POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1973
tom 19
nr 4
KWARTALNIK
PSTBAH 19(4)
497-596 (1973)

http://rcin.org.pl

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii" publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępach Biochemii". Autorzy artykułu odpowiedzialni są za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły są honorowane według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dalsze 100 odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Autorzy proszeni są o przestrzeganie następujących wskazówek:

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.

Układ maszynopisu: strona okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, tytuł pracy oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, tytuły naukowe autora(ów), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu korzystny jest często podział na rozdziały i podrozdziały. Wydzielone z tekstu tytuły rozdziałów należy oznaczyć numeracją rzymską, a ewentualne podrozdziały opatrzyć dodatkową numeracją arabską (np. I-2, II-4 itp.). Tytuły podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie powinny być numerowane. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

Autorzy proszeni są o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o nie wprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

http://rcin.org.pl

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z POMOCĄ FINANSOWĄ AKADEMII NAUK

1973
tom XIX
zeszyt 4

KWARTALNIK
PSTBAH 19 (4) 497-596 (1973)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

http://rcin.org.pl

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (*Warszawa*)
Członkowie: M. Bagdasarian (*Warszawa*), M. Chorąży (*Gliwice*), J. Gregorczyk (*Szczecin*), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (*Wrocław*), A. Morawiecki (*Wrocław*), J. Pawełkiewicz (*Poznań*), T. Szczepkowski (*Kraków*)

REDAKTOR NACZELNY
Zofia Zielińska

KOMITET REDAKCYJNY

B. Czartoryska (*Warszawa*), M. Fikus (*Warszawa*), B. Grzelakowska-Sztabert (*Warszawa*), S. Lewak (*Warszawa*), P. Masłowski (*Toruń*), I. Szumiel (*Warszawa*)

Adres Redakcji
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1973

Nakład 2.200 (2.057+143)	Oddano do składania 16.VII.1973 r.
Ark. wyd. 8,0, druk. 6,25	Podpisano do druku w październiku 1973 r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono w październiku 1973 r.
Cena zł. 20.—	Zam. nr 1055/73 R-29

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

http://rcin.org.pl

Post. Biochem. 19, 499—531, (1973).

MARIAN KOCHMAN *, *ANDRZEJ DŻUGAJ* **

Wybrane zagadnienia ewolucji i ontogenezy niektórych białek oraz izoenzymów

Ontogeny and Phylogeny of Some Proteins and Isoenzymes

Selected aspects of cytochrome c and hemoglobin evolution and phylogeny, as well as ontogeny and phylogeny of FDP-aldolases and other enzymes were discussed.

W ostatnich latach nagromadziło się wiele danych doświadczalnych wskazujących na powszechność występowania enzymów w różnych molekularnych formach. Dzięki zastosowaniu subtelnych metod rozdziału, stwierdzono, że szereg krystalicznych białek, uważanych do niedawna za jednorodne, jest mieszaniną różnych molekularnych form. Pokazano, że krystaliczna aldolaza mięśniowa składa się z co najmniej pięciu różnych rodzajów cząsteczek (1, 2, 3), podobnie heterogenną jest dehydrogenaza aldehydu 3-P-glicerynowego, wyodrębniona i skrystalizowana z mięśni królika (2, 3, 4, 5), jak i wiele innych krystalicznych białek (enolaza, kinaza pirogronianowa, aldolaza drożdżowa itd.) (2, 3).

W niektórych wyżej wymienionych przypadkach udało się wykazać, że „mikroheterogenność" krystalicznych preparatów jest prawdopodobnie związana z nieznacznymi różnicami, jakie zostały znalezione w strukturze pierwszorzędowej podjednostek białkowych (aldolaza (6, 7, 8)) i może wynikać z wyrażania się allelicznych genów (3). W innych przypadkach liczby uzyskanych różnych molekularnych form danego enzymu nie dają się przyporządkować możliwym kombinacjom dwóch typów podjednostek w cząsteczce białkowej.

Heterogenność może być uwarunkowana nie tylko odmiennym zapisem genetycznym lecz również innymi przyczynami. Może być ona wynikiem selektywnej modyfikacji *in vivo*, tak jak to pokazano dla rybonukleazy A

* Doc. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki Akademii Medycznej we Wrocławiu.
** Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Wykaz stosowanych skrótów: FDP — D-fruktozo-1,6-dwufosforan; F-1-P — D-fruktozo-1-fosforan; LDH — dehydrogenaza mleczanowa; LDH-M — izoenzym dehydrogenazy mleczanowej, forma mięśniowa; LDH-H — izoenzym dehydrogenazy mleczanowej, forma sercowa; FDP-aldolaza — aldolaza fruktozodwufosforanowa.

http://rcin.org.pl

i B oraz cytochromu c i innych (9, 10). W przypadku dehydrogenazy jabłczanowej i aminotransferazy glutaminianowej innym źródłem wielopostaciowości jest zdolność tych enzymów do tworzenia stosunkowo trwałych stanów o różnej konformacji, tzw. konformerów (10, 11). Heterogenność może być rezultatem związania z enzymem grup niebiałkowych. Wiązanie takie może być słabe, oparte na siłach przyciągania elektrostatystycznego, siłach Wan der Waalsa itp., tak jak ma to miejsce w przypadku wiązania szeregu ligandów z białkami. Może to też być wiązanie kowalencyjne, np. kwasu sjalowego, jak ma to miejsce w przypadku kwaśnej fosfatazy stercza (12). Innym przykładem występowania enzymów w wielu molekularnych formach mogą być „błędy" w procesie transkrypcji lub translacji, czego dowodem mogą być zmiany w składzie aminokwasowym enzymów biosyntetyzowanych w stanach głodowych (13). W tabeli I podano przykłady różnych molekularnych form enzymów.

Tabela 1

Różne molekularne formy enzymów

Lp	Charakterystyka różnic wielorakich form enzymów	Przykłady
1	Białka niezależne genetycznie (izoenzymy)	Dehydrogenaza jabłczanowa mitochondrialna i cytoplazmatyczna, aldolaza A, B i C, dehydrogenaza mleczanowa M, H i X i inne.
2	Hybrydy dwóch lub większej ilości łańcuchów peptydowych związanych niekowalencyjnie	Hybrydy LDH H z LDH M lub hybrydy aldolazy A z B ($\alpha_3\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$)*
3	Genetyczne warianty (allele) (izoenzymy)	Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanowa u człowieka (blisko 50 wariantów)
4	Łańcuchy polipeptydowe związane z grupami nie białkowymi	Fosforylaza a i b
5	Białka będące wynikami degradacji (zmian) łańcucha polipeptydowego	Rodziny chymotrypsyn pochodzące z chymotrypsynogenu
6	Polimery pojedynczych podjednostek	Dehydrogenaza glutaminianowa o ciężarach 100 000 i 250 000
7	Formy różniące się konformacją (konformery)	Wszystkie allosteryczne formy enzymów

α-podjednostka LDH H lub aldolazy A
β-podjednostka LDH M lub aldolazy B

Wobec złożoności przyczyn występowania enzymów w wielorakich formach zdecydowaliśmy ograniczyć nasze opracowanie do izoenzymów, to znaczy do tych molekularnych form danego enzymu, które powstały w wyniku wyrażania się różnych genów (14).

W języku polskim ukazały się trzy opracowania dotyczące izoenzymów (15, 16, 17). Nie obejmowały one zagadnień związanych z ich ewolucyjnym

http://rcin.org.pl

rozwojem oraz zmian, jakim podlegają podczas różnicowania się komórek. Niniejszy artykuł jest próbą wypełnienia tej luki. Chcemy w nim również przedstawić wybrane zagadnienia ewolucji struktury niektórych znanych białek — a mianowicie hemoglobiny i cytochromu c, aby na tych przykładach omówić pewne charakterystyczne, ogólne kierunki zmian, jakim podlegają enzymy podczas filogenetycznego i ontogenetycznego rozwoju gatunków.

I. Podział i kryteria klasyfikacji izoenzymów

Izoenzymy dzielimy zasadniczo na dwie grupy: izoenzymy alleliczne i niealleliczne. W przypadku izoenzymów allelicznych każdy typ biosyntetyzowanych podjednostek znajduje się pod kontrolą współdominujących genów allelicznych. W organizmach diploidalnych w najprostszym przypadku będą występowały dwa rodzicielskie typy podjednostek białkowych u heterozygoty, a tylko jeden typ izoenzymu u homozygoty. W ontogenezie wzajemny stosunek obydwu alleli jest zwykle stały. Różnice strukturalne izoenzymów allelicznych nie są zazwyczaj zbyt wielkie i z tego względu trudno je odróżnić od siebie pod względem immunologicznym.

Przykładem allelicznych form izoenzymów mogą być zbadane przez grupę Neurath'a izoenzymy karboksypeptydazy A (18). Autorzy użyli do badań krystaliczne preparaty enzymów otrzymane z pojedynczych osobników i stwierdzili na czwartej pozycji od C-końcowego aminokwasu różnice w składzie procentowym: leucyny i waliny. Zaobserwowano przy tym taką prawidłowość, że jeśli w jednym przypadku było więcej leucyny na mol białka, to waliny znajdowano mniej i odwrotnie, ale suma tych dwóch aminokwasów wynosiła zawsze jeden mol na mol karboksypeptydazy. Wyniki te pozwoliły w roku 1966 postulować istnienie allelicznych form karboksypeptydazy A. W późniejszych pracach pokazano, że krystaliczne preparaty karboksypeptydazy A zawierały dwa izoenzymy i pochodziły od osobników heterozygotycznych. U osobników homozygotycznych wykazano obecność tylko jednego z allelicznych izoenzymów (19).

Jak wspomniano, alleliczne izoenzymy cechuje występowanie w stałym do siebie stosunku, ponieważ znajdują się pod kontrolą takiego samego operatora i genu regulatorowego. Wydaje się jednak, że nie zawsze tak musi być. Wystarczy sobie wyobrazić, że gen operatorowy jednego z alleli uległ również mutacji. Wówczas induktor i korepresor mogą mieć zmienione powinowactwo do zmodyfikowanego operatora, wtedy stopień wyrażania się genów allelicznych ulega zmianie.

Izoenzymy niealleliczne stanowią drugą grupę enzymów poligenicznych. Ich biosynteza jest kontrolowana niezależnie przez dwa lub więcej genów występujących w różnych loci. Takie izoenzymy są na ogół na tyle zróżnicowane w strukturze pierwszorzędowej, że łatwo je rozróżnić im-

http://rcin.org.pl

munologicznie. Uważa się, że zostały wytworzone w wyniku duplikacji genów i stanowią grupę homologiczną, która zwykle, mimo znacznych różnic w strukturze pierwszorzędowej, zachowuje podobną strukturę czwartorzędową.

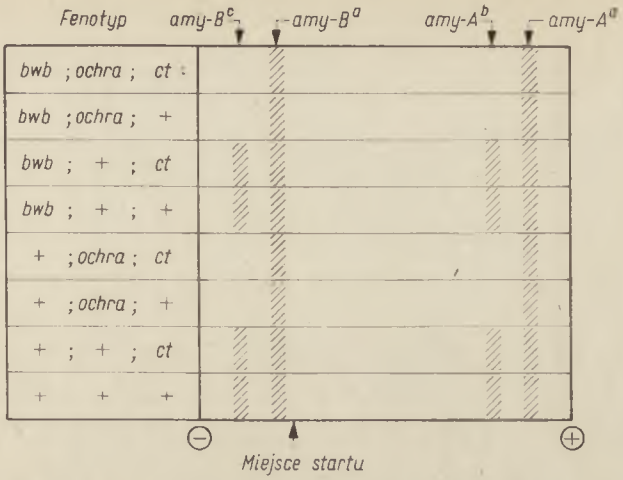
Podstawowym zagadnieniem przy badaniu różnych molekularnych form enzymów jest stwierdzenie, które z nich są izoenzymami, oraz — jeśli to możliwe — zlokalizowanie miejsca ich zapisu w aparcie genetycznym. Poznanie struktury pierwszorzędowej uzupełnione badaniami genetycznymi stanowi decydujące kryterium klasyfikacji izoenzymów. Ponieważ jednak zbadanie struktury pierwszorzędowej jak i wyznaczenie mapy genetycznej badanych form często przekracza możliwości zespołów badawczych, jako kryteria zastępcze stosuje się porównywanie map peptydowych, właściwości immunologicznych, katalitycznych, mas cząsteczkowych itd.

Dzięki zastosowaniu metod klasycznej genetyki oraz biochemii udało się w wielu przypadkach wyznaczyć lokalizację chromosomalną genów odpowiedzialnych za syntezę poszczególnych izoenzymów. Jako przykład mogą służyć badania O g i t y (20), przeprowadzone nad różnymi molekularnymi formami amylaz występującymi w organizmie muchy (*Musca domestica* L). Znane są mutanty tego owada charakteryzujące się brązowym kolorem ciała (bwb), oczyma koloru ochra (ocra) i ściętymi skrzydłami (ct).

Cechy te związane są odpowiednio z mutacjami na drugim, trzecim i czwartym chromosomie. Wszystkie osobniki muchy domowej posiadają po dwie grupy izoenzymów amylazy: pierwszą wędrującą do anody zwaną amy-A, i drugą wędrującą do katody zwaną amy-B. U dzikiego szczepu (R_p) stwierdzono w obrębie grupy pierwszej izoenzym amy-A^b w grupie drugiej izoenzym amy-B^c, szczep ten nie posiadał natomiast amy-A^a i amy-B^a. Osobniki o widocznych fenotypach bwb, ocra i ct nie posiadały iozenzymów amy-A^b i amy-B^c. W pokoleniu F_1 otrzymanym przez krzyżowanie dzikiego szczepu z potrójnym mutantem (bwb, ocra, ct, ♀ × R_p ♂) wszystkie osobniki posiadały identyczne zymogramy amylaz. Drugie pokolenie osobników F_2 otrzymanych przez wsteczne krzyżowanie (bwb, ocra, ct ♀ F_1 ♂) poddano analizie. Elektroforetyczny obraz izoenzymów u osobników F_2 przedstawiono na schemacie 1.

Otrzymano wyraźną segregację fenotypów: bwb; +; ct, bwb; +; +; +; +; ct, i +; +; +. Wszystkie te osobniki, które posiadały trzeci chromosom pochodzący od (R_p) (szczepu dzikiego), u heterozygoty posiadały izoenzymy amy-A^a, amy-A^b oraz amy-B^a i amy-B^c. Natomiast fenotypy bwb; ocra; ct, bwb; ocra; +, +; ocra; ct i +; ocra; +; w homozygotycznych warunkach posiadały amy-A^a i amy-B^a. Stąd wniosek, że gen (geny) odpowiedzialne za izoenzymy amy-A^b i amy-B^c są sprzężone z genami związanymi z kolorem oczu ochra znajdującymi się na trzecim chromosomie. Badania te pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że poszczególne izoenzymy w obrębie grup amy-A i amy-B są kontrolowane przez kodominu-

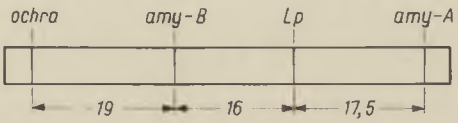
http://rcin.org.pl



Schemat 1. Elektroforogram amylaz u *Musca domestice*

Elektroforogram izoenzymów amylaz dla każdego fenotypu F_2 otrzymanych przez wsteczne krzyżowanie bwb; ochra; ct ♀ F_1 (bwb; ochra; ct ♀ ×Rp ♂) ♂. Z elektroforogramu wynika, że gen lub geny odpowiedzialne za izoenzymy amylaz amy-A^b i amy-B^c są połączone z genami odpowiedzialnymi za kolor oczu ochra leżącymi na trzecim chromosomie. Opracowano na podstawie Ogity (20)

jące geny alleliczne, natomiast każda grupa amylaz (A i B), kontrolowana jest przez oddzielne geny leżące na trzecim chromosomie. Badania stopnia wymiany poszczególnych odcinków trzeciego chromosomu w procesie crossing-over pozwoliły na zlokalizowanie genu dla amylaz formy A w odległości 17,5 jednostek mapy genetycznej na prawo od locus pętli skrzydła (schemat 2).



Schemat 2. Lokalizacja chromosomu odpowiedzialnego za syntezę amylaz

Lp. locus odpowiedzialny za pętlę skrzydła (loop of wing). Opracowano na podstawie Ogity (20)

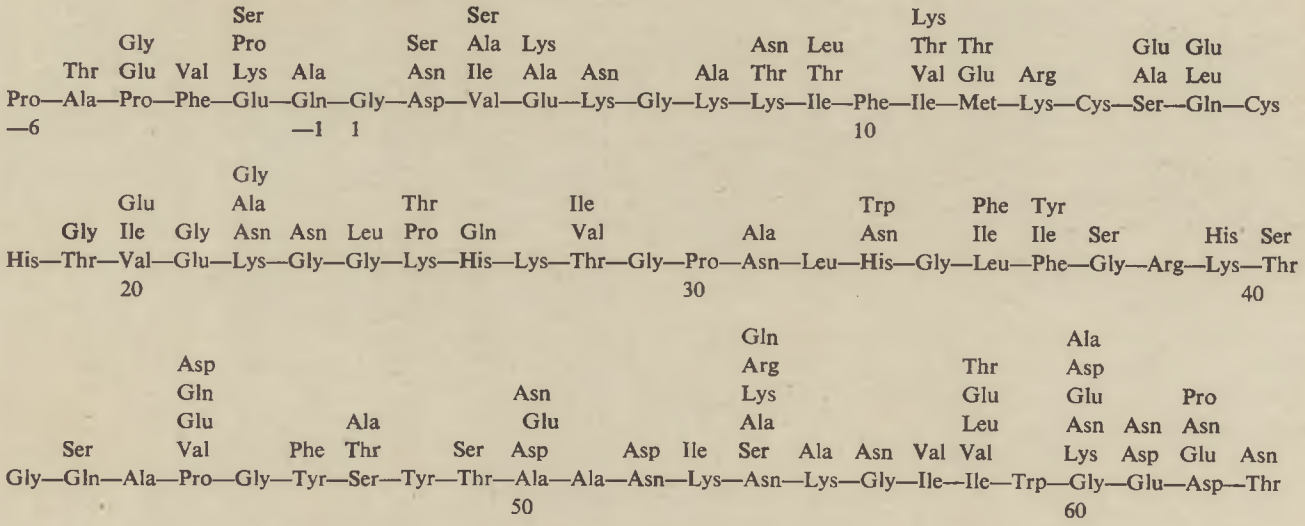
Locus dla formy B amylaz jest przesunięty o 16 jednostek w lewo od pętli na tym samym chromosomie.

Podobne badania pozwoliły na stwierdzenie, że izoenzymy kwaśnych fosfataz u much kontrolowane są przez parę współdominujących alleli w locus oddalonym o 26 jednostek od locus car recesywnego genu zmienionej barwy oczu znajdującego się na piątym chromosomie. Na tym chromosomie znajdują się loci większości genów esterazowych. Stwierdzono 24 różne formy molekularne esteraz, dla których zlokalizowano dotąd trzy oddzielne loci stwierdzające równocześnie u esteraz obecność enzymów mono i poligenicznych (20).

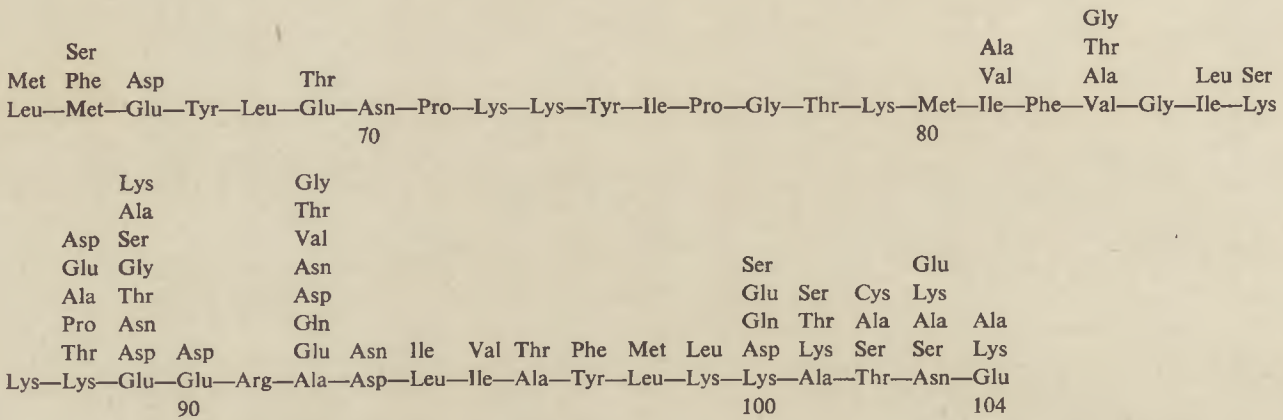
Genetyczne badania nad ludzkimi izoenzymami zostały szeroko omówione przez Harrisa i Hopkinsona (21).

http://rcin.org.pl

Struktury pierwszorzędowe cytochromów c u różnych gatunków



http://rcin.org.pl [304]



Podana sekwencja złożona jest z początkowego fragmentu sekwencji cytochromu c występującego u *Condida crusei* (pozycje od—6-1) oraz sekwencji cytochromu c u człowieka (pozycje od 1 do 104). Nad tą podstawową sekwencją umieszczono podstawienia aminokwasowe znalezione u następujących gatunków: makak, pies, kot, osioł, świnia, królik, kaczka, kangur, gołąb, kura, pingwin, żółw, wąż, tuńczyk, mucha, ćma, *Neurospora crassa*, drożdże. Cytochrom c szympansa jest identyczny z ludzkim cytochromem c, cytochrom c z owcy i krowy jest identyczny z cytochromem c ze świni. Na podstawie Margoliasha i Fitcha (22).

http://rcin.org.pl

II. Ewolucja białek

Jak wiadomo, drogę ewolucji wyznaczają dwa podstawowe procesy: mutacja i naturalna selekcja. Mutacje zachodzące w DNA są źródłem zmian w sekwencji łańcuchów polipeptydowych i prowadzą do powstania cząsteczek białkowych o odmiennych właściwościach. Selekcja nie wiąże się bezpośrednio ze zmianą sekwencji, ale z funkcją, jaką dane białko może spełnić (hormonalną, enzymatyczną, itp.). Wśród wielu poznanych mechanizmów ewolucji struktur białkowych duplikacje genów i punktowe mutacje odgrywają prawdopodobnie największą rolę w filogenezie izoenzymów. Ogólne typy zmian, jakim podlegają różne molekularne formy enzymów, są wspólne dla wszystkich struktur białkowych. Rozważmy je na przykładzie cytochromu c i hemoglobiny.

II-1. Cytochrom c

Ewolucja struktury cytrochromu c przebiegała na drodze punktowych mutacji, co zostało udokumentowane przez Margoliasha i Fitcha (22).

Cytochromy c zawierają jedną hemową grupę prostetyczną. Cechuje je punkt izoelektryczny bliski pH 10. Wszystkie cytrochromy c reagują dość łatwo z oksydazą cytrochromową ssaków i można je swobodnie zastępować w łańcuchu spalań komórkowych. Nazywa się je często cytochromami ssaków mimo, iż mogą pochodzić z tak odległych organizmów jak człowiek i drożdże. W tabeli 2 przedstawiono struktury pierwszorzędowe, a właściwie wariacje tych struktur obejmujące 20 różnych organizmów od drożdży do człowieka włącznie.

Porównując podobieństwa strukturalne można zauważyć:

1. Pozycje, w których występują te same aminokwasy.
2. Pozycje, w których następowały bardzo częste zmiany aminokwasów na ogół typu konserwatywnego z zachowaniem charakteru polarnego i wielkości łańcucha bocznego.
3. Zachowanie ogólnego fizykochemicznego charakteru całych fragmentów łańcucha polipeptydowego z zachowaniem aminokwasów hydrofobowych i zasadowych.

Badania statystyczne pokazały, że ze 103 do 110 aminokwasów, jakie wchodzą w skład cytochromów c, 27 do 29 zachowuje swoje położenie u większości różnych gatunków. Oczywiście przy porównywaniu dwóch dowolnych cząsteczek cytochromów ilość reszt, które nie uległy zmianie, jest znacznie większa. Porównując np. tak odległe filogenetycznie organizmy jak człowiek i drożdże widać, że w ich cytochromach aż 65 aminokwasów znajduje się w tych samych pozycjach. Spośród tych aminokwasów jedynie 28 jest niezbędnych do wykazania aktywności biologicznej. Identyczność pozostałych 37 reszt, stanowiąca ponad 1/3 całego łańcucha

http://rcin.org.pl

polipeptydowego, może być przypisana pozostałości po wspólnym przodku. Należy podkreślić, że mutacje w cytochromach nie są bezładnie rozrzucone, 38% całkowitej liczby aminokwasów zachowujących swoje położenie znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie hemu i prawdobodobnie stanowi miejsce reakcji z oksydazą cytochromową.

Jeżeli w czasie rozwoju ewolucyjnego substytucje aminokwasowe są wynikiem przypadkowego utrwalania selektywnie obojętnych lub prawie obojętnych mutacji, to wówczas zdaniem Ohta i Kimury (23) szybkość rozwoju ewolucyjnego cistronów może być przedstawiona w postaci całki szybkości mutacji v (s) i prawdopodobieństwa utrwalania danej mutacji u (s) jako funkcji współczynnika selekcji s. Całka ta nazywana jest efektywną neutralną szybkością mutacji:

$$K = 2N \int_{-2/Ne}^{2/Ne} u(s)v(s)ds$$

gdzie:

Ne i N — to efektywna i aktualna liczebność populacji,
v (s) — szybkość mutacji,
u (s) — prawdopodobieństwo utrwalania mutacji,
s — współczynnik selekcji.

Autorzy ci rozważyli wpływ efektywnej liczebności populacji i czasu generacji na efektywną neutralną szybkość mutacji, wyciągając wniosek, że jednolita szybkość zastąpień aminokwasowych w cząsteczkach białek u różnych linii rozwojowych jest zgodna z przypadkowym utrwaleniem neutralnych lub tylko w nieznacznym stopniu niekorzystnych mutacji. Natomiast wyraźnie korzystne dla funkcjonowania ustroju mutacje mogą wprowadzać znaczne zmiany w szybkości zastąpień aminokwasowych w białkach pośród różnych linii rozwojowych i tak np.: śledząc rozwój ewolucyjny insuliny u różnych linii rozwojowych kręgowców można zauważyć, że szybkość ewolucji tego białka była znacznie większa w linii prowadzącej do świnki morskiej (5,31 paulinga *), niż w innych liniach rozwojowych (24). Podobnie jest w przypadku hemoglobiny, której ewolucja przebiegała szybciej u niższych naczelnych (lemur) niż u pozostałych naczelnych (25, 26, 27).

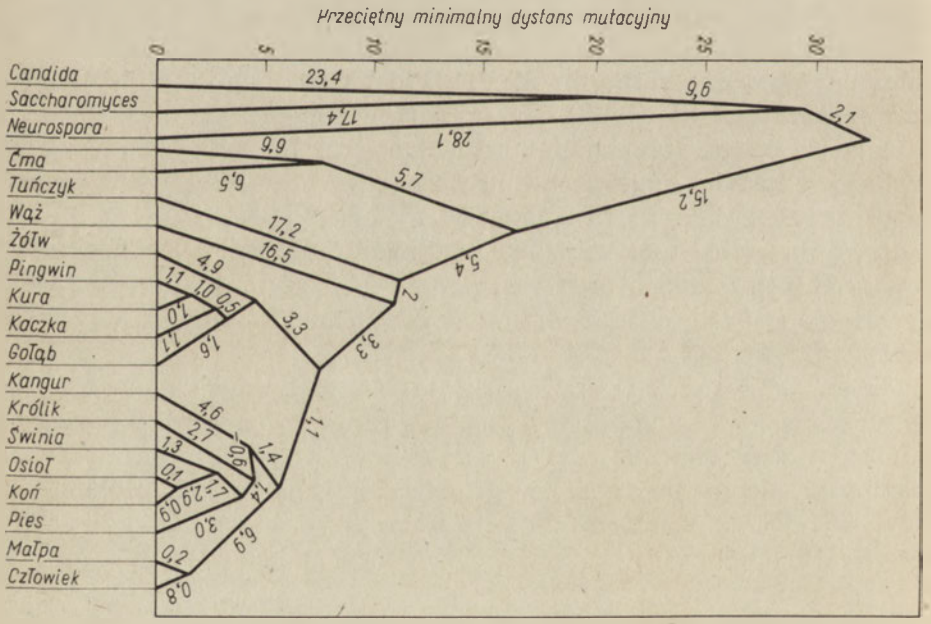
Zmian, jakie zaszły w czasie rozwoju filogenetycznego danego białka, nie można jednak przypisać przypadkowym mutacjom zasad w kodującej jednostce DNA. Najczęstszym typem mutacji wprawdzie jest przejście guaniny w adeninę, co zaobserwowano na przykład w hemoglobinie, nie zauważono jednak komplementarnej tranzycji w zakresie zasad pirymidynowych (22). Oprócz tego zauważono, że pewne aminokwasy, jak np. argi-

* przez jeden pauling rozumie się 1×10^{-9} zastąpień reszt aminokwasowych na jeden rok.

http://rcin.org.pl

nina, znacznie rzadziej utrwalają się w strukturach białkowych w wyniku mutacji niż wynikałoby to z przypadkowej wymiany zasad w czasie ewolucji. Ohta i Kimura (28) tłumaczą to tzw. selektywnym wymuszeniem aminokwasowych podstawień. Ponieważ arginina różni się znacznie od innych aminokwasów zarówno długością łańcucha węglowodorowego jak i ilością grup aminowych (w reszcie guanidylowej), zmiana jakiegokolwiek aminokwasu na argininę jest połączona zwykle z zasadniczą zmianą charakteru fizyko-chemicznego całej cząsteczki białkowej.

Na podstawie znajomości odcinków czasu, jaki dzielił zasadnicze grupy rozwojowe jak np. ssaki od ptaków, oraz znając liczbę zmienionych w tym czasie aminokwasów, można było wyznaczyć czas średni dla dokonania się jednej zmiany. Ptaki od ssaków dzieli około 280 milionów lat. W tym okresie zostało zastąpionych w cytochromach, średnio licząc 10,6 reszt aminokwasowych. Wynika z tego, że trzeba było około 26,4 milionów lat, aby jedna reszta aminokwasowa została zastąpiona przez inną (22). Takie same obliczenia można było zastosować do zmian zasad w łańcuchu polinukleotydowym DNA, otrzymując bardziej precyzyjną miarę jednej mutacji. Posługując się uzyskanymi jednostkami czasu zastąpienia (mutacji) jednego aminokwasu przez drugi, można było wyznaczyć przypuszczalny odcinek czasu, jaki dzieli w rozwoju ssaki lub ptaki od gadów, ryb, bezkręgowców a nawet drożdży. Na podstawie zaobserwowanych mutacji w łańcuchu polinukleotydowym cytrochromów, Fitch i Margoliash zrekonstruowali drzewo



Schemat 3. Drzewo genealogiczne cytochromu c
Na podstawie Margoliasha i Fitcha (22)

http://rcin.org.pl

filogenetyczne rozwoju gatunków, łącząc ze sobą te gatunki, które dzieliła najmniejsza liczba mutacji (schemat 3). W obliczeniach opartych na rachunku statystycznym, uwzględniono różnice długości łańcuchów polipeptydowych różnych cytrochromów, stąd wartości ułamkowe (22).

W ten sposób otrzymano kopię znanego z biologii drzewa filogenetycznego łącznie ze znanymi przypadkami regresji ewolucji, zaznaczonymi wartościami ujemnymi. Na tej podstawie pokazano również, że cytochromy pewnych gatunków uległy ewolucji szybciej niż innych, np. cytochrom królika dzieli od wspólnego przodka co najmniej 3,5 mutacji, podczas gdy cytochrom człowieka aż 7,7 mutacji. Powyższe badania nie tylko pozwoliły na systematyczne uszeregowanie zmian filogenetycznych, ale umożliwiły odgadnięcie zmian, jakie miały miejsce w strukturze białek u nie zbadanych dotąd organizmów leżących na tej samej linii rozwoju. Jednak, mimo tak obszernej wiedzy odnośnie ewolucji struktury cytochromów, nie znamy tej pierwotnej formy białkowej, z której wywodzą się cząsteczki cytochromów c.

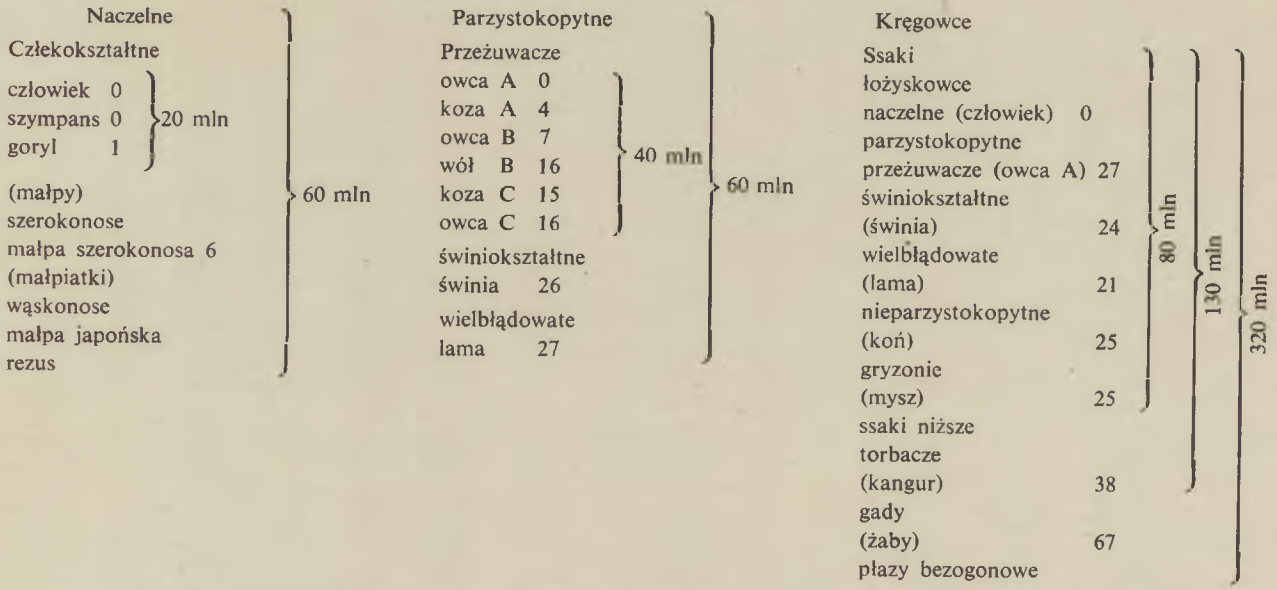
II-2. Hemoglobina

Związek pomiędzy duplikacją chromosomów a pojawieniem się nowych mutacji po raz pierwszy został zaobserwowany przez Bridgesa (29). Duplikacje mogą być dwojakiego rodzaju, mogą prowadzić do powtórzenia części łańcucha polinukleotydowego lub do duplikacji całkowitego cistronu. Nowy cistron może przez pewien czas nie ujawniać się (milczący gen), mimo to może ulegać dalszej mutacji. Mutacje tego cistronu mogą kumulować się w długim okresie czasu, a następnie na skutek mutacji mechanizmu odpowiedzialnego za kontrolę biosyntezy białka, zmieniony cistron może się nagle uczynnić, w wyniku czego pojawia się białko o radykalnie nieraz zmienionych właściwościach. Najlepiej poznanymi białkami, których ewolucja przebiegała prawdopodobnie właśnie przez duplikacje cistronów i punktowe mutacje genów są łańcuchy α, β, δ, γ hemoglobiny oraz mioglobina (30, 31). Według Ingrama (30), wszystkie cistrony odpowiedzialne za syntezę łańcuchów α, β, γ, δ hemoglobiny oraz mioglobiny pochodzą od wspólnego prekursora. Cistrony odpowiedzialne za syntezę łańcuchów α i β nie tylko różnią się znacznie między sobą, lecz również leżą na różnych chromosomach (32), podczas gdy cistrony kodujące łańcuchy δ i γ są jeszcze ze sobą sprzężone (33).

Porównując obszary homologiczne hemoglobin ludzkich można było zrekonstruować najbardziej prawdopodobne następstwo duplikacji genów zachodzące w czasie ewolucji. Pokazano np., że łańcuchy δ i β są najbardziej podobne do siebie, posiadając na ogólną liczbę 146 aminokwasów, 136 identycznych pozycji. Łańcuchy γ posiadają identyczne reszty aminokwasowe w 109 pozycjach z łańcuchem β i 106 z łańcuchem δ. Można było wyciągnąć wniosek, że łańcuchy β i δ oddzieliły się stosunkowo niedawno

http://rcin.org.pl

Szybkość podstawień aminokwasowych w łańcuchach β-hemoglobiny



Ilość aminokwasowych podstawień i przybliżony czas dzielący poszczególne gatunki od wspólnego przodka (38) opracowano na podstawie Chauveta i Achera.

http://rcin.org.pl

w rozwoju ewolucyjnym, podczas gdy ich wspólny przodek (β-δ-prekursor), oddzielił się znacznie wcześniej od prekursora łańcucha γ. Łańcuch α wykazuje znacznie mniej podobieństw od innych łańcuchów posiadając tylko 65 wspólnych reszt aminokwasowych z łańcuchem β, 62 z łańcuchem δ i 59 z łańcuchem γ. Mniej więcej jednakowe podobieństwo między łańcuchem α i każdym członkiem grupy β, δ, γ sugeruje, że prekursor łańcucha α oddzielił się od prekursora łańcuchów γ, β, δ najwcześniej w ewolucji.

Badania Scoulod'ego (34, 35) nad mioglobiną foki wykazały, że jej struktura przestrzenna jest bardzo podobna do mioglobiny spermy wieloryba. Porównując strukturę I-rzędową mioglobiny nasienia wieloryba z łańcuchami α i β-hemoglobiny ludzkiej wykazano 37 pozycji o identycznych resztach aminokwasowych. W ostatecznej konkluzji wszystkie te łańcuchy powinny posiadać wspólnego przodka, co pozostaje w całkowitej zgodności z badaniami Kendrew (36) i Perutza (37), którzy wykazali uderzające podobieństwo struktury przestrzennej mioglobiny i hemoglobiny mimo znacznych różnic w strukturze pierwszorzędowej.

Ostatnie badania nad ewolucją łańcuchów hemoglobiny prowadzone przez Chauveta i Achera (38), dostarczyły dalszych informacji. Autorzy ci, analizując ilość mutacji, jakie zaszły u przedstawicieli 26 gatunków kręgowców (od żaby do człowieka), stwierdzili, że aczkolwiek liczba substytucji jest zależna od czasu, to nie jest do niego proporcjonalna.

W łańcuchach β hemoglobiny wykazano 54 niezmienione pozycje aminokwasowe. Znaczna część tych konserwatywnych pozycji występuje w dwóch odcinkach łańcucha polipeptydowego pomiędzy pozycjami 28 a 40 oraz 96 a 108, licząc według numeracji przyjętej dla ludzkiej hemoglobiny. Pozycje 30, 33, 34, 35 są obsadzone przez aminokwasy pełniące rolę aminokwasów kontaktowych między łańcuchami β_1 i α_1, natomiast pozycje 36, 37, 39, 40 między β_1 i α_2 podjednostkami a pozycja 38 jest kontaktowa dla β-hemu. Nie zmieniająca się sekwencja aminokwasów w pozycji 96 do 108 może być wyjaśniona koniecznością zachowania kontaktu pomiędzy β łańcuchem i hemem (pozycje 96 i 98) z jednej strony, a dwoma α łańcuchami — (pozycje 97, 98, 99, 101, 102, 108) z drugiej strony.

Jak wiadomo, efekt Bohra, który łączy zmianę powinowactwa hemoglobiny do tlenu ze zdolnością wiązania protonu (39) przez hemoglobinę, wynika z obecności wiązań solnych w łańcuchach β, występujących pomiędzy His—146 i Asp—94 (40, 41), oraz Cys—93 (42). W łańcuchu β-hemoglobiny u ssaków, aminokwasy w tych wszystkich pozycjach pozostały nie zmienione.

Omówione wyżej badania nad zachowaniem budowy hemoglobiny, (mimo, że nie odnoszą się do cząsteczki enzymu) wyraźnie pokazują występowanie ścisłego związku pomiędzy stałością witalnych fragmentów struktury a funkcją cząsteczek białkowych. Na marginesie powyższych rozważań chcielibyśmy nadmienić, że wg McLachlana (43) powtarzające się sekwencje w cząsteczkach różnych białek nie stanowią dowodu na to,

http://rcin.org.pl

że powstały one przez duplikację genu u wspólnych przodków. Na podstawie rachunku statystycznego autor dowodzi, że większość dotychczas poznanych białek o złożonej strukturze nie powstała przez duplikację prostych cząsteczek, lecz wynikła ze stopniowego wzrostu łańcucha polipeptydowego wokół obszaru centrum aktywnego, charakteryzującego się względną trwałością składu aminokwasowego w procesie ewolucji.

III. Filogeneza izoenzymów

Brak w tej chwili tak wyczerpujących danych na temat struktury izoenzymów jak te, którymi dysponujemy w przypadku cytochromów, hemoglobiny, rybonukleazy i niektórych innych białek. Rozwój ewolucyjny izoenzymów można jednak prześledzić w oparciu o szereg pośrednich metod badania struktury. W niniejszym artykule ograniczymy się do dokładniejszego opisania badań nad ewolucją dwóch enzymów: FDP-aldolazy i anhydrazy węglanowej.

Porównując izoenzymy występujące w organizmach stojących na różnym stopniu rozwoju filogenetycznego można było wykazać, która z form izoenzymów jest filogenetycznie starsza. Jako przykład mogą posłużyć badania Tashianna i Shrefflera (44) nad anhydrazą węglanową.

III-1. Anhydraza węglanowa

Erytrocyty ssaków zawierają jedną lub dwie formy tego enzymu pozostających pod kontrolą dwóch niezależnych genów. Każda z tych form może występować w jednej lub kilku zmutowanych postaciach różniących się ruchliwością elektroforetyczną. Jak stwierdzono, aktywności specyficzne formy II anhydrazy u różnych gatunków są do siebie bardzo zbliżone, co wskazuje na znaczne wzajemne podobieństwo strukturalne, natomiast aktywności specyficzne formy I wykazują duże różnice gatunkowe. Składy aminokwasowe tych izoenzymów okazały się podobne. Anhydrazy te różniły się między sobą zawartością seryny, glicyny, leucyny zachowując jednak dla określonej formy molekularnej stałość składu wśród różnych gatunków. Porównanie map peptydowych oraz badania immunologiczne dostarczyły dalszych dowodów, że struktura formy II nie zmieniła się w czasie filogenezy. W badaniach immunologicznych posłużono się przeciwciałami skierowanymi, przeciwko ludzkim formom anhydrazy I i II. Przeciwciała te użyto do badań krzyżowych z anhydrazami człowieka, małp oraz gryzoni. Uzyskane wyniki wykazały brak różnic immunologicznych anhydrazy II u naczelnych oraz różnice w strukturze anhydrazy I. Stwierdzono, że przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej anhydrazie I lub II są specyficzne dla swoich antygenów i u naczelnych nie dają reakcji

http://rcin.org.pl

krzyżowych. Natomiast te same przeciwciała były nie specyficzne w odniesieniu do anhydrazy I i II występujących u gryzoni. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że jakkolwiek anhydrazy I i II człowieka różnią się znacznie strukturą, to anhydrazy gryzoni nie są jeszcze między sobą dostatecznie zróżnicowane i dlatego dają reakcje precypitacji z obu formami ludzkich przeciwciał (45).

Badania nad częstotliwością mutacji anhydrazy węglanowej I i II w erytrocytach ludzi, małp starego oraz nowego świata potwierdziły przypuszczenia, że forma I ulegała znacznie częściej mutacjom niż forma II (44, 46). Pojawienie się wariantów jednej z form nie było związane ze zmianami struktury II formy, co wskazuje, iż są one wynikiem wyrażania się oddzielnych niezależnych od siebie genów.

Jak wspomnieliśmy, obok naczelnych, gryzonie posiadają obie formy anhydrazy, w związku z powyższym przypuszcza się, że duplikacja genów miała miejsce jeszcze przed wykształceniem się tych gatunków. U ryb występuje tylko jedna forma molekularna anhydrazy o właściwościach zbliżonych do formy II (47). Powyższe doświadczenia, mimo że jeszcze nie ostateczne sugerują przybliżony czas zajścia duplikacji genu, pozwalają też stwierdzić, że forma II anhydrazy jest ewolucyjnie starsza. W erytrocytach przeżuwaczy występuje też tylko jedna forma molekularna anhydrazy a badania nad strukturą pierwszorzędową oraz właściwościami katalitycznymi wskazały, że należy ona do formy II anhydraz (46). Prawdopodobnie jednak gen anhydrazy I z erytrocytów przeżuwaczy nie zaniknął lecz uległ represji, ponieważ izoenzym ten można wykazać w komórkach epitelialnych żołądka (*rumen*) (48).

III-2. Aldolazy fruktozodwufosforanowe

Innym pasjonującym przykładem ewolucji enzymów jest ewolucja FDP-aldolaz. Należą one do enzymów o bardzo starym rodowodzie. Występują wszędzie tam, gdzie istnieje metabolizm węglowodanowy. Wśród FDP-aldolaz występują zarówno białka proste jak i złożone (metaloproteidy). Różnią się między sobą nie tylko specyficzną aktywnością enzymatyczną, ale również mechanizmem katalizowanej reakcji. Występują wśród nich, zarówno białka o wysoko zorganizowanej strukturze czwartorzędowej jak i takie, które w ogóle struktury czwartorzędowej nie posiadają.

Zgodnie z zaproponowaną przez R u t t e r a nomenklaturą (49), aldolazy dzielimy na dwie klasy. Klasę I występującą głównie u zwierząt i roślin samożywnych oraz klasę II występującą u bakterii, grzybów. Zarówno aldolazy klasy I jak II występują w *Euglenie* i *Chlamydomonas*. Ciężar cząsteczkowy aldolaz klasy I wynosi około 160 000, w centrum aktywnym znajduje się lizyna tworząca z substratem (fosforanem dwuhydroksyacetonu) labilny związek, związek typu zasady Schiffa. Redukcja tej zasady borowodorkiem prowadzi do inaktywacji aldolaz klasy I.

http://rcin.org.pl

Typ aldolazy	Pochodzenie aldolazy	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aldolazy Kl. I Typ A	Królik (57) mięśnie szkieletowe	Ala	Leu	Ser	Asn	His	His	Ile	Tyr	Leu	Gln	Gly	Thr
	Watłusz (58) mięśnie szkieletowe	Ala	Leu	Ser	Asp	His	His	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Thr
	Żaba (59) mięśnie szkieletowe	Ala	Leu	Ser	Asx	His	His	Val	Tyr	Leu	Glx	Gly	Thr
	Jesiotr (60, 61) mięśnie szkieletowe	Ala	Leu	Ser	Asp	His	His	Val	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr
Aldolazy Kl. I Typ B	Królik (62) wątroba	Ala	Leu	Asn	Asp	His	His	Val	Tyr	Leu	Gly	Gly	Thr
	Wół (62) wątroba	Ala	Leu	Asn	Asp	His	His	Val	Tyr	Leu	Gly	Gly	Thr
	Liście szpinaku (63)												

Struktury fragmentów N-końcowych

Typ aldolazy	Pochodzenie aldolazy	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aldolaza Kl.I Typ A	Królik (64) mięś. szkiel.	Pro	His	Ser	His	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Lys
	Królik (8) mięś. szkiel.												
	α-podjednost.	Pro	His	Ser	His	Pro	Ala	Leu	Thr	Glu	Gln	Lys	
	β-podjednost.	Pro	His	His	His	Pro	Ala	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	
Aldolaza Kl. I Typ C	Królik (1) mózg	Pro	His	Ser	Tyr	Pro	Ala						

http://rcin.org.pl

ralne FDP-aldolaz
trów aktywnych

Tabela 4

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Leu	Leu	Lys	Pro	Asn	Met	Val	Thr	Pro	Gly	His	Ala	Cys	Thr	Gln	Lys
Leu	Leu	Lys	Pro	Asn	Met	Val	Thr	Ala	Gly	His	Ser	Cys	Ser	His	Lys
Leu	Leu	Lys	Pro	Asx	Met	Val	Thr	Ala	Gly	Asx	Ala	Cys	Thr	Glx	Lys
Leu	Leu	Lys	Pro	Asn	Met	Val	Thr	Ala	Gly	Gln	Ala	Cys	Thr	Lys	Lys
Leu	Leu	Lys	Pro	Asn	Met	Val	Thr	Ala	Gly	His	Ala	Cys	Thr	Lys	
Leu	Leu	Lys	Pro	Asn	Met	Val	Thr	Ala	Gly	His	Ala	Cys	Thr	Lys	
Leu	Leu	Lys	Pro	Ser											

Struktury fragmentów C-końcowych

Typ aldolazy	Pochodzenie aldolazy									
Kl. I Typ A	Królik (65) mięs. szkiel.	α	Phe	Leu	Ile	Ser	Asn	His	Ala	Tyr
		β	Phe	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Ala	Tyr
Kl. I Typ B	Królik (66) wątroba			Gly	Phe	Leu	Ala	Thr_2	Ser_2	Tyr
Kl. I Typ C	Królik (67) mózg							Ser	Ala	Tyr
Kl. I Typ A	Szczur (68) mięś. szkiel.									Tyr
Kl. I Typ B	Szczur (68) wątroba									Tyr
Kl. I Typ A	Człowiek (69) mięś. szkiel.									Tyr
Kl. I Typ A	*Ascaris suum* mięśnie (70) wór skórno-mięśniowy									Tyr

http://rcin.org.pl

Aldolazy klasy II są metaloenzymami o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym około 80 000; w centrum aktywnym w miejsce lizyny występuje jon metalu dwuwartościowego: żelazo, cynk, mangan lub kobalt, które mogą się wzajemnie zastępować (50). Aldolazy te aktywują się związkami SH i jonami potasu, natomiast hamowane są przez związki kompleksujące metale jak np. EDTA (51).

Wśród aldolaz klasy I znaleziono u ssaków trzy izoenzymy: aldolazy A, B i C. U prymitywnych ryb obok aldolaz A, B i C wykazano elektroforetycznie nowy rodzaj cząsteczek o aktywności aldolazowej, który nazwano aldolazą D (52). Aldolazy A, B i C różnią się między sobą strukturą pierwszorzędową, a co za tym idzie właściwościami katalitycznymi, immunologicznymi oraz ruchliwością elektroforetyczną.

Struktura podjednostkowa aldolaz A, B i C jest tetrameryczna (53, 54, 55). W wypadku dysocjacji i reasocjacji mieszaniny aldolaz A i C lub A i B, obok dwóch wyjściowych cząsteczek powstają trzy hybrydy $\alpha_3\gamma$, $\alpha_2\gamma_2$, $\alpha\gamma_3$ lub $\alpha_3\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$ tworzące się w następstwie przypadkowego łączenia się ze sobą podjednostek aldolazowych, gdzie α są podjednostkami aldolazy A, β-podjednostkami aldolazy B, a γ-podjednostkami aldolazy C (55, 56).

Aldolazy A, B i C dają specyficzne reakcje immunologiczne (49, 56). Przeciwciała anty-A reagują tylko z aldolazą A, anty-B tylko z aldolazą B i anty-C z aldolazą C. Opierając się na danych opublikowanych w latach 1968—1972 (1, 8, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71) zestawiliśmy w tabeli 4 analogie strukturalne fragmentów C i N-końcowych oraz centrów aktywnych FDP-aldolaz pochodzących z różnych gatunków.

Badania pracowni Horeckera (57, 66), Perhama (60, 71) i Ruttera (1) pokazały, że aldolazy A, B i C z królika mają zbliżone sekwencje C-końcowe i N-końcowe oraz struktury centrów aktywnych (57, 62). Zaobserwowane różnice w strukturze pierwszorzędowej w zasadzie odnoszą się do nielicznych zastąpień natury konserwatywnej i można je przypisać pojedynczym zmianom zasad w łańcuchu polinukleotydowym W rejonie centrum aktywnego występuje tylko jedno opuszczenie aminokwasu — brak seryny u aldolazy A (57).

Ponieważ lizyna występująca w centrum aktywnym jest niezbędna do przejawiania funkcji biologicznej aldolaz, zachowanie niezmienionej struktury w tym obrębie wydaje się oczywiste. W przedstawionych sekwencjach aldolaz A, B i C uderza jednak podobieństwo fragmentów C i N-końcowych. Mogłoby to sugerować ich udział w katalizowaniu reakcji enzymatycznej. Nie stwierdzono zależności pomiędzy funkcją katalityczną a obecnością N-końcowych reszt aminokwasowych, natomiast usunięcie C-końcowej tyrozyny (tabela 5) powoduje utratę aktywności enzymatycznej względem FDP aldolazy A o 96%, aldolazy B o 50% i o 90% u aldolazy C (67). Aktywności enzymatyczne aldolaz A, B i C względem FDP znacznie się między sobą różnią, po usunięciu C-końcowego aminokwasu stają się do

http://rcin.org.pl

Tabela 5

Wynik działania karboksypeptydazy A na aktywność katalityczną aldolaz A, B i C.

Aldolaza	Wyjściowa aktywność specyficzna			Końcowa aktywność specyficzna		
	FDP	F-1-P	FDP : F-1-P wyjściowa	FDP	F-1-P	FDP : F-1-P końcowa
A	19	0,40	47	0,51	0,26	2
B	0,98	0,99	1,0	0,45	0,53	1,02
C	6,6	0,53	12,5	0,46	0,24	1,9

Opracowano na podstawie badań Penhoeta i wsp. (67).

siebie zbliżone. Wynika z tego, że C-końcowy fragment aldolazy jest funkcyjny i od niego uzależniona jest przede wszystkim aktywność względem FDP. Nie ulega wątpliwości, że mimo istniejących różnic aldolazy A, B i C stanowią homologiczną grupę białek.

Porównanie map peptydowych króliczych aldolaz A, B i C wykazało, że większość plam peptydowych nie pokrywa się ze sobą (49, 67). Można stąd wnosić, że królicze aldolazy A, B i C jakkolwiek homologiczne są już dość odległe od siebie w sensie ewolucyjnym.

Porównawcze badania Perhama i Andersona (71) wykazały, że aldolazy mięśniowe z królika, świni, wołu i jesiotra, a więc pochodzące z odległych szczebli drabiny ewolucyjnej, posiadają zbliżone składy aminokwasowe, mapy peptydowe, ich N-końcowym aminokwasem jest prolina. Ponadto posiadają takie same aminokwasy N-końcowe we fragmentach otrzymanych po bromocyjanowaniu i rozbiciu łańcuchów polipeptydowych przy metionianach (60). Można przypuszczać, że wszystkie te aldolazy pochodzą od tego samego genu zmieniającego się w czasie rozwoju filogenetycznego na drodze punktowych mutacji. Śledząc rozwój filogenetyczny FDP-aldolaz, widzimy, że u zwierząt jednokomórkowych występuje tylko jeden typ aldolazy stale zachowujący właściwości klasy I (72). U niektórych bezkręgowców obserwuje się już nie jedną lecz dwie różne molekularne formy aldolaz (72, 73). Ostatnio przeprowadzone badania wykazały, że obydwie te formy posiadają właściwości aldolaz klasy I (74). Stwierdzono nadto, że w swych właściwościach molekularnych i katalitycznych są one bardziej zbliżone do aldolaz typu A aniżeli do typu B (70). Wydaje się zatem, że można z dużym prawdopodobieństwem wysunąć przypuszczenie, że właśnie aldolaza A jest najstarszą filogenetycznie formą (70).

Omawiając aldolazę A wspomnieć należy o tzw. zjawisku mikroheterogenności. Mianowicie stwierdzono, że krystaliczne preparaty aldolazy A z mięśni królika występują w pięciu molekularnych formach (1, 2, 3). Spowodowane to jest prawdopodobnie istnieniem dwóch typów podjednostek (71, 74, 75, 76, 77), które, jak to sugeruje Hajos i wsp., różnią się sek-

http://rcin.org.pl

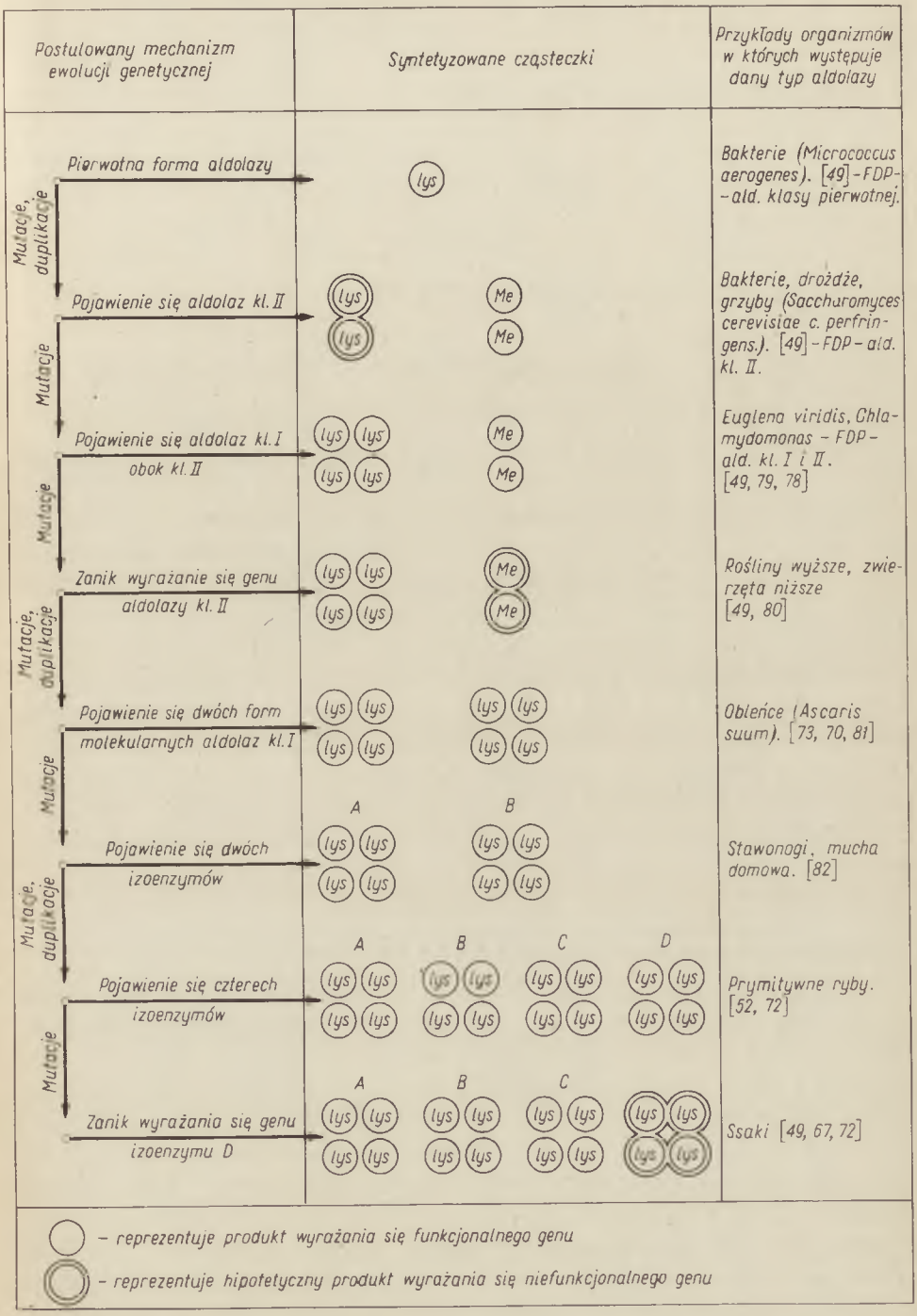
wencją w obszarze N-końcowego aminokwasu (8). Grupa Horeckera wykazała, że podczas wzrostu organizmu królika następuje specyficzna dezamidynacja reszty asparaginianowej położonej blisko wolnej grupy karboksylowej cząsteczki (75, 65). Wynikałoby z tego, że mikroheterogenność aldolazy A jest wynikiem łączenia się ze sobą co najmniej dwóch różnych typów podjednostek białkowych, które mogły powstać zarówno w wyniku modyfikacji *in vivo* łańcuchów polipeptydowych, jak też i takich, które są rezultatem wyrażania się dwóch prawdopodobnie allelicznych genów. Trudno powiedzieć, który z tych procesów przeważa, faktem jest, że obok pięciu głównych frakcji w preparatach krystalicznej aldolazy A znajdowano zawsze ślady dodatkowej heterogenności (2, 3, 7).

Przytoczone na wstępie różnice strukturalne między aldolazami klasy I i II zdawały się wykluczać możliwości ich pochodzenia od tego samego prekursora genetycznego. Wydawało się, że stanowią one przykład ewolucji niezależnych linii rozwojowych (49). Ostatnie prace grupy Ruttera sugerują jednak pewne podobieństwa między tymi dwoma klasami (78). Badania te były oparte wyłącznie na analizie składów aminokwasowych aldolazy drożdżowej oraz króliczych aldolaz A, B i C. Z obliczonych wartości odchylenia strukturalnego można było wyciągnąć wniosek, że wbrew dotychczasowym poglądom istnieje pokrewieństwo pomiędzy tymi klasami. Tym bardziej, że jak wykazali Harris i wsp. (78), mimo różnych ciężarów cząsteczkowych aldolaz klasy I i II, ciężary ich podjednostek są takie same i wynoszą około 40 000.

W roku 1970 Lebherz odkrył w *Micrococcus aerogenes* aldolazę (52) o właściwościach zupełnie odmiennych od aldolaz typu bakteryjnego. Aldolaza odkryta przez Lebherza posiada właściwości zbliżone do aldolaz klasy I z lizyną centrum aktywnym, lecz składa się z jednego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej około 34 000. Opierając się na tym odkryciu, jak również na innych danych literaturowych (49, 70, 72, 73, 78, 79, 80, 81, 82, 83) można założyć hipotetyczny przebieg ewolucji FDP-aldolaz, który przedstawiono na schemacie 4.

Wydaje się, że aldolaza z *Micrococcus aerogenes* może być zachowanym śladem praprzodka cząsteczki aldolazowej o masie około 40 000 i strukturze 1-podjednostkowej. Można zatem założyć, że na początku drogi ewolucyjnej aldolazy istniał gen funkcjonalny dla cząsteczek złożonych tylko z jednego łańcucha polipeptydowego. W czasie dalszego rozwoju ewolucyjnego, prawdopodobnie na skutek duplikacji genu, powstały dalej dwa niezależne geny, z których jeden funkcyjny ewoluował w kierunku biosyntetyzowania łańcuchów polipeptydowych, które łatwo uległy dimeryzacji lecz do przejawiania swej aktywności w miejsce lizyny potrzebowały metalu dwuwartościowego (klasa II). Drugi gen początkowo niefunkcjonalny ewoluował również w kierunku biosyntetyzowania łańcuchów polipeptydowych łatwo dimeryzujących, a potem tetrameryzujących, a które nie potrzebowały podobnie jak ich protoplasta metalu do pełnienia

http://rcin.org.pl



Schemat 4. Postulowany przebieg rozwoju filogenetycznego FDP-aldolaz.

http://rcin.org.pl

swej funkcji katalitycznej (klasa I). Funkcjonalny gen aldolaz klasy I ujawnił się nagle u progenitorów, jak *Euglena* i *Chlamydomonas*, obok aldolaz klasy II (49, 83, 79). Następnie podczas dalszej ewolucji aldolazy klasy II zanikły, a w obrębie klasy I, w wyniku nowych duplikacji genów, powstały aldolazy A, B, C i D. Wydaje się, że podczas dalszego rozwoju filogenetycznego aldolaza D zanikła.

Bardzo użyteczne do badania homologii sekwencji aminokwasowej izoenzymów okazało się obliczanie współczynnika korelacji (CC) (84) zdefiniowanego jako:

$$Cc = \frac{\sum(xy) - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}}{\sum(x)^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \cdot \sum(y)^2 - \frac{\sum(y)^2}{n}}$$

gdzie X i Y — przedstawiają ułamki molowe porównywanych par aminokwasów a „n" stanowi całkowitą liczbę porównań, tj. zazwyczaj 17—20 dla aminokwasów znajdujących się w danym białku. CC zawarty jest w granicach od 0 do 1, przy czym dąży do jedności w miarę wzrostu podobieństwa struktury i łańcucha polipeptydowego.

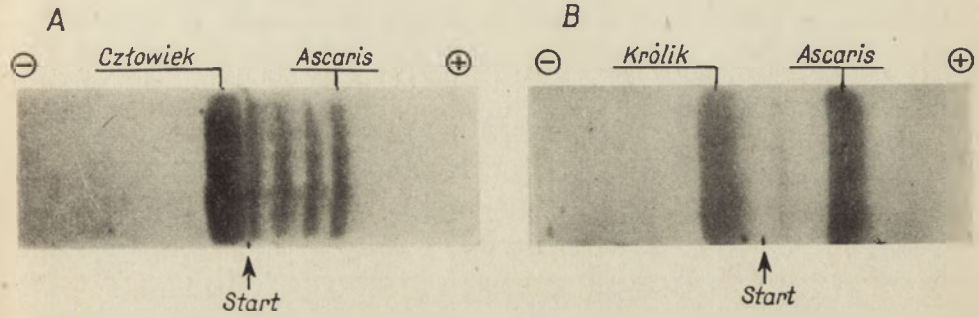
Obliczone ze składu aminokwasowego współczynniki korelacji potwierdziły na przykładzie kilku białek, znane z biologii drzewo genealogiczne rozwoju gatunków. Współczynniki korelacji aldolazy A z tkanek zwierząt zaliczanych do różnych gatunków są bliskie jedności (84), co sugeruje znaczne podobieństwo strukturalne aldolaz A, większe nawet, aniżeli podobieństwo izonezymów aldolaz A, B i C z tkanek tego samego zwierzęcia.

III-3. Zachowanie struktury centrów wiążących podjednostki

Zachowanie struktury izoenzymów w czasie ewolucji ogranicza się do obszaru centrum aktywnego, co jest faktem zrozumiałym nie wymagającym szerszych objaśnień. Chcielibyśmy natomiast zwrócić uwagę na badania dowodzące wyraźnej konserwacji struktury centrów wiążących podjednostki białkowe nawet w cząsteczkach tych enzymów, o których przypuszcza się, że struktura czwartorzędowa nie jest konieczna dla ich funkcji enzymatycznej. Mimo, że charakter wiązań, przy pomocy których podjednostki izoenzymów łączą się ze sobą, nie jest jeszcze wyjaśniony, można przypuszczać na zasadzie analogii ze strukturą hemoglobiny, że są to przede wszystkim wiązania hydrofobowe między określonymi resztami aminokwasowymi. Jedną z metod pozwalających na badania stopnia zachowania struktury obszarów wiążących podjednostki są badania hybry-

http://rcin.org.pl

dyzacyjne, polegające na wymianie łańcuchów polipeptydowych pomiędzy cząsteczkami izoenzymów o różnej ruchliwości elektroforetycznej. Badania te zastosowane do dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego pozwoliły wykazać zachowanie struktury centrów wiążących podjednostki u izoenzymów wyizolowanych z tak odległych od siebie pod względem ewolucyjnym organizmów jak bezkręgowce i ssaki (85). Wykazano bowiem, że dehydrogenazy z robaków obłych i człowieka, nie posiadające pod względem immunologicznym żadnych wspólnych cech hybrydyzowały ze sobą dając trzy aktywne hybrydy, zgodnie z ich budową tetrameryczną (patrz schemat 5 A).



Schemat 5.A. Elektroforogram uzyskany po dysocjacji i reasocjacji mieszaniny dehydrogenaz aldehydu 3-fosfoglicerynowego z mięśni ludzkich oraz *Ascaris suum* (85). Wywołano na aktywność enzymatyczną

Schemat 5.B. Elektroforogram uzyskany po dysocjacji i reasocjacji mieszaniny aldolaz z mięśni królika (typ A) z aldolazą otrzymaną z *Ascaris suum* (70). Wywołano na aktywność enzymatyczną

Podobne wyniki uzyskano w wypadku hybrydyzacji dehydrogenazy mleczanowej wyizolowanej z *Latimeria chalumnae* (ryby, o której pierwotnie sądzono, że wyginęła około 75 milionów lat temu), a dehydrogenazą mleczanową z wołu (86). Również i w tym przypadku otrzymano 3 aktywne hybrydy. Spotorno i Holloway przeprowadzili hybrydyzację pomiędzy dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego z drożdży (tetramer) i mięśni (tetramer), lecz w tym przypadku uzyskano tylko jeden hybryd zamiast spodziewanych trzech (87). Podobny wynik, aczkolwiek uzyskany z innymi enzymami otrzymali Kochman i Kwiatkowska (70), (patrz rysunek 5) w wypadku hybrydyzacji tetramerycznej aldolazy z *Ascaris suum* z aldolazą z mięśni królika.

Fakty te można wyjaśnić w różny sposób, np. że pozostałe dwa hybrydy są nieaktywne i dlatego nie zostały wykryte barwieniem enzymatycznym lub, że ze względów energetycznych asymetryczne hybrydy nie są trwałe. Naszym jednak zdaniem, powodem tworzenia się tylko jednego rodzaju cząsteczek o równym udziale obu typów podjednostek w tetrame-

http://rcin.org.pl

rycznej cząsteczce jest istnienie dwóch typów centrów wiążących podjednostki (rozpoznających podjednostki) w tych białkach. Pierwszy dla reakcji asocjacji:

monomer + monomer → dimer, oraz drugi typ dla reakcji:

dimer + dimer → tetramer.

Podczas ewolucji pierwszy z typów centrów „rozpoznających" prawdopodobnie tak się zmienił, że nie dochodzi do utworzenia heteromerycznego dimer, podczas gdy podobieństwa strukturalne w obszarze drugiego typu centrum rozpoznawczego są jeszcze na tyle zachowane, iż mogą powstawać heteromeryczne tetramery z homomerycznych dimerów.

III-4. Rozmieszczenie izoenzymów i ich funkcja

Rozważmy funkcję izoenzymów na przykładzie aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej.

Aldolaza. Jakkolwiek aldolaza A występuje w każdej tkance, to największe jej ilości występują w tkance mięśniowej charakteryzującej się intensywnymi procesami glikolizy (72). Aldolaza B, obok wątroby, znajduje się głównie w nerce i jelitach, organach związanych przede wszystkim z procesami anabolicznymi i procesami oksydacyjnej fosforylacji (72, 73). W pozostałych tkankach występuje obok aldolazy A również aldolaza C. Znaczne ilości aldolazy C występują w tkance nerwowej i soczewce oka (72, 73)

Porównawcze dane kinetyczne dla aldolaz A, B i C opracowane przez grupę Ruttera (67) wskazują na szczególnie aktywną rolę aldolazy A w rozkładzie fruktozo-1,6-dwufosforanu. Rozkłada ona ten metabolit kilkanaście razy szybciej niż aldolaza C zwana popularnie mózgową. Aldolaza A znajduje się we wszystkich tkankach, gdzie biegnie intensywna glikoliza, jak tkanka embrionalna (72), 73), mięśniowa oraz nowotworowa (68, 88, 89, 90, 91, 92). Najwyższe z kolei powinowactwa aldolazy B do fosfotrioz zdaje się ukazywać jej rolę przy wyłapywaniu fragmentów trójwęglowych i resyntezie FDP, gdy w wyniku działania odpowiedniego mechanizmu regulatorowego zostaną stworzone warunki do biosyntezy cukrowców. Z danych kinetycznych zwraca uwagę najwyższe ze wszystkich aldolaz powinowactwo aldolazy B do F-1-P. Przy stężeniach zbliżonych do fizjologicznych, aldolaza B rozkłada F-1-P blisko 60 razy szybciej niż aldolaza A. Jak z tego wynika, odgrywa ona główną rolę w glukoneogenezie i metabolizmie fruktozy, a jej brak (93), powoduje nietolerancję fruktozową.

Podczas ewolucji, w miarę powstawania bardziej złożonych form życia, dochodziło jednocześnie do tworzenia aglomeratów komórek dostosowanych do pełnienia specyficznych funkcji fizjologicznych oraz do biosyntezy nowych molekularnych form enzymów. Przykładem tego może być fakt, że w ciele tłuszczowym muchy, któremu przypisuje się niektóre funkcje wątroby, występuje aldolaza o pewnych właściwościach zbliżonych do króliczej

http://rcin.org.pl

Tabela 6

Rozmieszczenie FDP-aldolaz w niektórych tkankach i organach u kręgowców

	Mięśnie szkielet.	Śledziona	Serce	Mózg	Wątroba	Nerki	Jelito	Soczewka
Człowiek	A	A	A—C	A—C	A—B	A—B		
Małpa	A	A	A—C	A—C	A—B	A—B		
Wół	A	A—C	A	A—C	A—B	A—B		
Świnia	A	A—C	A—C	A—C	A—B	A—B		
Szczur	A	A	A	A—C	A—B	A—B	A—B	A—C
Królik	A	A	A	A—C	A—B	A—B	A—B	A—C
Kura	A	A—C	A—C	A—C	A—B	A—B, A—C		
Żółw	A	A	A—C	A—C	A—B	A—B, A—C		
Żaba	A	A	A—C	A—C	A—B	A—B	A—B	A—C
Okoń	A	A—C	A—C	A—C	A—B	A—B, A—C		
Rekin	A	A	A—C	A—C	A—B	A—B		
Pstrąg	A	„C"	A—„C"	„C—D"	A—B	„C"		
Jaszczurka							A—B	A—C
Zaskroniec							A—B	A—C
Gołąb							A—B, A—C	A—C

Opracowano na podstawie Lebherza i Ruttera (72) oraz Kochmana i wsp.. (73)
przez A — B rozumie się pięcioskładnikowy układ cząsteczek o składzie $\alpha_1, \alpha_2\beta, \alpha_2\beta_1, \alpha\beta_2, \beta_4$
przez A — C rozumie się pięcioskładnikowy układ cząsteczek o składzie $\alpha_4, \alpha_2\gamma_1\alpha_2\gamma_2, \alpha\gamma_3, \gamma_4$
Formy enzymatyczne, których obecność nie jest w pełni udokumentowana ujęto w cudzysłów.

aldolazy wątrobowej B, podczas gdy w mięśniach tego samego owada istnieje aldolaza o właściwościach zbliżonych do aldolazy mięśniowej A (82).

Obliczone przez Dedmana i wsp. (84) współczynniki korelacji dla aldolazy A, B i C pokazują, że aldolaza B jest bardziej zbliżona swoją strukturą do aldolazy A niż aldolaza C.

Dehydrogenaza mleczanowa. Oprócz od dawna znanych izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej M i H, Blanco i Zinkham opisali trze-

http://rcin.org.pl

ci izoenzym zwany X (94, 95). Ta trzecia forma molekularna jest wynikiem wyrażania się oddzielnego genu niezależnego od genu odpowiedzialnego za biosyntezę form M i H. Izoenzym X występuje w spermatocytach ptaków i ssaków. Jego biosynteza związana jest zwykle z wyłączeniem biosyntezy izoenzymów M i H. Optimum pH utlenienia lub redukcji pirogronianu jest dla izoenzymu X pośrednie między formą mięśniową i sercową. Powinowactwo do mleczanu jest najniższe, natomiast do pirogronianu najwyższe i jest zbliżone do powinowactwa formy M. Powinowactwo do 2-hydroksymaślanu, termostabilność, zachowanie się względem inhibitorów (szczawian, mocznik), jest podobne do enzymu sercowego (96). Podobieństwa te rozciągają się na struktury czwartorzędowe, ponieważ forma X łatwiej hybrydyzuje z enzymem sercowym (96).

Przytoczone przykłady wskazują, że izoenzymy zapewniają ustrojowi przystosowanie do różnych warunków życia, a także umożliwiają pełnienie specyficznych funkcji w wysoko wyspecjalizowanych komórkach poszczególnych tkanek i organów.

III-5. Ontogeneza

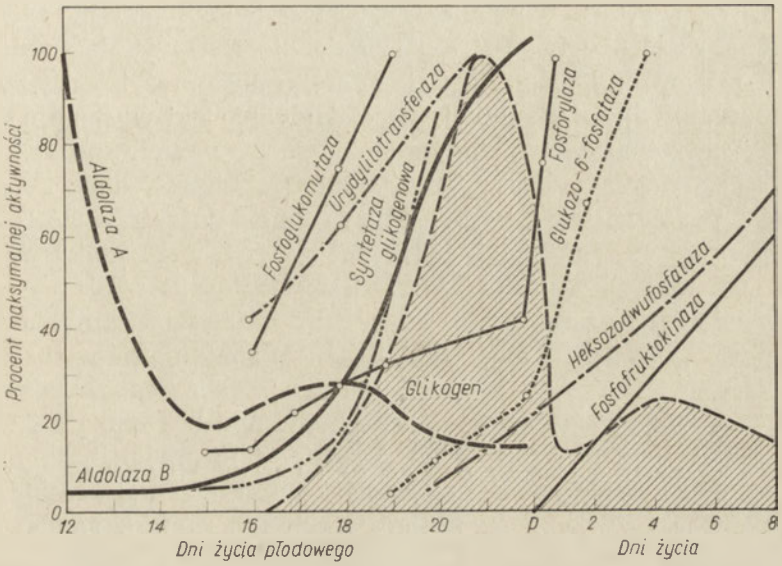
Powszechnie znane są w biologii poszukiwania związku pomiędzy ontogenezą i filogenezą. Jesteśmy dalecy od udowodniania, że w czasie ontogenezy ujawnianie się izoenzymów jest zgodne z ich rozwojem ewolucyjnym. Chcielibyśmy natomiast wykazać, że w czasie rozwoju osobniczego jako pierwszy, często ujawnia się izoenzym, który jednocześnie pochodzi od najstarszej ewolucyjnie formy molekularnej.

Podczas ontogenezy obserwuje się dostosowanie biosyntezy nowych molekularnych form enzymów do funkcji poszczególnych organów lub tkanek. Np.: błona worka żółtkowego, która pełni pewne funkcje wątroby w embrionach ptaków (97) jeszcze przed przejęciem ich przez wątrobę, syntetyzuje aldolazę typu wątrobowego na wiele dni przed tym, zanim nastąpi wykształcenie się wątroby i inicjacja biosyntezy aldolazy B w wątrobie (72).

W miarę różnicowania się komórek podczas rozwoju osobniczego następuje, w krótkich odstępach czasu, uruchomienie kolejnych ciągów metabolicznych, co obserwujemy jako pojawienie się lub gwałtowny wzrost aktywności szeregu specyficznych białek komórkowych (72, 98, 99, 100). Np. komórki trzustki szczura w 17 dniu rozwoju embrionalnego syntetyzują 1000 razy więcej cząsteczek rybonukleazy i chymotrypsynogenu niż 48 godzin wcześniej. Taki sam olbrzymi wzrost ma miejsce w przypadku karboksypeptydazy A między 17 a 20 dniem rozwoju, podczas gdy biosynteza amylazy wzrasta stopniowo od 13 do 19 dnia rozwoju komórek trzustki (98). Rezultaty analogicznych badań przeprowadzone na 11 enzymach podczas rozwoju ontogenetycznego wątroby wykazały, że wśród badanych enzymów aktywność aldolazowa posiada dość wyjątkowy przebieg:

http://rcin.org.pl

początkowo wysoka, stopniowo maleje, a następnie ponownie choć nieznacznie rośnie (98). Na podstawie badań immunologicznych oraz elektroforetycznych można było wykazać, że we wczesnoembrionalnym stadium wątroba biosyntetyzuje znaczne ilości aldolazy A. W miarę rozwoju, biosynteza aldolazy A zostaje wyłączona: następuje gwałtowny wzrost biosyntezy aldolazy B. Całość skomplikowanego przebiegu biosyntezy tych dwóch izoenzymów aldolazy oraz innych enzymów przedstawiono na schemacie 6.



Schemat 6. Zmiany aktywności enzymów w czasie ontogenezy w wątrobie szczura na podstawie Ruttera (98)

Ze schematu tego widać jak w miarę narastania biosyntezy aldolazy B następuje inicjowanie biosyntezy UDPG-syntetazy, syntetazy glikogenowej i innych enzymów typowych dla glukoneogenezy i funkcji wątroby w przemianie cukrowców.

Obok wątroby również w nerce i jelicie obserwuje się w miarę rozwoju osobniczego zahamowanie biosyntezy aldolazy A i inicjacje biosyntezy B (72, 73, 99, 101). Zahamowanie biosyntezy aldolazy A i inicjację biosyntezy aldolazy C zaobserwowano w rozwoju mózgu i soczewki (72, 73). Natomiast odwrotny proces biegnie podczas ontogenezy mięśni świnki morskiej, kurcząt i serca ludzkiego (przejście od C do A) (72, 102, 103). Zastępowanie biosyntezy aldolazy C przez biosyntezę aldolazy B zostało zaobserwowane w miarę ontogenezy wątroby ptaków (97).

U organizmów, w których zaobserwowano jednoczesne występowanie aldolaz klasy I i II, można spowodować wyrażanie się genów aldolaz klasy I i II dobierając odpowiednie warunki wzrostu. Stwierdzono, że u *Chla-*

http://rcin.org.pl

mydomonas mundana rosnących na pożywce z CO_2 jako jedynym źródle węgla biosyntetyzuje się tylko aldolaza klasy I. Zastąpienie CO_2 octanem inicjuje biosyntezę aldolazy klasy II. Podobne efekty można uzyskać u *Chamydomonas reinhardii* przy zastosowaniu różnego stopnia naświetlenia hodowli tego organizmu (88, 104).

Innym przykładem zmian izoenzymów w czasie ontogenezy są zmiany w biosyntezie dehydrogenazy mleczanowej. Np. w wątrobie i mięśniach szkieletowych embrionu ludzkiego, kurzego czy króliczego obserwuje się w miarę rozwoju wyłączenie biosyntezy formy H z jednoczesnym wzrostem formy M. W związku z tym zmienia się odpowiednio obraz hybrydów pięcioskładnikowego układu M-H (105). Podobnie jest z resztą w mięśniach gładkich macicy królika, gdzie elektroforetyczny obraz izoenzymów dojrzałego organu odpowiada mniej więcej takiemu, jaki występuje w mięśniach szkieletowych, podczas gdy w młodym organiźmie udział formy H w układzie M-H jest bardzo wyraźny (106). Podanie estradiolu przyspiesza biosyntezę podjednostek M, aktynomycyna może ją zatrzymać (106). Pobudzenie przez estradiol jakkolwiek specyficzne w stosunku do formy LDH-M pobudza jednocześnie biosyntezę aldolazy A, jak to wykazał Schwark (107), a zatem otwiera biosyntezę większej liczby białek. Niestety nie wiemy, czy geny aldolazy A i LDH-M znajdują się w obrębie tego samego operonu. Warto w tym miejscu podkreślić jednak pewną prawidłowość występowania zespołu izoenzymów np.: heksokinaza I, LDH-H i aldolaza C występują razem w tkankach o stałej metabolicznej funkcji (mózg, soczewka, serce), podczas gdy heksokinaza II, LDH-M i aldolaza A występują razem w tkankach podlegających znacznym zmianom aktywności metabolicznej (73, 67).

Innym czynnikiem, który może wywołać niezależne wyrażanie się izoenzymów LDH, jest ciśnienie parcjalne tlenu. Przy niskim następuje indukcja biosyntezy LDH-M, a przy wysokim supresja M i indukcja formy H (108). Przykłady powyższe dowodzą niezależnej kontroli wyrażania się genów LDH-M i M, X oraz aldolaz A, B i C.

III-6. Onkogeneza

Zmiany w obrazie izoenzymów powstałe w wyniku tworzenia się tkanki rakowej są przedmiotem szeregu doniesień. Chcielibyśmy tutaj zwrócić uwagę na jeden aspekt zaobserwowanych zmian. Otóż w tkankach nowotworowych obserwuje się zymogramy takie, jakie charakteryzują stadia embrionalne, potwierdza to znany postulat Pottera (109), że onkogeneza jest stadium zablokowanej ontogenezy. Wydaje się, że o ile w ontogenezie następuje kolejno włączanie i wyłączanie jednych genów po drugich, gdzie każda konstelacja nowych genów pobudza następną, o tyle w procesie onkogenezy następuje niejako zamrożenie jednego z przejś-

http://rcin.org.pl

ciowych stadiów rozwojowych i powielenie go aż do całkowitego wyniszczenia organizmu, bez możliwości uchwycenia „taśmy programującej" dalszy rozwój komórki. Przy czym im szybciej rosnącą jest dana tkanka nowotworowa, tym znaczniejsze jest cofnięcie się do stanów wczesno embrionalnych. Szereg przykładów obrazujących tę zależność podały pracownie Ruttera, Matsushimy i in. (90, 91, 92). Np. zmianę zahamowania biosyntezy aldolazy C i inicjację biosyntezy aldolazy A obserwuje się w nowotworach mózgowych (91). W nowotworach wątroby obserwuje się zahamowanie biosyntezy aldolazy B i pojawienie się aldolazy A (90, 91). Shapird i wsp. pokazali (89, 110), że w szybko rosnących nowotworach wątroby, o niskim stopniu zróżnicowania komórek obok aldolazy A występuje również aldolaza typu C. Wykazali oni, że podobnie jak w tkance embrionalnej tkanka wątroby obok aldolazy A zawiera również ślady aldolazy C (93). Ogólnie zatem biorąc, powyższe stany patologiczne charakteryzuje wybiórcza represja enzymów charakterystycznych dla dojrzałych z jednoczesnym zniesieniem represji enzymów produkowanych w stanach embrionalnych.

IV. Zakończenie

Oprócz opisanych przykładów duplikacji genowej i punktowej mutacji będących przyczyną powstania nowych genów, opisano ostatnio ciekawy przypadek „zszycia" genu. Od dawna wysuwano sugestie, że w niektórych ciągach metabolicznych istnieją enzymy o dwu funkcjach. Np.: przy syntezie tryptofanu u *E. coli* dwa oddzielne cistrony są odpowiedzialne za syntezę dwóch enzymów, jednego katalizującego przemianę indoliloglicerolo-3-fosforanu w indol i drugi enzym, który katalizuje przemianę indolu+seryna w tryptofan. U *Neupospora crassa* tylko jeden enzym katalizujący obie te reakcje został wykazany (111, 112).

Dokładnie zbadany przypadek „zszycia" genu dotyczy drugiego i trzeciego genu w operonie histydyny u *Sallmonella typhimurium* (his D i his C) his D jest odpowiedzialny za syntezę dehydrogenazy histydynolowej, natomiast his C za syntezę aminotransferazy. Yourno i wsp. (113) opisali mutację *Sallmonella typhimurium*, w wyniku której było biosyntetyzowane białko o masie cząsteczkowej równej w przybliżeniu sumie mas dehydrogenazy i aminotransferazy. Nowy enzym posiadał obie funkcje katalityczne. Mapy peptydowe sporządzone dla enzymów wyjściowych i nowego mutanta oraz analiza grup końcowych dostarczyły dowodów na to, że utworzone białko powstało na skutek zszycia dwóch oddzielnych genów.

Powstaje problem, czy taki enzym może być nazywany izoenzymem z punktu widzenia obecnie przyjętej nomenklatury. Jeśli występowałby równocześnie w tym samym organiźmie, obok enzymów „nie zszytych", uważamy, że tak.

http://rcin.org.pl

Opisane przykłady zmian zachodzących w strukturze enzymów podczas ewolucji jak i dostosowywanie właściwości katalitycznych izoenzymów do funkcji tworzących się tkanek organów stawiają przed biologią molekularną nowe pasjonujące problemy i zadania. Te na dziś — odnoszące się do kontroli wyrażania się genów poszczególnych białek izoenzymów i różnicowania się komórek i te na jutro — sięgające początków życia i syntezy pierwszego „pragenu" oraz „prabiałka".

Wszystkich zainteresowanych zagadnieniem ewolucji białek odsyłamy do zbioru sympozjalnych prac, który ukazał się niedawno wydawnictwem Brookhaven Symposia (114).

PIŚMIENNICTWO

1. Kochman M., Penhoet E., Rutter W. J., *Fed. Proc.* **27**, 590 (1968).
2. Susor W., Kochman M., Rutter W. J., *Science* **165**, 1260 (1969).
3. Susor W., Kochman M., Rutter W. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **209**, 328 (1973).
4. Kochman M., Rutter W. J., *Biochemistry* **7**, 1671 (1968).
5. Velick S. F., w Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases wyd. Horst Sund. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York str. 65 (1970).
6. Morse D. E., Horecker B. L., *Adv. Enzymol.* **31**, 125 (1968).
7. Kochman M., *Post. Hig. i Med. Dośw.*, **23**, 747 (1969).
8. Hajos G., Torchinsky Y., Sajgo M., *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 1 (1971).
9. Flatmark T., Sletten K., *J. Biol. Chem.*, **243**, 1623 (1968).
10. Kaplan N. O., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **151**, 382 (1968).
11. Roberts D. B., *J. Mol. Biol.*, **45**, 221 (1969).
12. Dziembor-Gryszkiewicz E., Gryszkiewicz J., Ostrowski W., IX Zjazd P. T. Biochem., Katowice 1971 Streszczenia prac str. 131.
13. Gułyi M. F., Litwinienko L. T., Martinienko F. P., Kokunin W. A., *Ukrain. Biochim. Żurnał.*, **40**, 440 (1967).
14. IUPAC-IUB Comisson on Biochemical Nomenclature, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **147**, 1 (1971).
15. Skangiel-Kramska J., *Post. Biochem.*, **15**, 385 (1969).
16. Szumiel I., *Post. Biochem.*, **9**, 153 (1963).
17. Tomaszewski L., *Post. Biochem.*, **9**, 173 (1967).
18. Walsh K. A., Ericsson L. H., Neurath H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 1339 (1966).
19. Neurath H., Walsh K. A., Winter W. P., *Science* **158**, 359 (1967).
20. Ogita Z., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**, 243 (1968).
21. Harris H., Hopkinson D. A., *Ann. Hum. Genet. (London)* **36**, 9 (1972).
22. Margoliash E., Fitch W. M., *Ann. N. Y., Acad. Sci.*, **151**, 359 (1968).
23. Ohta T., Kimura M., *J. Molec Evolution* **1**, 18 (1971).
24. King J. L., Jukes T. H., *Science* **164**, 788 (1969).
25. Buettner-Janusch J., Hill R. L., w Evolving Genes and Proteins red. Bryson V., Vogel H. I., Academic Press, New York (1965), str. 167.
26. Nolan C., Margoliash E., *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 727 (1968).
27. Zuckerkandl E., Pauling L., w Evolving Genes and Proteins red. V. Bryson, Vogel H. J., Academic Press., New York (1965), str. 97.
28. Ohta T., Kimura M., *Science* **174**, 150 (1971).

http://rcin.org.pl

29. Bridges C. B., *Science* **83**, 210 (1936).
30. Ingram V. M., *Nature* (London) **189**, 704 (1961).
31. Itano H. A., *Adv. Protein. Chem.*, **12**, 215 (1957).
32. Smith E. W., Torbert J. V., *Bull. Johns. Hopkins Hosp.*, **102**, 38 (1958).
33. Ceppelini R., *Ciba Fdn. Symp.*, **133**, (1959).
34. Scoulodi H., *J. Mol. Biol.*, **40**, 353 (1969).
35. Scoulodi H., *Proc. Roy. Soc. (Ser. A)* **258**, 181 (1960).
36. Kendrew J. C., *Brookhaven Symp. Biol.*, **15**, 216 (1962).
37. Perutz M. F., Bolton W., Diamond R., Muirhead H., Watson H. C., *Nature* (London) **203**, 687 (1964).
38. Chauvet J. P., Acher R., *Biochemistry* **11**, 916 (1972).
39. Antonini E., *Physiol. Rev.*, **45**, (1963).
40. Perutz M. F., Muirhead H., Mazzarella L., Crowther R. A., Greer J., Kilmartin J. V., *Nature* (London) **222**, 1240 (1969).
41. Perutz M. F., *Nature* (London) **228**, 734, (1970).
42. Riggs A., *J. Biol. Chem.*, **236**, 1948 (1961).
43. McLachlan A. D., *J. Mol. Biol.*, **64**, 417 (1972).
44. Tashian R. E., Shreffler D. C., Shows T. B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **151**, 64 (1968).
45. Micheli A., Buzzi C., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 324 (1964).
46. Tanis R. J., Tashian R. E., *Biochemistry* **10**, 4852 (1971).
47. Shimizu G., Matsuura F., *Bull. Jap. Sci. Fish.* **28**, 924 (1962).
48. Carter M. J., *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 222 (1971).
49. Rutter W. J., *Fed. Proc.*, **23**, 1248 (1964).
50. Kobes R. D., Simpson R. T., Vallee B. L., Rutter W. J., *Biochemistry* **8**, 585 (1969).
51. Rutter W. J., Hunsley J. R., Groves W. E., Calder J., Rajkumer T., Woodfin B. M., Tchola O., Horecker B. L., Brin M., Goldberg M., Fessendem J. M., Racker E., Meloche H. P., Ingram J. M., Wood W., Shuster C. W., Fish D. C., Blumenthal H. J., Ghalmbor M. A., Heath E. C., Takagi Y., Hoffe P., Rosen O. M., Groth D. P., Aldolases, w Methods in Enzymology, t. IX red. Colowick S. P. Kaplan N. O., Academic Press, New York (1966), str. 477.
52. Lebherz H. G., *Ph. Th. Univ. of Washington* (1970).
53. Kawahara K., Tanford C., *Biochemistry* 5, 1578 (1966).
54. Penhoet E., Kochman M., Valentine R., Rutter W. J., *Biochemistry* 6, 2940 (1967).
55. Penhoet E., Rajkumar T., Rutter W. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 1275 (1966).
56. Rutter W. J., Rajkumar T., Penhoet E., Kochman M., Valentine R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **151**, 102 (1968).
57. Lai C. Y., Oshima T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**, 363 (1971).
58. Gracy R. W., Lacko A. G., Horecker B. L., *J. Biol. Chem.*, **244**, 3913 (1969).
59. Ting S., Sia C. L., Lai C.Y., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**, 485 (1971).
60. Gibbons I., Anderson P. I., Perham R. N., *FEBS Letters* **10**, 49 (1970).
61. Gibbons I., Perham R. N., Anderson P. I., *Nature, New Biology* **238**, 173 (1972).
62. Ting S., Lai C, Y., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**, 476 (1971).

http://rcin.org.pl

63. Ribereau-Gayon G., Ramasarma T., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 343 (1971).
64. Lai C. Y., Gussin A., Smith J. D., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 38 (1972).
65. Lai C. Y., Horecker B. L., *J. Cell. Physiol.*, **76**, 381 (1970).
66. Lacko A. G., Brox L. W., Graćy R. W., Horecker B. L., *J. Biol. Chem.*, **245**, 2140 (1970).
67. Penhoet E., Kochman M., Rutter W. J., *Biochemistry* **8**, 4396 (1969).
68. Gracy R. W., Lacko A. G., Brox L. W., Adelman R. C., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 480 (1970).
69. Dżugaj A. — praca doktorska, Akademia Medyczna Wrocław (1972).
70. Kochman M., Kwiatkowska D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 856 (1972).
71. Anderson P. J., Gibbons I., Perham R. N., *Eur. J. Biochem.*, **11**, 503 (1969).
72. Lebherz H. G., Rutter W. J., *Biochemistry* **8**, 109 (1969).
73. Kochman M., Krzywda U., Kwiatkowska D., Baranowski T., *Int. J. Biochem.*, **2**, 221 (1971).
74. Kwiatkowska D., (w przygotowywaniu do druku).
75. Koida M., Lai C. Y., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 623 (1969).
76. Morse D. E., Chan W., Horecker B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 628 (1967).
77. Winstead J. A., Wold F., *J. Biol. Chem.*, **239**, 4212 (1964).
78. Harris C. E., Kobes R. D., Teller D. C., Rutter W. J., *Biochemistry* **8**, 2442 (1969).
79. Groves W. E., *Ph. Thesis University of Illinois* (1962).
80. Davis L. C., Brox L. W., Gracy R. W., Ribereau-Gayon G., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **140**, 215 (1970).
81. Kochman M., Kwiatkowska D., *Abstr. Commun. 7th. Met. Eur. Biochem. Soc.* (1971) str. 95.
82. Bauer A., Levenbook L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**, 619 (1969).
83. Russel G. K., Gibbs M., *Biochem. Biophys. Acta* **132**, 145 (1967).
84. Dedman J. R., Gracy R. W., Harris B. G., *Biochemistry* (1973) w druku.
85. Kochman M., Gołębiowska J., Baranowski T., (w przygotowywaniu do druku.
86. Kolb E., Harris J. I., The Biochemical Society Agenda Papers Proceedings of the Biochemical Society Cambridge 4—5 July Abstr. 1972 str. 26.
87. Spotorno G. M. L., Holoway M. R., *Nature* (London) **226**, 756 (1970).
88. Ikehara Y., Endo H., Okada Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 491 (1970).
89. Schapira F., Hatzfeld A., Reuber M. D., *Cancer Res.*, **31**, 1224 (1971).
90. Matsushima T., Kawabe S., Shibuya M., Sugimura T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 565 (1968).
91. Rutter W. J., Blostein R. E., Woodfin B. M., Weber C. S., *Adv. Enzyme Reg.*, **1**, 39 (1963).
92. Sugimura T., Sato S., Kawabe S., Suzuki N., Nien T. C., Kakakura K., *Nature* (London) **222**, 1070 (1969).
93. Nordman Y., Schapira F., Dreyfus J. C., *Biochem. Biophys. Res.* Commun., **31**, 884 (1968).
94. Blanco A., Zinkham W. H., *Science* **139**, 601 (1963).
95. Blanco A., Zinkham W. H., Kupchyk L., *J. Exp. Zool.*, **156**, 137 (1964).
96. Zinkham W. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **151**, 598 (1968).

http://rcin.org.pl

97. Lebherz H. G., *Devel. Biol.*, **27**, 143 (1972).
98. Rutter W. J., Weber G. S., w Developmental and Metabolic Control Mechanism. red. Darrel N. Ward. The Williams and Wilkins Co, Baltimore (1965), str. 195.
99. Rutter W. J., Clark W. R., Kemp J. F., Bradshaw W. S., Sanders T., Ball D. W., w Fleishmeier Epithilial-Mesenchymal Interaction. The Williams and Wilkins Co, Baltimore (1968), str. 114.
100. Kowarzykowa S., Zarzycki J., Karpiak S. E., Kowalewska D., Kochman M., Peryt A., Czechowich I., *Post. Hig. i Med. Dośw.*, **17**, 689 (1963).
101. Rensing U., Schmidt A., Leuthardt F., *Hoppe Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **348**, 921 (1967).
102. Masters C. J., *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 161 (1968).
103. Herskowitz J. J., Masters C. J., Wassarman P. J., Kaplan N. O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 24 (1967).
104. Guerrini A. M., Gremona T., Preddie E. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 249 (1971).
105. Vesell E. S., Philip J., *Ann. N. Y., Acad. Sci.*, **111**, 243 (1963).
106. Goodfriend T. L., Kaplan N. O., *J. Biol. Chem.*, **239**, 130 (1964).
107. Schwark W. S., Singhal R. L., Ling G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **192**, 106 (1969).
108. Dawson D. M., GoodfriendT. L., Kaplan N. O., *Science* **143**, 929 (1964).
109. Potter V. R., w Recent Trends in Cancer Biochemistry: The Importance of Studies on Fetal Tissue w Proceedings of the Eighth Canadian Cancer Research Conference, Honey Harbor, Ontario, Canada 1968 red. Morgan J. F., New York Pergamon Press Inc., (1969) str. 9.
110. Schapira F., Reuber M. D., Hatzfeld A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 321 (1970).
111. Bonner D. M., DeMoss J. A., Mills S. E., w Evolving Genes and Proteins red. Bryson V., Vogel H. J., Academic Press, New York, (1965), str. 305.
112. Dixon G. H., w Essays in Biochemistry t. I. red. Campbell P. N., Greville G. D., Academic Press London, New York (1966), str. 147.
113. Yourno J., Kohno T., Roth R. J., *Nature* (London) **228**, 820 (1964).
114. Brookhaven Symposia in Biology **23** (1972).

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

Post. Biochem. 19, 533—558 (1973).

ZOFIA KILIAŃSKA*, LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ**

Biologiczna rola białek niehistonowych chromatyny

Biological Role of Nonhistone Proteins of Chromatin

Properties, biosynthesis and probable functions of nonhistone proteins of the chromatin in eucariotic organisms are discussed.

W strukturze chromatyny eukariontów uczestniczy kilka wielkocząsteczkowych amfolitów, tj. DNA, RNA oraz białka zasadowe i kwaśne. Najmniej dotychczas poznanymi składnikami chromatyny są białka kwaśne, określane terminem niehistonowe białka chromatyny. W literaturze biochemicznej można odnotować dane o różnej ilości tych białek w różnych tkankach tego samego organizmu, jak np. embriony, erytrocyty, mózg, wątroba, jajowód, śledziona i serce kurczęcia (1, 2), wątroba oraz dojrzałe i niedojrzałe erytrocyty gęsi (3), wątroba i grasica szczura (4), wątroba, nerka i śledziona myszy (5), móżdżek i przysadka wieprza (6), a ponadto w różnych stadiach rozwojowych, np. jajowodu kurczęcia (7), w zarodkach i kiełkach pszenicy (8) czy w chromatynie stadiów embrionalnych (blastula, gastrula pluteus) jeżowca morskiego (9). Chromatyny z metabolicznie aktywnych tkanek, np. wątroby zawierają większe ilości białek niehistonowych w porównaniu z tkankami o niewielkiej aktywności, np. grasica (4, 10). Badania porównawcze euchromatyny z heterochromatyną wykazały wyższą zawartość białek niehistonowych w euchromatynie (11, 12, 13), silniej zaangażowanej w procesie transkrypcji DNA. Zjawisko to przyciąga uwagę ze względu na zdolność białek niehistonowych w odwracaniu hamującego wpływu histonów na syntezę RNA zależną od DNA (14, 15, 16, 17). Langan (14) w 1967 r. stwierdził wyższy odsetek aktywnych frakcji białek niehistonowych, tj. fosfoproteidów u eukariontów niż u prokariontów, posiadających stosunkowo prosty system chromosomowy. Szereg wła-

* Mgr, Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, Łódź.

** Doc. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, Łódź.

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — 3'5'-adenozynomonofosforan; PHA — fitohemoglutynina; SDS — siarczan dodecylu sodu, NHC — niehistonowe białka chromatyny.

http://rcin.org.pl

ściwości białek niehistonowych, jak ich niejednorodność (5, 18—22), specyficzność tkankowa a nawet gatunkowa (18, 21—25, 25), obrót (20, 26, 27), różna zawartość w obrębie chromatyny aktywnej i nieaktywnej (11, 12), zdolność do interakcji z selektywnymi regionami DNA genomu (21, 22, 25), tworzenie kompleksów z histonami (28, 29), hormonami (2, 7, 30—32) a także aktywność enzymatyczna (4, 28, 35—45) zdaje się wysuwać te jądrowe polianiony na stanowisko pozytywnych regulatorów genów. Nadal nie wyklucza się również udziału tych białek w utrzymaniu struktury chromosomu (28, 46, 47).

W związku z wymienionymi właściwościami białek niehistonowych poważnym zadaniem okazuje się izolowanie ich w stanie nadającym się do badania ich aktywności biologicznej. Nastręcza ono jednak ogromne trudności z uwagi na wyjątkowo niską rozpuszczalność tego typu białek w roztworach wodnych o fizjologicznych wartościach pH, ich niejednorodność oraz tendencję do agregacji.

Na ogół przyjęte są obecnie dwie drogi postępowania w otrzymywaniu białek niehistonowych. Jedna z nich, jako etap wstępny, włącza ekstrakcję chromatyny lub jąder komórkowych, pozbawionych globulin, za pomocą rozcieńczonych roztworów kwasów mineralnych (HCl lub H_2SO_4) w celu usunięcia histonów; następnie pozostałość chromatynową rozpuszcza się w detergentach, np. w 0,1—1% roztworze SDS (29, 48), fenolu (3, 22, 26, 49) czy stężonych roztworach soli o zasadowym pH, np. 11,6 (50). Rozdziału białek niehistonowych od kwasów nukleinowych dokonuje się w toku ultrawirowania, albo na zasadzie odmiennej rozpuszczalności w fenolu tych dwóch typów związków.

Drugi wariant metod izolowania białek niehistonowych sprowadza się do oddzielenia histonów od białek niehistonowych na drodze chromatografii jonowymiennej, filtracji żelowej lub na nośnikach elektroforetycznych. Chromatynę zdysocjowaną albo w roztworze NaCl o wysokiej sile jonowej (1—3M) zawierającym duże stężenie mocznika (najczęściej 5M) lub w układzie 25% HCOOH — 8M mocznik — 0,2M NaCl (14) poddaje się ultrawirowaniu np. 269 000g×24 godz (20) lub 100 000g×48 godz (3, 51) w celu oddzielenia DNA. Wydaje się, że dobre wyniki w dysocjacji chromatyny daje stosowany ostatnio roztwór 2,5M chlorowodorku guanidyny, zapewniający lepsze osadzenie DNA (9, 51, 52), który łatwo daje się odwirować już przez 18 godz przy 90 000g. W stosunkowo prosty sposób, tj. bez ultrawirowania można usunąć DNA ze zdysocjowanej chromatyny wykorzystując selektywne jego strącenie za pomocą 0,0135M roztworu chlorku lantanu (53). Uwolnione od DNA białka chromatyny rozdziela się na drodze chromatografii na złożach, np. Bio-Rex—70 (19, 20, 54), CM-celuloza (53), QAE-Sephadex A-50 (52,55), SP-Sephadex C-25 (56), SE-Sephadex C-50 (52).

Inne złoże, tj. hydroksyapatyt wykorzystano do rozdziału składników zdysocjowanej chromatyny, rozbitej dodatkowo ultradźwiękami (5, 57—59).

http://rcin.org.pl

Białka chromatyny i kwasy nukleinowe zaadsorbowane na hydroksyapatycie wymywa się przy zastosowaniu skokowego gradientu buforu fosforanowego (pH 6,8) zawierającego 2 mole NaCl i 5 moli mocznika.

Filtracja żelowa na złożu Bio-Gel A-50m chromatyny zdysocjowanej w układzie 3M NaCl — 0,01M bufor tris-HCl (pH 8) pozwoliła na oddzielenie DNA od białek chromosomowych, których chromatografia na kationicie Bio-Rex—70 dostarczała białek niehistonowych wolnych od histonów (60).

Jak dotąd ukazało się niewiele doniesień dotyczących izolowania białek niehistonowych mocno związanych z DNA (61). Na uwagę zasługuje możliwość wykorzystania zdolności wiązania tych białek z rtęcią (62). Jądra komórkowe otrzymane z nerki szczura, po uprzednio dożylnym podaniu ^{203}Hg, pozbawiano globulin za pomocą 0,14M roztworu NaCl. Osad zawieszano w układzie 0,6M NaCl — 6M mocznik — 0,05M $NaHSO_3$ (pH 7,6) i dializowano przez całą noc aż do osiągnięcia 0,14M stężenia z uwagi na NaCl. Po odwirowaniu, supernatant zawierał tzw. rozpuszczalne białko niehistonowe, odpowiadające białkom kwaśnym chromatyny, labilnie związanym z DNA (28). Z osadu usuwano histony (ekstrakcja 0,2N HCl), kwasy nukleinowe (trawienie RN-azą, DN-azą i hydrolizą w 5% TCA, 95°) oraz lipidy. Pozostałość rozpuszczano w układzie 0,2M bufor fosforanowy (pH 7,4) — 6M mocznik — 0,05M $NaHSO_4$ — 10% SDS uzyskując frakcję, tzw. nierozpuszczalnego białka niehistonowego. Białko to wędrowało w żelu poliakrylamidowym, jako pojedyńcze pasmo o masie cząsteczkowej odpowiadającej 150 000 daltonów. Włączało się weń 80—85%^{203}Hg, przy znikomym piętnie izotopowym w pozostałych frakcjach jądrowych, tj. w DNA, globulinach, histonach i rozpuszczalnych białkach niehistonowych.

Należy stwierdzić, że mimo coraz to nowszych rozwiązań technicznych nie udało się dotychczas uzyskać w pełni zadawalających wyników w izolowaniu całkowitych białek niehistonowych.

I. Niejednorodność i specyficzność białek niehistonowych

Białka niehistonowe stanowią składniki chromatyny o wybitnej niejednorodności (21, 22, 56, 63—66) i ta cecha w dużej mierze spowodowała zainteresowanie się nimi jako ewentualnymi kandydatami na stanowisko regulatorów funkcji genów (3, 6, 15, 23, 24, 66). Już pod koniec lat sześćdziesiątych zasygnalizowano złożoność tej grupy białek jądrowych (50, 63).

Chromatografia w żelu QAE-Sephadex A-25 oraz elektroforeza w żelu poliakryloamidowym białek niehistonowych wątroby, grasicy oraz nerki szczura udowodniły znaczną ich niejednorodność (20). Oznaczenie N-końcowych aminokwasów wykluczyło możliwość, że ta cecha białek niehisto-

http://rcin.org.pl

nowych jest spowodowana ich degradacją. Wysoki stopień niejednorodności białek niehistonowych nie wynikał również z obecności RNA; trawienie RN-azą nie zmieniało ich profilów elektroforetycznych i chromatograficznych. Na uwagę zasługuje fakt różnorodnej aktywności we włączaniu [^{3}H]-tyrozyny przez poszczególne frakcje białka niehistonowego wątroby szczura uzyskiwane w wyniku rozdziału w żelu QAE-Sephadex A-25. Porównanie profilów chromatograficznych i elektroforetycznych białek niehistonowych uzyskanych z trzech tkanek szczura pozwoliło zaobserwować różnice ilościowe i tylko nieznaczne jakościowe. Zbliżone wyniki w żelu poliakrylamidowym zaobserwowano (6) dla białek niehistonowych móżdżku i przysadki wieprza. Chromatografia w żelu SE-Sephadex C-25 białek niehistonowych wątroby szczura otrzymanych z chromatyny zdysocjowanej uprzednio w układzie 25% HCOH — 8M mocznik — 0,2M NaCl pozwoliła uzyskać 10—15 frakcji o charakterze kwaśnym i różnej masie cząsteczkowej od 12 500 do 142 000 daltonów (56). Rozpuszczalne w fenolu białka niehistonowe wątroby szczura w doświadczeniach Tenga i wsp. (22) dostarczyły w żelu poliakrylamidowym szeregu frakcji o masie cząsteczkowej w zakresie 13 000—80 000, przy czym przeważającą ilość frakcji stanowiły białka o masie cząsteczkowej ponad 35 000 daltonów.

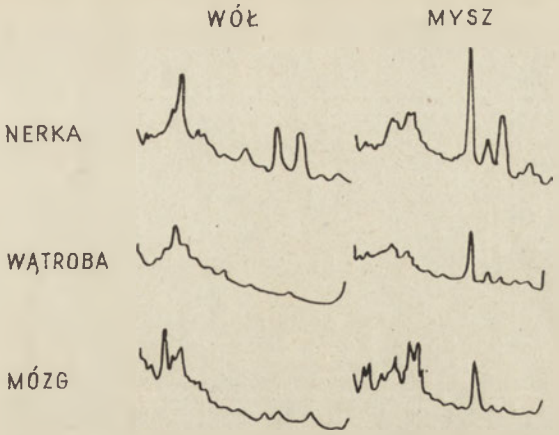
Teng i wsp. (21, 23) stwierdzili ewidentne różnice w profilach elektroforetycznego rozdziału w żelu poliakrylamidowym fosfoproteidów jądrowych z czterech tkanek szczura, tj. wątroby, nerki, śledziony i mózgu. Ponadto różny był stopień ufosforylowania *in vivo* białek niehistonowych pochodzących z różnych tkanek tego samego gatunku.

Znacznego stopnia niejednorodność oraz różnice ilościowe i jakościowe w obrazach elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym dla białek niehistonowych z wątroby, nerki i śledziony królika zostały stwierdzone przez Levy'ego i wsp. (51), a w odniesieniu do białek niehistonowych wątroby, śledziony, nerek i wątrobiaka Walkera u szczurów przez Wanga i wsp. (18, 23). Ci ostatni zdecydowanie wypowiadają się za istnieniem specyficzności tkankowej w obrębie białek niehistonowych.

Bardzo ostrożnie natomiast na ten temat wyrażają się Mac Gillivray i wsp. (5) stwierdzając tylko kilka drobnych różnic w profilach elektroforetycznych białek niehistonowych nerki, wątroby i mózgu dwóch odległych gatunków, tj. myszy i wołu. We wszystkich rozdziałach wykazali oni obecność kilku polipeptydów o masie cząsteczkowej ponad 40 000 daltonów, natomiast największe różnice sprowadzały się do zmiennej obecności niskocząsteczkowych polipeptydów. Okazało się, że we frakcjach białek niehistonowych nerki myszy występują cztery niskocząsteczkowe polipeptydy, których nie obserwowano w przypadku wątroby wołu (Ryc. 1). Różnice w obrazach elektroforetycznych białek niehistonowych wydają się być raczej ilościowe niż jakościowe (5).

Badanie stopnia fosforylacji białek niehistonowych pochodzących z wątroby, nerki, mózgu i nowotworu sutka (*Landschutz ascites*) myszy (67)

http://rcin.org.pl



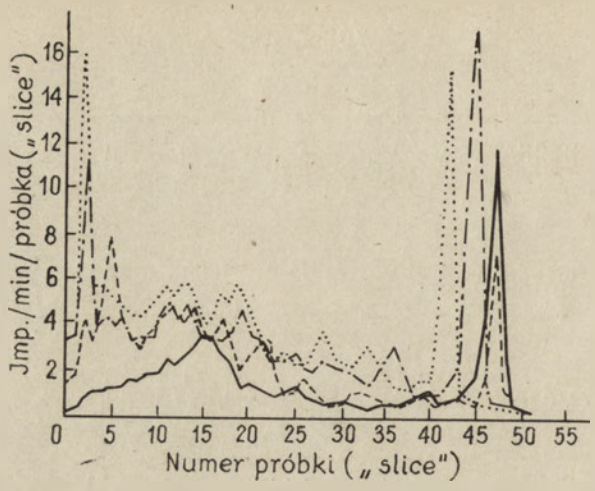
Ryc. 1. Profile densytometryczne białek niehistonowych nerki, wątroby i mózgu wołu oraz myszy rozdzielonych w 15% żelu poliakrylamidowym (wg 5)

dostarczyły innych spostrzeżeń. Analiza wykresów fosforylacji białek niehistonowych w różnych tkankach myszy (Ryc. 2) potwierdziła istnienie wielu podobieństw, ale także jaskrawe różnice (szczególnie w przypadku tkanki nowotworowej) w stopniu włączania ^{32}P we frakcje białek niehistonowych uzyskane w toku ich rozdziału na hydroksyapatycie (5) ponad 90% piętna izotopowego odnajdywano w białkach niehistonowych, a tylko około 6% w histonach. Wydaje się, że w cechach genetycznych oraz aktywności metabolicznej badanych tkanek należy szukać przyczyny różnego stopnia podobieństw między szybko fosforylującymi się frakcjami białek niehistonowych z różnych tkanek danego organizmu. Być może nawet drobne różnice w ufosforylowaniu białek niehistonowych mogą być związane z regulacją dużej ilości genów. Nie wyklucza się jednak możliwości, że ufosforylowane białka niehistonowe mogą reprezentować tylko część białek regulatorowych (67).

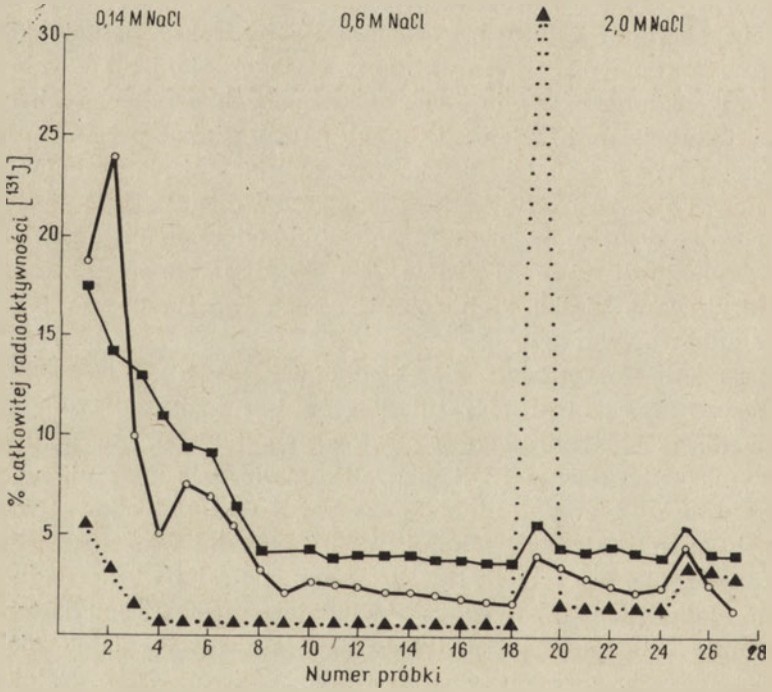
Zastosowanie do rozdziału białek niehistonowych pochodzących z wątroby szczura oraz wątroby i retikulocytów kurczęcia połączonej techniki ogniskowania izoelektrycznego ze strefową elektroforezą w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS pozwoliło stwierdzić znacznie więcej podobieństw między białkami niehistonowymi tkanki wątrobowej w obydwu gatunkach, aniżeli między białkami niehistonowymi wątroby i retikulocytów kurczęcia. Dla wszystkich trzech tkanek znaleziono tylko jedno wspólne pasmo białka niehistonowego odpowiadające masie 56 000 daltonów (68).

Ogromnie interesującą i sugestywną właściwością białek niehistonowych jest specyficzność ich oddziaływania *in vitro* z DNA. Selektywność wiązania białek niehistonowych rozpuszczalnych w fenolu z homologicznym DNA wykazano na drodze chromatografii na DNA-celulozie (25) oraz w wyniku tworzenia kompleksów z DNA w toku gradientowej dializy (22).

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Fosforylacja białek niehistonowych pochodzących z nerki (...), wątroby (—.—), mózgu (— — —) i guza puchlinowego (*Landschutz*) myszy (———). (wg 67).
[^{32}P]-białka niehistonowe (znakowane za pomocą [γ^{32}P]-ATP) rozdzielano w 15% żelu poliakryloamidowym zawierającym 0.1% SDS



Ryc. 3. Wiązanie białek niehistonowych wątroby szczura z różnymi typami DNA-celulozy: wątroby (▲▲), spermy łososia (○———○) oraz *E. coli* (■■) (wg 25). Białka niehistonowe znakowano za pomocą ^{131}J.

http://rcin.org.pl

Interakcja z DNA białek niehistonowych wątroby szczura występowała w największym stopniu w przypadku DNA wątroby a była niewielka z odległym gatunkowo DNA z *E. coli* i DNA spermy łososia (Ryc. 3).

Rozpuszczalne w fenolu fosfoproteidy jądrowe tworzyły kompleksy z DNA optymalnie, gdy oba składniki kompleksu pochodziły z tej samej tkanki (np. wątroba szczura), a nawet z różnych tkanek tego samego organizmu (np. wątroba i nerka szczura). Rozległość tworzenia kompleksu fosfoproteidy—DNA zmniejszała się już w przypadku ściśle spokrewnionych gatunków (szczur, mysz) a zanikała zupełnie przy próbach kompleksowania fosfoproteidów wątroby szczura z DNA łożyska ludzkiego, wątroby psa czy DNA pneumokoków (21, 22).

Być może wysoce niejednorodne fosfoproteidy jądrowe zawierają populacje białek odpowiedzialne za specyficzne ich wiązanie z DNA. Okazało się, że z około 13% całości fosfoproteidów wątroby szczura wchodzących w interakcję z homologicznym DNA, tylko 8% można odzyskać w czasie ponownej ekstrakcji fenolem wytworzonego kompleksu białko—DNA (22). Odzyskane fosfoproteidy dostarczają innego obrazu elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym w porównaniu z izolowanymi bezpośrednio z tkanki. Nie wyjaśniono dotychczas, czy brak pewnych frakcji w profilach elektroforetycznych fosfoproteidów, które poddawano interakcji z DNA należy tłumaczyć zmianami strukturalnymi spowodowanymi warunkami preparatyki, czy też odmienną ich funkcją. Białka niehistonowe wykazują również inhibitorowe działanie na biosyntezę hemoglobiny w pozakomórkowym systemie retikulocytów (69). Być może, właściwość ta jest wynikiem związania ich z hemoglobinowym *messenger* RNA.

II. Aktywność enzymatyczna białek niehistonowych

Występowanie szeregu pasm wspólnych i to w różnych ilościach w elektroforegramach białek niehistonowych różnego pochodzenia w żelu poliakrylamidowym nasuwa przypuszczenie, że niektóre z tych pasm mogą odpowiadać enzymom.

Białka niehistonowe posiadają aktywność wielu enzymów (28), wśród których na uwagę zasługuje obecność enzymów związanych z syntezą i degradacją DNA (16, 33—36) (por. 47) a także z fosforylacją jądra komórkowego (17, 70, 71).

Fosfoproteidy stanowią dość znaczny odsetek suchej masy jąder komórkowych np. 4% w przypadku grasicy cielęcia, a 9% — w wątrobie szczura (4), natomiast około 26% dezoksyrybonukleoproteidu z tkanki mózgowej (72, 73).

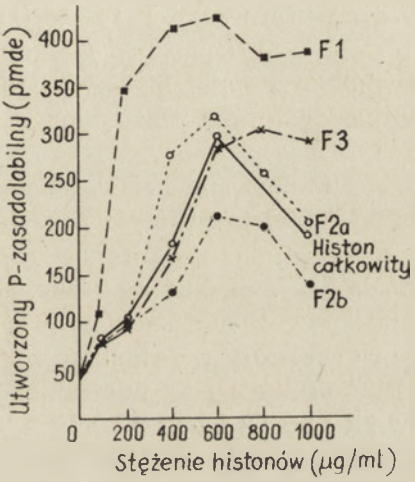
Białka niehistonowe są fosforylowane przez ATP, (lub też inne nukleozydotrójfosforany) na grupach hydroksylowych seryny i treoniny. Przenoszenie reszt fosforanowych na obydwa hydroksyaminokwasy przebiega

http://rcin.org.pl

z udziałem endogennej fosfokinazy, wykazującej labilność termiczną, 3-minutowe ogrzewanie w 60° niszczy całkowicie jej aktywność, przy czym głównie ulega ufosforylowaniu seryna (90%). Enzymatyczna fosforylacja białek niehistonowych grasicy cielęcej przebiega optymalnie w obecności ATP i jonów Mg^{2+} (25mM) w środowisku o dość rozległym zakresie pH (6,5—9,5) i w przeciwieństwie do kazeiny i fosfofityny nie wymaga dodatku egzogennego enzymu kinazy fosfoproteidowej (4). Większość jonów jedno- i dwuwartościowych przeważnie hamuje reakcję fosforylacji zarówno fosfoproteidów grasicy cielęcej (4) jak i z gruczołu krokowego szczura (37). Proces ten jest również w dużym stopniu hamowany przez N-etylomaleimid i p-chlororterciobenzoesan; jodooctan nie wykazuje nań żadnego wpływu. Fosforylację białek niehistonowych badano *in vitro* z udziałem różnych substratów jako donatorów reszt fosforanowych. W procesie fosforylacji fosfoproteidów grasicy cielęcia (4) i gruczołu krokowego (37) szczura stwierdzono, że donatorami reszt fosforanowych mogą być: ATP, dATP, GTP, ITP, CTP i UTP, natomiast ADP, piro- i ortofosforan nie są przydatne w tej reakcji. Efektywność przenoszenia fosforanu jest najwyższa przy użyciu ATP i dATP, jednakże dATP jest dobrym donatorem grup fosforanowych tylko w niewielkim stężeniu (4). Wykazane doświadczalnie przenoszenie fosforanu z różnych nukleozydotrójfosforanów na reszty hydroksyaminokwasów może mieć znaczenie biologiczne, gdyż nukleotydy jako naturalne składniki jądra komórkowego, których zawartość zmienia się w cyklu życiowym komórki, mogłyby modyfikować strukturę chromatyny poprzez ich oddziaływanie z fosfoproteidami. Brak odwracalności reakcji między ATP i fosfoproteidami (4) sugeruje, że te ostatnie nie mogą odgrywać roli zbiorników wysokoenergetycznego fosforanu ani pośredników wysokoenergetycznych w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Okazało się, że egzogenne ^{32}P-fosfoproteidy grasicy cielęcej po włączeniu w jądra komórkowe tego narządu ulegały szybciej defosforylacji (74). Zjawisko to nie miało charakteru proteolizy. Blokowanie syntezy ATP w jądrach komórkowych jodooctanem prowadziło do zahamowania wymiany reszt fosforanowych między endo- i egzogennymi fosfoproteidami; dodanie pirogronianu znoszącego hamujący efekt jodooctanu przywracało reakcję fosforylacji do poziomu próby kontrolnej. Okazało się, że cała radioaktywność ^{32}P-fosfoproteidów dodanych do jąder komórkowych przechodziła do frakcji rozpuszczalnej w zimnym 16% roztworze kwasu trójchlorooctowego. Uzupełniająca filtracja w żelu Sephadex G-15 wyjaśniła, że jedynym radioaktywnym produktem defosforylacji był fosforan nieorganiczny, co wskazywałoby, że ^{32}P fosfoproteidów nie jest wciągany w metaboliczne przenoszenie reszt fosforanowych na inne akceptory. Wyrazem wzrostu aktywności białek niehistonowych zaangażowanych w procesie syntezy RNA w czasie intensywnej genowej aktywności jest zwiększone tempo ich fosforylacji (40, 70, 71, 75). Stymulacja ludzkich limfocytów fitohemaglutyniną (PHA) prowadzi już w 15 minut po podaniu izotopu do wzrostu fo-

http://rcin.org.pl

sforylacji białek niehistonowych oraz wzmożonej syntezy RNA (71). Wydaje się, że proces fosforylacji białek niehistonowych podobnie jak acetylacja histonów poprzedza stymulację syntezy RNA w jądrach limfocytów. Stymulacja procesu transkrypcji przez ufosforylowane białka niehistonowe jest gatunkowo specyficzna (76). Podczas wielu doświadczeń nie obserwowano stymulacyjnego wpływu fosforylacji przez białka niehistonowe wątroby szczura na syntezę RNA, jeśli jako matrycy użyto DNA innego gatunku (np. ze spermy łososia, grasicy cielęcia, *E. coli* czy *C. perfringens*) lub kiedy ufosforylowane białka potraktowano alkaliczną fosfatazą.



Ryc. 4. Wpływ histonów całkowitych oraz ich 4 frakcji na fosforylację jądrowych fosfoproteidów.
Oznaczanie ilości radioaktywnego zasadolabilnego fosforanu po 10-minutowej inkubacji tych białek z [γ ^{32}P]-ATP (wg 77)

Duży wpływ na proces fosforylacji białek niehistonowych wykazują histony (77). Dodanie histonów *in vitro* powodowało 5—10-krotny wzrost fosforylacji fosfoproteidów grasicy, przy czym histon silnie lizynowy był najaktywniejszy w tej reakcji (Ryc. 4). W warunkach tych histony nie ulegały fosforylacji. Działanie odczynników sulfhydrylowych hamujących włączanie fosforanu w histony nie powodowało zmian w tempie enzymatycznej fosforylacji. Wpływ histonów na włączanie fosforanu był specyficzny, efektu stymulacji nie dawały inne białka, np. cytochrom c. albumina czy hemoglobina. Najprawdopodobniej histony zmieniają konformację białek niehistonowych i udostępniają w tych ostatnich nowe regiony dla reszt fosforanowych. Pojawienie się zwiększonej ilości ujemnie naładowanych grup w białkach niehistonowych wzmaga siłę ich elektrostatycznego wiązania z dodatnio naładowanymi histonami. Być może oddzia-

http://rcin.org.pl

ływanie między 2 typami różnoimiennie naładowanych białek chromatyny odsłania nowe odcinki helisy DNA dla syntezy RNA.

Z chromatyny wątroby szczura wyizolowano 2 kinazy białkowe zasocjowane z chromatyną wątroby szczura, przenoszące reszty γ-fosforanowe ATP na serynę i treoninę fosfoproteidów (38). W wyniku rozdziału w żelu Sephadex G-200 uzyskano 2 frakcje enzymu określane jako kinaza A_1 i A_2. Enzymy te były najbardziej aktywne w zakresie pH 6,0—6,5 i 7,0—7,5 w obecności 20mM jonów Mg^{+2}. Obie kinazy wykazywały znaczną specyficzność substratową w przypadku fosfoproteidów jądrowych, kazeiny czy fosfofityny, natomiast nie działały na histony i protaminy.

Odmienna specyficzność substratowa cechuje również dwie kinazy wyizolowane z jąder komórkowych wątroby szczura (41). Jedna z nich fosforylowała w zbliżonym stopniu fosfitynę, podczas gdy druga — głównie fosfitynę, a także w niewielkim stopniu histony. Białka enzymatyczne wykazywały znaczne różnice w masie cząsteczkowej (współczynnik sedymentacji 3,6 oraz 10,8S).

Fosfoproteidy jądrowe inkubowane z ATP, jonami Mg^{+2} i homologiczną chromatyną powodują jej silniejszą fosforylację (39). Obecna w nich endogenna kinaza białkowa jest zdolna do przenoszenia grup fosforanowych zarówno na fosfoproteidy jak i na histony frakcji F-2b. Oczyszczona na fosfocelulozie kinaza białkowa, inkubowana z fosfoproteidami i histonami F-2b, fosforyluje obydwa substraty w jednakowym stopniu w mieszaninie i oddzielnie. Histony F-2b usunięte z tej mieszaniny za pomocą protaminy zachowują radioaktywność tego samego rozmiaru jak w przypadku oddzielnej inkubacji z kinazą (tabela 1). Jądrowa kinaza nie jest jednak zdolna do przenoszenia grup fosforanowych z fosfoproteidów na histony F-2b.

Tabela 1

Fosforylacja fosfoproteidów jądrowych i histonu F2b przez jądrową kinazę białkową (wg 44)

Substrat	^{32}P włączony (imp/min.)
Fosfoproteidy	1196
Histon F-2b	1155
Fosfoproteidy + histon F-2b	2785
Histon F-2b	1142

Histon usuwano z mieszaniny inkubacyjnej za pomocą protaminy.

Uważa się (37, 38, 40, 41, 44, 71, 78), że proces fosforylacji białek niehistonowych w przeciwieństwie do histonów nie jest sytmulowany przez cykliczny AMP (cAMP). Ostatnie jednak doświadczenia (79) dowodzą, że cAMP selektywnie stymuluje *in vivo* fosforylację fenolorozpuszczalnych fosfoproteidów wątroby szczura. W 15 minut po wstrzyknięciu cAMP

http://rcin.org.pl

obserwuje się około 30% wzrost włączania prekursora ^{32}P-ortofosforanu w fosfoproteidy, przy czym w niektórych frakcjach wzrost stopnia fosforylacji dochodzi do 200%. Dane te przemawiają za selektywną fosforylacją fosfoproteidów stymulowaną przez cAMP.

Porównanie stopnia włączania radioaktywnego fosforanu w obecności cAMP w białka histonowe i niehistonowe pozwoliło stwierdzić w tych ostatnich 2-krotnie wyższe piętno izotopowe (80). Być może, rzeczywista różnica w radioaktywności obu typów białek chromatyny była większa z uwagi na prawdopodobne zanieczyszczenia histonów białkami niehistonowymi. Fakt znacznie aktywniejszej fosforylacji wolnych frakcji histonowych niż związanych w kompleksie chromatynowym sugeruje, że w chromatynie ewentualne miejsca fosforylacji tych białek są w interakcji z DNA, zmniejszając w ten sposób dostępność do nich kinazy białkowej.

III. Udział białek niehistonowych w represji i aktywacji genów

Powszechnie wiadomo, że tylko niewielka ilość DNA chromatyny jest aktywna jako matryca dla syntezy RNA. Aktywność matrycowa chromatyny szczura w syntezie RNA *in vitro* stanowiła około 15% aktywności wolnego DNA (66). Ograniczanie DNA jest prawdopodobnie tkankowo-specyficzne. Dotychczas jednak definitywnie nie sprecyzowano, który ze składników jądra komórkowego posiada właściwości tkankowo-specyficznej represji. Wysokocząsteczkowe polianiony, jak białka niehistonowe i RNA, grają zapewne tę rolę.

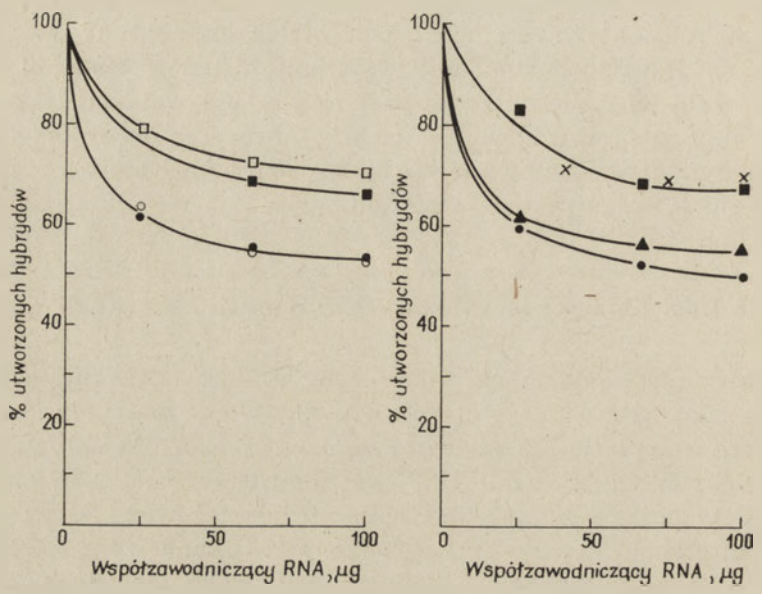
W poszukiwaniu czynników odpowiedzialnych za ograniczanie matrycowej aktywności chromatyny dysocjowano natywną chromatynę głównie w układzie o pH 6,0 z następczym tworzeniem sztucznych hybrydów chromatyny z uzyskanych produktów dysocjacji i badaniem aktywności tych hybrydów w syntezie RNA (24, 81, 82).

Dysocjacja chromatyny w układzie 2M NaCl — 5M mocznik — 0,05M octan sodu (pH 6), z odwirowaniem przy 110 000×g przez 36 godzin, dostarczała w supernatancie histonów z nieznacznym odsetkiem białek niehistonowych (ok. 10%), zaś w osadzie — DNA z główną pulą białek niehistonowych. Odzyskanie jej stawało się możliwe w układzie 2M NaCl — 5M mocznik — 0,01 bufor tris-HCl (pH 8,3) z dodatkiem 50mM $NaHSO_3$ dla zapobieżenia degradacji proteolitycznej. Chromatyna odtworzona ze składników zdysocjowanych zarówno w pH 6,0 jak i 8,3 wykazywała ograniczanie matrycowej aktywności DNA, zbliżone do naturalnej chromatyny (24). W chromatynie całkowicie pozbawionej histonów około 25—40% DNA pozostawało nieaktywnym w syntezie RNA.

Badanie aktywności matrycowej w syntezie RNA krzyżowych hybrydów utworzonych ze składników zdysocjowanej w pH 6,0 chromatyny wątroby i grasicy szczura wykazało, że za tkankowospecyficzne ogra-

http://rcin.org.pl

niczenie chromatyny w syntezie RNA odpowiedzialne są białka niehistonowe. Na przykład chromatyna odtworzona z kompleksu DNA—białka niehistonowe wątroby szczura oraz z histonów z grasicy szczura wykazywała aktywność w syntezie RNA analogiczną do odpowiedniej aktywności rodzimej chromatyny wątroby szczura i odwrotnie (Ryc. 5).



Ryc. 5. Aktywność matrycowa w syntezie RNA *in vitro* mierzona stopniem hybrydyzacji DNA-RNA przepisanego z: rodzimej chromatyny wątroby szczura (●———●), rekonstruowanej chromatyny wątroby (○———○), rodzimej chromatyny grasicy (■———■), rekonstruowanej chromatyny gracicy (□———□), a także hybrydów chromatyny utworzonych z histonów grasicy i kompleksu DNA—białka niehistonowe chromatyny wątroby (▲———▲) oraz z histonów wątroby i kompleksu DNA—białka niehistonowe chromatyny grasicy szczura (x———x), (wg 24)

Wszystkie rekonstrukcje przeprowadzono w toku gradientowej dializy (od 2,0 do 0,4M NaCl) wobec układu 5M mocznik—0,05M octan sodu (pH 6,0) przez 16 godzin, a następnie wobec 0,05M octanu sodu (pH 6,0)

Obok ostatnio wysuwanych sugestii, co do udziału białek niehistonowych w specyficznej represji genowej, od 1967 roku datują się doniesienia o specyficznym aktywowaniu przez nie procesu transkrypcji. Niektóre prace (14, 23, 66, 75) potwierdzają efekt stymulacji *in vitro* układu polimerazy RNA przez pewne frakcje białek niehistonowych. Białka niehistonowe wątroby szczura stymulują w jednakowym stopniu matrycową aktywność heterochromatyny i euchromatyny tej tkanki z uwzględnieniem, że kontrolna euchromatyna, z uwagi na wyższą zawartość białek niehistonowych, była o 54% bardziej aktywna w syntezie RNA niż heterochromatyna. Nowo utworzony RNA na chromatynach aktywowanych przez homo-

http://rcin.org.pl

logiczne lub heterologiczne białka niehistonowe hybrydyzował z DNA pochodzących z tych chromatyn w rozleglejszym stopniu niż RNA przepisany z odpowiednich chromatyn kontrolnych (23). Można wnioskować, że RNA nowo utworzony na chromatynie aktywowanej białkami niehistonowymi przedstawia sobą nowy typ RNA zawierający więcej informacji z przepisanego odcinka genomu niż w chromatynie kontrolnej. RNA przepisany z chromatyny guza Walkera, aktywowanej za pomocą homologicznych białek niehistonowych był różny od RNA syntetyzowanego na matrycy stymulowanej heterologicznymi białkami niehistonowymi.

Całość danych dowodzi, że: *1.* RNA przepisane z chromatyny aktywowanej przez homologiczne i heterologiczne białka niehistonowe reprezentują produkty transkrypcji z dodatkowych odcinków DNA. *2.* Homologiczne białka niehistonowe stymulują transkrypcję z innych odcinków DNA niż heterologiczne.

Tabela 2

Skład nukleotydowy RNA przepisanego z chromatyny wątroby szczura w obecności białek niehistonowych
(frakcje 9 i 20 uzyskane w toku chromatografii na DEAE-celulozie) (wg 66)

Matryca	Mol% nukleotydów				A+U / C+G
	CPM	AMP	GMP	UMP	
Chromatyna	32,2	25,5	25,8	16,5	0,72
Chromatyna + białka niehistonowe (frakcja 9)	30,0	26,3	23,4	20,3	0,89
Chromatyna + białka niehistonowe (frakcja 20)	31,8	26,1	22,6	19,5	0,82

Ciekawy wydaje się fakt, że RNA nowo syntetyzowany na matrycy chromatyny aktywowanej przez białka niehistonowe wykazuje inny skład nukleotydowy w porównaniu z RNA przepisanym z chromatyny kontrolnej (tabela 2) (66). Zmiany na poziomie transkrypcji DNA *in vitro* wywołane aktywacją matrycy przez białka niehistonowe znalazły również odbicie w procesie translacji. RNA nowo przepisane z chromatyny stymulowanej przez różne frakcje białek niehistonowych kodowały odmienne polipeptydy niż RNA kontrolny. Te jakościowo różne łańcuchy polipeptydowe były ponadto znacznie dłuższe (tabela 3), co potwierdzałoby dotychczasowe wnioski, że wzmożonej transkrypcji uległy dodatkowe odcinki genomu.

Ludzkie fibroblasty WI-38 stymulowane do proliferacji przez zmianę podłoża wykazują wzrost matrycowej aktywności chromatyny, tj. wzmożoną syntezę RNA w 1 godzinę po wymianie starego środowiska hodowlanego na świeże, zawierające 10% płodowej surowicy cielęcej (83). Zwiększenie aktywności matrycowej cechowało nie tylko chromatynę natywną ze stymulowanych fibroblastów, ale również chromatynę rekonstruowaną

http://rcin.org.pl

Tabela 3

Długość łańcuchów polipeptydowych kodowanych przez rRNA przepisane z chromatyny wątroby szczura w obecności lub przy braku białek niehistonowych (wg 66)

Matryce dla RNA	[^{14}C]-aminokwasy włączone (imp./min)	[^{3}H]-puromycyna włączona (imp./min)	Względna długość łańcuchów polipeptydowych
DNA	992	2429	1,56
Chromatyna	707	2703	1,00
Chromatyna + białka niehistonowe (frakcja 9)	1106	2716	1,55
Chromatyna + białka niehistonowe (frakcja 20)	834	2263	1,41

z całości chromosomowych białek takich fibroblastów z DNA pochodzącym z komórek HeLa. Hybrydy chromatyny zawierające DNA z komórek HeLa, histony z niestymulowanych i stymulowanych fibroblastów, a białka niehistonowe tylko ze stymulowanych fibroblastów wykazywały wyższą aktywność w syntezie RNA niż analogiczne hybrydy, ale z białkami niehistonowymi izolowanymi z niestymulowanych fibroblastów. Z uwagi na identyczność DNA i histonów w obu typach hybrydów chromatynowych, czynnikami aktywującymi proces transkrypcji wydawały się być białka niehistonowe.

Wydaje się prawdopodobne, że natychmiast po pobudzeniu fibroblastów do wzrostu na matrycach syntetyzowane są białka niehistonowe, które przyłączając się do genomu mogą być odpowiedzialne za wyzwolenie transkrypcji wymaganej do zainicjowania sekwencji wydarzeń biochemicznych prowadzących do syntezy DNA i podziału komórkowego.

IV. Interakcja białek niehistonowych z hormonami

Od sugestii Zalokara (84), że działanie hormonów wiąże się z selektywną aktywacją genów w odpowiednich tkankach, przedmiotem licznych doświadczeń stało się badanie oddziaływania hormonów z chromatyną. W ostatnich latach wykazano specyficzne wiązanie pewnych hormonów, głównie sterydowych, z chromatynami izolowanymi z tkanek docelowych, np. 17β-estradiolu (85—88), dwuetylostibestrolu (7,88) z chromatyną macicy, progesteronu z chromatyną jajowodu (2, 7, 31, 32, 89), aldosteronu z chromatyną nerki (85), hydrokortyzonu i kortyzolu z chromatyną wątroby (90,91), testosteronu z chromatyną gruczołu krokowego (37).

http://rcin.org.pl

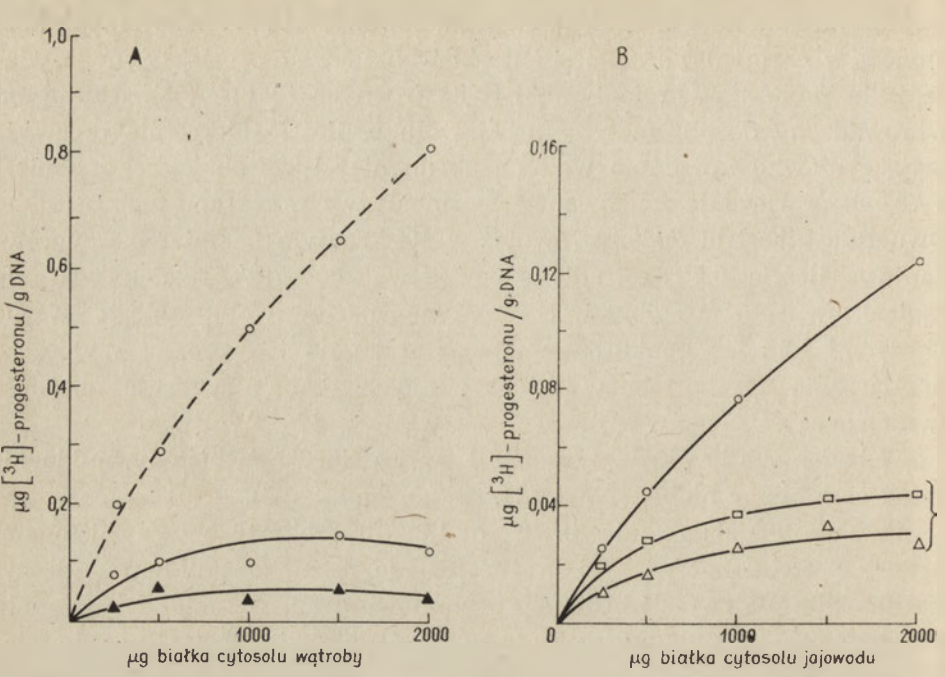
Konkurencyjne włączanie *in vitro* znakowanych i nie znakowanych hormonów w chromatynę macicy i nerki wołu dowiodło selektywnego wiązania hormonów z chromatynami tylko pewnych tkanek (88). Aldosteron wprowadzony do chromatyny nerki wołu w ilości 10^4-krotnie przewyższającej dawkę uprzednio włączonego do niej 1,2^{3}H-aldosteronu obniżał o 70—80% wiązanie znakowanego hormonu w chromatynę tego narządu. Dwuetylostilbestrol dodany również w 10^4-krotnym nadmiarze w porównaniu z ilością 6,7^{3}H-estradiolu powodował 60—70% spadek wiązania radioaktywnego estradiolu w chromatynę macicy wołu; aldosteron nie okazywał żadnego konkurencyjnego wpływu na ten proces. Wybiórcze przyłączanie się hormonów do określonych tkanek sugeruje obecność w nich specyficznego receptora.

W badaniach *in vitro* z hormonami wiążą się: DNA, histony, nukleohistony oraz białka niehistonowe (81, 82, 85, 86, 92—95).

Badanie oddziaływania *in vitro* 1,2^{3}H-hydrokortyzonu z histonami grasicy cielęcia doprowadziło do stwierdzenia, że znakowany hormon łączył się głównie (ok. 65%) z histonem argininowym F3, w mniejszym stopniu z histonem F-1 i tylko nieznacznie z histonami F-2b i F-2a. Znaczne wiązanie hormonów z histonem argininowym być może jest spowodowane zanieczyszczeniem jego białkami niehistonowymi (96). Prace nad charakterem wiązania progesteronu ze składnikami chromatyn różnych tkanek kurczęcia wykazały, że radioaktywny hormon, inkubowany z cytosolem komórek wątroby, włączał się tylko nieznacznie w chromatynę jajowodu, śledziony czy wątroby kurczęcia, podczas gdy ^{3}H-progesteron inkubowany z cytosolem komórek jajowodu wykazywał wybitne powinowactwo wyłącznie do chromatyny jajowodu kurczęcia (Ryc. 6A). Dane te sugerowały, że w tkankach wrażliwych na hormon występuje specyficzny dla nich receptor, a więc dla progesteronu — w cytosolu jajowodu. Uwalnianie się kompleksu hormon—receptor z jąder komórkowych pod wpływem proteaz wskazywałoby na jego białkową naturę (85). Radioaktywny kompleks ^{3}H-progestron—receptor cytoplazmatyczny jajowodu włączał się w rodzimą chromatynę jajowodu znacznie silniej niż w sztuczny nukleohiston o stosunku $\frac{\text{DNA}}{\text{histon}}$ odpowiadającym naturalnej chromatynie (31), co sugerowałoby, że w interakcji układu hormon—receptor z chromatyną uczestniczą inne białka niż histony (Ryc. 6B), najprawdopodobniej białka niehistonowe.

Wiązanie ^{3}H-progesteronu uprzednio inkubowanego z cystosolem komórek jajowodu kurczęcia zmienia się w różnych stadiach rozwoju tego narządu (różnicowanie stymulowano przez podanie dwuetylostilbestrolu) i osiąga maksimum w 7-mym dniu (7). Stopień wiązania kompleksu hormon—receptor koreluje z poziomem białek niehistonowych i RNA chroma-

http://rcin.org.pl



Ryc. 6 A. Wiązanie ^{3}H-progesteronu preinkubowanego z cytosolem jajowodu (— — —) lub z cytosolem wątroby (———) przez 30—50µg rodzimych chromatyn: jajowodu kurcząt po 15—dniowym działaniu estrogenu (○) oraz wątroby (▲) kurcząt kontrolnych

Ryc. 6 B. Wiązanie ^{3}H-progesteronu (preinkubowanego z cystosolem jajowodu) przez 30—50µg rodzimej chromatyny jajowodu $\left(\frac{\text{histon}}{\text{DNA}} = 0{,}95;\ \frac{\text{białka niehistonowe}}{\text{DNA}} = 0{,}54;\right.$ odsłonięcie matrycy: 3,8%$\left.\right)$ (○———○), „nukleohiston" A $\left(\frac{\text{histon}}{\text{DNA}} = 0{,}90;\right.$ odsłonięcie matrycy: 9,0%$\left.\right)$ (□—□) i „nukleohiston" B $\left(\frac{\text{histon}}{\text{DNA}} = 1{,}3;\right.$ odsłonięcie matrycy: 5,0%$\left.\right)$ (△—△) (wg 31)

Oczyszczone histony jajowodu dodawano wolno mieszając do oczyszczonego DNA jajowodu; w przypadku nukleohistonu A: 3 mg histonów i 3mg DNA, a nukleohistonu B — 6mg histonu i 3mg DNA

tyny jajowodu. Z uwagi na to, że chromatyna niezróżnicowanego jajowodu kurczęcia wiąże kompleks progesteron—receptor znacznie aktywniej niż chromatyna nerki czy erytrocytów kurczęcia, można wnioskować, że zdolność do wiązania hormonu nie jest osiągana w czasie indukowanego estrogenem dojrzewania jajowodu, lecz musi istnieć już we wczesnych stadiach organogenezy tej tkanki (7).

Sprzężenie kompleksu hormon—cytoplazmatyczny receptor z chromatyną może się odbywać poprzez odsłonięte odcinki DNA bądź poprzez białka niehistonowe, które spełniałyby w ten sposób rolę akceptora. Z przed-

http://rcin.org.pl

stawianych licznych badań (2, 7, 31, 42, 89) wynikają następujące dane: *1*) Progesteron dla specyficznego połączenia się z chromatyną wymaga białkowego receptora w cytoplaźmie komórek docelowych, tj. jajowodu; *2*) Jądra komórkowe jajowodu wykazują zdolność wiązania kompleksu progesteron—cytoplazmatyczny receptor, podczas gdy tej cechy nie wykazują (lub tylko w nieznacznym odsetku) jądra komórkowe nerki, płuc, jelit, wątroby; *3*) Jądrowo związany kompleks progesteronu z białkowym cytoplazmatycznym receptorem daje się ekstrahować roztworami o wysokim stężeniu soli. Wynik ten potwierdza wcześniejsze obserwacje King a i Gordona (85, 86) nad izolowaniem i właściwościami kompleksu receptor białkowy 17β-estradiol, pochodzącego z tkanek wrażliwych na estrogeny.

Białka niehistonowe chromatyny jajowodu posiadają miejsca akceptorowe dla wiązania progesteronu, a ponadto wykazują właściwości imunologiczne (89). Rozpoznawanie przeciwciał skierowanych przeciw białkom niehistonowym było wysoce specyficzne i reproduktywne. Odczyn wiązania dopełniacza mierzono w reakcji przeciwciał z antygenami, którymi były kompleksy DNA — białka niehistonowe z chromatyny rodzimej czy rekonstruowanej jajowodu bądź też erytrocytów kurczęcia. Rekonstruowana chromatyna różniła się tylko nieznacznie w porównaniu z rodzimą w zdolności reakcji wiązania z przeciwciałem, co mogło być spowodowane niepełną interakcją białek niehistonowych z DNA. Specyficzna zdolność przeciwciał w rozpoznawaniu tylko białek niehistonowych jajowodu została potwierdzona brakiem wyraźnej reakcji z kompleksem białka niehistonowe—DNA z rodzimej chromatyny erytrocytów. Ciekawe jest stwierdzenie wiązania dopełniacza w przypadku zastosowania takiego hybrydowego antygenu, jak DNA erytrocytów—białka niehistonowe jajowodu, podczas gdy hybryd w postaci DNA jajowodu—białka niehistonowe erytrocytów wykazywał jedynie śladową antygenność.

Badania prowadzone (97, 98) nad wyizolowaniem i właściwościami kompleksu estradiol—receptor macicy i endometrium cielęcia doprowadziły do stwierdzenia, że estradiol jest zasocjowany z tzw. podjednostką 4S zewnątrzjądrowego receptora białkowego o masie 8S, który może przechodzić aktywną postać 5S pod wpływem temperatury (98). Ta aktywna postać cytoplazmatycznego receptora białkowego w kompleksie z hormonem powoduje wzrost syntezy RNA (2,7-krotny w porównaniu z kontrolą) w jądrach komórkowych macicy cielęcia; w przypadku jąder komórkowych wątroby i nerki szczura nie obserwowano podobnych zmian. Należy nadmienić, że ostatnio (99) udało się wyizolować kompleks: cytoplazmatyczny receptor z macicy szczura—^{3}H-estradiol, który włączał się w jądra komórkowe tkanki docelowej (macica) równie dobrze jak i w jądra komórkowe innych tkanek szczura, (żołądek, wątroba, nowotwór sutka R3230AC); wiązanie jego ze śledzioną było nieznaczne. Kompleksy hormon—receptor,

http://rcin.org.pl

wyizolowane (po uprzednim włączeniu) z jąder komórek docelowych i komórek „niedocelowych" wykazywały podobne współczynniki sedymentacji.

Mechanizm, za pomocą którego hormony aktywują geny po sprzężeniu się z chromatyną, stanowi poważny problem w molekularnej endokrynologii i biochemii. Najbardziej pomyślnym modelem do tego typu badań wydają się być politeniczne chromosomy owadów dwuskrzydłych.

Na uwagę zasługują zmiany zachodzące w lokalizacji białek niehistonowych w chromosomach olbrzymich gruczołów śliniankowych muszki owocowej *Drosophila hydei*, a indukowane bądź termicznie bądź β-ekdysonem (100). Pufy tych chromosomów reprezentujące według Clevera (101) tzw. „geny w akcji" zawierają więcej białek niehistonowych niż chromosomy bezpufowe przy braku jakichkolwiek różnic w ilości w nich histonów. Akumulacja białek niehistonowych wydaje się być pierwszym wydarzeniem w tworzeniu się pufów. Białka niehistonowe, izolowane z jąder komórkowych gruczołów śliniankowych larw *D. hydei* kontrolnych, a także po uprzedniej indukcji termicznej 37°, 30 min. lub β-ekdysonem w obecności cAMP (45 min), poddawano elektroforezie w żelu poliakryloamidowym. Białka niehistonowe z chromosomów politenicznych kontrolnych zawierały 15—18 frakcji, natomiast w profilach elektroforetycznych białek niehistonowych z chromosomów pufowych pojawiało się dodatkowe pasmo białkowe o masie cząsteczkowej 23 000 daltonów w odpowiedzi na działanie temperatury, a o masie 42 000 daltonów — przy zastosowaniu ekdysonu jako czynnika indukującego tworzenie się pufów. Nieomal jednakowy rozkład radioaktywności we wszystkich pasmach elektroforetycznych białek niehistonowych otrzymanych z gruczołów śliniankowych larw *D. hydei* po uprzedniej inkubacji z hormonem w obecności ^{3}H-L-aminokwasów wyklucza syntezę jednej tylko frakcji białkowej. Być może wraz z aktywacją genów pod wpływem hormonu następuje w jądrze komórkowym nagromadzenie białek niehistonowych, które zostają już wcześniej zsyntetyzowane i to najprawdopdobniej w cytoplazmie (100).

W chwili obecnej stało się sprawą oczywistą, że inne hormony jak hydrokortyzon, estradiol uczestniczą w indukowaniu specyficznych zmian w syntezie białek niehistonowych na terenie różnych narządów docelowych. I tak, np. 17-β-estradiol stymuluje wzrost włączania ^{3}H-tryptofanu we frakcje białek niehistonowych macicy (87) wobec znikomego włączania w białka niehistonowe wątroby. Ta stymulacja ogranicza się do pojedynczej frakcji. Z doświadczeń powyższych wynika, że indukcja syntezy białek niehistonowych przez hormon jest narządowo-specyficzna. Szybkość włączania [^{3}H]-tryptofanu w białka niehistonowe macicy stymulowana przez 17-β-estradiol jest największa w 12 godzin po podaniu hormonu. W tym samym czasie obserwowano maksymalną aktywację genów macicy (98) przejawiającą się wzrostem aktywności matrycowej w syntezie RNA zależnej od DNA. Zjawisku temu towarzyszy zwiększona synteza białek nie-

http://rcin.org.pl

histonowych, w ścisłym związku z pojawianiem się nowych rybosomów w cytoplazmie (75, 102).

Ostatnio (26) również dostarczono dowodów specyficzności odpowiedzi w syntezie białek niehistonowych wątroby szczura na aktywację genową indukowaną kortyzolem. Białka te charakteryzuje wysoka szybkość syntezy, np. w 1 godzinę po włączeniu ^{14}C-leucyny specyficzna aktywność dla białek niehistonowych wynosiła 9 550, dla białek cytoplazmatycznych — 5 450, a dla histonów tylko 2 640 imp./min./mg białka. Analiza w żelu poliakrylamidowym wykazała, że wstrzyknięcie kortyzolu adrenalektomizowanym szczurom indukuje szybką syntezę tylko jednej frakcji białek niehistonowych wątroby o masie cząsteczkowej 41 000 specyficznie wiążącej się z kortyzolem.

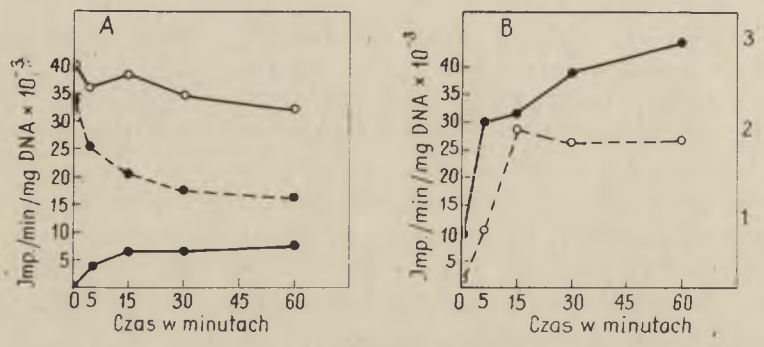
Należy zwrócić uwagę na wpływ testosteronu na metabolizm jądrowych fosfoproteidów gruczołu krokowego szczura (37). Orchiektomia powoduje zanik włączania ^{32}P w fosfoproteidy młodej tkanki gruczołu krokowego, a u osobników dojrzałych zanik gruczołu; nie okazuje ona żadnego wpływu na fosforylację fosfoproteidów wątroby. Dodanie testosteronu całkowicie znosi efekt kastracji szczura i już w 30 minut po podaniu hormonu obserwuje się intensywne włączanie ^{32}P w jądra komórkowe gruczołu. Kortyzol podany normalnym i adrenalektomizowanym szczurom wpływa na poziom grup tiolowych w białkach jądrowych. Okazało się, że w 15—30 minut po podaniu hormonu następuje wzrost zawartości grup tiolowych (oznaczonych poprzez włączanie ^{3}H-jodooctanu, N-^{14}C-etylomaleimidu lub metodami kolorymetrycznymi) zarówno w histonach jak i w białkach niehistonowych wątroby o masie cząsteczkowej odpowiadającej 45 000 daltonów. Równolegle obserwowano stymulację syntezy RNA.

V. Synteza białek niehistonowych

W badaniach nad syntezą białek komórkowych w zsynchronizowanych hodowlach HeLa S_3 stwierdzono praktycznie nie zmienione tempo syntezy białek niehistonowych (stanowiących pozostałość jąder komórkowych po usunięciu globulin i histonów, rozpuszczalną w 0,1% roztworze SDS) w fazach S_1G_2 oraz w czasie mitozy (103). Aby zidentyfikować miejsce syntezy białek niehistonowych stosowano znakowanie ^{3}H-leucyną komórek HeLa w logarytmicznej fazie wzrostu (104). Po 2-minutowym znakowaniu pulsowym tym aminokwasem badano w ciągu 60 minut tempo syntezy białek całkowitych, cytoplazmatycznych oraz jądrowych. Szybkość włączania się ^{3}H-leucyny w białko całkowite komórek HeLa utrzymywała się na tym samym poziomie, natomiast obniżaniu się stopnia włączania tego aminokwasu w białka cytoplazmatyczne towarzyszyło zwiększanie się tempa piętna izotopowego w białkach jądrowych. Aby wyeliminować możliwość

http://rcin.org.pl

wtórnego włączania izotopu skrócono czas znakowania pulsowego ^{3}H-leucyny do 30 sekund, zatrzymując reakcję przez dodanie cykloheksimidu. Wyraźny spadek włączania ^{3}H-leucyny w białka całkowite i cytoplazmatyczne z odpowiednim wzrostem radioaktywności w białkach niehistonowych (Ryc. 7) był podstawą do wniosku, że te ostatnie syntetyzują się w cytoplaźmie, a potem są transportowane do jądra komórkowego. Stwierdzenie to nie wyklucza jednak możliwości równoległej syntezy białek niehistonowych na terenie jądra.



Ryc. 7 A. Włączanie ^{3}H-leucyny w całkowite białka komórki (○———○) białka jądrowe (●———●) i cytoplazmatyczne (● — — — ●) w różnym czasie po znakowaniu pulsowym przez 30 sekund (reakcję zatrzymano przez podanie 5μg/ml cykloheksoimidu)

Ryc. 7 B. Włączanie ^{3}H-leucyny w histony (○ — — — ○) i białka niehistonowe (●———●) w warunkach podanych w A (wg 104)

Kinetykę syntezy białek niehistonowych i ich nagromadzenie badano (48, 105) w cyklu mitotycznym komórek HeLa. W przeciwieństwie do histonów, których synteza jest sprzężona z replikacją DNA, wzrost syntezy i nagromadzenie białek niehistonowych zachodzi przed rozpoczęciem replikacji DNA, czyli w późnej fazie G_1, z następnym spadkiem w fazie S i G_2 i nie zostaje przerwana w czasie mitozy. Synteza tych białek nie jest hamowana przez czynniki blokujące syntezę DNA (np. arabinozyd cytozyny). Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym białek niehistonowych z fazy G_1, S, G_2 znakowanych radioaktywnymi aminokwasami (^{3}H-Trp, ^{14}C-Liz) pozwoliła stwierdzić kilka pasm, o różnych masach cząsteczkowych. Niektóre z nich reprezentowały histonopodobne peptydy, nie ekstrahujące się rozcieńczonymi roztworami kwasów mineralnych. Rozdziały elektroforetyczne frakcji białkowych wymywających się 0,25M roztworem kwasu siarkowego wykazały obecność kilku frakcji białek niehistonowych zawierających traptofan, których synteza przebiegała w ciągu całego cyklu mitotycznego komórek HeLa. Można się spodziewać, że te peptydy mogą być odpowiedzialne w znacznym stopniu za syntezę histonów w fazie G_1. Przejściu

http://rcin.org.pl

komórek HeLa z fazy S w G_2 towarzyszy synteza białek niehistonowych o wysokiej specyficznej aktywności i dużej masie cząsteczkowej.

Badanie szybkości syntezy białek niehistonowych w cyklu mitotycznym komórek nowotworowych szczepu P 815 Y pozwoliło zaobserwować podwyższone jej tempo mierzone włączaniem znakowanych ^{14}C-aminokwasów w te białka w fazie G_1 z powolnym obniżaniem się w fazie S i wyraźnym spadkiem w fazie G_2. Równolegle przeprowadzano badanie stopnia fosforylacji białek niehistonowych; najaktywniejsze włączanie radioaktywnego fosforu następowało w fazie S (106).

Na uwagę zasługują wyniki badania tempa syntezy białek niehistonowych w jądrach komórkowych węzłów chłonnych świnki morskiej po aktywacji przez PHA (27). Tkanka limfatyczna jest dobrym modelem do badania wczesnych zmian aktywacji genomu; wiadomo, że synteza DNA i mitozy występują w niej w 24—48 godzin po zadziałaniu PHA. Okazało się, że w 1—3 godzin po stymulacji limfocytów przez PHA następuje około 20% wzrost syntezy białek niehistonowych, bez wyraźniejszych zmian w syntezie histonów, w porównaniu z komórkami nie stymulowanymi. Najbardziej interesujące wydaje się stwierdzenie, że stymulacja syntezy białek niehistonowych przez PHA osiąga różny stopień w obrębie poszczególnych frakcji, osiągając maksimum po 8 godzinach oraz 6-krotny wzrost ilości tych białek w kilku frakcjach (14, 16, 40, 52—54) w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Selektywność stymulacji syntezy białek niehistonowych przez PHA (27) i hormony (75, 87), odbywającej się znacznie wcześniej przed syntezą DNA, przemawia za ich udziałem w kontrolowaniu ekspresji genów.

Uwagi końcowe

Białka niehistonowe spełniają wiele wymagań stawianych wielkocząsteczkom kandydującym na pozycję regulatorów genów, a mianowicie: niejednorodność, specyficzność tkankową i gatunkową, wybitny obrót, różną zawartość w obrębie euchromatyny i heterochromatyny, specyficzność wiązania z homologicznym DNA, czy selektywność interakcji z hormonami.

Białka niehistonowe wykazują ponadto wieloraką aktywność enzymatyczną, co wskazuje na ich zaangażowanie w wiele procesów metabolicznych między innymi w fosforylację białek chromatyny. Większość poznanych kinaz jądrowych stanowi aktywne frakcje białek niehistonowych, których funkcja związana jest z fosforylacją ich samych (4, 37, 39, 40, 44, 77, 78) oraz histonów (39). Zmiany w obrębie białek niehistonowych chromatyny, w wyniku fosforylacji, mogą modyfikować konformację kompleksu chromatynowego (77), wzmagać oddziaływanie z dodatnio naładowanymi histonami i przez to udostępniać odblokowane odcinki genomu do od-

http://rcin.org.pl

czytywania podczas syntezy RNA. Zwiększone tempo fosforylacji białek niehistonowych w procesie transkrypcji jest tego wyrazem (40, 70, 71, 75).

Wciąż dyskutowanym zagadnieniem jest wpływ cAMP na fosforylację białek niehistonowych przez endogenne kinazy jądrowe. Większość badań podkreśla niezależność tego procesu od cAMP (37, 38, 40, 41, 71, 78). Jednakże najnowsze doniesienia z pracowni Allfrey'a (79) oraz Chae i wsp. (80) wykazały, że proces fosforylacji białek niehistonowych, podobnie jak histonów przebiega z udziałem tego nukleotydu. Rozbieżność wyników daje się tłumaczyć między innymi sposobem preparowania kinaz, które w przypadku drastycznych warunków izolowania mogą dysocjować na podjednostkę regulatorową i katalityczną (108), przy czym ta ostatnia zachowuje się jak enzym działający niezależnie od cAMP.

PIŚMIENNICTWO

1. Dingman C. W., Sporn M. B., J. *Biol. Chem.* **239**, 3483 (1964).
2. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W., *J. Biol. Chem.* **240**, 4188 (1971).
3. Shelton K. R., Noelin J. M., *Biochemistry* **10**, 2342 (1971).
4. Kleinsmith L. J., Allfrey V. C., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 123 (1969).
5. MacGillivray A. J., Cameron R. J., Krauze R. J., Rickwood D., Paul J., *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 384 (1972).
6. Show L. M. J., Huang R. C., *Biochemistry* **9**, 4530 (1970).
7. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W., *Biochim. Biophys. Acta* **254**, 129 (1971).
8. Wasilewa N. A., Biełkina G. G., Tongur A. M., Dawtian J., *Biochimija* **34**, 1239 (1969).
9. Hill R. J., Poccia D. C., Doty P., *J. Mol. Biol.* **61**, 445 (1971).
10. Bonner J., Dahmus M. E., Fambrough D., Huang R. C., Marushige K., Tuan D., *Science* **159**, 47 (1968).
11. Frenster J. H., *Nature* **206**, 680 (1965).
12. Berman A. E., Lebkowa N. P., Artamonowa W. A., Zburski I. B., *Mol. Biol.*, **2**, 224 (1970).
13. Seligy V., Miyagi M., *Exptl. Cell Res.*, **58**, 27 (1969).
14. Langan T. A., w Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, red. Koningsberger V. V., Bosch L., Elsevier Publishing Company, Amsterdam. London—New York 1967, str. 233.
15. Spelsberg T. C., Hnilica L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 63 (1969).
16. Wang T. Y., *Exptl. Cell Res.* **53**, 288 (1968).
17. Wang T. Y., *Exptl. Cell. Res.*, **57**, 467 (1969).
18. Wang T. Y., *Exptl. Cell Res.*, **69**, 217 (1971).
19. Umanski S. R., Tokarska W. J., Zotowa R. N., Migusina W. J., *Mol. Biol.*, **5**, 270 (1971).
20. Richter K. H., Sekeris C. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 44 (1972).
21. Teng C. T., Teng C. S., Allfrey V. G., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 690 (1970).
22. Teng C. S., Teng C. T., Allfrey V. G., *J. Biol. Chem.*, **246**, 3597 (1971).

http://rcin.org.pl

23. Kostraba N. C., Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **262**, 169, (1971).
24. Spelberg T. C., Hnilica L. S., Ansevin A. T., *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 550 (1971).
25. Kleinsmith L. J., Heidema J., Carrol A., *Nature* **226**, 1025 (1970).
26. Shelton K. R., Allfrey V. G., *Nature*, **228**, 132 (1970).
27. Levy R., Levy S., Rosenberg S. A., Simpson R. T., *Biochemistry* **12**, 224 (1973).
28. Wang T. Y., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1220 (1967).
29. Marushige K., Brutlag D., Bonner J., *Biochemistry* **7**, 3149 (1968).
30. Morozowa T. M., Sałganik R. J., *Mol. Biol.*, **3**, 745 (1969).
31. Steggles A. W., Spelsberg T. C., O'Malley B. W., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **43**, 20 (1971).
32. Spelsberg T. C., Steggles A. W., Chytil F., O'Malley B. W., *J. Biol. Chem.*, **247**, 1368 (1972).
33. Patel G., Howk R., Wang T. Y., *Nature* **215**, 1488 (1967).
34. Howk R., Wang T. Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **133**, 238 (1969).
35. O'Connor P. J., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **35**, 805 (1969).
36. Howk R., Wang T. Y., *Eur. J. Biochem.*, **13**, 455 (1970).
37. Ahmed K., *Biochim. Biophys. Acta* **243**, 38 (1971).
38. Takeda M., Yamamura H., Ohga., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **42**, 103 (1971).
39. Kamiyama M., Dastugue B., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 29 (1971).
40. Kamiyama M., Dastugue B., Kruh J., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1345 (1971).
41. Desjardins P. R., Lue P. F., Liew C. C., Gornall A. G., *Can. J. Biochem.*, **50**, 1249 (1972).
42. Gallwitz D., Sures I., *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 315 (1972).
43. Garrels J. I., Elgin S. C. R., Bonner J., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 545 (1972).
44. Kamiyama M., Dastugue B., Defer M., Kruh J., *Biochim. Biophys. Acta* **277**, 576 (1972).
45. Vidali G., Boffa L. C., Allfrey V. G., *J. Biol. Chem.*, **247**, 7365 (1972).
46. Malec J., *Post. Biochem.*, **14**, 523 (1968).
47. Kłyszejko-Stefanowicz L., Polanowska Z., *Post. Biochem.* **17**, 601 (1971).
48. Stein G. S., Borun T. W., *J. Cell Biol.*, **52**, 292 (1972).
49. Busch H., Steele W. J., *Advan. Cancer Res.*, **8**, 41 (1964).
50. Benjamin W., Gelhorn A., *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* **59**, 262 (1968).
51. Levy S., Simpson R. T., Sober H. A., *Biochemistry* **11**, 1547 (1972).
52. Arnold E. A., Young K. E., *Biochim. Biophys. Acta* **257**, 482 (1972).
53. Yoshida M., Shimura K., *Biochim Biophys. Acta* **263**, 690 (1972).
54. Gershey E., Kleinsmith L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **194**, 331 (1969).
55. Gilmour R. S., Paul J., *J. Mol. Biol.*, **40**, 137 (1969).
56. Elgin S. C. R., Bonner J., *Biochemistry* **11**, 772 (1972).
57. MacGillivray A. J., Carrol D., Paul J., *FEBS Letters* **13**, 204 (1971).
58. MacGillivray A. J., Rickwood D., Paul J., *Biochem. J.* **129**, 50P (1972).
59. Rickwood D., Threlfall G., MacGillivray A., Paul J., *Biochem. J.*, **129**, 50P (1972).
60. Van den Brock H. W. J., Nooden L. D., Sevall J. S., Bonner J., *Biochemistry* **12**, 229 (1973).

http://rcin.org.pl

61. Krivcav G. G., Bogdanow A. A., *Mol. Biol.*, **4**, 422 (1970).
62. Chauda S. K., Cherian M. G., *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **50**, 1013 (1973).
63. Wang T. Y., Johns E. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 176 (1968).
64. Wang T. Y., *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 235 (1968).
65. Gilmour R. S., Paul J., *FEBS Letters* 9, 242 (1970).
66. Kamiyama M., Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **228**, 563 (1971).
67. Rickwood D., Riches P. G., MacGillivray A. J., *Biochim. Biophys. Acta* 299, 162 (1973)
68. Barrett T., Gould H., *Biochim. Biophys. Acta* **294**, 165 (1973).
69. Kruh J., Tichonicky L., Wajcman H., *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 549 (1969).
70. Langan T. A., w Regulatory Mechanism for Protein Synthesis in Mammalian Cells, red. San Pietro A., Lamborg M., Kenney F. F., New York, London 1968, str. 101.
71. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 1182 (1966).
72. Aszmarin I. P., Komkowa A. J., *Biochimija* **32**, 640 (1965).
73. Komkowa A. J., Petrow W. C., Goriuchina O. A., *Vest. Leningr. Univ.* (seria biol.) 9, 74 (1965).
74. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 136 (1969).
75. Teng C. S., Hamilton T. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 465 (1969).
76. Shea M., Kleinsmith L. J., *Biochim. Biophys. Res. Commun*, **50**, 473 (1973).
77. Kaplowitz P. B., Platz R. D., Kleinsmith L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 739 (1971).
78. Ruddon R. W., Anderson S. L., *Biochim. Biophys. Res. Commun*, **46**, 1499 (1972).
79. Johnson E. M., Allfrey V. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 786 (1972).
80. Chae C. B., Smith M. C., Irvin A. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 134 (1972).
81. Spelsberg T. C., Hnilica L. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 202 (1971).
82. Spelsberg T. C., Hnilica L. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 212 (1971).
83. Stein G. S., Chaudhuri S., Beserga R., *J. Biol. Chem.*, **247**, 3918 (1972).
84. Zalokar M., w Control Mechanisms in Cellular Processes, Ronald Press, New York 1961, str. 87, cyt. wg Mikołajczyk H. Podstawy działania hormonów, PWN 1972 str. 182.
85. King R. J., Gordon J., *J. Endocrinol.*, **39**, 533 (1967).
86. King R. J., Gordon J., Steggels A. W., *Biochem. J.*, **114**, 649 (1969).
87. Teng C. S., Hamilton T. H., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1231 (1970).
88. Ławrinienko I. A., Sałganik R. J., Morozowa T. M., *Mol. Biol.*, **6**, 20 (1972).
89. O'Malley B. W., Spelsberg T. C., Schrader W. T., Chytil F., Steggles A. W., *Nature* 235, 141 (1972).
90. Ławrinienko I. A., Morozowa T. M., Juszkowa Ł. T., *Mol. biol.*, **5**, 17 (1971).
91. Doenecke D., Beato M., Congote L. F., Sekeris C. E., *Biochem. J.* **126**, 1171 (1972).
92. Goldberg M. L., Atchley W., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 17 (1966).
93. Sunaga K., Koide S. S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 670 (1967).
94. King R. J., Gordon J., *J. Endocrinol.*, **40**, 195 (1968).
95. Monder C., Walker M. C., *Biochemistry* 9, 2489 (1970).

http://rcin.org.pl

96. Tsai Y. H., Hnilica L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **228**, 277 (1971).
97. De Sombre E. R., Puca G. A., Jensen E. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 148 (1969).
98. Mohla S., De Sombre E. R., Jensen E. V., *Biochim. Biophys. Res Comm.*, **46**, 661 (1972).
99. Chamness G. C., Jennings A. W., McGuire W. L., *Nature* **241**, 465 (1973).
100. Helmsing D. J., Berendes H. D., *J. Cell. Biol.*, **50**, 893 (1971).
101. Clever U., w The Nucleohistones, red. Bonner J., Ts'o P.O.P. San Francisco, Holden-Day, Inc 1964, str. 317.
102. Teng C. S., Hamilton T. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 1410 (1968).
103. Stein G., Baserga R., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 715 (1970).
104. Stein G., Baserga R., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 28 (1971).
105. Borun T. W., Stein G. S., *J. Cell. Biol.*, **52**, 308 (1972).
106. Cross M. E., *Biochem. J.*, 128, **1213** (1972).
107. Sadgopal A., Kabat D., *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 486 (1969).
108. Szumiel I., Zajdel M. E., *Post. Biochem.*, **18**, 175 (1972).

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

Post. Biochem. **19**, 559—576 (1973).

MARIA SARNECKA-KELLER *

Makrocykliczne antybiotyki jako jonofory jednowartościowych kationów

Macrocyclic Antibiotics as Ionophores of Monovalent Cations

The structures of macrocyclic antibiotics, such as macrotetralides, enniatins, valinomycin, gramicidins, alamethicin as well as antamanide are described. The effects on biological and artificial lipid membranes and the ionophoric properties of these compounds in relation to their molecular conformation are discussed.

Błony biologiczne wykazują, jak wiadomo, selektywność w przenikaniu pewnych jonów, nawet bardzo zbliżonych pod względem parametrów fizykochemicznych, czego klasycznym przykładem może być wybiórczość w stosunku do kationów Na^+ i K^+. Istnieje wiele teorii tłumaczących tę selektywność błon (1). Jedną z nich jest teoria nośników, według której jony tworzą przejściowy kompleks z jakimś składnikiem błony i w tej formie są przez nią transportowane. Zewnątrzkomórkowymi jonoforami jednododatnich kationów, używanymi w badaniach nad selektywnością błon, są pewne antybiotyki zaliczane pod względem własności biologicznych do grupy walinomycyny. (Niektóre właściwości antybiotyków oligo- i polipeptydowych omawia artykuł K. Obojskiej (2)).

I. Struktura pierwszorzędowa antybiotykowych jonoforów jednowartościowych kationów

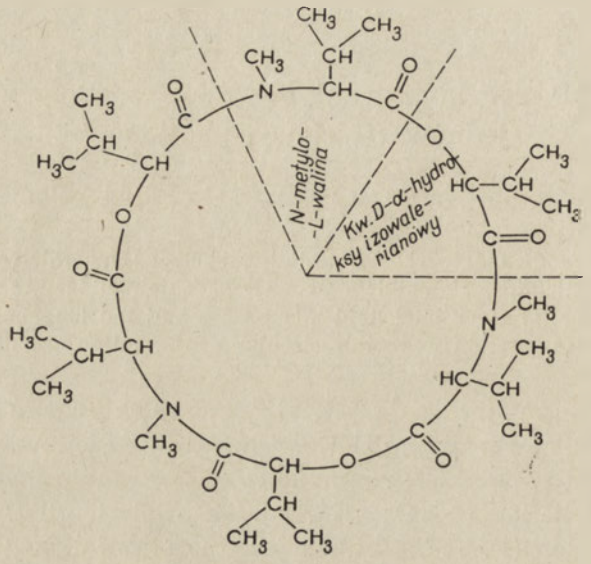
Najlepiej poznanymi co do charakteru chemicznego jonoforami jednododatnich kationów są antybiotyki: walinomycyna, gramicydyny, enniatyny, teralidowe związki grupy nonaktyny oraz wykryte w ostatnich latach alametycyna i antamanida.

Dwa strukturalnie zbliżone do siebie antybiotyki wyizolowane z *Fusarium oxysporum* i nazwane enniatyną A i B (3, 4) scharakteryzowano jako cykliczne tetradepsypeptydy zbudowane z na przemian powiązanych reszt kwasu D-α-hydroksyizowalerianowego i N-metyloaminokwasu (2, 3).

* Doc. dr hab., Zakład Biochemii Zwierząt Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

http://rcin.org.pl

W enniatynie A N-metylo-aminokwas zidentyfikowano jako N-metylo-L-leucynę a w enniatynie B jako N-metylo-L-walinę. Późniejsze oznaczenia masy cząsteczkowej oraz dokładniejsze analizy wykazały, że układ dwóch podstawowych reszt powtarza się trzykrotnie w drobinach obu związków, (5, 6, 7) a więc są one cyklicznymi heksadepsypeptydami (Ryc. 1).



Ryc. 1. Enniatyna BI

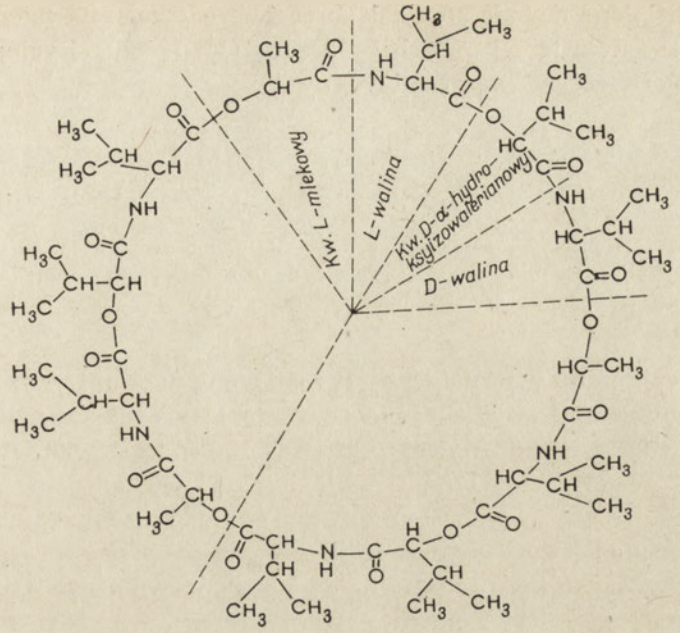
Enniatyna B określana jest przez niektórych jako BI (8) dla odróżnienia od analogu strukturalnego enniatyny BII, która nie ma grup metylowych przy żadnym atomie azotu iminowego (tzw. tri-desmetylo-enniatyna B). Prócz tego znane są i używane głównie w badaniach nad zależnością struktury i czynności biologicznej tego antybiotyku: didesmetylo- i monodesmetylo-enniatyny B (9).

Walinomycyna jest wytwarzana przez *Streptomyces filvissimus*, jej dwunastoczłonową odmianę przedstawia rycina 2.

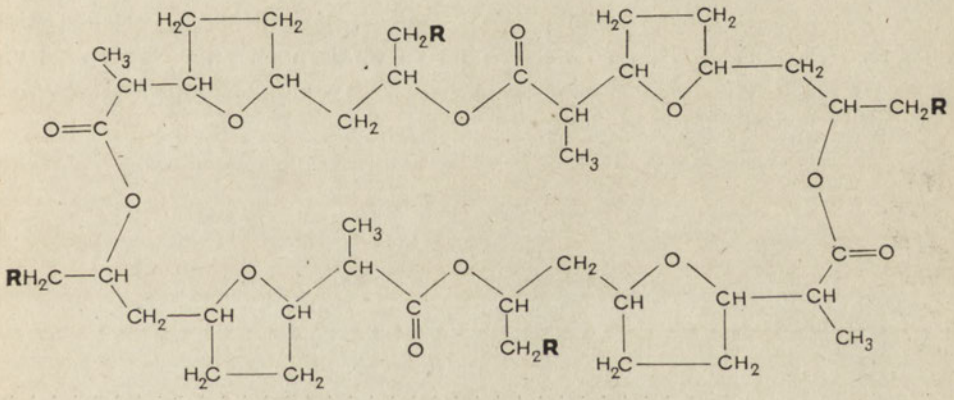
W cząsteczce tego związku powtarza się w układzie cyklicznym trzykrotnie sekwencja: — kwas L-mlekowy-L-walina—kwas D-α-hydroksyizowalerianowy—D-walina—. W pierścieniu występują na przemian wiązania peptydowe i estrowe i brak jest końcowych grup $-NH_2$ i -COOH. Znane są również walinomycyny 8-członowa i 16-członowa, w których zasadnicza sekwencja czterech reszt powtarza się odpowiednio dwu- lub czterokrotnie.

Nonaktyna produkowana przez *Streptomyces sp.* (11) jest przedstawicielem antybiotyków tetralidowych. Do grupy tej należą również monaktyna, dinaktyna i trinaktyna (12, 13), które są homologami nonaktyny. Podstawową ich strukturę (14) tworzy pierścień tetralidowy o charakterze

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Walinomycyna dwunastoczłonowa



Ryc. 3. Antybiotyki tetralidowe
nonaktyna 4R = 4H, monaktyna 1R = CH_3, dinaktyna 2R = 2CH_3, trinaktyna 3R = 3CH_3

pepsydu, złożony z czterech reszt kwasu nonaktynowego lub homononaktynowego powiązanych wiązaniami estrowymi (Ryc. 3).

Gramicydyny są produkowane łącznie z tyrocydynami przez *Bacillus brevis*. W grupie tych związków wyróżnić można linearne gramicydyny A, B, C, D oraz cykliczną gramicydynę S o strukturze zbliżonej do tyrocydyn i dlatego przez niektórych określaną jako tyrocydyna S (15, 16). Czynność jonoforową w odniesieniu do kationów potasowców wykazują głównie linearne gramicydyny. Handlowe preparaty gramicydyny tzw. A'

http://rcin.org.pl

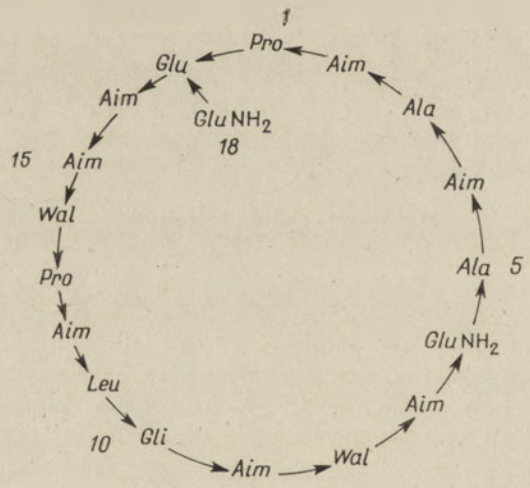
zostały rozdzielone metodą rozdziału przeciwprądowego na cztery składniki (17) i sekwencja trzech z nich oznaczona (18, 19, 20). Rycina 4 podaje strukturę pierwszorzędową gramicydyny A.

HCO—L—Wal→Gli→L—Ala→D—Leu→L—Ala→D—Wal→L—Wal→
→D—Wal→L—Try→D—Leu→L—Try→D—Leu→
→L—Try→D—Leu→L—TryNHCH$_2$CH$_2$OH

Ryc. 4. Gramicydyna *A*; gramicydyna B L-Try$_{11}$ = L-Fen;
gramicydyna C: L-Try$_{11}$ = L-Tyr

Reszta tryptofanu w pozycji 11 jest zastąpiona w gramicydynie B resztą L-fenyloalaniny a w gramicydynie C resztą L-tyrozyny. Znane są również gramicydyny izoleucynowe, w których N-końcowa walina jest zastąpiona przez resztę izoleucyny. Gramicydyna D występuje w śladowych ilościach i jej zróżnicowanie strukturalne względem poprzednich nie jest jeszcze wyjaśnione. We wszystkich linearnych gramicydynach występują w łańcuchu na przemian L- i D-aminokwasy, końcowa grupa aminowa jest sformylowana, natomiast końcowa grupa karboksylowa podstawiona przez etanoloaminę.

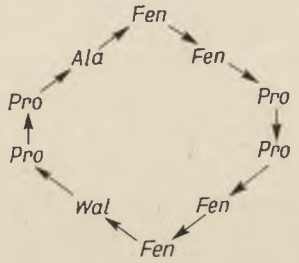
Alametycynę wyizolowano z *Trichoderma vivide* i określono wstępnie jej skład aminokwasowy: 2GluNH$_2$, Glu, 2Pro, Gli, 2Ala, 2Wal, Leu i 8 reszt kwasu α-aminoizomasłowego, stwierdzając L konfigurację wszystkich aminokwasów (21). Okazało się jednak, że w alametycynie występuje nie 8 lecz 7 reszt kwasu α-aminoizomasłowego. Sekwencję aminokwasową i jej strukturę cykliczną przedstawia rycina 5 (22).



Ryc. 5. Alamecytyna
Aim — reszta kwasu α-aminoizomasłowego

http://rcin.org.pl

Z *Amanita phalloides* wyizolowano antamanidę zdolną do hamowania toksycznych własności faloidyny i amanityny produkowanych przez ten sam organizm. Antamanidę scharakteryzowano (23) jako cykliczny dekapeptyd o sekwencji aminokwasowej podanej na rycinie 6.



Ryc. 6. Antamanida

Z powyższego zestawienia wynika, że antybiotyki oraz antamanida wykazujące czynność jonoforową w stosunku do jednododatnich kationów mają pewne wspólne cechy strukturalne. Zbudowane są wyłącznie z aminokwasów lub hydroksykwasów o charakterze hydrofobowym i za wyjątkiem alametycyny N- i C-końcowe grupy tych związków są zablokowane albo pewnymi podstawnikami albo w wyniku utworzenia form cyklicznych. Charakterystyczna jest również w niektórych obecność związków o konfiguracji D a w alametycynie i antamanidzie proliny. Te cechy strukturalne rzutują na tworzenie określonych konformacji. W rozpuszczalnikach o niskich stałych dielektrycznych tworzą się konformacje, w których dochodzi do uformowania hydrofilnego wnętrza i hydrofobowej powłoki. Takie konformacje walinomycyny czy enniatyny są trwałe nawet w rozpuszczalnikach o wysokich stałych dielektrycznych i dlatego związki tego typu w wodzie nie rozpuszczają się w ogóle względnie bardzo słabo. Rozpuszczają się natomiast dobrze w rozpuszczalnikach o niskich stałych dielektrycznych.

II. Wpływ makrocyklicznych antybiotyków na błony

Badając fizjologiczną rolę makrocyklicznych antybiotyków McMuray i Begg (24) stwierdzili, że walinomycyna rozkojarza proces fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. Później wykazano (25, 26, 27, 28, 29), że stymulowane przez walinomycynę utlenianie wymaga P_i i jest związane z pobieraniem jonów K^+ a wydzielaniem H^+ przez mitochondria. Kationy Rb^+ i Cs^+ mogą zastąpić K^+, natomiast Na^+ i Li^+ są bez wpływu. Podobne własności stwierdzono dla antybiotyków grupy nonaktyny (28, 30), wykazując tak jak dla walinomycyny znacznie większą swoistość w kierunku K^+ i Rb^+ niż Na^+ (31, 32). Według Gravena i wsp. (28, 33) wszystkie

http://rcin.org.pl

homologiczne tetralidowe antybiotyki rozkojarzają oksydacyjną fosforylację i indukują hydrolizę ATP, przy czym jednowartościowe kationy potasowców są potrzebne do tej czynności. Przy niskich stężeniach kationów największy wpływ wywiera Rb^+. Nonaktyna jest najmniej aktywna z tej grupy antybiotyków.

W dalszych badaniach przeanalizowano zachowanie się w stosunku do błon biologicznych innych antybiotyków, jak również ich syntetycznych analogów strukturalnych (34). Zastosowano także błony sztuczne, rekonstruowane z lipidów izolowanych z błon naturalnych (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42) i wykazano, że i w tych układach pewne walinomycyny, enniatyny głównie grupy B, gramicydyny A, B, C i D oraz antybiotyki grupy nonaktyny przyspieszają transport jednododatnich kationów. Adsorpcja antybiotyków grupy walinomycyny, nonaktyny i enniatyny na sztucznych lipidowych błonach zwiększa przewodnictwo tych błon dla kationów potasowców aż do 10^8 razy (39). W błonach utworzonych z lipidów serca wołu na przykład stwierdzono pod wpływem walinomycyny 400-krotne zwiększenie przepuszczalności błony dla K^+ w porównaniu do Na^+ (39). Enniatyny, antybiotyki tetralidowe, gramicydyny A, B i C są również aktywne ale około 100 razy słabiej. Wykazano również wpływ walinomycyny i gramicydyny na przemieszczanie kationów K^+ poprzez błony chromatoforów *Rhodospirillum rubrum* (43). Antybiotyki te w obecności kationów potasowców i P_i wywołują pęcznienie mitochondriów i zwiększają pobieranie tlenu (27). W odróżnieniu jednak od walinomycyny, gramicydyny wykazują mniejszą swoistość do określonych kationów i są aktywne również w obecności NH_4^+ i w nieobecności P_i.

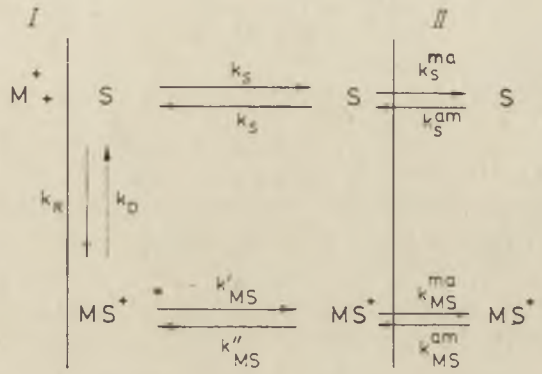
Alametycyna wywołuje w sztucznych błonach lipidowych przewodnictwo jonów (44, 45), którymi w zależności od nieobecności czy obecności pewnych białek zasadowych jak protaminy czy histony, mogą być kationy lub aniony (44). Alametacyna oddziaływa też na błony naturalne (40). Antybiotyk ten charakteryzuje mała swoistość w stosunku do jednododatnich kationów. Antamanida jest jedynym dotychczas poznanym cyklicznym peptydem o swoistej czynności biologicznej, wykazującym wybiórczość w stosunku do jonu Na^+ (46).

Dla wytłumaczenia obserwowanych zjawisk wysunięto szereg hipotez. Według jednego z poglądów walinomycyna i inne tego typu antybiotyki mają zdolność do komplementarnego oddziaływania ze swoistymi lipoproteidowymi receptorami kontrolującymi transport kationów w błonie (47). Wysunięto też dualistyczną hipotezę, według której walinomycyna zmienia niezależnie przepuszczalność błon dla kationów, jak i działa bezpośrednio na układ związany z produkcją energii w błonie mitochondrialnej (48, 49). Inni przypuszczają, że pierścieniowe depsypeptydy, zależnie od warunków, mogą działać zarówno jako ruchome nośniki kationów jak też jako pory w błonach tworząc hydrofilne środowisko dla wędrujących kationów (35, 39).

http://rcin.org.pl

Obecnie większość autorów wypowiada się za mechanizmem ruchomych nośników (50, 51), przy czym oprócz wykazanych zdolności do kompleksowania kationów przez makrocykliczne antybiotyki (rozdział III) jest szereg innych danych doświadczalnych potwierdzających ten pogląd (52, 53, 54, 55, 56, 38, 40).

Model działania obojętnego nośnika przy transporcie kationów jednododatnich i kinetykę tego procesu przedstawia rycina 7. Głównym etapem ograniczającym szybkość transportu jonów jest przemieszczanie kompleksu poprzez wnętrze błony (52).



Ryc. 7. Transport kationu M^+ przez neutralny nośnik S poprzez błonę lipidową (wg 81)

I i II fazy wodne po dwóch stronach lipidowej błony; k_D i k_R stałe dysocjacji i reasocjacji MS^+ w błonie; k_S i k_{MS} stałe szybkości przemieszczania się S i MS^+ w błonie; k_S^{ma} i k_{MS}^{ma} stałe szybkości przemieszczania się S i MS^+ przez barierę graniczną

Proces kompleksowania zachodzi na powierzchni błony (57) i prawdopodobnie konformacja tego międzyfazowego kompleksu jest inna niż konformacja lipofilnego kompleksu transportującego. Zaobserwowano też zmiany konformacyjne walinomycyny na powierzchni międzyfazowej błona/woda. Badając współoddziaływanie błon z antybiotykami (59) wykazano, że mają one różne miejsca receptorowe i tak np. nonaktyna przyłącza się do niepolarnych fragmentów drobin lecytyny.

III. Zależność czynności jonoforowej od konformacji

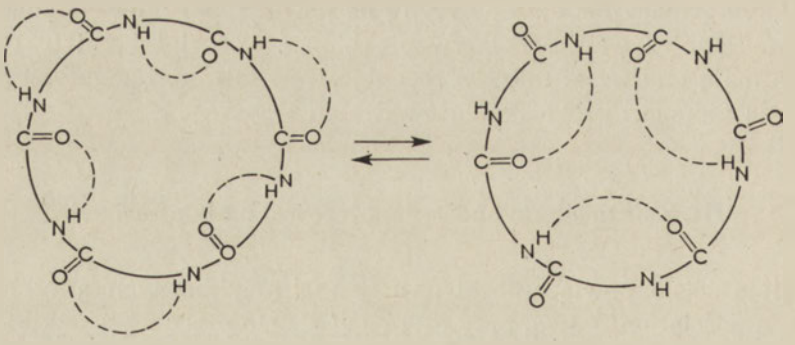
Istnieje ścisłe powiązanie struktury makrocyklicznych antybiotyków z ich czynnością jonforową, przy czym zwraca się przede wszystkim uwagę na rolę atomów tlenu grup karbonylowych w kompleksowaniu jonów metali (34).

W oparciu o teoretyczne rozważania zaproponowano modele jonów kompleksowych różnych dodatnich kationów z makrocyklicznymi anty-

http://rcin.org.pl

biotykami (39). Skierowane na zewnątrz węglowodorowe łańcuchy antybiotyku mogą wchodzić w interakcję z lipidami błony poprzez siły van der Waalsa, podczas gdy skierowane do środka atomy tlenu grup karbonylowych oddziaływują na protony pierwszej powłoki hydratacyjnej wokół kationu, względnie na kation pozbawiony płaszcza wodnego. Należy zaznaczyć, że grupy karbonylowe depsypeptydów mają ciepło hydratacji około 1,5 Kcal/mol większe niż wewnętrzna energia wiązania między dwoma dipolami wodnymi i dlatego grupy tę mogą z powodzeniem konkurować w solwatacji kationów. Aniony są wykluczane z uwagi na odwróconą polarność ich warstw hydratacyjnych. Tworzenie kompleksów kationów alkalicznych z makrocyklicznymi depsypeptydami i ich syntetycznymi analogami potwierdzono doświadczalnie (60) wykazując, że zdolność do kompleksowania jest określona przede wszystkim przez czynniki wpływające na konformację pierścieni.

W badaniach konformacji dwunastoczłonowej walinomycyny i jej kompleksu z K^+ zastosowano metodę jądrowego rezonansu magnetycznego, pomiar dyspersji skręcalności optycznej i momentu dipolowego oraz analizę widm IR, a więc metodykę pozwalającą na badania konformacji kompleksów w roztworach o różnej polarności (61), a także analizowano wydzielone z roztworu chloroformowego kompleksy walinomycyny z $KAuCl_4$ przy zastosowaniu klasycznej metody rentgenograficznej (62). Stwierdzono zależną od środowiska zmienność form konformacyjnych walinomycyny (61, 62, 63, 64). W rozpuszczalnikach o niskiej polarności walinomycyna występuje w dwu formach zawierających trzy lub sześć wiązań wodorowych pomiędzy grupami iminowymi i karbonylowymi kolejnych wiązań peptydowych. Równowaga pomiędzy tymi dwiema formami zależy od polarności środowiska — w niepolarnym występuje forma A, natomiast ze wzrostem polarności przeważa forma B (Ryc. 8).



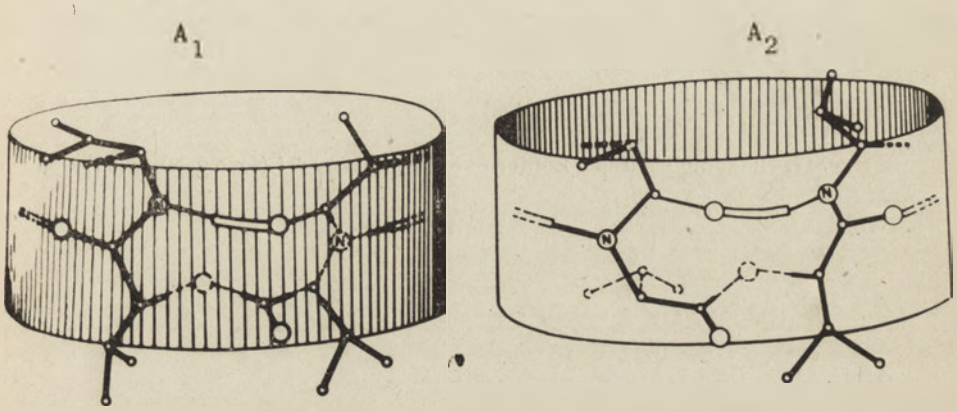
A B

Ryc. 8. Uproszczone schematy konformacji walinomycyny w rozpuszczalnikach o niskich stałych dielektrycznych (wg 61)

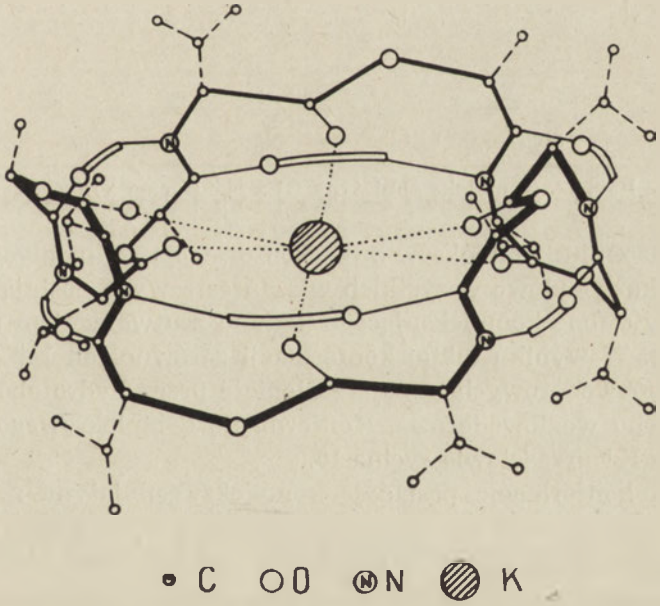
http://rcin.org.pl

Konfiguracja trans ugrupowań estrowych i peptydowych warunkuje utworzenie struktury, którą obrazowo można przedstawić jako złożoną z ogniw „bransoletkę" o średnicy 8Å i grubości 4Å. Zależnie od ukierunkowania grup bocznych forma A może tworzyć dwie odmiany (Ryc. 9), przy czym trwalszą jest A_1.

Wybiórczość walinomycyny w stosunku do jonu K^+ tłumaczona jest głównie efektami sterycznymi wynikającymi z wielkości średnic „otworu" wewnętrznego cząsteczki walinomycyny i kationu kompleksowanego (42). Dlatego walinomycyny 8-członowa i 16-członowa nie są aktywne.

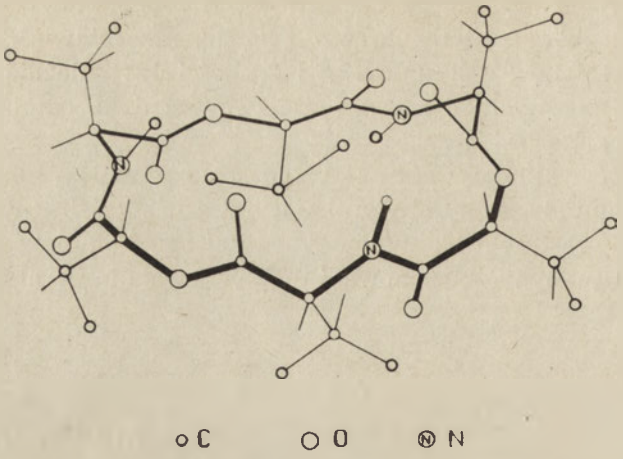


Ryc. 9. Dwie odmiany konformacyjne walinomycyny w środowisku niepolarnym (wg 61)

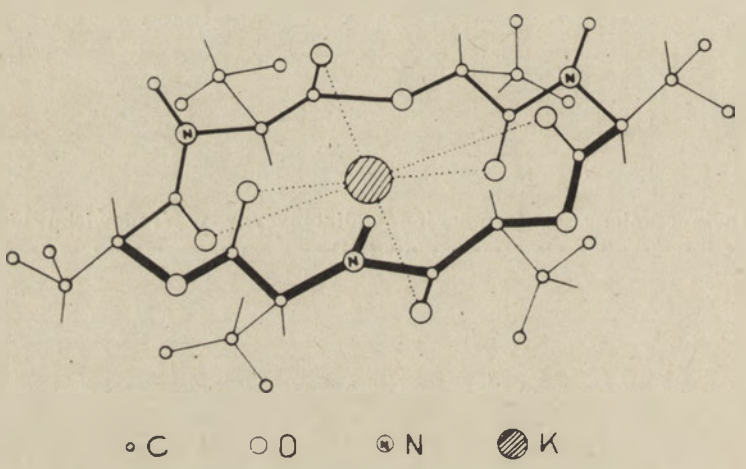


Ryc. 10. Konformacja kompleksu walinomycyny z K^+ (wg 61)

http://rcin.org.pl



Ryc. 11. Niekompleksująca konformacja enniatyny BI (forma N) (wg 7)



Ryc. 12. Kompleks enniatyny BI z K^+ (forma P) (wg 7)

Przy tworzeniu kompleksów z K^+ konformacja walinomycyny zmienia się. Grupy karbonylowe wszystkich wiązań estrowych zostają skierowane do środka w stronę kompleksującego kationu z utworzeniem układu heksagonalnego. W wyniku takiej konformacji zarówno jon K^+ jak również układ wiązań wodorowych zostają zasłonięte przez hydrofobowe rozgałęzione łańcuchy węglowodorowe. Konformację kompleksowego jonu walinomycyny z K^+ przedstawia rycina 10.

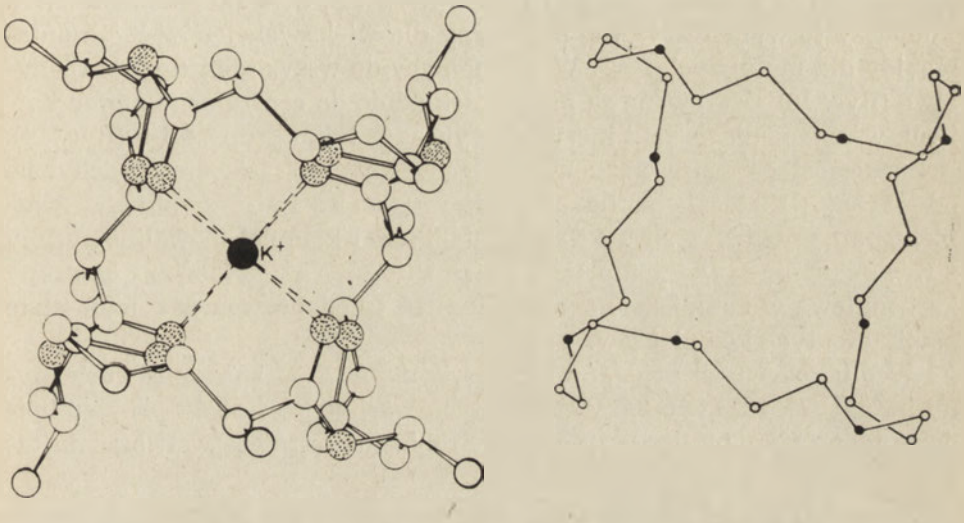
Podobną konformację posiadają kompleksy enniatyny z jonami K^+ (7, 56). W niepolarnych rozpuszczalnikach mogą występować dwie formy konformacyjne enniatyny „N" i „P". Forma „N" (Ryc. 11) ma pseudoaksjalną orientację trzech grup izopropylowych i pseudoekwatorialną trzech pozostałych, nie ma elementów symetrii i otworu wewnętrznego

http://rcin.org.pl

odpowiedniego do skompleksowania kationu. W przeciwieństwie do tej konformacji forma kompleksująca „P" (Ryc. 12) ma ścisłe upakowanie grup funkcjonalnych wokół centralnego kationu, pseudoekwatorialne położenie wszystkich grup izopropylowych i wykazuje oś symetrii.

Konformacja kompleksu enniatyny B z K^+ jest identyczną konformacją wolnej enniatyny w środowisku apolarnym. Sądzi się, że konformacja enniatyny kompleksującej kationy jest w pewnych granicach zmienna, co tłumaczy mniejszą od walinomycyny swoistość do kompleksowanego kationu (7).

Konformację kompleksu nonaktyny z K^+ wyjaśniono (32) przy zastosowaniu dyfrakcji promieni X (Ryc. 13).



Ryc. 13. Konformacja nonaktyny w kompleksie z K^+ (wg 32)

W odróżnieniu od walinomycyny i enniatyny w nonaktynie następuje tetraedryczne skoordynowanie kationu (65). Labilność konformacji cząsteczki nonaktyny w roztworze i jej zdolność dopasowywania się do rozmiarów kompleksowanego kationu nasunęło przypuszczenie, że nie rozmiar wewnętrznego otworu w nonaktynie jest czynnikiem kontrolującym wybór kationu lecz energia hydratacji kationu, z którego przed skompleksowaniem musi zostać usunięta woda hydratacyjna.

Antamanida zachowuje się pod względem swoistości odmiennie od poprzednio omówionych antybiotyków. W alkoholowych roztworach tworzy kompleksy z Na^+ i K^+ o stałych stabilności odpowiednio 2500 i 250l/mol (46), co znajduje uzasadnienie również w konformacji tego związku.

Na podstawie teoretycznej analizy konformacyjnej oraz badań widm w podczerwieni, dyspersji skręcalności optycznej i jądrowego rezonansu magnetycznego zaproponowano strukturę konformacyjną kompleksów an-

http://rcin.org.pl

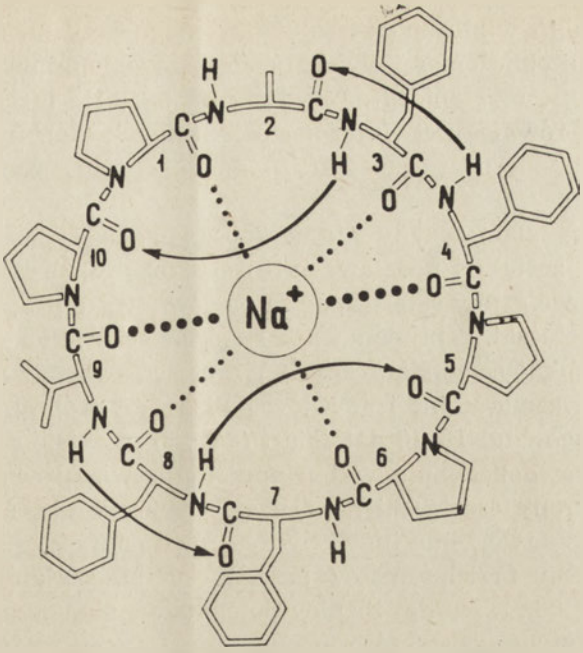
tamanidy z Na^+ w roztworze. Konformacja antamanidy w roztworze jest w znacznym stopniu zależna od polarności środowiska. W niepolarnych rozpuszczalnikach cząsteczka przybiera konformację, w której wszystkie atomy wodoru grup iminowych uczestniczą w wewnątrzcząsteczkowych wiązaniach wodorowych. Struktura antamanidy kompleksująca kationy posiada inną konformację (Ryc. 14 i 15) prawie niezależną od solwentu. Tylko cztery grupy iminowe biorą udział w śródcząsteczkowych wiązaniach wodorowych, ale w zasadniczy sposób usztywniają cały układ, sześć grup karbonylowych natomiast uczestniczy w oddziaływaniu jonowo—dipolowym z kationem Na^+.

Konformacja kompleksu antamanidy z Na^+ przypomina konformację kompleksu walinomycyny z K^+, nie jest jednak identyczna. W walinomycynie średnica wewnętrznego otworu wynosi 3Å, a w antamanidzie 2,5Å. Tłumaczy to wybiórczość walinomycyny dla większych jonów K^+ a antamanidy dla mniejszych Na^+. W walinomycynie wszystkie grupy karbonylowe (Ryc. 10) skierowane są prawie dokładnie do centralnego atomu kationu, w antamanidzie taki kierunek wykazują tylko grupy 4 i 9 (Ryc. 14). Pozostałe cztery grupy karbonylowe są w antamanidzie nieco odchylone od kierunku Na^+....O, co tłumaczy niższą wartość stałej stabilności kompleksu antamanidy z Na^+ od stałej stabilności kompleksu walinomycyny z K^+. Podobnie jak w kompleksie antamanidy z Na^+usytuowane są grupy karbonylowe w kompleksie enniatyny z K^+ i podobną wartość mają stałe stabilności tych kompleksów.

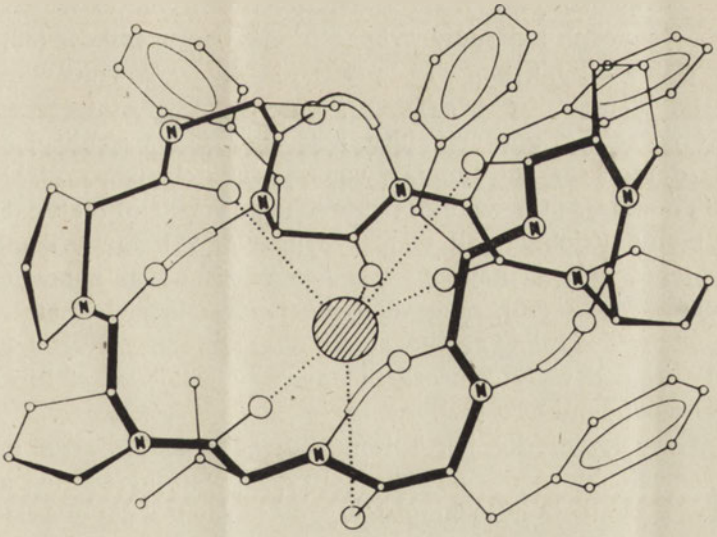
Według obecnych poglądów gramicydyny A, B, C i D nie są ruchomymi nośnikami, lecz tworzą w określonych warunkach kanały poprzez lipidowe błony (67, 68), przy czym dwie drobiny uczestniczą w tworzeniu takiego kanału (15, 69, 70).

Na podstawie badań widm w podczerwieni zaproponowano dla dimerów gramicydyny A strukturę antyrównoległą β, prowadzącą do utworzenia cyklicznego układu, w którym grupy formylowe jednego końca jednej cząsteczki połączone są z grupami hydroksylowymi drugiego końca drugiej cząsteczki (71). Jednakże przestrzenne oddziaływanie wielu bocznych łańcuchów, jak też obecność 3 wiązań peptydowych „cis" są bardzo niekorzystnymi cechami tej konformacji. Ostatnio (70, 72) zaproponowano zatem dla gramicydyn linearnych lewoskrętną i lipofilną strukturę spiralną określoną jako spirala π_{LD}. Jest ona energetycznie dopuszczalna, jak również spełnia wymagania dla tworzenia kanałów przez błonę. Dwie takie spirale łączą się wiązaniami wodorowymi swymi podobnymi końcami z utworzeniem wewnętrznego kanału. Rozmiary kanału zgadzają się z grubością błony oraz swoistością wykazywaną w szeregu $NH_4^+ > K^+ > Na^+$ (72). Z badań dichroizmu kołowego wynika, że konformacja zależna jest w dużym stopniu od rodzaju solwentu (73) i że mogą zachodzić indukowane fluktuacje tej konformacji, w wyniku których kanał może się dopasowywać do przejścia różnych kationów. Tłumaczy to stosunkowo małą swo-

http://rcin.org.pl



Ryc. 14. Wiązania wodorowe i jonowo-dipolowe w kompleksie antamanidy z Na^+ (wg 66)



Ryc. 15. Konformacja kompleksu antamanidy z Na^+ w roztworze (wg 66)

http://rcin.org.pl

istość gramicydyn w stosunku do przenoszonego kationu, oraz zgadza się z teoretycznymi obliczeniami wykazującymi szerokie minimum energii dla konformacji $\pi_{L,D}$. Działanie gramicydyny na zasadzie mechanizmu kanałowego zostało również potwierdzone przez innych (74). Interesujące jest stwierdzenie, że obecność cholesterolu w błonach obniża działanie gramicydyny (75).

Konformacja alametycyny nie jest poznana, a model jej cząsteczki skonstruowany został na podstawach teoretycznych (22). Według tego modelu hydrofobowe grupy skierowane są na zewnątrz, a grupy karbonylowe do wnętrza cząsteczki. Zaproponowaną strukturę charakteryzuje sztywność pierścienia wynikająca ze sterycznych ograniczeń swobody ruchu łańcucha przez 7 reszt kwasu α-amino-izomasłowego i 2 reszt proliny. Fragment łańcucha węglowego $GluNH_2$-18 natomiast (Ryc. 5) może się swobodnie przemieszczać i prawdopodobnie w ten sposób ułatwia przeniesienie kationu z jednej strony cząsteczki na drugą. Przyjmuje się, że alametycyna działa na zasadzie tworzenia tuneli hydrofilnych poprzez lipidowe warstwy błon. W tworzeniu takich kanałów uczestniczyć ma sześć drobin alametycyny (44). Przy odpowiedniej różnicy potencjałów alametycyna tworzy na powierzchni błon agregaty, które formują kanały usytuowane blisko siebie (75). Sumaryczne ich przewodnictwo jest większe niż suma przewodnictwa poszczególnych kanałów. Molekularny mechanizm działania alametycyny wymaga wyjaśnienia.

IV. Uwagi końcowe

Tłumaczenie wpływu makrocyklicznych antybiotyków na transport jednowartościowych kationów w oparciu o teorię nośników (38, 51, 52, 53) nie jest wolne od niejasności. Oprócz jonoforów również inne czynniki działają na błonę mitochondrialną i powodują w ostateczności podobne efekty. Najwcześniej poznaną substancją tego typu jest bliżej nie zidentyfikowana dotychczas substancja zwana po angielsku *„excitable inducing material"*, powstająca w wyniku bakteryjnego rozkładu białek (50) i działająca na błony podobnie jak alametycyna (76, 77). Modyfikacje w przenoszeniu jonów można uzyskać także przez usunięcie z powierzchni komórki jonów Mg^{++} (78), przez dodanie jonów ciężkich metali np. Zn^{++} (79, 80), przez dodanie parathormonu względnie pewnych frakcji histonów (81) oraz pod wpływem organicznych związków rtęci lub innych reagujących z grupami -SH (82).

Niejonowe detergenty jak Triton X-100 lub Lubrol WX użyte w takich stężeniach, które nie powodują lizy, wywołują również akumulację jonów oraz pęcznienie mitochondriów, gdy te zawiesi się w środowisku zawierającym octany czy fosforany (83). W warunkach tych zwiększa się zarówno szybkość, jak i absolutna ilość przenoszonych jonów. Proces ten

http://rcin.org.pl

jest ściśle uzależniony od jonów K^+ i jest hamowany przez dwunitrofenol oraz inne związki rozkojarzające fosforylację oksydacyjną.

Wpływ tak różnych czynników na transport kationów przez błony zdaje się przemawiać przeciw nośnikowej teorii działania makrocyklicznych antybiotyków. Związki te mogłyby oddziaływać jak niejonowe detergenty, tzn. wskutek interakcji z błoną doprowadzać do takiej jej modyfikacji strukturalnej, że towarzyszyłoby temu zmniejszenie bariery potencjału dla ruchu K^+. Wobec stwierdzonego mechanizmu nośnikowego dla walinomycyny, enniatyny i nonaktyny, a kanałowego dla gramicydyny linearnej i prawdopodobnie alametycyny, jest możliwe, że połączenia zmieniające przepuszczalność błon dla jednowartościowych kationów działają na różnych zasadach w zależności od swej struktury i możliwości zmian konformacyjnych. Na pewno jednak i zmiany konformacyjne białek strukturalnych błony muszą być brane pod uwagę.

Jakikolwiek jest mechanizm działania makrocyklicznych antybiotyków, interesujące jest zagadnienie ewentualnego występowania tego typu związków jako naturalnych składników błon. Wysunięto na przykład przypuszszenie, że w błonie mitochondrialnej istnieje składnik zdolny do kompleksowania kationów podobnie jak cykliczne antybiotyki (34). Niektórzy przyjmują też występowanie w błonach erytrocytów ruchomego nośnika jonów Na^+ o dwóch miejscach wiązania różniących się powinowactwem do tego kationu i podają model działania tego nośnika (84). Z serca wołu wyizolowano jonofor peptydowy, który reaguje zarówno z jonami K^+ i Na^+ i ułatwia ich przejście przez wewnętrzną błonę mitochondrialną (85). Peptyd ten jako rozpuszczalny w rozpuszczalnikach tłuszczowych izoluje się łącznie z frakcją lipidową. Występuje w ilości 10—100ng/g białka mitochondrialnego i zawiera walinę, leucynę (lub jej izomer), prolinę (lub hydroksyprolinę) i serynę. Związkowi temu przypisano strukturę duodekapeptydu o sekwencji —(Pro—Leu—Wal—Ser)$_3$—, co zgadza się z oznaczoną masą cząsteczkową wynoszącą 1 100. Otrzymany z mitochondriów peptyd zachowuje się podobnie do walinomycyny czy gramicydyny linearnej. Jest również peptydem obojętnym, nie ma końcowych grup aminowej i karboksylowej, a więc ma strukturę cykliczną. Jest pierwszym jonoforem peptydowym jednowartościowych kationów, wyizolowanym z błon biologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Diamound J. M., Wright E., *Ann. Rev. Physiol.*, **31**, 581, 1969.
2. Obojska K., Post. Biochem., **19**, 55, 1973.
3. Plattner P. A., Nager U., *Helv. Chim. Acta* **31**, 665, 1948.
4. Plattner P. A., Nager U., Boller A., *Helv. Chim. Acta* **31**, 594, 1948.
5. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Kiryushkin A. A., Ivanow V. T., *Tetrahedron Letters* **301**, 1962.

http://rcin.org.pl

6. Plattner P. A., Vogler K., Studer R. O., Quitt P., Keller-Schierlein W., *Helv. Chim. Acta* **46**, 927, 1963.
7. Plattner P. A., Vogler K., Studer R. O., Quitt P., Keller-Schierlein W., *Experientia* **19**, 71, 1963.
8. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Evstratov A. V., Bystrov V. F., Abdulaev N. D., Popov E. M., Lipkind G. M., Arkhipova S. F., Efremov E. S., Shemyakin M. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 668, 1969.
9. Studer R. O., Structure and microbiological activity in the enniatin series, w Peptides, red. U. Zervas L., Pergamon Press, Oxford, London, New York 1966.
10. The Merck Index of Chemicals and Drugs Merck and Co., Rahway New York, 1966.
11. Corbez R., Ettlinger L., Gaumann E., Keller-Schierlein W., Kraddfer F., Neipp L., Prelog V., Zahner H., *Helv. Chim. Acta* **38**, 1445, 1955.
12. Beck J., Gerlach H., Prelog V., Voser W., *Helv. Chim. Acta* **45**, 620, 1962.
13. Dominguez J., Dunitz J. D., Gerlach H., Prelog V., *Helv. Chim. Acta* **45**, 129, 1962.
14. Gerlach H., Prelog V., *Lieb. Ann.*, **669**, 121, 1963.
15. Goodall M. C., *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 471, 1970.
16. Glickson J. D., Mayers D. F., Setline J. M., Urry D. W., *Biochemistry* **11**, 477, 1972.
17. Gross E., Witkop B., *Biochemistry* **4**, 2495, 1965.
18. Sarges R., Witkop B., *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1862, 1964.
19. Sarges R., Witkop B., *Biochemistry* **4**, 2491, 1965.
20. Sarges R., Witkop B., *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 2027, 1965.
21. Meyer C. E., Reusser F., *Experientia* **23**, 85, 1967.
22. Payne J. W., Jakes R., Hartley B. S., *Biochem. J.*, **117**, 757, 1970.
23. Wieland Th., Lüben G., Ottenheim H., Faesel J., de Vries J. X., Konz W., Prox A., Schmid J., *Angew. Chem.*, **80**, 209, 1968.
24. McMurray W. C., Begg R. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 546, 1959.
25. Moore C., Pressman B. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 562, 1964.
26. Pressman B. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 1077, 1965.
27. Chappell J. B., Crofts A. R., *Biochem. J.*, **45**, 393, 1965.
28. Graven S. N., Lardy H. A., Johnson D., Rutter A., *Biochemistry* **5**, 1729, 1966.
29. Lynn W. S., Brown R. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**, 271, 1966.
30. Lardy H. A., Abstracts, 140th National Meeting of the American Chemical Soc., Chicago III Sept., 1961, str. 29C.
31. Pioda L. A. R., Wachter H. A., Dohner R. E., Simon W., *Helv. Chim. Acta* **50**, 1373, 1967.
32. Kilbourne B. T., Dunitz J. D., Pioda L. A. R., Simon W., *J. Mol. Biol.*, **30**, 559, 1967.
33. Graven S. N., Lardy A., Rutter A., *Biochemistry* **5**, 1735, 1966.
34. Lardy H. A., Graven S. N., Estrado S., *Fed. Proc.*, **26**, 1355, 1967.
35. Andreoli T. E., Tieffenberg M., Tosteson D. C., *J. Gen. Physiol.*, **50**, 2527, 1967.
36. Eisenman G., Ciani S. M., Szabo G., *Fed. Proc.*, **27**, 1289, 1968.
37. Henderson P. J. F., McGivan J. D., Chappell I. B., *Biochem. J.*, **111**, 521, 1969.
38. Liberman E. A., Topaly V. P., *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 125, 1968.
39. Mueller P., Rudin D. O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 398, 1967.

http://rcin.org.pl

40. Pressman B. C., *Fed. Proc.*, **27**, 1283, 1968.
41. Tosteson D. C., Andreoli T. E., Tieffenberg M., Cook P., *J. Gen. Physiol.*, **51**, 373, 1968.
42. Tosteson D. C., Cook P., Andreoli T., Tieffenberg M., *J. Gen. Physiol.*, **50**, 2513, 1967.
43. Jackson J. B., Crofts A. R., van Stedingk L. V., *Eur. J. Biochem.*, **6**, 41, 1968.
44. Rudin D. O., Mueller P., *Nature* **217**, 713, 1968.
45. Chapman D., Cherry R. J., Finer E. G., Hauser H., Phillips M. C., Shipley G. G., McMullen A. J., *Nature* **224**, 692, 1969.
46. Wieland Th., Faulstich H., Burgermeister W., Otting W., Möhle W., Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Malenkov G. G., *FEBS Letters* **9**, 89, 1970.
47. Shemyakin M. M., Vinogradova E. J., Feigina M. Yu., Aldanova N. A., Loginova N. F., Ryabova I. D., Pavlenko J. A., *Experientia* **21**, 548, 1965.
48. Harris E. J., Cockrell R., Pressman B. C., *Biochem. J.*, **97**, 38P, 1965.
49. Cockrell R. S., Harris E. J., Pressman B. C., *Biochemistry* **5**, 2326, 1966.
50. Harris E. J., Transport and accumulation in biological systems, Butherworths, London 1972.
51. Mitchell P., Membranes of cells and organelles morphology, transport and metabolism, w Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells. The Society for general microbiology Symp., 20, red. Charles H. P., Knight B.C.J.G., Cambridge, University Press 1970, str. 121.
52. Laüger P., Stark G., *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 458, 1970.
53. Stark G., Benz R., *J. Membrane Biol.*, **5**, 133, 1971.
54. Haynes D. H., Kowalsky A., Pressman B. C., *J. Biol. Chem.*, **244**, 502, 1969.
55. Wipf H. K., Pache W., Jordan P., Zahner H., Keller-Schierlein W., Simon W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 387, 1969.
56. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Antonov V. K., Vinogradova E. I., Shkrob A. M., Malenkov G. G., Evstratov A. V., Laine I. A., Melnik E. I., Ryabova I. D., *J. Membrane. Biol.*, **1**, 402, 1969.
57. Haynes D. H., *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 406, 1972.
58. Kemp G., Wenner Ch. E., *Biochim. Biophys. Acta* **282**, 1, 1972.
59. Pache W., Chapman D., *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 348, 1972.
60. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Antonov V. K., Shkrob A. M., Mikhaleva I. I., Evstratov A. V., Malenkov G. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 834, 1967.
61. Ivanov V. T., Laine I. A., Abdulaev N. D., Senyavina L. B., Popov E. M., Ovchinnikov Yu. A., Shemyakin M. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 803, 1969.
62. Pinkerton M., Steinrauf L. K., Dawkins P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 512, 1969.
63. Ohnishi M., Urry D. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 194, 1969.
64. Ohnishi M., Urry D. W., *Science* **168**, 109, 1970.
65. Prestegardy H., Chan S. I., *Biochemistry* **8**, 3921, 1969.
66. Ivanov V. T., Miroshnikov A. J., Abdullaev N. D., Senyavina L. B., Arkhipova S. F., Urazova N. N., Khalilulina K. Kh., By-

http://rcin.org.pl

strov V. F., Ovchinnikov Yu. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 654, 1971.
67. Hladky S. B., Haydon D. A., *Nature* **225**, 451, 1970.
68. Krasne S., Eisenman G., Szabo G., *Science* **174**, 412, 1971.
69. Tosteson D. C., Andreoli T. E., Tiffenberg M., Cook P., *J. Gen. Physiol.*, **51**, 3735, 1968.
70. Urry D. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 672, 1971.
71. Sarges R., Witkop B., *J. Amer. Chem.*, Soc., **87**, 2011, 1965.
72. Urry D. W., Goodall M. C., Glickson J. D., Mayers D. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1907, 1971.
73. Urry D. W., Glickson J. D., Mayers D. F., Haider J., *Biochemistry* 11, 487, 1972.
74. Kemp G., Jacobson K. A., Wenner C. E., *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 493, 1972.
75. Gordon L. G. M., Haydon D. A., *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 1014, 1972.
76. Bean R. C., Shepherd W. C., Chan H., Eichner J., *J. Gen. Physiol.*, **53**, 741, 1969.
77. Ehrenstein G., Lecar H., Nossal R., *J. Gen. Physiol.*, **55**, 119, 1970.
78. Settlemire C. T., Hunter G. R., Brierley G. P., *Biochim. Biophys. Acta* **162**, 487, 1968.
79. Brierley G. P., Settlemire C. T., *J. Biol. Chem.*, **242**, 4324, 1967.
80. Brierley G. P., Settlemire C. T., Knight V. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 276, 1968.
81. Rasmussen H., Shirasu H., Ogata E., Hawker C., *J. Biol. Chem.*, **242**, 4669, 1967.
82. Brierley G. P., Knight V. A., Settlemire C. T., *J. Biol. Chem.*, **243**, 5035, 1968.
83. Brierley G. P., Jurkowitz M., Scott K. M., Hwang K. M., Merda A. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 50, 1971.
84. Gardner J. D., Shibolet S., Ginzler E. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1548, 1971.
85. Blondin G. A., DeCastro A. F., Senior A. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 28, 1971.

http://rcin.org.pl

Post. Biochem. 19, 577—592, (1973).

JAN GOMUŁKIEWICZ *

Przenikanie anionów do erytrocytów

Permeation of Anions into Erythrocytes

Czerwone ciałka krwi były jednymi z pierwszych żywych komórek, w których badano przenikanie różnych substancji do ich wnętrza. Dzięki swojej stosunkowo prostej budowie, łatwości uzyskiwania w dużej ilości, bez domieszek innych komórek, trwałości i łatwości przechowywania przez długi okres czasu oraz przeżywaniu w roztworach fizjologicznych soli, erytrocyty są bardzo dogodnym obiektem do badań nad przenikaniem substancji przez błony komórkowe. Z tych też powodów błona plazmatyczna erytrocytów w wielu badaniach jest traktowana jako model błon innych komórek.

Mimo zebrania ogromnego materiału doświadczalnego i sporej liczby opracowań teoretycznych ciągle brak pełnego opisu mechanizmu przenikania do czerwonych krwinek większości istotnych dla ich życia substancji. Między innymi nadal nie jest wystarczająco poznany mechanizm przenikania anionów przez ich błony. Problemowi temu poświęcony jest obecny artykuł.

I. Wyniki początkowych badań nad przenikaniem anionów do erytrocytów

Charakterystyczną cechą błony plazmatycznej erytrocytów jest około milion razy większa przepuszczalność dla anionów niż dla kationów o podobnej wielkości ładunku i podobnych rozmiarach. Dzięki temu już na początku badań przenikania substancji do czerwonych ciałek krwi stwierdzono, że ich błona jest przepuszczalna dla anionów. Początkowo zauważono, że wzrost stężenia jonów węglanowych w środowisku zewnętrznym powoduje ich wymianę na jony chlorkowe z wnętrza erytrocytów i od-

* Dr hab., Instytut Biologii Roślin i Biofizyki, Akademia Rolnicza, Wrocław.

Wykaz stosowanych skrótów: DNFB — 1-fluoro-2,4-dwunitrobezen; MNT — 2-metoksy-5-nitropone; SITS — kwas 4-acetamido-4-izotiocyjanostylbeno-2,2'-dwusulfonowy; TNBS — kwas 2,4,6-trójnitrobezenosulfonowy; MA — bezwodnik maleinowy; PCMBS — p-chlororтęciobenzenosulfonian; PCMB — p-chlororтęciobenzoesan.

http://rcin.org.pl

wrotnie. Następnie wykazano również, że jony Cl^- mogą być wymieniane na jony SO_4^{--} i NO_3^-. W podobny sposób stwierdzono, że błona erytrocytów jest przepuszczalna dla wielu anionów nieorganicznych (Cl^-, Br^-, F^-, HCO_3^-, SO_4^{--}, AsO_4^{---}, $H_2PO_4^-$, HPO_4^{--}) oraz niektórych organicznych (mlecznanowych, salicylowych, szczawianowych). Badania powtarzane na erytrocytach różnych ssaków nie wykazały jakościowych różnic w przenikaniu anionów przez ich błonę (10, 23, 36, 83).

Wszystkie prowadzone do około 1920 roku badania miały tylko jakościowy charakter (10). Wykazały one jednak, że jony Cl^- i inne jednowartościowe aniony nieorganiczne przenikają przez błonę erytrocytów bardzo szybko w porównaniu z anionami dwuwartościowymi.

Dokładniejsze wyniki pozwoliła uzyskać przepływowa metoda badania przenikania jonów do erytrocytów (23). Polegała ona na szybkim zmieszaniu zawiesiny erytrocytów z CO_2, dla zaburzenia równowagi jonowej, a następnie przepuszczeniu jej ze znaną szybkością przez rurę przegrodzoną filtrem. Znając szybkość przepływu zawiesiny oraz dokonując analizy filtrów (łatwo przepuszczających osocze lecz zatrzymujących krwinki) umieszczonych w różnych odległościach od początku rury, można wyznaczyć przebieg czasowy wymiany HCO_3^- z osocza na Cl^- z wnętrza erytrocytów. Otrzymany na tej drodze połówkowy okres dla tej wymiany wynosił 0,2 sek.

Wykorzystując fakt łatwego przenikania kationów NH_4^+ do erytrocytów uzyskano względne szybkości przenikania przez ich błony dla różnych anionów, porównując szybkości zmian objętości krwinek umieszczonych w roztworach soli amonowych (różniących się anionem) (10).

Zarówno wspomniane tu przykładowo metody badań przenikania anionów przez błonę erytrocytów jak i inne stosowane w początkowym okresie badań (np. bezpośredni pomiar potencjometryczny stężenia odpowiedniego anionu w środowisku zewnętrznym) poza tym, że były mało dokładne, miały jeszcze jedną wadę, a mianowicie wymagały zaburzenia równowagi jonowej, a jak to się później okaże, przy braku równowagi jonowej nie można wyznaczyć stałej przenikania anionów przez błonę erytrocytów.

Możliwość badania przenikania jonów przez błonę erytrocytów w stanie równowagi jonowej między wnętrzem komórki a jej środowiskiem zewnętrznym dało dopiero wykorzystanie do tych badań jonów znaczonych izotopami promieniotwórczymi. Znaczone jony dodaje się w tak małych ilościach, że nie zaburza to równowagi. Mierząc szybkość zmian radioaktywności w krwinkach lub w ich środowisku można jednak badać kinetykę przenikania znaczonych jonów przez błonę komórkową. Przeszkodą w zastosowaniu tej metody do badania przenikania do erytrocytów anionów z grupy chlorowców (Cl^-, F^-, Br^-, J^-) była przez długi czas duża szybkość ich przenikania. Adaptując metodę przepływu zawiesiny komórek przez rurę przegrodzoną filtrem uzyskano możliwość przeprowadzenia takich badań (78). Uzyskane wyniki wykazały, że proces przenikania

http://rcin.org.pl

anionów z grupy chlorowców podlega kinetyce pierwszego rzędu. Otrzymane okresy połowicznej wymiany w temperaturze pokojowej dla erytrocytów człowieka i wołu, wynoszące odpowiednio dla jonu chlorkowego — 0,22sek, bromkowego — 1,12sek, fluorkowego — 2,21sek i jodkowego — 11,22sek, nie korelują ani z promieniami jonów ani z ich przewodnictwem jonowym. Fakt ten dowodzi, że inne czynniki decydują o ich przenoszeniu w swobodnym roztworze a inne w błonie erytrocytów. Czas połówkowej wymiany (0,22sek) przez błonę erytrocytów dla jonów chlorkowych jest około 70 razy większy od odpowiedniego czasu w swobodnym roztworze dla tych jonów. Błona ogranicza więc swobodę ich dyfuzji.

Przeprowadzone badania przenikania (w stanie równowagi) przy pomocy jonów znaczonych radioaktywnym ^{32}P wykazały, że szybkość wymiany jonów ortofosforanowych jest proporcjonalna do ich stężenia w środowisku zewnętrznym (34). Kinetyka wymiany jest dla jonów ortofosforanowych, podobnie jak dla innych anionów kinetyką pierwszego rzędu (52, 62). Badania na erytrocytach człowieka, psa, królika, kota, wołu i kozy wykazały, że charakter przenikania jonów ortofosforanowych do erytrocytów różnego pochodzenia jest taki sam (62). Różnice występują tylko w wartościach stałej szybkości wymiany fosforanu wyznaczonej jako współczynnik nachylenia prostej otrzymanej przez wykreślenie logarytmu naturalnego radioaktywności osocza w funkcji czasu. Stałe szybkości (w h^{-1}) dla wymiany fosforanu wynosiły odpowiednio dla człowieka — 0,24, psa — 0,23, królika — 0,21, kota — 0,11, wołu — 0,07 i kozy — 0,07.

Również badania przenikania jonów siarczanowych przy pomocy siarki promieniotwórczej (^{35}S) (56, 57) wykazały, że wymiana jonów siarczanowych w stanie równowagi jonowej podlega kinetyce pierwszego rzędu.

Równoległe do badań przenikania pomiary rozmieszczenia anionów między wnętrzem erytrocytów a środowiskiem zewnętrznym wykazały zgodność z rozmieszczeniem przewidywanym przez równowagę Donnana (86) dla wszystkich anionów nieorganicznych, poza jonami ortofosforanowymi. Zgodnie z kryteriami oceny charakteru procesu przenikania (23, 28, 39, 45, 86) nie ulegało wątpliwości, że aniony (poza ortofosforanowymi) przenikają przez błonę erytrocytów w sposób bierny. Otwarta była dalej sprawa charakteru przenikania jonów ortofosforanowych. Badania charakteru procesu przenikania tych jonów komplikowały dwa fakty. Pierwszy to udział jonów ortofosforanowych w procesach metabolicznych komórki. Drugi to występowanie ich w warunkach fizjologicznego pH w dwu formach — jedno i dwuzasadowej ($H_2PO_4^-$ i HPO_4^{--}).

Stwierdzone odstępstwo rozmieszczenia jonów ortofosforanowych od przewidywanego przez równowagę Donnana (53) mogło być spowodowane zmianą stężenia wewnątrzkomórkowego tych jonów, wywołaną przez hydrolizę estrów fosforanowych w czasie przygotowywania erytrocytów do analizy. Celem zmniejszenia tego błędu przeprowadzono doświadczenia z erytrocytami zawieszonymi w roztworach fizjologicznych o wyższych stę-

http://rcin.org.pl

żeniach ortofosforanów aniżeli w naturalnym osoczu (82). Ewentualna hydroliza estrów dawała więc mniejszy błąd względny w oznaczaniu stężeń ortofosforanów. Otrzymane w tych doświadczeniach wyniki wykazały praktyczną zgodność rozmieszczenia jonów ortofosforanowych z rozmieszczeniem przewidywanym przez równowagę Donnana. W ten sposób odpadł jeden z argumentów przemawiających za aktywnym transportem jonów ortofosforanowych przez błonę plazmatyczną erytrocytów.

Na korzyść aktywnego charakteru transportu jonów ortofosforanowych do erytrocytów miały natomiast przemawiać następujące fakty. Obniżenie szybkości przenikania tych jonów spowodowane zahamowaniem procesu glikolizy (30, 32). Wysoka energia aktywacji ich transportu (około 20kcal/mol) charakterystyczna dla reakcji chemicznych (32, 62). Stwierdzenie, że radioaktywność właściwa niektórych frakcji organicznych fosforu komórkowego jest wyższa od radioaktywności właściwej frakcji nieorganicznej (31, 62, 63).

Dalsze badania procesu przenikania jonów ortofosforanowych do erytrocytów wykazały niesłuszność wszystkich argumentów popierających pogląd o aktywnym charakterze transportu tych jonów. I tak, badając zależność przenikania jonów ortofosforanowych od stężenia tych jonów w środowisku zewnętrznym (8, 81, 88) wykazano, że pozostaje ona stała dla wszystkich stosowanych stężeń (maksymalne stężenie około 10-krotnie przewyższało stężenie fizjologiczne). Wynik ten wskazuje na brak nośników dla jonów ortofosforanowych w błonie erytrocytów, których istnienia wymagał model transportu aktywnego (31, 62). Okazało się również, że stała szybkości przenikania jonów ortofosforanowych nie zależy od procesu glikolizy (5, 21, 88). Przy tym wykazano, że jeśli proces glikolizy jest zahamowany, to przenikający do komórki fosfór ^{32}P nie wbudowuje się do frakcji organicznej. Obserwowane (30, 32) zmniejszenie szybkości przenikania jonów ortofosforanowych do erytrocytów przy zahamowanej glikolizie mogło być spowodowane zarówno zablokowaniem przechodzenia ^{32}P do frakcji organicznej fosforu komórkowego (5) jak i strumieniem netto tych jonów z komórki. Zablokowaniu glikolizy towarzyszy hydroliza estrów fosforanowych prowadząca do wzrostu stężenia jonów ortofosforanowych w komórce, a wzrost stężenia jonów zakłóca równowagę jonową między wnętrzem komórki i jej środowiskiem.

Również dzięki zastosowaniu odpowiedniej techniki szybkiego pobierania próbek (8) wykazano, że w początkowym okresie (do około 30 minut od momentu rozpoczęcia doświadczenia) najwyższą radioaktywność właściwą ma frakcja nieorganiczna fosforu komórkowego. Stwierdzona poprzednio (31, 62) wyższa radioaktywność frakcji organicznej od radioaktywności frakcji nieorganicznej jest wynikiem znacznie większej szybkości wchodzenia jonów ortofosforanowych w reakcje metaboliczne, aniżeli szybkość ich przechodzenia przez błonę komórkową (75). Nie stwierdzono też konkurencji między jonami ortofosforanowymi a jonami SO_4^{--} i AsO_4^{---}

http://rcin.org.pl

(8), która ze względu na podobieństwo chemiczne tych jonów powinna wystąpić.

Nowsze badania potwierdziły natomiast wysoką wartość energii aktywacji procesu przenikania jonów ortofosforanowych przez błonę erytrocytów. Wielkości energii aktywacji podawane przez różnych autorów różnią się co do wartości, ale zawsze przekracza ona wartość 20kcal/mol (15, 21, 22, 56, 57, 64). Jednak tak wysoka energia aktywacji nie musi być dowodem aktywnego charakteru procesu przenikania jonów przez błonę komórkową. Dowodzi ona tylko, że przenikanie nie może zachodzić na drodze swobodnej dyfuzji przez wypełnione wodą kanały w błonie. Jeśli jednak przyjąć, że jony dyfundują przez fazę błony, która jest bardziej zbliżona w swej strukturze do ciała stałego, to tak wysoka wartość energii aktywacji wcale nie będzie dziwna (64).

Biorąc pod uwagę wszystko, co zostało wyżej powiedziane, należy przyjąć, że bierny charakter transportu anionów (w tym również jonów ortofosforanowych) przez błonę erytrocytów jest dziś wystarczająco udowodniony. Zgodni są w tej kwestii praktycznie wszyscy badacze (poza nielicznymi wyjątkami (19, 47)) zajmujący się tym problemem. Nie jest to jednak równoznaczne z poznaniem mechanizmu tego transportu.

II. Mechanizm przenikania anionów przez błonę plazmatyczną erytrocytów

Badania, których zadaniem było dokładniejsze poznanie mechanizmu przenoszenia anionów przez błonę plazmatyczną erytrocytów ograniczają się w zasadzie do dwóch rodzajów jonów — jonów siarczanowych (SO_4^{--}) oraz jonów ortofosforanowych ($H_2PO_4^-$ i HPO_4^{--}). Jest to spowodowane stosunkowo małą szybkością przenikania tych jonów, co pozwala na dokładne badanie kinetyki ich transportu. Występujące w komórce w dużej ilości jony chlorkowe (Cl^-) przenikają przez błonę erytrocytów tak szybko, że ciągle jeszcze prowadzenie dokładniejszych badań kinetycznych jest bardzo trudne. Przyjmuje się jednak, że mechanizm przenikania wszystkich anionów jest podobny i prawidłowości stwierdzone dla jednego rodzaju anionów są słuszne dla pozostałych anionów. Przyjmuje się również, że mechanizm transportu anionów przez błonę erytrocytów różnych ssaków jest podobny (mimo występowania różnic w szybkościach przenikania).

Obszerne badania poświęcone jonom SO_4^{--} prowadzone były przez P a s s o w a i jego współpracowników. Wyniki tych badań przedstawione są w kilku artykułach przeglądowych i pracach oryginalnych (48, 56, 57, 58, 59, 60, 61). W zasadzie wszystkie te badania prowadzone były w stanie równowagi jonowej (równowagi Donnana) między wnętrzem komórki i jej środowiskiem; przy pomocy znaczonych jonów $^{35}SO_4^{--}$ (20). Badana była zależność stałej przenikania od pH, składu jonowego i siły jonowej środo-

http://rcin.org.pl

wiska zewnętrznego, temperatury oraz różnych czynników chemicznych. Stwierdzono, że przenikanie jonów SO_4^{--} rośnie wraz z obniżaniem pH i siły jonowej oraz wraz ze wzrostem stosunku stężenia jonów SO_4^{--} do stężenia jonów Cl^- w środowisku zewnętrznym. Przenikanie jonów SO_4^{--} hamują natomiast takie związki chemiczne jak DNFB, MNT, salicylan, benzoesan, fenol, anilina i ftalan. Stwierdzono również, że strumień jonów SO_4^{--} przez błonę plazmatyczną erytrocytów rośnie szybciej aniżeli ich stężenie w środowisku zewnętrznym, a także, że energia aktywacji procesu przenikania tych jonów jest wysoka (około 28kcal/mol) i nie zależy od pH środowiska.

W tym samym czasie w różnych ośrodkach prowadzono badania mechanizmu przenikania do erytrocytów jonów ortofosforanowych (5, 6, 12, 13, 25, 26, 27, 29, 56; 65, 70). Okazało się, że zależność przenikania tych jonów od parametrów fizyko-chemicznych środowiska zewnętrznego (pH, siła jonowa, skład jonowy, temperatura) przedstawia się podobnie jak dla jonów siarczanowych. Dodatkowo stwierdzono natomiast, że zamiana w środowisku jonów Cl^- na inne aniony (13, 25) zmienia szybkość przenikania jonów ortofosforanowych i to w różnym stopniu w zależności od rodzaju zastosowanego anionu. Wykazano również, że energia aktywacji procesu przenikania jonów ortofosforanowych obniża się wraz z obniżeniem siły jonowej środowiska (65) oraz, że wraz z obniżeniem pH środowiska przenikanie tych jonów osiąga maksimum przy pH 6,4, a przy dalszym obniżaniu pH przenikanie maleje (13). Nie stwierdzno natomiast dla jonów ortofosforanowych wpływu stosunku stężenia jonów chlorkowych do stężenia jonów ortofosforanowych ani na stałą przenikania, ani na energię aktywacji (27).

W ostatnim czasie ukazało się kilka prac, które wskazują wbrew powszechnie akceptowanemu dotychczas założeniu, że istnieją pewne różnice jakościowe mechanizmów przenikania różnych anionów do erytrocytów. Stwierdzno (58), że zależność przenikania jonów jodkowych (J^-) do erytrocytów od pH środowiska zewnętrznego jest przeciwna do odpowiedniej zależności dla jonów SO_4^{--} oraz, że przenikanie jonów J^- w zależności od ich stężenia (w zakresie do około 170mM) podlega kinetyce nasycenia. Równocześnie okazało się, że jony jodkowe hamują przenikanie jonów siarczanowych, ale jony siarczanowe nie wpływają na przenikanie jonów jodkowych. Powyższe wyniki wskazują według P a s s o w a (58) na możliwość występowania w błonie erytrocytów dwóch rodzajów kanałów, przez które aniony przenikają; jedne kanały są dostępne dla wszystkich anionów, drugie natomiast są dostępne tylko dla jonów jodkowych i ewentualnie dla pozostałych chlorowców.

Badając dyfuzję jonów Cl^- przez błonę plazmatyczną erytrocytów poddanych działaniu gramicydyny lub walinomycyny (czynników zwiększających przenikanie błony erytrocytów dla kationów jednowartościowych) stwierdzono (40, 68, 69), że szybkość przenikania jonów chlorkowych przy

http://rcin.org.pl

strumieniu netto różnym od zera jest kilkaset razy mniejsza od szybkości wymiany jonów chlorkowych w stanie równowagi jonowej, że kinetyka przenikania Cl^- wykazuje nasycenie oraz, że jony Cl^- konkurują z innymi anionami przy przechodzeniu przez błonę. Zdaniem autorów powyższych prac wskazuje to na nośnikowy charakter transportu anionów przez błonę erytrocytów. Okazało się również (79), że przewodnictwo chlorkowe błony erytrocytów poddanych działaniu walinomycyny jest około 10^6 razy mniejsze od przewodnictwa chlorkowego obliczonego z doświadczeń prowadzonych w stanie równowagi jonowej.

Należy jednak pamiętać, że chcąc porównywać wyniki badań przenikania jonów jodkowych z wynikami uzyskanymi dla jonów siarczanowych, trzeba było prowadzić doświadczenia w temperaturze bliskiej zera (w skali Celsjusza) a więc w temperaturze znacznie odbiegającej od temperatury fizjologicznej (około 37°) dla ssaków. Struktura błony erytrocytów w temperaturze bliskiej zera jest prawdopodobnie zmieniona w stosunku do struktury tej błony w temperaturze fizjologicznej. Wskazuje na to wyraźna zależność energii aktywacji procesu przenikania jonów chlorkowych do erytrocytów od temperatury (85). Również błona plazmatyczna erytrocytów poddanych działaniu walinomycyny czy gramicydyny może podlegać zmianom strukturalnym, a te mogą pociągać za sobą zmianę mechanizmu przenikania anionów.

Interesujący przyczynek do badań nad mechanizmem przenikania anionów do erytrocytów stanowi praca (15), w której wykazuje się, że różnice ilościowe stwierdzone w przenikaniu anionów do erytrocytów różnych ssaków są uwarunkowane różnym składem fosfolipidów w błonach plazmatycznych czerwonych ciałek krwi różnego pochodzenia.

III. Hipoteza ładunku związanego

Dla wyjaśnienia faktów przedstawionych w poprzednim rozdziale, P a s s o w (57) zaproponował hipotezę ładunku związanego, opisującą mechanizm biernego transportu jonów przez błonę plazmatyczną czerwonych ciałek krwi. Hipoteza ta zyskała duże uznanie i często przyjmowana jest z mniejszym krytycyzmem aniżeli odnosi się do niej sam Passow.

Passow formułując hipotezę ładunku związanego oparł się na szeroko rozpowszechnionym poglądzie, że milion razy większa przepuszczalność błony erytrocytów dla Cl^- w stosunku do przepuszczalności dla K^+ jest wynikiem istnienia w tej błonie wąskich por wypełnionych wodą, na ściankach których znajduje się duży dodatni ładunek elektryczny. Dalsze założenia Passowa są następujące: *1.* Strumień jednokierunkowy, biernie transportowanych przez błonę jonów (w stanie równowagi Donnana), jest jednoznaczną funkcją ich stężenia w błonie. *2.* Stężenie jonów w błonie

http://rcin.org.pl

zależy od stężenia ładunku związanego oraz od stężenia wszystkich jonów w środowisku sąsiadującym z błoną. *3.* Jeśli w błonie znajduje się duży dodatni (związany) ładunek elektryczny, to oddziaływanie elektrostatyczne spowoduje, że stężenie swobodnych kationów będzie w niej bardzo małe (praktycznie równe zeru). *4.* Jeśli ładunek związany stanowią dysocjujące grupy aminowe (NH_4^+), to jego stężenie będzie się zmieniać wraz ze zmianą pH w błonie. Wartość pH w błonie będzie natomiast uwarunkowana wartością pH i stężeniem wszystkich jonów w środowisku zewnętrznym. *5.* Zmiany pH oraz składu jonowego środowiska, wywołując zmianę stężenia ładunku związanego, będą powodować zmianę stężenia przenikającego jonu w błonie. Ponieważ strumień jonów zależy od ich stężenia w błonie, to zmiana pH lub stężenia wszystkich jonów w środowisku zewnętrznym wywoła zmianę strumienia badanych jonów przez błonę.

Chcąc sprawdzić zgodność swojej hipotezy z doświadczeniem, Passow wyprowadził równanie, które pozwalało na obliczenie stężenia interesujących jonów w błonie. Ponieważ większość jego doświadczeń była wykonana z jonami siarczanowymi, równanie wyprowadził dla jonów SO_4^{--}. Można je jednak wykorzystać dla dowolnych anionów dwuwartościowych. Przy wyprowadzeniu swego równania Passow założył, że:

1. W błonie spełniony jest warunek elektroneutralności w postaci:

$$2[SO_{4\,m}^{--}]+[Cl_m^-] = [A^+];$$

2. Dysocjacja ładunku związanego podlega prawu działania mas:

$$\frac{AH_m^+}{K+H_m^+} = A^+;$$

3. Ładunki związane nie oddziałują między sobą;

4. Błona jest jednorodna;

5. Rozmieszczenie dyfundujących anionów jest zgodne z rozmieszczeniem przewidywanym przez równowagę Donnana:

$$\frac{\sqrt{f_{SO_4}[SO_{4\,m}^{--}]}}{\sqrt{SO_{4\,o}^{--}}} = \frac{f_{Cl}[Cl_m^-]}{Cl_o^-} = \frac{H_o^+}{H_m^+}.$$

Z tych założeń otrzymuje się następujące równanie dla stężenia jonów SO_4^{--} w błonie:

$$2[SO_{4\,m}^{--}]+fp\sqrt{[SO_{4\,m}^{--}]} = A\frac{q}{K\sqrt{f_{SO_4}[SO_{4\,m}^{--}]}+q}. \qquad (1)$$

W powyższych zależnościach symbole chemiczne bez nawiasów ozna-

http://rcin.org.pl

czają aktywności a w nawiasach kwadratowych stężenia jonów. Znaczenie zastosowanych tu symboli jest następujące: A — jest sumaryczną koncentracją zdysocjowanych i niezdysocjowanych grup odpowiedzialnych za ładunek związany, A^+ — jest koncentracją grup niezdysocjowanych (stężeniem ładunku związanego), K — jest stałą dysocjacji grup odpowiedzialnych za ładunek związany błony, $f_{SO_4^{--}}$ i f_{Cl^-} — są współczynnikami aktywności odpowiednio dla jonów SO_4^{--} i Cl^- w błonie, $f = \sqrt{f_{SO_4}/f_{Cl}}$, $p = Cl_o^-/\sqrt{SO_{4\,o}^{--}}$, $q = H_m^+/\sqrt{SO_{4\,m}^{--}}$, indeksy m i o oznaczają stężenia w błonie i środowisku zewnętrznym — odpowiednio.

Chcąc z równania (1) obliczyć stężenie jonów SO_4^{--}, w błonie trzeba znać wartości parametrów A, K i f, które nie dają się wyznaczyć eksperymentalnie. Wartości parametrów A i K Passow dobrał na drodze kolejnych przybliżeń tak, aby obserwowane doświadczalnie strumienie jonów siarczanowych były jednoznaczną funkcją wyliczonego stężenia tych jonów w błonie. Warunkowi temu najlepiej odpowiada A = 2,5 M i $K = 10^{-9}$. Dla f przyjął natomiast wartość równą jedności.

Przedstawiona wyżej w skrócie hipoteza ładunku związanego zgodna jest z obserwowanymi zmianami strumienia jonów siarczanowych (48, 56, 57) oraz jonów ortofosforanowych (12, 13), przez błonę plazmatyczną erytrocytów, w zależności od pH i składu jonowego środowiska. Wyjaśnia ona również selektywność błony erytrocytów dla anionów. By jednak wyjaśnić inne fakty doświadczalne Passow przyjął dalsze założenia:

1. Obserwowana wartość energii aktywacji dla procesu przenikania jonów siarczanowych i ortofosforanowych (około 30kcal/mol) nie daje się pogodzić z założeniem por wypełnionych wodą i naładowanych dodatnim ładunkiem elektrycznym. Największe wartości energii aktywacji dla jonitowych błon sztucznych nie przekraczają bowiem 12kcal/mol. By więc pogodzić wysoką wartość energii aktywacji z hipotezą ładunku związanego Passow przyjął, że błona erytrocytów składa się z trzech warstw. Warstwy zewnętrzne (lub odcinki por odpowiadające warstwom zewnętrznym) błony zawierają duży ładunek dodatni, który decyduje o stężeniu anionów w tych warstwach i stanowi barierę energetyczną dla kationów. Środkowa warstwa stanowi natomiast barierę dla anionów. Mogą ją tworzyć lipidy (jak w modelu błony elementarnej Daniellige'go — Robertsona), lub też odpowiadające jej środkowe odcinki por naładowane ujemnym ładunkiem elektrycznym.

2. Wyniki eksperymentalne wskazują, że strumienie jonów siarczanowych i ortofosforanowych nie są liniową funkcją obliczonego stężenia tych jonów w błonie, lecz wyrażają się szybko rosnącą wraz ze stężeniem funkcją eksponencjalną. Aby te obserwacje wyjaśnić Passow przyjął, że proces przenikania anionów przez barierę energetyczną błony jest procesem kooperatywnym, to znaczy, że wraz ze wzrostem stężenia rośnie szybkość przenikania jonów przez błonę.

Mocnego poparcia dla hipotezy ładunku związanego dostarczają wyniki

http://rcin.org.pl

prac, w których badano wpływ na przenikanie anionów do erytrocytów związków reagujących z grupami aminowymi (zgodnie z hipotezą Passowa grupy aminowe są odpowiedzialne za dodatni ładunek związany błony erytrocytów). Stwierdzno, że zmniejszają przenikanie anionów takie związki jak: DNFB (42, 57, 59, 60, 61), MNT (58, 60), SITS (42), TNBS (42), MA (54) oraz enzym pronaza (59).

Hipoteza ładunku związanego (na co zwraca uwagę sam Passow (57, 59) oraz inni autorzy (13, 25, 60, 65)) nie jest jednak w stanie wyjaśnić wszystkich faktów związanych z przenikaniem anionów do erytrocytów. I tak nie tłumaczy ona: *1.* Występowania maksymalnej przepuszczalności błony erytrocytów dla anionów przy wartości pH równej 6,4 (13). *2.* Dlaczego zamiana jonów chlorkowych w środowisku na różne inne aniony jednowartościowe (13, 71, 85) lub duwartościowe (25, 71) powoduje zmianę przenikania badanych anionów. Zgodnie z hipotezą ładunku związanego ważny jest tylko ładunek jonu, a nie jego własności chemiczne (decyduje oddziaływanie elektrostatyczne). *3.* Dlaczego pewne związki chemiczne hamują przenikanie anionów, mimo że nie oddziaływują z grupami aminowymi (57, 59) — nie mogą więc zmieniać wielkości ładunku związanego w błonie. *4.* Dlaczego reagując z grupami aminowymi MNT w nieobecności fenolu hamuje przenikanie anionów, lecz praktycznie nie zmienia przenikania kationów. Natomiast po dodaniu fenolu MNT wyraźnie zwiększa przenikanie kationów bez wpływu na przenikanie anionów (58, 60). *5.* Występowania zależności energii aktywacji procesu przenikania jonów ortofosforanowych do erytrocytów od siły jonowej środowiska zewnętrznego (65). *6.* Braku zależności stałej przenikania błony erytrocytów dla jonów ortofosforanowych od stosunku stężeń jonów chlorkowych do ortofosforanowych w środowisku zewnętrznym (przy ustalonej sile jonowej i pH środowiska) (26).

Aby przynajmniej niektóre z powyższych faktów pogodzić z hipotezą ładunku związanego, niektórzy badacze proponują przyjęcie dodatkowych założeń. Sugeruje się, że na kooperatywne przenikanie danego anionu mają wpływ wszystkie aniony zmieniając barierę energetyczną w różnym stopniu (13), lub że aniony wpływają na przenikanie danego anionu w różnym stopniu, ponieważ mimo jednakowej wartości są w różnym stopniu wiązane na dodatnich centrach w błonie (85). Dla wyjaśnienia różnego wpływu MNT w obecności i bez fenolu na przenikanie anionów i kationów oraz wpływ PCMBS na przenikanie kationów i brak wpływu tego związku na przenikanie anionów, proponuje się, że w błonie istnieją dwa obszary naładowane dodatnio, z których jeden kontroluje przenikanie anionów a drugi przenikanie kationów (42).

http://rcin.org.pl

IV. Dyskusja założeń stanowiących podstawę hipotezy ładunku związanego

Autor hipotezy ładunku związanego — Passow, zdaje sobie sprawę z tego, że jego hipoteza nie całkowicie wyjaśnia mechanizm biernego transportu jonów przez błonę erytrocytów. Traktuje ją jedynie jako hipotezę roboczą, ale równocześnie jedyną, która w sposób zadawalający opisuje ten mechanizm (57, 58). Wydaje się celowe przedyskutowanie tu słuszności założeń i interpretacji zjawisk, które legły u podstaw powyższej hipotezy.

Podstawę hipotezy ładunku związanego stanowi założenie, że małe cząsteczki polarne, a więc hydrofilne (jony i obdarzone momentem dipolowym cząsteczki nieelektrolitów), przenikają przez wypełnione wodą pory błony komórkowej. Warstwa lipidów powinna bowiem być dla nich bardzo słabo przepuszczalna. Dodatkowo, aby wyjaśnić selektywność błony erytrocytów dla jonów chlorkowych w porównaniu z jonami potasowymi (których rozmiary są bardzo podobne), przyjmuje się obecność w tych porach dużego dodatniego ładunku elektrycznego. Dowodem istnienia por w błonie komórkowej jest, według zwolenników ich istnienia, regularne zmniejszanie się przenikania (np. anionów dwukarboksylowych (56)) wraz ze wzrostem rozmiarów przenikających cząsteczek, a po przekroczeniu pewnego maksymalnego rozmiaru praktyczny brak przenikania dla tych cząsteczek. Drugim jeszcze ważniejszym i do niedawna powszechnie przyjętym dowodem istnienia por w błonie komórkowej jest różnica w stałych przenikania błony dla wody, wyznaczanych metodą osmotyczną i metodą izotopową. Mianowicie stała przenikania dla wody wyznaczona z pomiarów strumienia osmotycznego, jest około 4 razy większa (dla erytrocytów) od stałej przenikania wyznaczonej w warunkach równowagi osmotycznej, wykorzystując wodę trytowaną (24, 73, 74, 83).

Na sztucznych błonach wykazano jednak, że za różnice w stałych przenikania wyznaczanych metodą osmotyczną i izotopową jest odpowiedzialna warstwa nie mieszającej się wody przy powierzchni błony, a nie istniejące w niej pory. Równocześnie nie stwierdzono faktów sprzecznych z założeniem, że woda przenika przez całą powierzchnię błon fosfolipidowych (16, 17, 66).

Metodami termodynamiki wykazano natomiast (77), że doświadczenia izotopowe i osmotyczne są nieporównywalne, a więc i wyznaczone w oparciu o nie stałe przenikania nie mogą być porównywane; różnice w wartościach stałych przenikania wystąpią również wtedy, gdy woda przenika przez całą powierzchnię błony.

Dalej, badając hamowanie przenikania wody przez błonę erytrocytów wywołane przy pomocy PCMB i PCMBS wykazano (50), że nie towarzyszy mu zahamowanie przenikania innych małych cząsteczek polarnych. Również zahamowanie przenikania tych ostatnich przy pomocy floretolu nie jest związane z zahamowaniem przenikania wody. Dla wytłumaczenia braku związku przenikania wody i innych małych cząsteczek polarnych

http://rcin.org.pl

(mocznika i szeregu glikoli) trzeba by przyjąć, że pory w błonie są wybiórczo przepuszczalne dla różnych cząsteczek. Podobnie pod wpływem działania PCMBS pojawia się wypływ potasu z erytrocytów, lecz nie stwierdza się wpływu tego związku na przenikanie jonów siarczanowych (60). By to wytłumaczyć trzeba przyjąć istnienie w błonie specjalnych por dla poszczególnych jonów.

Przedstawione wyżej fakty podważają prostotę koncepcji por w błonie komórkowej i czynią ją mniej prawdopodobną.

Wprowadzenie dodatnio naładowanych por dla wyjaśnienia różnicy w przenikaniu jonów chlorkowych i potasowych przez błonę erytrocytów, w świetle badań przenikania jonów do liposomów (1, 2, 3, 4, 55) wydaje się również nie być konieczne. Mianowicie liposomy, w wypadku których nic nie wskazuje na istnienie w nich por, są przepuszczalne dla jonów. Równocześnie liposomy utworzone z pewnych rodzajów fosfolipidów wykazują bardzo dużą selektywność dla jonów chlorkowych w porównaniu z jonami potasowymi. Energie aktywacji procesu przenikania jonów do liposomów (55) (dla jonów chlorkowych około 6kcal/mol, a dla jonów potasowych około 15kcal/mol) są bardzo bliskie energiom aktywacji dla przenikania tych jonów do erytrocytów. Przyczyną selektywności liposomów dla jonów chlorkowych oraz różnic w energiach aktywacji nie jest (jak wykazano w powyższej pracy) wypadkowy ładunek elektryczny liposomów, lecz rozkład potencjału elektrycznego na granicy lipidy—woda, określony przez polarną część cząsteczek fosfolipidów. Podobną hipotezę tłumaczącą selektywność błony erytrocytów dla jonów chlorkowych proponował Danielli (9).

Dodatkowym założeniem, jakie przyjęto w hipotezie ładunku związanego dla wyjaśnienia dużych wartości energii aktywacji dla anionów dwuwartościowych, było postulowanie nierównomiernego rozmieszczenia ładunku elektrycznego w porach błony; przyjmowano w środkowej części pory obecność ładunku ujemnego. Jak wynika z teorii (37), dla błon jonitowych, stężenie anionów w tym ujemnie naładowanym obszarze decydowałoby o ich strumieniu przez błonę, a nie stężenie w obszarze naładowanym ładunkiem dodatnim, jak tego wymaga hipoteza ładunku związanego. Takie rozmieszczenie ładunku w porze nie da się więc pogodzić z hipotezą ładunku związanego. Również druga wersja rozmieszczenia ładunku w porze, zakładająca, że środkowy odcinek pory jest hydrofobowy, jest niezgodna z założeniem o istnieniu w błonie erytrocytów kanałów wypełnionych wodą.

Jeśli nawet zrezygnować z koncepcji por naładowanych dodatnio i przyjąć, że istnieją większe obszary błony naładowane dodatnio, to następne założenie Passowa o spełnieniu w tych obszarach warunku elektroneutralności (koniecznego przy wyprowadzaniu równania (1)) jest mało prawdopodobne. Mianowicie grubość tego naładowanego dodatnio obszaru błony erytrocytów nie może przekraczać 25Å, ponieważ przy grubości

http://rcin.org.pl

błony około 100Å, do głębokości 10Å nie stwierdza się w niej grup naładowanych dodatnio (76, 84), a środkowa hydrofobowa warstwa błony ma grubość około 30Å (18). Dla warstwy o grubości około 25Å, a więc tylko kilka razy większej od rozmiarów molekularnych, trudno oczekiwać, by spełniony był w niej warunek elektroneutralności.

Również, jak wynika ze składu chemicznego błony erytrocytów, ilość grup naładowanych ujemnie przeważa w niej nad ilością grup naładowanych dodatnio (57, 84). Zgromadzenie w pewnych obszarach błony dużego ładunku dodatniego, jak to proponuje Passow, musi pociągać za sobą powstanie wyraźnego nadmiaru ładunku ujemnego w innych obszarach błony. Te ujemnie naładowane obszary spełniałyby podobną rolę w stosunku do kationów, jaką, zgodnie z hipotezą ładunku związanego, spełniają obszary naładowane dodatnio w stosunku do anionów. Błona erytrocytów nie byłaby selektywna dla anionów.

Przedstawiona tu dyskusja podstawowych założeń przyjętych w hipotezie ładunku związanego wykazuje, że są one niewystarczająco udokumentowane oraz, że założenia te są częściowo ze sobą sprzeczne. Podważa to słuszność samej hipotezy.

Alternatywnie do hipotezy ładunku związanego proponuje się w pracach (25, 26) następujące tłumaczenie wpływu parametrów fizyko-chemicznych środowiska zewnętrznego (pH, siła jonowa i skład jonowy) na przenikanie anionów do erytrocytów. Mianowicie przyjmuje się, że aniony przenikają do czerwonych ciałek krwi przez całą powierzchnię ich błony, a nie przez wypełnione wodą pory oraz, że środkową warstwę błony erytrocytów (odpowiedzialną za barierę energetyczną dla przenikających przez nią jonów) stanowią lipidy i ewentualnie hydrofobowe części cząsteczek zawartych w błonie białek (7, 18, 28, 38, 43, 44, 51). Dalej zakłada się, że struktura tej środkowej warstwy hydrofobowej błony zależy między innymi również od pH, siły jonowej i składu jonowego środowiska zewnętrznego. Obserwowane zmiany przenikania anionów do erytrocytów towarzyszące zmianom parametrów fizyko-chemicznych środowiska przypisuje się wywołanym przez nie zmianom w strukturze lipidowej warstwy błony. Zmiany strukturalne w lipidowej warstwie błony plazmatycznej mogą być spoowdowane przejściami fazowymi w samych lipidach zależącymi od parametrów fizyko-chemicznych środowiska (11, 41, 49, 67, 72, 80), a również mogą być wywołane zmianami konformacyjnymi zawartych w błonie białek, zależnymi od pH i siły jonowej środowiska (11, 35, 43, 44, 72, 87).

Stwierdzona zależność energii aktywacji procesu przenikania jonów ortofosforanowych do erytrocytów od siły jonowej środowiska zewnętrznego (66) przemawia za słusznością powyższych założeń. Nie można jej bowiem wyjaśnić ani towarzyszącą zmianie siły jonowej zmianą ujemnego elektrycznego ładunku powierzchniowego błony erytrocytów (27), ani też kooperatywnym charakterem transportu jonów ortofosforanowych przez

http://rcin.org.pl

błonę czerwonych ciałek krwi (26). Również spowodowany obniżeniem siły jonowej wypływ potasu z erytrocytów (25, 46) wskazuje, że przepuszczalność ich błony zwiększa się dla kationów podobnie jak dla anionów, przy zmniejszaniu siły jonowej środowiska. Taki niespecyficzny wzrost przepuszczalności błony erytrocytów dla anionów i kationów łatwiej można wytłumaczyć zmianą struktury błony, aniżeli zmianą ładunku związanego błony, jak to się próbuje robić w oparciu o hipotezę ładunku związanego (57).

By jednak upewnić się, czy wysunięta tu hipoteza jest słuszna, potrzebne są dalsze badania wpływu pH i składu jonowego środowiska na energię aktywacji procesu przenikania do erytrocytów jonów ortofosforanowych i ewentualnie innych anionów. Należy również zbadać wpływ pH, siły jonowej i składu jonowego środowiska zewnętrznego na przejścia fazowe w błonie plazamtycznej erytrocytów.

PIŚMIENNICTWO

1. Bangham A. D., *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 31 (1968).
2. Bangham A. D., w Permeability and Function of Biological Membranes, red. Bolis L., North-Holand, Amsterdam, 1970, str. 195.
3. Bangham A. D., *Chem. Phys. Lipids* **8**, 386 (1972).
4. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. G., J. Mol. Biol., **13**, 238 (1965).
5. Bieliński E., Praca doktorska, Instytut Biologii Stosowanej, WSR, Wrocław, 1969.
6. Bieliński E., Gomułkiewicz J., Przestalski S., *Studia Biophys.*, **13**, 217, (1969).
7. Borovyagin V. L., *Biophysica*, **16**, 746 (1971).
8. Chedru J., Cartier P., *Biochim. Biophys. Acta*, **126**, 500 (1966).
9. Danielli J. F., w The Permeability of Natural Membranes, red. Davson H., Danielli J. F., University Press, Cambridge, 1952, str. 295.
10. Davson H., w The Permeability of Natural Membranes red. Davson H., Danielli J. F., University Press, Cambridge, 1952 str. 126.
11. Dawson R. M. C., w Biological Membranes, red. Chapman D., Academic Press, New York, London, 1968, str. 203.
12. Deuticke B., *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, **296**, 21 (1967).
13. Deuticke B., *Naturwissenschaften*, **57**, 172 (1970).
14. Deuticke B., Diekerman R., Bach D. W., w Metabolism and Membrane Permeability of Erythrocytes and Thrombocytes, red. Deutsch E., Thieme G., Stuttgart, 1968, str. 430.
15. Deuticke B., Gruber W., *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 369 (1970).
16. Everit C. T., Haydon D. A., *J. Theor. Biol.*, **22**, 9 (1969).
17. Everit C. T., Redwood W. R., Haydon D. A., *J. Theor. Biol.*, **22**, 20 (1969).
18. Finean J. B., *Quart. Rev. Biophys.*, **2**, 1 (1969).
19. Gamperts B. D., *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 144 (1969).
20. Gardos G., Hoffman J. F., Passow H., w Laboratory Techniques in Membrane Biophysics, red. Passow H., Stämpfli R., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; New York, 1969, str. 9.

http://rcin.org.pl

21. Gerlach E., Deuticke B., Duhm J., *Pflüg. Arch. Ges. Physiol.*, **280**, 243 (1964).
22. Glader B. E., Omachi A., *Biochim. Biophys. Acta* **163**, 30 (1968).
23. Glynn I. M., *Prog. Biophys. Chem.*, **8**, 241 (1957).
24. Goldstein D. A., Solomon A. K., *J. Gen. Physiol.*, **44**, 1 (1960).
25. Gomułkiewicz J., Zeszyty Naukowe WSR we Wrocławiu, *Weterynaria*, **30**, 100, (1973).
26. Gomułkiewicz J., *Studia Biophys.*, **35**, 13 (1973).
27. Gomułkiewicz J., *Studia Biophys.*, **35**, 13 (1973).
28. Gomułkiewicz J., *Post. Hig. i Med. Dośw.*, **27**, 69 (1973).
29. Gomułkiewicz J., Przestalski S., Kuczera J., Bieliński E., *Studia Biophys.*, **17**, 117 (1969).
30. Gourley D. R. H., *Am. J. Physiol.*, **164**, 213 (1951).
31. Gourley D. R. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 1 (1952).
32. Gourley D. R. H., *Virginia J. Sci.*, **5**, 20 (1954).
33. Gourley D. R. H., Gemill C. L., *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**, 341 (1950).
34. Hahn L. A., Hevesy G. Ch., *Acta Physiol. Scand.*, **3**, 193 (1942).
35. Gulik-Krzywicki T., Schechter E., Luzzati V., Faure M., *Nature*, **223**, 1116 (1969).
36. Haris E. J., Transport and Accumulation in Biological Systems, Butterworths, London, 1956, rozdz. 5.
37. Helfferich F., Ion Exchange, McGrow-Hill, New York, 1962, rozdz. 8.
38. Hendler R. W., *Physiol. Rev.*, **51**, 66 (1971).
39. Hope A. B., Ion Transport and Membranes, Butterworths, London, 1971, rozdz. 6.
40. Hunter M. J., *J. Physiol.*, 218, 49P (1971).
41. Kavanau J. L., Structure and Function in Biological Membranes, Holden Day, San Francisco, 1965, tom I., rozdz. 1.
42. Knauf P. A., Rothstein A., *J. Gen. Physiol.*, **58**, 190 (1971).
43. Korohoda W., Znaczenie błon biologicznych w procesach kontrolujących ruch i metabolizm komórek, Wyd. Uniw. Jagiel., Kraków, 1970, rozdz. 1.
44. Korhoda W., Ambrose E. J., Forester J. A., *Folia Biol.*, **15**, 371 (1967).
45. Kotyk A., Janacek K., Cell Membrane Transport, Plenum Press, New York, London, 1970, rozdz. 5.
46. La Celle P. L., Rothstein A., *J. Gen. Physiol.*, **50**, 171 (1966).
47. Latzkowits I., Szentistvanyi I., Fejszi Cs., *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **7**, 55 (1972).
48. Lepke S., Passow H., *J. Membrane Biol.*, 6, 158 (1971).
49. Luzzati V., Tardien A., Gulik-Krzywicki T., *Nature*, **217**, 1028 (1968).
50. Macey R. I., Farmer R. E. I., *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 104 (1970).
51. Malhotra S. K., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **20**, 69 (1970).
52. Molison P. L., Robinson M. R., Hunter D. A., *Lancet*, **1**, 766 (1958).
53. Mueller G. B., Hastings A. B., *J. Biol. Chem.*, 189, 869 (1951).
54. Obaid A. L., Rega A. F., Garraham P. J., *J. Membrane Biol.*, **9**, 385 (1972).
55. Papahadiapoulos D., Watkins J. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 639 (1967).
56. Passow H., w Red Blood Cell., red. Bischop Ch., Surgenour D. M., *Acad.* Press, New York, London, 1964, str. 71.
57. Passow H., *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 425 (1969).
58. Passow H., First European Biophysical Congress, 14 to 17th Sept., 1971, Baden, Austria, Proceeding Vol. 8., str. 81.
59. Passow H., *J. Membrane Biol.*, 6, 233 (1971).

http://rcin.org.pl

60. Passow H., Schnell K. F., *Experientia*, 25, 460 (1969).
61. Poensgen J., Passow H., *J. Membrane Biol.*, 6, 210 (1971).
62. Prankerd T. A. J., Altman K. I., *Biochem. J.*, 58, 622 (1954).
63. Prankerd T. A. J., Altman K. I., *Nature*, 173, 870 (1954).
64. Przestalski S., Zeszyty Naukowe WSR we Wrocławiu, *Weterynaria*, 14, 7 (1962).
65. Przestalski S., Gomułkiewicz J., Bieliński E., First European Biophysical Congress, 14 to 17th Sept., 1971, Baden, Austria, Proceeding, vol. 8, str. 395.
66. Redwood W. R., Haydon D. A., *J. Theor. Biol.*, 22, 1 (1969).
67. Rubalcova B., Martinez de Munoz D., Gitler C., *Biochemistry*, 8, 2769, (1969.
68. Scarpa A., Cecchetto A., Azzone G. F., *Nature*, 219, 529 (1968).
69. Scarpa A., Cecchetto A., Azzone G. F., *Biochim. Biophys. Acta* 219, 179 (1970).
70. Schrier S. L., *J. Lab. Clin. Med.*, 75, 422 (1970).
71. Scha'afi R. I., Pascoe E., *J. Gen. Physiol.*, 59, 155 (1972).
72. Singer S. J., w Structure and Function of Biological Membranes, red. Rothfield L. I., Acad. Press, New York, London, 1971, str. 145.
73. Solomon A. K., w Membrane Transport and Metabolism, Kleinzeller A., Kotyk A., red. Publishing Haus of the Czeskoslovak Acad. Sci., Praha, 1961, str. 94.
74. Solomon A. K., *J. Gen. Physiol.*, 51, 355 (1968).
75. Tatibana Mosamiti, Miyamoto Kauji, Odaka Tokashi, Nakao Mahoto, *Biochem. J.*, 48, 685 (1960).
76. Tenforde T., *Adv. Biol. Med. Phys.*, 13, 43 (1970).
77. Tomicki B., *J. Theor. Biol.*, (w druku).
78. Tosteson D. S., *Acta Physiol. Scand.*, 46, 19 (1959).
79. Tosteson D. S., Cook P., Gunn R. B., Wieth J. O., IV International Biophys. Congress, 7—14th August, 1972, Moscov, Proceedings, Vol. 3, str. 133.
80. Trauble H., *Naturwissenschaften*, 58, 277 (1971).
81. Vestergard-Bodind B., *Biochim. Biophys. Acta* 66, 93 (1963).
82. Vestergard-Bodind B., Hesseblo T., *Biochim. Biophys. Acta* 44, 117 (1960).
83. Vieira F. L., Sha'afi R. I., Solomon A. K., *J. Gen. Physiol.*, 55, 451 (1970).
84. Weiss L., *Inter. Rev. Cytol.*, 26, 63 (1969).
85. Wieth J. O., *J. Physiol.*, 207, 581 (1970).
86. Whittam R., The Transport and Diffusion in Red Blood Cells., E. Arnold, London, 1964.
87. Wolkensztejn M. W., Biologia molekularna, PWN, Warszawa, 1969, (tłumaczenie z rosyj.) str. 197.
88. Zipursky A., Israels L. G., *Nature*, 189, 1013 (1961).

http://rcin.org.pl

KOMUNIKAT

We wrześniu 1975 roku odbędzie się w Gdańsku XI Statutowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologicznego.

Temat Zjazdu: „Komórkowa geneza składników i komórkowe uwarunkowanie funkcji osocza krwi — patofizjologia i klinika". „Leczenie rozrostowych chorób układu krwiotwórczego".

Tradycyjnie jeden dzień Zjazdu poświęcony będzie zagadnieniom transfuzjologii.

W czasie Zjazdu odbędzie się Walne Zebranie Towarzystwa.

Przewodniczącym XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Hematologicznego jest Prof. dr Mieczysław Gamski, Kierownik III Kliniki Chorób Wewnętrznych AM w Gdańsku, ul. Kieturakisa 80-742 Gdańsk

Przewodniczący Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Hematologicznego
(—) Hugon Kowarzyk

http://rcin.org.pl

SPIS TREŚCI

M. Kochman, A. Dżugaj — Wybrane zagadnienia ewolucji i ontogenzy niektórych białek oraz izoenzymów. 499
Z. Kiliańska, L. Kłyszejko-Stefanowicz — Biologiczna rola białek niehistonowych chromatyny 533
M. Sarnecka-Keller — Makrocykliczne antybiotyki jako jonofory jednowartościowych kationów 559
J. Gomułkiewicz — Przenikanie anionów do erytrocytów 577
Komunikat 593

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1973

ARTICLES IN POLISH

Volume 19 **Number 4**

M. Kochman, A. Dżugaj — Ontogeny and Filogeny of Some Proteins and Isozymes (Inst. Biochem. Biophys., Medical School, Wrocław) 499
Z. Kiliańska, L. Kłyszejko-Stefanowicz — Biological Role of Nonhistone Proteins of Chromatin (Inst. Biochem. Physiol., University of Łódź, Łódź) 533
M. Sarnecka-Keller — Macrocyklic Antibiotics as Ionophores of Monovalent Cations (Inst. Molecular Biol., Jagiellonian University, Kraków) . . . 559
J. Gomułkiewicz — Permeation of Anions into Erythrocytes (Inst. Plant Biol. Biophys., School of Argiculture, Wrocław) 577
Communication 593

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

Redakcja zastrzega sobie możność skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

Piśmiennictwo: W artykule powinny być cytowane prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawianą dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postępach Biochemii". Należy stosować numerowanie prac w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem będzie obejmował prace opatrzone kolejnymi numerami ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), **276**, (1) np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **247**, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a), inicjały autor(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydawania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), Enzymes, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co, London;

Grant J. K., (1969) w Essays in Biochemistry, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58, Academic Press, London

Załączniki: Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egzemplarzach na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze stronicy ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk winny jasno opisywać ich treść. Należy zaznaczyć z jakich (jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny tj. wykresy, rysunki, schematy, lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: △ □ ○ ▲ ■ ● Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra" i „dół" (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku podejmuje wy-

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów aby zabezpieczyć maszynopisy i ilustracje przed pogięciem.

http://rcin.org.pl

Cena 20 zł

SPIS TREŚCI

M. Kochman, A. Dżugaj — Wybrane zagadnienia ewolucji i ontogenezy niektórych białek oraz izoenzymów 499
Z. Kiliańska, L. Kłyszejko-Stefanowicz — Biologiczna rola białek niehistonowych chromatyny 533
M. Sarnecka-Keller — Makrocykliczne antybiotyki jako jonofory jednowartościowych kationów 559
J. Gomułkiewicz — Przenikanie anionów do erytrocytów 577
Komunikat 593

Post. Bioch. T. 10 nr 4 s. 497—596 Warszawa 1973
Indeks 37144

http://rcin.org.pl