańcuch ufosforylowany na C-5' niż łańcuch z wolną grupą hydroksylową na C-5' (86).

Z komórek *E. coli* zainfekowanych fakiem T₅, wyodrębniono dezoksyrybonukleazę. Enzym działa jak egzo- i endonukleaza, dając mieszaninę małych oligonukleotydów o przeciętnej długości łańcucha od 4—5 nukleotydów. Obok tego pojawiają się 5'-mononukleotydy. Enzym działa również na zdenaturowany DNA. Nie udało się ustalić roli enzymu w infekcyjności faga T₅, ani w syntezie cząsteczki DNA faga.

Kinetyka powstawania tego enzymu zdaje się przemawiać bardziej za jego udziałem w syntezie DNA faga niż za rozkładem DNA komórek gospodarza (35, 100, 101).

W ostrożnie wyizolowanych cząsteczkach DNA faga T₅, Thomas (136) zauważył 4 luki — trzy w jednym łańcuchu i jedną w drugim — i udowodnił, że luki te nie są artefaktami. Lehman (81) sugeruje, że między innymi funkcją dezoksyrybonukleazy indukowanej fakiem T₅ *in vivo* mogłoby być wprowadzenie do cząsteczki DNA tych pęknięć.

W *Pneumococcus* znaleziono endo- i egzonukleazę (73). Egzonukleaza szybciej rozkłada natywny DNA, niż zdenaturowany. Enzym ma aktywność fosfatazową i usuwa resztę fosforanową z końca łańcucha przy C-3'. Endonukleaza działa na natywny i zdenaturowany DNA dając oligonukleotydy zakończone resztą fosforanową na C-5'.

W *Bacillus subtilis* SB 19 zakażonym fakiem SP3 znaleziono dezoksyrybonukleazę indukowaną przez tego faga. Enzym ten jest swoisty wobec termicznie zdenaturowanego DNA. 90% produktów działania enzymu stanowią dwunukleotydy, a 10% trójnukleotydy, uwalniane stopniowo z 3' końca (137, 138). Dezoksyrybonukleaza jest również aktywna wobec polinukleotydów: polidezoksytymidylowego, polidezoksyadenylowego i polidezoksytydylowego oraz 5-metylopolidezoksytydylowego. Enzym rozkłada je do dwunukleotydów. Z kwasu polidezoksytydylowego w większości powstają d(pC)₂ oraz niewielkie ilości d(pC)₄ (5). Enzym nie działa na polirybonukleotydy. Nie rozkłada również trójnukleotydów. Czteronukleotydy o budowie d(pXpXpXpX) są hydrolizowane do dimerów.

W *Neurospora crassa* (85) i w mózgu jagniąt (59) znaleziono endonukleazy swoiste wobec jednoniciowego DNA. Enzym z *Neurospora* użyto w badaniach mechanizmu replikacji DNA przez oczyszczoną polimerazę (93) oraz do wydzielenia operonu lac (116).

Meselson i Yuan (91) oczyścili 5 000 razy endonukleazę ze szczepu *K. coli*, która powoduje restrykcję DNA faga λ. Enzym ten zasługuje na szczególną uwagę z tego względu, że przedstawia wyjątkowy, nie napotkany dotychczas stopień swoistości. Analiza sedymentacyjna wykazała, że enzym ze szczepu K działa na skręconą, kolistą cząsteczkę dwuniciowego DNA w ten sposób, że najpierw rozrywa jedno wiązanie w jednym tylko łańcuchu. W kilka sekund później rozszczepia komplementarny łańcuch w miejscu znajdującym się naprzeciw lub prawie naprzeciw

pierwszego rozszczepienia. W wyniku działania enzymu po pewnym czasie pojawia się w cząsteczce DNA ograniczona liczba dwuniciowych, symetrycznych pęknięć w swoistych miejscach cząsteczki, tzw. miejscach restrykcji (ang. *restriction sites*). Prowadzi to do rozpadnięcia się spirali DNA na duże dwuniciowe fragmenty. Ponadto w cząsteczce DNA dochodzi również do jednoniciowych pęknięć. W następstwie tych pęknięć pojawia się niewielka ilość jednoniciowego DNA oraz małe, niesedymetujące w ultrawirówce fragmenty polinukleotydowe. Enzym wymaga dla swej aktywności jonów Mg^{2+} , ATP i S-adenozylometioniny. Istnieją podstawy do przypuszczeń, że cząsteczka endonukleazy ma złożoną strukturę.

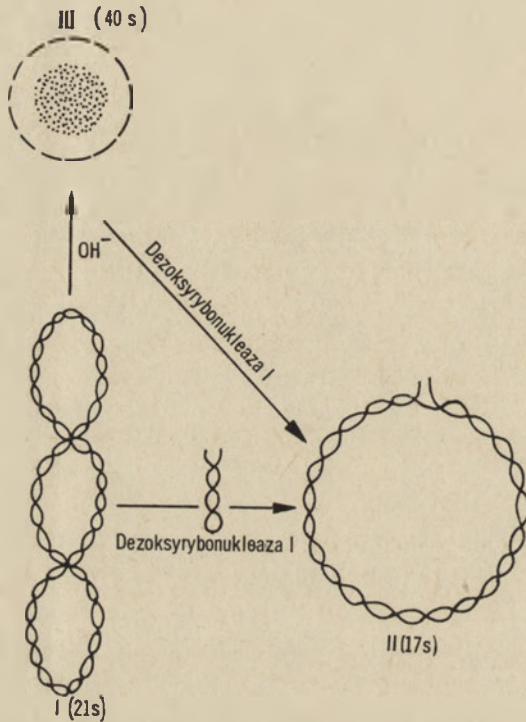
Nukleaza z *Micrococcus pyogenes* (132) działa na poli-d(A-T) wyodrębniony z kraba oraz na $(dA)_n \cdot (dT)_n$. Enzym wykazuje odmienny sposób rozkładu obu tych polinukleotydów. Rozkład poli-d(A-T) przebiega z natychmiastowym zniszczeniem jego uporządkowanej struktury, podczas gdy hydroliza $(dA)_n \cdot (dT)_n$ początkowo nie narusza struktury polimeru. Zniknięcie uporządkowanej struktury $(dA)_n \cdot (dT)_n$ następuje gwałtownie w późniejszym stadium reakcji. Różnice te spowodowane są tym, że egzonukleolityczny sposób rozkładu jest wyraźniej zaznaczony wobec $(dA)_n \cdot (dT)_n$ niż wobec poli-d(A-T). Przy niskiej sile jonowej enzym działa jak egzonukleaza na pasmo utworzone przez poli-A w podwójnej spirali $(dA)_n \cdot (dT)_n$.

IV. Zastosowanie dezoksyrybonukleaz do badania struktury i funkcji biologicznej DNA

Pięknym przykładem zastosowania nukleaz do badania zależności między strukturą i funkcją DNA są badania przeprowadzone nad fagiem ΦX 174. Niewrażliwość jednoniciowego DNA faga na egzonukleazy nawet po uprzednim działaniu na niego fosfatazami nasunęła przypuszczenie o braku wolnych grup hydroksylowych przy C-3' i C-5' i o kolistej budowie cząsteczki DNA (40, 43). Badania hydrodynamiczne oraz w mikroskopie elektronowym potwierdziły te przypuszczenia. Między innymi dzięki zastosowaniu fermentów ustalono, że replikatywna forma DNA faga ΦX 174 ma dwuniciową strukturę i struktura ta tworzy zamknięty pierścień, który ponadto uległ skręceniu (67, 122). Jeżeli na taki DNA podziałamy dezoksyrybonukleazą I z trzustki w specjalnie dobranych warunkach, to wtedy tylko w jednym łańcuchu zostaje rozerwane też tylko jedno, przypadkowe wiązanie. Prowadzi to do zmiany konformacji cząsteczki polegającej na rozkręceniu struktury I i utworzeniu rozwiniętego koła (struktura II). Tej zmianie konformacji towarzyszy dwukrotny spadek infekcyjności DNA faga.

Jeżeli na formę I DNA podziałac alkaliami, wtedy ulegnie ona bezładnemu zwinięciu (struktura III). Ta zmiana połączona jest z kilkukrotnym wzrostem infekcyjności faga. Ponowny spadek infekcyjności uzyskuje się

działając na taką cząsteczkę DNA dezoksyrybonukleazą I trzustki. Enzym powoduje wtedy przejście struktury III DNA w strukturę II. Warunkiem infekcyjności cząsteczki DNA faga jest więc pewna określona struktura, nie koniecznie natywna (67). Zmiany struktur DNA przedstawiono na schemacie 5.

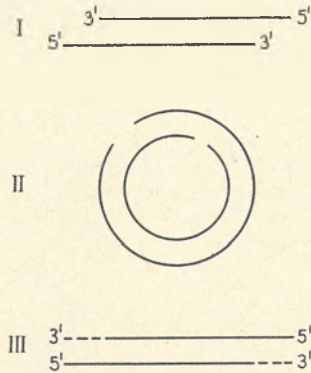


Schemat 5. Struktury DNA faga Φ X174 wg (36)

Objaśnienia w tekście

Dzięki zastosowaniu nukleaz udało się ustalić strukturę obu końcowych fragmentów cząsteczki DNA faga λ oraz zależną od tej struktury infekcyjność faga (128). Na podstawie tych badań ustalono, że cząsteczka DNA zbudowana jest z dwóch łańcuchów polinukleotydowych, tworzących spiralę, ale przesuniętych względem siebie o pewien odcinek tak, że na obu końcach wystają krótkie pojedyncze nici zakończone grupą $-OH'$ lub fosforanową przy C-5' rybozy. Te dwa wystające odcinki mają komplementarną sekwencję zasad, pozwalającą im na łączenie się i tworzenie kolistej struktury lub też na tworzenie dimerów, trimerów itd. Jeżeli taki DNA poddać działaniu polimerazy DNA, wtedy do wystających odcinków zostaną dobudowane „brakujące” fragmenty łańcucha i przyjmie on postać pełnej podwójnej spirali. Ta zmiana połączona jest z utratą infekcyjności DNA faga. Infekcyjność DNA można z powrotem przywrócić, działając na

niego egzonukleazą III z *E. coli*, która rozpoczynając hydrolizę z C-3' końca usunie dobudowane fragmenty łańcucha i przywróci mu wystające odcinki. Koniecznym więc warunkiem infekcyjności DNA faga jest istnienie na jego końcach wolnych, zdolnych do kohezji, krótkich odcinków łańcucha polinukleotydowego. W skład takiego odcinka wchodzi 20 nukleotydów (147). Struktury DNA faga przedstawiono na schemacie 6.



Schemat 6. Struktury DNA faga λ wg (128)

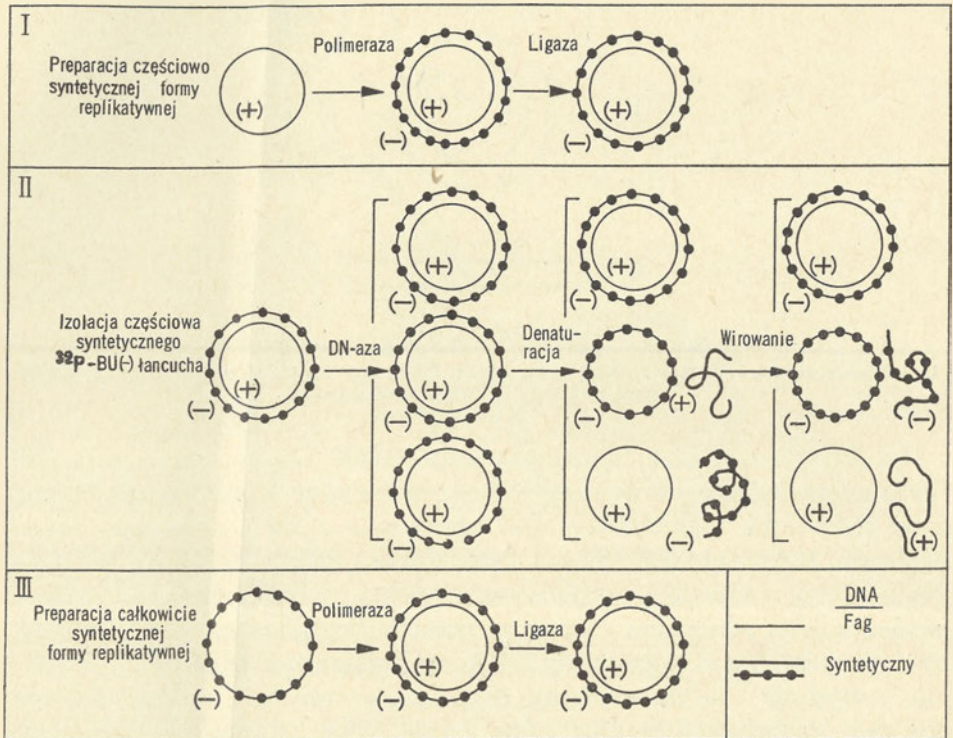
I. łańcuchowa struktura DNA, II. kolista struktura DNA, III. DNA z dobudowanymi fragmentami łańcucha polinukleotydowego

Dezoksyrybonukleazę trzustkową zastosowali Goulian i wsp. (56) w celu udowodnienia, że zsyntetyzowana przez nich *in vitro* replikatywna forma (RF) DNA faga ΦX 174 jest identyczna z RF naturalnego DNA. Częsteczka DNA faga ΦX 174 ma jednoniciową kolistą strukturę (łańcuch dodatni (+)), natomiast replikatywna forma przedstawia dwuniciową, również kolistą strukturę. Używając dodatniego łańcucha jako matrycy, polimerazy DNA z *E. coli*, ligazy DNA, trójfosforanów adenozyliny, guanozyliny, cytydyny i bromouracydyny (BU), znakowanych ³²P otrzymali oni częściowo syntetyczną replikatywną formę DNA, złożoną z naturalnego dodatniego i syntetycznego ujemnego (—) łańcucha.

Żeby wyodrębnić łańcuch (—), częściowo syntetyczną RF DNA poddali działaniu dezoksyrybonukleazy. Enzym powodował pęknięcie jednego tylko wiązania w łańcuchu (+) lub (—). Stosując denaturację termiczną oraz wirowanie w gradiencie gęstości można było obydwaj łańcuchy rozdzielić. Wyodrębniony łańcuch (—) był infekcyjny oraz miał zdolność tworzenia matrycy do syntezy łańcucha (+). W ten sposób można było odtworzyć całkowicie syntetyczną RF DNA faga ΦX 174 o specyficznej infekcyjności takiej, jaką miała naturalna RF cząsteczki DNA. Syntezę przedstawiono na schemacie 7.

Shapiro i wsp. (116) użyli swoistej wobec jednoniciowego DNA dezoksyrybonukleazy z *Neurospora crassa* do wyodrębnienia czystego operonu lac z *E. coli*. W błyskotliwym eksperymencie wykorzystali oni zdol-

ność genomu niektórych fagów do transdukcji operonu lac. Użyli oni dwóch fagów: λ (A) i ϕ 80 (B). DNA każdego z fagów zawierał łańcuch lekki (L) i łańcuch ciężki (H). Fag (A) włączał do cząsteczki swojego DNA dwie nici operonu lac w przeciwnym kierunku niż to czynił drugi fag (B). W wyniku tego procesu ta sama nić operonu lac znajdowała się w fagu λ w łańcuchu ciężkim (H), a w fagu ϕ 80 w łańcuchu lekkim (L). W ten sposób łańcuchy ciężkie z obu fagów, A i B, zawierały dwie komplementarne nici operonu lac. Następnie cząsteczki DNA faga A i B rozdzielono na

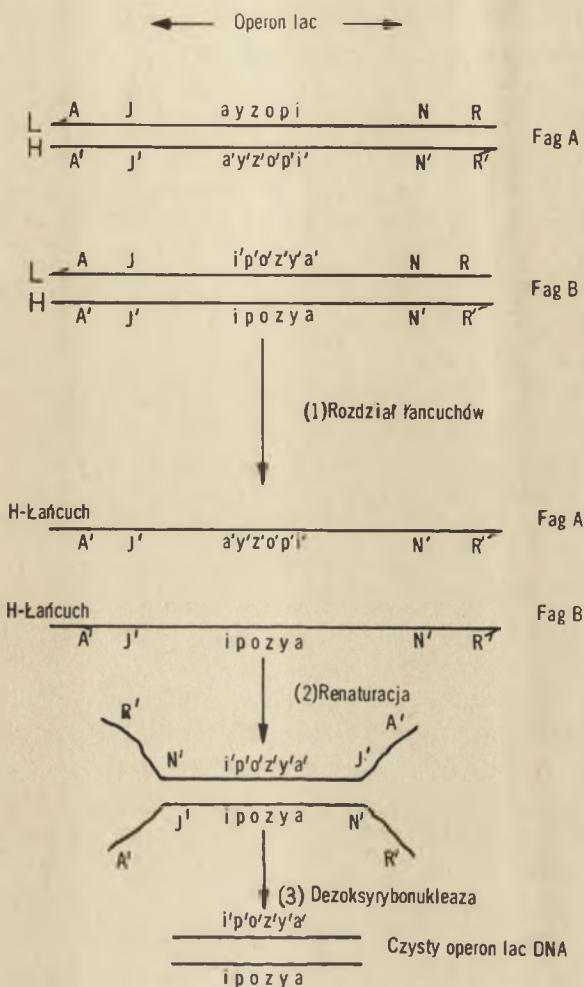


Schemat 7. Synteza DNA faga ΦX174 wg (56)

Objaśnienia w tekście

łańcuch lekki i ciężki stosując metodę opracowaną przez Hradeczną i Szybalskiego (64). W metodzie tej podstawę rozróżnienia dwóch łańcuchów na lekki i ciężki stanowi to, że tylko jeden z nich ma swoistą zdolność do reagowania z poli-I, G. Utworzony kompleks ma większą gęstość (ciężki) niż pozostały łańcuch (lekki). Wykorzystując różnicę gęstości można było rozdzielić obydwa łańcuchy. Wyodrębnione łańcuchy ciężkie z obu fagów zmieszano. Następowало teraz parowanie komplementarnych nici operonu lac. Fragmenty łańcucha DNA nie mające komplementarnej sekwencji zachowały jednoniciową strukturę. Działając na taką częściowo

dwuniciową, częściowo jednoniciową strukturę nukleazą swoistą dla jednoniciowego DNA usunięto niesparowane fragmenty otrzymując czysty operon lac (schemat 8).



Schemat 8. Wyodrębnianie operonu lac z *E. coli* wg (116)

A, J, N i R — markery chromosomów leżące poza operonem lac. Markerami operonu lac są: gen strukturalny represora (i), promotor (p), operator (o), strukturalny gen β -galaktozydazy (z), strukturalny gen lac permeazy (y), strukturalny gen transacetylazy galaktozydowej (a). Strzałki umieszczono na 5-końcach łańcuchów DNA. Znaki „prim” — oznaczają komplementarne sekwencje.

V. Uwagi końcowe

Ujawnianie i wyjaśnianie coraz bardziej złożonych struktur cząsteczek RNA i DNA będzie wymagać enzymów o wyjątkowo dużym stopniu swoistości. Wskazują na to jednoznacznie obecne tendencje w stosowaniu me-

tod enzymatycznych w analityce kwasów nukleinowych. Pogląd ten jest tym bardziej uzasadniony, że jak dotychczas chemiczne metody badania struktury kwasów nukleinowych nie gwarantują wymaganego stopnia swoistości.

Wyjątkowy stopień wybiórczości posiadają tylko nieliczne spośród znanych nukleaz. Wydaje się jednak, że lista tych enzymów w niedalekiej przyszłości zostanie powiększona o nowe odkrycia. Przemawiają za tym stosunkowo niedawne doniesienia o takich enzymach jak rybonukleaza U_2 (7, 8) czy dezoksyrybonukleaza ze szczepu *K E. coli* (91).

Niektóre spostrzeżenia ostatnich lat wskazują na pewne możliwości kształtowania swoistości enzymów przez dobór odpowiednich warunków reakcji. Zauważono, że swoistość enzymów ulega zmianom w czasie reakcji (139). Na przykład w przypadku dezoksyrybonukleazy I, swoistej wobec wielkocząsteczkowego DNA, występuje tzw. zjawisko „samoopóźnienia” (ang. *autoretardation*) polegające na tym, że w miarę przebiegu reakcji powstają coraz mniejsze fragmenty odporne na działanie enzymu i wskutek tego szybkość reakcji maleje (140). Dla nukleazy z mikrokoków charakterystyczne jest pojawianie się d-Ap i d-Tp w początkowym stadium reakcji i d-pC i d-pG w późniejszym etapie (130). Okazało się również, że swoistość enzymu może zależeć od rodzaju dwuwartościowego kationu w środowisku reakcji. W dwuniciowej strukturze dI:dC, łańcuch dC był całkowicie odporny na dezoksyrybonukleazę I w obecności Mg^{2+} . Dodanie do środowiska jonów Ca^{2+} lub zastąpienie Mg^{2+} przez Mn^{2+} znosiło tę oporność (24).

W rozwoju tego kierunku badań należy upatrywać zwiększone możliwości wykorzystania nukleaz w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych. Wreszcie rozwój metod chemicznej modyfikacji substratów w połączeniu z ich enzymatyczną degradacją stwarza możliwość rozszczepienia pewnych tylko wiązań. Wspomnieć tu należy o szczególnie użytecznych w badaniach struktury RNA siarczanie dwumetylu i CMCT. Siarczan dwumetylu reaguje z guanozyną i powstaje 7-metyloguanozyna. Wiązania położone przy takiej reszcie są niewrażliwe na działanie rybonukleazy T_1 (26, 78). W ten sposób po częściowej metylacji cząsteczki RNA i wyczerpującej jej degradacji rybonukleazą T_1 można uzyskać rozszczepienie tylko niewielkiej liczby wiązań. Ten właśnie sposób rozkładu wykorzystano w badaniach nad sekwencją rybosomalnego RNA 5S z *E. coli* (27).

Obiecujące podejście w rozwiązywaniu diskutowanego problemu stanowi też próba działania enzymami na kompleksy utworzone pomiędzy kwasami nukleinowymi a białkami lub innymi wielkocząsteczkowymi związkami. Mandeles (89) wykorzystał to do kontrolowanego rozszczepienia RNA z wirusa mozaiki tytoniowej. Z cząsteczki wirusa częściowo tylko usunięto białko, żeby odsłonić pewne obszary dla działania rybonukleazy T_1 .

Podkreślić należy, że pełne wykorzystanie metod enzymatycznych w

badaniach struktury i funkcji biologicznej kwasów nukleinowych możliwe jest w oparciu o stały rozwój innych metod analitycznych. Rozwój ten pozwala na wykrywanie coraz subtelniejszych zmian w strukturze RNA i DNA powstałych po zadziałaniu enzymami. Obecne metody pozwalają na zarejestrowanie rozszczepienia jednego tylko wiązania w cząsteczce DNA o masie 10^7 daltonów. Rozerwaniu pojedynczego wiązania w jednym z łańcuchów kolistej i skręconej cząsteczki DNA z polioma (141, 142) RF Φ X 174 (28) oraz z wewnątrzcząsteczkowej formy faga λ (22, 148), towarzyszy przejście w luźną kolistą formę. Zmiana ta połączona jest ze zmianami we współczynniku sedymentacji. Również udoskonalenie metod rozdzielania oligonukleotydów — dwukierunkowa jonoforeza i cienkowarstwowa chromatografia oraz elektroforeza na żelu akrylamidowym (106), stwarza nadzieję na wykrywanie coraz bardziej nikłych różnic sekwencji między różnymi rodzajami RNA.

LITERATURA

1. Adams A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1684 (1967).
2. Adams J. M., Jeppesen P. G. N., Sanger F., Barrel B. G., *Nature* **223**, 1009 (1969).
3. Adams A., Lindahl T., Fresco J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1684 (1967).
4. Apgar J., Everett G. A., Holley R. W., *J. Biol. Chem.* **241**, 1206 (1966).
5. Aposhian H. V., Friedman N., Nishihara M., Heimer E. P., Nussbaum A. L., *J. Mol. Biol.* **49**, 367 (1970).
6. Arber W., Linn S., *Annual Rev. Biochem.* **38**, 467 (1969).
7. Arima T., Uchida T., Egami F., *Biochem. J.* **106**, 601 (1968).
8. Arima T., Uchida T., Egami F., *Biochem. J.* **106**, 609 (1968).
9. Armstrong A., Hagopian H., Ingram V. M., Wagner E. K., *Biochemistry* **5**, 3027 (1966).
10. Artman M., Silman N., Engebret H., *Biochem. J.* **104**, 378 (1967).
11. Bardoń A., *Post. Biochem.* **13**, 389 (1967).
12. Barnard E. A., *Annual Rev. Biochem.* **38**, 677 (1969).
13. Bayev A., Venkstern T., Mirzabekov A., Krutilina A., Axelrod V., Engelhardt V., *Symp. genetic elements, Londyn 1966*.
14. Bell D., Russel G. J., *Biochemistry* **6**, 3363 (1967).
15. Bennett T. P., *Graphic Biochemistry, The Macmillan Company, New York, 1968, t. 1, rozdział 7*.
16. Bernardi A., Cantoni G. L., *J. Biol. Chem.* **244**, 1468 (1969).
17. Bernardi G., Cordonnier C., *J. Mol. Biol.* **11**, 141 (1965).
18. Bernardi G., Sadron Ch., *Biochemistry* **3**, 1411 (1964).
19. Billeter M. A., Weissman C., Warner R. C., *J. Mol. Biol.* **17**, 145 (1966).
20. Bishop J. M., Koch G., *J. Biol. Chem.* **242**, 1736 (1967).
21. Bishop J. M., Koch G., Levintov L., w *The Molecular Biology of Viruses*, red. J. S. Colter, W. Paranchych, Academic Press, New York 1967, str. 355.

22. Bode V. C., Kaiser A. D., *J. Mol. Biol.* **14**, 399 (1965).
23. Bogdanowa E. S., Gavrilowa L. P., Dvorkin G. A., Kisselev N. A., Spirin A. S., *Biochimija* **27**, 387 (1962).
24. Bollum F. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 2599 (1965).
25. Bose S., Nossal N., *Federation Proc.* **23**, 272 (1964).
26. Brimacombe R. L. C., Griffin B. E., Haines J. A., Haslam W. J., Reese C. M., *Biochemistry* **4**, 2452 (1965).
27. Brownlee G. G., Sanger F., Barrel B. G., *J. Mol. Biol.* **34**, 379 (1968).
28. Burton A., Sinsheimer R. L., *Science* **142**, 962 (1963).
29. Chang S. H., RajBhandary U. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 592 (1968).
30. Cousin M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **45**, 1363 (1965).
31. Cox R. A., *Biochem. J.* **106**, 725 (1968).
32. Cox R. A., *Biochem. J.* **106**, 733 (1968).
33. Cox R. A., *Biochem. J.* **114**, 753 (1969).
34. Cox R. M., Kanagalingam K., *Biochem. J.* **103**, 431 (1967).
35. Crawford L. V., *Virology* **7**, 359 (1959).
36. Dawid J. B., Wolstenholme D. R., *J. Mol. Biol.* **28**, 233 (1967).
37. Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 491 (1965).
38. Dütting D., Feldman H., Zachau H. G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **347**, 249 (1966).
39. Egami F., Takahashi K., Uchida T., *Progr. Nucleic Acid Res.* **3**, 59 (1964).
40. Fiers W., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **5**, 420 (1962).
41. Filipowicz B., *Post. Biochem.* **15**, 175 (1969).
42. Follman H., Wieker H. J., Witzel H., *European J. Biochem.* **1**, 243 (1967).
43. Freifelder D., Kleinschmidt A. K., Sinsheimer R. L., *Science* **146**, 254 (1964).
44. Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P., *Nature* **188**, 98 (1960).
45. Friedberg E. C., Goldthwait D. A., *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* **33**, 271 (1968).
46. Friedberg E. C., Goldthwait D. A., *Federation Proc.* **27**, 796 (1968).
47. Friedberg E. C., Hadi S. M., Goldthwait D. A., *J. Biol. Chem.* **244**, 5879 (1969).
48. Gassen H. G., Witzel H., *European J. Biochem.* **1**, 36 (1967).
49. Gawriłowa L. P., Bresler S. E., Mosevicki M. J., *Biochimija* **24**, 938 (1959).
50. Geiduschek E. P., Moohr J. W., Weiss S. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1078 (1962).
51. Giacomoni D., Spiegelman S., *Science* **138**, 1328 (1962).
52. Gilham P. T., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 687 (1962).
53. Gołaszewski T., *Post. Biochem.* **10**, 369 (1964).
54. Gould H., *Biochemistry* **5**, 1103 (1966).
55. Gould H., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 441 (1966).
56. Goulian M., Kornberg A., Sinsheimer R. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 2321 (1967).
57. Goulian M., Lucas Z. J., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **243**, 627 (1968).
58. Hayashi M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1736 (1965).
59. Healy J. W., Stollar D., Simon M. I., Levine L., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 461 (1963).
60. Hiesin R. B., Szjemiakin M. F., *Biochimija* **27**, 761 (1962).

61. Van Holde K. E., Brahm J., Michelson A. M., *J. Mol. Biol.* **12**, 726 (1965).
62. Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisee M., Merrill H. S., Penswick J. R., Zamir A., *Science* **147**, 1462 (1965).
63. Holley R. W., Everett G. A., Madison J. T., Zamir A., *J. Biol. Chem.* **240**, 2122 (1965).
64. Hradecna Z., Szybalski W., *Virology* **32**, 633 (1967).
65. Hurwitz J., Becker A., Gefter M. L., Gold M., *J. Cell Physiol.* **70**, 181 (1967).
66. Irie M., *J. Biochem. (Tokyo)* **63**, 649 (1968).
67. Jansz H. S., Baas P. D., *J. Mol. Biol.* **32**, 159 (1968).
68. Jorgenson S. E., Koerner J. F. *J. Biol. Chem.* **241**, 3090 (1966).
69. Kasai K., Grünberg-Manago M., *European J. Biochem.* **1**, 152 (1967).
70. Klee C. B., Singer M. F., *J. Biol. Chem.* **243**, 923 (1968).
71. Klett R. P., Cerami A., Reich E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 943 (1968).
72. Korn D., Weissbach A., *J. Biol. Chem.* **238**, 3390 (1963).
73. Lacks S., Greenberg B., *J. Biol. Chem.* **242**, 3108 (1967).
74. Lark K. G., *Annual Rev. Biochem.* **38**, 569 (1969).
75. Laskowski M., *Post. Biochem.* **6**, 3 (1960).
76. Laskowski M., Sr., *Advan. Enzymol.* **28**, 1 (1967).
77. Laskowski M., Sr., *Advan. Enzymol.* **29**, 165 (1967).
78. Lawley P. D., Brookes P., *Biochem. J.* **89**, 127 (1963).
79. Lehman I. R., *J. Biol. Chem.* **235**, 1479 (1960).
80. Lehman I. R., *Progr. Nucleic Acid. Res.* **2**, 84 (1963).
81. Lehman I. R., *Annual Rev. Biochem.* **36**, 645 (1967).
82. Lehman I. R., Nussbaum A. L., *J. Biol. Chem.* **239**, 2628 (1964).
83. Lehman I. R., Richardson C. C., *J. Biol. Chem.* **239**, 233 (1964).
84. Lehman I. R., Richardson C. C., *Federation Proc.* **24**, 1466 (1965).
85. Linn S., Lehman I. R., *J. Biol. Chem.* **240**, 1287 (1965).
86. Little J. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 679 (1967).
87. McLeod K. M., Huang S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **149**, 12 (1967).
88. Madison J. T., Holley R. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 153 (1965).
89. Mandeles S., *J. Biol. Chem.* **243**, 3671 (1968).
90. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.* **52**, 552 (1952).
91. Meselson M. Yuan R., *Nature* **217**, 1110 (1968).
92. Millar D. B., Byrne R. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **119**, 398 (1967).
93. Mitra S., Kornberg A., *J. Gen. Physiol.* **49**, 59 (1966).
94. Montagnier L., Sanders F. K., *Nature* **199**, 664 (1963).
95. Morais R., Blacktsein M., Lamirande G., de, *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 711 (1967).
96. Nikei T., Cantoni G. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 3991 (1963).
97. Nossal G. W., Singer M. F., *J. Biol. Chem.* **243**, 913 (1968).
98. Oleson A. E., Koerner J. F., *J. Biol. Chem.* **239**, 2935 (1964).
99. Ostrowski W., Walczak Z., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 345 (1961).
100. Paul A. V., Lehman I. R., *J. Biol. Chem.* **241**, 3441 (1966).
101. Pfefferkorn E., Amos H., *Virology* **6**, 299 (1958).
102. Preiss J., Berg P., Ofengand E. J., Bergman F. H., Dieckman M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 319 (1959).

103. Ralph R. K., *Advan. Virus Res.* **15**, 61 (1969).
104. Razzel W. E., Khorana H. G., *J. Biol. Chem.* **234**, 2114 (1959).
105. Reddi K. K., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 132 (1959).
106. Richards E. G., Coll J. A., Gratzner W. B., *Anal. Biochem.* **12**, 452 (1965).
107. Richardson C. C., *Annual Rev. Biochem.* **38**, 795 (1969).
108. Richardson C. C., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **239**, 242 (1964).
109. Richardson C. C., Lehman I. R., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **239**, 251 (1964).
110. Robertson H. D., Webster R. E., Zinder N. D., *J. Biol. Chem.* **243**, 82 (1968).
111. Rushizky G. W., Knight C. A., Sober H. A., *J. Biol. Chem.* **236**, 2732 (1963).
112. Sadowski P., Ginsberg B., Yudelovich A., Feiner L., Hurwitz J., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**, 165 (1968).
113. Sanger F., Brownlee G. G., Barrel B. G., *J. Mol. Biol.* **13**, 373 (1965).
114. Schildkraut C. L., Marmur J., Fresco J. R., Doty P., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 2 (1961).
115. Schumaker V. H., Richards E. G., Schackman H. K., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4230 (1956).
116. Shapiro J., Machattie L., Eron L., Ihler G., Ippen K., Beckwith J., *Nature* **224**, 768 (1969).
117. Shatkin A. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1721 (1965).
118. Short E. C., Jr., Koerner J. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 595 (1965).
119. Shugar D., *Post. Biochem.* **1**, 269 (1955).
120. Sierakowska H., *Post. Biochem.* **15**, 193 (1969).
121. Singer M. F., Tolbert G., *Biochemistry* **4**, 139 (1965).
122. Sinsheimer R. L., Starman B., Nagler C., Guthrie S., *J. Mol. Biol.* **4**, 142 (1962).
123. Spahr P. F., *J. Biol. Chem.* **239**, 3716 (1964).
124. Spahr P. F., Gesteland R. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 876 (1968).
125. Spirin A. S., *J. Mol. Biol.* **2**, 436 (1960).
126. Spirin A. S., *Biochimija* **26**, 511 (1961).
127. Staehelin M., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 493 (1964).
128. Strack H. B., Kaiser A. D., *J. Mol. Biol.* **12**, 36 (1965).
129. Studier F. W., *J. Mol. Biol.* **11**, 373 (1965).
130. Sulkowski E., Laskowski M., Sr., *J. Biol. Chem.* **237**, 2620 (1962).
131. Sulkowski E., Laskowski M. Sr., *J. Biol. Chem.* **243**, 4917 (1968).
132. Sulkowski E., Laskowski M. Sr., *J. Biol. Chem.* **244**, 3818 (1969).
133. Takahashi K., *J. Biol. Chem.* **240**, 4117 (1965).
134. Takanami M., Zubay G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 834 (1964).
135. Thomas C. A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1861 (1956).
136. Thomas C. A., *J. Gen. Physiol.* **49**, 143 (1966).
137. Trilling D. M., Aposhian H. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 622 (1965).
138. Trilling D. M., Aposhian H. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 214 (1968).
139. Vanecko S., Laskowski M. Sr., *J. Biol. Chem.* **236**, 1135 (1961).
140. Vanecko S., Laskowski M., Sr., *J. Biol. Chem.* **236**, 3312 (1961).
141. Vinograd J., Lebowitz J., *J. Gen. Physiol.* **49**, 103 (1966).
142. Vinograd J., Lebowitz J., Radloff R., Watson R., Laipis P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1104 (1965).
143. Weissbach A., Korn D., *J. Biol. Chem.* **237**, 3312 (1962).
144. Whitfield P., Witzel H., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 338 (1963).
145. Witzel H., Barnard E. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 289 (1962).

146. Witzel H., Barnard E. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 295 (1962).
147. Wu R., Kaiser A. D., *J. Mol. Biol.* **35**, 523 (1968).
148. Young E. T., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **10**, 562 (1964).
149. Young E. T., Sinsheimer R. L., *J. Biol. Chem.* **240**, 1274 (1965).
150. Zachau H. D., Dütting D., Feldman M., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **347**, 212 (1966).

EWA KUREK*

Fosfobiałka komórkowe i ich rola biologiczna

Cellular Phosphoproteins and Their Biological Function

The localization of cellular phosphoproteins in eucariotic and procariotic organisms is reviewed. Their possible functions in the different metabolic processes of cell are discussed.

Fosfoproteidy stanowią grupę kwaśnych białek złożonych, w których z aminokwasami łańcucha peptydowego związane są reszty fosforanowe. Zawartość fosforu w naturalnych fosfobiałkach jest różna i waha się od 1—30 reszt PO_4^{1-} na 1 cząsteczkę białka. Akceptorami reszt fosforanowych w białku mogą być różne grupy funkcyjne. Do głównych połączeń fosfoaminokwasowych należą: estry tlenowe hydroksyaminokwasów seryny i treoniny (typ wiązania -O-P) i połączenia fosfoamidowe, głównie N-3 histydyny (typ wiązania -N-P). Połączenia fosfoestrowe charakteryzują się trwałością przy niskich wartościach *pH* i labilnością w środowisku alkalicznym. Fosfobiałka zawierające P-histydynę są natomiast labilne w środowisku kwaśnym i względnie stabilne w alkalicznym (52).

Lokalizacja fosfobiałek w komórkach jest bardzo różnorodna, co wiąże się zapewne z różnorodnością ich funkcji. Znalaziono je we frakcjach błon komórkowych, w mitochondriach, frakcjach cytoplazmatycznych, w jądrach, a także w rybosomach. Fosfobiałka zawierające P-histydynę występują stosunkowo rzadko. Tak ufosforylowany aminokwas wyizolowano z białek mitochondriów nerki i wątroby szczura (83), bakteryjnej syntetazy sukcynylo-CoA (70), fosfogliceromutazy zwierzęcej (65), a także z białka histydynowego (HPr) bakteryjnego systemu fosfotransferazowego (11, 45, 46, 47, 66, 73, 82). Większość fosfobiałek zawiera ufosforylowaną serynę i treoninę. Tu należą: witellina z żółtka jaja, owoalbumina z białka jaja, fibrynogen (człowieka i psa), preparaty cieni erytrocytów, a także kwaśne białka chromatynowe (1, 4, 9, 39, 40, 43, 52). W niektórych przy-

*Dr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biochemii, Uniwersytet im. M. Curie-Skłodowskiej, Lublin

Wykaz stosowanych skrótów: HPr — białko histydynowe, cAMP — cykliczny adenozynomonofosforan, PEP — fosfoenolopirogronian, SDS — sól sodowa siarczanu dodecyłu, fb — fosfobiałka

padkach aminokwasy te tworzą sekwencje typu (O-fosfo-L-seryna)_n, gdzie $n = 1-6$. Tak jest w kazeinie, fosfitynie, fosfobiałkach mózgowych, a także preparatach z komórek nowotworowych. Charakterystyczną cechą tych białek jest występowanie w łańcuchu peptydowym leucyny, izoleucyny, kwasu asparaginowego i glutaminowego w sąsiedztwie P-seryny lub P-treoniny (41, 52, 56, 59). W enzymatycznych fosfobiałkach frakcji wyodrębnionych z licznych drobnoustrojów oraz z błon mitochondrialnych występują: P-seryna, P-treonina i P-histydyna (2, 3, 12, 13, 25, 26, 27, 59, 64, 65, 75, 83).

W komórce fosfobiałka powstają w wyniku fosforylacji reszt aminokwasowych w już utworzonym łańcuchu peptydowym, a nie wbudowywania ufosforylowanych aminokwasów do łańcucha. Proces fosforylacji jest katalizowany przez swoistą fosfokinazę białkową, w obecności ATP jako źródła energii i fosforu. W przypadku fosfobiałek mózgu nie wyklucza się udziału GTP obok ATP jako donatora energii. Fosforylacja „białka histydynowego” układu fosfotransferazowego Rosemana zachodzi przy udziale fosfoenolopirogronianu (PEP) jako dawcy grupy fosforanowej i energii (45, 48, 52).

Białka komórek bakteryjnych zawierają mało fosforu w porównaniu do kazeiny i fosfityny. Na aktywną rolę fosfobiałek w komórkach mikroorganizmów może wskazywać zmniejszanie się ilości fosforu fosfobiałkowego w komórce wraz ze zmianą logarytmicznej fazy wzrostu na stacjonarną (63).

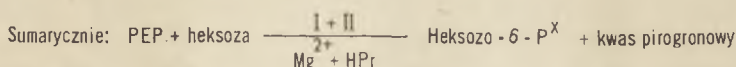
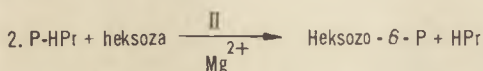
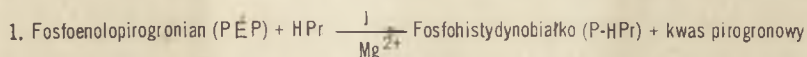
Celem niniejszego przeglądu jest omówienie lokalizacji i funkcji biologicznej poszczególnych rodzajów fosfobiałek komórkowych.

I. Fosfobiałka transportowe

Lokalizacja fosfobiałek w błonie komórkowej lub w jej pobliżu przemawia za ich udziałem w transporcie jonów Na^+ i K^+ , wody i niskocząsteczkowych związków organicznych do komórki. Pobudzenie *in vitro* tkanki mózgowej bodźcami elektrycznymi powoduje podwyższenie poziomu fosfobiałek w komórce. Przypuszcza się, że zmiany te stanowią część łańcucha reakcji łączących metaboliczny odzew tkanki nerwowej na zmiany wywołane bodźcami elektrycznymi (52). Heald (31, 32) przypisuje fosfobiałkom mózgu ważną rolę w transporcie jonów. Obecność sekwencji ujemnie naładowanych reszt fosforanowych seryny w fosfobiałkach czyni je naturalnymi polielektrolitami, które w roztworach mogą wykazywać działanie podobne do syntetycznych żywic jonowymiennych. Mogą one pełnić funkcję metabolicznie aktywnych naturalnych wymienników jonowych, czego wynikiem może być transport jonów lub wody przez błony komórkowe. Ahmed i Judah (6) wykazali, że istnieje bezpośredni

związek między fosforylacją białka przez ATP a transportem wody. Autorzy ci stwierdzili, że substancje, które hamują transport jonów Na^+ i K^+ w komórkach wątroby, na przykład cholina, hamują jednocześnie przemianę fosfobiałek. Wykazano także funkcję tego typu fosfobiałek jako przenośnika jonów w erytrocytach człowieka (34).

W komórkach bakteryjnych stwierdzono wyraźny związek między układem fosfotransferazowym i permeazą węglowodanową. Kundig i wsp. (45) wyodrębnili z komórek *E. coli*, *Aerobacter cloacae* i *aerogenes* oraz z *Lactobacillus arabinosus*, a Simoni i wsp. (73) ze *Staphylococcus aureus* — układ fosfotransferazowy, który zawiera dwa enzymy, I i II, oraz ciepło-stabilne „białko histydynowe” (HPr). Układ fosfotransferazowy według tych autorów działa według schematu 1.



Schemat 1. Układ fosfotransferazowy u bakterii wg (45, 73)

* wyjątek stanowi fruktoza, która u *E. coli* i *A. aerogenes* jest fosforylowana na C-1 (45)

Pierwszą reakcją w tym układzie jest przeniesienie fosforanu z PEP na HPr, a ściślej związanie go z atomem azotu w pierścieniu imidazolowym reszty histydynowej. Reakcję tę katalizuje enzym I. HPr i enzym I są zlokalizowane w cytoplazmie (66) i nie wykazują swoistości substratowej. Drugą reakcję — przeniesienie fosforanu z HPr na cukier katalizuje enzym II, związany z błoną komórkową (47) i czynnik cytoplazmatyczny F III, wyodrębniony przez Henstemberga i wsp. (32) w 1969 roku. Te dwa czynniki warunkują swoistość substratową układu. Mutanty wykazujące zakłócenia w syntezie enzymu I lub HPr nie są zdolne do wykorzystywania większości cukrów. Geny kodujące enzym I i HPr są zlokalizowane bardzo blisko siebie w obrębie operonu i w szczepie dzikim podlegają ściślejszej indukcji skoordynowanej (66). Synteza enzymu II jest indukcyjna. Enzym ten stanowi związany z błoną kompleks, który daje się rozfrakcjonować na część IIA (trzy białka) i IIB oraz składnik lipidowy. Połączone frakcje IIA i IIB katalizują fosforylację dopiero po uzupełnieniu kationem dwuwartościowym (Ca^{2+} lub Mg^{2+}) i komponentą lipidową. U *E. coli* czynnikiem aktywnym jest fosfatydyloglicerol. Frakcja IIB, fosfatydyloglicerol i kation dwuwartościowy tworzą sedimentu-

jący kompleks, który katalizuje fosforylację cukrów w obecności frakcji IIA i fosfo-HPr. Optymalną aktywność wykazuje kompleks, w którym stosunek frakcji IIB i lipidu wynosi 1 : 1 (w/v). Białko IIB podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) wędruje jako pojedyncze pasmo z ruchliwością wskazującą na ciężar cząsteczkowy około 36 000. Reprezentuje ono około 10% białek błony komórkowej (47).

Simon i wsp. (73) wykazali, że układ fosfotransferazowy pełni decydującą rolę w transporcie, a nie w metabolizmie cukru wewnątrz komórki, chociaż jedna z ostatnich prac na ten temat (57) sugeruje, że układ ten bierze udział w przemianach katabolicznych fruktozy i mannitolu u *Clostridium thermocellum*.

Fosforylacja przez system Rosemana jest niezbędna podczas transportu wszystkich cukrów do komórek bakterii Gramododatnich. U Gramujemnych system ten katalizuje przeniesienie fosforanu z PEP na cukry o konfiguracji D-glukozy i D-mannozy (46). *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* transportują pewne cukry (glukoza, mannitol, fruktoza, N-acetylo-D-glukozaamina) z udziałem układu fosfotransferazowego, inne cukry (glicerol, maltozę, laktozę) z udziałem innych układów. Galaktoza jest fosforylowana przez ten układ, lecz nie jest to jedyna możliwa droga transportu tego cukru do komórki (66, 82).

II. Fosfobiałka mitochondrialne

Mitochondria zawierają dwa rodzaje fosfobiałek: kwaso-labilne i kwaso-stabilne. Są one zlokalizowane we frakcji błon (58).

Beyer (12, 13) wyodrębnił z mitochondriów serca wołu fosforylotransfosforylazę, która katalizuje syntezę ATP z ADP w obecności P_i i sama ulega ufosforylowaniu podczas fosforylacji oksydacyjnej. Inhibitory fosforylacji oksydacyjnej i transportu elektronów jak również czynniki rozkojarzające hamują fosforylację apoenzymu transfosforylazy, natomiast nie wpływają na reakcję przeniesienia grupy fosforanowej z ufosforylowanego enzymu na ADP. Tylko połowa związanego z enzymem fosforu bierze udział w tej reakcji. Trwałość wiązania grupy fosforanowej z enzymem zmienia się bardzo wyraźnie po reakcji z ADP. Przed reakcją fosforan jest łatwo uwalniany z białka przez ogrzanie lub trawienie kwasem, natomiast po przeniesieniu reszty PO_4^{3-} z enzymu na ADP, ta część fosforu, która pozostaje związana z białkiem enzymu uzyskuje taką stabilność, jaką wykazują reszty fosfoserynowe. Wysunięto hipotezę, że fosforylotransfosforylaza uczestniczy w fosforylacji oksydacyjnej, pełniąc funkcję niestabilnego ufosforylowanego pośrednika, którego istnienie zakładało już wielu badaczy.

Zając (83) zaproponował mechanizm fosforylacji fosfobiałek w mitochondriach nerki i wątroby szczura. Reakcja ta byłaby sprzężona z fosforylacją oksydacyjną i substratową. Używając inhibitorów cyklu Krebsa i dwunitrofenolu Zając wykazał udział fosforylacji substratowej i oksydacyjnej w fosforylacji fosfobiałek kwasostabilnych zawierających P-histydynę. Natomiast ATP uczestniczy w fosforylacji fosfobiałek zawierających P-serynę. GDP i AMP hamowały fosforylację obu frakcji fosfobiałek mitochondrialnych.

III. Cytoplazmatyczne fosfobiałka z aktywnością enzymatyczną

Do tej grupy można zaliczyć enzymy, które stale zawierają w swojej cząsteczce reszty kwasu fosforowego i te, które ulegają cyklicznie fosforylacji w czasie reakcji enzymatycznej. Pierwszy rodzaj reprezentują enzymy proteolityczne, na przykład pepsyna i pepsynogen. Nie wykazano udziału reszt fosforanowych w specyficznym działaniu tych enzymów. Oba białka zawierają fosforan związany z seryną. Spełnia on prawdopodobnie rolę czynnika modyfikującego strukturę przestrzenną białka enzymu (52). Do drugiej grupy zaliczamy przede wszystkim fosfatazy, fosforylazy i transfosforylazy.

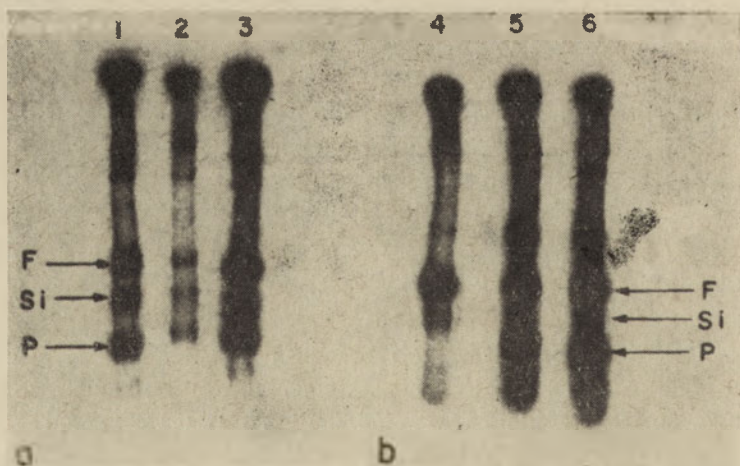
Agreen i Engstrom (3) wyodrębnili z komórek drożdżowych fosfoglukomutazę, fosfobiałko biorące udział w przeniesieniu fosforanu. Stwierdzono, że enzym ten, podobnie jak heksokinaza, fosforylaza z mięśni, fosfoglukomutaza z mięśni i fosfogliceromutaza z drożdży, działa w dwóch etapach. W pierwszym etapie seryna białka enzymatycznego jest fosforylowana kosztem ATP (26, 55, 59) (wyjątek stanowi fosfogliceromutaza drożdżowa, w której fosforylacji ulega histydyna (65)). Następnie grupa fosforanowa z białka enzymatycznego jest przenoszona na akceptor. Akceptorami są różne związki w zależności od swoistości enzymu. Wszystkie te enzymy funkcjonują jako transfosforylazy i występują w dwóch stanach: fosfoenzymu i enzymu pozbawionego fosforu.

Bardzo rozpowszechnionymi w świecie roślinnym i zwierzęcym oraz w komórkach drobnoustrojów enzymami są fosfatazy, które także tylko na krótki okres czasu przyłączają reszty fosforanowe, pełniąc funkcję ufosforylowanych związków pośrednich. Enzymy te katalizują reakcję odszczepienia fosforanu od różnych związków (23). Najlepiej poznana spośród nich jest fosfataza alkaliczna z *E. coli*. Inkubując oczyszczony enzym ze znakowanym ^{32}P fosforanem nieorganicznym wykazano powstawanie połączeń fosforan-białko. Reakcja przyłączania fosforanu przebiega w środowisku kwaśnym (optimum pH 4,0), jest szybka, swoista i odwracalna. Cząsteczka enzymu zawiera 33 reszty serynowe, lecz tylko jedna z nich reaguje z fosforanem. Ta reaktywna seryna znajduje się w centrum aktywnym enzymu. Specyficzna lokalizacja tego enzymu w przestrzeni pe-

riplazmatycznej umożliwia transport do komórki tych związków, które w formie ufosforylowanej nie są zdolne do penetracji przez błonę cytoplazmatyczną (15, 25, 27, 67, 68, 69, 75, 79).

IV. Fosfobiałka rybosomowe

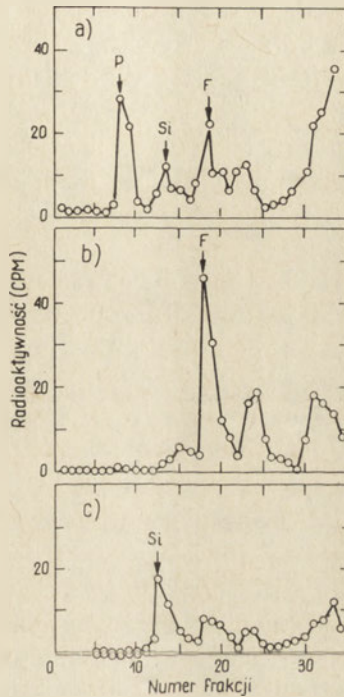
1970 rok przyniósł ciekawe doniesienia dotyczące fosforylacji białek rybosomowych. Loeb i Blat (53) w rybosomach wątroby szczura, a Kabat (36) w rybosomach retikulocytów królika wykazali *in vivo* i *in vitro* fosforylację białek rybosomowych zachodzącą z udziałem ATP, a katalizowaną przez pozajądrową kinazę białkową. Fosforylacja tych białek zachodzi w wyniku przeniesienia grupy γ -fosforanowej z ATP na reszty seryny i treoniny w łańcuchu peptydowym. Walton i wsp. (80) wykazali, że w korze nadnerczy wołu reakcję tę katalizuje kinaza białkowa zależna od cyklicznego adenozyńmonofosforanu (cAMP), zlokalizowana w mikrosomach. Działając 0,25% dezoksychohanem sodu na retikulum endoplazmatyczne można uwolnić 71% aktywności kinazowej oraz białko receptorowe dla cAMP, bez inaktywacji obu białek. Wykazano, że rybosomy przemyte 0,5M NH_4Cl , chociaż nieaktywne w syntezie białka *in vitro*, są dobrym substratem do fosforylacji ich białek z udziałem ATP, kinazy białkowej, cAMP i białka receptorowego dla cAMP. W stężeniach 10^{-5} — 10^{-9} M cAMP stymuluje około trzykrotnie fosforylację tych białek. Spośród innych cyklicznych nukleotydów tylko cIMP wyraźnie pobudzał fosforylację, chociaż w znacznie mniejszym stopniu (20% wartości dla cAMP) (53, 80). Kabat (36, 37) stosując elektroforezę na żelach



Rys. 1. Autoradiogram z elektroforegramu na żelu poliakrylamidowym białek rybosomowych znakowanych ^{32}P wg Kabata (37)

a) system bezkomórkowy — 1. kontrola 2. w obecności 0,02M cAMP 3. w obecności 0,02M NaF
b) wewnątrzkomórkowo — 4. rybosomy po traktowaniu 0,5% dezoksychohanem sodu 5,6. rybosomy przemyte buforem: 0,01M Tris-HCl, 0,25M KCl, 0,01M MgCl_2 , pH 7,4

poliakrylamidowych zawierających 0,6% SDS stwierdził, że 40% ^{32}P związanego z rybosomami jest zawarte w około 10 różnych białkach luźno połączonych z rybosomami i zostaje odszczepione po przemyciu rybosomów buforem o wysokiej sile jonowej. Znakując rybosomy ^{32}P zarówno wewnątrzkomórkowo (*in vivo*) jak i w ekstraktach bezkomórkowych (*in vitro*), zidentyfikowano oprócz tych białek 3 frakcje elektroforetyczne, które są silnie związane z rybosomami i każda z nich ma charakterystyczną lokalizację, a chyba także i funkcję, warunkującą specyfikę rybosomu na różnych etapach syntezy białka (rysunki 1 i 2).



Rys. 2. Rozmieszczenie radioaktywności w elektroforegramach na żelu poliakrylamidowym białek rybosomowych znakowanych wewnątrzkomórkowo ^{32}P wg Katabata (36)

a) całe rybosomy b) podjednostki 30S uzyskane po dysocjacji rybosomów 0,01M EDTA c) podjednostki 50S uzyskane jak w b

Fracja „Si” jest białkiem, zasocjowanym z większą podjednostką rybosomową i prawdopodobnie jest jej strukturalnym składnikiem, a fosforylacja tego białka następuje tylko na monosomach. Sugeruje się, że rybosomy zawierające ufosforylowane białko „Si” są klasą nieaktywnych cząstek, które mogą być formą magazynowania rybosomów.

Fracja „F” jest fosfobiałkiem zasocjowanym z monosomem i zlokalizowanym na mniejszej podjednostce. Fosforylację tego białka stymuluje inkubacja komórek z 0,03M NaF. Fluorek jest znanym czynnikiem hamu-

jącym proces inicjacji syntezy białka. Colombo i wsp. (21) wykazali, że podczas inkubacji retikulocytów z NaF zmniejsza się w komórce liczba podjednostek rybosomowych, a jednocześnie gromadzą się monosomy 80S. Działanie fluorku jest sprzężone z obniżeniem ilości ATP w komórce. Dzieje się tak dlatego, że fluorek hamuje procesy utleniania glukozy. Zwiększenie ilości monosomów w komórce jest zatem wtórnym efektem hamowania przez NaF procesów dostarczających energię. Wpływ NaF na zwiększenie fosforylacji białka „F” może być związany z zakłóceniem procesów enzymatycznych, jakkolwiek brak jest bliższego wyjaśnienia tego zjawiska.

Fracja „P” cechuje się wysoką radioaktywnością. Stwierdzono, że jest to substancja niebiałkowa, niskocząsteczkowa, charakteryzująca się dużą ruchliwością elektroforetyczną. Brak dokładniejszych danych o tym składniku rybosomowym.

Na mniejszej podjednostce rybosomu mieści się także fosfobiałko tzw. frakcja „Su” (36), które przypuszczalnie oddysocjowuje, gdy podjednostki te łączą się z mRNA, gdyż polirybosomom brakuje tego białka. 0,03M NaF stymuluje fosforylację tego białka.

Wydaje się, że fosforylacja białek rybosomowych jest jednym z mechanizmów regulujących procesy komórkowe na poziomie translacji przez modyfikację struktury samego rybosomu. Dotyczy to nie tylko rybosomów *Eucariota*, ale także rybosomów *E. coli*, które, jak wynika z doświadczeń Kurek (dane niepublikowane), ulegają także fosforylacji.

V. Fosfobiałka jądrowe

Omawiając fosfobiałka jądrowe należy zwrócić uwagę na ich szczególną lokalizację w chromosomie organizmów wyższych. W ostatnich latach powszechnie przyjmowanym modelem chromosomu jest taki układ, w którym nici białka kwaśnego biegnie wewnątrz zwojów podwójnie skręconych helis DNA. Histony ułożone są na zewnątrz DNA w postaci oddzielonych od siebie pasm i skupień, które spinają spiralne molekuly DNA. Długa oś histonów ustawia się pod kątem około 58° do długiej osi DNA i równoległe do szerokich rowków. Regularne odległości między mostkami histonowymi są równe w przybliżeniu skokowi spirali DNA. Histony stabilizują taką strukturę chromosomu i ochraniają DNA przed denaturacją cieplną (42).

Oprócz komponentów strukturalnych, które spełniają niewątpliwie także funkcjonalną rolę, w chromosomie znaleziono dodatkowy czynnik, którego rola strukturalna wydaje się znikoma, natomiast funkcja według pewnych badaczy (18, 19) istotna. Tym czynnikiem jest RNA chromatynowy, stanowiący nową klasę kwasów rybonukleinowych. Zawiera on duże ilości adeniny i kwasu dwuhydrourydylowego, a długość jego łańcucha jest określana na około 40 nukleotydów. Wiązanie RNA z białkiem na-

stępuje poprzez kwas dwuhydrourydylowy. Związany z białkiem RNA jest odporny na działanie rybonukleazy (18, 19). Ostatnio ukazało się kilka prac rzucających nowe światło na zagadnienia RNA chromatynowego. Autorzy tych doniesień (7, 22, 24) wykazali, że łańcuch RNA zasocjowanego z chromatyną jest dużo dłuższy niż łańcuch złożony z 40 nukleotydów. Heterologiczny jądrowy RNA cechuje wysoka zawartość adeniny występującej w powtarzających się sekwencjach 150—200 nukleotydów. Badania przeprowadzone na komórkach HeLa i raka Ehrlicha (22, 24) wskazują na duże podobieństwo RNA chromatynowego do mRNA i najsurowiej przypuszczają, że RNA jądrowy może spełniać rolę prekursora

Tablica 1

Skład dezoksyrybonukleoproteidów z różnych organizmów (za 62), uzupełnione danymi (10) i Kurek (dane niepublikowane)

	Stosunek składników			Metoda preparatyki
	DNA	RNA	Białko	
1. <i>E. coli</i>				
a. 1,0		0,03	2,3	różnicowe wirowanie
b. 1,0		<0,1	1,0	różnicowe wirowanie
c. 1,0		—	0,25	sączenie przez żel
d. 1,0		—	1,54	sączenie przez żel (Kurek, dane niepublikowane)
2. <i>B. megaterium</i>				
a. 1,0		0,14	1,4	różnicowe wirowanie
b. 1,0		1,0	3,0	różnicowe wirowanie
3. <i>B. subtilis</i>				
1,0		0,1	1,2	precypitacja
4. <i>Achromobacter sp.</i>				
1,0		<0,01	1,2	precypitacja
5. Nukleohiston z grasicy cielęcej				
1,0		—	1,1	różnicowe wirowanie
6. Nukleohiston z kielków grochu				
1,0		0,13	1,3	różnicowe wirowanie
7. Chromatyna z wątroby szczura				
a. 1,0		0,043	1,67	różnicowe wirowanie
b. 1,0		0,1	3,0	różnicowe wirowanie (10)

mRNA. Artmanowi i Rothowi (7) nie udało się wykazać istnienia wiązania kowalentnego między jądrowym RNA a białkiem w wątrobie i erytrocytach kurczęcia ani oporności tego RNA na działanie nukleaz. Dotychczas zgromadzone dane o nukleoproteidzie jądrowym nie wyjaśniają jednoznacznie roli i budowy RNA chromatynowego, jakkolwiek występowanie RNA w chromosomie organizmów wyższych nie ulega wątpliwości.

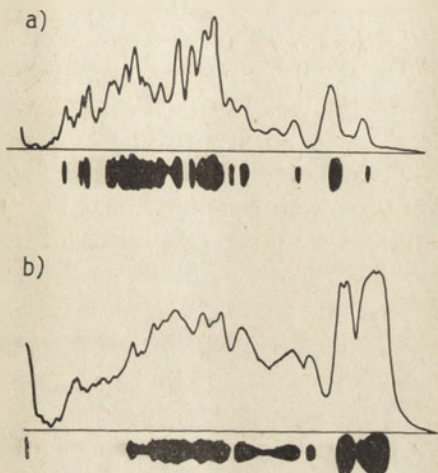
Stosunek poszczególnych komponentów w chromatynie z różnych or-

ganizmów jest różny; różnią się także dane podawane przez różnych autorów dla tego samego organizmu (tablica 1).

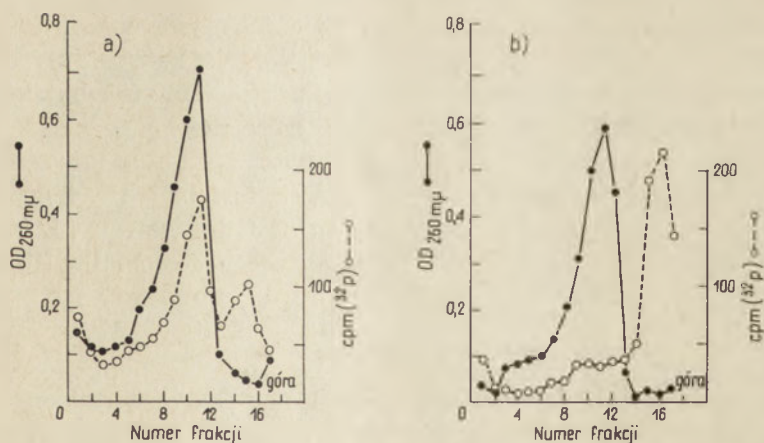
Przypuszcza się, że histony oprócz roli strukturalnej pełnią także zasadniczą rolę funkcjonalną. Wykazano, że chromatyna występuje w gęstej nieaktywnej postaci, gdy zawiera dużo histonów, a ściślej frakcji lizynowej i niewielką ilość kwaśnych białek (41, 44). Rozkładając natywny DNA dezoksyrybonukleazą na odcinki określonej wielkości Bonner (14) otrzymał prawie stechiometryczny rozdział na eu- i heterochromatynę i stwierdził, że odcinki skompleksowane z histonem i ubogie w białko niehistonowe to heterochromatyna nie wykazująca funkcji matrycowej dla mRNA. Stwierdzono hamujący wpływ histonów i ich podfrakcji, niezależnie od pochodzenia gatunkowego i tkankowego, na syntezę RNA zależną od DNA. Stopień hamowania jest bardzo wysoki — od 100—70% (14, 42, 44, 62). W związku z tym wysuwa się szereg hipotez o roli histonów w komórce, z których najbardziej atrakcyjna jest hipoteza ich funkcji jako inhibitorów genowych, przedstawiona przez Stedmanów (74) w 1950 roku. Najpoważniejszym zarzutem stawianym tej hipotezie jest brak specyficzności gatunkowej i tkankowej histonów, a substancja regulująca musi wykazywać specyficzność względem miejsca działania. Istnieje pogląd, że histony wiążą się z RNA chromatynowym. Ten rodzaj RNA wykazuje duży stopień hybrydyzacji z DNA jądrowym. RNA chromatynowy jest czynnikiem zapewniającym specyficzność histonom w blokowaniu matrycy DNA. Zdolność do kowalencyjnego wiązania z jądrowym RNA wykazują także chromatynowe białka kwaśne (8, 18, 19).

Langan i Smith (51) zauważyli, że jądra wątroby szczura zawierają 13—15-krotnie więcej fosfobiałek niż wyjściowe homogenaty. Preparaty te zawierały 1,0—1,2% fosforu labilnego w alkaliach, głównie w formie fosfoseryny i fosfotreoniny. Podczas oczyszczania tych białek zaobserwowano, że mogą one tworzyć z histonem nierozpuszczalne kompleksy. Wykazano, że fosfobiałka są zasocjowane z błoną jądrową. Stanowią one 46% masy DNA jądra. Stwierdzono, że 62% białka w oczyszczonym preparacie fosfoproteidów jest zdolne do tworzenia nierozpuszczalnego kompleksu z histonami. *In vitro* obecność fosfobiałka w mieszaninie inkubacyjnej zmniejsza stopień hamowania syntezy RNA przez histony. Jest to najprawdopodobniej spowodowane usunięciem histonu z roztworu przez fosfobiałka. Oddziaływanie wzajemne między histonami i fosfobiałkami w jądrze mogłoby umożliwiać matrycową aktywność DNA w obecności histonów (48, 51). Wang i Johns (81) stwierdzili, że interakcja tego typu zachodzi ze wszystkimi podfrakcjami histonowymi i jest wysoce swoista, gdyż inne kwaśne białka nie reagują z histonami w ten sposób. Badania te wskazują na strukturalną i funkcjonalną rolę nie tylko histonów, co było uznawane już dość dawno, lecz także kwaśnych białek w kompleksie DNA-białko chromatyny. Według Kleinsmitha i wsp. (38, 39, 40) fosfobiałka jądrowe nie są pośrednikami w jakimś meta-

bolicznym szlaku transportu grup fosforanowych, lecz ich fosforylacja i defosforylacja służy modyfikacji struktury chromatyny przez zmianę oddziaływania wzajemnego histonów i DNA. Na taką rolę fosfobiałek wskazuje między innymi ich specyficzność gatunkowa i tkankowa, którą zaobserwowali Teng i wsp. (78) oraz Platz i Kish (60). Okazało się, że profil elektroforetyczny fosfobiałek jądrowych jest charakterystyczny dla poszczególnych tkanek tego samego gatunku zwierzęcia (rysunek 3).



Rys. 3. Elektroforetyczny rozdział na żelu poliakrylamidowym kwaśnych białek jądrowych z wątroby (a) i nerki (b) szczura, według Tenga i wsp. (78)



Rys. 4. Wiązanie fosfobiałek jądrowych do DNA podczas ultrawierowania w gradientie sacharozy wg Tenga i wsp. (78)

a) DNA i fosfobiałka z wątroby szczura b) DNA z grasicy cielęcej, fosfobiałka z wątroby szczura

Badania nad wiązaniem DNA z fosfobiałkami jądrowymi wykazały wysoką swoistość gatunkową tej reakcji. W homologicznym układzie (rysunek 4a) stopień wiązania jest duży, towarzyszy mu przesunięcie ^{32}P -fosfobiałek jądrowych w gęstsze obszary gradientu sacharozowego (właściwe dla DNA) podczas ultrawierowania. W układzie heterologicznym (rysunek 4b) wiązanie jest nieznaczne. Procent wiązania zmniejsza się wraz z odległością międzygatunkowego pokrewieństwa dawcy DNA i dawcy fosfoproteidów jądrowych.

Wysoką specyficzność substratową wykazują także opisane przez T a k e d a i wsp. (76) i A h m e d a (5) dwie jądrowe kinazy białkowe katalizujące przeniesienie grupy γ -fosforanowej z ATP na serynę i treoninę fosfobiałek jądrowych. Enzymy te mają podobne właściwości, lecz różnią się specyficznością substratową. Każda z kinaz fosforyluje inną frakcję elektroforetyczną heterogenego preparatu fosfobiałek jądrowych. Fosforylacji ulegają tylko fosfobiałka jądrowe, oraz kazeina i fosfityna, natomiast w stosunku do histonów i protaminy enzymy te nie są aktywne. Kinaza A_1 wykazuje 5-krotnie wyższą aktywność niż kinaza A_2 i przede wszystkim w stosunku do reszt serynowych. Obie opisane kinazy wykazują wyjątkową dla tego typu enzymów niezależność od cAMP. Obok przedstawionych wyżej badań, za udziałem fosfobiałek w regulacji aktywności matrycowej DNA przemawia zwiększona szybkość fosforylacji białek jądrowych w limfocytach człowieka poddanych działaniu fitohemaglutyniny. Substancja ta stymuluje wzrost i podział limfocytów (48). Zauważono także, że hormony sterydowe, na przykład estrogen, indukują syntezę kwaśnych białek chromatynowych, przy czym jednocześnie zwiększa się matrycowa aktywność chromatyny (20, 77).

Zmiany w fosforylacji fosfoproteidów wykazano w przebiegu oogenezy u ryb (33, 54). W początkowym okresie tego procesu pojawia się defosfosfityna i w miarę rozwoju oogenezy jest ona fosforylowana do formy końcowego produktu zawierającego 10% fosforu. Pierwszy etap fosforylacji jest gwałtowny, później następuje zwolnienie procesu, pojawiają się związki pośrednie o niższej zawartości fosforu, które tylko w pewnych wypadkach są fosforylowane do końcowego produktu w stadium dojrzewania jaj.

Stwierdzono korelację między zawartością fosfobiałek w komórce a jej zdolnością do syntezy RNA zależnej od DNA. Jądra wątroby, które bardzo aktywnie syntetyzują RNA, zawierają dużo więcej fosfobiałka (fb) zasocjowanego z DNA ($\frac{\text{fb}}{\text{DNA}} = 0,49$) niż jądra grasicy ($\frac{\text{fb}}{\text{DNA}} = 0,14$) stosunkowo mało aktywne w syntezie RNA (39).

Zmiany oddziaływania wzajemnego histon-DNA są także związane z modyfikacją struktury samych histonów. Może to zachodzić na drodze wprowadzania do molekuly histonu grup acylowych lub fosforanowych (16, 17, 30, 35, 49, 50, 61, 71, 72). Po wprowadzeniu tych grup obserwuje się podobne zjawisko jak w przypadku interakcji z kwaśnymi białkami,

tn. wzrost syntezy RNA zależnej od DNA w porównaniu do syntezy w obecności niezmienionych histonów. Zauważono, że ta chemiczna modyfikacja histonów poprzedza zwiększenie aktywności genowej chromatyny. Langan i Smith (51) wyizolowali z wątroby szczura fosfokinazę białkową, która fosforyluje histony z udziałem końcowej grupy fosforanowej ATP, lecz jest nieaktywna w stosunku do kwaśnych białek jądrowych. Fakt ten przemawia za tym, że fosfoseryna i fosfotreonina, które wyodrębniono z frakcji histonowych, nie pochodzą z zanieczyszczeń fosfobiałkami.

Frenster (28, 29) przypisuje specyficzną rolę RNA chromatynowemu, który wraz z fosfobiałkami traktuje jako grupę polianionów jądrowych. Reagowałyby one z polikationowymi represorami, którymi są histony i przez to umożliwiałyby powstawanie lokalnych pętli jednoniciowego DNA. Pętle te byłyby okresowo stabilizowane przez jądrowy RNA, który hybrydyzuje z jedną nicią umożliwiając transkrypcję RNA na nici komplementarnej. Przypuszczenia te zostały w pewnym stopniu potwierdzone. Za pomocą znakowania trytem stwierdzono stałe otwieranie i zamykanie podwójnej spirali DNA. Część DNA w obrębie aktywnej chromatyny jest w stanie pojedynczej nici i ten jednopasmowy DNA staje się dwuniciowy po usunięciu z natywnej chromatyny polianionów.

LITERATURA

1. Adams G. H., Vidali G., Neelin J. M., *Can. J. Biochem.* **48**, 33 (1970).
2. Agree G., *Acta Chem. Scand.* **10**, 152 (1956).
3. Agree G., Engstrom L., *Acta Chem. Scand.* **10**, 489 (1956).
4. Agree G., Engstrom L., *Acta Chem. Scand.* **10**, 876 (1956).
5. Ahmed K., *Biochim Biophys. Acta* **243**, 38 (1971).
6. Ahmed K., Judah J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 245 (1962).
7. Artman M., Roth J. S., *J. Mol. Biol.* **60**, 291 (1971).
8. Bekhor I., Kung G. M., Bonner J., *J. Mol. Biol.* **39**, 351 (1969).
9. Benjamin W., Goodman R. M., *Science* **166**, 629 (1969).
10. Benjamin W., Levander O. A., Gellhorn A., DeBellis R. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 858 (1966).
11. Berman K. M., Cohn M., *J. Biol. Chem.* **245**, 5309 (1970).
12. Beyer R. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **123**, 41 (1968).
13. Beyer R. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 884 (1968).
14. Bonner J., w *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis (BBA Library, tom X)*: Elsevier, Amsterdam 1967, str. 211.
15. Brockman R. W., Heppel L. A., *Biochemistry* **7**, 2554 (1968).
16. Buckingham R. H., Stocken L. A., *Biochem. J.* **117**, 157 (1970).
17. Buckingham R. H., Stocken L. A., *Biochem. J.* **117**, 509 (1970).
18. Chih R., Huang C., Bonner J. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 960 (1965).
19. Chih R., Huang C., Hunag P. C., *J. Mol. Biol.* **39**, 365 (1969).
20. Cohen P., Kidson C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **63**, 458 (1969).
21. Colombo B., Vesco C., Baglioni C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 651 (1968).

22. Darnell J. E., Wall R., Tushinski R. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1321 (1971).
23. Dziembor E., *Post. Biochem.* **16**, 89 (1970).
24. Edmonds M., Vaughan jr. M. H., Nakazato H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1336 (1971).
25. Engstrom L., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 606 (1962).
26. Engstrom L., Agreen G., *Acta Chem. Scand.* **10**, 877 (1956).
27. Fife W. K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 309 (1967).
28. Frenster J. H., *Nature* **206**, 1269 (1965).
29. Frenster J. H., *Nature* **208**, 894 (1965).
30. Gutierrez R. M., Hnilica L. S., *Science* **157**, 1324 (1967).
31. Heald P. J., *Nature* **193**, 451 (1962).
32. Hengstenberg W., Penberthy W. K., Hill K. L., Morse M. L., *J. Bacteriol.* **99**, 383 (1969).
33. Ingles C. J., Dixon G. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1011 (1967).
34. Judah J. D., Ahmed K., McLean A. E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 472 (1962).
35. Jungmann R. A., Schweppe J. S., Lestina F. A., *J. Biol. Chem.* **245**, 4321 (1970).
36. Kabat D., *Biochemistry* **9**, 4160 (1970).
37. Kabat D., *Biochemistry* **10**, 197 (1971).
38. Kaplowitz P. B., Platz R. D., Kleinsmith L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 739 (1971).
39. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 123 (1969).
40. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 136 (1969).
41. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1182 (1966).
42. Klyszejko L., *History, Monografie Biochemiczne tom 14*, PWN, Warszawa, 1967.
43. Knox W. E., Herafeld A., Hudson J., *Arch. Biochem. Biophys.* **132**, 397 (1969).
44. Kosłow Yo. V., Georgiew G. P., *Nature* **228**, 245 (1970).
45. Kundig W., Ghosh S., Roseman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 1067 (1964).
46. Kundig W., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **246**, 1393 (1971).
47. Kundig W., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **246**, 1407 (1971).
48. Langan T. A., w *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis (BBA Library, tom X)*, Elsevier, Amsterdam 1967, str. 233.
49. Langan T. A., *Science* **162**, 579 (1968).
50. Langan T. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **64**, 1276 (1969).
51. Langan T. A., Smith L., doniesienie osobiste.
52. Lisowski J., *Post. Hig. Med. Dośw.* **17**, 619 (1963).
53. Loeb J. E., Blat C., *FEBS Letters* **10**, 105 (1970).
54. Mano Y., *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 284 (1970).
55. Mayer S. E., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **245**, 3153 (1970).
56. Moret V., Sperti S., Silipranoli N., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 196 (1962).
57. Patni N. I., Alexander I. K., *J. Bacteriol.* **105**, 226 (1971).
58. Pinna L. A., Wadkins C. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 400 (1967).
59. Pizer L. I., *J. Biol. Chem.* **235**, 895 (1960).
60. Platz R. D., Kish V. M., Kleinsmith L. J., *FEBS Letters* **12**, 38 (1970).
61. Pogo B. G. T., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 805 (1966).

62. Raaf J., Bonner J., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 567 (1968).
63. Rafter G. W., Lane W. C., *J. Bacteriol.* **83**, 1077 (1962).
64. Rask L., Walinder O., Zetterquist O., Engstrom L., *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 107 (1970).
65. Rose Z. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **140**, 508 (1970).
66. Saier M. H., Simoni R. D., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **245**, 5870 (1970).
67. Schlesinger M. J., *J. Bacteriol.* **96**, 727 (1968).
68. Schwartz J. H., Crestfield A. M., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 722 (1963).
69. Shwartz J. H., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1996 (1961).
70. Sedmak I., Ramaley R., *Biochim. Biophys. Acta* **170**, 440 (1968).
71. Shepherd G. R., Noland B. J., Roberts C. N., *Biochim. Biophys. Acta* **199**, 265 (1970).
72. Sherod D., Johnson G., Challeley R., *Biochemistry* **9**, 4611 (1970).
73. Simoni R. D., Lewinthal M., Kundig F. D., Kundig W., Anderson B., Hartman P. E., Roseman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1963 (1967).
74. Stedman E., Stedman E., *Nature* **166**, 780 (1950).
75. Tait G. H., Bert L. Vallee, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1247 (1966).
76. Takeda M., Yamamura H., Ohago Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 103 (1971).
77. Teng C. S., Hamilton T. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **63**, 465 (1969).
78. Teng C. T., Teng C. S., Allfrey V. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41**, 690 (1970).
79. Voelz H., Ortigoza R. O., *J. Bacteriol.* **96**, 1357 (1968).
80. Walton G. M., Gill G. N., Abrass I. B., Garen L. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **68**, 880 (1971).
81. Wang T. Y., Johns E. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 176 (1968).
82. White R. J., *Biochem. J.* **118**, 89 (1970).
83. Zajac J., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 307 (1968).

JERZY CHEŁKOWSKI *

Połączenia flawin z białkami

Flavin-Protein Connections

The actual state in the study on combination of flavins with proteins is reviewed. Particularly investigations on covalently linked FAD in succinic dehydrogenase are described.

Trójpierścieniowy układ izoalloksazynowy wykazuje bardzo dużą reaktywność, dzięki której łatwo oddziałuje na cząsteczki innych związków. Może on występować w formie chinonowej, semichinonowej i hydrochinonowej. Niezależnie od tego może dysocjować jako kation lub jako anion. Absorbując promieniowanie ultrafioletowe i światło o barwie niebieskiej przechodzi w stan wzbudzony, emitując fluorescencję (tablica 1). Budowa i nomenklatura naturalnych flawin oraz układy enzymatyczne, w których one występują, omówione zostały w *Postęпах Biochemii* w artykułach Kaniugi (32) i Gardasa (26).

Tablica I

Naturalnie występujące flawiny i niektóre ich właściwości spektralne

Flawina	Maksima absorpcji w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7			Fluorescencja	
	I	II	III	Maksimum (nm)	Wydajność $\Phi \times 10^2$
Ryboflawina (Rb) tzw wolna	445	373	266	533	26,0
Mononukleotyd flawinowy (FMN)	445	373	266	533	25,0
Dwunukleotyd flawinoadenino- wy (FAD)	450	375	263	533	3,8
Dwunukleotyd flawinoadenino- wy związany kowalencyjnie (flawina dehydrogenazy bur- sztynianowej), peptydy flawi- nowe	445	349	262—5	533	—

* Dr, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wyższa Szkoła Rolnicza, Poznań

Wykaz stosowanych skrótów: FMS — flawinomonosiarcezan, SD — dehydrogenaza bursztynianowa

Budowa flawin umożliwia zarówno zmianę konformacji ich cząsteczek jak i oddziaływanie na cząsteczkę białka, szczególnie na jego strukturę trzeciorzędową. Występujące w materiale biologicznym flawoproteidy można podzielić na enzymy flawinowe, których w ostatnim wydaniu katalogu enzymów (20) znajduje się 37 * oraz flawoproteidy nie wykazujące aktywności enzymatycznej. Osobną ciekawą grupę stanowią tzw. peptydy flawinowe, uwalniające się po hydrolizie dehydrogenazy bursztynianowej i innych enzymów, ostatnio dość intensywnie badane.

W ostatnich latach obserwuje się poważny postęp w dziedzinie poznania mechanizmu działania enzymów flawinowych i chemii flawin. Zagadnieniom tym poświęcone były trzy międzynarodowe spotkania: w Amsterdamie (1965), w Nagoya (1967) i w Durham (1969).

Ze względu na sposób powiązania ze związkami wielkocząsteczkowymi flawiny naturalne dzieli się najogólniej na silnie związane i luźno związane, zazwyczaj na flawiny ekstrahujące się przy denaturacji białek 50% do 100% roztworem kwasu trójchlorooctowego i nieekstrahujące się

Tablica 2

Typy wiązań tworzących się między cząsteczką flawinową i białkiem

Typ wiązania	Energia wiązania kcal/mol	Grupy uczestniczące w wiązaniu	Przykłady
Wiązania kowalencyjne	30—100	a) -N-C- H_2	a) FAD połączony z histydyną w dehydrogenazie bursztynianowej
		b) -S-C- H_2	b) FAD połączony z cysteiną w oksydazie monoaminowej
Wiązania jonowe	10—20	-PO_3^{2-} — -NH^+ 	Oddziaływanie reszty fosforanowej FMN i FAD z grupami aminowymi
Wiązania wodorowe	2—10	$\text{-NH}^+ \text{C} \text{HO-}$ O^-	Oddziaływanie pierścienia izoalloksazynowego z resztami tyrozyny
Przeniesienie ładunku			W stadium hipotez i badań na układach modelowych
Oddziaływanie dipolipol			Oddziaływanie układu izoalloksazynowego z różnymi fragmentami łańcucha białkowego
Siły hydrofobowe			

* Hemmerich i wsp. (28) w artykule podsumowującym III Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów w Durham prezentują listę 44 flawoproteidów, w tym 9 zawierających FMN, 2 po 1 cząsteczce FMN i FAD, 2 zawierające kowalencyjnie związany FAD, pozostałe jedną do dwóch cząsteczek FAD.

tym roztworem. Podział ten jednak nie uwzględnia zupełnie sposobu i siły wiązania flawin z białkiem czy innymi związkami wielkocząsteczkowymi. Teoretycznie przewidywać można typy wiązań, przedstawione w tablicy 2.

Czwartorzędowa struktura flawoproteidów nie jest znana. Dotychczas opracowane metody nie pozwalają na dokładne zbadanie oddziaływania flawin z białkiem w stanie natywnym. Uzyskane do tej pory informacje są wnioskami wypływającymi z badań modelowych na układach:

flawina — białko

flawina — związek aromatyczny.

Do badań stosowane są najczęściej metody fluorescencyjne, za pomocą których bada się kinetykę asocjacji i dysocjacji kompleksów flawinowo-białkowych. Wykorzystywane jest zjawisko wygaszania fluorescencji flawin przez białko i pewne związki aromatyczne odpowiadające resztom poszczególnych aminokwasów oraz zmiany fluorescencji białek w czasie kompleksowania z flawinami. Pewnych informacji dostarczają również analizy zmiany widm absorpcyjnych, głównie przesunięć maksimów absorpcyjnych w pasmach 375 i 450nm. Pasma 260nm nie może być brane pod uwagę ze względu na silną absorpcję w tym zakresie przez reszty aminokwasów aromatycznych łańcucha białkowego. Podczas powstawania kompleksów z białkiem charakterystyczne maksima zostają rozmyte lub przesunięte o około 20nm w kierunku fal dłuższych lub krótszych.

Massey i Gunther (47) na podstawie badań porównawczych widm absorpcyjnych różnych flawoproteidów podzielili flawoproteidy na dwie grupy: enzymy z nierozmytym pasmem absorpcyjnym przy 450 nm (oksydaza D-aminokwasowa, oksydaza glukozowa, dehydrogenaza butyrylo-CoA) oraz enzymy z rozmytym pasmem przy 450 nm (dehydrogenaza zredukowanego NAD, dehydrogenaza zredukowanego NAD(P), dehydrogenaza amidu kwasu liponowego, reduktaza glutationowa i flawoproteid przenoszący elektrony). O oddziaływaniu poszczególnych grup funkcyjnych FAD lub FMN z białkiem świadczy konkurowanie nukleotydów z różnymi syntetycznymi pochodnymi o apoenzym podczas tworzenia z nim kompleksów (81). O możliwości oddziaływania flawin z resztami aminokwasowymi łańcucha białkowego wnioskować można na podstawie badania właściwości sztucznie otrzymanych kompleksów ryboflawiny z fenolem i indolem (21, 22, 54, 55, 78). Potwierdzeniem możliwości oddziaływania flawin z cząsteczkami fenoli jest ich rozdział na żywicach fenolowych (45).

Na możliwość oddziaływania flawin z grupami polarnymi i niepolarnymi białek wskazuje też ich oddziaływanie z rozpuszczalnikami organicznymi o różnej polarności, przejawiające się zmianami widm absorpcyjnych i fluorescencyjnych (38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45).

Ostatnio stosuje się również metody optycznej dyspersji rotacyjnej i dichroizmu kołowego do śledzenia zmian konformacji cząsteczek flawin

przy tworzeniu kompleksów z białkiem czy też w czasie reakcji enzymatycznej, jak również zmian konformacji białka w czasie łączenia się z flawiną (1, 15, 16, 17, 48, 89).

I. Flawoproteidy o funkcjach nieenzymatycznych

Do flawoproteidów o funkcjach nieenzymatycznych zaliczyć można kompleksy wolnej ryboflawiny z białkami. Obecność takich kompleksów stwierdzono w jajach kurzych i plazmie krwi (3, 31, 51, 52, 56, 90, 91). Odgrywają one ważną rolę w magazynowaniu i transporcie witaminy B₂.

Z białka jaj kurzych wyodrębniono proteid zawierający odwracalnie dysocjującą ryboflawinę w ilości 1 mola na 1 mol białka o ciężarze cząsteczkowym 32 000 do 36 000. Zawartość ryboflawiny w flawoproteidzie wynosi 0,9⁰%. Białko to charakteryzuje się ścisłą swoistością względem konfiguracji bocznego łańcucha rybitolu, lecz wiąże N-3-metylo-ryboflawinę. Fakt ten nie jest zgodny z proponowanym schematem (patrz niżej) łączenia się cząsteczki izoalloksazynowej z białkiem poprzez N-3.

Podobny kompleks wyodrębniono z żółtka jaja kurzego. Część białkowa tego kompleksu ma ciężar cząsteczkowy wynoszący 40 000. Kompleks ten nie wykazuje fluorescencji. Wygasza też fluorescencję wolnej ryboflawiny aż do momentu wysycenia białka ryboflawiną. Całkowicie wysycony kompleks zawiera 10,5mg ryboflawiny w 1g suchej masy białka. Ryboflawina ulega odszczepieniu od białka przy zakwaszeniu do pH 2. Połączona z białkiem ryboflawina ulega odwracalnej redukcji do formy semichinonowej i hydrochinonowej, przy czym połączenie z białkiem nie ulega rozerwaniu (91).

Kompleksowe połączenie tworzy ryboflawina oraz FMN również z jednym z białek frakcji albuminowej osocza krwi (31). Na podstawie wielkości stałej asocjacji autorzy wnioskują, że oddziaływanie między ryboflawiną a albuminą ma charakter niejonowy. Natomiast FMN wiąże się z albuminą najprawdopodobniej siłami elektrostatycznymi dzięki obecności reszty fosforanowej.

II. Flawoproteidy o funkcjach enzymatycznych

Jakkolwiek stosowana jest powszechnie nazwa „koenzymy flawinowe”, nukleotydy flawinowe nie są w układach enzymatycznych tak luźno związane jak koenzymy nikotynamidowe (2). Sposób połączenia nukleotydów flawinowych z apoenzymami jest bardzo zróżnicowany, jednak w większości enzymów spełniają one raczej rolę grup prostetycznych. Połączenie z białkiem jest w większości flawoproteidów na tyle silne, że można

wyodrębnić z materiału biologicznego nierozdzielone holoenzymy. Wyróżnić można cztery zasadnicze typy wiązania nukleotydów flawinowych z apoenzymami według wzrastającej siły wiązania nukleotydu z białkiem (10, 32):

- typ pierwszy — enzymy, w których grupa prostetyczna zostaje odszczepiona częściowo już w czasie izolowania, na przykład przy wytrącaniu siarczanem amonu i w czasie dializy;
- typ drugi — najliczniejsza grupa enzymów, z których flawinę uwolnić można przez strącenie białka w środowisku kwaśnym siarczanem amonu, adsorpcję na *Florisilu* lub węgłu aktywowanym, jak również dializę wobec rozcieńczonych kwasów;
- typ trzeci — oddzielenie flawiny możliwe jest dopiero po denaturacji białka, na przykład kwasem trójchlorooctowym;
- typ czwarty — uwolnienie flawiny możliwe jest dopiero po strawieniu enzymu proteazami, ale nawet wtedy flawina pozostaje połączona z kilkoma aminokwasami.

Ta różnorodność powodowała częstokroć trudności w określeniu grupy prostetycznej wyizolowanych i oczyszczonych enzymów (57).

Flawoproteidy pierwszej grupy wykorzystywane są do ilościowego oznaczania koenzymów flawinowych: FMN i FAD, gdyż możliwe jest uzyskanie apoenzymów pozbawionych flawiny i mających zdolność odwracalnego wiązania FMN lub FAD.

Do ilościowych enzymatycznych oznaczeń FAD stosowana jest oksydaza D-aminokwasowa, a do oznaczeń FMN oksydaza mleczanowa i dehydrogenaza zredukowanego NAD.

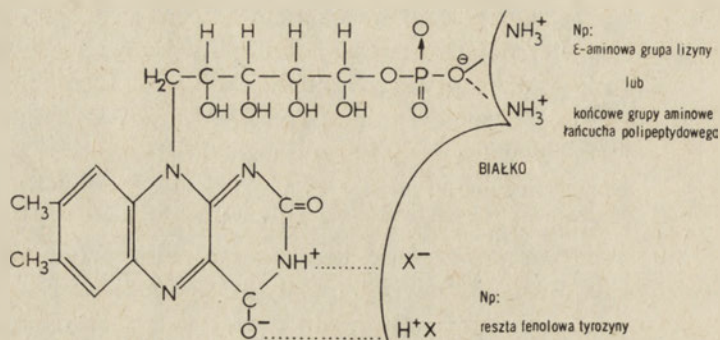
Jako swego rodzaju ciekawostkę wymienić można niezwykle czułą metodę oznaczania FMN za pomocą luciferazy bakteryjnej. Ilość emitowanego przez układ enzymatyczny światła bioluminescencji zależy od ilości zredukowanego FMN (FMNH_2). Metodą tą można oznaczyć 0,000 01 μg FMN (9, 53), lub FAD po przekształceniu w FMN.

Początkowo Kuhn i Rudy (46) przypuszczali, że połączenie cząsteczki flawinowej z białkiem w flawoproteidach zachodzi poprzez grupę iminową w pozycji N-3 i resztę fosforanową. Koncepcję tę podtrzymywali w swych pracach Theorell i Nygaard (68, 69, 70, 71, 72). Dalsze badania wykazały, że enzymy zawierające FMN i FAD należy rozpatrywać oddzielnie.

Modelem dla grupy enzymów zawierających FMN był „stary żółty enzym Warburga” — dehydrogenaza zredukowanego NAD z drożdży. Z danych kinetycznych asocjacji i dysocjacji FMN i apoenzymu Theorell (68) wnosił, że cząsteczka flawiny wiąże się z białkiem zarówno poprzez grupę fosforanową jak i przez azot w pozycji 3 układu izoalloksazynowego (schemat 1). Autorzy ci uważali, że najodpowiedniejsza dla wiązania się flawiny jest pozycja 3 ze względu na to, że jest to jedyny azot

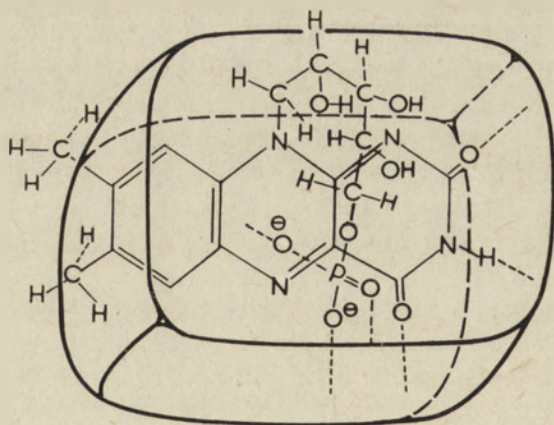
niezależny od stanu oksydoredukcyjnego cząsteczki, zdolny do tworzenia wiązań wodorowych, na przykład z resztą fenolową tyrozyny.

Ugrupowaniami apoenzymu, z którymi łączy się FMN, mogą być według Theorella i wsp., reszta tyrozyny wiążąca się z N-3 układu izoalloksazynowego oraz wolna grupa ϵ -aminowa lizyny i końcowe grupy



Schemat 1. Łączenie się FMN z apoenzymem wg Theorella i Nygaarda (68—72)

aminowe łańcuchów polipeptydowych, które łączyłyby się z resztą fosforanową. Na znaczenie reszty fosforanowej w łączeniu się FMN z białkiem apoenzymu wskazuje kompetycyjne hamowanie aktywności enzymatycznej „starego żółtego enzymu” przez analog FMN, zawierający resztę kwasu siarkowego zamiast reszty kwasu fosforowego (tzw. FMS — flawinomonosiaraczan (18, 19). Fluorescencja tego analogu nie ulega wygaszeniu w obecności apoenzymu, co potwierdza rolę reszty fosforanowej również w przyłączaniu układu izoalloksazynowego (73, 81).



Schemat 2. Przestrzenne usytuowanie aktywnego centrum holoenzymu Shethna (11) Linie przerywane oznaczają punkty oddziaływania FMN z grupami czynnymi białka. Zamknięta przestrzeń sugeruje ukształtowanie przestrzeni białkowej, do której przyłącza się flawina

Próby przedstawienia modelu przestrzennego flawoproteodu zawierającego FMN jako grupę prostetyczną dokonali Tollin i wsp. (11, 15, 16, 17). Na podstawie badań dichroizmu kołowego oraz wygaszania fluorescencji apoenzymu i holoenzymu „flawoproteidu Shethna” z *Azotobacter vinelandii* autorzy ci zaproponowali model przedstawiony na schemacie 2.

Zgodnie z proponowaną hipotezą nukleotydy znajdują się w zagłębieniu apoproteidu, co stwarza możliwości oddziaływania z białkiem wszystkich jego grup czynnych. W odpowiedniej orientacji przestrzennej cząsteczki nukleotydu względem białka w tym układzie brałyby udział grupy metylowe. Dla łączenia się z białkiem istotną jest zarówno budowa pierścienia izoalloksazynowego jak i bocznego łańcucha rybitolowego. Acetylowanie grup hydroksylowych łańcucha rybitolowego całkowicie uniemożliwia wiązanie flawiny z białkiem. I w tym flawoproteidzie stwierdzono udział reszt tyrozyny apoproteidu w wiązaniu układu izoalloksazynowego, przy czym na część izoalloksazynową przypada w przybliżeniu 3/4 energii wiążącej. Energia wiązania grupy 5'-fosforanowej wynosi 2—3 kcal/mol, jest więc znacznie niższa od wartości przyjętych dla wiązań jonowych (tablica 2).

Wyniki badań nad „flawoproteidem Shethna” potwierdziły wcześniej wysuwane koncepcje, wykazując zmiany konformacji zarówno cząsteczki flawinowej jak i białka, zachodzące w czasie kompleksowania. Okazało się również, że po połączeniu nukleotydu z białkiem nie zachodzi już zmiana konformacji białka przy redukcji flawiny do semichinonu czy hydrochinonu.

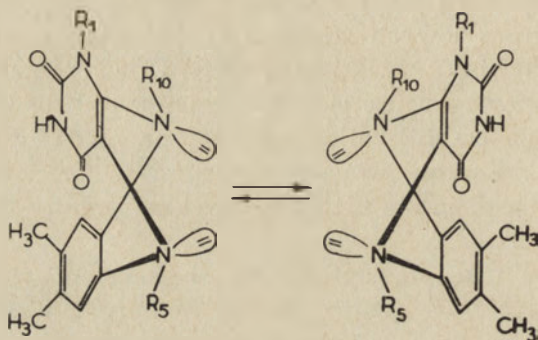
Konformacja białka apoenzymu zależy od rodzaju wiązanej flawiny; inna jest przy wiązaniu ryboflawiny niż przy przyłączaniu FMN, co potwierdza znaczenie reszty fosforanowej dla łączenia się z białkiem. Wyniki uzyskane przez Tollina i wsp. wskazują na występowanie prawie jednakowego otoczenia flawin w różnych flawoproteidach, jakkolwiek natura kontaktu flawina-białko jest inna w oksydazach niż w dehydrogenazach.

Możliwość zmiany konformacji cząsteczki izoalloksazynowej na skutek tworzenia się formy rodnikowej sugerowali Hemmerich i wsp. (28a) wysuwając hipotezę powstawania formy „motylkowej” (schemat 3), pozwalającej na istnienie dwóch enancjomerów.

Badania krystalograficzne chinonowych i hydrochinonowych pochodnych flawin (36) wykazały tworzenie się takich struktur, dzięki możliwości inwersji wokół osi $N_{(5)} \dots N_{(10)}$. Kąt rozwarty między płaszczyznami dwóch skrajnych pierścieni wynosił w badanych kryształach 140° — 160° .

Dogodnym układem modelowym dla badania oddziaływania FAD z białkiem jest układ FAD-apoenzym w oksydazie D-aminokwasowej. Szczegółowe badania na układzie tym przeprowadzono w pracowniach Yagi (81, 82, 83, 85) i Massey'a (47). Na podstawie badań zmian widm absorpcyjnych oraz hamowania aktywności enzymatycznej utworzono

schemat łączenia się FAD z białkiem. Zgodnie z tym schematem cząsteczka nukleotydu łączy się z białkiem poprzez układ izoalloksazynowy, pierścień purynowy adeniny i reszty kwasu fosforowego. Dla łączenia części adeninowej zasadnicze znaczenie ma jej grupa $-NH_2$, a z części białkowej enzymu w wiązaniu biorą udział grupy $-SH$. Układ izoalloksazynowy, niezależnie od łączenia się z białkiem, zachowuje zdolność do tworzenia kompleksu z substratem. W pracowni Yagi wykryto kompleks holoenzymu oksydazy D-aminokwasowej z substratem — D-alaniną (tzw. kompleks Michaelisa) (84, 86, 87, 88).



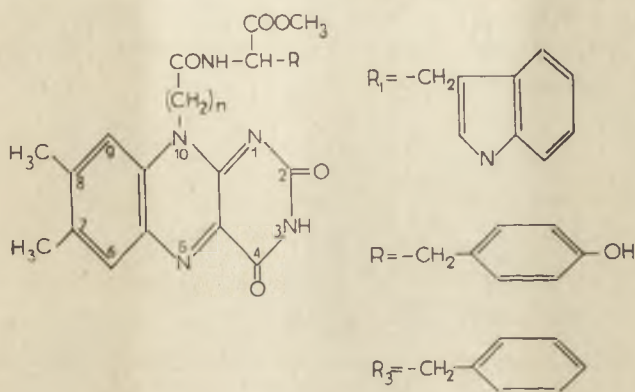
Schemat 3. „Motylkowa” konformacja hydrochinonu flawinowego ukazująca możliwość tworzenia dwóch stereoisomerów, wg Hemmericha i wsp. (28a)
 R_1 i R_2 — atomy wodoru, R_{10} — reszta rybitolu

Strittmatter (64, 65, 66) badając reduktazę cytochromu b_5 stwierdził, że w tym enzymie FAD łączy się z apoenzymem poprzez resztę tyrozynową. Nie stwierdził natomiast udziału grup sulfhydrylowych w powstawaniu kompleksu flawina-białko. Z badań nad strukturą trzyczłonową tego prostego flawoproteidu wynika, że FAD przyspiesza proces rozkładania łańcucha polipeptydowego w czasie odwracalnej denaturacji apoenzymu. Ugrupowaniami łańcucha peptydowego, biorącymi udział w przyłączaniu FAD, są prawdopodobnie dwie reszty tryptofanu.

Badane w pracowniach japońskich (89) zmiany widm dichroizmu kolowego przy powstawaniu kompleksów FMN i FAD z apoenzymem oksydazy D-aminokwasowej wskazują na łączenie się nukleotydu z białkiem oraz zmiany konformacji nukleotydu flawinowego. Zmiany widm świadczą raczej o zmianie orientacji przestrzennej układu izoalloksazynowego i rybitolu bez zmiany wzajemnego oddziaływania izoalloksazyny i puryny w cząsteczce FAD.

Interpretację badań na układach flawina-białko ułatwia szczegółowa analiza zmian, jakie zachodzą we właściwościach cząsteczki flawinowej pod wpływem wprowadzania do jej pierścieni różnych podstawników (13, 14, 28a, 45, 50, 58). Ostatnio zsyntetyzowano pochodne flawin, które zamiast

rybitolu zawierały różnej długości łańcuchy boczne kwasów onowych (od 1 do 5 atomów węgla) związanych z aminokwasami aromatycznymi — tyrozyną, fenyloalaniną i tryptofanem. Pochodne te (rysunek 1) wykazują charakterystyczne wygaszenie fluorescencji w stosunku do niezmięnionej cząsteczki flawinowej, podobne do wygaszenia, jakie zachodzi przy tworzeniu połączeń z białkiem (23). Fakt ten przemawia za oddziaływaniem pierścienia izoalloksazynowego z resztami aminokwasów aromatycznych. Oddziaływanie izoalloksazynowych pochodnych jest tym silniejsze, im łańcuch boczny kwasu onowego jest krótszy, a zatem sąsiedztwo cząsteczki aminokwasu i cząsteczki izoalloksazynowej — bliższe.



Rys. 1. Syntetyczne aromatyczne peptydy flawinowe (23)

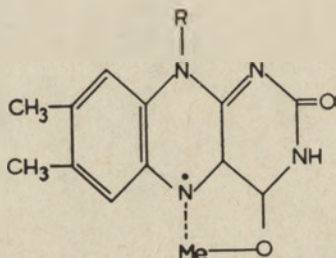
Im krótszy łańcuch boczny (mniejsza ilość jednostek $=\text{CH}_2$ i niższa wartość n) tym silniejsze wygaszenie fluorescencji przez rodnik R. $n = 1, 2, 3, 4$ lub 5

Tsibris i wsp. (74) oraz Roth i wsp. (58), rozpatrując wpływ N-3-metylopochothanej FMN i innych analogów tego koenzymu na aktywność „starego żółtego enzymu”, wnioskuje, że pozycja N-3 nie pełni — jak przypuszczali Theorell i Nygaard — zasadniczej roli w wiązaniu flawiny z białkiem. Zdaniem Tsibrisa oddziaływanie cząsteczki FMN z apoenzymem zachodzi częściowo poprzez przeniesienie ładunku, a częściowo przez wzajemną polaryzację między cząsteczką izoalloksazynową a resztami aminokwasów aromatycznych.

Wyniki uzyskane na układach flawina-białko potwierdzają w pewnym stopniu badania na modelowych kompleksach flawin ze związkami aromatycznymi. Stwierdzono, że cząsteczka flawinowa tworzy kompleksy z fenolem i indolem (21, 22, 54, 55, 78). Kompleksy te uzyskano w postaci krystalicznej. Jedna cząsteczka flawinowa może łączyć się równocześnie z dwiema cząsteczkami tych związków. Fakt oddziaływania cząsteczki flawinowej z dwiema cząsteczkami fenolu w pewnym stopniu tłumaczy możliwość równoczesnego oddziaływania cząsteczki flawinowej z resztami aminokwasowymi białka i z substratem. Umożliwia to również oddziały-

wanie cząsteczki flawinowej na trzeciorzędową strukturę białka, na przykład poprzez kompleksowanie równocześnie z dwiema resztami aminokwasowymi.

Metodami potencjometrycznymi wykazano duże powinowactwo semichinonów flawin do tyrozyny, serotoniny oraz grup dwusiarczkowych, natomiast tylko niewielkie — do tryptofanu (12). Wysokie powinowactwo semichinonu FMN i tyrozyny wskazywałoby na możliwość stabilizacji rodnikowej formy flawin przez resztę tego aminokwasu. Zarówno dla połączenia flawin z białkiem jak i dla aktywności enzymatycznej, duże znaczenie ma chelatowanie metali, szczególnie przez formy rodnikowe flawin (28, 65). Jednak sposób łączenia się metali z białkiem nie jest znany. Nie wiadomo też czy jony metali wpływają na kompleksowanie flawin z białkiem. Przypuszczalny wzór chelatu semichinonu flawiny z metalem przedstawia rysunek 2.



Rys. 2. Proponowany wzór chelatu semichinonu flawinowego z metalem (2a)

Próbowano wyjaśnić oddziaływanie flawin z hydrofilowymi i hydrofobowymi grupami białka otaczającego flawiny we flawoproteidach badając właściwości flawin w rozpuszczalnikach o różnej polarności i stałej dielektrycznej. Flawiny w roztworach w bardzo dużym stopniu oddziałują z cząsteczkami rozpuszczalników. Przejawia się to zmianą widm absorpcyjnych i fluorescencyjnych flawin jak również wydajności kwantowej fluorescencji, uzależnionych od polarności rozpuszczalnika i jego charakteru (38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45). Wynika z tego, że o możliwości przejść energetycznych w cząsteczce flawinowej decyduje środowisko, w jakim się ona znajduje. Można by przypuszczać, że w cząsteczkach białka otaczających flawiny w flawoproteidach istnieją struktury oddziałujące na cząsteczkę flawinową podobnie jak cząsteczki rozpuszczalników. Jednak dotychczasowe wyniki oparte wyłącznie na badaniu widm, nie upoważniają jeszcze do obliczania polarności środowiska otaczającego flawiny w flawoproteidach (38).

Z uzyskanych dotychczas danych wynikałoby, że uproszczone schematy 1, 2 i 3 w dość jasny sposób przedstawiają oddziaływanie flawin z białkiem. Faktycznie jednak oddziaływanie to nie da się sprowadzić do

jednego wiązania między któryś z atomów układu izoalloksazynowego a aminokwasami aromatycznymi. Proponowane schematy kompleksowania flawin z białkiem stale jeszcze należy traktować jako robocze. Dokładniejsze poznanie struktury przestrzennej i reaktywności cząsteczek flawin, ich oddziaływania z metalami i tworzenia nietrwałych form rodnikowych wskazuje, że łączenie się flawin z białkiem trudno jest ująć w jeden schemat. Nie można bowiem jednoznacznie i z całą pewnością orzec, które atomy cząsteczki flawinowej i białkowej biorą udział w wiązaniu i czy tworzące się połączenie ma charakter przeniesienia ładunku, wiązania wodowego, wzajemnej polaryzacji, jonowy, czy inny.

Szczególnie cennych informacji o połączeniu flawin z białkiem i znaczeniu struktury białka dla aktywności enzymów flawinowych dostarczają opisanie w dalszej części artykułu badania nad dehydrogenazą bursztynianową.

III. Peptydy flawinowe

Swego rodzaju wyjątek w połączeniach flawin z białkami stanowi niezwykle trwałe połączenie FAD w dehydrogenazie bursztynianowej (EC 1.3.99.1).

Do wyjaśnienia budowy i właściwości tzw. flawiny silnie związanej (1,4) przyczyniły się w pierwszym rzędzie prace Kearney i Singera (33, 34, 35, 60, 61) zapoczątkowane w połowie lat 50-tych. Autorzy ci stwierdzili, że flawina z dehydrogenazy bursztynianowej uwalnia się dopiero po hydrolizie białka trypsyną i chymotrypsyną. Jednak uwalniająca się flawina nie była identyczna z żadną z dotychczas poznanych pochodnych flawinowych — ryboflawiną, FMN czy FAD. Różniła się od nich widmem absorpcyjnym, wykazując maksimum nie w pasmie 375 nm, ale w pasmie 345—350 nm. Analiza oczyszczonej flawiny wykazała, że jest ona zbudowana z FAD połączonego dodatkowo z kilkoma resztami aminokwasowymi. Silne wiązanie z łańcuchem peptydowym było przyczyną niemożności uwolnienia flawiny przez denaturację białka. Wiązanie to okazało się odporne również na działanie hydrolaz peptydowych, zarówno endo- jak i egzopeptydaz. Podczas hydrolizy białka uwalniał się FAD — wciąż połączony z peptydem. Główną frakcją uzyskaną przez Kearney (33) po trawieniu proteolitycznym był heksapeptyd zawierający aminokwasy: alaninę, serynę, treoninę, kwas glutaminowy, walinę i drugą resztę seryny z wolną grupą aminową. Flawina nie przechodziła w lumiflawinę w warunkach, w których powstawała lumiflawina z FAD czy ryboflawiny. Następowало odszczepienie łańcucha rybitolu, lecz powstający produkt jako silnie hydrofilny nie rozpuszczał się w chloroformie. Produkt defosforylacji tej flawiny nie rozpuszczał się w alkoholu benzylovym w odróżnieniu od ryboflawiny. Właściwości fluorescencyjne

tej flawiny również były odmienne od właściwości pozostałych pochodnych. Charakterystyczny dla flawiny związanej z peptydami jest zanik fluorescencji przy pH wyższym od 6; najsilniejszą fluorescencję wykazuje ona przy pH 3,1—3,2. Umożliwia to przeprowadzenie oznaczania stężenia tej flawiny nawet w obecności luźno związanych flawin przez pomiar fluorescencji przy pH 3,2 i przy pH 6,5.

Singer i wsp. (59, 60) opierając się na założeniu, że flawina silnie związana pochodzi wyłącznie z dehydrogenazy bursztynianowej zaproponowali, żeby oznaczać zawartość tego enzymu w preparatach mitochondrialnych przez oznaczenie zawartości peptydów flawinowych uwalniających się podczas hydrolizy enzymu. Autorzy ci proponują stosowanie do pomiarów stężenia peptydów flawinowych metodę spektrofotometryczną lub fluorometryczną. Zalecają jednak szczególnie metodę fluorometryczną po uprzednim przeprowadzeniu peptydu flawinowego w formę mononukleotydu (hydroliza w pH 1, 15 minut w 100°) jako bardziej czułą i selektywną.

Wang i wsp. (76, 77), badając skład aminokwasowy uwalniających się z dehydrogenazy bursztynianowej (skrót SD — ang. *succinate dehydrogenase*) peptydów flawinowych, uzyskali po hydrolizie kwasowej flawinę połączoną z seryną. Grupa aminowa tego peptydu flawinowego była wolna, co świadczyłoby o powiązaniu flawinowej grupy prostetycznej z apoenzymem przez grupę karboksylową seryny. Rozkład peptydu flawinowego słabym ługiem (pH 10,5 w $80^\circ C$, 5—8 godzin) daje taki sam produkt, jaki uzyskiwano przy rozkładzie ryboflawiny, ale połączony z peptydem, co świadczy o odporności wiązania między peptydem a flawiną na rozkład w środowisku słabo alkalicznym. Mocznik uwalnia się w tych warunkach w takiej samej ilości jak z ryboflawiny, co wyklucza jako miejsca przyłączenia peptydu do pierścienia izoalloksazynowego pozycje 1, 2 i 3. Autorzy ci w wyizolowanych z różnych źródeł peptydach stwierdzili następującą sekwencję aminokwasów:

Flawina-seryna (Gli-Glu-Asp) ... (peptyd z SD świni)

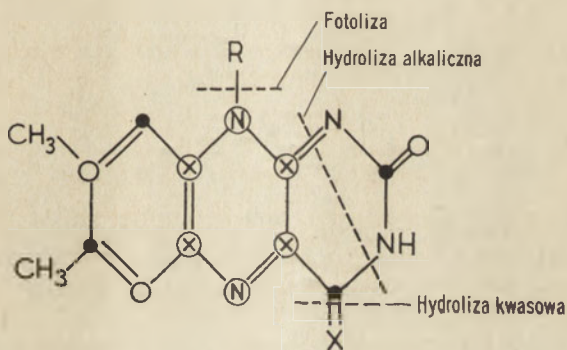
oraz Flawina-seryna (Gli-Glu-Ala) ... (peptyd z SD owcy)

Cerletti i Strom (6) badali różnice w wydajności fluorescencji między dwunukleotydem (FAD) a mononukleotydem (FMN) związanymi peptydowo. Stwierdzili oni, że w pH 3,1 FAD wykazuje tylko 90% wydajności fluorescencji FMN. Różnica we właściwościach fluorescencyjnych jest więc znacznie mniejsza w przypadku peptydów flawinowych niż w przypadku flawin wolnych (FMN, FAD i ryboflawiny). Emisja fluorescencji mononukleotydu zredukowana była o 20% przez dodanie adenozyiny do stężenia 0,05 M. W tych samych warunkach fluorescencja FMN malała o 50%, a więc 2,5-krotnie silniej. Świadczy to o możliwości oddziaływania związanej z peptydami flawiny z purynami, jakkolwiek jest ono w pewnym stopniu utrudnione. Jest to, zdaniem autorów, dodatkowym dowodem na to, że w połączeniu z białkiem nie bierze udziału azot w po-

zycji 3 pierścienia izoalloksazynowego. Azot ten oddziałuje — jako wolny — z grupą aminową w pozycji 6 adeniny, podobnie jak FMN.

Hemmerich i wsp. (28a) rozważając możliwości podstawienia peptydu do pierścienia wykluczają pozycje 1, 2, 3, 4, 5 i 10 na podstawie właściwości licznych syntetycznych pochodnych izoalloksazyny (13, 14, 49, 50). Motywują to twierdzenie tym, że przy podstawieniu w tych pozycjach nastąpiłyby drastyczne zmiany w widmie absorpcyjnym peptydu flawinowego, a tymczasem zmiany te ograniczają się jedynie do pewnego przesunięcia maksimum. Zdaniem autorów jedynym możliwym miejscem przyłączenia może być pierścień homoaromatyczny układu flawinowego, a najodpowiedniejszym ugrupowaniem wydaje się grupa metylowa w pozycji 8 flawochinonu — z uwagi na jej funkcyjny charakter.

Teoretyczne przewidywania grupy Hemmericha zostały potwierdzone dzięki zbiorowemu wysiłkowi kilku pracowni (27, 63) zajmujących się badaniami spektrofotometrycznymi, fluorescencyjnymi i EPR oczyszczonych preparatów peptydów flawinowych z dehydrogenazy bursztynianowej. Na podstawie tych badań autorzy podali wzór strukturalny z uwzględnieniem gęstości spinowej i miejsc wrażliwych na hydrolizę i fotolizę (schemat 4).

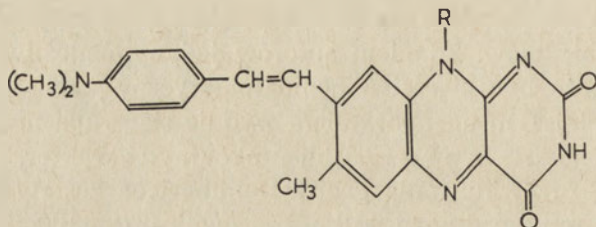
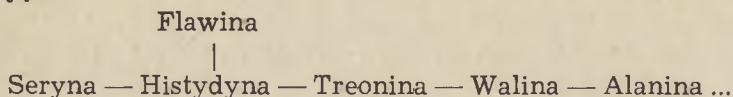


Schemat 4. Submolekularna struktura i reaktywność cząsteczki flawinowej (27)
 O — atomy w punktach o wysokiej gęstości spinowej, X — atomy o niewyliczalnej gęstości spinowej, ● — atomy o niskiej lub niezmiernie małej gęstości spinowej, X — np. -S-CH₃, -O-R, =S, R — rybitol lub pochodna (w FMN połączony z resztą fosforanową, w FAD — dodatkowo z AMP)

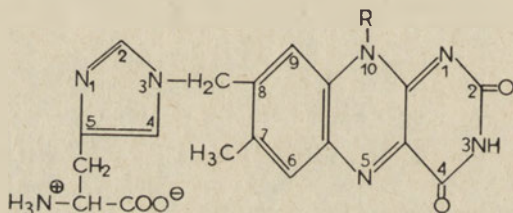
Grupa metylowa C-8 wykazuje reaktywność równą conajmniej reaktywności grupy metylowej w nitrotoluenach i można ją zaklasyfikować również jako grupę funkcyjną flawochinonów. Dzięki tej grupie cząsteczka flawinowa tworzyć może z aldehydami połączenie typu Fl_{ox}-CH=CH-R (rysunek 3).

Ostateczne wyjaśnienie sposobu połączenia flawiny z cząsteczką białka podali badacze z pracowni Singera (75a). Stosując metodę Edmana do odbudowy peptydów flawinowych stwierdzono, że aminokwasem bez-

pośrednio łączącym się z flawiną jest histydyna (rysunek 4). Schematyczne połączenie flawiny z łańcuchem białkowym przedstawia się następująco:



Rys. 3. Pochodna flawinowa podstawiona do grupy metylowej w pozycji 8. Możliwość tworzenia takich pochodnych wskazuje na charakterystyczną reaktywność grupy metylowej w pozycji 8, której długo nie brano pod uwagę (28a)



Rys. 4. Histydyloryboflawina — pochodna ryboflawiny otrzymana po kwasowej hydrolizie peptydów flawinowych z dehydrogenazy bursztynianowej (75a)
R — rybitol

Pięciopeptyd o tej sekwencji uzyskano po hydrolizie kwasowej dehydrogenazy bursztynianowej. Trudne do wyjaśnienia jest, dlaczego w poprzednich pracach nie stwierdzono w peptydach flawinowych z dehydrogenazy bursztynianowej obecności histydyny pomimo, że stwierdzono obecność innych aminokwasów (33, 76). Znamienne jest występowanie w bocznym łańcuchu seryny. Autorzy przypuszczają, że pewne znaczenie dla aktywności enzymatycznej ma występowanie po obydwu stronach histydylflawiny aminokwasów z wolnymi grupami hydroksylowymi: seryny i treoniny. Po hydrolizie dehydrogenazy trypsyną uzyskano peptyd zawierający ponad 20 aminokwasów, jednak o identycznym ułożeniu pierwszych pięciu aminokwasów, jak w wyodrębnionym pięciopeptydzie.

Dehydrogenaza bursztynianowa nie jest jedynym enzymem zawierającym flawinę związaną kowalencyjnie. Walker i wsp. (75) zbadali również oksydazę monoaminową z wątroby bydłowej. Po degradacji en-

zymu opisaną wyżej metodą uzyskano pięciopeptyd o następującym układzie aminokwasów:

Seryna-Glicyna-Glicyna-Cysteina-Tyrozyna



Peptyd ten nie wykazuje takiej zależności fluorescencji od pH , jak peptyd zawierający histydynę.

Zasadniczą rolę w wiązaniu flawiny z białkiem w oksydazie monoaminowej odgrywa bezpośrednio połączenie przez siarkę z resztą cysteiny. Warto zaznaczyć, że analogicznie związane są pierścienie porfirynowe w cytochromie *c*. Fakt kowalencyjnego związania flawiny nie wyklucza możliwości oddziaływania z białkiem również innych atomów jej cząsteczki. Zbadane dotychczas dwa wymienione enzymy najprawdopodobniej nie wyczerpują listy enzymów, w których flawina związana jest kowalencyjnie.

Frissel i wsp. (24, 25) wykazali, że oksydaza sarkozynowa (EC 1.5.4.1) oraz oksydaza dwumetyloglicynowa (prawdopodobnie identyczna z oksydazą *N*-metyloaminokwasową (EC 1.5.3.2) również zawierają jako grupę prostetyczną flawinę związaną silnie z peptydami.

King i wsp. (37) podjęli próbę oznaczenia zawartości flawin w mitochondriach i preparatach cząstek oddechowych serca. Oznaczali oni w tych preparatach flawiny ekstrahujące się 10% kwasem trójchlorooctowym i nie ekstrahujące się tym kwasem. We frakcji ekstrahującej się 10% TCA oznaczali FAD i FMN. Pozostający po ekstrakcji osad poddawali trawieniu enzymatycznemu, po którym oznaczali flawiny nieekstrahujące się kwasem. W otrzymanych wynikach zaskakująca jest zawartość flawiny silnie związanej, wynosząca 50% zawartości sumy flawin. Z założonego opisu metodycznego wynikałoby, że mogło to być spowodowane niecałkowitą ekstrakcją flawin luźno związanych.

Cerletti i wsp. (5, 7, 8, 67) oznaczali zawartość flawiny związanej z peptydami w tkankach szczura, próbując wykryć zależność między zawartością peptydów flawinowych a aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej. Stwierdzili oni szczególnie wysoką zawartość peptydów flawinowych w wątrobie, nerkach i sercu. Jednak zawartość tych flawin w stosunku do flawin uwalniających się już przy denaturacji wynosi zaledwie kilka procent (około 4%). Zawartość peptydów flawinowych oznaczana fluorescencyjnie jest wyższa niż zawartość dehydrogenazy bursztynianowej obliczonej na podstawie aktywności tego enzymu i jego liczby obrotów. Autorzy tłumaczą to — zgodnie z doniesieniami literatury — występowaniem formy peptydowej flawiny również w innych enzymach (25).

Singer i wsp. (62) zastosowali oznaczenie peptydów flawinowych do badania biosyntezy dehydrogenazy bursztynianowej przez drożdże. Stwierdzili oni, że zawartość peptydów flawinowych w komórkach drożdży jest skorelowana z aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej. Właściwości uwalnianych na drodze proteolizy peptydów flawinowych z komórek drożdżowych są podobne do właściwości peptydów flawinowych z serca wołu.

Janicki i wsp. (29, 30) stwierdzili, że bakterie kwasu propionowego również syntetyzują peptydy flawinowe w ilości 4,47—14,39% sumy ryboflawiny, FMN i FAD.

Wykrycie peptydów flawinowych zmusza do nowego spojrzenia na zagadnienie analityki flawin. Od chwili wykrycia tych związków przy identyfikacji grupy prostetycznej enzymów flawinowych wielu badaczy prowadzi hydrolizę białka enzymatycznego dla stwierdzenia obecności flawin związanych kowalencyjnie z białkiem. Dotyczy to również oznaczania zawartości ogólnej flawin w tkankach. Nowsze prace wskazują na to, że zawartość peptydów flawinowych w surowcach naturalnych jest niewielka — rzędu 6% sumy flawin (7, 8, 10, 29). Nie są one jednak oznaczane metodą lumiflawinową (80), a jedynie poprzez bezpośredni pomiar fluorescencji przy pH 3,2. Zawartość peptydów flawinowych odpowiada przede wszystkim zawartości dehydrogenazy bursztynianowej i zależy od intensywności procesów utleniania w komórkach czy tkankach. Duże ilości peptydów flawinowych znajdują się w komórkach bakterii kwasu propionowego i wątroby. Zawartość peptydów flawinowych w drożdżach zależy od natleniania hodowli — w warunkach beztlenowych spada praktycznie do zera. Nie stwierdzono obecności tych związków w mleku. Pośrednio zawartość peptydów flawinowych pozwala na określenie intensywności utleniania komórkowego.

Jakkolwiek badania nad wiązaniem flawin z białkiem prowadzone są od wielu lat, dane na ten temat są dotychczas bardzo fragmentaryczne. Otwarty pozostaje stale istotny z punktu widzenia analitycznego problem uwalniania flawin przy ilościowym ich oznaczaniu. Jak dotąd nie wykryto innych form silnie związanych flawin poza peptydami flawinowymi. W materiale biologicznym znajduje się wiele związków odgrywających względem flawin rolę sorbentów. Obecność takich związków pozorować może silne wiązanie flawin.

Dla pełnego wyjaśnienia wiązania flawin z białkiem i innymi związkami wielkocząsteczkowymi konieczne są dalsze badania. Obecna znajomość struktury flawoproteidów daleka jest jeszcze od poziomu, jaki osiągnięto w badaniach np. nad hemoglobina czy cytochromami. Enzymy flawinowe włączone są głównie w strukturę błon mitochondrialnych (79). Niewątpliwie zachodzi więc oddziaływanie zarówno flawin jak i całych cząsteczek flawoproteidów ze składnikami lipidowymi tych błon, a oddziaływanie to jest istotne dla ich funkcji biologicznych.

LITERATURA

1. Basford R. E., Mii S., Green D. E., 46th Meeting of the Am. Soc. Biol. Chem. San Francisco, IV (1955).
2. Beinert H., w *The Enzymes*, red. P. D., Boyer, K. Myrback H. Lardy., Academic Press, New York, Londyn 1961, str. 351.
3. Blum J. C., Proceedings of the Seventh Intern. Congress of Nutrition, Hamburg 1966, 5, str. 550.
4. Bukin W. N., Rep. of III-rd Intern. Congress of Biochemistry, Brussels 1955, Symposium of Vitamins 19—23.I.1958, Berlin.
5. Cerletti P., Giordano M. G., w *Methods in Enzymology*, red, S. P. Colowick i N. O. Kaplan, tom 18, Academic Press, New York 1970, str. 285.
6. Cerletti P., Strom R., *Nature* **198**, 1094 (1963).
7. Cerletti P., Strom R., Giordano M. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 423 (1963).
8. Cerletti P., Strom R., Giordano M. G., Balestreo F., Giovenco M. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 408 (1964).
9. Chappelle E. W., Picciolo G. L., Atland R. H., *Biochem. Med.* **1**, 255 (1967).
10. Chełkowski J., *Bull. Acad. Polon. Sci.* **19**, 153 (1971).
11. D'Anna J. A., Tollin G., *Biochemistry* **10**, 57 (1971).
12. Draper R. D., Ingraham L. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **139**, 265 (1970).
13. Dudley K. H., Ehrenberg A., Hemmerich P., Müller F., *Helv. Chim. Acta* **47**, 1354 (1964).
14. Dudley K. H., Hemmerich P., *Helv. Chim. Acta* **50**, 355 (1966).
15. Edmondson D. E., Tollin G., *Biochemistry* **10**, 113 (1971).
16. Edmondson D. E., Tollin G., *Biochemistry* **10**, 124 (1971).
17. Edmondson D. E., Tollin G., *Biochemistry* **10**, 133 (1971).
18. Egami T., Naoi M., Tada M., Yagi K., *J. Biochem.* **39**, 669 (1965).
19. Egami T., Yagi K., *J. Biochem.* **43**, 153 (1956).
20. *Enzymy, Nomenklatura i Klasyfikacja*, PWN, Warszawa 1967.
21. Fleischmann D. E., Tollin G., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 248 (1965).
22. Fleischmann D. E., Tollin G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 38 (1965).
23. Fory W., Mac Kenzie R. F., Mc Cormick D. B., *J. Heterocyc. Chem.* **5**, 625 (1968).
24. Frissel W. R., Cronin J. R., Mackenzie C. G., w *Flavins and Flavi-proteins*, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam, Londyn, New York 1966, str. 367.
25. Frissel W. R., Mackenzie C. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 94 (1962).
26. Gardas A., *Post. Biochem.* **12**, 513 (1966).
27. Hemmerich P., Ehrenberg E., Walker W. H., Ericsson E. G., Salach J., Bader P., Singer T. P., *FEBS Letters* **3**, 37 (1969).
28. Hemmerich P., Nagelschneider G., Veeger C., *FEBS Letters* **8**, 69 (1970).
- 28a. Hemmerich P., Veeger C., Wood H. C. S., *Angew. Chem.* **4**, 671 (1965).
29. Janicki J., Chełkowski J., Nowakowska K., *Acta Microbiol. Polon.* **15**, 249 (1966).
30. Janicki J., Sobkowska E., Chełkowski J., Final Technical Report of Grant No FG-Po-144.
31. Jusko W. J., Levy G., *J. Pharm. Sci.* **58** 58 (1969).
32. Kaniuga Z., *Post. Biochem.* **10**, 7 (1964).
33. Kearney E. B., *J. Biol. Chem.* **235**, 865 (1960).
34. Kearney E. B., Singer T. P., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 579 (1955).

35. Kearney E. B., Singer T. P., The 3rd Intern. Congress of Biochem. Brussels 1955.
36. Kierkegaard P., Norrestam R., Werner P. E., Csoregh I., Glehn M. V., Karlsson R., Leijnomark M., Ronquist O., Stensland B., Tillberg O., Torbjornsson L., Flavins and Flavoproteins, red. H. Kamin, University Park Press, Baltimore 1970, str. 1.
37. King T. E., Howard D. F., Li J. C. R., *J. Biol. Chem.* **237**, 2941 (1962).
38. Kotaki A., Yagi K., *J. Biochem.* **68**, 509 (1970).
39. Koziol J., *Experientia* **21**, 189 (1965).
40. Koziol J., *Photochem. Photobiol.* **5**, 41 (1966).
41. Koziol J., *Photochem. Photobiol.* **5**, 55 (1966).
42. Koziol J., *Zeszyty Naukowe WSE w Poznaniu, Seria I*, **26**, 91 (1966).
43. Koziol J., *Photochem. Photobiol.* **9**, 45 (1969).
44. Koziol J., *Zeszyty Naukowe WSE w Poznaniu, Seria I*, **34**, 27 (1969).
45. Koziol J., *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1970, tom 18, str. 253.
46. Kuhn R., Rudy H., *Berichte* **69**, 2557 (1936).
47. Massey V., Gunther H., *Biochemistry* **4**, 1161 (1965).
48. Miles D. W., Urry D. W., *Biochemistry* **7**, 2791 (1968).
49. Müller F., Hemmerich P., *Helv. Chim. Acta* **49**, 2352 (1966).
50. Müller F., Walker W., Hemmerich P., *Helv. Chim. Acta* **49**, 2365 (1966).
51. Ostrowski W., Krawczyk A., *Acta Chem. Scand.* **17**, 241 (1963).
52. Ostrowski W., Sarżyński B., Żak Z., *Biochem. Biophys. Acta* **59**, 515 (1962).
53. Paneque A., Aparicio P. J., Catalina L., Losada M., *Biochim. Biophys. Acta* **162**, 149 (1968).
54. Pereira J. F., Tollin G., *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 79 (1967).
55. Ray A., Guzzo A. V., Tollin G., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 258 (1965).
56. Rhodes M. B., Bennet N., Feency R. F., *J. Biol. Chem.* **234**, 2054 (1959).
57. Ringler R. L., Minakami S., Singer T., *J. Biol. Chem.* **238**, 801 (1963).
58. Roth J. A., Chassy B. M., Mc Cormick D. B., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 429 (1966).
59. Singer T. P., Hauber J., Arrigoni O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 150 (1962).
60. Singer T. P., Hauber J., Kearney E. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 146 (1962).
61. Singer T. P., Kearney E. B., Massey V., *Advan. Enzymol.* **18**, 65 (1957).
62. Singer T., Rocca E., Kearney E. B., w *Flavins and Flavoproteins*, red. E. C. Slater, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam-Londyn-New York 1966, str. 391.
63. Singer T. P., Salach J., Walker W. H., Gutman M., Hemmerich P., Ehrenberg A., w *Flavins and Flavoproteins*, red. H. Kamin, University Park Press, Baltimore 1970, str. 607.
64. Strittmatter P., *J. Biol. Chem.* **236**, 2329 (1961).
65. Strittmatter P., *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, (I), 125 (1966).
66. Strittmatter P., w *Flavins and Flavoproteins*, red. K. Yagi, University of Tokyo Press, Tokyo 1968, str. 85.
67. Strom R., Cerletti P., V Intern. Congress of Biochem., Moskwa 1965, tom 4, str. 295.
68. Theorell H., *Science* **124**, 467 (1956).
69. Theorell H., Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.* **8**, 877 (1954).
70. Theorell H., Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.* **8**, 1104 (1954).

71. Theorell H., Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.* **8**, 1649 (1954).
72. Theorell H., Nygaard A. P., *Ark. Kemi* **7**, 205 (1954).
73. Theorell H., Yagi K., Ludwig G. D., Egami F., *Nature* **180**, 922 (1957).
74. Tsibris J. C. M., McCormick D. B., Wright L. D., *J. Biol. Chem.* **24**, 1138 (1966).
75. Walker W. H., Kearney E. B., Seng R., Singer T. P., *Biochem Biophys. Res. Comm.* **44**, 287, (1971).
- 75a. Walker W. H., Singer T. P., *J. Biol. Chem.* **245**, 4224 (1970).
76. Wang Y. L., *Rev. Roum. Biochim.* **3**, 149 (1966).
77. Wang Y. L., Tsou C. L., Wang C. J., The 3rd Intern. Congress of Biochem., Brussels 1955.
78. Wilson J. E., *Biochemistry* **5**, 1351 (1966).
79. Wojtczak L., *Post Biochem.* **17**, 209 (1971).
80. Yagi K., w *Methods of Biochemical Analysis*, red. D. Glick, Intersci. Publ. New York-Londyn 1962, str. 319.
81. Yagi K., *Advan. Enzymol.* **27**, 1 (1965).
82. Yagi K., Harada M., *Nature* **194**, 1179 (1962).
83. Yagi K., Ozawa T., *Nature* **184**, 1227 (1959).
84. Yagi K., Ozawa T., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 381 (1960).
85. Yagi K., Ozawa T., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 319 (1963).
86. Yagi K., Ozawa T., *J. Biochem. (Tokyo)* **54**, 204 (1963).
87. Yagi K., Ozawa T., Harada M., *Nature* **194**, 1938 (1959).
88. Yagi K., Sugiura N., Okamura K., Kotaki A., *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 343 (1968).
89. Yamaji K., Yamano T., Tagagi T., Isemura H., w *Flavins and Flavoproteins*, red. K. Yagi, University of Tokyo Press, Tokyo 1968.
90. Zak Z., Ostrowski W., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 427 (1963).
91. Zak Z., Steczko J., Ostrowski W., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 1065 (1969).

ROMAN LORENC *

Postępy badań nad kalcytoniną

Progress on Calcitonin Research

Some new concepts on calcitonin chemistry, immunochemistry and mechanism of action are reviewed.

Kalcytonina jest polipeptydowym hormonem, którego czynność łączy się z regulacją gospodarki fosforanowo-wapniowej ustroju. W ciągu dziesięciu lat, które upłynęły od wykrycia kalcytoniny przez Coppa i wsp. (26), przeprowadzono różnokierunkowe badania dotyczące tego hormonu. Część z tych prac jak również pewne aspekty wynikające z badań nad kalcytoniną omówiono w kolejnych artykułach przeglądowych (37, 51). W niniejszej pracy ograniczono się do omówienia opracowywanych w ostatnich latach zagadnień dotyczących biochemicznych i immunologicznych właściwości kalcytoniny jak również mechanizmu jej działania.

1. Różnice gatunkowe w budowie i właściwościach kalcytoniny

W 1964 roku Baghdiantz i wsp. (3) opracowali metodę wyodrębniania kalcytoniny, która stała się podstawą dalszych prac nad tym zagadnieniem. W sześciu laboratoriach Szwajcarii i Stanów Zjednoczonych otrzymano z tarczycy świni kalcytoninę w postaci czystej (4, 5, 17, 34, 69, 70), a w trzech z nich ustalono strukturę chemiczną oczyszczonego hormonu (5, 46, 68). Ostatnio doniesiono również o syntezie aktywnego polipeptydu (40, 74).

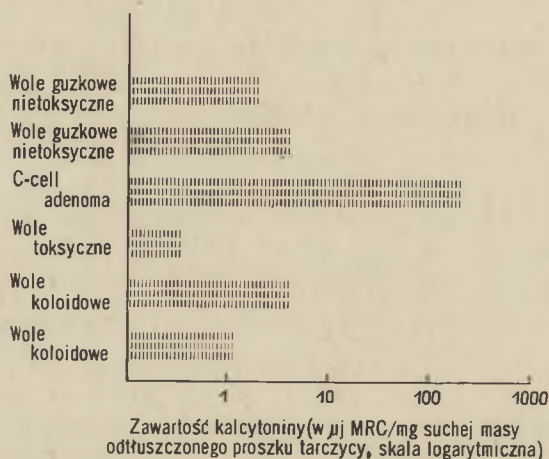
W 1970 roku Brewer i Edelhoeh (16) przeprowadzili badania struktury drugo- i trzeciorzędowej cząsteczki kalcytoniny świni. Okazało się, że cząsteczka kalcytoniny w środowisku wodnym występuje głównie w formie nieuporządkowanej, a tylko około 10% łańcucha ma uporządkowaną konfigurację α -helisy. Uporządkowanie cząsteczki następuje w rozpuszczalnikach niepolarnych: na przykład w 2-chloroetanolu aż 50%

* Dr med., Zakład Biochemii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Wykaz używanych skrótów: EGTA — kwas etylenoglikolocteroocetowy

łańcucha polipeptydowego cząsteczki hormonu ma konfigurację α -helisy. Autorzy przypuszczają, że stwierdzone w zależności od środowiska różnice w strukturze cząsteczki mogą mieć istotne znaczenie dla mechanizmu działania hormonu. Wspomniana zmiana konformacyjna polipeptydu mogłaby zachodzić na przykład przy interakcji hormonu w miejscach receptorowych, a zwłaszcza w hydrofobowych lipidowych częściach błon komórkowych.

Kluczową rolę w badaniach kalcytoniny ludzkiej odegrało wykrycie tego hormonu w mięszu raka tarczycy zwanego hialinowym (6, 46) lub rdzeniastym (litym) (42). Wysoka zawartość hormonu w mięszu raka umożliwiła wyodrębnienie hormonu (28, 58), a następnie ustalenie jego sekwencji aminokwasowej (59). Kolejnym krokiem było przeprowadzenie



Rys. 1. Zawartość kalcytoniny w chorobowo zmienionych tarczycach człowieka (wg 53)

Zawartość hormonu podano w mU MRC w przeliczeniu na mg suchej masy odtuszczonego proszku tarczycy

jego syntezy (77). Ze względu na to, że badania kalcytoniny u człowieka ograniczały się właściwie wyłącznie do przypadków raka, poważnego znaczenia nabiera wykrycie nowej jednostki chorobowej — gruczolaka, którego macierzą są również syntetyzujące ten hormon komórki C tarczycy (8). W mięszu gruczolaka wykryto obecność fluorogennych amin (7) a oznaczenie zawartości kalcytoniny (53) ujawniło (rysunek 1), że przekracza ona około 600 razy zawartość hormonu w mięszu wola toksycznego oraz około 60 razy zawartość w wolu koloidowym. Opracowano ponadto metodę wyodrębniania hormonu z chorobowo zmienionych tarczyc człowieka (54).

W ostatnich latach zainteresowanie strukturą kalcytoniny rozciągnęło się na inne gatunki zwierząt. Oczyszczono kalcytoninę wołu i ustalono jej

Tablica 1

Struktura pierwszorzędowa cząsteczek kalcytoniny wyizolowanej z tarczycy świni, wołu, człowieka i ciała skrzepo pochodnego łososia

Kalcytonina świni	H_2N -Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Tre-Cys-Wal-Leu-Ser-Ala-Tyr-Arg-Asn-Leu-Asn-Fen-His-Arg-Fen-Ser-Gli-Met-Gli-Fen- 0 Gli-Pro-Glu-Tre-Pro NH_2
Kalcytonina wołu	H_2N -Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Tre-Cys-Wal-Leu-Ser-Ala-Tyr-Try-Liz-Asp-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Fen-Ser-Gli-Met-Gli-Fen- 0 Gli-Pro-Glu-Tre-Pro NH_2
Kalcytonina człowieka	H_2N -Cys-Gli-Asn-Leu-Ser-Tre-Cys-Met-Leu-Gli-Tre-Tyr-Tre-Gln-Asp-Fen-Asn-Liz-Fen-His-Tre-Fen-Pro-Gln-Tre-Ala-Leu- 0 Gli-Wal-Gli-Ala-Pro NH_2
Kalcytonina łososia	H_2N -Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Tre-Cys-Wal-Leu-Gli-Liz-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Liz-Leu-Gln-Tre-Tyr-Pro-Arg-Tre-Asn-Tre- 0 Gli-Ser-Gli-Tre-Pro NH_2
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
	28 29 30 31 32

strukturę (15). Na szczególną uwagę zasługują przeprowadzone ostatnio badania w ciałkach skrzelopochodnych (łac. *corpora ultimobranchialia*) niższych kręgowców. Jak wiadomo (20, 45, 66, 67, 79) kalcytonina wytwarzana jest przez komórki C, które u ssaków zlokalizowane są w tarczycy, natomiast u człowieka w tarczycy, grasicy i przytarczycach (36). Komórki te ewolucyjnie pochodzą z łuków skrzelopochodnych — *corpora ultimobranchialia*, przy czym u niższych kręgowców, w tym także u ryb, ciałka skrzelopochodne tworzą osobny narząd (23, 27, 56, 87). Właściwość tę wykorzystali O'Dor, Parkes i Copp (62), którzy w toku prowadzonych prac porównawczych wyizolowali kalcytoninę z ciałka skrzelopochodnego łososia (62) i ustalili jej strukturę pierwszorzędową (60).

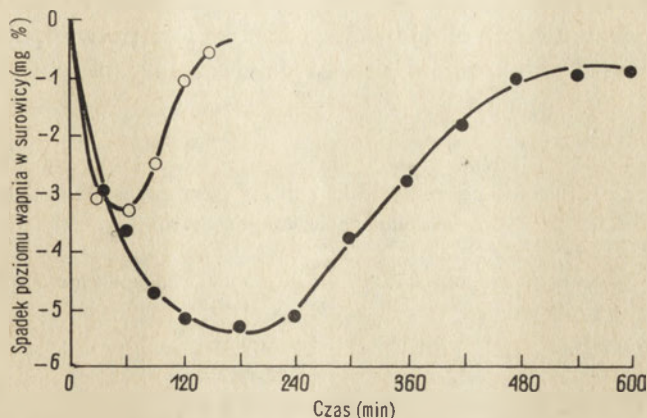
W tablicy 1 przedstawiono strukturę pierwszorzędową cząsteczek kalcytoniny wyizolowanej z tarczycy wołu, świni, raka hialinowego tarczycy człowieka oraz ciałka skrzelopochodnego łososia. Cechy wspólne dla omawianych polipeptydów dotyczą ogólnej liczby 32 aminokwasów, jednakowej we wszystkich przypadkach, związanego z N-końcem mostka dwusiarczkowego cysteiny (1—7) oraz wspólnej dla wszystkich preparatów lokalizacji amidu proliny jako ugrupowania C-końcowego. Na uwagę zasługuje podobne ugrupowanie N-końca polipeptydów. Dziesięć aminokwasów N-końca jest jednakowych w przypadku kalcytoniny świni, wołu i łososia, a w przypadku człowieka są one identyczne aż w siedmiu pozycjach łańcucha polipeptydowego.

Kalcytonina wołu jest zbliżona budową do kalcytoniny z tarczycy świni (różni się tylko w trzech pozycjach łańcucha), natomiast najbardziej zbliżoną do kalcytoniny człowieka jest kalcytonina łososia podobna do ludzkiej w piętnastu pozycjach.

Najbardziej widoczne różnice w strukturze pierwszorzędowej dotyczą części środkowej polipeptydów oraz ugrupowania C-końca łańcucha. Niemniej i w tych ugrupowaniach można zauważyć pewne regularności. Reszty hydrofobowe tyrozyny, leucyny i fenyloalaniny rozmieszczone są w regularnych odstępach (pozycje 4, 9, 12, 16, 19 i 22), a rozmieszczenie grup kwaśnych i zasadowych wykazuje również pewne prawidłowości. Aminokwasy kwaśne występują w pozycjach 15 lub 30, natomiast zasadowe w pozycjach 11, 14, 18 i 21. Nieobecność odpowiedniego aminokwasu łączy się z jego podstawieniem przez aminokwas obojętny.

Jak ujawniły badania porównawcze, różnicom w budowie polipeptydów odpowiadają również różnice w ich aktywności biologicznej. Szczególnie interesujące wydaje się stwierdzenie wysokiej aktywności biologicznej kalcytoniny z ciałka skrzelopochodnego łososia. Aktywność właściwa kalcytoniny z łososia (3000 MRC/mg białka) przekracza około 20 razy aktywność właściwą kalcytoniny świni, człowieka i wołu. Wysokiej aktywności towarzyszy ponadto przedłużone obniżenie poziomu wapnia występujące po podaniu hormonu (rysunek 2). Mechanizm wspomnianych efektów nie jest znany. Na uwagę może zasługiwać większy rozmiar czą-

steczki kalcytoniny łososia, co znajduje swoje odzwierciedlenie w szybszej jej elucji z kolumn *Sephadex* w porównaniu z kalcytoniną z innych źródeł (25), oraz w większym stopniu uwodnienia cząsteczki (39).



Rys. 2. Spadek poziomu wapnia w surowicy krwi królika (wg 25) po dożylnym podaniu 10 MRC kalcytoniny świni (○—○) lub kalcytoniny łososia (●—●)

II. Właściwości immunologiczne hormonu

Dzięki ustaleniu różnic w budowie kalcytoniny z różnych gatunków zwierząt, w nowym świetle przedstawiły się badania immunologiczne prowadzone w układach heterogennych (19, 41, 44, 45, 86). Badania lat ostatnich (44, 48, 86), w których zastosowano technikę radioimmunologiczną i homogenne preparaty hormonu, wykazały, że różnogatunkowe cząsteczki kalcytoniny mają również różne centra antygenowe. W toku klasycznej próby radioimmunologicznej w ustalonych dla standardu kalcytoniny warunkach preparat badany współzawodniczy ze standardem o centrum antygenowe specyficznych, skierowanych w stosunku do nich przeciwciał. Zasada metody polega na określeniu stopnia hamowania wiązania się przeciwciała ze znakowanym radioaktywnym jodem standardem, przez odpowiednie stężenia preparatu badanego. Postępowanie to umożliwia ilościowe określenie stężenia preparatu badanego.

W przeprowadzonych przez Tashijana i wsp. (86) badaniach centrum antygenowego kalcytoniny zastosowano homogenne preparaty hormonu świni, odpowiednie ugrupowania polipeptydowe i ich analogi. Oznaczenie inhibicji wiązania się przeciwciał z natywną znakowaną jodem cząsteczką kalcytoniny przez odpowiednie ugrupowania polipeptydowe pozwoliło na ustalenie sekwencji aminokwasów istotnych dla aktywności

immunologicznej hormonu. Strukturę polipeptydów zastosowanych przez autorów w badaniach centrum antygenowego kalcytoniny świni przedstawiono w tablicy 2. Przeprowadzone oznaczenia ujawniły, że ugrupowanie centrum związane jest w głównej mierze z sekwencją aminokwasów zlokalizowanych w cząsteczce hormonu w pozycjach od 17—25. Chociaż dla wywołania odczynu immunologicznego istotną jest prawdopodobnie obecność całej cząsteczki hormonu, to bardziej czynny okazał się C-koniec polipeptydu (86).

Tablica 2

Polipeptydy o budowie podobnej do kalcytoniny świni zastosowane w badaniach radioimmunologicznych wg (86)

Sekwencja aminokwasów	Pochodzenie
H (1—32) NH ₂	naturalne
H (1—25) NH ₂	syntetyczne
H (1—16) NH ₂	syntetyczne
H (1—9) OH	syntetyczne
H (10—29) NH ₂ -norleu ²⁵	syntetyczne
H (8—22) OH	syntetyczne
H (15—21)	naturalne (po hydrolizie enzymatycznej)
H (22—32)	„

Podobny typ doświadczeń dotyczących kalcytoniny człowieka przeprowadzili Byfield i wsp. (22) oraz Dietrich i Rittel (31). Wspomniani autorzy sądzą, że ugrupowanie antygenowe cząsteczki kalcytoniny ludzkiej znajduje się w części środkowej polipeptydu pomiędzy 13—18 aminokwasem (22, 31), przy czym, podobnie jak w przypadku kalcytoniny ze świni, aktywność immunologiczna związana jest również z C-końcem polipeptydu. Dietrich i Rittel (31) na podstawie badań z analogami polipeptydowymi wskazują ponadto na istotną rolę ugrupowania amidowego C-końca łańcucha dla badanego odczynu. Fakt, że odpowiednie odcinki łańcucha kalcytoniny świni i człowieka uczestniczące w głównej mierze w odczynach immunologicznych mają sekwencje znacznie różniące się między sobą, może stanowić wytłumaczenie występujących w tych przypadkach negatywnych odczynów krzyżowych.

Byfield i wsp. (22) zastosowali w roli antygeny natywne preparaty kalcytoniny wyizolowane z raka hialinowego tarczycy człowieka, natomiast odpowiednie ugrupowania polipeptydowe otrzymywali przez trawienie preparatu hormonu enzymami proteolitycznymi. Dietrich i Rittel (31) wykorzystali preparaty syntetyczne o strukturze odpowiadającej kalcytoninie wyizolowanej z raka, a odpowiednie fragmenty polipeptydowe otrzymali na drodze syntezy.

Kontrowersyjne w pewnej mierze wyniki uzyskano w pracowni Potts'a (30, 47, 68) gdzie otrzymano w surowicy królika przeciwciała

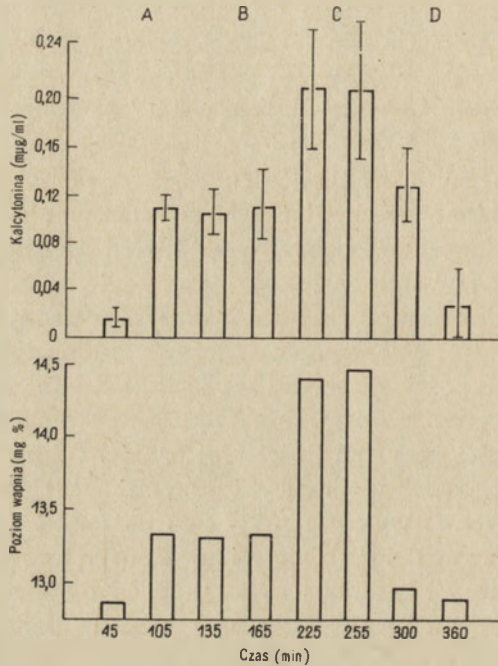
skierowane przeciwko cząsteczce kalcytoniny świni, aktywne wobec kalcytoniny owcy, wołu i człowieka. Występujące w tych przypadkach odczyny krzyżowe autorzy tłumaczą uzyskaniem przeciwciał skierowanych w stosunku do N-końcowego ugrupowania polipeptydów charakteryzujących się podobną sekwencją aminokwasów. Trudne do pogodzenia z tymi obserwacjami wydaje się doniesienie Brewera (14) o tym, że na obecność odczynu immunologicznego nie wywiera wpływu rozbitcie wiązania dwusiarczkowego istotnego dla konfiguracji N-końca polipeptydu.

Waga jaką przywiązuje się do identyfikacji kalcytoniny w tkankach człowieka jest związana z poważnym zapotrzebowaniem diagnostycznym. Dotychczas istotną rolę spełniały w tym względzie techniki morfologiczno-histochemiczne (32, 38, 78). Badania lat ostatnich rozszerzyły się o badania zawartości hormonu w tkance (1, 52, 53) oraz w krwi krążącej (81, 82), a ostatnio czynione są również próby zastosowania w tym celu czulszych technik immunofluorescencyjnych. Wśród nielicznych prac na ten temat na szczególną uwagę zasługuje doniesienie Kaliny i wsp. (44) ze względu na zastosowanie przez autorów syntetycznej kalcytoniny człowieka jako antygeny. Porównanie odczynu immunofluorescencyjnego, świadczącego o obecności syntetyzujących kalcytoninę komórek C, z danymi uzyskanymi przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego ujawniło brak równoległości przy ich ilościowej ocenie. Odczyn immunofluorescencyjny nie występował w grasicy i przytarczycach, natomiast w tarczycy liczba komórek C wykryta przy jego pomocy wydawała się znacznie zaniżona w porównaniu z danymi uzyskanymi w mikroskopie elektronowym (13). Nie wyjaśniono czy brak odczynu związany jest z różnicami czynnościowymi komórek, zamaskowaniem centrum antygenowego, czy też różnicami w budowie hormonu. Nie ma bowiem dotychczas odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu struktura hormonu wyizolowanego z tkanki rakowatej jest reprezentatywna dla struktury kalcytoniny syntetyzowanej w normalnej tarczycy człowieka.

Na uwagę zasługują badania kinetyczne wpływu bodźców wydzielniczych w postaci wysokich stężeń soli wapnia na obraz morfologiczny komórek C. Jak ujawniły badania w mikroskopie elektronowym komórki C tarczycy reagują zarówno *in vivo* (49, 80, 83) jak i *in vitro* (21, 65) na zmiany poziomu wapnia i magnezu. Do proliferacji komórek C prowadzą stany hipokalcemii, natomiast odmienne obrazy zaobserwowano w hiperkalcemii. Komórki są wtedy powiększone, obserwuje się w nich obniżenie odczynów histochemicznych, co w połączeniu z wyraźną degranulacją przemawia za wzmożoną sekrecją hormonu (18, 49, 50, 55, 80, 93).

Skorelowanie wspomnianych badań z testami radioimmunologicznymi umożliwiło ustalenie wpływu podawanych w postaci kroplówki soli wapnia na poziom krążącej w krwi kalcytoniny. Przeprowadzone u królika (47) oznaczenia wskazują (rysunek 3), że kalcytonina jest utrzymywana na stałym poziomie.

Podwyższenie poziomu wapnia powoduje natychmiastowe wzmożenie jej sekrecji, co znajduje odbicie przy oznaczaniu jej poziomu w krwi krążącej. Stała sekrecja kalcytoniny wraz z możliwością zwiększenia jej poziomu w zależności od stężenia soli wapnia stanowi uzupełnienie znacznych efektów działania parathormonu, umożliwiając precyzyjną regulację homeostazy wapniowej.



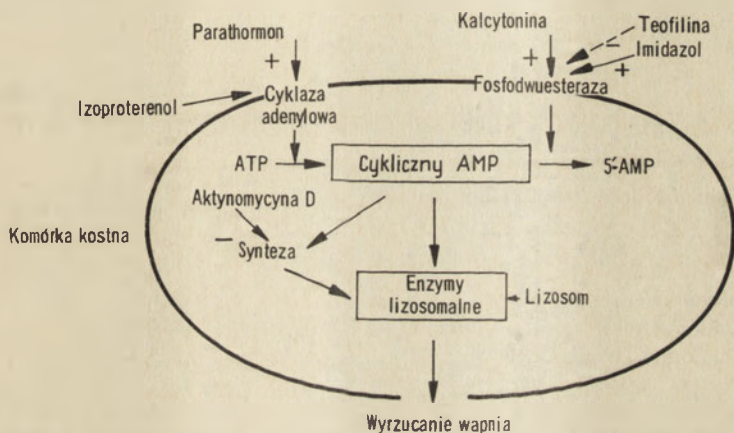
Rys. 3. Wpływ kroplówki zawierającej dekstrozę (A i D) lub sole wapnia (B-140 mg/kg/godz.; C-420 mg/kg/godz.) na poziom wapnia i kalcytoniny w surowicy krwi królika (wg 47)

III. Poglądy na mechanizm działania kalcytoniny

W poprzedniej pracy przeglądowej (51) wspomniałem o dwuprzENOŚnikowej hipotezie Sutherlanda i wsp. (84) stanowiącej hipotezę roboczą dla wyjaśnienia mechanizmu działania kalcytoniny. Według niej hormon jako tzw. „pierwszy przENOŚnik informacji” działa na metabolizm komórki za pośrednictwem tzw. „drugiego przENOŚnika” — cyklicznego AMP. Badania lat ostatnich potwierdziły istotną rolę cyklicznego AMP w czynności szeregu hormonów (25, 75, 85). Zwrócono zwłaszcza uwagę na fakt, że specyficzność działania hormonu związana jest z jego powinowactwem do określonej specyficznej cyklazy adenylowej — enzymu zlokalizowanego w błonie komórkowej i uczestniczącego w syntezie cy-

klicznego AMP. Powinowactwo hormonu do specyficznych, zlokalizowanych w określonych komórkach cyklaz adenylowych stanowiłoby więc wytłumaczenie specyficznego działania hormonu na określone narządy. Na przykład epinefryna powoduje syntezę cyklicznego AMP w komórkach wątrobowych (29), natomiast na działanie parathormonu wrażliwe są komórki kanalików nerkowych (2).

Nowy element istotny dla mechanizmu regulacji hormonalnej wykryli w swoich badaniach Rasmussen i Tenenhouse (71, 72, 73). Autorzy ci zwrócili uwagę na rolę jonów wapnia jako dodatkowego czynnika związanego z czynnością szeregu hormonów, a między innymi parathormonu i kalcytoniny. Spostrzeżenia te znalazły potwierdzenie w pracach Sutherlanda i wsp. (75, 85), którzy stwierdzili, że *in vitro* brak jonów wapnia w badanym układzie powoduje zaburzenia prawidłowej czynności hormonalnej. Synteza cyklicznego AMP nie ulega zmianie w tych przypadkach (89, 94).



Schemat 1. Hipotetyczny mechanizm działania parathormonu i kalcytoniny w komórce kostnej (wg 92)

Linia ciągłą zaznaczono aktywację, linią przerywaną — inhibicję

Punktem wyjścia rozważań o mechanizmie działania kalcytoniny w biochemicznej regulacji homeostazy wapnia było wykrycie przez Chase'a i wsp. (24) wpływu parathormonu na zwiększenie stężenia cyklicznego AMP w moczu. Przy założeniu, że parathormon zwiększa resorpcję wapnia z tkanki kostnej za pośrednictwem cyklicznego AMP, funkcję kalcytoniny starano się powiązać bądź z zahamowaniem syntezy tego nukleotydu, bądź z przyspieszeniem jego inaktywacji w komórce. Ponieważ fosfodiesteraza katalizuje hydrolizę cyklicznego AMP, nie uwieńczone ostatecznie powodzeniem poszukiwania dotyczyły w głównej mierze bezpośredniego wpływu kalcytoniny na czynność wspomnianego enzymu (90, 91, 92) (schemat 1).

Do wyjaśnienia tego zagadnienia przyczyniło się dopiero zsyntetyzowanie dwumaślanowej pochodnej cyklicznego AMP, niewrażliwej na czynność fosfodiesterazy (88). W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że zarówno cykliczny AMP jak i jego dwumaślanowa pochodna wywierają podobny wpływ na metabolizm komórek kostnych jak parathormon. Obserwowana w tych przypadkach zwiększona resorpcja tkanki kostnej była zahamowana przy równoległym podawaniu badanym zwierzętom kalcytoniny. Fakt, że hamujące działanie kalcytoniny występowało również, gdy resorpcję wywołano podaniem niewrażliwej na hydrolizę dwumaślanowej pochodnej cyklicznego AMP, nasuwa wniosek, że punkt uchwytu działania kalcytoniny nie jest związany ani z etapem syntezy cyklicznego AMP ani też nie dotyczy etapu jego inaktywacji. Bezpośrednich dowodów słuszności tego rozumowania dostarczyli Chase i Aurbach (2), którym udało się stwierdzić, że pod wpływem parathormonu następuje zwiększenie syntezy cyklicznego AMP w komórkach tkanki kostnej, przy czym na wzrost tej syntezy nie wpływa obecność kalcytoniny w badanym środowisku (tablica 3).

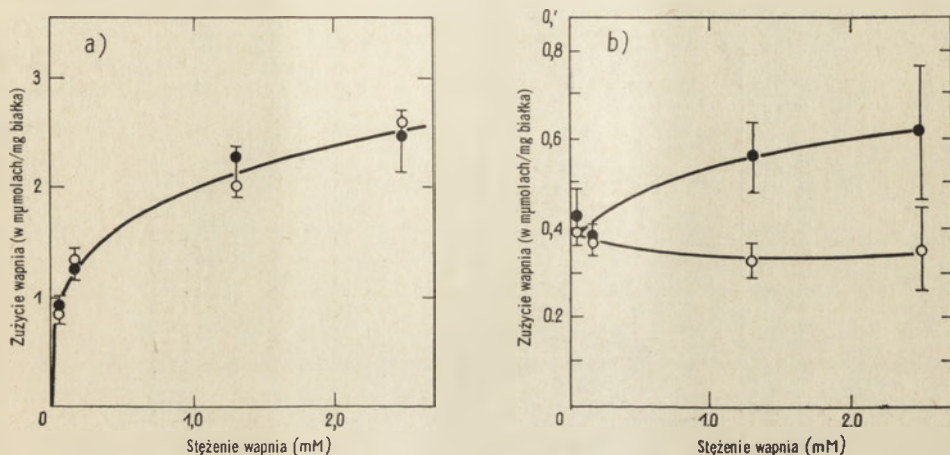
Tablica 3

Wpływ parathormonu i kalcytoniny na poziom cyklicznego adenylowego wg (2)

Składniki dodane do mieszaniny reagującej	Poziom cyklicznego 3', 5'-AMP w m μ molach/mg białka
Bez dodatków	191,9
Kalcytonina	194,0
Parathormon	328,4
Parathormon + kalcytonina	325,0

Borle (10, 11), badając kinetykę metabolizmu wapnia w hodowli komórek HeLa, stwierdził występowanie dwóch odrębnych puli wapnia komórkowego o różnych właściwościach i kinetyce wymiany z wapniem zewnątrzkomórkowym. Wapń puli związanej ze ścianą komórkową stanowi około 90% wapnia związanego przez komórkę i ulega intensywniejszej wymianie z wapniem zewnątrzkomórkowym. Pulę tę udaje się usunąć przez trawienie ściany komórkowej trypsyną i działanie EDTA, co z kolei umożliwia prześledzenie właściwości tzw. puli wapniowej wewnątrzkomórkowej. Niewrażliwość transportu wapnia do puli wewnątrzkomórkowej na warunki beztlenowe i inhibitory metaboliczne, jak DNP i kwas jodoctowy, jak również przeprowadzone rozważania termodynamiczne skłoniły Borle'a do wysunięcia wniosku o biernym charakterze badanego transportu. Natomiast szczególnie istotne dla prowadzonych rozważań wydaje się stwierdzenie przez Borle'a bezpośredniego wpływu parathormonu na zawartość wapnia w puli wewnątrzkomórkowej, przy jednoczesnym braku wpływu na pulę związaną ze ścianą komórkową (rysunek 4).

Na podstawie przeprowadzonych badań autor wysunął hipotezę o bezpośrednim wpływie parathormonu na bierny transport wapnia do komórki. Badania nad wpływem parathormonu na transport wapnia w komórkach nerkowych uzyskanych z nerki małpy potwierdzają tę hipotezę (12). Rozszerzeniem doświadczeń Borle'a stały się przeprowadzone przez Nagatę i Rasmussena (57) doświadczenia ze szczurami, którym operacyjnie usunięto tarczycę i przytarczycę. Zastosowanie takiego modelu

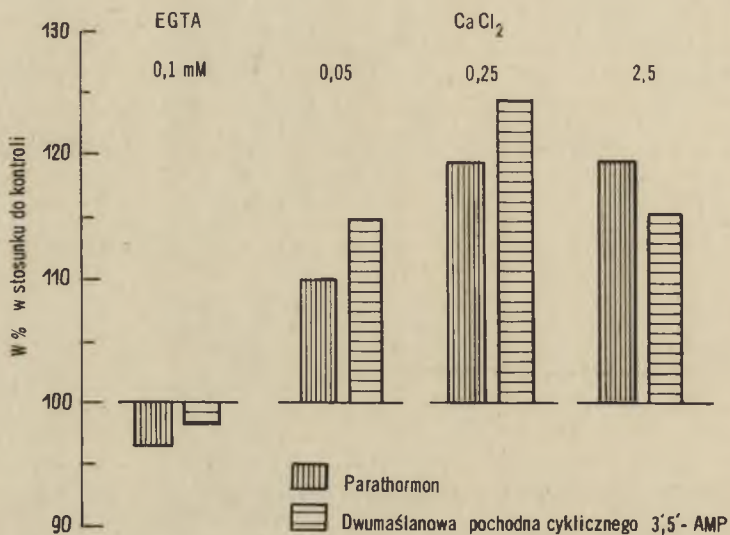


Rys. 4. Wpływ parathormonu na zużycie wapnia przez komórki HeLa (wg 11)
 a — komórki nietknięte, b — komórki poddane trawieniu enzymami proteolitycznymi
 ○ — kontrola. ● — dodatek parathormonu (5 $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$)

doświadczalnego umożliwi bezpośrednie prześledzenie wpływu podawanego parathormonu i kalcytoniny na skutek wyeliminowania ich źródeł endogennych. Autorzy ci po podaniu parathormonu stwierdzili wzrost zawartości izocytrynianu i obniżenie α -ketoglutaranu, natomiast efekt przeciwny występował po podaniu EGTA. Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto wniosek, że zaobserwowane efekty związane są z zahamowaniem aktywności kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy izocytrynianowej, enzymów szczególnie wrażliwych na obecność jonów wapnia. Wpływ parathormonu, wyrażający się zwiększeniem stężenia jonów wapnia, powodowałby zahamowanie aktywności obu enzymów, co z kolei odzwierciedla się nagromadzeniem odpowiednich metabolitów.

W dalszych doświadczeniach Tenenhouse, Rasmussen i Nagata (88) poddawali tkankę nerek działaniu kolagenazy i hialuronidazy w wyniku czego uzyskiwali tysiące kanalików nerkowych. Izolowane w taki sposób kanaliki nerkowe wykazywały zdolność do syntezy glukozy, przy czym jako substrat mogły być wykorzystywane mleczan, kwas pirogronowy lub α -ketoglutaran. Proces ten był przyspieszany za-

równy przez parathormon jak i sole wapnia, niemniej brak soli wapnia eliminował efektywność działania parathormonu. Niezależnie od występowania czy też braku soli wapnia, efektem działania parathormonu była synteza cyklicznego AMP w badanym układzie doświadczalnym. Dodatek cyklicznego AMP jak również jego dwumaślanowej pochodnej do tego układu stymulował glukoneogenezę, przy czym, podobnie jak w przypadku parathormonu, efekt ten był wyraźnie uzależniony od obecności jonów wapnia (rysunek 5). Pobudzający glukoneogenezę poziom wapnia



Rys. 5. Wpływ parathormonu i pochodnej cyklicznego AMP na glukoneogenezę kanalików nerkowych (wg 8)

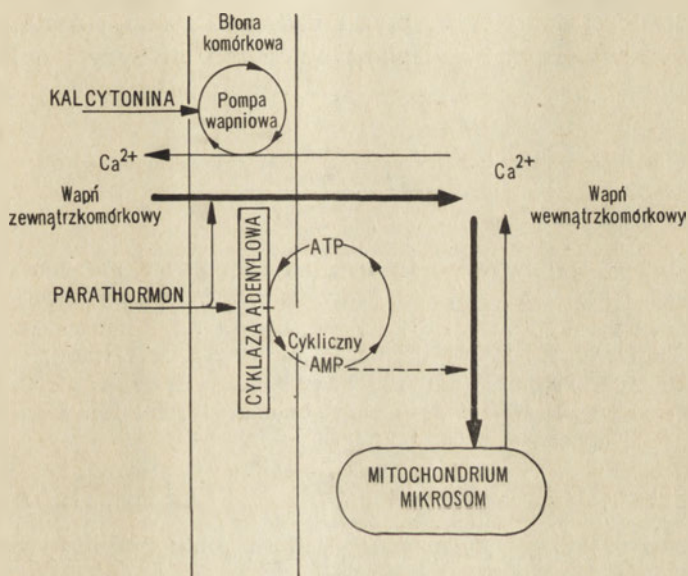
Wyniki podano w % wartości kontroli obliczanej dla każdego z badanych stężeń wapnia

wewnątrzkomórkowego mógł ulec podwyższeniu bądź przez zwiększenie stężenia wapnia zewnątrzkomórkowego bądź przez podanie parathormonu. Robocza hipoteza, w oparciu o którą przeprowadzono wspomniane badania zakłada, że parathormon jednocześnie stymuluje syntezę cyklicznego AMP i zwiększa wychwytywanie wapnia przez komórkę. Podwyższony wewnątrzkomórkowy poziom cyklicznego AMP powoduje natomiast obserwowane efekty metaboliczne na drodze aktywacji enzymów oraz zmian wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia wapnia między organelami komórkowymi.

Pewnym potwierdzeniem tego toku rozumowania jest wpływ podwyższenia stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego na obniżenie syntezy kolagenu (35), stymulację syntezy RNA (63) oraz inhibicję akonitazy (43). Przeprowadzone przez Borle'e (11, 12) badania przemawiają za tym, że transport wapnia przez ścianę komórkową do wnętrza komórki jest procesem biernym, przebiegającym zgodnie z kierunkiem elektrochemicz-

nego potencjału. Ten bierny przepływ wymaga niewątpliwie interakcji z częściami składowymi błony komórkowej podobnie, jak w przypadku przenikania jonów Na^+ przez ścianę komórkową. Wydaje się, że przepuszczalność jonów wapnia jest uzależniona od aktywności ATPazy różnej od ATPazy wpływającej na przepuszczalność jonów Na^+ i K^+ .

Pewne dane świadczą, że kalcytonina może wpływać na zmianę przepuszczalności wapnia przez ścianę komórkową działając przeciwnie do parathormonu. Nisbet i Nordin (61) stwierdzili, że kalcytonina hamuje wzrost syntezy cytrynianu — procesu zależnego od obecności parathormonu. Natomiast bardziej bezpośrednich dowodów dostarczyli Parkinson i Radde (64), którzy zaobserwowali, że w pewnych warunkach kalcytonina wpływa na podwyższenie aktywności ATPazy zależnej od wapnia w cieniach erytrocytów, co w efekcie powoduje zwiększenie aktywnego wydalania wapnia z komórki.



Schemat 2. Przyjęty ostatnio schemat działania parathormonu i kalcytoniny (na podstawie 88)

————→ transport bierny, —————→ transport czynny, —————→ kontrola dodatnia, - - - - -> kontrola ujemna

Z tych względów wydaje się coraz prawdopodobiejsze, że przeciwstawne działaniu parathormonu działanie kalcytoniny (schemat 2) wiąże się ze zmianą wymiany wapnia komórkowego przez bezpośrednią aktywację „pomp wapniowych”. Stymulowane przez parathormon nagromadzenie się w komórce jonów wapniowych prowadziłoby do zahamowania dehydrogenazy izocytrynianowej, wskutek czego nagromadzałyby się kwas cytrynowy. Nadmiar cyklicznego AMP powodowałby aktywację fosforylasy klikogenu (75) i zwiększenie glikolizy. Duże stężenia powstającego

w tych warunkach kwasu mlekowego i cytrynowego prowadziłoby do zakwaszenia środowiska, uwolnienia enzymów lizosomalnych i w efekcie do resorpcji szybko wymieniającej frakcji minerałów kostnych.

Trzymanie homogennych preparatów z różnych gatunków zwierząt oraz łososia umożliwiło szersze porównanie budowy i właściwości kalcytoniny. Rewizji uległy również poglądy na temat mechanizmu działania hormonu.

W świetle powiązania prowadzonych prac z praktycznym ich zastosowaniem w klinice człowieka szczególnym zainteresowaniem cieszą się badania wysoko aktywnej kalcytoniny wyizolowanej z łososia. Być może, już wkrótce dalsze prace ujawnią czy zwiększona aktywność hormonu uzależniona jest w tym przypadku od większej efektywności receptorów komórek kostnych, przedłużenia okresu półtrwania hormonu czy też od innych efektów.

Obok zastosowania hormonu jako leku w terapii zmian kostnych (9, 33) badania obecności kalcytoniny oraz komórek C zyskują sobie coraz szersze prawo obywatelstwa w diagnostyce chorób tarczycy i onkologicznej.

LITERATURA

1. Aliapoulios M. A., Morain W. D., *Am. Surg.* **117**, 554 (1969).
2. Aurbach C. D., Chase L. R., *Federation Proc.* **29**, 1179 (1970).
3. Baghdiantz A., Foster G. V., Edwards A., Kumar M. A., Slack E., Soliman H. A., MacIntyre I., *Nature* **203**, 1027 (1964).
4. Beesley T. E., Harman R. E., Jacob T. A., Homnick C. F., Bitali R. A., Veber D. F., Wolf F. J., Hirschman R., Denckenwalker R. G., R. G., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3255 (1968).
5. Bell P. H., Barg W. F., Colucci D. F., Davies M. C., Dziobkowski C., Englert M. F., Heyder E., Paul R., Sender E. H., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2704 (1968).
6. Beskid M., *Folia Histochem., Cytochem.* **2**, 261 (1964).
7. Beskid M., Lorenc R., *Acta Histochem.* **38**, 74 (1970).
8. Beskid M., Lorenc R., Rościszewska A., *Path. (London)* **103**, 1 (1971).
9. Bijvoet O. L. M., Van der Sluys J., Jansen A. P., *Lancet* **1**, 877 (1968).
10. Borle A. B., *Endocrinology* **83**, 1316 (1968).
11. Borle A. B., *J. Cell Biol.* **36**, 567 (1968).
12. Borle A. B., *Endocrinology* **85**, 194 (1969).
13. Braunstein H., Stephens C. L., *Arch. Path.* **86**, 650 (1968).
14. Brewer H. B., *Federation Proc.* **28**, 383 (1969).
15. Brewer H. B., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symp., red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 14.
16. Brewer H. B., Edelhoeh H., *J. Biol. Chem.* **245**, 2402 (1970).
17. Brewer H. B., Keutmann H. T., Potts J. T., Reisfeld R. A., Shlueter R., Munson P. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 5739 (1968).
18. Bugnon C., Maurat J. P., Lenys D., Moreau N., Rousselet F., *Compt. Rend. (Paris) Soc. Biol.* **9**, 2363 (1967).

19. Bussolati G., Calvalheira A. F., Pearse A. G. E., w Calcitonin, Proc. I-st Int. Symp., red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1968, str. 133.
20. Bussolati G., Foster G. V., Pearse A. G. E., *Virch. Arch. Abt. B. Tellpath.* 2, 243 (1969).
21. Bussolati G., Monga G., Navone R., Gasparii G., w Calcitonin 1969 Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 24.
22. Byfield P. G. H., Clark M. B., Turner E., Foster G. V., MacIntyre I., w Calcitonin 1969, Proc. II-nd Int. Symp. red. Taylor S., Heinemann. Londyn 1970, str. 47.
23. Chan A. S., Ciperia J. D., Belanger L. F., *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.* 11, 34 (1968).
24. Chase L. R., Fedak S. A., Aurbach G. D., *Endocrinology* 84, 761 (1969).
25. Copp D. H., Brooks C. E., Low B. S., Newsome F., Odor R. K., Walker V., Watts E. G., w Calcitonin 1969, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 281.
26. Copp D. H., Cameron E. C., Cheray B. A., Davidson A. G. F., Henze K. G., *Endocrinology* 70, 638 (1962).
27. Copp D. F., Cockroft D. W., Kueh Y., *Science* 158, 924 (1967).
28. Cunliffe W. J., Black M. M., Hall R., Johnson I. D. A., Hudgson T. V., Joplin G. F., Williams E. D., Woodhouse N. J. Y. Galante L., MacIntyre I., *Lancet* 2, 63 (1968).
29. Davoren P. R., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* 238, 3016 (1963).
30. Deftos J. J., Lee M. R., Potts J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 60, 293 (1968).
31. Dietrich F. M., Rittel W., Calcitonin 1969, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 117.
32. Falck B., Ljungberg O., Rosengren E., *Acta Path. Microbiol. Scand.* 74, 1 (1968).
33. Foster G. V., Joplin G. F., MacIntyre I., Melvin K. E. W., Slack E., *Lancet* 1, 107 (1966).
34. Frantz J., Rosenthaler J., Zehnder K., Doepfner W., Huguein R., Guttman S., *Helv. Chim. Acta* 51, 218 (1968).
35. Gaillard P. J., w The Parathyroids, str. 20. red. R. O. Grep, R. V. Talmage, C. C. T. Springfield III.
36. Galante L., Gudmundsson T. V., Matthews E. W., Tse A., MacIntyre I., *Lancet* 2, 537 (1968).
37. Geisler J., *Post. Biochem.* 16, 3 (1970).
38. Gershon M. D., Ross L. L., *J. Physiol.* 186, 14 (1966).
39. Guttman S., Pless J., Huguein R. L., Sandrin E., Bossert H., Zehnder K., w Calcitonin 1969, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 74.
40. Guttman S., Pless J., Sandrin E., Jaquenoud P. A., Bossert H., Willems H., *Helv. Chim. Acta* 51, 1155 (1968).
41. Hargis G. K., Williams G. A., Tenenhouse A., Arnauld C. D., *Science* 152, 73 (1966).
42. Hazard J. B., Hook L. A., Cridle G., *J. Clin. Endocrinol.* 19, 152 (1959).
43. Hekkelman J. W., w Bone Metabolism and the Action of Parathyroid Extract, University of Leiden 1963.
44. Kalina M., Foster G. V., Clark M. B., Pearse A. G. E., w Calcitonin 1969, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 274.
45. Kracht J., Hachmaister U., Breustedt H. J., Bonicke J., Lenke M., w Calcitonin, Proc. I-st Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1968, str. 143.

46. Laskowski J., *Nowotwory* 7, 23 (1957).
47. Lee M. R., Deftos L. J., Potts J. T., *Endocrinology* 84, 36 (1969).
48. Lequin R. M., Mackeng W. H. L., Schopman W., Care A. D., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 80.
49. Lietz H., Donath K., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 227.
50. Lietz H., Schmohling H. U., Zippel H., *Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat.* 348, 290 (1969).
51. Lorenc R., *Post. Biochem.* 16, 527 (1970).
52. Lorenc R., Beskid M., *Pol. Arch. Med. Wewn.* 46, 357 (1971).
53. Lorenc R., Beskid M., *Acta Histochem.*, 43, 1 (1972).
54. Lorenc R., Beskid M., *Pol. Tyg. Lek.* 26, 1034, (1971).
55. Matsuzawa T., Kurosumi K., *Nature* 213, 927 (1967).
56. Moseley J. M., Mathews E. W., Breed R. H., Galante L., Tse A., MacIntyre I., *Lancet* 1, 108 (1968).
57. Nagata N., Rasmussen, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 1364 (1968).
58. Neher R., Riniker B., Maier R., Byfield P. G. H., Gudmundsson T. V. MacIntyre I., *Nature* 220, 984 (1968).
59. Neher R., Riniker B., Rittel W., Zuber H., *Helv. Chim. Acta* 51, 1900 (1968).
60. Niall H., Keutmann H. T., Copp D. H., Potts J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 63, 771 (1969).
61. Nisbet J., Nordin B. E. C., w *Calcitonin*, Proc. I-st Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1968, str. 230.
62. O'Dor R. K., Parkes C. O., Copp O. H., *Canadian. J. Biochem.* 47, 823 (1969).
63. Park H., Talmage R. V., w *Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin*, Proc. III-rd Int. Symp. red. R. V. Talmage, L. F. Belanger, Excerpta Medica Foundation, 1968, str. 203.
64. Pearse A. G. E., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 125.
65. Pearse A. G. E., *Vet. Record* 79, 587 (1966).
66. Parkinson D. K., Radde I. C., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1979, str. 466.
67. Potts J. T., *Federation Proc.* 29, 1200 (1970).
68. Potts J. T., Niall H. D., Keutmann H. T., Brewer H. B., Deftos L. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 1321 (1968).
69. Potts J. T., Reisfeld R. A., Hirsch P. F., Washed A. B., Voelkel E. F., Munson P. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58, 328 (1967).
70. Putter I., Kaczka E. A., Harman R. E., Rickes E., Kempf A. J., Chaiet L., Rothrock J. W., Wase A., Wolf F. J., w *Calcitonin*, Proc. I-st Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1968, str. 74.
71. Rasmussen H., *Science* 170, 404 (1970).
72. Rasmussen H., Tenenhouse A., *Am. J. Med.* 43, 711 (1967).
73. Rasmussen H., Tenenhouse A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 1364 (1968).
74. Rittel W., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Sieber P., *Helv. Chim. Acta* 51, 924 (1968).
75. Robison G. A., Buther R. W., Sutherland E. W., *Annual. Rev. Biochem.* 37, 149 (1968).
76. Schatzmann H. J., *Experientia* 22, 364 (1966).

77. Sieber P., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Rittel W., *Helv. Chim. Acta* **51**, 2057 (1968).
78. Solcia E., Sanpietro R., *Zellforsch. Mikroskop. Anat.* **65**, 131 (1965).
79. Stachura J., *Pat. Pol.* **22**, 287 (1971).
80. Stachura J., Pearse A. G. E., *Virchows. Arch. Abt. B. Zellpath.* **5**, 173 (1970).
81. Sturtridge W. C., Chittal S. M., Puil E. A., Thomas P., Kumar M. A., Verdy M., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symb. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 117.
82. Sturtridge W. C., Kumar M. A., *Lancet* **1**, (1968).
83. Stux M., Thompson B., Isler H., Leblond C. P., *Endocrinology* **68**, 292 (1961).
84. Sutherland E. W., Rall T. W., Menon T., *J. Biol. Chem.* **237**, 1220 (1962).
85. Sutherland E. W., Robison G. A., *Pharmacol. Rev.* **18**, 145 (1966).
86. Tashijan A. H., Bell P. H., Levine L., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 359.
87. Tauber S. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **58**, 1684 (1967).
88. Tenenhouse A., Rasmussen H., Nagata N., w *Calcitonin 1969*, Proc. II-nd Int. Symp. red. S. Taylor, Heinemann, Londyn 1970, str. 418.
89. Vale W., Burgus R., Guillemin R., *Experientia* **23**, 853 (1967).
90. Wells H., Lloyd W., *Endocrinology* **81**, 139 (1967).
91. Wells H., Lloyd W., *Endocrinology* **82**, 468 (1968).
92. Wells H., Lloyd W., *Endocrinology* **82**, 521 (1968).
93. Welsch U., Pearse A. G. E., *Histochemie* **17**, 1 (1969).
94. Zor U., Lowe J. R., Bloom G., Field S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 649 (1968).

EWA SUSKA-BRZEZIŃSKA *

Enzymatyczna inaktywacja neurohormonów

Enzymatic Inactivation of Neurohormones

Some possible ways of enzymatic inactivation of neurohormones in the blood and tissues of man and animals are reviewed.

Droga prowadząca od biosyntezy do obwodowego efektu działania hormonu jest procesem złożonym z wielu etapów: sekrecji, transportu w łożysku naczyniowym i rozprzestrzenienia w organizmie związania z receptorami narządów docelowych, prowadzącego do efektów metabolicznych, wreszcie wydalania, połączonego zazwyczaj z uprzednią inaktywacją tych związków.

W przypadku hormonów peptydowych szczególnie ważną rolę odgrywa inaktywacja na drodze rozerwania labilnego wiązania peptydowego przez enzymy proteolityczne, lub inaktywacja na skutek działania oksydoreduktaz.

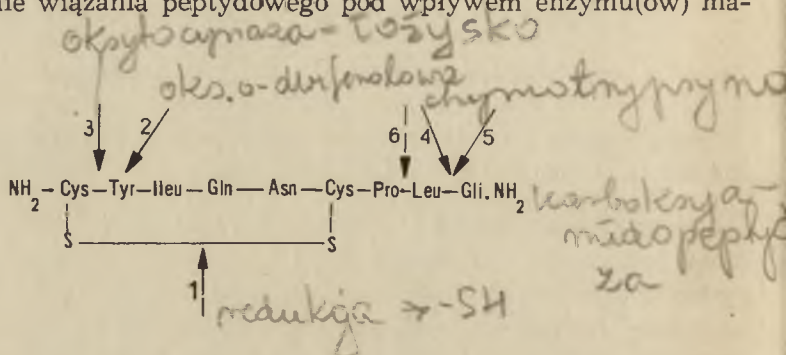
Peptydowe hormony części nerwowej przysadki mózgowej, jak oksytocyna, wazopresyna i związki pokrewne, różnią się czułością na enzymatyczną inaktywację. Tę właściwość wykorzystuje się w badaniach struktury neurohormonów oraz związku między strukturą a aktywnością. Poznanie rozmieszczenia w tkankach enzymów biorących udział w metabolizmie neurohormonów, w warunkach normalnych i patologicznych, nabiera w tym świetle szczególnego znaczenia. Enzymy mogą bowiem wpływać zarówno na poziom neurohormonów w krążącej krwi jak i na ich degradację w tkankach. Pomocne w poznaniu roli i mechanizmu działania enzymów w metabolizmie neurohormonów okazały się też syntetyczne analogi tych związków, dzięki ich odporności na działanie enzymów.

Ze względu na to, że oksytocyna (I) jest neurohormonem występującym u wszystkich dotychczas badanych gatunków ssaków, na przykładzie jej cząsteczki przedstawiono miejsca, w których może zachodzić enzymatyczna inaktywacja.

Zaznaczone we wzorze oksytocyny (I) strzałki wskazują na miejsca, w których zachodzi enzymatyczne rozszczepienie cząsteczki:

* Dr, Instytut Stosowanej Fizjologii Zwierząt, Wyższa Szkoła Rolnicza, Kraków

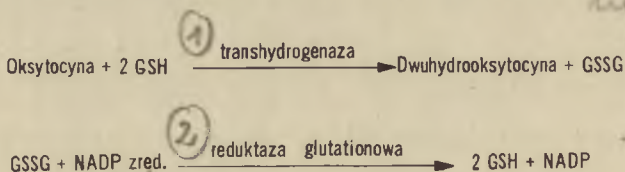
1. Działanie transhydrogenazy lub nieenzymatyczna redukcja mostka dwusiarczkowego.
2. Oksydaza o-dwufenolowa (EC 1.10.3.1).
3. Aminopeptydaza cystynowa czyli oksytocynaza (EC 3.4.1.).
4. Chymotrypsyna (EC 3.4.4. 5.) — działająca na oksytocynę i wazopresynę, lub trypsyna (EC 3.4.4.4.) — inaktywująca wazopresynę i pokrewne peptydy.
5. „Karboksyamidopeptydaza”.
6. Rozerwanie wiązania peptydowego pod wpływem enzymu(ów) macicy kobiet.



Możliwości enzymatycznej inaktywacji oksytocyny są ograniczone, ponieważ grupa amidowa zabezpiecza cząsteczkę przed działaniem karboksypeptydaz (23, 94), a cykliczna struktura powoduje odporność oksytocyny na działanie niespecyficznych aminopeptydaz.

I. Działanie enzymów oksydoredukcyjnych

Redukcja mostka dwusiarczkowego w cząsteczce oksytocyny zachodzi przede wszystkim w wątrobie (66), nerkach (25) i macicy (6) pod wpływem transhydrogenaz. Powstała na skutek redukcji dwuhydrooksytocyna



Schemat 1. Przebieg redukcji oksytocyny (wg 66)

jest związkiem biologicznie nieaktywnym. Enzymem katalizującym ten proces jest transhydrogenaza glutationinsuliny (52, 53). Oksytocyna i wazopresyna mają zdolność zastępowania insuliny w reakcji przenoszenia wodoru z glutationu. Rychlik (66) badając mechanizm tego zjawiska stwierdził stałe utlenianie zredukowanego glutationu w obecności oksy-

tocyny. Dowodem na to było przejście dodanego do systemu NADPH_2 w NADP w obecności reduktazy glutationu (schemat 1).

Dwuetapowy przebieg redukcji oksytocyny jest podobny do przyjętego dla insuliny w wątrobie. Na ścisłe podobieństwo katabolizmu insuliny i neurohormonów wskazuje także to, że rozkład insuliny w nerkach szczurów jest obniżony w obecności oksytocyny (18).

Obecność tyrozyny w cząsteczce oksytocyny umożliwia utlenienie fenolowej grupy $-\text{OH}$ przez oksydazę o-dwufenolową, przy czym hormon traci swą biologiczną aktywność. Produktami utlenienia są pochodne dwuhydroksy lub chinonowe. Wykazano, że ekstrakty z przysadki lub syntetyczne hormony można inaktywować wyciągiem z ziemniaków (33) oraz grzybów (14, 16), zawierającym oksydazę o-dwufenolową.

II. Działanie enzymów proteolitycznych

1. Oksytocynaza

W 1957 roku Tuppy i Nesvadba (96) wykazali, że pojawiający się w surowicy ciężarnych kobiet (28, 29, 105) i małych człekokształtnych (106) enzym inaktywujący oksytocynę ma zdolność proteolitycznego rozzerwania wiązania peptydowego między resztą pół-cystynową z wolną grupą aminową a tyroziną. Aminopeptydaza ta, nazwana oksytocynazą, powoduje utratę własności biologicznych tak oksytocyny (99) jak i wazopresyny (61), przy czym szybkość inaktywacji obu neurohormonów jest taka sama (82).

Źródłem oksytocynazy, według obecnie przyjętego poglądu, jest łożysko (49, 67, 75). Szczególnie przemawia za tym fakt, że oksytocynaza nie występuje u kobiet nieciężarnych i u płodów. Stężenie enzymu w krwi koreluje z masą łożyska, przy mnogich ciążach jest większe.

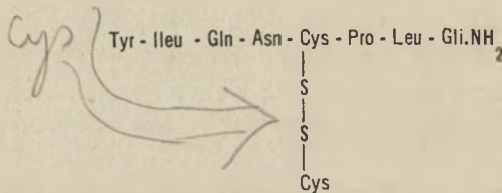
Oksytocynazie poświęcono wiele prac i jest to enzym najlepiej poznany ze wszystkich biorących udział w inaktywacji neurohormonów. Przewadzone od 1960 roku szerokie badania nad oczyszczaniem oksytocynazy z surowicy kobiet ciężarnych (10, 38, 61, 78, 81, 82, 98, 99, 111) zakończyły się sukcesem, bowiem Yman (110) wyizolował oksytocynazę z surowicy krwi łożyskowej kobiet, stosując jako kolejne etapy oczyszczania: frakcjonowanie etanolem, chromatografię na hydroksyapatycie oraz Sephadex G-200. Enzym ten w stanie czystym ma ciężar cząsteczkowy 290 000, a 44% cząsteczki stanowią węglowodany (galaktoza, fukoza, galaktozoamina, glukozoamina i kwas sialowy). W części peptydowej oksytocynazy występują duże ilości kwasu asparaginowego i glutaminowego, treoniny, seryny oraz proliny. Część węglowodanowa zawiera 2 typy łańcuchów węglowodanowych, połączonych z polipeptydami poprzez treoninę i serynę wiązaniem O-glikozydowym.

Cząsteczka oksytocynazy zawiera 40 reszt kwasu sialowego, który bierze

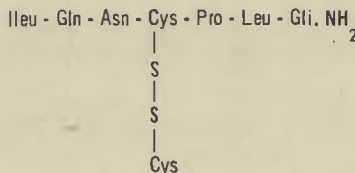
prawdopodobnie udział w konformacyjnych zmianach enzymu przy pH 8,5 (11). Zmiany te nie zachodzą, jeśli kwas sialowy zostanie usunięty z cząsteczki oksytocynazy na skutek działania α -neuraminidazy. Nie wiadomo, czy kwas sialowy bierze udział w tworzeniu kompleksu enzym-substrat, czy też jego obecność na powierzchni białka wpływa na rozmieszczenie łańdzków w cząsteczce enzymu, a tym samym na stabilność kompleksu enzym-substrat.

Oksytocynaza jest oporna na działanie semikarbazynu, co sugeruje, że centrum aktywne enzymu nie zawiera grup $>CO$ (43, 105). Barth i wsp. (9), po zaobserwowaniu hamowania oksytocynazy dimedonem, rozważają możliwość udziału grupy aldehydowej w jej centrum aktywnym. Jak wiele innych peptydaz, oksytocynaza wymaga obecności jonów metali dwuwartościowych dla swej katalitycznej funkcji (107). Inhibicja za pomocą EDTA uznana jest za właściwość odróżniającą oksytocynazę surowicy kobiet ciężarnych od inaktywujących oksytocynę enzymów tkankowych. R y d e n (67) podkreślił jednak, że test ten nie jest całkowicie pewny, gdyż enzymy tkankowe są też niekiedy hamowane przez EDTA.

Według S j ö h o l m a i Y m a n a (80) proces degradacji neurohormonów przy udziale oksytocynazy przebiega w kilku etapach:



- Rozerwanie wiązania peptydowego między resztą pół-cystynową a tyrozyną z wytworzeniem dziewięciopeptydu (II).
- Uwolnienie znakowanej trytem tyrozyny i nieradioaktywnego ośmiopeptydu (III).

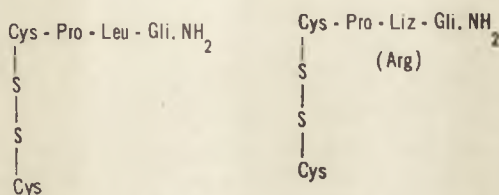


- Rozerwanie dalszych wiązań peptydowych połączone z uwolnieniem izoleucyny i glutaminy.

Enzymatyczna degradacja zakończona jest utworzeniem się z oksytocyny pięciopeptydu (IV), a z wazopresyny pięciopeptydu (V).

Być może oksytocynaza bierze również udział w inaktywacji innych hormonów, ponieważ jak wykazali Seelig i Lassen (74), częściowo

oczyszczony preparat oksytocynazy wykazuje zdolność unieczynniania kalcytoniny, której cząsteczka od końca z wolną grupą aminową zbliżona jest do cząsteczki oksytocyny. Nie wynika stąd jednak, że oksytocynaza jest jedynym, czy głównym inaktywatorem kalcytoniny.



Optimum działania oksytocynazy przypada na pH 7,0—7,6 (112), a inaktywacja oksytocyny przebiega według reakcji I rzędu (56, 76). Inaktywacja oksytocyny jest wprost proporcjonalna do ilości enzymu w mieszaninie inkubacyjnej, natomiast nie zależy od ilości hormonu. Sjöholm i Yman (80), działając wysoko oczyszczonym preparatem oksytocynazy na znakowaną trytem oksytocynę i wazopresynę, uzyskali wartości stałej Michaelisa (K_m) $0,51 \times 10^{-5}$ M dla oksytocyny i $1,07 \times 10^{-5}$ M dla wazopresyny.

Oksytocynaza poddana elektroforezie na żelu poliakrylamidowym (79, 110) w pH powyżej 7,2 daje 2 smugi wykazujące aktywność aminopeptydazy cystynowej (CAP_1 i CAP_2). Są to dwie, różniące się konformacją formy tego samego enzymu, a nie jak dawniej sądzono izoenzymy (37, 59, 100). Wolniej wędrująca w polu elektrycznym CAP_2 występuje przy fizjologicznych wartościach pH (7,2 i niżej) i wydaje się, że tylko ta forma enzymu może mieć znaczenie *in vivo* (79). Forma CAP_1 posiada mniejszy ładunek dodatni i przejście CAP_2 w formę CAP_1 spowodowane jest małymi zmianami konformacji dotyczącymi krótkiego odcinka łańcucha polipeptydowego (110).

Według nomenklatury Komisji Enzymowej Międzynarodowej Unii Biochemicznej (63) oksytocynaza jest zaliczana do hydrolaz α -aminoacylopeptydów (3.4.1). Nazwa „oksyto-cynaza” jest zastrzeżona i powinna być używana jedynie w stosunku do aminopeptydazy występującej w krwi kobiet w czasie ciąży i degradującej zarówno oksytocynę jak i wazopresynę. Nazwa „aminopeptydaza cystynowa” jest trochę myląca, ponieważ enzym działa nie tylko na peptydy zawierające cystynę.

Właściwości hydrolityczne oksytocynazy w stosunku do szeregu syntetycznych substratów wykorzystano dla oznaczania aktywności tego enzymu. Wprowadzony przez Tuppy i Nesvada L -cystyno-dwu- β -naftyloamid okazał się substratem współzawodniczącym z oksytocyną (43, 59). Uwalniana pod wpływem oksytocynazy β -naftyloamina może być oznaczana, po uprzednim dwuazowaniu, kolorymetrycznie. Jako substraty dla

oksytocynazy stosowano również amid L-cystynylo-dwu-L-tyrozyny, związek posiadający N-końcową dwupeptydową sekwencję oksytocyny i wazopresyny (108). Substrat ten jest pod wpływem oksytocynazy hydrolizowany do cystyny i amidu glicyny.

Polecany przez niektórych autorów (97, 101, 109) L-cystyno-dwu-p-nitroanilid jest substratem wygodnym, ponieważ uwalniana po hydrolizie enzymatycznej nitroanilina, może być od razu oznaczana kolorymetrycznie, bez sprzęgania z innym barwnikiem. B é r a n k o v á i wsp. (15) opisali rozkład pod wpływem surowicy kobiet ciężarnych szeregu peptydów zawierających S-benzylo-L-cysteinę, jak na przykład S-benzylo-L-cysteinilo-leucyna, S-benzylo-L-cysteinilo-tyrozyna, S-benzylo-L-cysteinilo-feniloalanina, S-benzylo-L-cysteinilo-glicyna. Na częściowo oczyszczonym preparacie enzymu autorzy potwierdzili hydrolizę powyższych substratów (21).

Badania enzymologiczne wykazały, że oksytocynaza jest aminopeptydazą cystynową i hydrolizuje wiązanie peptydowe powstałe z grupy $-NH_2$ tyrozyny i grupy $COOH$ N-końcowej reszty pół-cystynowej lub S-benzylo-L-cystynowej. Jednakże termin aminopeptydaza cystynowa, tak często używany w stosunku do oksytocynazy (43, 64, 81, 95), nie wyklucza, że inna reszta aminokwasowa z wolną grupą $-NH_2$ może być uwalniana pod wpływem enzymu. Stwierdzono, że oksytocynaza może hydrolizować β -naftyloamidy szeregu aminokwasów (58, 96, 98), jak również L-leucyno-p-nitroanilid, czy glicyno-dwu-p-nitroanilid. Oksytocynaza jest więc enzymem o bardzo szerokiej specyficzności w stosunku do syntetycznych substratów.

2. Chymotrypsyna i trypsyna

Czułość oksytocyny na proteolityczne działanie chymotrypsyny po raz pierwszy zaobserwowali C r o x a t t o i wsp. (22), a 20 lat później potwierdzili to G o l u b o w i d u V i g n e a u d (39).

Chymotrypsyna powoduje rozerwanie wiązania peptydowego w dwu miejscach łańcucha peptydowego: między leucyną i amidem glicyny, który zostaje uwolniony (8) oraz między tyrozyną a izoleucyną. Jednakże już uwolnienie amidu glicyny powoduje utratę biologicznych własności oksytocyny. Jak wykazali P l i š k a i B a r t h (60), chymotrypsyna uwalnia amid glicyny z peptydów złożonych z więcej niż trzech aminokwasów, natomiast trójpeptydy są odporne na działanie tego enzymu. Zjawisko powyższe jest prawdopodobnie związane z II-rzędową strukturą peptydów.

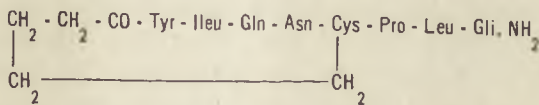
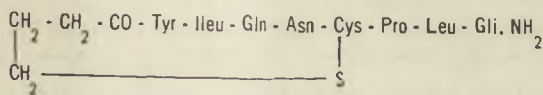
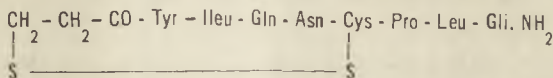
Wazopresyna jest również inaktywowana przez chymotrypsynę, która działa na wiązanie między feniloalaniną a glutaminą. Znacznie silniej jest jednak wazopresyna atakowana przez trypsynę, która rozrywa wiązanie peptydowe między argininą lub lizyną a amidem glicyny (1, 2, 102).

Oksytocyna jest odporna na działanie trypsyny (4) ponieważ nie zawiera zasadowych aminokwasów jak lizyna czy arginina. Stopień uwolnienia amidu glicyny z cząsteczki wazopresyny pod wpływem trypsyny jest około 500-krotnie wyższy niż z oksytocyny pod działaniem chymotrypsyny (8).

Tak chymotrypsyna jak i trypsyna są enzymami często stosowanymi do wykrywania obecności oksytocyny i wazopresyny lub wazotocyny w materiale biologicznym (14, 41, 55, 57, 93).

3. „Karboksyamidopeptydaza”

Pliška i wsp. (62), badając właściwości biologiczne niektórych analogów oksytocyny, wykazali, że mają one aktywność antydiuretyczną zbliżoną do oksytocyny. Deaminooksytocyna (VI) ma aktywność biologiczną wyższą od oksytocyny, a więc obecność końcowej grupy $-NH_2$ nie jest konieczna dla zachowania aktywności neurohormonów (20, 50, 105). Deamino-1-karbaoksytocyna (VII) oraz deamino-1,6-dwukarbaoksytocyna (VIII) — związki, w których atom siarki w mostku dwusiarczkowym deaminooksytocyny zastąpiony jest grupą metylenową — zachowują właściwości biologiczne oksytocyny (51, 62). Wynika stąd, że obecność mostka dwusiarczkowego nie jest warunkiem koniecznym dla zachowania biologicznych własności neurohormonów (65, 73).



Deaminooksytocyna nie jest inaktywowana przez aminopeptydazy (39), natomiast dwa pozostałe analogi są odporne zarówno na działanie aminopeptydaz jak i reduktaz mostka dwusiarczkowego. Jednocześnie stwierdzono (7, 88), że analogi te unieczynniane są przez homogenaty tkanek zwierzęcych, szczególnie nerek i wątroby oraz pęcherza żaby (36). Cząsteczka oksytocyny musi być więc jeszcze atakowana w innym miejscu.

Glass i wsp. (35), badając inaktywację oksytocyny i deaminooksytocyny przez częściowo oczyszczony homogenat macicy, stwierdzili enzymatyczne rozszczepienie wiązania peptydowego między leucyną w pozycji 8 a amidem glicyny w pozycji 9. Ponieważ enzym ten nie inaktywuje 8-arginino-wazopresyny i 8-lizyno-wazopresyny, musi on być czuły na obecność leucyny w cząsteczce oksytocyny i mieć własności endopeptydazy.

Stosując chromatografię na *DEAE*-celulozie, wysalanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sączenie molekularne na *Sephadex G-150*, *G-25* i *G-50*, Koida i wsp. (54) wyizolowali z nerek szczurów enzym rozszczepiający w cząsteczce oksytocyny wiązanie peptydowe między leucyną a amidem glicyny. Oczyszczony enzym ma własności „karboksyamido-peptydazy” i być może odgrywa ważną rolę w regulacji aktywności neurohormonów *in vivo*.

III. Inaktywacja neurohormonów u człowieka

Neurohormony uwolnione do krwiobiegu nie mają zdolności przenikania do erytrocytów, lecz pozostają w plazmie. Okres półtrwania egzogennej oksytocyny u mężczyzn wynosi mniej niż 1 minutę (32), natomiast u kobiet ciężarnych waha się od 1,2 do 4 minut (40). Stosując oksytocynę znakowaną trytem (zawierającym $\text{L-3-}^3\text{H}$ -tyrozyne) Ryden i Sjöholm (68, 69) stwierdzili, że okres półtrwania oksytocyny w krwi kobiet nieciężarnych wynosi około 4,5 minuty, przy czym uzależniony jest od czynności hormonów płciowych — estrogeny hamują, a gestageny przyspieszają jej zanik.

Inaktywacja neurohormonów u człowieka zachodzi nie tylko pod wpływem oksytocynazy, która występuje tylko u kobiet w okresie ciąży; dużą rolę odgrywają w tym procesie enzymy znajdujące się w tkankach, a szczególnie w wątrobie i nerkach. González-Panizza i wsp. (40), stosując makroinfuzję oksytocyny u nieciężarnych kobiet stwierdzili, że około 20% podanego hormonu pojawia się w moczu, podczas gdy u ciężarnych jedynie niecałe 1%. Wskazywało by to na duży udział oksytocynazy w degradacji oksytocyny. Z drugiej strony kobiety nieciężarne i mężczyźni mają okresy półtrwania hormonu bardzo podobne do kobiet ciężarnych — czyli inny mechanizm musi brać również udział w tym procesie. Za pomocą analizy polarograficznej produktów rozkładu oksytocyny stwierdzono, że w surowicy kobiet nieciężarnych nie zachodzi degradacja tego hormonu (12).

Inaktywację neurohormonów w tkankach mogą powodować niespecyficzne aminopeptydazy, np. aminopeptydaza leucynowa. Jak wykazały badania Bartoška i wsp. (13), enzym ten nie działa na neurohormony tak długo, dopóki występują one w postaci cyklicznej (dwusiarczkowej), jednakże otwarty pod wpływem reduktaz pierścień może być atakowany przez aminopeptydazę leucynową. Nie można również wykluczyć istnienia w tkankach enzymu typu „karboksyamidopeptydazy”, działającego na

wiązanie peptydowe między 8 a 9-yminokwasem w cząsteczce oksytocyny. Felicetti i Hanson (30), badając w tkankach ludzkich występowanie peptydazy rozszczepiającej dwupeptyd D-leucylo-glicynę wykazali, że enzym ten w znacznych ilościach pojawia się w nerkach, dwunastnicy, jelitach, wątrobie, mózgu, śledzionie i mięśni szkieletowym. Enzym wyizolowany z nerek człowieka scharakteryzowali jako aminopeptydazę o ciężarze cząsteczkowym między 50 000 a 60 000 (31). Być może bierze on udział w inaktywacji oksytocyny. Odpowiednie badania nie były dotychczas prowadzone.

Macica kobiet wykazuje dość znaczną zdolność do inaktywacji oksytocyny (19, 56, 67). Inaktywacja nie zachodzi w warunkach tlenowych, co wskazywało by na początkową redukcję mostka dwusiarczkowego, a potem na dalszą inaktywację przypuszczalnie pod wpływem proteaz. Doświadczenie prowadzone na szczurach (6) wykazało, że inaktywacja w wątrobie i nerkach zachodzi tak w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, natomiast w macicy tylko w warunkach beztlenowych. Sugeruje to istnienie odmiennego mechanizmu inaktywacji neurohormonów w macicy. Ostatnie badania Waltera i wsp. (104) rzuciły zupełnie nowe światło na mechanizm unieczynniania oksytocyny przez macicę kobiet. Stosując chromatografię na DEAE-celulozie homogenatu macicy kobiet nieciężarnych, autorzy uzyskali 2 frakcje wykazujące zdolność degradacji oksytocyny. Jedna frakcja miała aktywność aminopeptydazową, natomiast druga zawierała enzym odszczepiający od oksytocyny dwupeptyd — amid leucylo-glicyny, co wskazuje na rozerwanie wiązania peptydowego między proliną a leucyną. Rozerwanie cząsteczki oksytocyny między 7 a 8-yminokwasem nie było dotąd obserwowane i wskazuje na możliwość unieczynniania neurohormonów w mięśni macicy na innej drodze aniżeli w pozostałych tkankach.

IV. Inaktywacja neurohormonów w organizmach zwierzęcych

O ile u człowieka i ssaków neurohormonami produkowanymi przez podwzgórze są oksytocyna i wazopresyna, u niższych zwierząt, począwszy od smoczkoustych, wyosobniono z układu podwzgórzowo-przysadkowego 5 innych hormonów, różniących się od siebie aminokwasami w pozycji 3, 4 i 8. W tablicy 1 zebrano wszystkie dotychczas poznane neurohormony.

Ze względu na łatwość uzyskania materiału do badań, znacznie więcej wiemy na temat unieczynniania neurohormonów u zwierząt niż u człowieka. Poszukiwania oksytocynazy u ssaków nie dały rezultatu (26, 72, 107). Hashimoto (43) wykazał nieznaczną aktywność aminopeptydazy cystynowej u szczurów, królików, świnek morskich i myszy, zwierząt u których oksytocynaza nie występuje. W plazmie kobiet ciężarnych zachodzi ścisła korelacja między aktywnością oksytocynazową i amino-

peptydazy cystynowej (poziom enzymów różnych od oksytocynazy, hydrolizujących L-cystyno-dwu- β -naftyloamid jest bardzo niski). U zwierząt jednak korelacja ta nie musi koniecznie zachodzić.

Dość znaczną aktywność aminopeptydazy cystynowej wykazano natomiast w plazmie krwi ptaków (27, 34, 43, 86, 87), jednakże wyniki dotyczące występowania w plazmie ptaków aktywności enzymatycznej inaktywującej neurohormony są sprzeczne. Suska-Brzezińska (84), stosując test biologiczny na izolowanej macicy szczura *in vitro* wykazała, że plazma kur i kogutów posiada zdolność do inaktywacji oksytocyny,

Tablica 1

Różnica w budowie chemicznej dotychczas poznanych neurohormonów

Nazwa	Budowa chemiczna	Występowanie
Oksytocyna	Cys-Tyr-Ileu-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gli.NH ₂ S S	Człowiek i ssaki
Arginino-wazopresyna	Fen Arg	Ssaki (z wyjątkiem świniokształtnych)
Lizyno-wazopresyna Wazotocyna	Fen Liz Arg	Świniokształtne Wszystkie kręgowce z wyjątkiem ssaków
Mezotocyna	Ileu	Ptaki, płazy, ryby płucodyszne
Ichtiotocyna (izotocyna)	Ser Ileu	Ryby kostnoszkieletowe
Glumitocyna	Ser Gln	Ryby chrzęstnoszkieletowe

natomiast Hasan i Heller (42) nie potwierdzają tej właściwości plazmy kur. Autorzy powyżsi badali rozkład oksytocyny przez plazmę ptaków, ponieważ do niedawna sądzono, że oksytocyna jest drugim obok wazotocyny neurohormonem tej gromady. Ostatnia praca Achera i wsp. (3) zaprzecza istnieniu oksytocyny w podwzgórzu ptaków i dowodzi, że drugim neurohormonem u tych zwierząt jest izoleucyno-8-oksytocyna, czyli mezotocyna. Istotnym jest, że mezotocyna nie różni się od oksytocyny w tej części cząsteczki, która ulega rozszczepieniu pod wpływem aminopeptydaz.

Rozdzielając elektroforetycznie plazmę krwi kur na żelu skrobiowym udało się stwierdzić (85) obecność aminopeptydazy o ruchliwości elektroforetycznej oksytocynazy kobiet ciężarnych. Pozwala to przypuszczać, że podobny do oksytocynazy enzym występuje też w plazmie ptaków.

Aminopeptydaza cystynowa krwi pojawia się już w życiu embrionalnym kurcząt (89). U zwierząt dorosłych poziom enzymu ulega znacznemu obniżeniu w okresie znoszenia jaja (17), co wskazuje na jego powiązanie

z aktywnością neurohormonalną podwzgorza. Neurohormony są bowiem uwalniane do krwiobiegu w czasie tego procesu (83, 90, 91) i działając kurcząco na mięśnie jajowodu ułatwiają zniesienie jaja (70, 71). Obniżenie aktywności enzymu unieczynniającego neurohormony może mieć na celu umożliwienie im wzięcia udziału w samym procesie zniesienia jaj i pośrednio stanowiłoby dowód o powiązaniu aminopeptydazy cystynowej z neurohormonami. Występowanie w plazmie ptaków enzymu unieczynniającego neurohormony jest szczególnie zaskakujące, gdyż nie pojawia się on u pozostałych gromad kręgowców, z wyjątkiem jednego przedstawiciela gadów — *Natrix rhombifera* (27).

Tkanki zwierzęce mają silną zdolność inaktywacji neurohormonów. Najczęściej przypisuje się to działaniu aminopeptydaz, względnie redukcji mostka dwusiarczkowego. W 20 minut po podaniu znakowanej oksytocyny, stężenie radioaktywności w nerkach i wątrobie jest wyższe niż w krwi (5). Inne narządy, łącznie z mięśniem szkieletowym, nie wykazują wyższej radioaktywności niż krew. Największe znaczenie w inaktywacji neurohormonów przypisuje się nerkom. Praktycznie w 150 sekund po podaniu oksytocyna ulega inaktywacji w tej tkance (77). Najsilniej inaktywuje oksytocynę warstwa brodawkowa nerek, znana jako miejsce działania hormonów antydiuretycznych.

Oddzielając frakcję mitochondrialną od cytoplazmatycznej homogenatu nerek szczurów, udało się stwierdzić, że oksytocyna jest inaktywowana przez obie frakcje. Analogi oksytocyny — dezamino-1-karbaoksytocyna i dezamino-1,6-dwukarbaoksytocyna ulegały inaktywacji jedynie przy inkubacji z frakcją cytoplazmatyczną (88). Przypisywać to można obecności we frakcji cytoplazmatycznej endopeptydazy o własnościach „karboksamidopeptydazy” (54) rozszczepiającej wiązanie peptydowe między 8 a 9-y aminokwasem. W odróżnieniu od oksytocyny, system enzymatyczny inaktywujący wazopresynę występuje głównie we frakcji cytoplazmatycznej (24).

Uwolnienie z cząsteczki oksytocyny amidu glicyny, pod wpływem działania enzymów znajdujących się w nerkach, zostało potwierdzone w doświadczeniach *in vivo* (103). Około 50—65% radioaktywności podanej szczerom dożylnie ¹⁴C-oksytocyny pojawiło się w moczu w postaci amidu ¹⁴C-glicyny. Badania te dowodzą, że działanie „karboksamidopeptydazy” stanowi jedną z podstawowych dróg inaktywacji oksytocyny *in vivo*. Jest rzeczą interesującą, że nerki szczurów degradują oksytocynę znacznie silniej aniżeli arginino-wazopresynę (54).

Sposób rozszczepienia oksytocyny w wątrobie sugeruje, że enzymem inaktywującym może być aminopeptydaza podobna do aminopeptydazy leucynowej (EC 3.4.1.1.) (15,66), chociaż całkowicie odmienna od oksytocynazy. Aminopeptydaza wątrobowa inaktywująca oksytocynę różni się od aminopeptydazy leucynowej tym, że hydrolizuje amid leucyny bardzo wolno i nie jest inaktywowana przez EDTA. Z tego też względu enzym

występujący w wątrobie, czy innych tkankach zwierzęcych nie może być ani dwupeptydazą, ani też trójpeptydazą.

Zdolność do inaktywacji neurohormonów wykazuje również podwzgórze, co po raz pierwszy wykazano u psów (45, 46, 47) i królików (48). Inaktywację tę przypisuje się działaniu aminopeptydaz, w szczególności aminopeptydazie cystynowej, której aktywność w podwzgórzcu i prąplaszczu kory mózgowej (łac. *paleopallium*) szczurów wzrasta po podaniu estrogenów i progesteronu (44, 92). Poziom enzymu w innych częściach mózgu szczurów pozostaje po podaniu tych związków bez zmian.

Zagadnienie inaktywacji oksytocyny i innych neurohormonów w tkankach jest więc bardzo złożone z uwagi na obecność niespecyficznych aminopeptydaz, możliwość redukcji mostka dwusiarczkowego i udziału endopeptydaz. W tych warunkach na neurohormon może działać jednocześnie kilka enzymów.

LITERATURA

1. Acher R., Chauvet J., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 487 (1953).
2. Acher R., Chauvet J., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 421 (1959).
3. Acher R., Chauvet J., Chauvet M. T., *European J. Biochem.* **17**, 509, (1970).
4. Acher R., Fromageot C., *Ergebn. Physiol.* **48**, 285 (1955).
5. Aroskar J. P., Chan W. Y., Stouffer J. E., Schneider C. H., Murti V. V. S., du Vigneaud V., *Endocrinology* **74**, 226 (1964).
6. Audrian L., Caluser H., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 494 (1960).
7. Barth T., Hütter H. J., Pliška V., Šorm F., *Experientia* **25**, 646 (1969).
8. Barth T., Pliška V., Rychlik I., *Collec. Czech. Chem. Comm.* **32**, 1058 (1967).
9. Barth T., Pliška V., Rychlik I., Šorm F., *Collec. Czech. Chem. Comm.* **32**, 2327 (1967).
10. Barth T., Rychlik I., Mannsfeldt H. G., *Collec. Czech. Chem. Comm.* **36**, 2540 (1971).
11. Barth T., Yman L., Kulling B., Barthova J., *Collec. Czech. Chem. Comm.* **36**, 2316 (1971).
12. Bartik M., Teleha M., Čuderlikova V., Zwick K., *Endocrinol. Exp.* **5**, 143 (1971).
13. Bartošek I., Pliška V., Rychlik I., Šorm F., w *Problemy Ewolucionnoj i Techničeskoj Biochimii*, Nauka, Moskwa 1964, str. 276.
14. Bentley P. J., *J. Endocrinol.* **43**, 359 (1969).
15. Beránková Z., Rychlik I., Šorm F., *Collec. Czech. Chem. Comm.* **26**, 1708 (1961).
16. Bisset G. W., *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* **18**, 405 (1962).
17. Brzezińska E., Rzaśa J., Ewy Z., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II Sér. Sci Biol.* **15**, 143 (1967).
18. Camu F., Conard V., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **162**, 247 (1966).
19. Carballo M. Am., w *Oxytocin*, red. R. Caldeyro-Barcia i H. Heller, Pergamon Press, Londyn 1961, str. 343.
20. Chan W. Y., du Vigneaud V., *Endocrinology* **71**, 977 (1962).
21. Čihař M., Beránková Z., Rychlik I., Šorm F., *Collec. Czech. Chem. Comm.* **26**, 2632 (1961).

22. Croxatto H., Alliende J., Croxatto R., *Rev. Med. Aliment. (Santiago)* 5, 228 (1942/43a).
23. Croxatto H., Croxatto R., Rioscco M., *Rev. Soc. Argent. Biol* 21, 23 (1945).
24. Dicker S. E., Greenbaum A. L., *J. Physiol. (London)* 132, 199 (1956).
25. Dicker S. E., Greenbaum A. L., *J. Physiol. (London)* 141, 107 (1958).
26. Dicker S. E., Whyley G. A., *Acta Endocrinol.* 34 (suppl. 51) 145 (1960).
27. Ehrensing R. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 177, 370 (1964).
28. Fekete K., *Endokrinologie* 7, 364 (1930).
29. Fekete K., *Endokrinologie* 10, 16 (1932).
30. Felicetti D., Hanson H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 349 555 (1968).
31. Felicetti D., Hanson H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 351, 1253 (1970).
32. Fitzpatric R. J., w Oxytocin, red. R. Caldeyro-Barcia R. i H. Heller, Pergamon Press, Londyn 1961, str. 358.
33. Fraser A. M., *Rev. Can. Biol.* 9, 54 (1950).
34. Gilbert A. B., Lake P. E., *Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. and Artificial Insemination Sec. II*, 317 (1964).
35. Glass J. D., Dubois B. H., Schwartz I. L., Walter R., *Endocrinology* 87, 730 (1970).
36. Glass J. D., Schwartz I. L., Walter R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 63, 1426 (1969).
37. Glendening M. B., Titus M. A., Schroeder S. A., Mohun G., Page E. W., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 92, 814 (1965).
38. Goebelsman U., Beller F. K., *Z. Klin. Chem.* 3, 49 (1965).
39. Golubow J., du Vigneaud V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 112, 218 (1963).
40. González-Panizza V. H., Sica-Blanco Y., Méndez-Bauer C., w Oxytocin red. R. Caldeyro-Barcia i H. Heller, Pergamon Press, Londyn 1961, str. 347.
41. Haller E. W., Sachs H., Sperelakis N., Share L., *Am. J. Physiol.* 209, 79 (1965).
42. Hasan S. H., Heller H., *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* 33, 523 (1968).
43. Hashimoto T. J., *Jap. Obstet. Gynaecol. Soc.* 8, 87 (1961).
44. Heil H., Meltzer V., Kuhl H., Abraham R., Taubert H., D., *Fert. Steril.* 22, 181 (1971).
45. Hooper K. C., *Biochem. J.* 83, 511 (1962).
46. Hooper K. C., *Biochem. J.* 85, 8P (1962).
47. Hooper K. C., *Biochem. J.* 90, 584 (1964).
48. Hooper K. C., *Biochem. J.* 99, 128 (1966).
49. Hooper K. C., Jessup D. C., *J. Physiol. (London)* 148, 539 (1959).
50. Hoppe D. B., Murti V. V. S., du Vigneaud V., *J. Biol. Chem.* 237, 1563 (1962).
51. Jošt K., *Collec. Czech. Chem. Comm.* 36, 218 (1971).
52. Katzen H. M., Stetten D., *Diabetes* 11, 271 (1962).
53. Katzen H. M., Tietze F., Stetten D., *J. Biol. Chem.* 238, 1006 (1963).
54. Koida Masao, Glass J. D., Schwartz I. L., Walter R., *Endocrinology* 88, 633 (1971).
55. Lawler H. C., du Vigneaud V., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 74, 114 (1953).
56. Melander S. E. J., *Acta Endocrinol., Suppl.* 96, 1 (1965).
57. Munsick R. A., Sawyer W. H., Van Dyke H. B., *Endocrinology* 66, 860 (1960).
58. Nesvadba H., *Mh. Chem.* 93, 386 (1962).

59. Page E. W., Titus M. A., Mohun G., Glendering M. B., *Am. J. Obstet. Gynecol.* **82**, 1090 (1961).
60. Pliška V., Barth T., *Collec. Czech. Chem. Comm.* **35**, 1576 (1970).
61. Pliška V., Barth T., Rychlík I., *Experientia* **23**, 196 (1967).
62. Pliška V., Rudinger J., Dousa T., Cort J. H., *Am. J. Physiol.* **215**, 916 (1968).
63. Raport Komisji Enzymowej Międzynarodowej Unii Biochemicznej, Oxford 1961.
64. Riad A. M., *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* **69**, 409 (1962).
65. Rudinger J., Jošt K., *Experientia* **20**, 570 (1964).
66. Rychlík I., Proc. 2 nd Int. Pharmacol. Meeting, Praga 1963, **10**, 153 (1964).
67. Ryden G., *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* **3**, 1 (1966).
68. Ryden G., Sjöholm I., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **48**, Suppl. 3 139 (1969).
69. Ryden G., Sjöholm I., *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **50**, Suppl. 9 37 (1971).
70. Rzaśa J., Ewy Z., *J. Reproduk. Fert.* **21**, 549 (1970).
71. Rzaśa J., Ewy Z., *J. Reproduk. Fert.* **25**, 115 (1971).
72. Sawyer W. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol.* **87**, 463 (1954).
73. Schwartz I. L., Rasmussen H., Rudinger J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 1044 (1964).
74. Seelig H. P., Lassen E., *Z. Ges. Exptl. Med.* **154**, 265 (1971).
75. Semm K., *Arch. Gynäk.* **191**, 57 (1958).
76. Semm K., w Oxytocin, red. R. Caldeyro-Barcia i H. Heller, Pergamon Press, Londyn 1961, str. 336.
77. Sjöholm I., Ryden G., *Acta Endocrinol.* **61**, 432 (1969).
78. Sjöholm I., Yman L., *Acta Pharm. Suecica* **3**, 377 (1966).
79. Sjöholm I., Yman L., *Acta Pharm. Suecica* **3**, 389 (1966).
80. Sjöholm I., Yman L., *Acta Pharm. Suecica* **4**, 81 (1967).
81. Sjöholm I., Yman L., Sandberg F., *Acta Pharm. Suecica* **2**, 261 (1965).
82. Stoklaska E., Wintersberger E., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* **236**, 358 (1959).
83. Sturkie P. D., Yu-Chong Lin., *J. Endocrinol.* **35**, 325 (1966).
84. Suska-Brzezińska E., *Acta Physiol. Pol.* **20**, 88 (1969).
85. Suska-Brzezińska E., *Folia Biol.* **17**, 311 (1969).
86. Suska-Brzezińska E., Ewy Z., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II, Sér. Sci. Biol.* **13**, 17 (1965).
87. Suska-Brzezińska E., Ewy Z., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II, Sér. Sci. Biol.* **18**, 121 (1970).
88. Suska-Brzezińska E., Fruhaufová L., Barth T., Pliška V., Rychlík I., Jošt K., Šorm F., *Collec. Czech. Chem. Comm.*, w druku.
89. Suska-Brzezińska E., Ślebodziński A., *Experientia* **24**, 437 (1968).
90. Tanaka K., Nakajo S., *Endocrinology* **70**, 453 (1962).
91. Tanaka K., Nakajo S., *Poult. Sci.* **42**, 729 (1963).
92. Taubert H.-D., Heil H., Kuhl H., *Symp. Dtsch. Ges. Endokrin.* **16**, 288 (1970).
93. Thorn N. A., *Acta Endocrinol.* **32**, 128 (1959).
94. Thorn N. A., Silver L., *J. Exptl. Med.* **105**, 575 (1957).
95. Titus M. A., Reynolds D. R., Glendening M. B., Page E. W., *Am. J. Obstet. Gynecol.* **80**, 1124 (1960).
96. Tuppy H., Nesvadba H., *Mh. Chem.* **88**, 977 (1957).
97. Tuppy H., Wiesbauer U., Wintersberger E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **329**, 278 (1962).
98. Tuppy H., Wiesbauer U., Wintersberger E., *Mh. Chem.* **94**, 321 (1963).

99. Tuppy H., Wintersberger E., *Mh. Chem.* **91**, 1001 (1960).
100. Tuppy H., Wintersberger E., w Oxytocin, vasopressin and their structural analogues, red. J. Rudinger, Praga 1964, str. 143.
101. Van Oudheusden A. P. M., *Clinica Chim. Acta* **32**, 140 (1971).
102. du Vigneaud V., Lawler H. C., Popenoe E. A., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4880 (1953).
103. Walter R., Shlank H., *Endocrinology* **89**, 48 (1971).
104. Walter R., Shlank H., Glass J. D., Schwartz I. L., Kerényi T. D., *Science* **173**, 327 (1971).
105. Werle E., Hevelke A., Buthmann K., *Biochem. Z.* **309**, 270 (1941).
106. Werle E., Semm K., Enzenbach R., *Arch. Gynäk.* **177**, 211 (1950).
107. Werle E., Semm K., *Arch. Gynäk.* **187**, 449 (1956).
108. Wintersberger E., Tuppy H., *Mh. Chem.* **91**, 406 (1960).
109. Wintersberger E., Tuppy H., Stoklaska E., *Mh. Chem.* **91**, 577 (1960).
110. Yman L., *Acta Pharm. Suecica* **7**, 29 (1970).
111. Yman L., Kulling B., *Acta Pharm. Suecica* **6**, 313 (1969).
112. Yman L., Sjöholm I., *Acta Pharm. Suecica* **4**, 13 (1967).

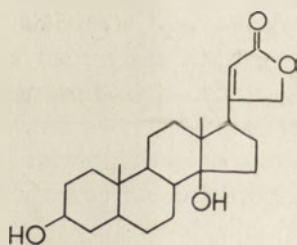
WIRGINIA JANISZOWSKA *

Biosynteza kardenolidów i bufadienolidów

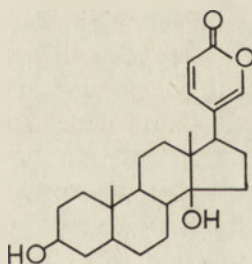
Biosynthesis of Cardenolides and Bufadienolides

Biosynthetic pathways of cardenolides and bufadienolides in higher plants are reviewed.

Kardenolidy i bufadienolidy stanowią grupę naturalnych sterydów roślinnych budzących zainteresowanie zarówno ze względu na ich strukturę jak i własności farmakologiczne. Kardenolidy, używane w dawnych czasach przez dzikie ludy do zatruwania strzał, obecnie stosowane są do leczenia pewnych chorób serca (9, 17, 18, 24, 36, 83). Omawiane związki wykryto dotychczas u przedstawicieli 12 rodzin roślin, przy czym znajdowano je prawie we wszystkich organach w różnych ilościach w zależności od wieku rośliny oraz okresu jej wegetacji (37, 42, 49, 63). W ostatnich latach nagromadziło się sporo informacji pozwalających na sformułowanie dróg biosyntezy tych związków.



I



II

Kardenolidy i bufadienolidy mają podobną strukturę, zawierają bowiem czteropierścieniowy szkielet sterydowy z grupą hydroksylową o konfiguracji β przy atomie węgla C-14 oraz pierścień laktonowy dołączony do węgla C-17 (57, 74). Występują one głównie w postaci glikozydów, a cząsteczki cukrów najczęściej są dołączone do grupy hydroksylowej przy węglu C-3. Aglikon z cząsteczkami cukrów jest połączony w następujący sposób:

* Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

aglikon-O-/rzadki cukier/_x O-/glukoza/_y (57).

Kardenolidy (wzór ogólny I) zawierają pięcioczłonowy α , β - nienasycony pierścień γ -laktonowy, tzw. pierścień butenolidowy, są więc sterydami C₂₃. Natomiast bufadienolidy (wzór ogólny II), sterydy C₂₄, zawierają podwójnie nienasycony sześcioczłonowy pierścień laktonowy, tzw. pierścień kumalinowy.

Różnice między poszczególnymi kardenolidami i bufadienolidami polegają na obecności różnej ilości tlenowych grup funkcyjnych i podwójnych wiązań w szkielecie sterydowym oraz różnej konfiguracji podstawników przy węglu C-5 (57).

I. Biosynteza kardenolidów

Już od dawna wiadomo, że octan, kwas mewalonowy oraz skwalen są prekursorami steroli roślinnych (2, 32, 46, 59, 78, 82). Było więc prawdopodobne, że są one także prekursorami kardenolidów. W latach 1964—65 E u w i Reichstein (23) oraz Gros i wsp. (30, 41) wykazali, iż rośliny *Digitalis purpurea* przekształcają zarówno 1-¹⁴C-octan jak i 2-¹⁴C-mewalonian w kardenolidy poprzez skwalen i nieznaną dwudziestosiędmiowęglowy związek sterydowy jako metabolity pośrednie.

Wiadomo, że u zwierząt kluczowym pośrednikiem w biosyntezie wszystkich steroli i hormonów sterydowych jest cholesterol. Ostatnio związek ten jest również coraz częściej wykrywany zarówno w roślinach niższych (19, 56, 77) jak i wyższych (4, 8, 20, 38, 39, 44). Co więcej, wyjaśniono także, że cholesterol lub jego glikozyd ulega w organizmach roślinnych dalszym przekształceniom do różnych typów sterydów (3, 25, 33, 34, 73) lub alkaidów sterydowych (1). Fakty te skłoniły różnych badaczy (4, 30, 41, 48, 49, 66) do wysunięcia przypuszczenia, iż biosynteza kardenolidów zachodzi w następującym ciągu reakcji: octan → mewalonian → skwalen, który w wyniku cyklizacji dawałby związek pośredni C₂₇, typu cholesterolu. Dowodów popierających tę hipotezę dostarczyli w 1967 roku Jacobson i Frey (38), którzy wykazali, że rośliny *D. purpurea* przekształcają kwas 2-¹⁴C-mewalonowy w cholesterol. Związek ten zawierał około 30% radioaktywności frakcji steroli, jakkolwiek wagowo stanowił zaledwie 3% wszystkich steroli. Ta niezwykle wysoka radioaktywność specyficzna wskazywała na dużą aktywność metaboliczną cholesterolu pełniącego rolę pośrednika w biosyntezie sterydów roślinnych, podobnie jak zwierzęcych.

Stosując prekursorzy takie jak octan lub mewalonian, podawano je roślinom na drodze нефизjologicznej, mianowicie poprzez łydogę liścia. Tschesche i Lilienweiss (75) wykazali, że tą samą drogą można wprowadzać glikozyd cholesterolu w przeciwieństwie do wolnego cholesterolu czy innych małopolarnych sterydów nierozpuszczalnych w wo-

dzie. Metoda ta miała jednak duże ograniczenia, ponieważ glikozydy steroli nie są właściwymi metabolitami biosyntezy, a ponadto w postaci glikozydów można podawać jedynie sterydy zawierające grupy hydroksylowe. Brak metody wprowadzania bliższych prekursorów kardenolidów nie pozwalał na badanie kolejności przekształceń tych związków w roślinach. Dopiero Bennett i Heftmann (2) opracowali w 1965 roku metodę wprowadzania do roślin *in vivo* niepolarnych związków sterydowych. Polega ona na nanoszeniu na odtłuszczony liść niepolarnego prekursora rozpuszczonego w niepolarnym rozpuszczalniku. Po odparowaniu rozpuszczalnika powierzchnię liścia spryskuje się olejem silikonowym. Autorzy wykazali, że w takich warunkach około 10% podanego związku przenika do wnętrza liścia. Po kilku dniach lub tygodniach zmywa się pozostały na liściu prekursor, a roślinę analizuje.

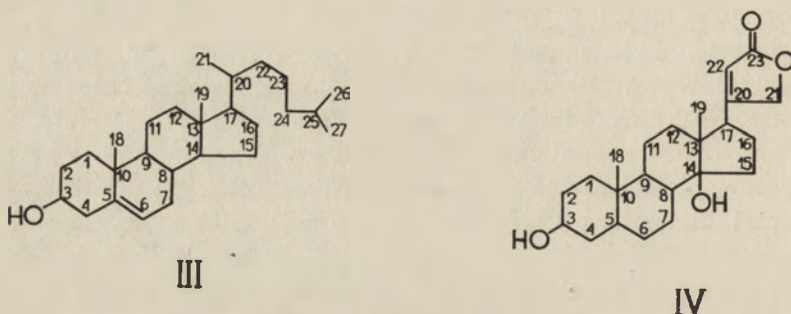
Opracowanie tej metody było punktem wyjściowym dla intensywnych badań nad biosyntezą kardenolidów i umożliwiło wykrycie pośrednich metabolitów szlaku biosyntezy tych związków. W latach 1968—1970 Wickramasinghe i wsp. (80, 81) oraz Tschesche i wsp. (71) udowodnili, że jednym z tych metabolitów jest rzeczywiście cholesterol, gdyż w liściach *D. lanata* przekształca się on w kardenolidy. Bennett i wsp. (6) wykazali, że rośliny *D. lanata* obok cholesterolu przekształcają także β -sitosterol w kardenolidy. Jednak znakowanie kardenolidów powstałych z cholesterolu jest znacznie wyższe niż powstałych z β -sitosterolu, co wskazuje, że raczej cholesterol niż β -sitosterol jest prekursorem leżącym na głównym szlaku biosyntezy kardenolidów. Ponadto wykazano, że cholesterol ulega utlenieniu w roślinach *Digitalis* do 20α -hydroksycholesterolu, który również przekształca się w kardenolidy (74, 81).

1. Powstawanie pierścienia butenolidowego

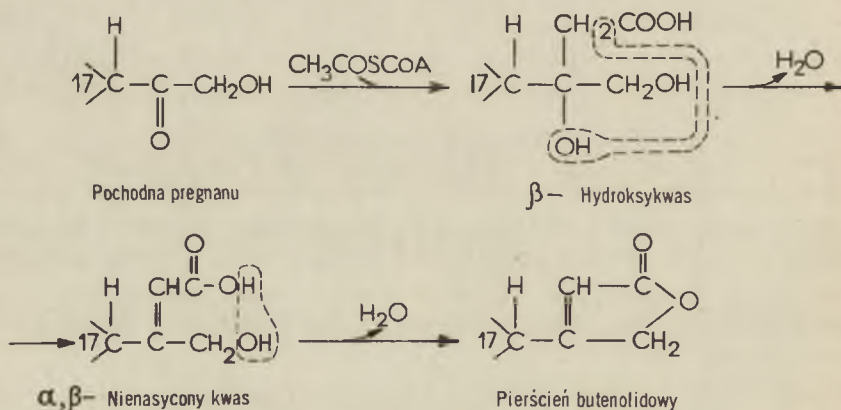
Opierając się na znanym fakcie, że w czasie biosyntezy kwasów żółciowych z cholesterolu u zwierząt zachodzi rozerwanie łańcucha bocznego między atomami węgla C-24 i C-25 z jednoczesnym utlenieniem atomu C-24 do grupy karboksylowej, przypuszczano początkowo, że atomy węgla pierścienia butenolidowego i kumalinowego pochodzą z łańcucha bocznego cholesterolu (III). Mianowicie po rozerwaniu łańcucha między atomami węgla C-23 i C-24 lub C-24 i C-25 oraz utlenieniu końcowego atomu węgla do grupy karboksylowej nastąpiłoby wytworzenie pierścienia laktonowego w wyniku reakcji między grupą karboksylową a grupą hydroksylową przy węglu C-21 (30, 41). Droga ta wydawała się prawdopodobna, ponieważ z *Chionographis japonica* wyizolowano lakton o 23 atomach węgla, chiogralakton, razem z chiograsterolami A i B o postulowanej w tym szlaku strukturze (60, 61).

Pierwszych danych wskazujących na inną drogę powstawania pierścienia laktonowego kardenolidów dostarczyli w 1965 roku Gros i wsp.

(30, 41). Autorzy ci podając roślinom *D. purpurea* i *D. mertonensis* $2-^{14}\text{C}$ -mewlonian wykazali, że cholesterol pochodzący z tego związku zawierał radioaktywne atomy węgla w pozycjach C-1, C-7, C-15, C-22, C-26, natomiast powstała z niego digitoksygenina (IV) — główny kardenolid badanych roślin — wprawdzie zawierała węgle ^{14}C w szkielecie sterydowym, ale atom węgla C-22 w pierścieniu butenolidowym, wbrew oczekiwaniom, nie był radioaktywny. Z drugiej strony w analogicznym doświad-



czeniu po podaniu $1-^{14}\text{C}$ -octanu jako prekursora, wyizolowano kardenolidy zawierające radioaktywne atomy węgla zarówno w części sterydowej jak i w pierścieniu laktonowym. Ostatnio *Wickramasinghe* i wsp. (80, 81) udowodnili na drodze degradacji chemicznej, że pierścień bute-



Schemat 1. Powstawanie pierścienia butenolidowego

nolidowy kardenolidów wytworzonych w liściach *D. lanata* z podwójnie znakowanego cholesterolu (trytem w pozycji 7 i ^{14}C w pozycjach 1, 7, 15, 22, 26) nie zawiera atomów węgla pochodzących z łańcucha bocznego cholesterolu.

Z przedstawionych powyżej prac wynika, że w roślinach *Digitalis* z octanu poprzez mewalonian powstaje cholesterol, z którego po rozerwa-

niu łańcucha bocznego między atomami węgla C-20 i C-22 tworzy się dwudziestojednowęglowa pochodna, prawdopodobnie pregnenolon. Natomiast donorem atomów węgla C-22 i C-23 pierścienia butenolidowego byłby kwas octowy, najprawdopodobniej w postaci acetyloCoA. Ponadto podając roślinom *Digitalis* 21-hydroksypregnenolon stwierdzono, że proces powstawania pierścienia laktonowego jest poprzedzony wprowadzeniem grupy hydroksylowej w pozycję C-21 (67). Do atomu węgla C-20 pochodnej pregnenolonowej zostaje dołączona cząsteczka kwasu octowego i powstaje pierścień butenolidowy według schematu 1 (41, 65, 66).

2. Przekształcanie cholesterolu w 5 β -pregnanolon

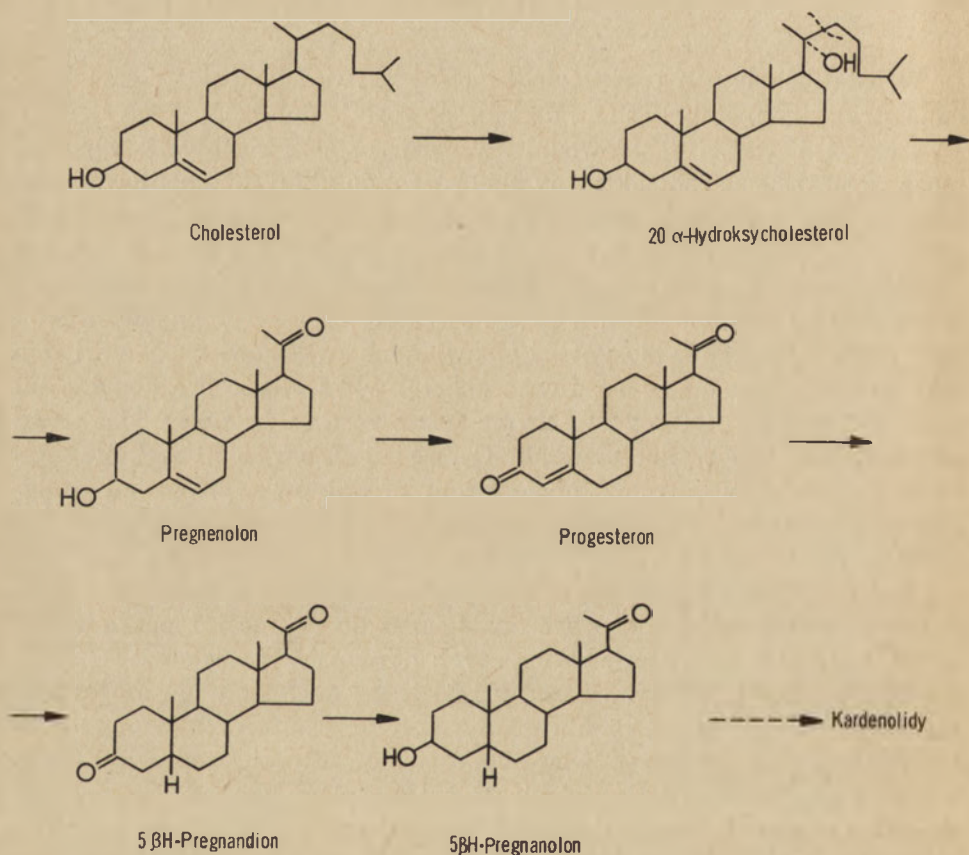
W ostatnich latach przeprowadzono intensywne badania w celu ustalenia struktury metabolitu C₂₁, do którego zostaje dołączony kwas octowy.

C a s p i i wsp. (13) udowodnili w 1966 roku, że rośliny *D. purpurea* mogą przekształcać radioaktywny cholesterol do kilku metabolitów, wśród których zidentyfikowali pregnenolon. Już poprzednio było wiadomo, iż związek ten powstaje w pewnych roślinach z cholesterolu (4, 5, 23, 28, 76). Uzyskany wynik wskazywał, że pregnenolon jest metabolitem pośrednim w biosyntezie kardenolidów, a przejście cholesterol \rightarrow pregnenolon istotnym etapem na drodze biosyntezy omawianych związków. S a u e r i wsp. (51, 52) oraz T s c h e s c h e i wsp. (69, 75) wykazali, że pregnenolon lub jego 3 β -glukozyd jest przekształcony przez rośliny *D. lanata* do kardenolidów. Podobny wynik uzyskali C a p s i i L e w i s (11), którzy ponadto spośród powstałych z cholesterolu produktów wyizolowali progesteron i wykazali, że związek ten ulega dalszym przekształceniom do kardenolidów.

Z przytoczonych powyżej prac wynika, iż rola pregnenolonu w biosyntezie kardenolidów może być analogiczna do dobrze już poznanej roli pregnenolonu w biosyntezie zwierzęcych hormonów sterydowych (21, 35, 62, 64). Wiadomo, że u zwierząt przejście pregnenolonu w progesteron przebiega na drodze utlenienia grupy 3 β -hydroksylowej do 3-ketonowej i izomeryzacji podwójnego wiązania Δ^5 do Δ^4 . W celu sprawdzenia czy u roślin uwodorowanie pierścienia B pregnenolonu zachodzi w podobny sposób, C a s p i i H o r n b y (10) podawali młodym roślinom *D. lanata* podwójnie znakowany trytem i ¹⁴C 3 α ³H, 4 ¹⁴C-pregnenolon. Wyizolowany progesteron oraz wszystkie kardenolidy były znakowane węglem ¹⁴C w pozycji C-4, natomiast nie zawierały trytu. Utrata atomu ³H z pozycji 3 α wskazuje, że biosynteza kardenolidów musi zachodzić poprzez metabolit pośredni o grupie ketonowej w pozycji C-3, najprawdopodobniej progesteron.

Dalsze przemiany progesteronu w roślinach *Digitalis* badali B e n n e t t i wsp. (7), którzy po podaniu 4-¹⁴C-progesteronu stwierdzili, że

włącza się on do kardenolidów 10 razy lepiej niż pregnenolon, co potwierdziło poprzednie sugestie (11), iż jest on bliższym prekursorem omawianych związków niż pregnenolon. Ponadto autorzy wyizolowali inne produkty przemiany progesteronu. Były to 5α -pregnandion, 5β -pregnandion, 5α -pregnanolon oraz bardzo słabo znakowany 5β -pregnanolon. Nie wydaje się prawdopodobne, aby 5α -pochodne progesteronu były pośrednikami w biosyntezie kardenolidów, ponieważ te ostatnie zawierają przy atomie węgla C-5 atom wodoru o konfiguracji β . Znalezienie tych związków było więc niespodzianką, lecz ostatnio wykryto 5α -pregnandion i 5α -pregnanolon jako metabolity progesteronu w kulturach tkankowych różnych ga-



Schemat 2. Biosynteza 5β H-pregnanolonu z cholesterolu

tunków roślin, między innymi i *D. purpurea* (26, 29). Natomiast metabolitem w biosyntezie kardenolidów jest prawdopodobnie 5β -pregnandion, który ulega redukcji do 5β -pregnanolonu. Autorzy przypuszczają, że niezwykle mała radioaktywność 5β -pregnanolonu jest uwarunkowana bądź bardzo szybkim metabolizowaniem tego związku, bądź poprze-

działającym redukcję grupy ketonowej przy C-3 wprowadzeniem grupy hydroksylowej w pozycję C-14 szkieletu steroidowego. Podobne badania przeprowadzone nad biosyntezą kardenolidów występujących w *Strophanthus kombé*, a różniących się od kardenolidów roślin *Digitalis* dodatkowymi grupami tlenowymi w pozycji C-5 i C-19, wykazały, że ich prekursorami są zarówno pregnenolon jak i progesteron (53, 54). Co więcej, wykryto także i w tej roślinie 5 β -pregnandion, 5 β -pregnanolon oraz dodatkowo 5 β -hydroksypregnanolon. Wykrycie tego ostatniego związku jest zrozumiałe, ponieważ w *S. kombé* występuje 5 β -hydroksykardenolidy. Wydaje się prawdopodobne, że w tej roślinie pregnenolon ulega kolejnym przekształceniom poprzez 5 β -pregnandion, 5 β -pregnanolon do 5 β -hydroksypregnanolonu. Ostatnie przejście wskazuje, że wprowadzenie grupy 5 β -hydroksylowej następuje po redukcji podwójnego wiązania Δ^4 , a poprzedza wytworzenie pierścienia butenolidowego.

Interesujący jest fakt występowania w *S. kombé* 5 α -pregnandionu i 5 α -pregnanolonu. Okazało się, że te związki są przekształcane w produkt, który zidentyfikowano jako uzarigeninę — 5 α -kardenolid. (55). Uzarigenina występuje w niewielkich ilościach w *S. kombé* i bardzo rzadko w innych roślinach *Strophanthus* (43, 50). Tschesche i Snatzke (76) również znaleźli 5 α -pregnanolon i uzarigeninę w *Xysmalobium undulatum* i sugerowali biosyntetyczną zależność między nimi. Przez wiele lat z roślin wyodrębniano tylko 5 β -sterydy, obecnie coraz częściej są wykrywane 5 α -pochodne, jest więc prawdopodobne, że związki te występują powszechnie w świecie roślinnym w bardzo małych ilościach.

Na podstawie omówionych wyżej wyników ustalono kolejność przekształceń pierścienia steroidowego przedstawioną na schemacie 2.

3. Hydroksylacja szkieletu steroidowego

Po ustaleniu kolejnych etapów prowadzących do wytworzenia 5 β -pregnanolonu pozostało do wyjaśnienia czy grupy hydroksylowe zostają wprowadzone do steroidu C₂₁ przed, czy po wytworzeniu pierścienia butenolidowego oraz wyjaśnienie mechanizmu hydroksylacji. Szczególnie istotne jest wprowadzenie grupy 14 β -hydroksylowej, ponieważ występuje ona prawie we wszystkich znanych kardenolidach i bufadienolidach.

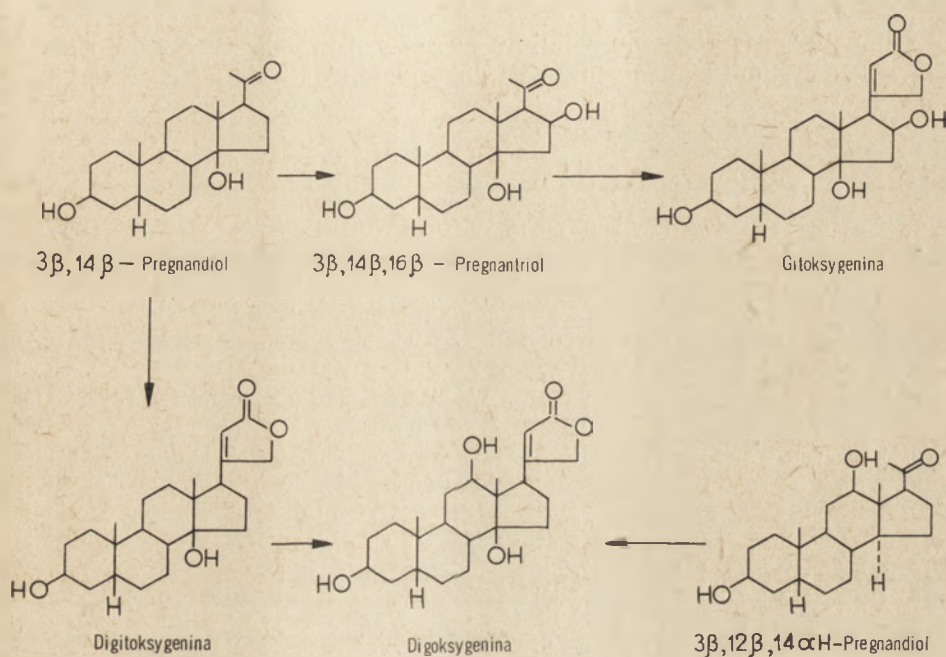
W 1968 roku wykazano, że rośliny *D. lanata* nie metabolizują dezoksykortykosteronu, który powinien być przekształcany w kardenolidy, gdyby najpierw był wytwarzany pierścień butenolidowy, a następnie wprowadzana grupa hydroksylowa (15). Wykazano również, iż Δ^5 , 14-dezoksy, 14 α H-digitoksygenina i 5 β , Δ^{14} -digitoksygenina nie są hydroksylowane przez rośliny *Digitalis* (74). Natomiast 3 β , 14 β -pregnandiol jest przekształcany *in vivo* w digitoksygeninę, i gigoksygeninę ditoksygeninę (67). W świetle tych wyników nie ulega wątpliwości, że hydroksylacji w pozycji

C-14 ulega steryd C_{21} i że reakcja ta poprzedza wytworzenie pierścienia butenolidowego.

Mechanizm tej reakcji nie jest dotychczas wyjaśniony. Jest to problem godny uwagi, ponieważ trzeciorzędowa grupa hydroksylowa kardenolidów przy węglu C-14 ma konfigurację β , natomiast prekursorzy tych związków: cholesterol, pregnenolon i progesteron zawierają w pozycji C-14 atom wodoru o konfiguracji α . Zmiana konfiguracji podstawnika trzeciorzędowego musi być związana ze zmianą konfiguracji pierścienia D szkieletu sterydowego. Obecnie wiadomo, że w czasie procesu hydroksylacji trzeciorzędowego atomu węgla wprowadzona grupa hydroksylowa przyjmuje stereochemię istniejącego poprzednio protonu (14, 16, 21, 22, 31, 47). W myśl tej reguły w wyniku hydroksylacji pochodnej pregnanu powstawałaby 14 α -hydroksypochodna. Związki tego typu występują wprawdzie w świecie roślinnym, jednak do tej pory z roślin syntetyzujących kardenolidy nie udało się wyodrębnić żadnej 14 α -hydroksypochodnej pregnanu (27, 45). Ponadto Caspi i Lewis (12) wykazali, że rośliny *D. lanata* nie metabolizują egzogenego 14 α -hydroksyprogesteronu. Wydaje się więc mało prawdopodobne, aby proces hydroksylacji przebiegał poprzez 14 α -hydroksyzwiązek. Ostatnio Tschesche i wsp. (72) podali roślinom *D. lanata* znakowany trytem w pozycji 16 i 17 5 β , Δ^{14} -pregnanolon, który jednak również nie był włączany do kardenolidów. Prawdopodobnie wprowadzenie grupy hydroksylowej w tym przypadku nie zachodzi poprzez wytworzenie przy hydroksylowym atomie węgla podwójnego wiązania, a następnie epoksydu, z którego po ataku protonu powstawałaby grupa hydroksylowa mająca inną konfigurację niż istniejący poprzednio proton. Wielu badaczy (12, 72, 74) jest zdania, że w roślinach *Digitalis* istnieje specyficzna 14 β -hydroksylaza wprowadzająca grupę hydroksylową bezpośrednio w pozycję 14 β -pochodnej progesterenu. Enzymu tego nie udało się do tej pory wyodrębnić. Byłby to mechanizm dotychczas nie spotykany, gdyż musiałby być związany z rozerwaniem wiązania C-C w pierścieniu D szkieletu sterydowego.

Po ustaleniu, że hydroksylacja przy atomie węgla C-14 zachodzi na poziomie C_{21} sterydu, należało wyjaśnić czy teraz kolejnym etapem jest wytworzenie pierścienia butenolidowego, a dopiero następnym wprowadzenie grup hydroksylowych w pozycję C-12 digoksygeniny lub C-16 gitoksygeniny, czy też kolejność tych reakcji jest odwrotna. Aby ustalić, która z tych dróg jest słuszna Tschesche i wsp. (67) śledzili przekształcenia 22- ^{14}C -digitoksygeniny. Ulegała ona utlenieniu do digoksygeniny, ale nie do gitoksygeniny, co wskazywało, że hydroksylacja w pozycji C-12 jest możliwa na etapie kardenolidów, natomiast wprowadzenie grupy hydroksylowej przy C-16 prawdopodobnie zachodzi na poziomie pregnanu. Do podobnego wniosku doszli ostatnio Varma i Caspi (79) po stwierdzeniu włączania 14 β , 16 β -hydroksyprogesteronu do gitoksygeniny w liściach *D. lanata*. Jednakże w innych pracach Tsches-

sche i wsp. (69, 70, 72) z jednej strony potwierdzili, iż hydroksylacja w pozycji C-12 zachodzi na poziomie kardenolidów, z drugiej strony wykazali możliwość hydroksylacji w pozycji C-14 na poziomie progesteronu po uprzednim wprowadzeniu grupy 12β -hydroksylowej. Fakt ten sugeruje istnienie dwóch różnych dróg powstawania digoksygeniny oraz wskazuje, że część enzymów biorących udział w biosyntezie kardenolidów nie jest ściśle specyficzna w stosunku do podstawników w części sterydowej (schemat 3). Natomiast wszystkie dane doświadczalne dotyczące hydroksylacji przy C-16 wskazują, że proces ten zachodzi tylko na poziomie metabolitu pośredniego C_{21} .



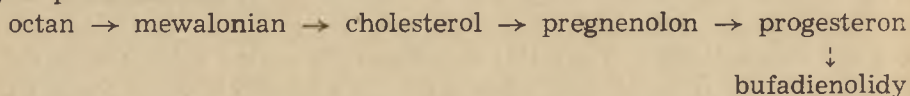
Schemat 3. Biogeneza digitoksygeniny, digoksygeniny i gitoksygeniny

II. Biosynteza bufadienolidów

Tschesche i Brassat (68) wykazali, że liście *Helleborus atro-rubens* metabolizują 3β -glikozyd pregnenolonu do helebryny — bufadienolidu występującego w tej roślinie. Z drugiej strony było wiadomo, iż bufadienolidy ropuchy *Bufo marinus* powstają z cholesterolu poprzez pochodną pregnanu, do której zostaje dobudowany pierścień kumalinowy w wyniku dołączenia dodatkowych trzech atomów węgla. Najprawdopodobniej substratem tej ostatniej reakcji jest kwas szczawiooctowy, z którego po utracie dwutlenku węgla i dwóch cząsteczek wody oraz laktoni-

zacji może powstać podwójnie nienasycony sześcioczłonowy pierścień kumalinowy (58, 68).

Biorąc pod uwagę przebieg biosyntezy bufadienolidów w organizmie zwierzęcym oraz biosyntezę kardenolidów, wielu badaczy (5, 11, 68) uważa, że bufadienolidy w świecie roślinnym powstają w wyniku następujących przekształceń:



Miejsce biosyntezy omawianych związków w tkankach roślinnych nie jest jeszcze dokładnie poznane. Stwierdzono jedynie, że kardenolidy i bufadienolidy powstają w liściach. Natomiast nie zaobserwowano syntezy kardenolidów w korzeniu, pomimo, że związki te tam występują; sugeruje to możliwość ich transportu z liści do korzeni (70).

LITERATURA

1. Bennett R. D., Heftmann E., *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 616 (1965).
2. Bennett R. D., Heftmann E., *Phytochemistry* **4**, 475 (1965).
3. Bennett R. D., Heftmann E., *Phytochemistry* **4**, 577 (1965).
4. Bennett R. D., Heftmann E., *Phytochemistry* **5**, 747 (1966).
5. Bennett R. D., Heftmann E., Shui-Tze Ko., *Phytochemistry* **5**, 517 (1966).
6. Bennett R. D., Heftmann E., Winter B. J., *Phytochemistry* **8**, 2325 (1969).
7. Bennett R. D., Sauer H. H., Heftmann E., *Phytochemistry* **7**, 41 (1968).
8. Bocher J., Duperon R., *Séances Compt. Rend. Soc. Biol.* **157**, 2268 (1963).
9. Brown B. T., Stafford A., Wright S. E., *Brit. J. Pharmacol.* **18**, 311 (1966).
10. Caspi E., Hornby G. M., *Phytochemistry* **7**, 423 (1968).
11. Caspi E., Lewis D. O., *Science* **156**, 519 (1967).
12. Caspi E., Lewis D. O., *Phytochemistry* **7**, 683 (1968).
13. Caspi E., Lewis D. O., Piatak D. M., Thimann K. V., Winter A., *Experientia* **22**, 506 (1966).
14. Caspi E., Ramm P. J., Gain R. E., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 4012 (1969).
15. Caspi E., Wickramasinghe J. A. F., Lewis D. O., *Biochem. J.* **108**, 499 (1968).
16. Charney W., Herzog H. L., *Microbiol Transformations of Steroids*, Academic Press, New York 1967.
17. Chen K. K., *J. Med. Pharm. Chem.* **3**, 111 (1961).
18. Chen K. K., *Arch. Intern. Pharmacodyn.* **140**, 8 (1962).
19. Chen K. K., Huskins R. H., *Canadian J. Chem.* **41**, 1647 (1963).
20. Devys M., Barbier M., *Compt. Rend.* **261**, 4901 (1965).
21. Dorfmann R. I., Ungar F., w *Metabolism of Steroids Hormones*, Academic Press, New York 1965, str. 123.
22. Dorfmann R. I., Yamasaki K., Dorfmann M., *Biogenesis and Action of Steroids Hormones*, Geron-X, California 1968, str. 126, 132, 140, 205, 252, 309.
23. Euw J. v., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **47**, 711 (1964). (1962).
24. Foerster W., *Arch. Intern. Pharmacodyn.* **148**, 334 (1964).
25. Frantz I. D., Schroepfer G. J. jun., *Annual Rev. Biochem.* **36**, 691 (1967).

26. Furuya T., Hirotsani M., Kawaguchi K., *Phytochemistry* **10**, 1013 (1971).
27. Galbraith M. N. Horn D. H. S., *Chem. Comm.* str. 905 (1966).
28. Gawienowski A. M., Gibbs C. C., *Phytochemistry* **8**, 2317 (1969).
29. Graves J. M. H., Smith W. K., *Nature* **214**, 1248 (1967).
30. Gros E. G., Leete E., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3479 (1965).
31. Hayano M., w Oxygenases, red. O. Hayaishi, Academic Press, New York 1962, str. 182.
32. Heftmann E., *Annual Rev. Plant. Physiol.* **14**, 225 (1963).
33. Heftmann E., *Lloydia* **30**, 209 (1967).
34. Heftmann E., *Lloydia* **31**, 293 (1968).
35. Heftman E., Mosettig E., *Biochemistry of Steroids*, Reinhold New York 1966.
36. Henderson F. G., Chen K. K., *J. Med. Chem.* **8**, 577 (1965).
37. Hoch J. H., w A Survey of Cardiac Glucosides and Genins, University of South Carolina Press, South Carolina USA 1961.
38. Jacobson G. M., Frey M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3338 (1967).
39. Johnson D. F., Bennett R. D., Heftmann E., *Science* **140**, 198 (1963).
40. Johnson D. F., Bennett R. D., Heftmann E., *Phytochemistry* **5**, 231 (1966).
41. Leete E., Gregory H., Gros E. G. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3475 (1965).
42. Libizow N. I., Gubanow A., *Farmatsiya (Moskwa)* **16**, 29 (1967).
43. Lichti H., Tamm C., Reischstein T., *Helv. Chim. Acta* **39**, 1933 (1965).
44. Linde H., Ergenc N., Meyer K., *Helv. Chim. Acta* **49**, 1246 (1966).
45. Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S., Chang M. L., Hsu H. Y., *Chem. Comm.* str. 915 (1966).
46. Popjak G., Cornforth J. W., *Advan. Enzymol.* **22**, 281 (1960).
47. Ramm P. J., Caspi E., *J. Biol. Chem.* **244**, 6064 (1969).
48. Ramstad E., Beal J. L., *Chem. Ind. (London)* 177 (1960).
49. Reichstein T., *Naturwissenschaften* **54**, 53 (1967).
50. Russell J. H., Schindler O., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **44**, 1315 (1961).
51. Sauer H.H., Bennett R. D., Heftmann E., *Naturwissenschaften* **54**, 226 (1967).
52. Sauer H. H., Bennett R. D., Heftmann E. *Phytochemistry* **6**, 1521 (1967).
53. Sauer H. H., Bennett R. D., Heftmann E., *Phytochemistry* **7**, 1543 (1968).
54. Sauer H. H., Bennett R. D., Heftmann E., *Phytochemistry* **8**, 69 (1969).
55. Sauer H. H., Bennett R. D., Heftmann E., *Phytochemistry* **8**, 839 (1969).
56. Schubert K., Rose G., Tummler R., Ikewara N., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **339**, 293 (1964).
57. Singh B., Rastogi R. P., *Phytochemistry* **9**, 315 (1970).
58. Sipertein M. D., Murray A. W., Titus E., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 154 (1957).
59. Staple E., w Biogenesis of Natural Compounds, red. P. Bernfeld, Pergamon Press Inc. New York 1963, str. 155.
60. Takeda K., Minato H., Shimaoka A., *Chem. Comm.* **2**, 104 (1968).
61. Takeda K., Shimaoka A., Iwasaki M., Minato H., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **13**, 691 (1965).
62. Talaley P., *Physiol. Rev.* **37**, 362 (1957).
63. Tamm Ch., *Fortscher. Chem. Org. Naturstoffe* **13**, 137 (1956).
64. Tomkins G. M., *Recent Progr. Hormone Res.* **12**, 125 (1956).
65. Tschesche R., *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **12**, 131 (1955).

66. Tschesche R., *Angew. Chem.* **73**, 727 (1961).
67. Tschesche R., Becker P., Hombach R., *Z. Naturforsch. Ser. B*, **23** 1615 (1968).
68. Tschesche R., Brassat B., *Z. Naturforsch. Ser. B*, **20**, 707 (1965).
69. Tschesche R., Brassat B., *Z. Naturforsch. Ser. B* **21**, 894 (1966).
70. Tschesche R., Brassat B., *Z. Naturforsch. Ser. B* **22**, 679 (1967).
71. Tschesche R., Fritz R., Josst G., *Phytochemistry* **9**, 371 (1970).
72. Tschesche R., Hombach R., Scholten H., Peters M., *Phytochemistry* **9**, 1505 (1970).
73. Tschesche R., Hulpke H., *Z. Naturforsch. Ser. B* **21**, 494 (1966).
74. Tschesche R., Hulpke H., Sholten H., *Z. Naturforsch. Ser. B* **22**, 677 (1967).
75. Tschesche R., Lilienweiss G., *Z. Naturforsch. Ser. B* **19**, 266 (1964).
76. Tschesche R., Snatzke G., *Ann. Chem.* **636**, 105 (1960).
77. Tsuda K., Akagi S., Kishida Y., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **6**, 101 (1958).
78. Turowska G., *Post. Biochem.*
79. Varma K. R., Caspi E., *Phytochemistry* **9**, 1539 (1970).
80. Wickramasinghe J. A. F., Burrows E. P., Sharma R. K., Greig J. B., Caspi E., *Phytochemistry* **8**, 1433 (1969).
81. Wickramasinghe J. A. F., Hirsch P. C., Munavalli S. M., Caspi E., *Biochemistry* **7**, 3248 (1968).
82. Willuhn G., *Pharm. Z.* **110**, 96 (1965).
83. Wilson J. W., w *Medicinal Chemistry*, red. A. Burgen, Interscience New York 1960, str. 626.

JANINA OPIEŃSKA-BLAUTH *

Kwasy aminomasłowe

Aminobutyric Acids

The aspects of different chemical and biological properties of some aminobutyric acids with particular regard on γ -aminobutyric acid are reviewed and discussed.

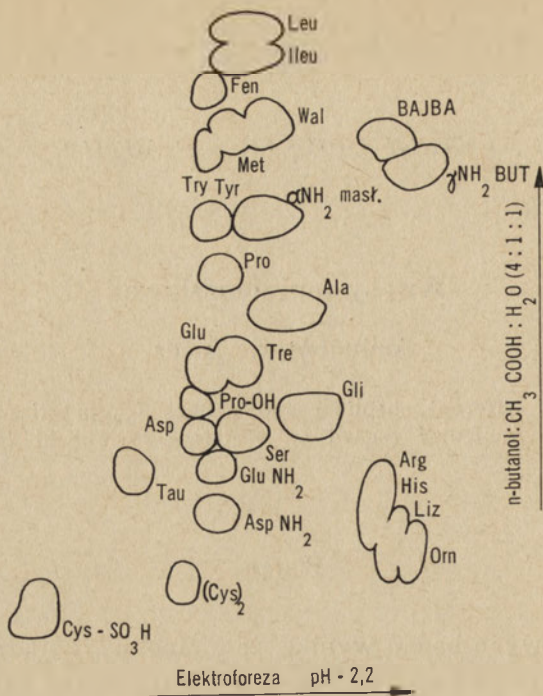
Wstęp

Z dotychczasowych badań wynika, że aminokwasy masłowe nie wchodzi w skład białek. Znane są natomiast nieliczne wolne peptydy zawierające kwasy aminomasłowe, wśród nich otrzymany syntetycznie, cykliczny dekapeptyd, w skład którego wchodzi kwas dwuaminomasłowy (1a). W tkankach zwierzęcych, roślinnych i u bakterii występują kwasy aminomasłowe wolne lub związane w połączeniach kompleksowych. Zalicza się je do aminokwasów endogennych. Powstają one w przemianach niektórych aminokwasów, głównie kwasu glutaminowego i asparaginowego, metioniny i treoniny a także w przemianie zasad pirymidynowych. Niektóre z kwasów aminomasłowych gromadzą się w tkankach bądź w warunkach fizjologicznych, bądź patologicznych.

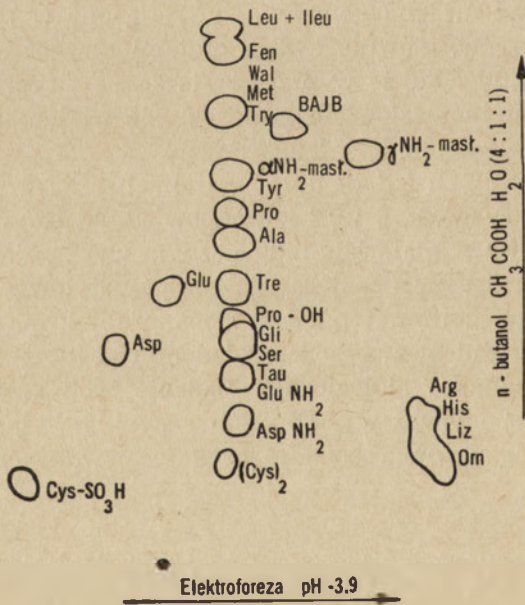
Do najlepiej znanych i dokładniej opisanych zalicza się trzy izomery kwasu aminomasłowego, α , β i γ i ich odpowiedniki izo z łańcuchem rozgałęzionym. Ponadto w materiale biologicznym występują też kwasy aminomasłowe zawierające grupę hydroksylową, metylową lub drugą grupę aminową. Mimo zbliżonej budowy chemicznej kwasy aminomasłowe stanowią grupę zróżnicowaną pod względem biosyntezy, szlaków metabolicznych i aktywności biologicznej. Badanie tych związków jest kłopotliwe i trudne, ponieważ występują one zwykle w małych stężeniach w materiale biologicznym a ponadto brak jest swoistych reakcji rozpoznawczych.

* Prof. dr., Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Lublin

Wykaz stosowanych skrótów: GABA — kwas γ -aminomasłowy, BAIBA — kwas β -aminoizomasłowy, T-GABA — aminotransferaza GABA:2-oksoglutaran, GAD — dekarboksylaza glutaminianowa, DANS — dwumetylonaftalenosulfochlorek.



Rys. 1. Elektrochromatogram aminokwasów pH 2,2 (47)



Rys. 2. Elektrochromatogram aminokwasów pH 3,9 (47)

W naszych badaniach aminoacyduryi fizjologicznej i patologicznej wykrywaliśmy w moczu niejednokrotnie kwasy β -aminoizomasłowy, oraz α - a nawet γ -aminomasłowy (48, 49, 50, 51). Dobry rozdział umożliwiający identyfikację i oznaczenie ilościowe tych trzech kwasów aminomasłowych uzyskaliśmy metodą elektrochromatografii bibułowej Fischla i Segala (21) wg naszej modyfikacji (47). Wyniki ilustrują rysunki 1 i 2. Metoda ta może być stosowana do badania moczu i surowicy.

Oznaczenia ilościowe przeprowadzano w eluatach z plam zawierających 2—10 μ g kwasów α - i γ -masłowego, a 4—20 μ g kwasu β -aminoizomasłowego, przy czym straty przy elucji nie przekraczały 2,5% w mieszaninach wzorcowych a 5—10% w moczu. Najwięcej informacji zebrano dotąd o kwasie γ -aminomasłowym. Ten fakt, jak również aktywność biologiczna tego związku jako inhibitora w przenoszeniu bodźców w centralnym układzie nerwowym, sprawiają, że poświęcamy mu pierwszy i najobszerniejszy rozdział niniejszego artykułu.

I. Kwas γ -aminomasłowy

Aktywność biologiczna kwasu γ -aminomasłowego (GABA od ang. *gamma-aminobutyric acid*) została dość dobrze zbadana. O jego roli w przenoszeniu bodźców w centralnym układzie nerwowym można znaleźć wiele prac głównie w czasopismach farmakologicznych i fizjologicznych. Na uwagę czytelników zasługują szczególnie liczne prace Roberta i wsp. (54—67), a zwłaszcza artykuły przeglądowe (16, 57, 67, 80). W piśmiennictwie polskim zalecić można świetny, wyczerpujący artykuł przeglądowy Sierosławskiej (76).

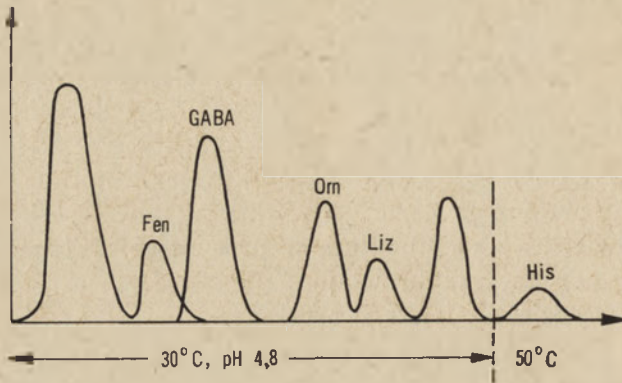
1. Występowanie

Kwas γ -aminomasłowy występuje przeważnie w ilościach śladowych w pleśniach, drożdżach, grzybach, bakteriach i w roślinach wyższych. W większości tkanek i narządów zwierzęcych (wątroba, trzustka, ślina, sok żołądkowy) zawartość GABA nie przekracza 8 μ g/g tkanki. Na ogół nie znajdowano go ani w moczu ani w krwi, ostatnio jednak stwierdzono jego obecność w erytrocytach ryb (24, 25). W większych stężeniach występuje GABA tylko w mózgu. W różnych obszarach mózgowych znajdowano go w ilości około 400—600 μ g/g tkanki. W próbkach mózgu zamrożonych w płynnym azocie znajdowano mniejsze ilości GABA niż w niezamrożonych (10a).

2. Metody oznaczania

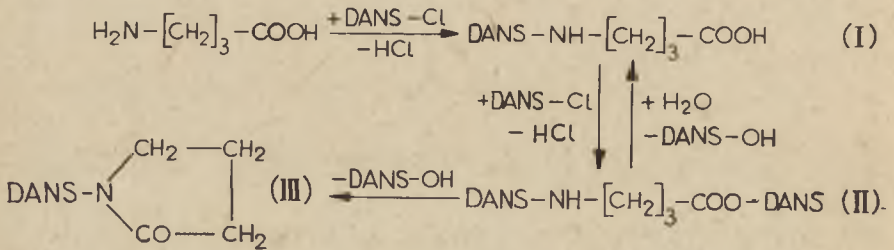
Do rozdzielenia GABA od innych aminokwasów i do jego oznaczeń ilościowych i półilościowych stosowano najczęściej metody chromatograficzne: chromatografię bibułową, elektroforezę, elektrochromatografię,

oraz chromatografię kolumnową jonowymienną. Modyfikując metodę Spackmana, Steina i Moora (79) uzyskano (41) dobry rozdział GABA od innych aminokwasów, a zwłaszcza rozsuniecie szczytów GABA i ornityny (rysunek 3) (41, 92).



Rys. 3. Rozdział aminokwasów zasadowych i GABA (79)

Do oznaczeń aktywności biologicznej GABA stosuje się najczęściej metodę z receptorem neuronowym, wypreparowanym z segmentów brzusznych mięśni skorupiaków (ang. *stretch receptor neuron*) (15). Dokładny opis i ocenę swoistości tej metody znaleźć można u Sierosławskiej



Schemat 1. DANS pochodne GABA (71)

DANS — dwumetylnaftalenosulfochlorek

(76). Wspomniany receptor niewrażliwy na acetylocholinę i serotoninę, reaguje na pikrotoksynę, a pod wpływem GABA przestaje reagować na podniecie rozciągania. Podobnie jak GABA działają niektóre inne rzadziej spotykane aminokwasy, np. kwas β -hydrokso- γ -aminomasłowy, β -alani-na, γ -butyrylocholina. Do metody biologicznej zastosowano też technikę autoradiografii. Znaczony GABA łączy się bowiem z receptorem w czasie krótkiej inkubacji w temperaturze 0—4°C a połączenie to ulega następnie rozpadowi w temperaturze pokojowej. Rola GABA w przenoszeniu podniet u skorupiaków nie jest jasna, a wyniki badań Floreya (22, 23) i Krawitza i wsp. (34, 35) w tej dziedzinie są kontrowersyjne. Do

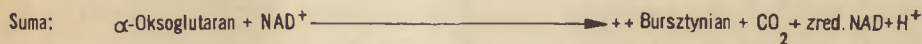
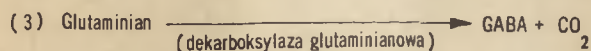
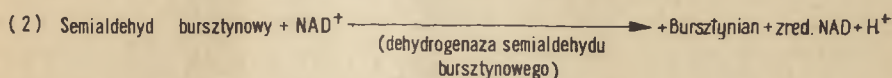
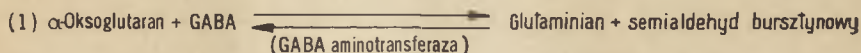
ilościowych oznaczeń GABA w mózgu pożyteczna okazała się metoda spektrofotometryczna Baxtera i Roberta (5), w której stosuje się dekarboksylazę glutaminową pochodzenia bakteryjnego. Małe ilości GABA w tkankach zwierzęcych można oznaczać wg Seilera i Wiechmana (71) działając dwumetylonafthalenosulfochlorkiem (DANS). Produkt reakcji DANSylo- γ -butyrylolaktam (schemat 1) daje pomarańczową fluorescencję.

Ponadto do identyfikacji GABA w mózgu stosuje się metodę Udenfrienda (84) opartą na oznaczeniach pochodnych pipsylowych (^{35}S).

3. Biosynteza i metabolizm

Według pierwotnych poglądów Roberta GABA powstaje wyłącznie w szarej substancji mózgowej podczas nieodwracalnej reakcji dekarboksylacji kwasu glutaminowego, w której koenzymem jest fosforan pirydoksalu. W próbach z nieoczyszczonymi a następnie również z oczyszczonymi preparatami z mózgow zwierzęcych stwierdzono bowiem wzrost stężenia GABA po dodaniu kwasu glutaminowego.

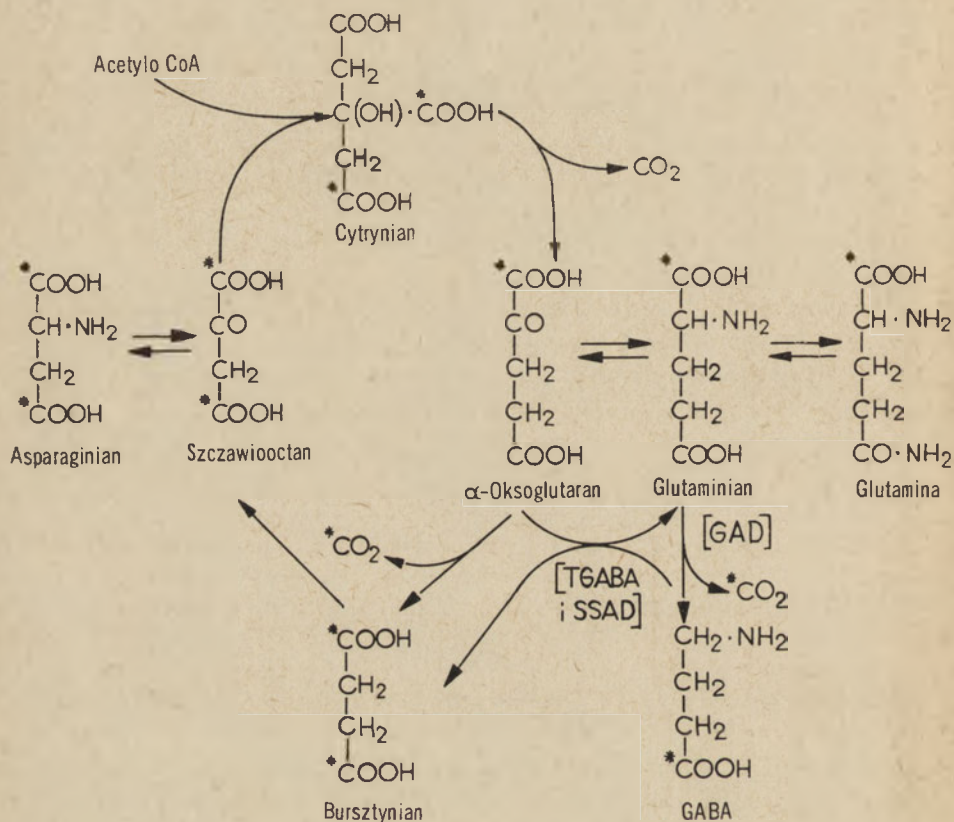
Obok tej dekarboksylacji w mózgu przebiegają dwie inne reakcje enzymatyczne związane z przemianą GABA (schemat 2). Aminotransferaza



Schemat 2. Metabolizm kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w centralnym układzie nerwowym wg (2)

GABA-kwas α -ketoglutarowy (T-GABA), której koenzymem jest również fosforan pirydoksalu, katalizuje reakcję prowadzącą do powstawania semialdehydu bursztynowego i kwasu glutaminowego. Reakcja ta jest odwracalna i przy dostatecznym stężeniu semialdehydu możliwa jest częściowa regeneracja GABA. Semialdehyd bursztynowy w obecności swoistej dehydrogenazy utlenia się do kwasu bursztynowego włączającego się w cykl Krebsa. Dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD), aminotransferaza GABA- α -ketoglutaran (T-GABA) i dehydrogenaza semial-

dehydu bursztynowego stanowią zespół enzymatyczny regulujący gospodarkę GABA w centralnym układzie nerwowym. W wyniku transaminacji obok kwasu glutaminowego, głównego substratu biosyntezy GABA, tworzy się też glutamina, stanowiąca jakby materiał zapasowy dla GABA i zaliczana do ważnych czynników regulacyjnych aktywności mózgu (86). Ponadto również kwas hydroksyglutaminowy ulega przemianie do GABA. Biosyntezę i metabolizm GABA przedstawia schemat 3.



Schemat 3. Biosynteza i metabolizm kwasu γ -aminomasłowego (GABA)

T-GABA — aminotransferaza kwasu γ -aminomasłowego α -ketoglutaran, GAD — dekarboksylaza glutaminianowa, SSAD — dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego

Badania porównawcze przeprowadzane w mózгах różnych zwierząt wykazały największą aktywność GAD u myszy i szczurów a najmniejszą u małp. Stwierdzono też liniową zależność między aktywnością tego enzymu a zawartością GABA w mózgu. Zdaniem Robertsa i wsp. stałość stężenia GABA w mózgu uwarunkowana jest wyłącznie aktywnością GAD. Bezpośredni bowiem produkt reakcji transaminacji semialdehyd bursztynowy szybko utlenia się i to nie tylko pod wpływem dehydrogenazy, ale również na drodze fosforylacji oksydacyjnej, tak że odwrócenie

tej reakcji w kierunku powstawania GABA jest *in vivo* mało prawdopodobne. Różnice w zawartości GABA w różnych obszarach mózgowych powodowane są prawdopodobnie ograniczeniami przenikania substratów i enzymów przez bariery błon.

Dekarboksylazę kwasu glutaminowego (GAD) w stanie oczyszczonym po raz pierwszy otrzymano z bakterii. Enzym z *E. coli* w 90% homogeny, o masie cząsteczkowej około 300 000 wykazywał optimum w *pH* 3,8, a stała Michaelisa dla glutaminianu wynosiła $8,2 \times 10^{-4}$ M w buforze o *pH* 6,4. Koenzymem był fosforan pirydoksalu, jony Cl^- działały aktywnie a jony octanowe hamująco (73, 74, 75). Oczyszczone dziesięciokrotnie preparaty GAD z mózgów cieląt różniły się znacznie od enzymu bakteryjnego. Masa cząsteczkowa enzymu z mózgu wynosiła około 100 000, stała Michaelisa dla glutaminianu — 5×10^{-3} M przy *pH* 6,5, a optimum *pH* leżało w granicach od 6,4 dla preparatu surowego do 7,2 dla preparatu oczyszczonego. Ponadto jony Cl^- (0,1N) hamowały aktywność enzymu. Aktywatorem był koenzym fosforan pirydoksalu. Dodatek GABA nie miał wpływu na GAD z mózgu (31). Z mózgów myszy otrzymano preparat GAD o aktywności właściwej 68,6 przy stopniu oczyszczenia 158 (81).

Tablica 1

Aktywność dekarboksylazy glutaminowej (GAD) w nerkach ssaków wg (89)

Ustrój	GABA $\mu\text{M/g}$	Aktywność GAD $\mu\text{M CO}_2/100 \text{ mg}$	Aktywność GAD nerki/mózg $\times 100$
Człowiek	0,440	0,076	
Szczur	0,037	0,144	17,1
Mysz	0,033	0,096	7,4
Świnka morska	0,078	0,056	5,3

Whelan, Scriver i Mohynden (89) przeprowadzili interesujące badania nad zależnością między aktywnością GAD a stężeniem GABA w nerkach u ssaków (tablica 1). Zdaniem tych autorów obecność GABA w nerkach jest związana z odchyleniami od fizjologicznej oksydatywnej przemiany kwasu glutaminowego.

Aminotransferazę GABA-kwas α -ketoglutarowy (T-GABA) wyosobniono z mózgów myszy. Oczyszczony homogeny preparat wykazywał optimum działania przy *pH* 7,95 (88). Fosforan pirydoksalu, który jest koenzymem zarówno dla GAD jak i dla T-GABA, wykazuje jednak znacznie większe powinowactwo do aminotransferazy, to też przy przygotowywaniu proszków acetonowych z mózgu jako źródła obu enzymów koenzym szybciej i łatwiej odszczepia się od GAD (3, 4, 5, 7). Wyraźną odwracalność reakcji transaminacji katalizowanej przez T-GABA stwierdzono w mózgach królików i cieląt, nieznaczną w wątrobie i brak jej w nerkach. Na uwagę zasługują badania porównawcze nad aktywnością GAD i T-GABA u zwierząt w czasie wzrostu. W płatach wzrokowych kurczą

aktywność obu enzymów wzrastała z wiekiem (78). W siatkówkach szczurów podczas całego okresu wzrostu aktywność GAD była niska a normalny poziom ustalał się dopiero po 30 dniach od urodzenia, czyli w okresie pełnej dojrzałości. Natomiast aktywność T-GABA wzrastała liniowo z wiekiem osiągając wartości normalne po 45 dniach od urodzenia (39).

4. GABA i jego pochodne w tkankach układu nerwowego

Zdaniem większości autorów GABA w mózgu występuje tylko w szarej substancji, niektórzy wspominają jednak o wykrywaniu nieznacznych ilości tego związku również w substancji białej. Singh i Malhotra (77) oraz Hilde i wsp. (30) wykazali różnice w stężeniach GABA w różnych obszarach mózgu. Według Singha i Malhotra (77) zawartość GABA w mg/100 g suchej tkanki mózgu małpy wynosi w płacie czołowym $79,47 \pm 15,73$, w płacie „temporal” — $96,5 \pm 14,84$, w jądrze migdałowatym $87,62 \pm 18,75$, w „hippocampus” $85,54 \pm 9,12$, w podwzgórzu $10,12$, a w mózdzku $84,47 \pm 13,01$.

W płynie mózgowo-rdzeniowym wśród zwykle wykrywanych 16—18 aminokwasów występuje kwas α -aminomasłowy. Obecność GABA natomiast stwierdzono tylko w niektórych płynach i to przy objętościach badanej próbki powyżej 25 ml (8, 36, 42, 42a). Wyników tych nie konfrontowano ze schorzeniami w centralnym układzie nerwowym. Zainteresowanie budzi często wykrywany kwas α -aminomasłowy, którego przemiana nie wiąże się z kwasem glutaminowym.

Niekiedy w mózgach wykrywa się kwas β -hydroksy- γ -aminomasłowy (46, 72), który powstaje na drodze β -oksydacji GABA lub z hydroksyproliny, a także drogą dekarboksylacji kwasu β -hydroksyglutaminowego. Ta β -hydroksy pochodna GABA znajdująca także w nerkach i mięśniach ssaków, bierze udział w syntezie homokarnozyny mięśni zastępując β -alaninę lub histydynę (1). Znane są 4 izomery kwasu β -hydroksy- γ -aminomasłowego, dwa o budowie cyklicznej i dwa łańcuchowe. Na drodze transamidacji z arginą powstaje z GABA kwas guanidynomasłowy o cechach biologicznych zbliżonych do GABA. Z mózgow bydlęcych wyizolowano ponadto butyrylohistydynę, związek o charakterze peptydu (52). Ostatnio zaś zidentyfikowano w mózgu (43) oraz oczyszczono (37) N- γ -aminobutyrylo/lizynę rozkładaną przez peptydazę. Wszystkie wymienione pochodne wykazują znacznie słabszą aktywność niż GABA.

5. Transport GABA w tkance nerwowej i bariera mózgowa

Swobodną wędrówkę aminokwasów na zewnątrz i do wewnątrz tkanki nerwowej limituje bariera mózgowa. Istotę i funkcjonowanie tej bariery opisał Laitha (38). Histologicznie określa się barierę mózgową

jako zestaw różnych elementów obejmujący śródbłonek naczyń włosowatych, śródbłonek spłotów naczyniowych w bocznych komorach mózgu i elementy glejowe. Bariera utrzymuje stały skład substancji w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym, przy czym granice przepuszczalności dla poszczególnych aminokwasów są różne. Laitha zakłada istnienie 3 rodzajów barier rozdzielających: krew-mózg, krew-płyn mózgowo-rdzeniowy i mózg-płyn mózgowo-rdzeniowy. Przepływ poszczególnych związków z mózgu do krwi i odwrotnie jest limitowany błonami o różnych strukturach zdefiniowanych anatomicznie i histologicznie. Niektóre substancje migrują bezpośrednio z mózgu do krwi i odwrotnie, inne natomiast za pośrednictwem płynu mózgowo-rdzeniowego.

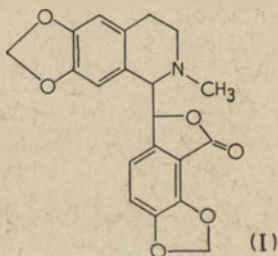
Przepuszczalność bariery mózgowej dla kwasu glutaminowego, glutaminy i GABA wydaje się istotna z uwagi na rolę tych związków w mózgu. *In vitro* w skrawkach mózgu inkubowanych w medium zawierającym oprócz soli glukozę i kwas glutaminowy stwierdzono kumulację GABA niezgodną z gradientem stężeń. Powodowała ona równoważną migrację jonów K^+ . W doświadczeniach *in vivo* nie stwierdzono tego zjawiska, ponieważ bariera mózgowa regulowała migrację potasu. Zwyczajka stężenia kwasu glutaminowego lub proliny w krwi nie powodowała zwiększenia jego stężenia w mózgu (bariera krew-mózg). Zakłada się możliwość 3 wariantów dla transportu kwasu glutaminowego: bierna dyfuzja, aktywny transport lub wymienna dyfuzja. *In vitro* stwierdzano aktywny transport GABA do mózgu połączony z chemicznym wiązaniem fosfolipidów. Dane o barierze mózgowej są na razie fragmentaryczne. U zwierząt młodocianych w okresie wzrostowym bariera mózgowa nie działa wcale lub wykazuje nikłą aktywność. Pełną jej aktywność uzyskują dopiero zwierzęta dojrzałe. Laitha uważa, że układy regulujące w barierze mózgowej mają charakter dynamiczny tzn. podlegają zmianom stosownie do procesów regulujących biosyntezę i metabolizm. Na aktywność bariery mózgowej w warunkach fizjologicznych wpływają naturalne inhibitory a w patologicznych różne czynniki uszkodzające strukturę komórkową, a ponadto niektóre leki.

6. Inhibitory w biosyntezie i metabolizmie GABA

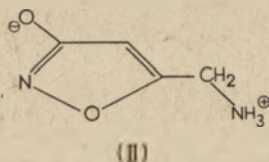
Z punktu widzenia farmakologów i neurofizjologów szczególnie interesująca jest możliwość regulacji *in vivo* stężenia GABA w poszczególnych obszarach mózgowych przez podawanie leków, które hamują bądź aktywują biosyntezę i przemiany tego związku (16). Z osiągnięć z lat ostatnich wymienić należy doświadczenia z ^{14}C -tiosemikarbazydem, silnym inhibitorem biosyntezy GABA, zastosowanym do badań lokalizacji GABA w różnych obszarach mózgu zarówno tych, które wykazują wysoką aktywność, jak i tych, które jej nie mają (11, 82). Wykorzystano też fakt, że tiosemikarbazyd hamując GAD eliminuje kwas glutaminowy jako sub-

strat w biosyntezie GABA i wykazano *in vivo*, że w takich warunkach źródłem GABA mogą być putrescyna i ornityna (70). Stwierdzono też, że metioninosulfoksymina (MSI) w dawkach 400—800mg/kg wywołuje u szczurów silne drgawki utrzymujące się przez pewien czas nawet po zabiciu zwierzęcia. MSI uważana jest za silny inhibitor dekarboksylazy kwasu glutaminowego (80, 80a). Inhibitorami aminotransferazy GABA α -ketoglutaran okazały się związki zbliżone budową do kwasu asparagino-owego, np. kwas aminoszczawiooctowy, który obniża aktywność enzymu do 50%. W obecności tych inhibitorów wzrastało w mózgu stężenie GABA bez równoczesnego obniżenia stężenia kwasu glutaminowego.

Zawartość GABA w mózgu zależy od natlenienia organizmu. W hyperoksji stwierdzano obniżenie a w hypoksji podwyższenie zawartości GABA wolnego i związanego, a ponadto stosunek ilościowy GABA wolnego do związanego zależał od zawartości tlenu w atmosferze, w której przebywały zwierzęta przy hyperoksji występowały u zwierząt drgawki a przy hypoksji objawy dyskoordynacji w mięśniach (91). *In vitro* w skrawkach kory mózgowej inkubowanych w medium zawierającym GABA wprowadzenie jonów potasu wywoływało gwałtowny i znaczny spadek zawartości GABA. Efekt ten nie występował po wprowadzeniu równoważnych ilości jonów sodu (40). Podobnie zachowują się i inne przenośniki w centralnym układzie nerwowym jak acetylocholina lub aminy



Wzór I. Bikucullina (12)



Wzór II. Muscimol (33)

katecholowe. Interesujące doświadczenia Curtisa i wsp. (12) z alkaloidem ftalidoizochinolinowym bikuculiną (wzór I), która blokuje efekt inhibitorowy GABA pozwoliły stwierdzić, że GABA jest prawdopodobnie najważniejszym jeżeli nie jedynym naturalnym inhibitorem w central-

nym układzie nerwowym, co potwierdziło dawniejsze przypuszczenia wysuwane przez *Roberts*a (57).

Oprócz GABA również glicyna wykazuje właściwości inhibitora, jednak nie w mózgu a w rdzeniu kręgowym i to tylko u niektórych gatunków zwierząt (12). Ostatnio przypisuje się własności inhibitorowe w przenoszeniu impulsów nerwowych także niektórym związkom otrzymanyim z grzybów. Jeden z nich muscimol (wzór II), zalicza się do betain izoksyazolowych (32, 33).

7. Neuronowa aktywność GABA

Dane źródłowe o neuronowej aktywności GABA opublikowane do 1960 roku podsumowuje *Roberts* (16) w XVI rozdziale zbiorowego wydawnictwa *Neurochemistry*. *Sierosławska* (76) w swej pracy przeglądowej uwzględniającej piśmiennictwo do 1963 roku dochodzi do następujących konkluzji: wprawdzie dotychczasowe badania nad przenoszeniem podnieć w centralnym układzie nerwowym nasuwają przypuszczenia, że GABA jest głównym a może i jedynym naturalnym inhibitorem, ale brak na to pełnego materiału dowodowego. Przypuszcza się, że GABA spełnia swoją rolę czynnika uspokajającego (trankwilizera) nie tylko pod postacią pierwotnej łańcuchowej formy ale i w postaci pochodnych cyklicznych laktamowej lub laktonowej. Związki o typie struktury GABA łatwo ulegają cyklizacji i powstawanie w ustroju form cyklicznych jest bardzo prawdopodobne. GABA wbrew pierwotnym poglądom może w pewnych warunkach u niektórych gatunków zwierząt przenikać przez barierę mózgową być może pod postacią laktamową.

Następne lata przyniosły sporo publikacji uzupełniających nasze wiadomości w tej dziedzinie. Niektóre z nich omówiono w poprzednim rozdziale. Tu warto przytoczyć, za artykułem redakcyjnym w *Nature* (44) zarys współczesnych poglądów na antagonistyczną rolę GABA w centralnym układzie nerwowym.

Przenoszenie bodźców elektrycznych z jednego neuronu na drugi w synapsach wiąże się z uwalnianiem przekaźnika (transmittera). Uwolniony we włóknie przedsynapsowym przekaźnik chemiczny rozprzestrzenia się wzdłuż synaptycznej szpary oddzielającej neurony, reagując ze specjalnym receptorem na powierzchni neuronu już poza synapsą. Przenośnik może albo pobudzać neurony już poza synapsą do aktywności, albo hamować zdolność neuronów do reakcji na następne pobudzenia. Inhibitory przewodnictwa w neuronach odgrywają decydującą rolę w przetwarzaniu informacji w centralnym układzie nerwowym. Ciągłe bowiem, wzajemne oddziaływanie czynników hamujących i pobudzających determinuje aktywność pojedynczych neuronów.

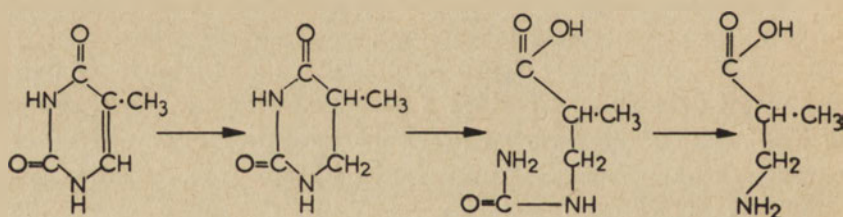
Nie wszystkie przekaźniki czynne w ustroju zwierzęcym zostały ziden-

tyfikowane. Głównym ale nie jedynym przenośnikiem o charakterze inhibitora (depresorem) jest prawdopodobnie GABA.

Przypuszcza się, że w centralnym układzie nerwowym GABA jest jedynym przenośnikiem hamującym. Swoistym antagonistą GABA jak już wspomniano, jest bikukullina o silnym działaniu farmakologicznym powodującym drgawki. Wprowadzona miejscowo bikukullina blokuje hamujące działanie lokalnie podanego GABA na neurony w korze mózgowej i mózdzku. Alkaloid ten nie blokuje natomiast inhibitorów wrażliwych na strychninę w rdzeniu kręgowym. W hamowaniu przewodnictwa w rdzeniu bierze udział glicyna. Strychnina blokująca inhibitory rdzeniowe i powodująca drgawki nie wpływa jednak na depresor w korze mózgowej i mózdzku.

II. Kwas β -aminoizomasłowy

Kwas β -aminoizomasłowy (BAIBA) występuje w moczu tak zwanych „wydzielaczy BAIBA” rzadko spotykanych w populacjach rasy białej, częściej (5—10%) w populacjach rasy czarnej i żółtej (27, 28). Wydalanie BAIBA w tych przypadkach ma charakter genetyczny, natomiast wydalanie obserwowane przy niektórych schorzeniach wiązano z wadliwą re-sorpcją zwrotną aminokwasów w kanalikach nerkowych. Według sugestii Fink a i wsp. (17, 18, 19, 20) BAIBA jest produktem rozpadu tyminy, zasady pirymidynowej wchodzącej w skład DNA (85) (schemat 4).



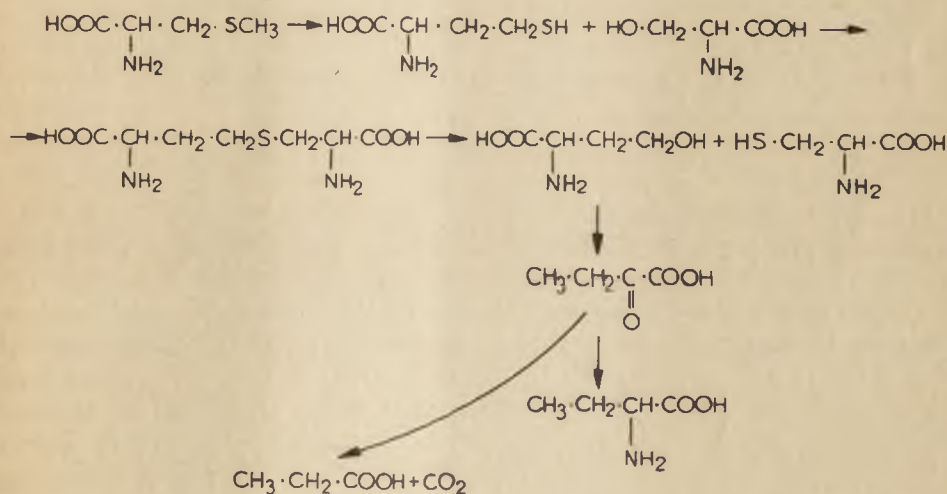
Schemat 4. Przemiana tyminy do kwasu β -aminoizomasłowego

Fink i wsp. wykazali wzrost ilości wydalonego BAIBA u szczurów po podaniu w diecie tyminy, a w większym jeszcze stopniu po podaniu dwuhydrotyminy. Pochodzenie BAIBA potwierdzają też dane odnośnie wykrywania tego aminokwasu w moczu w przypadkach schorzeń nowotworowych. Zwiększone ilości BAIBA w moczu wykrywa się w stanach głodowych u dzieci z wyniszczeniem przy niedoborach białkowych (kwashiorkor), przy zatruciach ołowiem, u chorych po naświetleniach neutronami i promieniami gamma. Najwięcej danych źródłowych o występowaniu BAIBA w moczu w fizjologii i patologii podaje Berry (6). Identy-

fikacja BAIBA w moczu odgrywa zatem rolę w diagnostyce lekarskiej. Metody identyfikacji i oznaczeń ilościowych BAIBA w moczu opisali Schietecatte i wsp. (69) oraz Goedde i Brunschede (26). Pierwsi z nich zastosowali technikę chromatografii bibułowej. Oznaczenia ilościowe przeprowadzali densytometrycznie. Zakres stężeń BAIBA oznaczanych tą metodą wynosił od 15—50mg w 24-godzinnym moczu, co odpowiada ok. 0,75—2,5 μ g na plamę. Goedde i Brunschede oznaczali BAIBA pod postacią DNP pochodnych techniką chromatografii cienko-warstwowej. Oznaczenia ilościowe przeprowadzali fotometrycznie w eluatach z plam DNP-BAIBA. Czułość tej metody wynosiła 0,8 μ g a średni błąd około 5%.

III. Kwas α -aminomasłowy

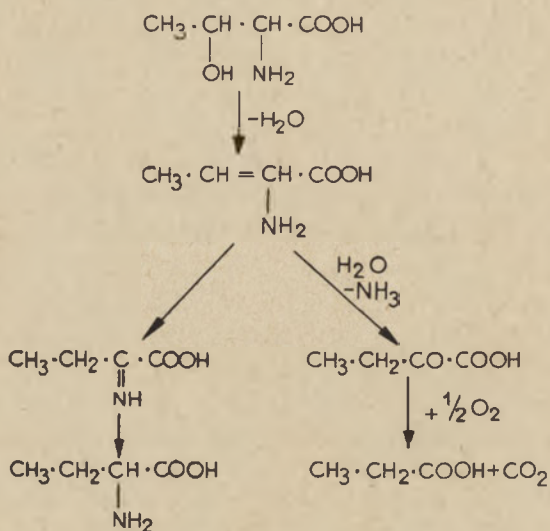
Kwas α -aminomasłowy występuje w większości tkanek roślinnych i zwierzęcych. W odróżnieniu od GABA i BAIBA, nie wykazuje on żadnej swoistej właściwości biologicznej. Większość autorów wiąże jego występowanie w tkankach z metabolizmem metioniny (schemat 5) i treoniny (schemat 6). Teoretycznie i kwas glutaminowy mógłby być substrat



Schemat 5. Kwas α -aminomasłowy na szlaku przemiany metioniny

tem w biosyntezie kwasu α -aminomasłowego, ale dotychczas nie uzyskano dowodów potwierdzających to przypuszczenie. Dominuje pogląd, że kwas α -aminomasłowy nie leży na żadnym z głównych szlaków metabolizmu któregośkolwiek aminokwasu lub innych związków. Nie kumuluje się on w tkankach, nie wykrywa się go w krwi, a w moczu występuje spo-

radycznie w ilościach śladowych. W moczu fizjologicznym u dzieci jego zawartość wynosi średnio 2,6µg/mg kreatyniny (87). W moczu dzieci zdrowych i chorych (kwashiorkor) leczonych i nieleczonych wykrywa się metodą Steina i Moora sporadycznie kwas α-aminomasłowy (87). Dent



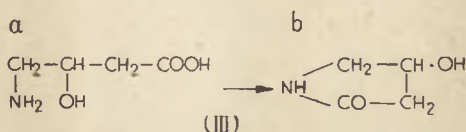
Schemat 6. Kwas α-aminomasłowy na szlaku przemiany treoniny

(13, 14) stwierdzał chromatograficznie kwas α-aminomasłowy w moczu dzieci w przypadkach choroby Fanconiego. Również w przypadkach krzywicy (5 na 15 badanych) wykryto kwas α-aminomasłowy w stężeniach 5,5—26,5mg w dobowej ilości moczu (87). U dorosłych w fizjologii i patologii kwas α-aminomasłowy występuje w moczu tylko sporadycznie w zakresie stężeń 20—40µM/1000 ml. W płynach mózgowo-rdzeniowych wykrywano kwas α-aminomasłowy również sporadycznie i w ilościach śladowych (8, 42, 42a). Żaden z wymienionych autorów, którzy wykrywali kwas α-aminomasłowy w płynach ustrojowych nie interpretował jego pochodzenia i nie wiązał jego obecności z żadnym ze znanych aminokwasów. Obecność tego związku w płynach mózgowo-rdzeniowych może budzić zainteresowanie, zwłaszcza iż nie wykrywano w nich nigdy GABA.

W naszych badaniach aminoacydurii u dzieci z niedorozwojem umysłowym o różnej patogenie wykrywaliśmy kwas α-aminomasłowy sporadycznie (48, 49). W niektórych przypadkach stwierdziliśmy w moczu obok tego związku również obecność BAIBA i GABA, uzyskując ich wyraźny rozdział na elektrochromatogramach bibułowych (47).

IV. Inne kwasy aminomasłowe

W piśmiennictwie spotyka się tylko nieliczne wzmianki o innych mniej znanych aminokwasach masłowych. I tak w mózgu zidentyfikowano kwas β -hydrokso- γ -aminomasłowy (wzór III a i b), który może tam powstawać z substratów zawierających obok grupy aminowej również hydroksoylową (np. z kwasu hydroksoylglutaminowego), a także drogą oksydacji. Związek ten w mózgu może spełniać rolę inhibitora jednak znacznie słabszego od GABA.



Wzór III. Kwas β -hydrokso- γ -aminomasłowy
 a — budowa łańcuchowa, b — budowa cykliczna (46)

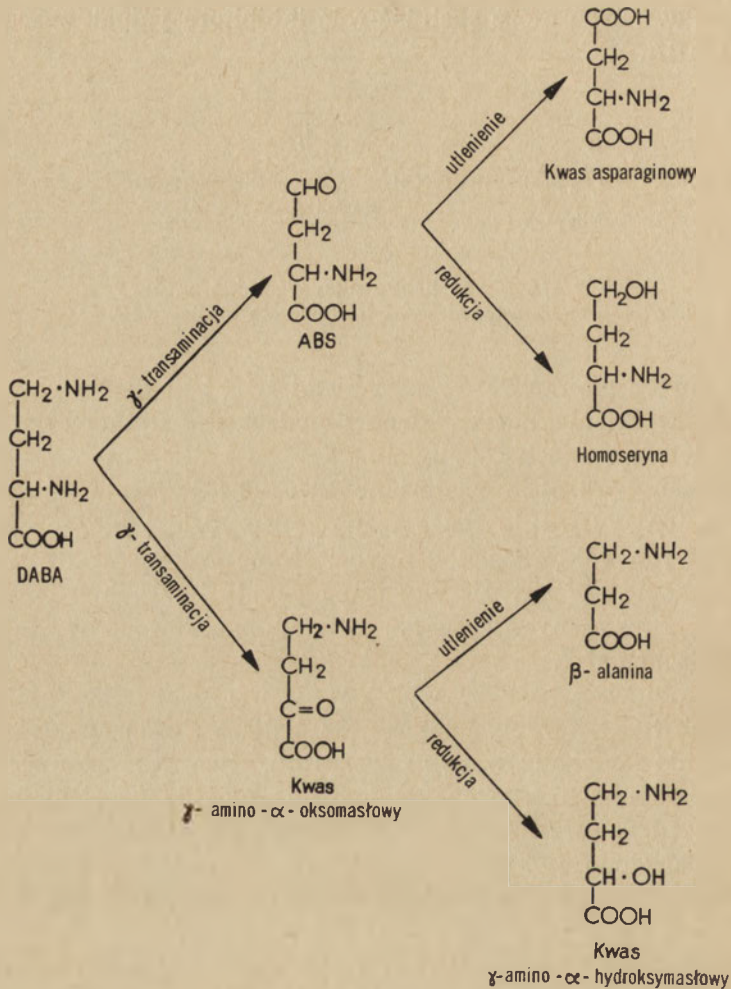
Wśród innych aminokwasów z grupami -OH i aminową przy różnych węglach (9) wymienić należy kwas 4-hydrokso-3-aminomasłowy stosowany jako lek w stanach zapalnych.

W mózgu bydłych znaleziono kwas 2,4-dwuaminomasłowy (45). Aminokwas ten występuje także w mukopeptydzie i błonach komórkowych niektórych bakterii patogennych. Izomery kwasów dwuaminomasłowych występują w antybiotyku aspartycynie i w bakterii *Xanthomonas* (29, 53). Przemiany kwasu α, γ -dwuaminomasłowego w *Xanthomonas* przedstawia schemat 7.

Kwas α -aminoizomasłowy, wykrywany wśród metabolitów argininy w komórkach tłuszczowych u myszy (83) zalicza się do analogów aminokwasowych nie metabolizowanych w ustroju. Kwas β -aminomasłowy wytwarzany jest przez bakterie *Pseudomonas putrida* (90). Forma L tego aminokwasu ulega przemianie do kwasu bursztynowego. W orzeszkach ziemnych znaleziono aminokwasy masłowe z grupami metylowymi, których prekurem jest prawdopodobnie kwas metyloglutaminowy. W *Chromobacterium violaceum* zidentyfikowano kwas γ -cyjano- α -aminomasłowy (10). W tkance mózgowej wykrywano ponadto inne pochodne kwasu masłowego: γ -butyrylohistydynę i kwas guanidynomasłowy, co świadczy o licznych procesach transaminacji i transamidacji odbywających się w ustrojach.

Na zakończenie przeglądu danych o metabolizmie i roli biologicznej kwasów aminomasłowych podkreślić należy zagadnienie wątpliwe i niedostatecznie zbadane. Do takich należy sprawa zależności aktywności biologicznej od struktury chemicznej, a także pełne powiązanie w szlakach metabolicznych wszystkich znanych dotychczas izomerów kwasów ami-

nomasłowych. Nie rozstrzygnięta jest sprawa pochodzenia kwasu α -aminomasłowego i jego pojawiania się w płynie mózgowo-rdzeniowym i w moczu. Brak też pełnego i jasnego poglądu na transport kwasu γ -aminomasłowego przez błony bariery mózgowej do płynu mózgowo-rdzeniowego, do krwi i w odwrotnym kierunku do mózgu. Niezupełnie jest wyjaśniona sprawa występowania kwasu γ -aminomasłowego w moczu. Dalszych



Schemat 7. Metabolizm kwasu L- α - γ -dwuaminomasłowego u *Xantomonas* (53)
DABA — kwas dwuaminomasłowy, ABS — aldehyd α -aminomasłowy

badań wymaga transport kwasu glutaminowego i GABA oraz lokalizacja katalizujących ich przemiany enzymów w poszczególnych partiach mózgowych. Na zainteresowanie zasługują próby wykorzystania aminokwasów masłowych w diagnostyce lekarskiej niektórych schorzeń.

LITERATURA

1. Abraham D., Pisano J. J., Udenfriend S., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 570 (1961).
- 1a. Arold H., *Liebigs Ann. Chem.* **739**, 194 (1970).
2. Balázs R., Machiyama Y., Hammond B. J., Julian T., Richter D., *Biochem. J.* **116**, 445 (1970).
3. Baxter C. F., Roberts E., *J. Biol. Chem.* **233**, 1135 (1958).
4. Baxter C. F., Roberts E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **101**, 811 (1959).
5. Baxter C. F., Roberts E., *J. Biol. Chem.* **236**, 3287 (1961).
6. Berry H. K., *Metabolism* **9**, 373 (1960).
7. Bessman S. P., Rossen J., Layne G. C., *J. Biol. Chem.* **201**, 385 (1953).
8. Blass J., Langier S., *Inst. Pasteur, Chim. Bact.* (1956).
9. Bryan J. K., *Biochim. Biophys. Acta* **171**, 205 (1969).
10. Brysk M. M., Ressler C. H., *J. Biol. Chem.* **245**, 1156 (1970).
- 10a. Chmelar V., Hais J. M., Hodáňova M., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 327 (1964).
11. Csillik B., Knyihár E., *Nature* **225**, 562 (1970).
12. Curtis D. R., Duggan A. W., Felix D., Johnston G. A. R., *Nature* **226**, 1222 (1970).
13. Dent C. E., *Biochem. J.* **41**, 240 (1947).
14. Dent C. E., *Biochem. J.* **45**, 49 (1949).
15. Elliott K. A. C., *Physiol. Rev.* **39**, 383 (1959).
16. Elliott K. A. C., Page I. H., Irvine H., Quastel J. H., *Neurochemistry*, Thomas C. Springfield, Illinois, USA 1962, str. 636.
17. Fink K. K., *J. Biol. Chem.* **218**, 9 (1956).
18. Fink K. K., Cline R. G., Henderson R. B., Fink R. M., *J. Biol. Chem.* **221**, 225 (1956).
19. Fink K. K., Henderson R. B., Fink R. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **78**, 135 (1951).
20. Fink K. K., Henderson R. B., Fink R. M., *J. Biol. Chem.* **197**, 411 (1952).
21. Fischl J., Segal D., *Clin. Chim. Acta* **8**, 479 (1963).
22. Florey E., Florey E., *J. Physiol.* **144**, 220 (1958).
23. Florey E., *J. Physiol.* **156**, 1 (1961).
24. Fugelli K., *Experientia* **26**, 361 (1970).
25. Fugelli K., *Nature* **228**, 1001 (1970).
26. Goedde H. W., Brunschede H., *Clin. Chim. Acta* **11**, 485 (1965).
27. Harris H., *Ann. Eug. London* **18**, 1335 (1959).
28. Harris H., *Human Biochemical Genetics*, Univ. Press, Cambridge 1959.
29. Hausmann W., *J. Antib. (Tokyo)* **22**, 207 (1969).
30. Hilde H., Hersh H. G., Robins G., *J. Neurochem.* **9**, 61 (1962).
31. Jenny G. H., *Helv. Physiol. Acta C* (96—97) (1966).
32. Johnston D. G. R., Curtis D. R., de Groat W. W., Dugan A. W., *Biochem. Pharm.* **17**, 2488 (1968).
33. Kier L. B., Truitt E. B., *Experientia* **26**, 988 (1970).
34. Krawitz E. A., *J. Neurochem.* **9**, 303 (1962).
35. Krawitz E. A., Potter D. D., Van Gelder N. M., *Nature* **194**, 382 (1962).
36. Kruze D., Szukalski B., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **33**, 3 (1963).
37. Kumon A., Matsuoka J., Kakimoto Y., Nakaima T., Sano J., *Biochim. Biophys. Acta* **200**, 466 (1970).
38. Laitha A., w *Neurochemistry*, red. Elliott K. A. C., Page I. H., Quastel J. H., Thomas C., Springfield, Illinois 1962, XVIII, str. 399.

39. Maccaione S., Campisi R., Albanese A., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **46**, 785 (1970).
40. Machiyama Y., Balázs R., Hammond B. J., Julian T., Richter D., *Biochem. J.* **116**, 469 (1970).
41. Molitoris K., *J. Chromatog.* **34**, 399 (1968).
42. Müting D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **110**, 620 (1962).
- 42a. Müting D., Shivaran K. N., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **317**, 34 (1959).
43. Nakajama T., Kakimoto Y., Kumon A., Matsuoko Y., Sano J., *J. Neurochem.* **16**, 417 (1969).
44. News and Views, *Nature* **226**, 1199 (1970).
45. Nyhan W. L., *Aminoacid Metabolism and Genetic Variation*, Mc Graw-Hill, N. York 1967, str. 327.
46. Ohara K., Sano J., Koizumi H., Nashimura S., *Science* **129**, 1225 (1959).
47. Opieńska-Blauth J., *Post. Biochem.* **13**, 595 (1967).
48. Opieńska-Blauth J., Gębala A., Kozłowska T., Sanecka-Obacz M., Stryjecka M., *Prace i Materiały Naukowe, Inst. Matki i Dziecka* **6**, 313 (1965).
49. Opieńska-Blauth J., Gębala A., Sanecka-Obacz M., Kozłowska T., Stryjecka M., *Ann. Paed.* **207**, 115 (1966).
50. Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Dobrzańska A., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 137 (1960).
51. Opieńska-Blauth J., Tomaszewski L., *Metody Chromatograficzne w badaniach aminokwasów i aminoacydurii*. PWN, Warszawa 1956.
52. Pisano J. J., Wilson J. W., Cohen L., Abraham W., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **236**, 499 (1961).
53. Rao D., *Biochem. J.* **114**, 107 (1969).
54. Roberts E., *Ultrastructure and Metabolism of the Nervous System XL*, 288 (1962).
55. Roberts E., *Nutrition Rev.* **21**, 161 (1963).
56. Roberts E., *Structure and Function of Inhibitory Neuronal Mechanisms*. Euler C., Pergamon Press. Oxford, 1968.
57. Roberts E., Baxter C. F., Van Harrevelt A., Viersma C. A. G., Adey W. R., Killam A. F., *Inhibition in the Nervous System and Gamma-Aminobutyric Acid*. Pergamon Press, Oxford, 1960.
58. Roberts E., Bregoff H. M., *J. Biol. Chem.* **201**, 393 (1953).
59. Roberts E., Eidelberg E., *Intern. Rev. Neurobiol.* **2**, 479 (1960).
60. Roberts E., Frankel S., *J. Biol. Chem.* **187**, 55 (1950).
61. Roberts E., Frankel D., *J. Biol. Chem.* **188**, 789 (1950).
62. Roberts E., Frankel S., *J. Biol. Chem.* **190**, 515 (1951).
63. Roberts E., Frankel S., Harman P. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **74**, 383 (1950).
64. Roberts E., Lowe J. P., Guth L., Jelinek B., *J. Exptl. Zool.* **138**, 313 (1958).
65. Roberts E., Rothstein M., Baxter C. F. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **97**, 796 (1958).
66. Roberts E., Simonsen D. G., *Biochem. Pharmacol.* **12**, 113 (1963).
67. Roberts E., Simonsen D. G., *Vitamins Hormones* **22**, 503 (1964).
68. Salvador R. A., Albers R. W., *J. Biol. Chem.* **234**, 705 (1959).
69. Schietecatte W., Maes G., Faes M. H., Bernardelli R., *Clin. Chim. Acta* **11**, 259 (1965).

70. Seiler N., Knödgen B., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 27 (1971).
71. Seiler N., Wiechmann M., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 588 (1968).
72. Seiler N., Wiechman M., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1493 (1969).
73. Shukuya R., Schwert G. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 1649 (1960).
74. Shukuya R., Schwert G. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 1653 (1960).
75. Shukuya R., Schwert G. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 1658 (1960).
76. Sierosławska J., *Post. Hig. Med. Dośw.* **18**, 413 (1964).
77. Singh J. S., Malhotra C. L., *J. Neurochem.* **9**, 37 (1962).
78. Sisken B., Sano K., Roberts E., *J. Biol. Chem.* **236**, 503 (1961).
79. Spackman D. H., Stein W. H., More S., *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
80. Stransky Z., *Activitas Nervosa Superiora* **8**, 105 (1966).
- 80a. Stransky Z., *Nature* **224**, 612 (1969).
81. Suss J. P., Haber B., Roberts E., *Biochemistry* **5**, 287 (1966).
82. Sze P. Y., Kuriyama K., Roberts E., Duarte C., *Brain Res.* **25**, 387 (1971).
83. Touabi M., Jeanvenaud B., *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 128 (1969).
84. Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **187**, 65 (1950).
85. Umbreit W. W., Heneage P., *J. Biol. Chem.* **201**, 15 (1953).
86. Van Harrevelt A. J., *J. Neurochem.* **3**, 300 (1958).
87. Vis H. L., *Aspects de Mecanismes des Hyperaminoaciduries de l'enfance*, Arscia Bruxelles 1963.
88. Waksman A., Roberts E., *Biochemistry* **4**, 2132 (1965).
89. Whelan W. T., Scriver C. R., Mohyndden T., *Nature* **224**, 216 (1969).
90. Winnacker E. L., Barker H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **237**, 284 (1971).
91. Wood J. D., Watson W. J., *Can. J. Biochem.* **47**, 994 (1969).
92. Wünsch A., *J. Chromatog.* **30**, 225 (1967).

RECENZJE

J. Opieńska-Blauth, H. Kraczkowski i H. Burszkiewicz — Zarys chromatografii cienkowarstwowej, wydanie II, PWRiL, Warszawa, 1971 r. str. 385, rys. 101, tabel 124.

Jest to drugie, znacznie rozszerzone i unowocześnione wydanie doskonałej monografii prof. Opieńskiej-Blauth i Jej współpracowników, poświęconej jednej z najnowszych technik analizy chemicznej — chromatografii cienkowarstwowej. Podręcznik podzielony jest na 20 rozdziałów, posiada bogate piśmiennictwo około 1200 pozycji oraz skorowidz rzeczowy.

Technika chromatografii cienkowarstwowej w nowoczesnym opracowaniu metodycznym wprowadzona do praktyki przez E. Stahla pod koniec lat pięćdziesiątych, dzisiaj znalazła powszechne zastosowanie do analizy jakościowej i ilościowej, do badań strukturalnych związków organicznych i nieorganicznych. Szczególnie korzystną cechą tej metody jest szybkość z jaką uzyskuje się rozdział składników różnych mieszanin oraz możliwość zastosowania takich solwentów, które dla bibuły i różnych folii byłyby niszczące (silne kwasy i zasady, niektóre odczynniki organiczne), a użycie których ma niejednokrotnie zasadnicze znaczenie dla efektywności rozdziału. Możliwość łączenia metody chromatografii cienkowarstwowej z innymi technikami — chromatografią bibułową i elektroforezą w różnych nośnikach — jeszcze bardziej rozszerza jej zastosowanie w analizie chemicznej.

Po omówieniu historycznego rozwoju, autorzy przedstawiają zwięźle teoretyczne zasady, szczegóły techniki i przyrządy, których prostota jest jeszcze jedną zaletą omawianej metody. W dalszych rozdziałach następuje systematyczne omówienie przebiegu analizy licznych grup związków chemicznych: aminokwasów, peptydów i białek, lipidów, sterydów, cukrowców, alkaloidów i terpenów, produktów hydrolizy kwasów nukleinowych, witamin i antybiotyków oraz innych grup związków organicznych. Odrębny rozdział poświęcony został zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej do analizy lekarskiej i końcowy rozdział — standaryzacji metody, głównie do celów ilościowych.

Należy podkreślić, że w książce znalazło się wiele wyników własnych autorów, jako że środowisko lubelskie ma konkretne osiągnięcia na tym polu. W sumie — pożyteczna i potrzebna w polskim piśmiennictwie pozycja, wydana przez wydawnictwo, które cechuje staranność technicznego opracowania podręcznika i czystość druku. Na przyszłość przydałby się skorowidz nazwisk. Z pewnością monografia będzie szeroko wykorzystana w pracowniach różnego typu w całym kraju.

W. Ostrowski

**J. Kączkowski — Podstawy biochemii, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne.
Warszawa 1970.**

W roku 1970 ukazało się II wydanie książki J. Kączkowskiego „Podstawy biochemii” wydane przez Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Książka jest podręcznikiem biochemii ogólnej przeznaczonym dla studentów wydziału technologii rolno-spożywczej, a także wydziału rolniczego Wyższych Szkół Rolniczych. Treść podręcznika zawarta jest w 14 rozdziałach: 1. Wiadomości wstępne, 2. Aminokwasy i białka, 3. Enzymy, 4. Witaminy rozpuszczalne w wodzie i koenzymy, 5. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach. Związki pochodne izopentenolu, 6. Kwasy nukleinowe, 7. Przemiana aminokwasów i białek, 8. Barwniki porfiryne, 9. Utlenianie biologiczne, 10. Cykl kwasów trójkarboksylowych, 11. Cukrowce i ich przemiany, 12. Fotosynteza, 13. Metabolizm tłuszczowców, 14. Rola związków mineralnych w metabolizmie.

Założeniem autora podręcznika było przedstawienie najważniejszych wiadomości o budowie i przemianach związków występujących w ustrojach żywych z podkreśleniem tych, z którymi ma do czynienia nowoczesna technologia żywnościowa. Stąd też autor w licznych rozdziałach umieścił materiał szczególnie interesujący technologów żywności. W rozdziale o białkach podaje przegląd ważniejszych białek występujących w produktach żywności; w rozdziale o enzymach mówi o zastosowaniach enzymów w technologii rolno-spożywczej, a na przykład w rozdziale o witaminach o przemysłowej produkcji witamin i witaminizowaniu artykułów spożywczych. Jest to zaletą podręcznika przeznaczanego dla studentów uczelni rolniczych. Podręcznik, jako zawierający podstawowe wiadomości z biochemii, jest bardzo związany z odpowiednio wyważoną treścią poszczególnych rozdziałów. Podręcznik stanowić może cenną pomoc w nauczaniu biochemii i to nie tylko w uczelniach rolniczych. Jednak nie wszystkie rozdziały opracowane są jednakowo starannie. Na przykład w rozdziale o kwasach nukleinowych można znaleźć szereg drobnych potknięć czy nieścisłości. I tak np. na stronie 143 autor pisze, że „Bardzo interesującym zjawiskiem jest stwierdzone ostatnio występowanie w kwasach nukleinowych wirusów, lub w tak zwanym rozpuszczalnym RNA *N*-metylowych pochodnych zasad, np. 6-*N*-metylo- i 6-*N*-dwumetyloadeniny”. Wiemy dziś, że występowanie tych pochodnych jest o wiele powszechniejsze i nie ogranicza się do tych dwóch podanych rodzajów kwasów nukleinowych. Na stronie 148 autor mylnie informuje, że „Wirusy bakteryjne, czyli bakteriofagi zawierają wyłącznie DNA, podczas gdy wirusy roślinne mogą zawierać wyłącznie RNA”. Mówiąc o biosyntezie kwasów nukleinowych (str. 149) stwierdza, że „Synteza-DNA- przebiega przy współdziałaniu enzymu... oraz niewielkiej ilości DNA... Ten ostatni pełni rolę tak zwanego startera lub matrycy, na wzór której przebiega dalsza synteza...” Tak podane pojęcia startera lub matrycy mogą mylić czytelnika (o czym zresztą sam miałem okazję się przekonać podczas egzaminów). Również nieprawdziwe jest stwierdzenie (str. 150), że „Każdy — z rozdzielonych łańcuchów DNA — w wyniku podziału przechodzi do oddzielnej komórki potomnej, gdzie następuje dobudowa dopełniającego łańcucha z udziałem obecnych tam trójfosforanów...” Również niepotrzebnie podaje autor bardzo hipotetyczną drogę przekazywania informacji: DNA → RNA I → białko → RNA II → DNA godzącej zresztą w znany dogmat Cricka o niemożności przenoszenia informacji zawartej w strukturze białka na strukturę RNA (i DNA). W rozdziale o biosyntezie białka mylnie podano (str. 152), że aminokwas jest aktywowany przy udziale kinazy. Również niezbyt fortunate wydaje mi się przedstawienie zagadnienia kodu genetycznego ujęte zbyt historycznie, a pomijające ważniejsze i obowiązujące dziś stwierdzenia. Można było np. pominąć w elementarnym

podręczniku sprawy kodu zachodzącego na siebie czy nie zachodzącego, ale nie powinno zabraknąć w nim aktualnej tablicy kodonów.

Mimo tych niedociągnięć sądzę, że książka Kączkowskiego jest bardzo pożyteczną rodzimą pozycją podręcznikową biochemii. Język książki jest jasny, układ przejrzysty i logiczny. Jest starannie wydana. Zgodnie z przeznaczeniem można ją polecić studentom wydziałów rolno-spożywczych Wyższych Szkół Rolniczych, a także innym pragnącym zapoznać się z podstawami biochemii.

J. Pawełkiewicz

SPRAWOZDANIA

IV. Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów. Konstanz, 14—19 marzec 1972 r.

W dniach 14—19 marca odbyło się w Uniwersytecie w Konstanz (NRF) IV Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów, finansowane przez EMBO, IUB, firmę Volkswagen i Towarzystwo Wspomagania Uniwersytetu w Konstanz. Organizatorem sympozjum był prof. dr Peter Hemmerich.

Sympozjum miało charakter warsztatowy tzw. „Workshop” i jego podstawą była dyskusja nad krótkimi, 5—10 minutowymi, komunikatami przedstawionymi przez 82 uczestników. Tematyka sympozjum została podzielona na 3 główne sekcje z następującymi zagadnieniami do dyskusji:

- A) Budowa chemiczna i funkcja flawin wolnych i związanych z białkami. 1) Budowa chemiczna starych i nowych koenzymów flawinowych oraz flawin. 2) Ogólne chemiczne i fizyczne własności rdzenia flawinowego. 3) Oddziaływania między flawinami, jednoelektronowe przeniesienia, połączenia metalu z flawiną. 4) Aktywacja wodoru związanego z węglem CH (odwodowanie) przy udziale flawin. 5) Aktywacja O_2 (autooksydacja, oksygenacja) przy udziale flawin. 6) Aktywacja połączenia CO przy udziale flawin.
- B) Rola flawin w metabolizmie zwierząt, roślin i drobnoustrojów. 1) Flawiny w stanach wzbudzonych światłem. 2) Flawiny w metabolizmie pirogronianu. 3) Flawiny w syntezie kwasu tłuszczowego. 4) Flawiny w utlenianiu mitochondrialnym. 5) Flawiny w mikrosomalnym utlenianiu zredukowanego NAD(P) i reakcjach hydroksylacji. 6) Flawiny w fotosyntezie.
- C) Chemia i budowa flawo-/apo/proteidów. 1) Pierwszorzędowa struktura i analiza promieniami X flawoproteidów. 2) Wiązanie flawin przez białka i modyfikacja białek. 3) Badania rezonansu magnetycznego flawoproteidów. 4) Badania czwartorzędowej struktury i zmian konformacyjnych flawoproteidów. 5) Nowe flawoproteidy.

W przeciwieństwie do poprzednich trzech sympozjów, materiały z obecnego sympozjum, ze względu na dyskusyjny charakter zjazdu nie będą publikowane. Następne, V sympozjum przewidziane jest w roku 1975 w Kalifornii (USA).

Z. Kaniuga

KOMUNIKAT

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego komunikuje uprzejmie, że została powołana Rada Redakcyjna Postępów Biochemii w następującym składzie:

Przewodniczący — prof. dr Kazimierz Zakrzewski (Warszawa)
Członkowie — doc. dr Michał Bagdasarian (Warszawa)
 prof. dr Mieczysław Choraży (Gliwice)
 doc. dr Janusz Grzegorzczak (Szczecin)
 doc. dr Stanisław Lewak (Warszawa)
 prof. dr Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław)
 doc. dr Andrzej Morawiecki (Wrocław)
 prof. dr Jerzy Pawełekiewicz (Poznań)
 prof. dr Tadeusz Szczepkowski (Kraków)
 prof. dr Zofia Zielińska (Warszawa)

Sekretarz
dr Janina Malec

Prezes
prof. dr Tomasz Borkowski

STATUT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

STATUT POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Rozdział I

Nazwa, teren działalności, siedziba i charakter prawny

§ 1.

Stowarzyszenie nosi nazwę: „Polskie Towarzystwo Biochemiczne” zwane w dalszej treści Statutu Towarzystwem

§ 2.

Terenem działalności Towarzystwa jest obszar Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej a siedzibą władz m.st. Warszawa.

§ 3.

Towarzystwo jest stowarzyszeniem zarejestrowanym, działającym na podstawie obowiązującego prawa o stowarzyszeniach i z tego tytułu posiada osobowość prawną.

§ 4.

Towarzystwo może zakładać oddziały terenowe, podlegające legalizacji przez właściwą terenową władzę administracji ogólnej.

§ 5.

Towarzystwo może być członkiem krajowych i międzynarodowych organizacji o tym samym lub podobnym profilu działania.

§ 6.

1. Towarzystwo używa pieczęci okrągłej z napisem: „POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE” oraz pieczęci podłużnej z napisem: „Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Zarząd Główny w Warszawie, Adres siedziby”.
2. Oddziały Towarzystwa używają pieczęci podłużnej z napisem: „Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Oddział w....., adres siedziby.

§ 7.

Towarzystwo opiera swoją działalność na pracy społecznej ogółu członków.

Rozdział II

Cele i środki działania

§ 8.

Celem Towarzystwa jest popieranie rozwoju biochemii i jej popularyzacja.

§ 9.

Dla osiągnięcia swych celów Towarzystwo:

- 1) organizuje zjazdy, sympozja, zebrania naukowe, odczyty, wykłady i konkursy,
- 2) wydaje i popiera czasopisma naukowe, książki i inne publikacje z zakresu biochemii,
- 3) opiniuje o stanie i potrzebach biochemii polskiej i występuje w jej sprawach wobec władz,
- 4) współpracuje z pokrewnymi stowarzyszeniami w kraju i zagranicą.

Rozdział III

Członkowie, ich prawa i obowiązki

§ 10.

W skład Towarzystwa wchodzi członkowie zwyczajni, honorowi i wspierający.

§ 11.

1. Członkiem zwyczajnym Towarzystwa może być obywatel polski lub obcy posiadający dorobek naukowy z biochemii lub dziedzin pokrewnych.
2. Członkiem honorowym Towarzystwa może być obywatel polski lub obcy, szczególnie zasłużony dla rozwoju polskiej biochemii.
3. Członkiem wspierającym może być każda osoba prawna, wpłacająca roczną składkę na rzecz Towarzystwa.

§ 12.

1. Kandydat na Członka zwyczajnego zostaje przyjęty w poczet Członków Towarzystwa przez Zarząd Główny na podstawie pisemnej deklaracji podpisanej przez 2 Członków wprowadzających.
2. Członkostwo honorowe — na wniosek Zarządu Głównego — nadaje Walne Zebranie Członków Towarzystwa większością co najmniej 2/3 głosów, w tajnym głosowaniu.
3. Członków wspierających przyjmuje Zarząd Główny na podstawie pisemnej deklaracji.
4. Przyjęcie kandydatów z zagranicy następuje po akceptacji przez Polską Akademię Nauk.

§ 13.

1. Członkowie zwyczajni Towarzystwa mają prawo do:
 - 1) czynnego i biernego wyboru do władz Towarzystwa,
 - 2) uczestniczenia w Walnych Zebraniach, w Zjazdach Naukowych, sympozjach, konferencjach i zebraniach naukowych i organizacyjnych Towarzystwa,
 - 3) prenumeraty wydawnictw biochemicznych poprzez Towarzystwo.
2. Członkowie honorowi mają wszystkie prawa Członków zwyczajnych oraz są zwolnieni od opłacania składek członkowskich.
3. Członkowie Towarzystwa obywatele państw obcych mają wszystkie prawa członków zwyczajnych lub honorowych z wyjątkiem biernego prawa wyborczego.
4. Członkowie wspierający mają prawo uczestniczenia w Walnym Zebraniu z głosem doradczym za pośrednictwem swego przedstawiciela.

§ 14.

Członkowie Towarzystwa obowiązani są:

- 1) przestrzegać postanowień Statutu, regulaminów oraz uchwał władz Towarzystwa,
- 2) opłacać regularnie składki członkowskie w wysokości uchwalonej przez Walne Zebranie członków.

§ 15.

1. Członkostwo wygasa w przypadku:
 - 1) wystąpienia z Towarzystwa zgłoszonego na piśmie Zarządowi Głównemu, za pośrednictwem terenowo właściwego Oddziału lub bezpośrednio o ile w miejscu zamieszkania członka nie ma oddziału,
 - 2) skreślenie z listy członków przez Zarząd Główny z powodu nie płacenia składek przez okres 2 lat, mimo dwukrotnego pisemnego upomnienia, a w przypadku członkostwa wspierającego w związku ze zmianą profilu działania lub utratą osobowości prawnej,
 - 3) wykluczenie z Towarzystwa przez Zarząd Główny za działalność na szkodę Towarzystwa, za czynny nie liczące z godnością członka Towarzystwa lub

- w przypadku skazania prawomocnym wyrokiem sądu powszechnego na karę dodatkową utraty praw publicznych,
2. Od uchwały Zarządu Głównego o wykluczeniu z Towarzystwa przysługuje członkowi prawo odwołania się do Walnego Zebrania, którego uchwała jest ostateczna.

Rozdział IV

Władze Towarzystwa

§ 16.

1. Władzami Towarzystwa są:
- 1) Walne Zebranie Członków Towarzystwa,
 - 2) Zarząd Główny,
 - 3) Główna Komisja Rewizyjna,
2. Kadencja Zarządu Głównego i Głównej Komisji Rewizyjnej trwa 3 lata.
3. Członkowie władz Towarzystwa pełnią swoje funkcje honorowo.
4. Członkowie władz Towarzystwa nie powinni pełnić tej samej funkcji dłużej niż przez dwie kolejne kadencje.

§ 17.

1. Walne Zebranie Członków Towarzystwa jest najwyższą władzą Towarzystwa i może być zwyczajne lub nadzwyczajne.
2. Do kompetencji zwyczajnego Walnego Zebrania Członków Towarzystwa należy:
- 1) uchwalenie głównych kierunków działalności Towarzystwa,
 - 2) rozpatrywanie sprawozdań z działalności Zarządu Głównego i Głównej Komisji Rewizyjnej,
 - 3) udzielanie absolutorium ustępującemu Zarządowi Głównemu na wniosek Głównej Komisji Rewizyjnej,
 - 4) wybór Zarządu Głównego i Głównej Komisji Rewizyjnej,
 - 5) nadawanie godności członka honorowego na wniosek Zarządu Głównego,
 - 6) uchwalanie wysokości składek członkowskich,
 - 7) rozpatrywanie spraw wniesionych pod obrady Zebrania przez Zarząd Główny,
 - 8) rozpatrywanie wniosków zgłoszonych przez członków Towarzystwa,
 - 9) rozpatrywanie odwołań członków w sprawach wykluczenia z Towarzystwa,
 - 10) podejmowanie uchwał o zmianie Statutu i rozwiązywaniu się Towarzystwa.

§ 18.

Uchwały Walnego Zebrania członków Towarzystwa zapadają zwykłą większością głosów przy obecności co najmniej połowy liczby członków uprawnionych do głosowania — w pierwszym terminie, w drugim terminie — bez względu na liczbę obecnych.

§ 19.

1. Zwyczajne Walne Zebranie Członków Towarzystwa zwoływane jest przez Zarząd Główny co trzy lata w związku z zakończeniem Kadencji.
2. O terminie, miejscu i porządku obrad Zwyczajnego Walnego Zebrania Zarząd Główny zawiadamia członków co najmniej na dwa tygodnie przed zwołaniem Zebrania.

§ 20.

1. Nadzwyczajne Walne Zebranie Członków zwołuje Zarząd Główny z własnej inicjatywy, na wniosek Głównej Komisji Rewizyjnej, na wniosek co najmniej 1/3 liczby Członków Towarzystwa, zgłoszony na piśmie Zarządowi Głównemu.
2. Nadzwyczajne Walne Zebranie winno być zwołane w terminie 3 miesięcy od wpłynięcia wniosku i obraduje nad sprawami, dla których zostało zwołane.

§ 21.

W skład Zarządu Głównego wchodzi prezes, wiceprezes oraz 14 członków wybranych przez Walne Zebranie w tajnym głosowaniu.

§ 22.

Do kompetencji Zarządu Głównego należy:

- 1) reprezentowanie Towarzystwa na zewnątrz,
- 2) realizowanie celów statutowych oraz wykonywanie uchwał Walnego Zebrania Członków,
- 3) opracowywanie planów całokształtu działalności Towarzystwa i projektów budżetu oraz sprawozdań z ich wykonania,
- 4) zarządzanie majątkiem Towarzystwa oraz przyjmowanie darowizn i zapisów,
- 5) rozstrzyganie sporów wynikłych między Członkami w obrębie Towarzystwa,
- 6) powoływanie i rozwiązywanie oddziałów terenowych i nadzór nad ich działalnością,
- 7) powoływanie komisji problemowych oraz sekcji specjalistycznych,
- 8) uchwalanie regulaminów wewnętrznych,
- 9) powoływanie komitetu zjazdowego w miejscowości wybranej na zjazd naukowy,
- 10) przyjmowanie, skreślanie i wykluczanie Członków Towarzystwa.

§ 23.

1. Posiedzenia Zarządu Głównego odbywają się w miarę potrzeby nie rzadziej jednak niż raz na pół roku.
2. Uchwały Zarządu Głównego zapadają zwykłą większością głosów, przy obecności co najmniej połowy członków Zarządu, w tym prezesa lub wiceprezesa. W razie równości głosów rozstrzyga głos przewodniczącego zebrania.

§ 24.

1. Zarząd Główny wybiera ze swego grona siedmioosobowe Prezydium Zarządu Głównego, w skład którego wchodzi: prezes, wiceprezes, sekretarz, skarbnik i 3 członków Zarządu.
2. Prezydium Zarządu Głównego kieruje działalnością Towarzystwa w okresach pomiędzy posiedzeniami Zarządu Głównego zgodnie z regulaminem uchwalonym przez Zarząd Główny.
3. Posiedzenia Prezydium odbywają się w miarę potrzeby, nie rzadziej jednak niż co dwa miesiące.
4. Uchwały Prezydium zapadają zwykłą większością głosów, przy obecności przynajmniej pięciu jego Członków, w tym prezesa lub wiceprezesa i winny być przedstawione na najbliższym posiedzeniu Zarządu Głównego.

§ 25.

1. Główna Komisja Rewizyjna składa się z 3 Członków wybranych przez Walne Zebranie na okres kadencji Zarządu Głównego, Główna Komisja Rewizyjna konstituując się wybiera spośród siebie przewodniczącego i sekretarza.
2. Do obowiązków Głównej Komisji Rewizyjnej należy: kontrola całokształtu działalności Towarzystwa, przeprowadzana przynajmniej raz w roku, ze szczególnym uwzględnieniem gospodarki finansowej w zakresie celowości, prawidłowości i rzetelności.
3. Główna Komisja Rewizyjna ma prawo występowania do Zarządu Głównego z wnioskami wynikającymi z ustaleń kontroli i żądania wyjaśnień.
4. Przewodniczący Głównej Komisji Rewizyjnej może brać udział z głosem doradczym w posiedzeniach Zarządu Głównego i Prezydium Zarządu Głównego.
5. Regulamin działania Głównej Komisji Rewizyjnej zatwierdza Walne Zebranie Członków.

Rozdział V

Oddziały Towarzystwa

1. Oddziały Towarzystwa są powoływane z inicjatywy Członków na podstawie uchwały Zarządu Głównego w miejscowościach, na których terenie pracuje co najmniej 15 Członków Towarzystwa.
2. Teren działalności Oddziału i jego siedzibę określa Zarząd Główny Towarzystwa.
§ 27.

1. Władzami Oddziału Towarzystwa są:
 - 1) Walne Zebranie Członków Oddziału,
 - 2) Zarząd Oddziału,
 - 3) Komisja Rewizyjna Oddziału.
2. Kadencja Zarządu i Komisji Rewizyjnej Oddziału trwa 3 lata.
§ 28.

Walne Zebranie Członków Oddziału jest najwyższą władzą Oddziału i może być zwyczajne lub nadzwyczajne.

§ 29.

1. Do kompetencji Walnego Zebrania Członków Oddziału należy:
 - 1) wytyczanie kierunków działalności Oddziału, zgodnie z postanowieniami Statutu i uchwałami władz Towarzystwa,
 - 2) rozpatrywanie sprawozdań z działalności Zarządu Oddziału i Komisji Rewizyjnej Oddziału,
 - 3) udzielanie absolutorium ustępującemu Zarządowi Oddziału na wniosek Komisji Rewizyjnej Oddziału,
 - 4) wybór Zarządu Oddziału i Komisji Rewizyjnej Oddziału,
 - 5) rozpatrywanie wniosków zgłoszonych przez Członków Oddziału.
2. Uchwały Walnego Zebrania Członków Oddziału zapadają w pierwszym terminie zwykłą większością głosów, przy obecności co najmniej połowy Członków uprawnionych do głosowania, w drugim terminie bez względu na liczbę obecnych.
3. Zwyczajne Walne Zebranie Członków Oddziału zwoływane jest przez Zarząd Oddziału, który informuje Członków Oddziału o proponowanym porządku obrad na 2 tygodnie przed wyznaczonym terminem.
§ 30.

Zarząd Oddziału zwołuje nadzwyczajne Walne Zebranie Członków Oddziału na wniosek Zarządu Głównego, z własnej inicjatywy, na wniosek Komisji Rewizyjnej Oddziału, na wniosek przynajmniej 1/3 Członków Oddziału zgłoszony na piśmie Zarządowi Oddziału.

§ 31.

Zarząd Oddziału składa się z 3 do 5 osób, wybieranych przez Walne Zebranie Członków Oddziału.

§ 32.

1. Do kompetencji Zarządu Oddziału należy:
 - 1) prowadzenie działalności zgodnie z postanowieniami Statutu Towarzystwa i uchwałami władz Towarzystwa,
 - 2) organizowanie konferencji, kursów i zebrań naukowych,
 - 3) organizowanie zjazdów Towarzystwa i sympozjów specjalistycznych z upoważnienia Zarządu Głównego,
 - 4) organizowanie odczytów i wykładów popularyzujących biochemię,
 - 5) składanie Zarządowi Głównemu sprawozdań z działalności Oddziału.
2. Posiedzenia Zarządu Oddziału odbywają się w miarę potrzeby, nie rzadziej jednak niż raz na kwartał.

§ 33.

1. Komisja Rewizyjna Oddziału wybierana przez Walne Zebranie Członków Oddziału w tajnym głosowaniu składa się z 3 osób, spośród których wybiera przewodniczącego.
2. Do obowiązków Komisji Rewizyjnej Oddziału należy przeprowadzenie przynajmniej raz w roku kontroli działalności Oddziału Towarzystwa.
3. Komisja Rewizyjna ma prawo występowania do Zarządu Oddziału z wnioskami wynikającymi z ustaleń kontroli.
4. Przewodniczący Komisji Rewizyjnej Oddziału może brać udział z głosem doradczym w posiedzeniach Zarządu Oddziału.

Rozdział VI**Majątek Towarzystwa**

§ 34.

1. Majątek Towarzystwa składa się z nieruchomości, ruchomości i funduszy.
2. Na fundusze Towarzystwa składają się:
 - 1) wpływy ze składek członkowskich,
 - 2) wpływy z majątku ruchomego i nieruchomego,
 - 3) dotacje i zapisy,
 - 4) wpisowe za udział w zjazdach naukowych.

§ 35.

Dla ważności pism dotyczących praw i obowiązków majątkowych Towarzystwa wymagane są podpisy prezesa, lub wiceprezesa Zarządu Głównego oraz Skarbnika.

§ 36.

Wszelkie postanowienia władz Towarzystwa, zmierzające do uszczuplenia majątku nieruchomego lub funduszy Towarzystwa wymagają zgody władzy rejestracyjnej.

Rozdział VII**Zmiana Statutu i rozwiązanie się Towarzystwa**

§ 37.

Zmiana Statutu następuje na podstawie Uchwały Walnego Zebrania Członków Towarzystwa, podjętej większością przynajmniej 2/3 głosów, przy obecności połowy liczby Członków uprawnionych do głosowania.

§ 38.

1. Rozwiązanie się Towarzystwa może nastąpić na podstawie uchwały Walnego Zebrania Członków Towarzystwa podjętej większością głosów przy obecności przynajmniej połowy Członków uprawnionych do głosowania.
2. Uchwała o rozwiązaniu się Towarzystwa określi sposób przeprowadzenia likwidacji oraz cel na jaki ma być przeznaczony majątek Towarzystwa.
3. Uchwała o przeznaczeniu majątku podlega zatwierdzeniu przez władzę rejestracyjną.

SPIS TREŚCI

R. Gondko, B. Słomiany, K. Ślaska—Strukturalne składniki błon erytrocytów	351
K. Staroń—Związki fluoryzujące jako wskaźniki zmian konformacyjnych błon związanych z transportem energii	375
J. Petryniak—Zastosowanie nukleaz do badania struktury i biologicznej aktywności RNA i DNA	391
E. Kurek—Fosfobiałka komórkowe i ich rola biologiczna	419
J. Chełkowski—Połączenia flawin z białkami	435
R. Lorenc—Postępy badań nad kalcytoniną	455
E. Suska-Brzezińska — Enzymatyczna inaktywacja neurohormonów	473
W. Janiszewska—Biosynteza kardenolidów i bufadienolidów	489
J. Opieńska-Blauth — Kwasy aminomasłowe	501
Recenzje książek (W. Ostrowski, J. Pawełkiewicz)	521
IV Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów, Konstanz, 14—19 marzec 1972 r. (Z. Kaniuga)	525
Statut Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	527

W 4-tym zeszycie 18-go tomu ukażą się:

1. Purynowe prekursorzy kwasów nukleinowych w roślinach nasiennych — *H. Rybicka*
2. Badania nad syntezą rybosomowych kwasów rybonukleinowych — *T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski*
3. Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy cz. I. Replikacja RNA — *A. Wodnar, J. Passent, A. Leonowicz*
4. Wirusy bakteryjne zawierające kwas rybonukleinowy cz. II. Replikacja RNA — *W. Filipowicz, W. Zagórski*

POSTĘPY BIOCHEMII

July 1972

ARTICLES IN POLISH

Volume 18	Number 3
R. Gondko, B. Slomiany, K. Ślaska — Structural Components of the Erythrocyte Membrane (<i>Dep. Biophys. Inst. Biochem. and Physiol. Univ. Łódź; Dep. Biochem. New York Medical College, New York; Dep. Gen. and Physiol. Chem. Med. School. (Łódź)</i>)	351
K. Staroń — Fluorescent Probes in Investigations of Energy-Linked Membranes Conformational Changes (<i>Dep. Enzymol. Inst. Biochem. Univ. Warszawa</i>)	375
J. Petryniak — Application of Nucleases in Studies on the Structure and Biological Activity of RNA and DNA (<i>Ludwik Hirsfeld Inst. of Immunol. and Exp. Therapy, Pol. Acad. Sci., Wrocław</i>)	391
E. Kurek — Cellular Phosphoproteins and Their Biological Function (<i>Dep. Biol. Mol., Inst. Microbiol. and Biochem. M. Curie Skłodowska Univ., Lublin</i>)	419
J. Chełkowski — Flavin-Protein Connections (<i>Inst. Food Technol. High School Agricult., Poznań</i>)	435
R. Lorenc — Progress on Calcitonin Research (<i>Dep. Biochem. Postgrad. Med. Train. Center, Warszawa</i>)	455
E. Suska-Brzezińska — Enzymatic Inactivation of Neurohormones (<i>Inst. Animal Physiol. High School Agricult., Kraków</i>)	473
W. Janiszowska — Biosynthesis of Cardenolids and Bufadienolids (<i>Inst. Biochem. Univ., Warszawa</i>)	489
J. Opieńska-Blauth — Aminobutyric Acids (<i>Dep. Physiol. Chem. Med. School, Lublin</i>)	501
Chronicle	521

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

SPIS TREŚCI

R. Gondko, B. Slomiany, K. Ślaska — Strukturalne składniki błon erytrocytów	351
K. Staroń — Związki fluoryzujące jako wskaźniki zmian konformacyjnych błon związanych z transportem energii	375
J. Petryniak — Zastosowanie nukleaz do badania struktury i biologicznej aktywności RNA i DNA	391
E. Kurek — Fosfobiałka komórkowe i ich rola biologiczna	419
J. Chełkowski — Połączenia flawin z białkami	435
R. Lorenc — Postępy badań nad kalcytoniną	455
E. Suska-Brzezińska — Enzymatyczna inaktywacja neurohormonów	473
W. Janiszowska — Biosynteza kardenolidów i bufadienolidów	489
J. Opieńska-Blauth — Kwasy aminomasłowe	501
Recenzje książek (W. Ostrowski, J. Pawełkiewicz)	521
IV Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów, Konstanz, 14—19 marzec 1972 r. (Z. Kaniuga)	525
Statut Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	527

Komunikat

Zawiadamiamy uprzejmie o zmianie adresu Redakcji Postępów Biochemii.

Korespondencję należy kierować na adres:

Redakcja Postępów Biochemii

Warszawa

ul. Freta 16

Biuro Redakcji mieści się w siedzibie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Redakcja