

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

**1974**

**tom 20**

**nr 4**

**KWARTALNIK**

PSTBAH 20(4)  
357-524 (1974)

<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 „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiedzialni są za prawdziwość 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 dodatkowe odbitki (płatne) 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 okładowa 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), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

**Strona 2 i następane** 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 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 doraznie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z POMOCĄ FINANSOWĄ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 4  
tom XX  
zeszyt 4

KWARTALNIK  
PSTBAH 20 (4) 357-524 (1974)

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. Pawelkiewicz (Poznań)*

REDAKTOR NACZELNY  
Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI  
Małgorzata Landman

## KOMITET REDAKCYJNY

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

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1974

Nakład 2250 (2120+130)	Oddano do składania 16.VII.1974 r.
Ark. wyd. 12,75, druk. 10,5	Podpisano do druku w listopadzie 1974 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w listopadzie 1974 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1087/74 W-121.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

## Biochemia polska i jej reprezentacje

Oceniając rozwój biochemii nie można pominąć warunków w jakich powstawała, a zwłaszcza ludzi którzy ją budowali. Na przełomie XVIII-go stulecia jednym z jej budowniczych był wielki nasz chemik i lekarz Jędrzej Śniadecki profesor Uniwersytetu Wileńskiego. „Dwa są fenomena ożywionemu światu właściwe, to jest organizacja i życie. Obadwa lepiej się czuć, niżeli opisać dają.... Życie to w całym ożywionym świecie zależy na wzroście i doskonaleniu się organizowanych jestestw przez przybieranie sobie i wyrabianie szczególne ciał otaczających...” Tak pisał przed 170 laty w swojej pięknej książce „Teoryja jestestw organicznych”, tłumaczonej na język francuski, niemiecki i rosyjski. Można by dziś jeszcze podpisać się pod wielu wywodami podanymi w „Teoryi jestestw”.

Śniadecki był wielkim zwolennikiem Antoniego Wawrzyńca Lavoisier'a, słusznie nazywanego ojcem biochemii. Lavoisier w latach 1770—80 skutecznie zwalczał naukę Stahla o flogistonie, udowadniając że do podtrzymania życia konieczny jest stały dopływ tlenu. On pierwszy zwrócił uwagę na podobieństwo procesu oddychania i spalania.

Idąc w ślady Lavoisiera Śniadecki już w 1797 roku, w programie wykładów, zapowiada że „naukę flogistonu wytłumaczy i jak rozumie, niechybnie zbije. Pokaże przy tym, jak i oddychanie zwierząt podobne jest zupełnie paleniu się ciał i jak stanowi najistotniejsze ciepła zwierzęcego źródło”.

Śniadecki pracował w ówczesnym Uniwersytecie Wileńskim do 1822 roku jako chemik i parę jeszcze lat jako lekarz, głosząc śmiało wówczas poglądy o jedności materii nieożywionej i materii świata żywego, poprzez nieustanną przemianę materii.

Zmarł w 1838 roku w Wilnie.

W połowie wieku XIX Justus von Liebig publikuje dwa dzieła, stanowiące historyczny fundament biochemii. W roku 1840 ukazuje się jego „Chemia z zastosowaniem do rolnictwa i fizjologii”, w 1842 roku „Chemia organiczna w zastosowaniu do zoofizjologii i patologii”. Tłumaczone na wiele języków, ogłaszane nawet w ówczesnej prasie codziennej, wpłynęły one na kształtowanie się wśród przyrodników, a zwłaszcza lekarzy i rolników, nowych poglądów na temat zagadki życia i przyczyny wielu schorzeń ludzi, zwierząt i roślin. Pierwsza z tych książek została wydana po polsku w cztery, a następna już w dwa lata po opublikowaniu oryginału, świadcząc na jak chłonny grunt natrafiały one w naszym kraju.

Utworzenie pierwszego Zakładu Chemii Fizjologicznej przypisuje się Feliksowi Hoppe-Seylerowi, profesorowi chemii Uniwersytetu w Stras-

bourgu w roku 1872. Już w 1864 roku na Wydziale Medycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego kreowano Zakład Chemii Patologicznej, a na kierownika powołano docenta Aleksandra Stopczyńskiego, mianowanego w 1869 r. profesorem chemii patologicznej. W 1873 roku Zakład ten przekształcono w Katedrę Chemii Lekarskiej, którą prof. Stopczyński prowadził do 1906 roku. Prawie równolegle rozwijał się podobny zakład w Szkole Głównej w Warszawie przekształconej później w Uniwersytet. Wykładał tam od 1864 roku Herman Fudakowski (1834—1878). Był on pierwszym w Polsce profesorem chemii fizjologicznej.

Trzecim Polakiem, który w tych czasach wykładał chemię fizjologiczną był Marcelli Nencki. Lecz działo się to w Bernie w Szwajcarii, gdzie w 1877 r. dla 30-letniego wówczas Nenckiego utworzono katedrę chemii fizjologicznej w tamtejszym Uniwersytecie. W 1891 r. Nencki przeniósł się do Petersburga, gdzie wspólnie z I. P. Pawłowem zorganizował Instytut Medycyny Eksperymentalnej i był w nim kierownikiem Działu Chemii. Choć całe życie pracował on na obczyźnie (zmarł w 1901 r.) utrzymywał stałe kontakty naukowe z uczonymi w kraju. Szczególnie owocna okazała się w skutkach prowadzona na odległość współpraca Nenckiego z Leonem Marchlewskim z Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pierwszy badał strukturę chemiczną i produkty rozpadu hemoglobiny, drugi chlorofilu. Z produktów rozpadu tych związków wyodrębnili oni hemopiroł wskazując na pokrewieństwo chemiczne barwnika krwi i barwnika roślin.

W okresie międzywojennym biochemia polska zaczęła rozwijać się intensywnie.

Zakłady biochemiczne, zwane zresztą najczęściej zakładami chemii fizjologicznej lub lekarskiej oraz chemii rolnej powstały na Wydziałach Lekarskich i Rolnych pięciu istniejących wówczas Uniwersytetów, w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, w Akademii Medycyny Weterynaryjnej oraz w Państwowym Zakładzie Higieny. Prace badawcze z dziedziny biochemii prowadzono też w niektórych uniwersyteckich katedrach fizjologii i chemii. Swoją poczesną pozycję w biochemii światowej zawdzięczała biochemia polska ośrodkom w Krakowie, Lwowie i Warszawie.

W Krakowie kontynuował badania Leon Marchlewski zajmując się budową i strukturą przestrzenną cukrów.

We Lwowie Jakub Karol Parnas stworzył wybitną szkołę znaną biochemii światowej z badań nad glikolizą i udziałem w niej związków fosforowych. Tam też już w latach trzydziestych zaczęto w badaniach biochemicznych stosować związki znakowane radioaktywnymi izotopami.

W Warszawie Stanisław Przyłęcki rozwinął badania t.zw. sympleksów stając się jednym z pierwszych, którzy podjęli prace nad białkami złożonymi. W Warszawie również pracował Kazimierz Białaszewicz, pierwszy w Polsce profesor fizjologii zwierząt; badacz o szerokim wachlarzu zainteresowań, obejmujących przede wszystkim zagadnienia przemiany materii i energii w tkankach różnych zwierząt. On to wraz z gronem innych

badaczy z kilku pracowni istniejących przy Towarzystwie Naukowym Warszawskim utworzył w 1918 roku Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego, który w okresie międzywojennym stał się nie tylko pierwszą lecz i największą i najlepiej wyposażoną placówką biologiczną w Polsce.

Podczas II Wojny Światowej zakłady biochemiczne poszły w rozsypkę, a ich wyposażenie uległo zniszczeniu lub zostało rozgrabione. J. K. Parnas w czasie wojny zdołał się przenieść ze Lwowa do Moskwy, gdzie pracował i zmarł w 1949 r. K. Białaszewicz zmarł w Warszawie w 1943 r., a S. Przełęckiego stracili hitlerowcy podczas Powstania Warszawskiego. L. Marchlewski sterany okropnościami wojny zmarł w Krakowie w 1946 r.

Trud zorganizowania i uruchomienia ośrodków biochemicznych podjęli po wyzwoleniu nieliczni, którzy przeżyli okupację. Już w 1945 r. powstały pierwsze zakłady chemii fizjologicznej i biochemii w reaktywowanych lub nowokreowanych przez P.R.L. uczelniach. W latach późniejszych powstały zakłady w uniwersytetach, wyższych szkołach rolniczych i pedagogicznych. Niektóre z tych zakładów rozwinęły się następnie w uczelnie lub międzyuczelniane instytuty biochemii i biologii molekularnej. Specjalizację jednak w zakresie biochemii wprowadzono znacznie później, bo dopiero w roku 1958 i początkowo tylko w Uniwersytetach Łódzkim i Warszawskim.

W 1946 r. utworzono też Zakład Biochemii w reaktywowanym właśnie Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego (od 1952 r. Instytut Polskiej Akademii Nauk).

Szybko postępująca specjalizacja i rozwój stosowanych dyscyplin przyrodniczych, a zwłaszcza w dziedzinach medycyny i rolnictwa sprawiły, że również w wielu instytutach resortowych zaczęły powstawać zakłady biochemii. Niektóre z nich szybko osiągnęły poważną pozycję w życiu naukowym.

W 1955 r. kreowany został Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, który w krótkim czasie rozwinął się w największą i najlepiej wyposażoną placówkę biochemiczną w Polsce.

Biochemia wyrastając z różnych dyscyplin biologicznych przez wiele lat zachowywała z nimi ścisłą więź. I tak Marceli Nencki swój słynny odczyt o zadaniach chemii biologicznej przedstawił na Zjeździe Lekarzy i Przyrodników (1900 r.). Ale i później prace biochemiczne przedstawiano bądź na zjazdach Przyrodników i Lekarzy, bądź Chemików czy Fizjologów. Na przedwojennych i wczesnych powojennych listach członków Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego znaleźć można nazwiska wielu biochemików. Jeszcze jednak w późnych latach czterdziestych i na początku pięćdziesiątych biochemiczna społeczność nie miała swojej organizacji.

W konsekwencji inicjatyw wysuniętych podczas dyskusji na I Kongresie Nauki Polskiej w 1951 r. już w roku następnym powołano przy radzie naukowej Ministerstwa Zdrowia Komisję Biochemiczną z Tadeuszem Baranowskim na czele. W tymże 1952 r. rozszerzono zasięg i kompetencje

Komisji przez utworzenie pod auspicjami Polskiej Akademii Nauk Komitetu Biochemicznego i Biofizycznego z Józefem Hellerem na czele. Zadania Komitetu nie były łatwe. Należało bowiem koordynować współpracę między resortami, inicjować i subsydiować prace badawcze, organizować sympozja oraz reprezentować biochemię polską na arenie międzynarodowej. Niemalym osiągnięciem Komitetu było uruchomienie dwu czasopism: w 1953 r. zaczęło wychodzić czasopismo przeglądowe *Postępy Biochemii*, w roku następnym czasopismo publikujące prace doświadczalne *Acta Biochimica Polonica*. *Postępy Biochemii* redagował początkowo Józef Heller, a następnie przez szereg lat Irena Chmielewska; *Acta Biochimica Polonica* zaś redagował Włodzimierz Mozołowski, a później Irena Mochnacka. Obydwa nasze czasopisma zyskały sobie popularność i uznanie nie tylko w kraju.

Pierwsze sympozjum biochemiczne na temat organicznych związków fosforowych odbyło się w Łodzi w 1952 r. z udziałem około 70 osób z różnych ośrodków. Miało ono charakter informacyjny o osiągnięciach Biochemii Światowej. Późniejsze konferencje miały charakter roboczy, na których między innymi nakreślano problemy, których badania należało podjąć.

Rozwój biochemii, jej znaczenie dla rozwoju wszystkich właściwie dyscyplin biologicznych stworzyły konieczność wyłonienia społecznej reprezentacji coraz liczniejszej kadry biochemików. W roku 1957 grono biochemików podczas posiedzenia w Poznaniu podjęło inicjatywę zorganizowania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Byli to: Tadeusz Baranowski, Kazimierz Bassalik, Irena Chmielewska, Antoni Dmochowski, Józef Duda, Bronisław Filipowicz, Józef Heller, Tadeusz Korzybski, Jerzy Meduski, Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozołowski, Włodzimierz Niemierko, Janina Opieńska-Blauth, Włodzimierz Ostrowski, Jerzy Pawełkiewicz, Ignacy Reifer, Ryszard Wiktor Schram, Zdzisław Stolzmann, Bolesław Skarżyński.

Z pośród zebranych wyłoniono Tymczasowy Zarząd w skład którego weszli: Włodzimierz Niemierko — przewodniczący (Warszawa), Bronisław Filipowicz (Łódź), Tadeusz Korzybski (Warszawa), Ignacy Reifer (Warszawa) i Zdzisław Stolzmann (Poznań).

Opracowano statut Towarzystwa, wpisano je w rejestr Polskich Towarzystw Naukowych i przyjęto około 200 członków, a w grudniu 1958 r. zwołano I Walne Zebranie. Pierwszym Prezesem Towarzystwa został wybrany Bolesław Skarżyński z Krakowa, a Wiceprezesem Irena Chmielewska z Warszawy.

Pierwszą dwuletnią kadencję Zarządu poświęcono głównie sprawom organizacyjnym. Z pomocą Wydziału II PAN uregulowano sprawy finansowe Towarzystwa. Część funduszków przeznaczono na stypendia, na krótkoterminowe wyjazdy szkoleniowe do ośrodków krajowych. Uzyskano, skromny co prawda, lecz własny lokal w Warszawie przy ulicy Freta 16,



w domu w którym przed laty urodziła się Maria Skłodowska. Już w okresie I kadencji powstały oddziały Towarzystwa w Gdańsku, Krakowie, Lublinie, Łodzi, Poznaniu, Szczecinie, Warszawie i Wrocławiu, a w roku 1960 w Białymstoku. Jako główne zadanie oddziałów określano organizowanie dyskusji naukowych z różnych dziedzin biochemii i dziedzin pokrewnych.

Kwartalnik *Postępy Biochemii* stał się z czasem organem Towarzystwa, powiększono jego objętość. Ufundowano doroczną nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za najlepszy artykuł ogłoszony w *Postęпах Biochemii*.

W 1960 roku w Białymstoku zorganizowano I Sympozjum Biochemiczne Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na temat enzymów oddechowych, rozdzielania i oczyszczania białek oraz przemian aminokwasów.

Należy podkreślić, że w czasie dwuletniej kadencji pierwszy Zarząd wykonał olbrzymią pracę, stwarzając szerokie możliwości dalszej działalności i rozwoju Towarzystwa. Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wzrosła już do 378 osób.

Wysiłki Zarządu Głównego należycie oceniono na II Walnym Zebraniu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, które zwołano w Warszawie w lutym 1961 roku. Prezesem wybrano Bronisława Filipowicza (Łódź), Wiceprezesem Kazimierza Zakrzewskiego (Warszawa).

W okresie drugiej kadencji rozpoczęto wydawanie *Monografii Biochemicznych*, sporządzono kartotekę biochemików polskich, powołano Komisję do uporządkowania nomenklatury biochemicznej, której przewodniczył Tadeusz Korzybski. Zorganizowano po raz pierwszy Kurs Podstaw Biochemii, na którym w ciągu trzech miesięcy wykładowcy z terenu całej Polski przedstawili najnowsze osiągnięcia z wszystkich niemal dziedzin biochemii. Kursy tego rodzaju, często przeznaczone dla biologów różnych specjalności zatrudnionych w lecznictwie, oświacie i przemyśle organizowało Towarzystwo później wielokrotnie, zastępując, w pewnym stopniu, dotkliwie odczuwany brak szkolenia podyplomowego z biochemii.

Staraniem Towarzystwa i Komitetu Biochemicznego zorganizowano w 1961 r. wyjazd na V Międzynarodowy Kongres Biochemiczny w Moskwie dla około 100 osób z około 50-ciu komunikatami. Był to pierwszy tak liczny występ polskich biochemików na terenie międzynarodowym i możliwość osobistego zetknięcia się ze specjalistami z innych krajów.

W 1962 roku Polskie Towarzystwo Biochemiczne zorganizowało w Poznaniu II Sympozjum na temat „Biochemia krwinki czerwonej”, w którym uczestniczyło 300 zainteresowanych. W tymże roku powstał Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Olsztynie.

W początkach 1963 roku dotknął Towarzystwo niespodziewany bolesny cios; w pełni działalności i pomysłów twórczych odszedł od nas prof. Bolesław Skarżyński, jeden z inicjatorów i założycieli Towarzystwa — pierwszy jego prezes. Idąc w ślady swego wielkiego nauczyciela Leona Marchlewskiego, Skarżyński przez prawie 40 lat doszukiwał się ładu i prostoty

w chemicznym podłożu zjawisk życiowych. Z upodobania muzyk, historyk i pełen swady mówca nadawał swoim wystąpieniom i publikacjom swoisty ton i pełen uroku wdzięk. Strata była tym boleśniejsza, że nastąpiła prawie w przededniu otwarcia pierwszego Polskiego Kongresu Biochemii, którego był jednym z inicjatorów i Jego referat miał zainaugurować rozpoczęcie obrad. Dla uczczenia jego pamięci postanowiono doroczną nagrodę *Postępów Biochemii* nazwać nagrodą imienia Bolesława Skarżyńskiego. W tymże roku ustanowiono nową doroczną nagrodę imienia Jakuba Karola Parnasa za najlepszą opublikowaną pracę eksperymentalną wykonaną w kraju.

I Krajowy Kongres Biochemii zorganizowano 4—7 września 1963 roku w Łodzi. Był to rzeczywiście pierwszy na szerszą skalę przegląd ówczesnego, powojennego już dorobku polskiej biochemii. Liczba uczestników przekroczyła 600 osób. Wygłoszono około 450 komunikatów z eksperymentalnych prac. Obradowano w 9-ciu sekcjach. Zorganizowano 5 sympozjów na temat utleniania biologicznych, biochemii ewolucyjnej i porównawczej, żywienia i żywności, lipidów i alkaloidów.

III Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbyło się w czasie Kongresu. Prezesem wybrano Kazimierza Zakrzewskiego z Warszawy, Wiceprezesem Macieja Wiewiórowskiego z Poznania. Liczba członków Towarzystwa wynosiła wówczas 534 osoby.

W 1964 r. powstał jedenasty z kolei oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na Górnym Śląsku.

W okresie III Kadencji odbyły się dwa sympozja. Jedno z nich na temat „Struktura i funkcja enzymów” odbyło się w październiku 1964 roku w Kazimierzu. Wygłoszono 54 komunikatów. Udział w obradach wzięło około 250 uczestników.

Następne III sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbyło się w czerwcu 1965 roku w Gdańsku. Tematem była „Biochemia lipidów”. Zgłoszono około 130 doniesień, w tym większość na tematy wolne, a w obradach uczestniczyło około 200 osób.

W okresie tego zjazdu odbyło się w Gdańsku IV Walne Zebranie członków, które nadało Włodzimierzowi Mozołowskiemu (Gdańsk) godność Członka Honorowego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w uznaniu Jego zasług dla rozwoju polskiej biochemii. Przeprowadzono wybory. Na Prezesa ponownie wybrano Kazimierza Zakrzewskiego, na Wiceprezesa Zofię Zielińską (Warszawa). Jednym z głównych zadań Zarządu Głównego tej kadencji miało stać się zorganizowanie w Polsce III Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS).

Federacja ta powstała w celu ułatwienia osobistych kontaktów i porozumienia się biochemików obszaru europejskiego. Przedstawiciel Polskiego Towarzystwa Biochemicznego już w r. 1963 uczestniczył we wstępnych rozmowach na ten temat i Polskie Towarzystwo jest jednym z towarzystw założycieli Federacji.

W 1965 r. Rada FEBS powierzyła Polskiemu Towarzystwu Biochemicznemu zorganizowanie III Zjazdu FEBS w Polsce. Zgodnie ze statutem FEBS Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przejął na ten okres funkcję prezydenta Federacji.

Po wielomiesięcznej ofiarnej pracy bardzo wielu członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i po pokonaniu wielu trudności III Zjazd FEBS odbył się w Warszawie w dniach 4—7 kwietnia 1966. Był to największy z urządzanych do tego czasu zjazdów naukowych w Polsce. Biochemię zagraniczną reprezentowało ponad 1000 biochemików z 28 krajów całego świata, wśród nich 5 laureatów Nagrody Nobla. W obradach brała udział prawie cała kadra biochemików polskich, około 550 osób. Była to dla nich, zwłaszcza dla młodych biochemików, okazja przedstawienia swoich prac na forum międzynarodowym, możliwość zapoznania się z aktualnymi osiągnięciami ośrodków zagranicznych i nawiązania bezpośrednich osobistych kontaktów.

III Zjazd Federacji zakończył się pełnym sukcesem naukowym. Trudno jednak kilku lub kilkunastu zdaniemi skwitować wyniki czterodniowych obrad, na których wygłoszono 564 doniesienia, a na zorganizowanych sympozjach i kolokwiałach przedstawiono 36 referatów z różnych dziedzin biochemii. Staraniem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego teksty referatów wydano *in extenso* we współpracy Państwowego Wydawnictwa Naukowego i Academic Press w trzech tomach pt. „Genetic Elements” pod redakcją D. Shugara, „Mitochondria” — red. E. C. Slater, Z. Kaniuga i L. Wojtczak, „Blood Platelets” — red. E. Kowalski i S. Niewiarowski.

Z innych form działalności Towarzystwa w IV Kadencji, to kontynuowanie kursów „Podstaw Biochemii”. Zorganizowano je w województwie warszawskim i na terenie Trójmiasta. W województwie gdańskim kursy uzupełniono ponadto wykładami na temat „Biochemia wirusów” i „Dziedziczność i wady wrodzone”. Na Dolnym Śląsku biochemicy i elektrotechnicy omawiali możliwości wytwarzania specjalistycznej biochemicznej aparatury naukowej, a w Krakowie zorganizowano spotkanie fotobiologów.

Komisja Nomenklatury Polskiego Towarzystwa Biochemicznego opracowała pierwsze zasady polskiej nomenklatury biochemicznej pod kierunkiem Tadeusza Korzybskiego i wydała w 1967 roku polską wersję międzynarodowego nazewnictwa enzymów zatwierdzonego przez międzynarodową Unię Biochemiczną.

We wrześniu 1967 roku w Krakowie odbyło się V Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego poświęcone głównie zagadnieniom metabolizmu siarki i enzymów nukleolitycznych, oraz V Walne Zebranie Towarzystwa. Nadało ono godność członków honorowych Józefowi Helerowi i Włodzimierzowi Niemierce z Warszawy za wybitne zasługi dla rozwoju Towarzystwa. Na Prezesa wybrano Zofię Zielińską, a Wiceprezesem Stefana Angielskiego (Gdańsk). Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wzrosła do 797 osób.

Nadal kontynuowano akcję szkoleniową. W Warszawie, Szczecinie, Toruniu prowadzono kursy dla nauczycieli biologii. W Toruniu utworzono dwunasty Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W Krakowie, Poznaniu i w Warszawie zorganizowano konferencje robocze na temat struktury białek, w Poznaniu i Lublinie na tematy związane z zagadnieniami dotyczącymi fotobiologii, w Łodzi na temat biochemii krwi czerwonej, a na Górnym Śląsku zainicjowano dyskusję na temat nauki i etyki w medycynie.

Stale rozszerzająca się tematyka dorocznych sympozjów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i rosnące nimi zainteresowanie skłoniły Zarząd Główny do przekształcenia ich w doroczne zjazdy biochemiczne, zachowując kolejną numerację. Pierwszy z tych zjazdów jako VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbył się w Olsztynie w lipcu 1968 r. (przedstawiono 135 komunikatów). W jego ramach zorganizowano subsydiowane przez UNESCO Międzynarodowe Sympozjum na temat: „Synteza białka, struktura i funkcja makromolekuł i elementów subkomórkowych”. Teksty referatów wydano w publikacji p.t. „Protein Biosynthesis” pod redakcją P. Szafrąńskiego, S. Klity i P. Masłowskiego. Liczba uczestników przekroczyła 400, w tym 63 specjalistów z zagranicy. Wygłosili oni 17 referatów programowych i kilkanaście komunikatów.

W dniach 18—20 września 1969 r. we Wrocławiu odbył się VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W programie Zjazdu było sympozjum na temat „Peptydy i peptydazy” oraz liczne sekcje poświęcone tematom wolnym. W Zjeździe wzięło udział około 550 uczestników, w tym 34 z zagranicy; przedstawiono 240 prac.

W okresie Zjazdu odbyło się VI Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i przeprowadzono wybory. Prezesem została ponownie Zofia Zielińska, Wiceprezesem Tomasz Borkowski z Lublina. Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego osiągnęła 855.

We wszystkich prawie Oddziałach Towarzystwa urządzono kilkanaście kursów metodycznych na temat sączenia molekularnego. Dla nauczycieli Trójmiasta urządzono kurs pt. „Molekularne podstawy biologii”. Oddział Białostocki wspólnie z Oddziałem Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej przeprowadził szkolenie w zakresie technik stosowanych w biochemii klinicznej.

W maju, w dniach 28—30, 1970 roku VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zwołano w Szczecinie. Oprócz Sesji z doniesieniami z różnych dziedzin biochemii odbyły się dwa sympozja na temat „Enzymy” i „Utlenianie biologiczne”. W obradach brało udział około 550 uczestników, przedyskutowano ponad 180 prac.

W dniach 7—8 maja 1971 r. Oddział Łódzki Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, wspólnie z Komisją Ultrastruktury PAN, zorganizował dwudniową konferencję na temat „Fracje subkomórkowe a składniki strukturalne komórki”. Było to pierwsze w Polsce spotkanie biochemików

i morfologów. Wygłoszone referaty zostały *in extenso* wydane pod wymienionym wyżej tytułem.

Doroczny IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zwołano do Katowic w dniach 8—11 września 1971 r. Zorganizowano dwa sympozja na temat „Struktura i funkcja genomu” i „Biochemia środowiskowa”. Na Zjazd nadesłano około 300 komunikatów, a uczestniczyło w nim około 550 osób.

W czasie Zjazdu odbyło się VII Walne Zebranie, które nadało godność Członka Honorowego Michałowi Laskowskiemu (Buffalo, USA), Janinie Opieńskiej-Blauth (Lublin), Antoniemu Dmochowskiemu (Łódź), Bronisławowi Filipowiczowi (Łódź) i Tadeuszowi Baranowskiemu (Wrocław). Liczba członków Towarzystwa wzrosła do 953 osób.

W przeprowadzonych wyborach Prezesem został urzędujący obecnie Tomasz Borkowski, Wiceprezesem Antoni Dancewicz z Warszawy.

Doroczny X Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbył się w dniach 21—23 września 1972 roku w Poznaniu. W obradach udział wzięło około 600 osób z kraju i 20 uczestników z różnych ośrodków zagranicznych.

Obrady toczyły się w ramach dwóch sympozjów na temat „Struktura i funkcja kwasów nukleinowych” oraz „Własności molekuly białkowej”. Zarówno w okresie tego Zjazdu, jak i wielu poprzednich zorganizowano wystawy książki, aparatury i odczynników firm krajowych i zagranicznych. Często ilustrowano wykładami bądź pokazami użytkowanie wystawianej aparatury.

W 1973 roku odbył się w Białymstoku, w dniach 10—12 września, kolejny XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Na Zjazd przybyło około 550 uczestników. Zgłoszono ponad 280 doniesień. W ramach Zjazdu zorganizowano dwa sympozja pt. „Biochemia Rolnictwu” i „Właściwości błon biologicznych” oraz konferencję na temat „Nauczanie biochemii i kształcenie biochemików”.

XII Zjazd Towarzystwa zwołano do Warszawy w dniach 4—7 września 1974. Tematyka sympozjów brzmi: Sympozjum I — „Białka chromatyny” i Sympozjum II — „Kwasy nukleinowe, struktura i funkcja”. Zgłoszono łącznie 12 referatów i 250 komunikatów.

Omawiając tę żywą działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w kraju, nie można nie wspomnieć o trudnościach ograniczających nasz udział w zagranicznych zjazdach. Jak powiedzieliśmy w V Międzynarodowym Kongresie w Moskwie w 1961 roku zorganizowanym przez Międzynarodową Unię Biochemiczną (I.U.B.) uczestniczyło około 100 polskich biochemików. W trzy lata później zaś w VI Międzynarodowym Kongresie Biochemii w Nowym Jorku dwadzieścia kilka osób, zaś na następne Kongresy I.U.B. wysłanie reprezentatywnych delegacji okazało się niemożliwe, ale w 1973 w VIII Kongresie wzięło jednak udział 40 osób z kraju. Niestety delegacje polskie na Zjazdy FEBS (odbywające się co roku w okresach

między Kongresem I.U.B.) są wciąż niezadawalająco małe. Jedynym wyjątkiem był IX Zjazd FEBS w Budapeszcie (1974), w którym wzięło aktywny udział ponad 130 biochemików z P.R.L.

Od chwili powstania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego liczba jego członków wzrosła pięciokrotnie osiągając 1038 osób. Oddziały Towarzystwa działają obecnie we wszystkich większych ośrodkach, w których znajdują się szkoły wyższe i instytuty naukowo-badawcze (patrz tabela).

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
w dniu 30 czerwca 1974

Oddział (siedziba)	Liczba członków
Białystok	40
Gdańsk	44
Toruń	18
Katowice	53
Kraków	69
Lublin	62
Łódź	108
Olsztyn	38
Poznań	98
Szczecin	38
Wrocław	92
Warszawa	372
Zagraniczni	6
Ogółem	1038

W ciągu 15 lat swojej działalności Polskie Towarzystwo Biochemiczne stało się jednym z największych towarzystw naukowych w Polsce. Na zebraniach swoich i dorocznych zjazdach dąży do tworzenia form do dyskusji naukowej otwartej nie tylko dla biochemików, lecz również dla specjalistów z dziedzin pokrewnych.

*Bronisław Filipowicz*

KRZYSZTOF KRZYSTYNIAK \*

## Fizjologiczna rola cyklicznej fotofosforylacji

### Physiological Role of Cyclic Photophosphorylation

#### I. Cykliczny transport elektronów i fotofosforylacja

Fotofosforylację sprzężoną z cyklicznym transportem elektronów wykryto w 1954 roku (1, 2). Cykliczna fosforylacja zachodzi w warunkach anaerobowych lub w obecności DCMU, przy czym nie powstają równoważniki redukcyjne. Drugim typem fosforylacji fotosyntetycznej, wykrytym w 1957 roku i nazwanym później fosforylacją niecykliczną (3), jest synteza ATP sprzężona z niecyklicznym transportem elektronów, któremu towarzyszy fotoliza wody, wydzielanie tlenu i tworzenie NADPH<sub>2</sub>.

Dalsze badania procesu fotofosforylacji stały się możliwe dopiero po uzyskaniu preparatu izolowanych chloroplastów o wysokiej zdolności włączania CO<sub>2</sub> (4, 5). Badania Arnona (6) a następnie innych autorów (7—10) wykazały, że istnieją stechiometryczne zależności pomiędzy wytwarzaniem ATP w niecyklicznej fosforylacji a wydzielaniem tlenu, pochodzącego z fotolizy wody jako donatora elektronów i redukcją NADP. Wstępne badania wykazały, że stosunek powstałego ATP do NADPH w procesie fosforylacji niecyklicznej wynosi 1 : 1, podczas gdy asymilacja 1 mola CO<sub>2</sub> zachodzi przy udziale 3 moli ATP i 2 moli NADPH (6). Wskazuje to, że niecykliczna fosforylacja, chociaż jest głównym źródłem energii dla procesu asymilacji, to jednak nie dostarcza całkowitej ilości ATP niezbędnej w procesie asymilacji dwutlenku węgla.

W związku z istnieniem cyklicznego i niecyklicznego transportu elektronów sprzężonego odpowiednio z cykliczną i niecykliczną fosforylacją nasuwa się pytanie czy i w jakim stopniu zachodzi współdziałanie I i II układu fotosyntezy. Przyjęto, że cykliczny transport elektronów wymaga

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

Wykaz stosowanych skrótów: DCMU — 3-(3', 4'-dwuchlorofenylo)-1, 1-dwumetylomocznik; DCIP — 2, 6-dwuchlorofenyloindofenol; PMS — metylosiarczan N-metylofenazyliowy; TMPD — czterometylo-p-fenylenodwuamina; FMN — mononukleotyd flawinowy; NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego; NADPH — zredukowana forma NADP.

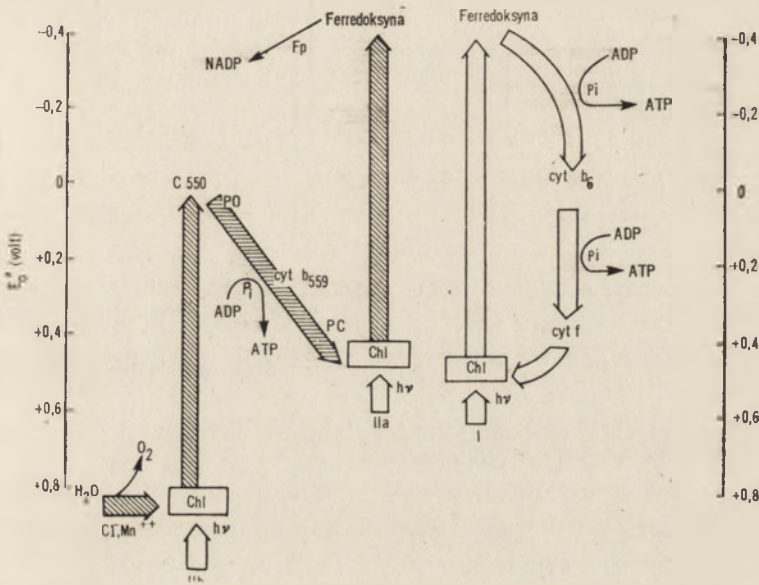
jedynie aktywacji barwników I fotoukładu pobudzonego światłem o długości fali około 700nm. Zespół barwników I fotoukładu jako główny składnik zawiera chlorofil a. W centrum fotochemicznym tego zespołu występuje składnik P-700 (11, 12). Składnikami układu przenoszącego elektrony w cyklicznym transporcie są: ferredoksyna, cytochromy  $b_6$  i f oraz plastocjanina (13 — 16). Z cząstek układu I fotosyntezy uzyskanych przez rozbięcie chloroplastów detergentami wyizolowano kompleks cytochromów  $b_6$  i f (17—19). Z fotoukładem I związany jest przypuszczalnie cytochrom  $b_{559\text{ HP}}$  charakteryzujący się wyższym potencjałem w stosunku do cytochromu  $b_{559\text{ LP}}$  występującego w układzie II fotosyntezy (20). Plastocjanina jest, jak się wydaje donatorem elektronów dla układu I fotosyntezy, na co wskazuje m.in. inhibicja fotoredukcji NADP spowodowana ekstrakcją plastocyaniny heptanem (21, 22). Stwierdzono również, że fotoredukcja NADP w obecności układu askorbinian — DCIP jako donatora elektronów oraz fotoutlenianie cytochromu f w cząstkach fotoukładu I zależą od obecności plastocyaniny (23).

Obecnie zasadnicze rozbieżności dotyczą poglądów na współzależność reakcji świetlnych i miejsc syntezy ATP w niecyklicznym transporcie elektronów. Zdaniem niektórych autorów (24—27), niecykliczny transport elektronów związany jest z aktywacją I i II układu fotosyntezy, przy czym postulują oni istnienie dwóch miejsc syntezy ATP. Przy takim założeniu stosunek P/2e, który wyraża rzeczywistą stechiometrię fotofosforylacji niecyklicznej i jest niezależny od stopnia stymulacji transportu elektronów przez ADP i fosforan (28, 29) powinien przybierać wartość 2. Tymczasem obserwowany stosunek P/2e jest bliski 1 lub przekracza nieco tę wartość (3,28,30—32). Natomiast w obecności askorbinianu jako donatora elektronów stosunek ten przyjmuje wartość zaledwie około 0,5. Obniżenie wydajności fosforylacji w obecności askorbinianu interpretowano początkowo ominięciem jednego z dwóch hipotetycznych miejsc syntezy ATP w fosforylacji niecyklicznej (33) lub stosowaniem preparatu chloroplastów o określonej niskiej wydajności fosforylacji (28). Ostatnio postuluje się, że obniżenie stosunku P/2e do wartości około 0,5 spowodowane jest redukcją sztucznych akceptorów elektronów w niecyklicznym transporcie w wyniku działania dysmutazy w układzie askorbinian — akceptory elektronów (34).

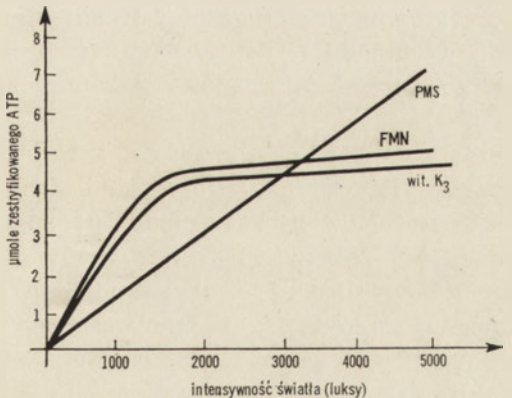
W odróżnieniu od powyższych poglądów przyjmujących współzależność I i II układu fotosyntezy,  $A\ r\ n\ o\ n$  i wsp. postulują całkowitą odrębność cyklicznego i niecyklicznego transportu elektronów (35—39) (Ryc. 1). Na podstawie wyliczonej wydajności fosforylacji  $A\ r\ n\ o\ n$  (30) zakłada istnienie tylko jednego miejsca sprzężenia na drodze niecyklicznego transportu elektronów, tzn., że redukcja 1 cząsteczki NADP sprzężona jest z syntezą 1 cząsteczki ATP. Natomiast na drodze cyklicznego transportu elektronów występują wg tego autora dwa miejsca syntezy ATP: jedno przy cytochromie  $b_6$  drugie przy cytochromie f (40). Wskazuje na to porównanie wy-



dajności fosforylacji w obecności PMS oraz w obecności FMN lub witaminy K<sub>3</sub> jako przenośników elektronów (Ryc. 2). Wyższa wydajność fosforylacji przebiegającej przy udziale FMN lub witaminy K<sub>3</sub>, przy niskich natężeniach światła, w porównaniu ze stopniem fosforylacji w układzie z PMS sugeruje istnienie przynajmniej dwóch miejsc sprzężenia fosforylacji w cyklicznym transporcie elektronów. Co więcej, proporcjonalnie wzrastająca wydajność fosforylacji wraz ze wzrostem intensywności światła w układzie z PMS sugeruje zmianę drogi przepływu elektronów w obrębie fotoukładu I. Prawdopodobnie PMS służy jako przenośnik w przepływie elektronów, przy czym następuje omińnięcie redukcji cytochromów (41). Na rycinach 4 i 5 przedstawiono schemat cyklicznej fosforylacji z udziałem PMS lub witaminy K<sub>3</sub> i FMN.

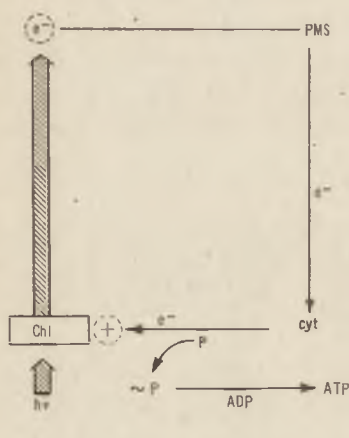


Ryc. 1. Schemat cyklicznego i niecyklicznego transportu elektronów (35)

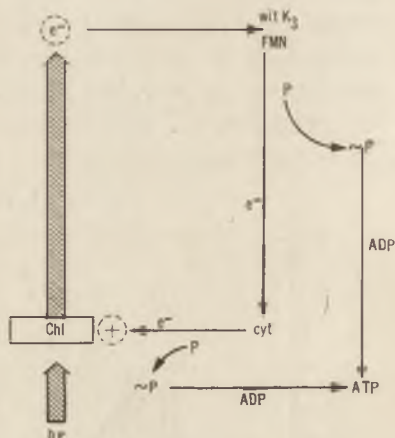


Ryc. 2. Wpływ intensywności światła na anaerobową cykliczną fotofosforylację (40)

Przy założeniu występowania tylko jednego miejsca syntezy ATP w niecyklicznym transporcie elektronów, zgodnie z postulatami Arnona (30), ilość ATP tworzonego w niecyklicznej fotofosforylacji jest niewystarczająca w procesie asymilacji dwutlenku węgla. Nasuwa się zatem przypuszczenie, że ATP powstały w cyklicznej fosforylacji może stanowić źródło „uzupełniającej” ilości ATP dla procesu włączania dwutlenku węgla.



**Ryc. 3.** Schemat cyklicznej fosforylacji z udziałem PMS (40)  
cyt — oznacza kompleksy cytochromów



**Ryc. 4.** Schemat cyklicznej fosforylacji z udziałem FMN lub witaminy K<sub>3</sub> (40)  
cyt — oznacza kompleksy cytochromów

## II. Udział cyklicznej fosforylacji w asymilacji CO<sub>2</sub>

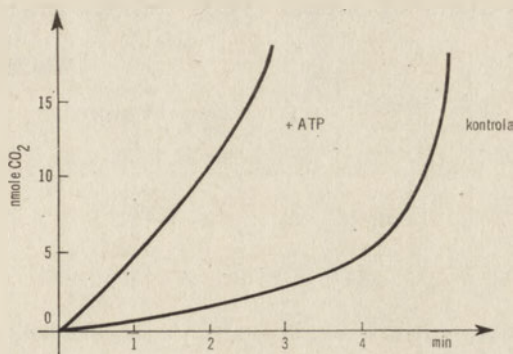
W badaniach nad wykazaniem źródła „dodatkowego” ATP niezbędnego w procesie asymilacji CO<sub>2</sub> (42) uzyskano dane potwierdzające postulowaną (6) rolę cyklicznej fosforylacji:

1) Dodanie ATP (Ryc. 5.) znacznie skraca okres opóźnienia włączania CO<sub>2</sub> obserwowanego w pierwszych minutach oświetlania chloroplastów światłem monochromatycznym o długości fali 664 nm, absorbowanym przez zespół barwników układu II fotosyntezy. Dodanie ATP powoduje jednocześnie wzrost zawartości fosforanów cukrów i obniżenie poziomu glicerofosforanu.

2) Okres opóźnienia asymilacji CO<sub>2</sub> może być skrócony przez preiluminację światłem monochromatycznym o długości fali około 720 nm, stymulującym jedynie cykliczną fosforylację lub przez dodanie fosforanów cukrów — np. rybozo-5-P, lub fruktozo-1,6-dwu-P.

3) Dodanie inhibitorów cyklicznej fosforylacji, takich jak antymycyna A lub oligomycyna powoduje obniżenie intensywności asymilacji CO<sub>2</sub> oraz zmiany w poziomie pośrednich produktów procesu asymilacji: obniżenie ilości fosforanów cukrów i podwyższenie zawartości glicerofosforanu. Jak wykazują dane przedstawione w tabeli 1, kierunek zmian procentowej za-

wartości pośrednich produktów asymilacji po podaniu antymycyny A jest odwrotny w porównaniu ze zmianami ilości glicerofosforanu i fosforanów cukrów po podaniu ATP. Dodanie ATP do preparatu zawierającego antymycynę A czterokrotnie zwiększa intensywność włączania dwutlenku węgla, przy czym procentowy skład pośrednich produktów asymilacji zostaje przywrócony do wartości identycznych jak w chloroplastach kontrolnych.



Ryc. 5. Wpływ ATP na okres opóźnienia asymilacji  $\text{CO}_2$  w chloroplastach oświetlanych światłem monochromatycznym 664nm (42)

Przedstawiony w tabeli 2 różny efekt działania inhibitorów cyklicznej oraz niecyklicznej fosforylacji sugeruje, że ATP produkowany w cyklicznej fosforylacji uzupełnia w fizjologicznych warunkach ATP powstały w procesie fotofosforylacji niecyklicznej i przez to decyduje o przemianie kwasu 3-P-glicerynowego w fosforany cukrów. Skład procentowy tych pośrednich produktów asymilacji zależy zatem od stosunku ATP/NADPH (42); selektywne hamowanie fosforylacji niecyklicznej (stosując DCMU) obniża ten stosunek, przy czym obserwuje się obniżenie poziomu glicerofosforanu oraz podwyższenie ilości fosforanów cukrów. Zastowanie inhibitorów fosforylacji cyklicznej, takich jak antymycyna A, oligomycyna lub salicylaldoksym daje efekt odwrotny.

Przedstawione dane (42) przemawiają za słusznością hipotezy występowania cyklicznej fosforylacji jako procesu endogennego, fizjologicznego. Sprawa ta jest jednak nadal problemem spornym dla wielu autorów (43—46). Jak już nadmieniano, cykliczny transport elektronów zachodzi w warunkach anaerobowych lub w obecności DCMU i towarzyszy mu powstawanie ATP, nie powstają natomiast równoważniki redukcyjne (40). Nie można tym samym określić cyklicznej fosforylacji szybkością utleniania lub redukcji egzogennych akceptorów czy donatorów elektronów, t.j. reakcji charakterystycznych dla fosforylacji niecyklicznej. W wyizolowanych chloroplastach tworzenie ATP sprzężone z cykliczną fosforylacją jest niewielkie i jest znacznie stymulowane przez sztuczne przenośniki elektronów, takie jak PMS (47), DCIP (48,49), witaminę  $\text{K}_3$  (40), TMPD (50), ferredoksynę (51) oraz FMN (40). Z uwagi na stosowanie pośrednich me-

tod oznaczania wydajności fosforylacji oraz rozbieżne wyniki oznaczenia stosunku ATP: NADPH w preparatach izolowanych chloroplastów, istnieją hipotezy odrzucające współdziałanie cyklicznej i niecyklicznej fosforylacji w procesie włączania dwutlenku węgla:

Tabela 1.

Odwroćenie wpływu antymycyny A na asymilację  $^{14}\text{CO}_2$  w chloroplastach przez dodanie ATP (42)

Dodano do kontroli	Wydajność asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ %	Włączanie $^{14}\text{CO}_2$	
		kw. 3-P-glicerynowy %	fosforany cukrów %
—	100	36	64
ATP (0,003M)	131	22	78
Antymycyna A	11	49	51
Antymycyna A, ATP	47	36	64

\* Miarą wydajności asymilacji określono stopień włączenia  $^{14}\text{CO}_2$  do pośrednich produktów asymilacji: glicerofosforanu i fosforanów cukrów.

Tabela 2.

Wpływ inhibitorów cyklicznej i niecyklicznej fosforylacji na poziom produktów asymilacji  $^{14}\text{CO}_2$  (42)

Inhibitor	Stężenie M	hamowanie włączenia $^{14}\text{CO}_2$ %	włączanie $^{14}\text{CO}_2$	
			kw. 3-P-glicerynowy %	fosforany cukrów %
Antymycyna A (inhibitor cyklicznej fosforylacji)	— $6 \times 10^{-6}$ $1,2 \times 10^{-6}$	0 14 27	21 45 46	79 55 54
DCMU (inhibitor niecyklicznej fosforylacji)	— $2,5 \times 10^{-7}$ $5 \times 10^{-7}$	0 32 64	31 14 13	69 86 87

1) Wysoki poziom fosforylacji *in vitro* w obecności sztucznych przenośników elektronów w atmosferze azotu uważany jest za artefakt, charakterystyczny dla wyizolowanych chloroplastów (45).

2) Stosunek ATP: NADPH dla niecyklicznej fosforylacji jest wyższy od jedności (52—56). Fosforylacja niecykliczna dostarczałaby więc całkowitej ilości ATP niezbędnego w procesie asymilacji dwutlenku węgla.

3) Obserwowana stymulacja karboksylacji związana z jednoczesnym hamowaniem fotofosforylacji sugeruje udział wysokoenergetycznych pośredników dostarczających dodatkowej ilości ATP niezbędnego w asymilacji  $\text{CO}_2$  (57—59).

4) Hamowanie przez DCMU indukowanej światłem fosforylacji i stymulacja redukcji  $\text{CO}_2$  po dodaniu ditiotretitolu sugeruje istnienie niezależ-

nej reakcji fotochemicznej. Byłby to proces tzw. „pseudocykliczny”, związany z redukcją tlenu i dostarczający uzupełniającej ilości ATP, niezbędnej dla redukcji CO<sub>2</sub>, w którym tlen odgrywałby rolę przenośnika elektronów (43,60). W wyniku pseudocyklicznego transportu elektronów redukowany jest chlorofil a<sub>1</sub>; proces ten wymaga udziału obydwu układów fotosyntezy ale wydzielany tlen jest jednocześnie pobierany w równoważnych ilościach (60).

Nowsze badania zaprzeczają hipotezie występowania cyklicznej fosforylacji jako artefaktu związanego z izolowaniem chloroplastów. Wykazano bowiem istnienie cyklicznej fosforylacji *in vivo* w atmosferze azotu (61, 62), jak również określono ilość ATP tworzonego w procesie cyklicznej fosforylacji w izolowanych chloroplastach, bez dodanych sztucznych przenośników elektronów (63). W analogicznych warunkach wykazano przepływ elektronów w procesie cyklicznej fosforylacji badając zmiany oksydoredukcyjne cytochromów (64). W atmosferze beztlenowej oraz przy braku chlorków (niezbędnych w procesie fotolizy wody) chloroplasty zachowują się jak bakteryjne chromatofory. Ich aktywność ograniczona jest tylko do anaerobowej fosforylacji, przy czym stwierdza się zmiany oksydoredukcyjne cytochromów b<sub>6</sub> i f, natomiast dodanie plastocyaniny nie wpływa na przepływ elektronów (64).

W świetle cytowanych tutaj wyników badań występowanie cyklicznej fosforylacji jako procesu endogennego w warunkach fizjologicznych wydaje się być bardzo prawdopodobne.

### III. Udział cyklicznej fosforylacji w reakcjach wymagających ATP

Reeves i Hall (56), według których stosunek ATP/2e charakterystyczny dla preparatu ostrożnie izolowanych chloroplastów jest bliski wartości 2, określają udział cyklicznej fosforylacji w asymilacji dwutlenku węgla jako rzędu 10<sup>0</sup>% fosforylacji niecyklicznej. Niezależnie od postulowanej roli cyklicznej fosforylacji w asymilacji CO<sub>2</sub>, wielu autorów sugeruje jej udział w reakcjach wymagających dostarczenia ATP (57, 65—67). Wykazano np. udział cyklicznej fosforylacji w aktywnym transporcie jonów: w odróżnieniu od aktywnego transportu jonów Cl<sup>-</sup> niezbędnych dla funkcjonowania fotoukładu II, wrażliwego na DCMU, — aktywny transport jonów K<sup>+</sup> jest niewrażliwy na DCMU i zależy jedynie od fosforylacji cyklicznej (transport ten zachodzi w czasie oświetlania chloroplastów światłem monochromatycznym o długości fali około 720nm). Wykazano również udział cyklicznej fosforylacji w włączaniu <sup>32</sup>P do struktur komórkowych (57, 65), w anaerobowej fotoasymilacji glukozy (66) oraz w asymilacji octanu (70, 71). Badano również włączanie <sup>14</sup>C leucyny w izolowanych chloroplastach zakładając, że biosynteza białek zależy nie od poziomu NADPH, a jedynie od ATP — może zatem zachodzić wyłącznie przy udziałem

le cyklicznej fosforylacji (67). Okazało się (Tabela III, Tabela IV), że najwyższy stopień włączania  $^{14}\text{C}$  leucyny obserwuje się na świetle o długości fali 714nm, które stymuluje ten proces dwukrotnie — w porównaniu z aktywnością włączania  $^{14}\text{C}$  leucyny w warunkach oświetlenia światłem o długości fali 644nm.

Przedstawione powyżej wyniki badań sugerują udział w biosyntezie białek ATP powstałego w procesie cyklicznej fosforylacji; postuluje się również taką zależność w przypadku biosyntezy DNA i RNA. Procesy te z energetycznego punktu widzenia zależą jedynie od ATP; hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia (67).

Tabela 3.

Włączanie  $^{14}\text{C}$ -leucyny w izolowanych chloroplastach szpinaku (67)

Warunki inkubacji	Włączona $^{14}\text{C}$ -leucyna mumole/mg chloroplastów na godz.
światło	2,84
ciemność	0,15
ciemność + układ tworzący ATP	1,03

Tabela 4.

Wpływ światła monochromatycznego na asymilację  $\text{CO}_2$  i włączanie  $^{14}\text{C}$ -leucyny w izolowanych chloroplastach szpinaku (67)

Długość fali nm	Włączanie $^{14}\text{C}$ -leucyny %	Asymilacja $\text{CO}_2$ %
664	100	100
714	184	30

W pewnych warunkach tworzenie ATP może być jedynym przejawem procesu fotosyntezy nie tylko w bakteriach, ale i w tkankach roślin wyższych (72): ATP może powstawać w cyklicznej fosforylacji nawet w przypadku, gdy włączanie dwutlenku węgla jest znacznie obniżone lub całkowicie zahamowane. Sytuację taką obserwuje się w czasie zamknięcia aparatów szparkowych w porze południowej w liściach roślin wyższych (73, 74), lub w warunkach niedoboru wody.

Przedstawione tutaj fakty sugerują istnienie cyklicznej fosforylacji jako procesu endogennego, fizjologicznego w chloroplastach roślin wyższych. Proces ten stanowi przypuszczalnie istotne źródło energii dla wielu procesów metabolicznych. ATP tworzony w cyklicznej fosforylacji stanowi prawdopodobnie uzupełnienie ilości ATP powstającego w procesie fotofosforylacji niecyklicznej i jest niezbędny w procesie asymilacji dwutlenku węgla.

Artykuł otrzymano 30.11.1973, po rewizji autorskiej przyjęto 24.6.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Arnon D. I., Allen M. B., Whatley F. R., (1954), *Nature*, **174**, 394—396.
2. Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6324—6329.
3. Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B., (1958), *Nature*, **127**, 1026—1034.
4. Allen M. B., Arnon D. I., Capindale J. B., Whatley F. R., Durcham L. J., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4149—4155.
5. Jensen R. G., Bassham J. A., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 1095—1101.
6. Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B., (1958), *Science*, **127**, 1026—1034.
7. Jagendorf A. T., (1958), *Brookhaven Symp. Biol.*, **11**, 236—258.
8. Avron M., Jagendorf A. T., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 1315—1320.
9. Stiller M., Venesland B., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 562—579.
10. Turner J. F., Black C. C., Gibbs M., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 577—579.
11. Kok B., (1956), *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 399—401.
12. Kok B., (1957), *Nature*, **179**, 583—584.
13. Davenport H. E., Hill R., (1952), *Proc. Rev. Soc. (London)*, ser. B., **139**, 327—348.
14. Hill R., (1954), *Nature*, **174**, 501—503.
15. Katoh S., (1960), *Nature*, **186**, 533—534.
16. Katoh S., Shiratori I., Takamyia A., (1962), *J. Biochem. (Tokyo)*, **51**, 32—40.
17. Boardmann N. K., Anderson J. M., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **143**, 187—203.
18. Anderson J. M., Boardmann N. K., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 403—421.
19. Nelson N., Neuman J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1817—1824.
20. Anderson J. M., Boardmann N. K., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 157—160.
21. Katoh S., Takamyia A., (1963), *Plant Cell Physiol.*, **4**, 335—347.
22. Hind G., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 235—240.
23. Avron M., Shneyour A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **226**, 498—500.
24. Avron M., Shavit E., (1967), w *Current Topics in Bioenergetics t. 2*, red. D. R. Sanadi, Academic Press, New York, 1—21.
25. Avron M., Shavit E., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 317—321.
26. Vernon L. P., Avron M., (1965), *Ann. Rev. Biochem.*, **34**, 269—296.
27. Avron M., Neumann J., (1968), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **29**, 137—169.
28. Frąckowiak B., Kaniuga Z., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **226**, 360—365.
29. Frąckowiak B., Kaniuga Z., (1973), *Photosynthetica*, **7**, 28—33.
30. Del Campo F. T., Ramirez J. M., Arnon D. I., (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 2805—2809.
31. Izawa S., Good N. E., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 380—391.
32. Saha S., Good N. E., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5017—5021.
33. Bohme H., Trebst A., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 137—148.
34. Epel B. L., Neuman J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 520—529.
35. Arnon D. I., (1967), *Physiol. Rev.*, **47**, 317—358.
36. Arnon D. I., Tsujimoto J. H., McSwain B. D., (1967), *Nature*, **214**, 562—568.
37. McSwain B. D., Arnon D. I., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 989—991.
38. Knaff D. B., Arnon D. I., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 715—719.
39. Arnon D. I., Chain R. K., McSwain B. D., Tsujimoto H. Y., Knaff D. B., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1404—1409.
40. Arnon D. I., (1969), *Handbuch Pflanzenarn. und Dügung*, wyd. Linser H.,

- Vien — New York, 349—379.
41. Masey V., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 255—256.
  42. Schurmann P., Buchanann B. B., Arnon D. I., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 111—134.
  43. Heber U., (1969), *Biochim. Biophys. Acta.*, **180**, 303—319.
  44. Heber U., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 140—152.
  45. Tanner W., Loffer M., Kandler O., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 422—428.
  46. Forti G., Jagendorf A. T., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 322—330.
  47. Avron M., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 251—256.
  48. Gromet E., Natan Z., Avron M., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 215—221.
  49. Keister D. L., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2673—2678.
  50. Schwarz M., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 204—212.
  51. Tagawa K., Tsujimoto W. J., Arnon A. I., (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **49**, 545—549.
  52. Winget G. D., Izawa S., Good N. E., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 438—443.
  53. Izawa S., Winget G. D., Good N. E., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 223—226.
  54. Lynn W. S., Brown R. H., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 412—417.
  55. Hall D. O., Reeves S. C., Baltscheffsky H., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 359—366.
  56. Reeves S. G., Hall D. O., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 66—78.
  57. Urbach W., Gimmler H., (1970), *Z. Pflanzenphysiol.*, **62**, 276—281.
  58. Champigny H. L., Miginiac-Maslow M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 344—343
  59. Miginiac-Maslow M., Champigny H. L., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 344—352.
  60. MacRobbie E. A., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 64—73.
  61. Forti G., Parisi B., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 1—6.
  62. Tanner W., Loos E., Klob W., (1968), *Z. Pflanzenphysiol.*, **59**, 301—303.
  63. Miginiac-Maslow M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **224**, 353—360.
  64. Arnon D. I., Knaff D. B., McSwain B. D., Chain R. K., Tsujimoto H. Y., (1971), *Photochem. Photobiol.*, **14**, 397—425.
  65. Urbach W., Simonis W., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 39—45.
  66. Tanner W., Dachsels L., Kandler O., (1965), *Plant Physiol.*, **40**, 115—119.
  67. Ramirez J. M., Del Campo F. F., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 606—613.
  68. MacRobbie E. A., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 64—73.
  69. Raven J. A., (1967), *J. Gen. Physiol.*, **59**, 1627—1634.
  70. Wiessner W., Gaffron H., (1964), *Nature*, **201**, 725—726.
  71. Wiessner W., (1965), *Nature*, **205**, 56—57.
  72. Allen M. B., Whatley F. R., Arnon D. I., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 16—23.
  73. Heath O. V., Orchard H., (1957), *Nature*, **180**, 180—181.
  74. Losada M., Trebst A. V., Ogata S., Arnon D. I., (1960), *Nature*, **186**, 753—760.



STANISŁAW MALESZEWSKI \*

## Tlen jako element regulacji fotosyntezy

### Oxygen Regulation of Photosynthesis

#### I. Efekt Warburga

Otto Warburg w 1920 roku (1) stosując w badaniach zawieszinę glonów *Chlorella* po raz pierwszy stwierdził, że  $O_2$  hamuje fotosyntezę. Podwyższenie stężenia  $O_2$  w środowisku powoduje zmniejszenie szybkości fotosyntetycznej asymilacji  $CO_2$  jak i wydzielania  $O_2$  (2). Zjawisko to, nazwane efektem Warburga jest prawdopodobnie powszechne w świecie roślin fotosyntetyzujących (3, 4). Wykazano je również w doświadczeniach z wyizolowanymi chloroplastami (5). Hamowanie fotosyntezy przez  $O_2$  jest większe w niskich stężeniach  $CO_2$ , występuje natychmiast po podwyższeniu stężenia  $O_2$  i jest prawie całkowicie odwracalne (3, 6, 7, 8, 9).

Tlen obniża szybkość fotosyntezy w komórkach roślin  $C_3^{**}$  (11, 12) już w stężeniach bardzo niskich, wynoszących kilka procent (1, 3, 6, 7, 10). Następstwem zwiększania stężenia  $O_2$  w środowisku jest także wyraźne podwyższenie punktu kompensacyjnego  $CO_2$  (stężenie  $CO_2$ , w którym równoważą się procesy pobierania i wydzielania  $CO_2$  na świetle) roślin  $C_3$  (9). Natomiast fotosyntezę w liściach kukurydzy i innych roślin  $C_4^{**}$  (11, 12) tlen hamuje dopiero w stężeniach wyższych od 21<sup>o</sup>%. Punkt kompensacyjny  $CO_2$  roślin  $C_4$  nie zależy w widocznym stopniu od stężenia  $O_2$  i jest zwykle bliski zera (13, 14).

Wyniki badań nad mechanizmem efektu Warburga wskazują, że  $O_2$  może działać zarówno na etapie reakcji świetlnych (fotochemicznych) jak i reakcji ciemnych (asymilacji i redukcji  $CO_2$ ) fotosyntezy. Powoduje to, że mechanizm tego zjawiska jest bardzo złożony i poznany dotychczas tylko fragmentarycznie.

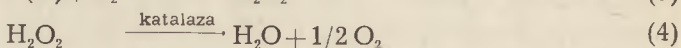
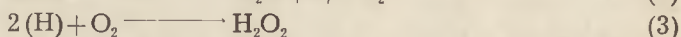
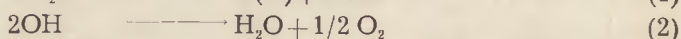
\* Dr, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski,

\*\* W fotosyntetyzujących komórkach roślin  $C_3$  pierwszym trwałym produktem asymilacji  $CO_2$  jest PGA. W tkankach roślin  $C_4$  początkowymi produktami są zaś czterowęglowe kwasy dwukarboksyłowe: szczawiooctowy, jabłkowy i asparaginowy.

Wykaz stosowanych skrótów: PS-I, PS-II — fotoukład I, II; NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego; NADPH — zredukowana forma NADP; NAD — dwunukleotyd nikotynamido-adeninowy; NADH — zredukowana forma NAD; ATP — adenozynotrójfosforan; PEP — kwas fosfoenolopirogronowy; PGA — 3-fosfoglicerynian; OAA — szczawiooctan; INH — hydrazyd kwasu izonikotynowego.

## II. Wpływ tlenu na fotosyntetyczny transport elektronów

Możliwość działania tlenu na fotochemiczne reakcje fotosyntezy rozważał już Warburg (1), który sugerował, że  $O_2$  reagując z wytwarzanymi w nich zredukowanymi metabolitami, jako akceptor elektronów może współzawodniczyć z produktami asymilacji  $CO_2$ . Hipotezę tę potwierdzono wykazując, że  $O_2$  może być utleniaczem w reakcji Hilla przebiegającej w wyizolowanych chloroplastach (15, 16, 17, 18). Część zredukowanych metabolitów fotochemicznych reakcji fotosyntezy może w obecności  $O_2$  ulegać utlenieniu z wytworzeniem  $H_2O_2$  i ostatecznie  $H_2O$  i  $O_2$ . Proces ten sumarycznie przedstawiają reakcje 1, 3 i 4, gdzie (H) oznacza równoważnik redukcyjny przenoszony w fotochemicznych reakcjach fotosyntezy.



W wyniku takiego działania  $O_2$  następowałoby zmniejszenie wytwarzania reduktorów, a następnie także natężenia asymilacji i redukcji węgla.

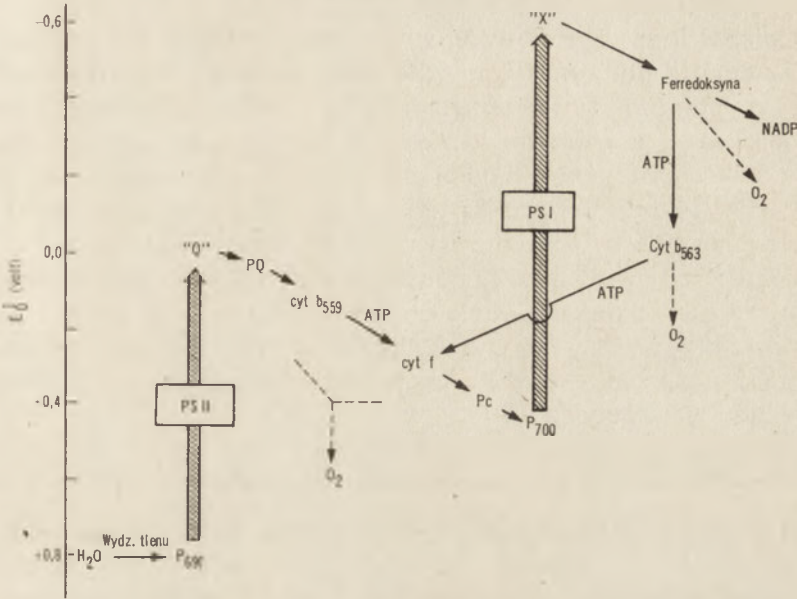
Przytoczone w następnych rozdziałach badania dostarczyły dalszych dowodów działania  $O_2$  na reakcje fotosyntetycznego transportu elektronów (reakcja Mehlera). Pozwoliły także na określenie miejsc w łańcuchu przenośników, w których następuje przejmowanie elektronów przez tlen. Większość tych dowodów ma charakter pośredni, gdyż uzyskane zostały w badaniach nad wpływem  $O_2$  na procesy związane z fotosyntetycznym transportem elektronów. Bezpośrednie wykazanie zużywania  $O_2$  w fotosyntezie (reakcja 3) jest bowiem metodycznie trudne z powodu równoczesnej, najczęściej znacznie intensywniejszej produkcji  $O_2$  (reakcje 2 i 4).

### II-1. Wygaszanie fluorescencji chlorofilu przez tlen

Badania fotochemicznych reakcji fotosyntezy, których przebieg przedstawia schematycznie rycina 1, prowadzono między innymi na drodze analizy zmian natężenia fluorescencji chlorofilu. Reakcje te oraz metody ich badań niedawno omówiono w *Postęпах Biochemii* (19, 20).

Natężenie fluorescencji chlorofilu, której źródłem jest głównie fotoukład II (PS II) zależy od wzbudzenia PS II i stanu oksydoredukcyjnego przenośników elektronów zredukowanych przez ten fotoukład. Wzbudzenie fotoukładu I (PS I) długofalowym światłem czerwonym ( $\lambda > 700\text{nm}$ ) jak i inne czynniki zwiększające odpływ elektronów z PS II powodują wygaszanie fluorescencji. Natężenie jej wzrasta natomiast gdy hamuje się przepływ elektronów w chloroplastach (21, 22, 23, 24, 25). Natężenie fluorescencji jest więc wskaźnikiem stanu oksydoredukcyjnego i natężenia utleniania związków przejmujących elektrony od PS II.

Stosując w badaniach wyizolowane chloroplasty oraz całe liście wykazano, że tlen zmniejsza natężenie fluorescencji chlorofilu. Wpływ tlenu jest największy jeżeli działają oba fotoukłady, natomiast nie wpływa on w ogóle lub tylko w małym stopniu na fluorescencję chlorofilu mutantów ze słabo funkcjonującym PS I. Wskazuje to, że  $O_2$  przejmuje elektrony z fotochemicznych reakcji fotosyntezy, reagując z przenośnikami zlokalizowanymi za PS I, prawdopodobnie z ferredoksyną (26, 27).



**Ryc. 1.** Miejsca działania  $O_2$  w reakcjach fotosyntetycznego transportu elektronów (4, 37)  
 PQ – plastochinon; Pc – plastocyjanina;  $P_{680}$ ,  $P_{700}$  – formy chlorofilu o maksimach absorpcji odpowiednio przy 690 i 700nm, występujące w centrach reakcji PS II i PS I; Q i X – akceptory elektronów PS II i PS I.

**II-2. Hamowanie przez tlen kurczenia się chloroplastów na świetle**

Chloroplasty w komórkach i chloroplasty wyizolowane wykazują odwracalne zmiany objętości zależne od oświetlenia: kurczenie się na świetle i pęcznienie w ciemności. Kurczenie się chloroplastów stwierdzano po oświetleniu ich w atmosferze  $N_2$  długofalowym światłem czerwonym ( $\lambda > 700nm$ ) wzbudzającym PS I. Wskazuje to, że proces ten ma związek z cyklicznym przepływem elektronów (28—33). Równoczesne zastosowanie krótkofalowego światła czerwonego o małym natężeniu, które wzbudza PS II, stymuluje kurczenie się chloroplastów. Natomiast krótkofalowe światło czerwone o dużym natężeniu, użyte łącznie z długofalowym, działa hamująco, co tłumaczy się zatrzymywaniem cyklicznego przepływu elektronów. Centrum reakcji PS I przejmując elektrony od wzbudzonego PS II ulega bowiem silnej redukcji i nie może być akceptorem elektronów w przepływie cyklicznym (30).

Stwierdzono, że kurczenie się chloroplastów indukowane długofalowym światłem czerwonym jest silnie hamowane przez  $O_2$ . Jednocześnie maleje ilość zredukowanego cytochromu f (30). Prowadzi to do wniosku, że  $O_2$  przerywa cykliczny przepływ elektronów. Działanie tlenu, tak jak wskazywały wyniki badań nad fluorescencją chlorofilu i w tym przypadku może być zlokalizowane na etapie przepływu elektronów z PS I na NADP.

### II-3. Utlenianie cytochromu $b_{563}$

Badania, w których stosowano wyizolowane chloroplasty szpinaku (34, 35) oraz komórki mutantu *Chlamydomonas reinhardi* (36, 37) charakteryzującego się obniżoną zawartością barwników fotosyntetycznych pozwoliły na stwierdzenie, że jednym ze składników fotosyntetycznego łańcucha przenośników elektronów jest odmiana cytochromu b o maksimach absorpcji przy 430 i 563nm. Cytochrom ten (cyt  $b_{563}$ ) jest prawdopodobnie donorem elektronów dla cytochromu f w fotofosforylacji cyklicznej.

Cytochrom  $b_{563}$  w wyniku samoutleniania (4, 37, 38) może przekazywać elektrony na tlen zamiast na cytochrom f. Reakcja ta może być również przyczyną zmniejszonego w wysokich stężeniach  $O_2$  stopnia redukcji cytochromu f na świetle oraz kurczenia się chloroplastów indukowanego przez światło wzbudzające PS I.

### II-4. Wpływ tlenu na transport elektronów pomiędzy PS II i PS I

Badania Björkmana (7) nad wpływem  $O_2$  na stan oksydoredukcyjny plastocyaniny wskazały na możliwość występowania jeszcze jednego miejsca działania  $O_2$  w reakcjach fotosyntetycznego transportu elektronów. Oświetlając liście światłem wzbudzającym tylko PS I nie stwierdzano zależności redukcji plastocyaniny od stężenia  $O_2$ . Tlen zmniejszał natomiast ilość zredukowanej plastocyaniny gdy stosowano światło wzbudzające oba fotoukłady ( $\lambda > 625\text{nm}$ ). Na tej podstawie wnioskowano, że tlen może działać także na etapie przenoszenia elektronów pomiędzy PS II i PS I, a ściślej — pomiędzy PS II a plastocyaniną (Ryc. 1).

Na możliwość przejmowania przez  $O_2$  elektronów pomiędzy dwoma fotoukładami wskazuje również przyspieszony w obecności  $O_2$  zanik fluorescencji chlorofilu w ciemności (21, 39).

### II-5. Wpływ tlenu na wzmożone włączanie $CO_2$ w ciemności po okresie świetlnym

Komórki glonów (40) i zielone tkanki roślin wyższych (14, 41) bezpośrednio po naświetleniu w atmosferze pozbawionej  $CO_2$  wiążą dostarczony im równocześnie z zaciemnieniem  $CO_2$  znacznie intensywniej niż po dłuższym okresie ciemności.

W reakcjach wzmożonego ciemniowego włączania  $CO_2$  po okresie świetlnym biorą udział metabolity wytworzone i nagromadzone w komórkach w poprzedzającym okresie oświetlania. Włączony w ciemności  $^{14}C$

występuje nie tylko we wczesnych produktach asymilacji  $^{14}\text{CO}_2$  (41, 42, 43) lecz także w fosforanach cukrów i w cukrach (40, 44, 45, 46, 47). Wskazuje to, że podczas oświetlania następuje akumulacja zarówno akceptorów  $\text{CO}_2$  (RuDP, PEP) jak i równoważników redukcyjnych. Analiza procesu wzmożonego ciemniowego włączania  $\text{CO}_2$ , zależnego od świetlnych reakcji fotosyntezy, dostarcza pośrednio informacji o ich przebiegu. Zjawisko to umożliwia także rozdzielenie w czasie świetlnych i ciemnych reakcji fotosyntezy i oddzielne ich badanie.

Wyniki badań, w których materiałem doświadczalnym były glony, wykazały, że działanie  $\text{O}_2$  w okresie oświetlania zmniejsza akumulację związków biorących udział w procesie wzmożonego ciemniowego włączania  $\text{CO}_2$  a w ciemności przyspiesza ich rozpad (44, 45, 47, 48).

Występujące w liściach kukurydzy (roślina typu  $\text{C}_4$ ) intensywne ciemniowe włączanie  $\text{CO}_2$  po okresie świetlnym jest hamowane w wysokich stężeniach  $\text{O}_2$  (14). Wyniki badań przeprowadzonych w naszym laboratorium nad wzmożonym ciemniowym włączaniem  $\text{CO}_2$  w liściach kukurydzy potwierdziły zależność tego procesu od stężenia  $\text{O}_2$  w okresie oświetlania (41). Ilość włączonego  $^{14}\text{CO}_2$  w ciemności (w 21%  $\text{O}_2$ ) po uprzednim oświetlaniu liści w atmosferze zawierającej 21%  $\text{O}_2$  były prawie dwa razy mniejsze niż po oświetlaniu w  $\text{N}_2$ . Stężenie  $\text{O}_2$  100% w okresie oświetlania eliminowało natomiast całkowicie wzmożone ciemniowe włączanie  $\text{CO}_2$  (tabela 1).

Tabela 1.

Wpływ stężenia  $\text{O}_2$  w okresie oświetlenia na natężenie wzmożonego ciemniowego włączania  $^{14}\text{CO}_2$  w liściach kukurydzy (41)

Produkty włączania $^{14}\text{CO}_2$	Wzmożone ciemniowe włączanie $^{14}\text{CO}_2$ (2 min.)			Ciemniowe włączanie $^{14}\text{CO}_2$ (2 min) 21% $\text{O}_2$
	Stężenie $\text{O}_2$ w okresie oświetlania			
	0%	21%	100%	
	Ilość włączonego $^{14}\text{C}$ rozp $\times$ min $^{-1} \times$ g $^{-1}$ św. masy $\times 10^{-5}$			
Całkowita ilość włączonego $^{14}\text{C}$	16,0	8,2	2,5	2,5
Jabłczan + asparaginyan	12,2	6,4	1,9	2,0
Alanina	1,3	0,7	0,2	—
Inne związki	2,5	1,1	0,4	0,5

Głównymi produktami wzmożonego ciemniowego włączania  $^{14}\text{CO}_2$  u kukurydzy był kwas jabłkowy i kwas asparaginowy. W związkach tych występowało blisko 80% włączonego w ciemności  $^{14}\text{C}$ . Wskazuje to, że proces ten w liściach kukurydzy składa się z reakcji karboksylacji PEP, redukcji wytworzonego OAA do kwasu jabłkowego, oraz aminacji OAA do kwasu

asparaginowego i wymaga akumulacji zarówno akceptora  $\text{CO}_2$  (PEP lub jego prekursorów) jak i NADPH. Uzyskane wyniki wskazują, że  $\text{O}_2$  działając w okresie oświetlania zmniejsza akumulację tych metabolitów. Zgodnie z wynikami badań przedstawionych w poprzednich rozdziałach należy przypuszczać, że następuje to na drodze przejmowania elektronów z fotochemicznych reakcji fotosyntezy. Tlen może także stymulować zużywanie produktów tych reakcji w przebiegających podczas oświetlania przemianach nie wymagających dopływu  $\text{CO}_2$ . Wyniki przedstawione w tabeli 1 dowodzą, że przy braku  $\text{CO}_2$  tlen w stężeniu 21% również silnie wpływał na reakcje fotosyntezy przebiegające na świetle.

#### II-6. Bezpośrednie dowody zużywania tlenu w reakcjach fotosyntetycznego transportu elektronów

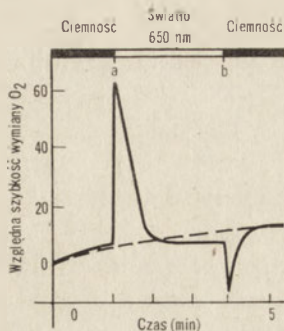
Oprócz omówionych uprzednio badań, wykorzystujących zjawiska związane z fotosyntetycznym transportem elektronów, podejmowano także próby wykazania metodami bardziej bezpośrednimi zużywania  $\text{O}_2$  w świetlnych reakcjach fotosyntezy.

Cyjanki użyte w małych stężeniach nie hamują w chloroplastach fotosyntetycznego transportu elektronów (49) ani też redukcji PGA (50), blokują natomiast rozkład wytwarzanego  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reakcja 4). Wykorzystując to, w preparatach chloroplastów redukujących na świetle PGA, wykazano równoległe przebiegającą reakcją Mehlera (reakcja 3). Wyrażała się ona znacznym zmniejszeniem wydzielania  $\text{O}_2$  przez chloroplasty po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej KCN (26).

Zużywanie  $\text{O}_2$  w reakcjach fotosyntetycznego transportu elektronów wykazano także badając wymianę  $\text{O}_2$  komórek glonów i wyizolowanych chloroplastów, w następujących po sobie krótkich okresach światła i ciemności. Podczas ciągłego oświetlania tlen jest wydzielany z intensywnością, która stanowi różnicę między intensywnościami produkcji i zużycia  $\text{O}_2$ . Po oświetleniu materiału doświadczalnego, uprzednio znajdującego się w ciemności, światłem wzbudzającym selektywnie PS II obserwuje się gwałtowny wyrzut tlenu (Ryc. 2, maksimum a). Zjawisko to tłumaczy się redukcją przez PS II akceptorów elektronów, które w formie utlenionej akumulują się w chloroplastach w okresie ciemności. Przy zahamowanym dalszym przepływie elektronów pule tych metabolitów na świetle ulegają szybko redukcji, co powoduje obserwowany następnie spadek wydzielania  $\text{O}_2$ . Zastosowanie światła wzbudzającego PS I przywraca wydzielanie  $\text{O}_2$ . Może to także nastąpić w ciemności w obecności  $\text{O}_2$ , co potwierdza utlenianie przez  $\text{O}_2$  przenośników elektronów zredukowanych przez PS II (26, 51—53).

W tych samych doświadczeniach, po wyłączeniu światła rejestrowano przez krótki okres pobieranie  $\text{O}_2$  (Ryc. 2, minimum b). Przypuszcza się, że jest to spowodowane wolniejszym zanikiem w ciemności reakcji stymu-

lowanych przez światło, związanych z pobieraniem  $O_2$  niż reakcji w których na świetle wydziela się  $O_2$ . Wykorzystując to opóźnienie, w wyniku doświadczeń przeprowadzonych z użyciem wyizolowanych chloroplastów (51) oraz całych tkanek (54, 55) wykazano, że światło selektywnie wzbudające PS I stymuluje reakcje odpowiedzialne za pobieranie  $O_2$ . Wskazuje to na udział PS I w przepływie elektronów na tlen.



**Ryc. 2.** Wymiana  $O_2$  wyizolowanych chloroplastów buraka na świetle (650nm) i w ciemności (51)

Wyniki przedstawionych wyżej badań nad kinetyką wymiany  $O_2$  w okresach, w których reakcje fotosyntezy osiągały stan równowagi lub od stanu tego się oddalały potwierdziły możliwość przejmowania elektronów przez tlen zarówno pomiędzy fotoukładami jak też pomiędzy PS I a NADP.

Zużywanie  $O_2$  w reakcjach zrównoważonego procesu fotosyntezy wykazano bezpośrednio stosując tlen zawierający izotop  $^{18}O$ . Występowało ono wyraźnie na świetle o natężeniu wynoszącym conajmniej 30% natężenia światła wysycającego fotosyntezę i w tych warunkach przewyższało pobieranie  $O_2$  w ciemności. Na świetle pobieranie  $O_2$  było największe gdy stężenie  $CO_2$  stanowiło czynnik ograniczający szybkość fotosyntezy, co wskazuje na kompetycyjne działanie  $O_2$  w stosunku do  $CO_2$  (4, 56—63).

Na podstawie przytoczonych dotąd danych należy uznać za udowodnioną możliwość przejmowania przez tlen elektronów w kilku miejscach łańcucha świetlnych reakcji fotosyntezy. Wyniki badań przeprowadzonych odmiennymi metodami i na różnym materiale roślinnym wskazują, że  $O_2$  przejmuje elektrony między fotoukładami, oraz na etapie: centrum aktywne PS I — NADP, (według schematu przedstawionego na rycinie 1). W mniejszym zakresie potwierdzono natomiast reakcję  $O_2$  z cytochromem  $b_{563}$ .

W badaniach *in vitro*, w których stosowano preparaty zawierające fragmenty wyizolowanych chloroplastów szpinaku Ellyard i Gibbs (5) stwierdzili taką samą szybkość redukcji egzogenego NADP w atmosferze  $N_2$  jak i  $O_2$ . Wyniki te nie wykluczają możliwości działania  $O_2$  na reakcje fotosyntetycznego transportu elektronów w warunkach dużego na-

teżenia światła i niskiego stężenia  $\text{CO}_2$ , które prawdopodobnie powodują spadek poziomu NADP w chloroplastach. Sugerują one zaś, że działanie  $\text{O}_2$  może nastąpić dopiero gdy fotosyntetyczny transport elektronów jest ograniczony brakiem lub małym natężeniem redukcji NADP i produktów asymilacji  $\text{CO}_2$ , które są bardziej efektywnymi akceptorami elektronów niż  $\text{O}_2$  (30).

### III. Działanie tlenu na reakcje asymilacji i redukcji $\text{CO}_2$

Bezpośrednie działanie  $\text{O}_2$  na reakcje asymilacji i redukcji  $\text{CO}_2$  wykazali Ellyard i San Pietro (64) w badaniach prowadzonych przy użyciu preparatów enzymatycznych nie zawierających chloroplastów, wiążących  $^{14}\text{CO}_2$  w ciemności po dodaniu NADPH, ATP i 5-fosforybozy.

Zgodnie z wcześniejszymi hipotezami (3) hamowanie ciemnych reakcji fotosyntezy może być wynikiem kilku procesów powodowanych przez tlen. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że największe znaczenie może mieć inaktywacja niektórych enzymów cyklu Calvina oraz stymulacja fotooddychania\*, związanego z przemianami kwasu glikolowego.

#### III-1. Hamowanie przez tlen enzymów cyklu Calvina

Sugestię, że tlen działa inaktywująco na niektóre enzymy cyklu Calvina wysunięto po raz pierwszy na podstawie stwierdzonej dużej wrażliwości fotosyntezy glonów na czynniki utleniające ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (65). Rozważano możliwość hamowania przez  $\text{O}_2$  karboksylazy RuDP (6), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (66) i fosforybulokinazy (3). Aktywność wymienionych enzymów zależy od występowania w ich cząsteczkach grup —SH. Przypuszczano, że w wysokich stężeniach  $\text{O}_2$  grupy te mogą być utleniane, a w niskich — zredukowane przez endogenne reduktory, co tłumaczyłoby odwracalność efektu Warburga (3, 66). Nie wykazano jednak bezpośrednio w badaniach *in vitro* hamowania przez  $\text{O}_2$  enzymów fotosyntetycznych na tej drodze w stopniu odpowiadającym efektowi Warburga. Również związki ochraniające grupy —SH: zredukowany kwas liponowy, 2,3-dwumerkaptopropanol oraz zredukowany glutation nie zapobiegały hamowaniu asymilacji  $\text{CO}_2$  przez tlen w wysokich stężeniach (67, 68).

Nowsze badania wprowadziły istotną modyfikację do omawianej hipotezy. Stwierdzono, że światło aktywuje wiele enzymów biorących udział w asymilacji  $\text{CO}_2$  i fotosyntetycznych przemianach węgla. Należą do nich: karboksylaza RuDP (69—71), kinaza piorogronianowa, karboksylaza PEP (72), dehydrogenaza jabłczanowa chloroplastów (NADP) (73), dehydroge-

\* Reakcje związane z wytwarzaniem  $\text{CO}_2$  w fotosyntetyzujących tkankach na świetle, różne od oddychania ciemniowego (mitochondrialnego).



naza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (NADP) (74), heksozodwufosfataza (75, 76) i fosforybulokinaza (77). Aktywacja przebiega również *in vitro* w preparatach wyizolowanych chloroplastów, a mechanizm jej polega prawdopodobnie na redukcji w cząsteczkach enzymów grup -S-S- do -SH przy udziale reduktorów (NADPH, ferredoksyna) wytwarzanych w fotochemicznych reakcjach fotosyntezy (78). Reakcja ta mogłaby być katalizowana przez reduktazę białkowych dwusiarczków, która jest również wrażliwa na O<sub>2</sub> (79). Przejmując elektrony z fotochemicznych reakcji fotosyntezy tlen może zmniejszać świetlną aktywację enzymów lub całkowicie ją znosić (80).

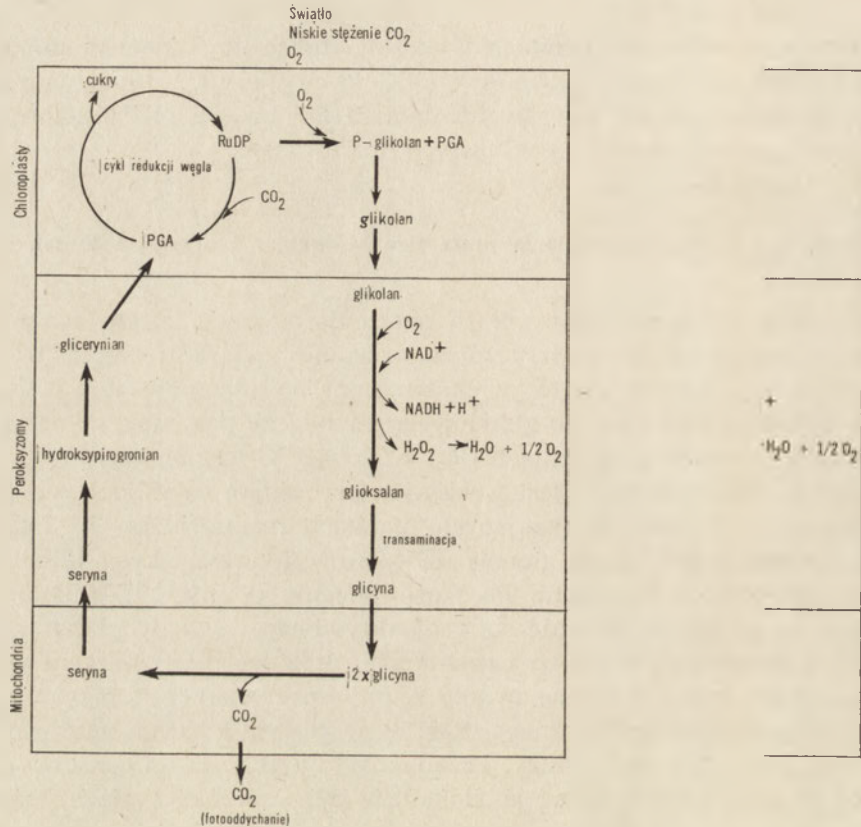
W ostatnich latach wykazano także inny mechanizm działania O<sub>2</sub> na etapie reakcji asymilacji CO<sub>2</sub>, który polega na oksydacyjnym rozszczepieniu RuDP z wytworzeniem PGA i kwasu fosfoglikolowego. Reakcję tę omówiono szerzej w następnym rozdziale.

### III-2. Stymulacja przez tlen biosyntezy i przemian kwasu glikolowego

Tlen nie tylko obniża natężenie asymilacji CO<sub>2</sub> lecz wpływa również na drogi fotosyntetycznych przemian związków węgla. U większości glonów wyraża się to zwiększonym w wysokich stężeniach O<sub>2</sub> wydzielaniem do podłoża kwasu glikolowego, zwłaszcza przy dużych natężeniach światła i w niskich stężeniach CO<sub>2</sub>. Stosując <sup>14</sup>C-węglan wykazano, że wydzielany kwas glikolowy jest wczesnym produktem asymilacji węgla (81—88).

W fotosyntetyzujących tkankach roślin wyższych, a także w komórkach niektórych glonów (89—92), wytwarzany kwas glikolowy ulega dalszym przemianom. Po wprowadzeniu do liści <sup>14</sup>C-glikolanu stwierdzano szybkie pojawianie się radioaktywnego węgla w glicynie, serynie, PGA, fosforanach heksoz i sacharozie. Stosując inne znaczone metabolity udowodniono funkcjonowanie w fotosyntetycznych tkankach roślin wyższych szlaku metabolicznego (Ryc. 3), w którym kwas glikolowy na świetle przekształca się w cukry. Przemiany te przebiegają częściowo poza chloroplastami. Rozpoczyna je, zlokalizowana w peroksysomach, reakcja utleniania kwasu glikolowego do kwasu glioksalowego, katalizowana przez specyficzną oksydazę oraz przez reduktazę kwasu glioksalowego współdziałającą z NAD. Reakcję tę hamują α-hydroksysulfoniiny, w obecności których następuje akumulacja kwasu glikolowego w fotosyntetyzujących tkankach (93, 94). W peroksysomach kwas glioksalowy ulega następnie przekształceniu w glicynę, przy udziale aminotransferazy i kwasu glutaminowego jako donora grupy aminowej. Dalsze przemiany przebiegają w mitochondriach, gdzie w reakcji katalizowanej przez hydroksymetylotransferazę serynową glicyna ulega przekształceniu w serynę. Reakcja ta jest prawdopodobnie głównym źródłem CO<sub>2</sub> wytwarzanego w procesie fotooddychania (4, 95—97).

Przemiany te zostały wyjaśnione w mniejszym stopniu. Część wytworzonego kwasu jest niewątpliwie substratem dla biosyntezy białek. W procesie biosyntezy białek w pszenicy oraz tytoniu serynę-3-<sup>14</sup>C stwierdzono, że na kwas ten jest również przekształcany w cukry. Proces ten przebiega w chloroplastach (przemiana seryny w kwas glicerynowy) i w mitochondriach (przemiana kwasu glicerynowego w kwas glikolowy). Opisane przemiany kwasu glikolowego (4, 95, 97—107) są związane z transportem pośrednich metabolitów pomiędzy chloroplastami, cytoplazmą i mitochondriami.



Przebieg i przemiany kwasu glikolowego w fotosyntetyzujących komórkach roślin wyższych (95, 107, 124, 162)

(108) sugeruje, że wytwarzany w peroksisomach kwas może ulegać także bezpośredniej dekarboksylacji do kwasu karboksylowego i że reakcja ta jest w poważnej mierze odpowiedzialna za  $\text{CO}_2$  w procesie fotooddychania.

dotychczasowych badań zaproponowano kilka możliwości przemiany kwasu glikolowego w fotosyntetyzujących komórkach. Wyniki dotychczasowych badań sugerowano kilka możliwości przemiany kwasu glikolowego bezpośrednio w reakcji niezależnej od  $\text{CO}_2$  w reakcji niezależnej od  $\text{CO}_2$  w reakcji niezależnej od  $\text{CO}_2$ .

od cyklu Calvina (109—111). Przeczy temu jednak intensywne wytwarzanie kwasu glikolowego przy niskich stężeniach  $\text{CO}_2$ , a także w środowisku całkowicie pozbawionym  $\text{CO}_2$  (112—114) jak też zmniejszona akumulacja glikolanu w wysokich stężeniach  $\text{CO}_2$  (115).

Wyniki większości badań wskazują natomiast, że prekursorami kwasu glikolowego są pośrednie produkty cyklu redukcji węgla. Wykazano na przykład, że glony oraz zielone tkanki roślin wyższych mogą wytwarzać na świetle  $^{14}\text{C}$ -glikolan zużywając jako substrat podaną  $^{14}\text{C}$ -glukozę (87, 88, 116, 117). Wyniki te w pełni potwierdzają pogląd, że wytwarzanie kwasu glikolowego w chloroplastach przebiega w ścisłym związku z cyklem asymilacji i redukcji węgla i że proces ten stanowi ważny składnik mechanizmu efektu Warburga (5).

Wilson i Calvin (81) na podstawie wyników badań przeprowadzonych na glonach postulowali wytwarzanie glikolanu z fosforanów ketoz przy udziale transketolazy. Możliwość taką potwierdzono, wykazując powstanie glikolanu na świetle w preparatach zawierających fragmenty wyizolowanych chloroplastów, transketolazę, fruktozo-6-fosforan, ferredoksynę i NADP (118). Wysokie stężenia  $\text{O}_2$  proces ten stymulowały. Niezbędność chloroplastów i światła dowodzi, że w stosowanych warunkach doświadczalnych w syntezie kwasu glikolowego brały udział metabolity fotochemicznej fazy fotosyntezy. Funkcja chloroplastów polegała prawdopodobnie na dostarczaniu utleniaczy dla utleniania aldehydu glikolowego, związanego w kompleks z transketolazą, do wolnego kwasu glikolowego. Mogą to być utleniacze wytwarzane w PS II oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$  powstający w wyniku utleniania przez  $\text{O}_2$  ferredoksyny lub NADPH (119). Na podobnej drodze kwas glikolowy mógłby powstawać i z innych pośrednich metabolitów cyklu redukcji węgla: ksylulozo-5-fosforanu (118) oraz sedoheptulozo-7-fosforanu (120).

Bezpośrednim prekursorem kwasu glikolowego może być także kwas 2-fosfoglikolowy, rozkładany przez znajdującą się w chloroplastach fosfatazę kwasu fosfoglikolowego (121). Związek ten mógłby powstawać z dwufosforanów, ksylulozy, fruktozy, lub sedoheptulozy (123). Ostatnio wykazano, że RuDP jako kompleks z karboksylazą reaguje z tlenem dając PGA i kwas fosfoglikolowy (124, 125). Prowadząc reakcję w obecności tlenu zawierającego  $^{18}\text{O}$  stwierdzono, że znaczony tlen pojawia się w grupie karboksylowej glicyny, pośredniego metabolitu cyklu kwasu glikolowego. W doświadczeniach z częściowo oczyszczonym enzymem, w obecności  $\text{O}_2$  i braku  $\text{CO}_2$ , pobraniu 1mola  $\text{O}_2$  odpowiadało zużycie 1mola RuDP (126). Reakcja ta *in vitro* w optymalnych warunkach przebiegała z szybkością zaledwie o połowę mniejszą niż karboksylacja RuDP (127). Dane te wskazują, że wytwarzanie kwasu glikolowego na świetle następuje w wyniku współzawodnictwa o RuDP pomiędzy  $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$  (128), co tłumaczy wiele obserwacji dotyczących wpływu  $\text{O}_2$  na fotosyntezę.

Znoszenie efektu Warburga przez fosforany cukrów oraz wysokie stężenie

nia  $\text{CO}_2$  (5) potwierdza hipotezę, że zjawiska hamowania fotosyntezy przez  $\text{O}_2$  i wytwarzania kwasu glikolowego mają ścisły związek z współzawodnictwem między  $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$  o RuDP. Dalszym tego dowodem jest stwierdzenie, że optimum pH reakcji oksydacyjnego rozszczepienia RuDP jest znacznie wyższe od optimum pH reakcji karboksylacji RuDP (127, 129). Wcześniej bowiem wykazano, że wysokie pH wzmagają wytwarzanie kwasu glikolowego przez glony w dużych stężeniach  $\text{O}_2$  (86).

Ostatnio Zelitch (130) na podstawie badań nad przemianami znaczących prekursorów kwasu glikolowego w liściach tytoniu i kukurydzy sugeruje, że w fotosyntetyzujących tkankach roślin może funkcjonować więcej niż jeden szlak biosyntezy tego związku. Przy czym, zależnie od typu rośliny i warunków jedna z dróg może przeważać.

### III-3. Udział szlaku kwasu glikolowego w fotosyntezie przebiegającej w komórkach roślin wyższych

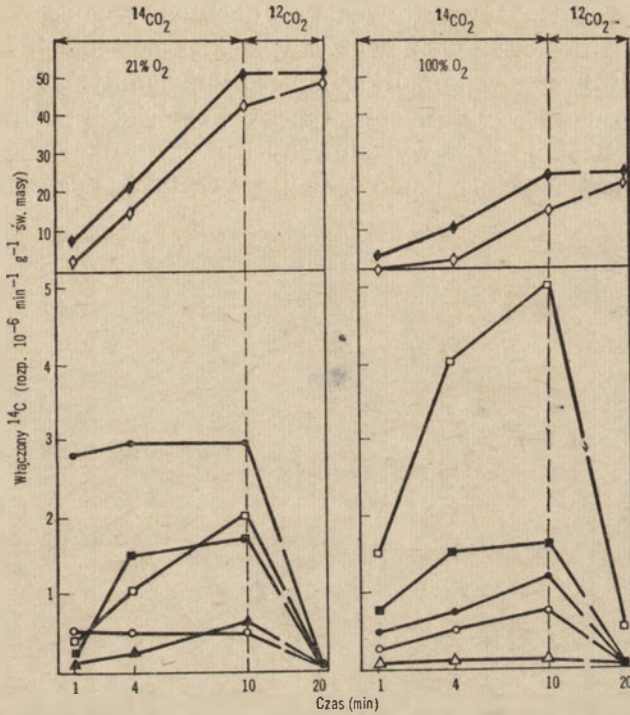
Badania prowadzone przez autora tego artykułu w latach 1967—68 w pracowni prof. C.D. Nelsona w Kanadzie wykazały, że tlen wpływa na udział metabolitów szlaku kwasu glikolowego w fotosyntetycznych przemianach węgla w tkankach roślin  $\text{C}_3$  (131, 132). Wyrazem tego jest odmienny przebieg włączania  $^{14}\text{CO}_2$  do produktów fotosyntezy w normalnym i wysokim stężeniu  $\text{O}_2$ . W badaniach, w których jako materiał doświadczalny stosowano igły jodły, wykazano, że w atmosferze 100%  $\text{O}_2$ , przy obniżonej o około 50% asymilacji  $^{14}\text{CO}_2$ , włączanie  $^{14}\text{C}$  do metabolitów szlaku kwasu glikolowego jest znacznie większe niż w normalnym stężeniu tlenu. Po zamianie asymilowanego  $^{14}\text{CO}_2$  na  $^{12}\text{CO}_2$ , radioaktywny węgiel, początkowo włączony do tych związków, odnajdywano w cukrach (Ryc. 4). Wyniki te wskazują, że podwyższone stężenie  $\text{O}_2$  powoduje zwiększony udział metabolitów szlaku kwasu glikolowego w fotosyntetycznym wytwarzaniu cukrów.

Inhibitor szlaku kwasu glikolowego, hydrazyd kwasu izonikotynowego (INH) (85, 133) hamował fotosyntezę w igłach jodły prawie 3 razy silniej w atmosferze  $\text{O}_2$  niż w powietrzu (Tabela 2). Świadczy to również o większym udziale szlaku kwasu glikolowego w fotosyntezie przebiegającej w komórkach roślin  $\text{C}_3$  przy wysokich stężeniach  $\text{O}_2$  (131, 132).

W liściach roślin typu  $\text{C}_4$  asymilacja  $\text{CO}_2$  następuje za pośrednictwem czterowęglowych kwasów dwukarboksylowych, wytwarzanych w komórkach mezofilu. Pierwszym produktem asymilacji jest kwas szczawiooctowy, który powstaje w wyniku karboksylacji PEP. Jest on następnie przekształcany w kwasy jabłkowy i asparaginowy. Metabolity te po przemieszczeniu do komórek pochwy okołowiązkowych\* ulegają tam dekarbo-

\* Wiązki przewodzące w liściach roślin  $\text{C}_4$  otacza warstwa komórek z chloroplastami, tworząca pochwę okołowiązkową. Na zewnątrz pochwy znajdują się komórki mezofilu z mniejszymi chloroplastami.

ksylacji, a uwolniony CO<sub>2</sub> jest wiązany przy udziale karboksylazy RuDP (11, 12, 134, 135). Dalsze reakcje fotosyntezy przebiegają tak jak w tkankach roślin C<sub>3</sub>, to jest na drodze cyklu Calvina. Karboksylaza PEP wykazuje dużą aktywność w komórkach mezofilu (68, 136—140). Charakteryzuje się ona też większym powinowactwem do CO<sub>2</sub> niż karboksylaza RuDP (68, 141) oraz nie jest wrażliwa na tlen (124, 143).



**Ryc. 4.** Kinetyka włączania <sup>14</sup>C do produktów fotosyntezy w igłach jodły w 21% i 100% O<sub>2</sub>  
 (-♦-), całkowita ilość włączonego <sup>14</sup>C; -◇-, - cukry rozpuszczalne + skrobia; -●-, - PGA; -□-, - glicyna + seryna; -■-, - glikolan; -○-, - jabłczan; -△-, - alanina (132)

**Tabela 2.**

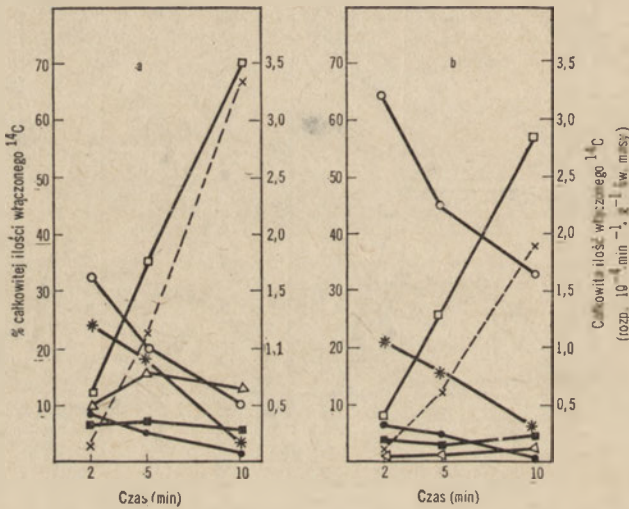
Hamowanie przez INH (1 × 10<sup>-2</sup>M) asymilacji <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> w igłach jodły w stężeniach O<sub>2</sub> 21% i 100% (132)

Stężenie O <sub>2</sub>	Ilość włączonego <sup>14</sup> C przez 20 min. rozp × min <sup>-1</sup> × g <sup>-1</sup> św. masy × 10 <sup>-7</sup>		% hamowania przez INH
	Igły kontrolne	+ INH	
21%	10,0	7,2	28
100%	4,4	1,1	75

Występujący w liściach roślin C<sub>4</sub> mechanizm asymilacji CO<sub>2</sub> warunkuje specyficzne właściwości fotosyntezy tych roślin: niski punkt kompensacyjny CO<sub>2</sub> i brak efektu Warburga w zakresie stężeń O<sub>2</sub> poniżej 21%. Działa

on wydajnie jako system transportu  $\text{CO}_2$  do komórek pochwy okołowiązkowych nawet przy niskich stężeniach  $\text{CO}_2$  i wysokich stężeniach  $\text{O}_2$ , stwarzając tam korzystne warunki dla reakcji karboksylacji RuDP.

Mechanizm ten powoduje także odmienny wpływ wysokich stężeń  $\text{O}_2$  na produkty asymilacji  $^{14}\text{CO}_2$ . Tlen w wysokich stężeniach zmniejszając natężenie fotosyntezy w liściach kukurydzy nie wpływa na włączenie  $^{14}\text{CO}_2$  do czterowęglowych kwasów dwukarboksylowych, obniża natomiast szybkość włączania radioaktywnego węgla do dalszych produktów fotosyntezy (Rys. 5). Wskazuje to, że  $\text{O}_2$  nawet w wysokich stężeniach nie działa na reakcje zlokalizowane w komórkach mezofilu, hamuje natomiast proces asymilacji i redukcji węgla przebiegający w komórkach pochwy okołowiązkowych (144). Reakcje te w wyizolowanych z liści kukurydzy komórkach pochwy okołowiązkowych są hamowane przez  $\text{O}_2$  także w stężeniach mniejszych od 21% (142).



**Ryc. 5.** Kinetyka włączania  $^{14}\text{C}$  do produktów fotosyntezy w liściach kukurydzy w a) 21% i b) 100%  $\text{O}_2$   
 (-○- - jabłczan + asparagianin; -△- - alanina; -●- - PGA; -■- - glicyna + seryna; -★- - glikolan; -□- - cukry; - - - - - całkowita ilość włączonego  $^{14}\text{C}$ ) (144)

Chociaż asymilujące tkanki kukurydzy i innych roślin typu  $\text{C}_4$  nie wydzielają  $\text{CO}_2$  na świetle i wykazują małe aktywności enzymów szlaku kwasu glikolowego, szereg danych wskazuje, że szlak ten również w nich funkcjonuje. W liściach roślin  $\text{C}_4$  kwas glikolowy jest wytwarzany i ulega przemianom. Komórki ich zawierają peroksosomy, organelle związane z przemianami tego metabolitu. Z tych względów brak wydzielania  $\text{CO}_2$  na świetle przez asymilujące tkanki roślin  $\text{C}_4$  należy tłumaczyć ponownym wiązaniem wytwarzanego  $\text{CO}_2$  (68, 94, 98, 106, 145—151).

Jednym z charakterystycznych objawów działania wysokich stężeń  $\text{O}_2$  na przemiany asymilowanego  $^{14}\text{CO}_2$  zarówno u glonów (83), roślin  $\text{C}_3$  (131, 132, 152) jak i roślin  $\text{C}_4$  (144, 153) jest znaczne zmniejszenie włączania  $^{14}\text{C}$

do alaniny. Zwiększone włączanie  $^{14}\text{C}$  do alaniny stwierdzono natomiast w ekstremalnych temperaturach: wysokich (154) jak też i niskich (155, 156). Alanina powstaje w fotosyntezie przez redukcyjną aminację PEP, którego prekursorem jest PGA. Reakcję tę w ekstremalnych temperaturach prawdopodobnie stymuluje wysoka wartość stosunku NADPH/ATP (154—156). Zmniejszona synteza alaniny w fotosyntezie przy wysokich stężeniach  $\text{O}_2$  może więc wskazywać, iż  $\text{O}_2$ , poprzez reakcję Mehlera (rozd. II), obniża ilościowy stosunek NADPH/ATP w chloroplastach.

#### IV. Funkcja tlenu w fotosyntezie

Stężenie  $\text{O}_2$  w naturalnym środowisku, a także w asymilujących tkankach roślin nie ulega większym zmianom. Zmieniają się natomiast w szerokim zakresie inne czynniki: natężenie światła, temperatura, długość dnia, dopływ  $\text{CO}_2$  (stopień otwarcia aparatów szparkowych) uwodnienie tkanek, zaopatrzenie w składniki mineralne, stężenie produktów fotosyntezy w komórkach oraz czynniki związane z fizjologicznym rytmem dobowym i rocznym. Niektóre z nich jak np. natężenie światła, temperatura i dopływ  $\text{CO}_2$  mogą zmieniać się bardzo szybko. Ponadto w cyklu rozwojowym rośliny zmienia się zapotrzebowanie na związki wytwarzane w reakcjach fotosyntezy: ATP, NADPH oraz pośrednie metabolity cyklu Calvina. Z tego powodu funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego wymaga złożonego systemu regulacyjnego, działającego na różnych poziomach organizacyjnych. Np. ilość pochłanianej energii świetlnej jest regulowana przez odpowiednie ustawienie się w stosunku do źródła światła całej rośliny, liści oraz przez układ chloroplastów w komórkach (157, 158). Może ona także zależeć od wielkości i strukturalnej organizacji jednostki fotosyntetycznej (159).

Przedstawione w poprzednich rozdziałach dane wskazują, że tlen w normalnym stężeniu również może działać na reakcje fotosyntezy. Pozwalają one na wysunięcie hipotezy, że współzawodnictwo między produktami asymilacji  $\text{CO}_2$  i tlenem o dostarczane przez fotoukłady elektrony stanowi element systemu regulacji procesu fotosyntezy, który dzięki udziałowi tlenu jest zdolny do natychmiastowej reakcji na szybko zmieniające się warunki środowiska. System ten zapewnia równowagę kolejnych etapów fotosyntezy i podporządkowane są mu zarówno reakcje fotosyntetycznego transportu elektronów jak i reakcje asymilacji i redukcji  $\text{CO}_2$ .

NADP i produkty asymilacji  $\text{CO}_2$  są bardziej efektywnymi akceptorami elektronów niż  $\text{O}_2$  (4, 30). Przy dużym natężeniu światła i ograniczonym dopływie  $\text{CO}_2$  (np. przez spowodowane deficytem wodnym zamknięcie aparatów szparkowych) zużycie produktów fotochemicznych reakcji fotosyntezy, a zwłaszcza NADPH może być bardzo małe. Wykazano, że występujący w takich warunkach nadmiar energii wzbudzenia, przekazywanej przez chlorofil jest przyczyną świetlnej inaktywacji centrów reakcji PS I

i PS II (160—163). Tlen przejmując elektrony przy nie wystarczającym dopływie  $\text{CO}_2$  może zapewniać odpływ nadmiaru energii wzbudzenia z fotoukładów i zapobiegać fotoinaktywacji ich centrów aktywnych.

Przejmowanie przez  $\text{O}_2$  elektronów od PS I (fosforylacja pseudocykliczna) może mieć również związek z regulacją stosunku NADPH/ATP. Według hipotezy Arnona i wsp. (164, 165) stosunek ten zależy od wytwarzania ATP w procesie fosforylacji cyklicznej, która mogłaby dostarczać ATP nawet przy braku zapotrzebowania na NADPH. W ostatnich latach uzyskano wiele doświadczalnych dowodów funkcjonowania fosforylacji cyklicznej *in vivo*, nie jest jednak wyjaśniona jej rola w procesie fotosyntezy. W odpowiednich warunkach doświadczalnych energia przetwarzana w fosforylacji cyklicznej może być wykorzystana w procesach asymilacji związków organicznych, pobierania jonów i w reakcjach syntezy białek. Udział jej w fotosyntezie jest jednak kwestionowany (133, 166—174).\* Fosforylację cykliczną można wykazać jedynie w warunkach beztlenowych (30), co stawia pod znakiem zapytania jej fizjologiczne znaczenie i funkcjonowanie w warunkach naturalnych. Przejmowanie przez  $\text{O}_2$  elektronów od PS za pośrednictwem ferredoksyny może mieć znaczenie przypisywane fosforylacji cyklicznej, to jest umożliwiać syntezę ATP również przy braku NADP i dalszych akceptorów elektronów (30, 33, 175). Działanie tlenu w innych miejscach fotosyntetycznego transportu elektronów (między PS II i PS I, utlenianie cytochromu  $b_{563}$ ) może być także związane z jego udziałem w regulacji tego procesu.

Wyniki badań nad wpływem  $\text{O}_2$  na fotosyntezę sugerują, że tlen atmosferyczny obok szeregu innych czynników (176) jest istotnym elementem mechanizmu regulacji enzymów aktywowanych na świetle za pośrednictwem NADPH lub ferredoksyny (rozdz. III-1). Wpływając na wytwarzanie reduktorów w świetlnych reakcjach fotosyntezy oraz na stopień redukcji grup -SH enzymów fotosyntetycznych, tlen działa przeciwnie niż światło. W systemie regulacyjnym spełniałby więc funkcję czynnika odwracalnie inaktywującego niektóre enzymy i „wylączającego” aparat fotosyntetyczny przy niskim natężeniu światła i w ciemności.

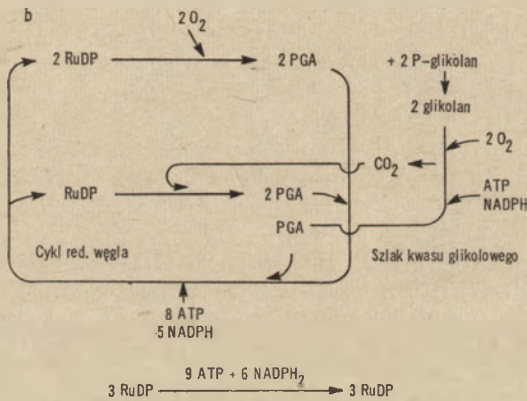
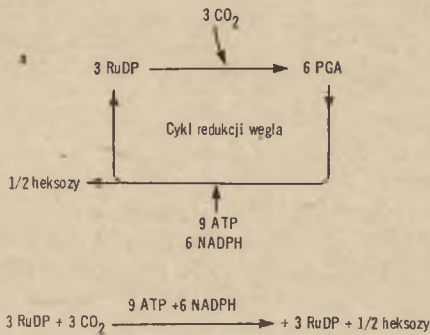
Wytwarzanie i przemiany kwasu glikolowego na świetle przy udziale  $\text{O}_2$ , niezależnie od tego na jakiej drodze związek ten powstaje z fosforanów cukrów lub cukrów, umożliwiają funkcjonowanie fotosyntetycznego transportu elektronów i cyklu redukcji węgla nawet przy braku dopływu  $\text{CO}_2$  z zewnątrz. Asymilacja i redukcja do poziomu heksoz 3 cz.  $\text{CO}_2$  wymaga 9 cz. ATP i 3 cz. NADPH (Ryc. 6a). Przy udziale  $\text{O}_2$ , karboksylazy RuDP działającej jako oksygenaza (rozdz. III-2) oraz enzymów szlaku kwasu glikolowego, produkty fotochemicznych reakcji fotosyntezy mogą być zużywane bez równoczesnej asymilacji  $\text{CO}_2$  netto. Jak wynika ze schematu

---

\* Patrz także artykuł w tym zeszycie K. Krzystyniaka nt. „Fizjologiczna rola cyklicznej fotofosforylacji”, str. 369—378.



przedstawionego na rycinie 6b pozwala to na „jałowy bieg” cyklu redukcji węgla na świetle (162). Proces ten może mieć takie samo fizjologiczne znaczenie jak przejmowanie przez  $O_2$  elektronów bezpośrednio z fotochemicznych reakcji fotosyntezy. Ponadto, jeżeli światło hamuje oddychanie ciemniowe komórek fotosyntetycznych (177—180) może on dostarczać substratów dla biosyntezy kosztem nagromadzonych cukrów, a także warunkować szereg innych procesów metabolicznych.



**Ryc. 6.** Fotosyntetyczne przemiany związków węgla w warunkach dobrego (Ryc. a) i ograniczonego (Ryc. b) dopływu  $CO_2$  w 21%  $O_2$  (163)

Działanie  $O_2$  w procesie fotosyntezy powoduje utratę części pochłoniętej energii i wytworzonych związków organicznych (7, 8, 181). W naturalnym środowisku, charakteryzującym się dużą zmiennością licznych czynników jest ono prawdopodobnie niezbędne dla optymalnego funkcjonowania metabolizmu roślin na świetle. Potwierdzają to dane wskazujące, że zużywanie  $O_2$  w procesie fotosyntezy stymuluje niektóre reakcje metaboliczne (4, 26, 143, 182—187). Wykazano, że przy wysokiej aktywności aparatu fotosyntetycznego, dużym stężeniu  $CO_2$  i intensywnym świetle  $O_2$  w stężeniach zbliżonych do 21% może stymulować również asymilację  $CO_2$  (187, 188).

Tak jak fotofosforylację cykliczną można uważać za ewolucyjny relikw (33) metabolizmu roślin żyjących w pierwotnym środowisku, zawierającym znaczenie mniej wolnego tlenu a bogatszym w CO<sub>2</sub>, to regulacyjną funkcję O<sub>2</sub> można traktować jako efekt adaptacji procesu fotosyntezy do obecnego stężenia tych gazów w atmosferze Ziemi.

Artykuł otrzymano 15.6.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 24.6.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Warburg O., (1920), *Biochem. Z.*, **103**, 188—217.
2. Gaffron H., (1940), *Am. J. Bot.*, **27**, 204—216.
3. Turner J. S., Brittain E. G., (1962), *Biol. Rev.*, 100—170.
4. Jackson W. A., Volk R. J., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 185—432.
5. Ellyard P. W., Gibbs M., (1969), *Plant Physiol.* **44**, 1115—1121.
6. Tamiya H., Huzisige H., (1949), *Acta Phytochim. (Japan)*, **15**, 83—104.
7. Björkman O., (1966), *Physiol. Plant.*, **19**, 618—633.
8. Björkman O., (1967), *Carnegie Inst. Washington Year Book*, **66**, 220—232.
9. Forrester M. L., Krotkov G., Nelson C. D., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 422—427.
10. Poskuta J., (1968), *Physiol. Plant.*, **21**, 1129—1136.
11. Hatch M. D., Slack C. R., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 141—162.
12. Black C. C. Jr., (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 253—286.
13. Forrester M. L., Krotkov G., Nelson C. D., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 428—431.
14. Poskuta J., (1969), *Physiol. Plant.*, **22**, 76—85.
15. Mehler A. H., (1951), *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 65—77.
16. Mehler A. H., (1951), *Arch. Biochem. Biophys.*, **34**, 339—351.
17. Mehler A. H., Brown A. H., (1952), *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 365—370.
18. Brown A. H., (1953), *Am. J. Bot.*, **40**, 719—729.
19. Hendrich W., (1967), *Post. Biochem.*, **13**, 311—333.
20. Frąckowiak B., (1967), *Post. Biochem.*, **13**, 355—357.
21. Butler W. L., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 309—317.
22. Duysens L. N. M., Sweers, H. E., (1963), *Plant Cell Physiol.*, Tokyo, (Special Issue), 352—372.
23. Joliet P., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 116—134.
24. Butler W. L., (1966), *Curr. Top. Bioenerg.*, **1**, 49—73.
25. Kok B., Cheniae G., (1966), *Curr. Top. Bioenerg.*, **1**, 1—47.
26. Heber U., French C. S., (1968), *Planta*, **79**, 99—112.
27. Fork D. C., Heber U. W., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 606—612.
28. Izawa S., Itoch M., Shibata K., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **75**, 349—354.
29. Good N., Izawa S., Hind G., (1966), *Curr. Top. Bioenerg.*, **1**, 76—103.
30. Heber U., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 302—319.
31. Krause G. H., Heber U., (1971), *Proc. 1<sup>st</sup> Eur. Biophys. Congr.*, wyd. Broda A., Locker H., Springer-Lederer, str. 79. Vienna: Verlag Wiener Med. Akad.
32. Gimmler H., (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, (Cyt. za 33)
33. Simonis W., Urbach W., (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 89—114.
34. Boardman N. K., Anderson J. M., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **143**, 187—203.

35. Cramer W. A., Butler W. L., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **143**, 332—339.
36. Levine R. P., Gorman D. S., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1293—1300.
37. Hiyama T., Nishimura M., Chance B., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 527—534.
38. James W. O., Leech R. M., (1964), *Proc. R. Soc., London*, **160 B**, 13—24.
39. Bannister T. T., Rice G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **162**, 555—580.
40. Calvin M., Benson A. A., (1947), *Science*, **107**, 476—480.
41. Stamieszkin I., Maleszewski S., Poskuta J., (1972), *Z. Pflanzenphysiol.*, **67**, 180—182.
42. Fager E. W., Rosenberg J. L., Gaffron H., (1950), *Fed. Proc.*, **9**, 535—542.
43. Tagasaki R. K., Gibbs H., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 991—996.
44. Miyachi S., Izawa S., Tamiya, H., (1955), *J. Biochem.*, **42**, 221—244.
45. Katoh T., Hirokawa T., Miyachi S., (1958), *J. Biochem.*, **45**, 907—912.
46. Bassham J. A., Kirk M., (1963), *Plant Cell Physiol.*, Tokyo (Special Issue) 493—504.
47. Hogetsu D., Miyachi S., (1970), *Plant Physiol.* **45**, 178—182.
48. Tamiya H., Miyachi S., Hirokawa T., (1957), Some Pre-Illumination Experiments with C<sup>14</sup> Research in Photosynthesis, wyd. Gaffron H., str. 213—223. Interscience Publishers, New York.
49. Trebst A., Eck H., Wagner S., (1963), Photosynthetic Mechanism in Green Plants, Nat. Acad. Sci., Nat. Res. Council Publ. **1145**, str. 174—194, Washington.
50. Urbach W., Hudson M. A., Ullrich W., Santarius K. A., Heber U., (1965), *Z. Naturforsch.*, **206**, 890—898.
51. Fork D. C., (1963), *Plant Physiol.*, **3**, 323—332.
52. French C. S., (1963), *Plant Cell Physiol.*, Tokyo, (Special Issue), 271—279.
53. Kouchkovsky Y. De, (1963), *Physiol. Veg.*, **1**, 15—76.
54. French C. S., Fork D. C., (1961), 5<sup>th</sup> Proc. Int. Congr. Biochem. t. 6, 122—127.
55. Ried A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 653—663.
56. Brown A. H., Weis D., (1959), *Plant Physiol.*, **34**, 224—234.
57. Weis D., Brown A. H., (1959), *Plant Physiol.*, **34**, 235—239.
58. Hoch G., Owens O. H., Kok B., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, **101**, 171—180
59. Hoch G., Owens O. H., Kok B., (1963), w La Photosynthese, str. 148—159, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
60. Ozbun J. L., Volk R. J., Jackson W. A., (1964), *Plant Physiol.*, **39**, 523—527.
61. Ozbun J. L., Volk R. J., Jackson W. A., (1965), *Crop. Sci.* **5**, 69—75.
62. Mulchi C. L., Volk R. J., Jackson W. A., (1968), *Plant Physiol.* **43**, 13.
63. Jackson W. A., Volk R. J., (1969), *Nature*, **5190**, 269—271.
64. Ellyard P. W., San Pietro A., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 1679—1683.
65. Gaffron H., (1937), *Biochem. Z.*, **292**, 241—270.
66. Turner J. S., Turner J. F., Shortman K. D., King Judith E., (1958), *Aust. J. Biol. Sci.* **11**, 336—342.
67. Gibbs M., Plaut Z., Latzko, E., Eley J., Schacter B., (1968), w Photosynthesis in Sugar Cane, red. Coombs J., str. 49—60, Tate and Lyle Ltd., London.
68. Gibbs M., (1971), w Structure and Function of Chloroplasts, red. Gibbs M., str. 169—214, Springer-Verlag, New York.
69. Wildner G. F., Criddle R. S., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 952—960.

70. Andersen W. R., Wildner G. F., Criddle R. S., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 84—90.
71. Kleinkopf G. E., Huffaker, R. C., Matheson A., (1970), *Plant Physiol.* **46**, 416—418.
72. Slack C. R., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 483—488.
73. Johnson H. S., Hatch M. D., (1970), *Biochem. J.* **119**, 273—280.
74. Ziegler H., Ziegler I., Schmidt-Clausen H. J., Müller B., Dörr I., (1969), w *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner H., t. 3, 1636—1645 (Proc. Int. Congr. Photosynthesis Res., Freudenstadt) Tübingen.
75. Buchanan B. B., Kalberer P. P., Arnon D., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 74—79.
76. Buchanan B. B., Kalberer P. P., Arnon D., (1968), *Fed. Proc.* **27**, 344.
77. Latzko E., Gibbs M., (1969) w *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner H., t. 3, 1624—1630 (Proc. Int. Congr. Photosynthesis Res., Freudenstadt), Tübingen.
78. Holzer H., Duntze W., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 345—374.
79. Hatch M. D., Turner J. F., (1960), *Biochem. J.*, **76**, 556—562.
80. Zucker M., (1972), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 133—156.
81. Wilson A. T., Calvin M., (1955), *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 5948—5957.
82. Tolbert N. E., Zill L. P., (1956), *J. Biol. Chem.*, **222**, 895—906.
83. Bassham J. A., Kirk M., (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 376—380.
84. Pritchard G. G., Griffin W. J., Whittingham C. P., (1962), *J. Exp. Bot.*, **13**, 176—184.
85. Coombs J., Whittingham C. P., (1966), *Phytochemistry*, **5**, 643—651.
86. Orth G. M., Tolbert N. E., Jimenez E., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 143—147.
87. Hess J. L., Tolbert N. E., (1967), *Plant Physiol.* **42**, 371—379.
88. Whittingham C. P., Coombs J., Marker A. F. H., (1967), w *Biochemistry of Chloroplast*, red. Goodwin T. W., t. 2, 155—173, Academic Press, London.
89. Zelitch J., Day P. R., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 289—291.
90. Lord M. J., Merrett M. J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 543—544.
91. Nelson E. B., Tolbert N. E., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 263—270.
92. Lelson E. B., Tolbert N. E., Hess J. L., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 55—59.
93. Zelitch I., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 3077—3081.
94. Zelitch I., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 1299—1303.
95. Goldsworthy A., (1970) *Bot. Rev.*, **36**, 321—340.
96. Poskuta J., (1970), *Wiad. Bot.*, **14**, 43—54.
97. Hatch M. D., Osmond C. B., Slatyer R. O., (red), (1971), *Photosynthesis and Photorespiration*, Wiley-Interscience, New York.
98. Rabson R., Tolbert N. E., Kearney P. C., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 154—163.
99. Baldwin R. L., Tolbert N. E., Wood W. A., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 172—175.
100. Ongun A., Stocking C. R., (1965), *Plant Physiol.*, **40**, 819—824.
101. Mifflin B. J., Marker A. F. H., Whittingham C. P., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **120**, 266—273.
101. Hess J. L., Tolbert N. E., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 5705—5711.
103. Marker A. F. H., Whittingham C. P., (1966), *Proc. R. Soc., ser. B.* **165**, 473—485.
104. Kisasi T., Tolbert N. E., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 242—250.
105. Duve C. de, (1969), *Proc. R. Soc. Ser. B*, **173**, 71—83.

106. Tolbert N. E., Oeser A., Yamazaki R. K., Hageman R. H., Kishiki T., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 135—147.
107. Tolbert N. E., (1971), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 45—74.
108. Zelitch I., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 109—113.
109. Warburg O., Krippahl G., (1960), *Z. Naturforsch.*, **15 b**, 197—199.
110. Tanner H. A., Brown T. E., Eyster C., Treharne R. W., (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 205—210.
111. Zelitch I., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1869—1876.
112. Schou L., Benson A. A., Bassham J. A., Calvin M., (1950), *Physiol. Plant.*, **3**, 487—495.
113. Stiller M., (1962), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **13**, 151—170.
114. Hess J. L., Tolbert N. E., Pike L. M., (1967), *Planta*, **74**, 278—285.
115. Plaut Z., Gibbs M., (1970), *Plant Physiol.*, **45**, 470—474.
116. Marker A. F. H., Whittingham C. P., (1967), *J. Exp. Bot.* **18**, 732—379.
117. Whittingham C. P., Bermingham M., Hiller R. G., (1963), *Z. Naturforsch.*, **18**, 701—706.
118. Shain Y., Gibbs M., (1971), *Plant Physiol.* **48**, 325—330.
119. Telfer A. R., Cammack R., Evans M. C., (1970), *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **10**, 21—24.
120. Prochoroff N. N., Katterman R., Holzer H., (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 477—481.
121. Richardson K. E., Tolbert N. E., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 1285—1290.
122. Thompson C. M., Whittingham C. P. (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 260—269.
123. Bradbeer J. W., Anderson C. M. A., (1967), w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. Goodwin T.W., Academic Press, New York, str. 175—179.
124. Ogren W. L., Bowes G., (1971), *Nature, New Biology*, **230**, 159—161.
125. Bowes G., Ogren W. L., Hageman R. H., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 716—722.
126. Lorimer G. H., Andrews T. J. Tolbert N. E., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 461.
127. Ryan F. J., Setsuko Omata, Han San Ku, Tolbert N. E., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 40,
128. Laing W. A., Ogren W. L., Hageman R. H., (1973), *Plant Physiol.* **51**, 40,
129. Andrews T. J., Lorimer G. H., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry*, **12**, 11—20.
130. Zelitch I., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 299—305.
131. Maleszewski S., Nelson C. D., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 20,
132. Maleszewski S., Lewanty Z., (1971), *Z. Pflanzenphysiol.* **67**, 305—310.
133. Pritchard G. G., Whittingham C. P., Griffin W. J., (1961), *Nature*, **190** 533—554.
134. Farineau J., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M.D., Osmond C.B., Slatyer Wiley-Interscience, New York, str. 202—210.
135. Huber C. S., Kanai R., Edwards G. E., (1973), *Planta (Berl.)*, **113**, 53—60.
136. Slack C. R., Hatch M. D., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 660—665.
137. Hatch M. D., Slack C. R., Bull T. A., (1969), *Photochemistry*, **8**, 697—706.
138. Nagy A. H., Pacséry M., Faludi-Daniel A., (1971), *Physiol. Plant.*, **24**, 301—305.
139. Black C. C., Edwards G. E., Kanai R., Mollenhauer, (1971), 2<sup>nd</sup> International Congress on Photosynthesis, Stresa, Italy, str. 1745—1757.
140. Edwards G. E., Kanai R., Black C. C., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 278—285.
141. Buchanan B. B., Schürmann P., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 157—159.

142. Chollet R., Ogren W. L., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 2062—2066.
143. Bowes G., Ogren W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **108**, 2171—2176.
144. Lewanty Z., Maleszewski S., Poskuta J., (1971). *Z. Pflanzenphysiol.*, **65**, 4<sup>o</sup>9—472.
145. Zelitch I., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1623—1631.
146. Kisaki T., Tolbert N. E., (1970), *Plant Cell Physiol.* **11**, 247—258.
147. Osmond C. B., Harris B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta.* **234**, 270—275.
148. Osmond C. B., (1971), 2<sup>nd</sup> International Congress on Photosynthesis, Stresa, Italy, str. 2233—2239.
149. Volk R. J., Jackson W. A., (1971), *Plant Physiol.*, **49**, 218—223.
150. Downton W. J. S., Tregunna E. B., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 923—929.
151. Moss N. D., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 1463—1464.
152. Voskresenskaya N. P., Wiil Y. A., Grishina G. S., Pärnik T. R., (1970). *Photosynthetica*, **4**, 1—8.
153. Grishina G. S., Maleszewski S., Frankiewicz A., Voskresenskaya N. P., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**, 189—197.
154. Chliustova T. M., Tarczewski A., (1972), *Physiol. Rast.*, **19**, 251—257.
155. Tarczewski A., (1964) *Physiol. Rast.*, **2**, 232—239.
156. Maciejewska U., Maleszewski St., Kacperska-Palacz A., (1974), *Bull. Acad. Pol. Sci. ser. Biol.* (w druku).
157. Zurzycki, J., (19<sup>o</sup>2), w Handbuch der Pflanzenphysiologie, red. Ruhland W. **17**, 940—978, Springer-Verlag, Berlin.
158. Mayer F., (1971), w Structure and Function of Chloroplasts, red. Gibbs M., str. 35—49, Springer-Verlag, New York.
159. Schmid G. H., Gaffron J., (1968), *Gen. Physiol.*, **52**, 212—220.
160. Jones L. W., Kok B., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1037—1043.
161. Jones L. W., Kok B., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1044—1049.
162. Björkman O., Boardman N. K., Anderson J. M., Thorne S. W., Goodchild D. J., Pyliotis N. A., (1972), Carnegie Inst. Washington, Year Book **71**, str. 115—135.
163. Osmond C. B., Björkman O., (1972), Carnegie Inst. Washington, Year Book **71**, str. 141—148.
164. Arnon D. I., Whatley E. R., Allen M. B., (1958), *Science*, **127**, 1026—1034.
165. Arnon D. I., Tsujimoto H. Y., McSwain B. D., (1967), *Nature*, **214**, 562—566.
166. Kandler O., 1954), *Z. Naturforsch.*, **96**, 625—644.
167. MacRobbie E. A. C., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 64—73.
168. Wiessner W., (19<sup>o</sup>5), *Nature*, **205**, 56—57.
169. Syrett P. J., (1966), *J. Exp. Bot.* **17**, 641—654.
170. Ramirez J. M., Del Campo F. F., Arnon D. I., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **59**, 606—612.
171. Jeschke W. D., (1967), *Planta*, **73**, 161—174.
172. Tanner W., Löffler M., Kandler O., (1969), *Plant Physiology*, **44**, 422—428.
173. Tanner W., Kandler O., (1969), w Progress in Photosynthesis Research, red. Metzner., t. 3 str. 1217—1223 (Proc. Int. Congr. Photosynthesis Res., Freudenstadt), Tübingen.
174. Klob W., Kandler O., Tanner W., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 825—827.
175. Hber U., (1973), *Biochem. Biophys. Acta*, **305**, 140—152.
176. Preiss J., Kosuge T., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 433—466.
177. Calvin M., Massini P., (1952), *Experientia*, **8**, 445—457.
178. Nielsen E. S., (1955), *Physiol. Plant.*, **8**, 945—953.

179. Nishida K., (1962), *Plant Cell. Physiol.* **3**, 111—124.
180. Ozbun J. L., Volk R., Jackson W. W., (1964), *Plant Physiol.* **39**, 523—527.
181. Goldsworthy A., (1969), *Nature*, **224**, 501—502.
182. Warburg O., Krippahl J., Völker W., Gewitz H., (1959), *Z. Naturforsch.* **146**, 712—715.
183. Walker D. A., Zelitch I., (1963), *Plant Physiol.* **38**, 390—396.
184. Urbach W., Fork D. C., (1967), *Carnegie Inst. Washington, Year Book* **66**, str. 390—395.
185. Akita S., Moss D. N., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 601—603.
186. Vidaver W., (1965), *Carnegie Inst. Washington, Year Book* **64**, str. 395—397.
187. Fedina I. S., Vaklinova S. G., (1973), *Com. Ren. Acad. Bul. Sci.*, **26**, 1681—1684.
188. Will J., Isaac A., Oja A., Parnik T., (1972), *Dokl. Akad. Nauk USSR* **204**, 1269—1273.





M. GABRIELA SARZAŁA\*

## Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum (mięśni szkieletowych)

### Structure and Function of Sarcoplasmic Reticulum Membranes

Sarkoplazmatyczne retikulum (SR) mięśni szkieletowych stanowi system błon otaczających miofibryle. Główną jego funkcją jest regulacja poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce mięśniowej w cyklu skurczowo-rozkurczowym (1—3).

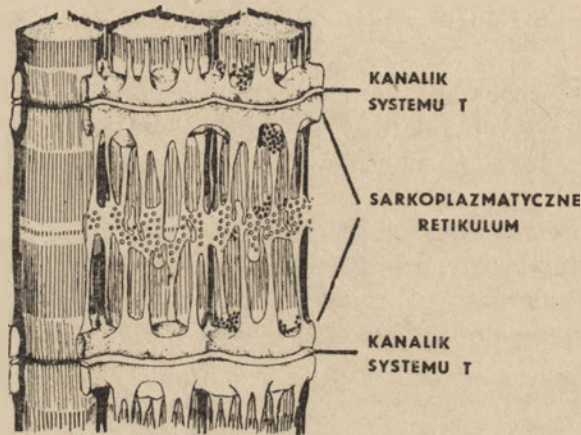
Mechanizm skurczu mięśnia szkieletowego omówiono niedawno w dwu artykułach opublikowanych w *Postęпах Biochemii* (4, 5). Obecnie przedstawiamy molekularną organizację błon sarkoplazmatycznego retikulum i udział ich poszczególnych składników w procesie transportu  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce mięśniowej.

System błon SR, opisany po raz pierwszy przez Verattiego w 1902 roku (6), dokładnie poznano dopiero na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym (7, 8). W mięśniach szkieletowych tworzy on siateczkę cienkich kanalików i cystern otaczających miofibryle (7—13) (Ryc. 1). Kanaliki sarkoplazmatycznego retikulum biegają równolegle do osi włókien mięśniowych. Osobny układ poprzecznych kanalików otaczających włókna mięśniowe tworzy, tzw. system T (*transverse tubules*) pochodzący z inwaginacji błony powierzchniowej mięśni — sarkolemy (11). W miejscu położenia systemu T kanaliki SR rozszerzają się tworząc cysterny. Dwie cysterny należące do sąsiednich kanalików SR i położonego między nimi kanalika poprzecznego tworzą tak zwane triady. Pomiedzy tymi dwoma systemami błon nie ma bezpośredniego połączenia. Wykazano istnienie różnic gatunkowych w lokalizacji triad (11—13). Występują one mianowicie bądź na poziomie linii Z u niższych kręgowców bądź, jak u wyższych kręgowców, na granicy prążków A i I. Ponieważ depolaryzacja błony komórkowej powoduje lokalny skurcz sarkomerów w miejscu występowania systemu T, już dawno wysunięto przypuszczenie (14), że system ten stanowi przekaznik, poprzez który stan pobudzenia błony zewnętrznej ulega przeniesieniu do SR, a więc do wnętrza komórki. Mimo bardzo intensywnych badań mechanizm uwalniania wapnia z sarkoplaz-

---

\* Dr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.

matycznego retikulum jest ciągle przedmiotem dyskusji. Szereg danych wskazuje, że bezpośrednią odpowiedzią na impuls nerwowy jest zmiana potencjału błony komórkowej. Powoduje ona uwolnienie wapnia i pojawianie się go w sarkoplazmie w formie zjonizowanej. Przypuszczenie to potwierdza, na przykład, uwalnianie wapnia do środowiska z pęcherzyków SR umieszczonych w polu elektrycznym (15) lub po zmianie środowiska jonowego (16). Bezpośrednio wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w sarkoplazmie w wyniku elektrycznego pobudzenia wykazali Jöbbs i O'Connor (17) podając w iniekcji do żywego mięśnia żaby mureksyd — barwnik wiążący wapń.



Ryc. 1. Przekrój przez włókno mięśniowe żaby (12)  
Schemat budowy sarkoplazmatycznego retikulum.

O przemieszczaniu  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce mięśniowej zależnie od jej stanu funkcjonalnego świadczą przekonywująco wyniki Winegrada. Na autoradiogramach skrawków mięśni inkubowanych z  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  obserwował on przemieszczanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w różnych stanach pracy mięśnia (18—20). W czasie spoczynku mięśnia wapń znajdował się w cysternach SR wchodzących w skład triad, podczas gdy w mięśniu pobudzonym elektrycznie obecny był również w podłużnych kanalikach oraz na poziomie prążka A.

Badania *in vitro* nad rolą sarkoplazmatycznego retikulum w regulacji stężenia wapnia w komórce mięśniowej zapoczątkowały prace Marsh'a (21, 22). Zaobserwował on, że płukanie homogenatów mięśniowych zwiększa zdolność miofibryli do superprecypitacji, a więc do skurczu (patrz pozycja 4), co świadczyło, że czynnik powodujący rozkurcz mięśni znajduje się we frakcji rozpuszczalnej. Czynnik ten nazwany „czynnikiem rozkurczowym” hamował aktywność miofibrylarnej ATP-azy i powodował rozkurcz ekstrahowanych glicerolem włókien mięśniowych, które w obecności ATP pozostawały w stanie skurczu (22—24). Dalsze badania wykazały (25, 26), że cała „aktywność rozkurczowa” znajduje się we frak-

cji subkomórkowej mięśni odpowiadającej frakcji mikrosomalnej innych tkanek. Frakcja ta zawiera pęcherzyki tworzące się z fragmentów sarkoplazmatycznego retikulum powstałych podczas homogenizacji tkanki mięśniowej. Okazało się, że pęcherzyki te działają podobnie do chelatorów wapnia takich, jak EGTA czy EDTA, usuwają z sarkoplazmy jony wapnia potrzebne do aktywacji ATP-azy aktomiozynowej (27).

Izolowanie pęcherzyków błon SR (mikrosomów) z homogenatów mięśniowych przeprowadza się drogą różnicowego (28) lub zonalnego (29) wiorowania. Na ogół zbiera się frakcję sedimentującą między 8 000—30 000xg. W celu usunięcia fragmentów miofibryli mikrosomy ekstrahuje się 0,6M roztworem KCl (30). Zanieczyszczenie fragmentami innych błon komórkowych można usunąć przez oczyszczenie frakcji mikrosomalnej w nieciągłym (31) lub ciągłym gradiencie sacharozy (32, 33).

Tak izolowane pęcherzyki błon SR (mikrosomy) posiadają specyficzną zdolność do aktywnego transportu i akumulacji wapnia. Stanowią doskonały model do badań nad aktywnym transportem jonów w ogólności, a także ze względu na bardzo wyspecjalizowaną funkcję i stosunkowo prosty skład białkowy i lipidowy wygodny obiekt do badań struktury błon biologicznych.

W ostatnich latach dzięki użyciu nowoczesnych metod fizykochemicznych otrzymano szereg informacji o molekularnej organizacji błon SR, ruchliwości poszczególnych składników w błonie, zmianach fazy lipidowej komponenty błon oraz zmianach konformacji składników błony w czasie transportu wapnia.

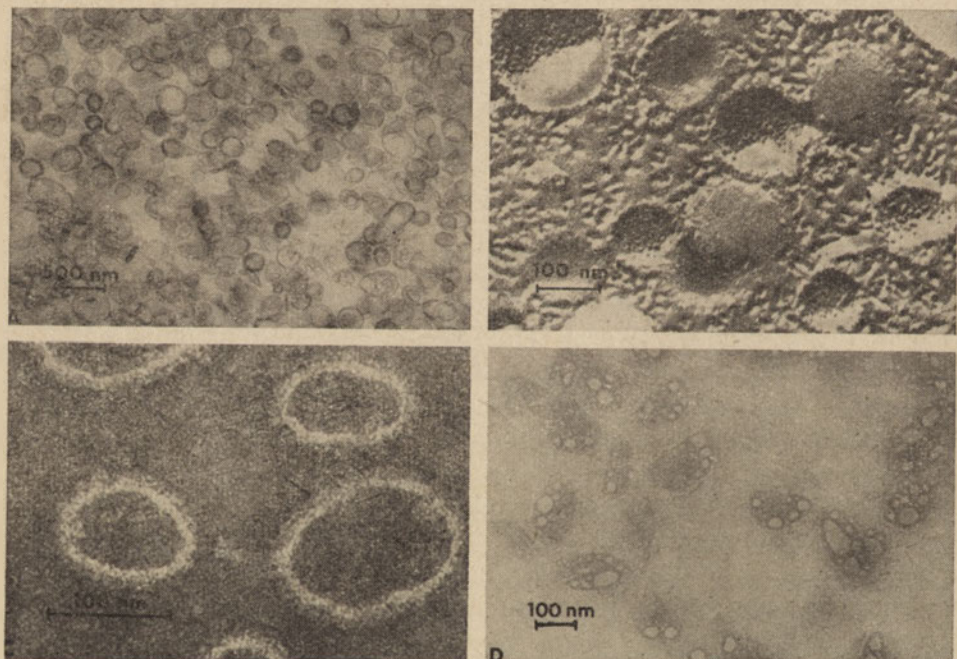
## I. Struktura błon sarkoplazmatycznego retikulum

Fragmenty błon SR tworzą zamknięte pęcherzyki o średnicy od 300—2000Å (Ryc. 2A). Stosując technikę ultracienkich skrawków stwierdzono, że pęcherzyki otacza pojedyncza błona o grubości 60—70Å o trójwarstwowej strukturze (33—37). Sądzi się, że wewnątrz pęcherzyków jest albo puste, albo zawiera bliżej niezidentyfikowane białko.

Zarówno morfologicznie jak i funkcjonalnie błona SR jest asymetryczna. Istnieją na przykład różnice w ilości grup SH pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną powierzchnią błony. Jak wykazali Hasselbach i Elfvin (34), większość grup SH znajduje się na zewnętrznej powierzchni. Asymetryczne ułożenie białek w błonach SR wykazano ostatnio również metodą dyfrakcji promieni X (38).

Przy użyciu techniki barwienia negatywowego (33—35, 39—41) na zewnętrznej powierzchni błony zaobserwowano obecność warstwy granularnej składającej się z buławek o średnicy około 40Å (Ryc. 2C). Odległość poszczególnych buławek wynosi około 90Å.

Dla lepszego poznania struktury błon SR przyczyniły się ostatnio badania, w których stosowano technikę *freeze-etching* (40, 41). Technika ta polega na bardzo szybkim zamrożeniu badanego materiału, rozłupaniu i odsublimumowaniu lodu w wysokiej próżni oraz wykonaniu przez napylanie platyną i węglem replik pękniętych powierzchni. Otrzymane repliki bada się przy pomocy mikroskopu elektronowego. Branton w roku 1969 (42) wykazał, że w efekcie zastosowania tej techniki pęknięcie następuje wewnątrz błony w jej rejonie hydrofobowym. Zdjęcia przedstawiają przeto wewnętrzne powierzchnie rozłupanych błon. Na ogół po rozłupaniu błon stwierdza się na jednej z wewnętrznych powierzchni obecność regularnie ułożonych cząstek, a na drugiej powierzchni błony odpowiadające im wielkością wgłębienia. Wykazano, że sztuczne błony lipidowe badane tą techniką mają zupełnie gładkie powierzchnie. Przypuszcza się więc, że widoczne w błonach biologicznych cząstki o mniejszej lub większej średnicy odpowiadają globularnym białkom błon. Również po rozłupaniu błon SR obserwowano cząstki o średnicy około 75—90Å występujące głównie na wklęsłej płaszczyźnie błony pęcherzyka (Ryc. 2B) (40, 41).



Ryc. 2. Obrazy mikroskopowe pęcherzyków SR

- A — badane techniką ultracienkich skrawków (33)  
 B — badane techniką *freeze-etching* (22),  
 na wklęsłej powierzchni widoczne cząstki o średnicy 90 Å.  
 C — preparaty barwione negatywowo — na powierzchni pęcherzyków widoczne buławki o średnicy 40Å (33).  
 D — pęcherzyki SR naładowane wapniem barwione negatywowo wewnątrz pęcherzyków widoczne kryształy szczawianu wapnia (33).

### II-1. Transport i wiązanie wapnia

Stężenie jonów wapnia w sarkoplazmie komórki mięśniowej będącej w stanie rozkurczu jest bardzo niskie, poniżej  $10^{-6}M$ , natomiast cały zjonizowany wapń zmagazynowany jest w kanalikach i cysternach sarkoplazmatycznego retikulum (1).

Izolowane pęcherzyki błon SR powstałe po fragmentacji kanalików i cystern pobierają znaczne ilości jonów wapnia na koszt ATP. Aktywny transport jonów wapnia przeprowadza stymulowana jonami  $Mg^{2+}$  ATP-aza (1—3, 26, 27, 43, 44). Niektórzy autorzy tę zależną od energii akumulację nazywają specyficznym wiązaniem (45). Aktywne pęcherzyki mogą pobrać około 150nmoli  $Ca^{2+}$  na mg białka, a stała wiązania wynosi około  $4 \times 10^6 M^{-1}$ . Czynniki precypitujące wapń, takie jak szczawian, pozwalają wielokrotnie zwiększyć pobieranie  $Ca^{2+}$  przez pęcherzyki SR do wartości około 6 $\mu$ moli wapnia na mg białka mikrosomalnego. W tych warunkach w pęcherzykach gromadzą się kryształy szczawianu wapnia (Ryc. 2D) (33), a stężenie wapnia osiąga wartość  $5 \times 10^{-4}M$ , jest więc kilka tysięcy razy wyższe niż w środowisku zewnętrznym (1—3). Niezależnie od transportu wapnia analizowano również wiązanie tych jonów przez błony SR. Z krzywych *Scatcharda* wynika, że w nieobecności ATP, a w obecności 100mM KCl oraz 5mM  $MgCl_2$ , eliminujących niespecyficzne wiązanie, ekstrapolowana maksymalna ilość wapnia wiązana przez błony SR wynosi 10—15nmoli na mg białka a obliczona stała wiązania koło  $1 \times 10^6 M^{-1}$ . Wiązanie niespecyficzne (mierzone w nieobecności KCl i  $MgCl_2$ ), o podobnej stałej powinowactwa, jest znacznie większe i wynosi koło 100nmoli wapnia na mg białka (45—50).

Wapń pobierany przez pęcherzyki SR nie ulega samoistnemu wypływowi, chyba że błona pęcherzyków ulega zniszczeniu i staje się nieuszczelna.

### II-2. Wiązanie nukleotydów i wymiana ATP/ADP

Mikrosomy mięśniowe wiążą ATP i ADP (49, 50) i katalizują reakcję wymiany grupy fosforanowej między tymi dwoma nukleotydami (27, 49, 51, 52). Maksymalna ilość ATP wiązanego przez mikrosomy wynosi 1—1,6nmola, maksymalna zaś ilość wiązanego ADP 2—5nmoli na mg białka. W optymalnych warunkach szybkość wymiany ATP i ADP jest kilkakrotnie większa niż szybkość hydrolizy ATP. Wymianę tę katalizują jony wapnia.

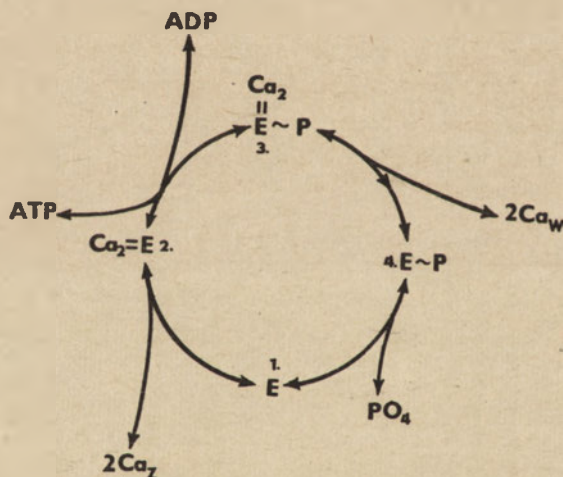
### II-3. Ufosforylowany intermediat

W czasie transportu  $Ca^{2+}$  do wnętrza pęcherzyków SR połączonego z rozpadem ATP powstaje ufosforylowany intermediat (53, 54). Doświadczalnie jego powstawanie wykazano po inkubacji mikrosomów w obec-

ności  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$ . Związek ten, stabilny w pH 2—5, ulega szybko nieenzymatycznej hydrolizie w pH alkalicznym. Wzrost szybkości rozpadu ufosforylowanego intermediatu w alkalicznym pH lub w obecności hydroksylaminy sugeruje, że wiązanie między fosforanem a białkiem jest typu acylowego. Poziom ufosforylowanego pośrednika powstającego w błonach SR jest w obecności 5mM  $\text{Mg}^{2+}$  bardzo niski i wynosi mniej niż 0,1nmola na mg białka, natomiast w obecności 0,01—1mM  $\text{Ca}^{2+}$  wzrasta do 1—4nmola na mg (53, 55). Powstawanie ufosforylowanego intermediatu jest procesem bardzo szybkim, tak że maksymalny stały poziom w błonach SR osiąga on w ciągu kilku sekund.

#### II-4. Aktywne uwalnianie wapnia

W ostatnich latach stwierdzono odwracalność aktywnego transportu  $\text{Ca}^{2+}$  przez błony sarkoplazmatycznego retikulum (56—59). Naładowane wapniem pęcherzyki SR, w nieobecności ATP a w obecności ortofosforanu uwalniają zakumulowany wapń. Uwalnianiu wapnia towarzyszy synteza ATP a dodanie ADP przyspiesza ten proces. Kierunek translokacji wapnia determinuje równowaga chemicznego i fizykochemicznego potencjału między stężeniem ATP i  $\text{Ca}^{2+}$  w środowisku a stężeniem ADP,  $\text{PO}_4^{2-}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  wewnątrz pęcherzyków. Translokacja  $\text{Ca}^{2+}$  z pęcherzyków do środowiska zachodzi również za pośrednictwem ufosforylowanego intermediatu. W tym



MAKINOSE 73

**Ryc. 3.** Schemat obrazujący transport  $\text{Ca}^{2+}$  w pęcherzykach SR i zmiany funkcjonalne ATP-azy podczas tego procesu (59)

- 1., 2., 3., 4., — różne stany funkcjonalne transportującej wapń ATP-azy,  
 $\text{Ca}_z$  — jony wapnia w środowisku zewnętrznym,  
 $\text{Ca}_w$  — jony wapnia wewnątrz pęcherzyków.

przypadku ATP-aza ulega fosforylacji w obecności ortofosforanu, a nie jak w przypadku transportu do wewnątrz na koszt ATP. Powstały ufosforylowany intermediat wykazuje te same właściwości co intermediat powstający w obecności ATP. Przeprowadzone ostatnio dokładne pomiary (57) wykazały, że w błonach SR jednemu miejscu fosforylacji odpowiada jedno miejsce wiązania MgATP oraz dwa miejsca wiązania wapnia. Zgodnie z tym proporcjami zaproponowano następujący schemat obrazujący zasadnicze etapy translokacji  $\text{Ca}^{2+}$  i zmian funkcjonalnego stanu ATP-azy podczas transportu  $\text{Ca}^{2+}$  (Ryc. 3) (59). Transport wapnia do środka pęcherzyków rozpoczyna się, gdy enzym ten (stan 1) wiąże dwa jony wapnia na zewnętrznej powierzchni błony pęcherzyka SR (stan 2). Następnie w obecności ATP ma miejsce fosforylacja enzymu i powstaje kompleks ufosforylowanego intermediatu z  $\text{Ca}^{2+}$  (stan 3). Z kolei z tego kompleksu po wewnętrznej stronie błony pęcherzyka uwalniają się jony wapnia i enzym przechodzi w stan 4, po czym następuje jego defosforylacja i powrót do stanu 1-go. Reakcje prowadzące do powstania stanu 2-go i 3-go zachodzą na zewnętrznej powierzchni błony pęcherzyka, reakcja prowadząca do powstania stanu 4-go na wewnętrznej, nie znamy natomiast miejsca zachodzenia reakcji powstawania stanu 1-go.

### III. Skład chemiczny i rola poszczególnych składników błon SR

#### III-1. Lipidy

Podobnie jak w przypadku większości wewnętrznych błon komórek zwierzęcych około 50% masy błon SR stanowią lipidy, (33, 61—70), w tym fosfolipidy (PL) stanowią od 75 do 85%. Głównym składnikiem fosfolipidowym są lecytyny (około 75% wszystkich fosfolipidów); resztę stanowią fosfatydyloetanolaminy (10—15%) oraz fosfatydyloinozytol i fosfatydyloseryna, których zawartość nie przekracza kilku procent (60—66). Wszystkie te fosfolipidy są niejednorodne, złożone z kilku rodzajów molekularnych (68, 69). Na szczególną uwagę zasługuje duża zawartość fosfolipidów alkilowych (66, 69).

Wyniki dotyczące zawartości lipidów obojętnych w błonach SR są rozbieżne; podawano wartości sięgające od 3—20% całkowitej ilości lipidów (33, 61—69), w tym cholesterol stanowi jedynie około 5—7%. Niektórzy autorzy (64, 67) sądzą nawet, że lipidy obojętne znajdowane w błonach SR pochodzą z zanieczyszczeń.

Fosfolipidy błon SR zawierają stosunkowo dużo różnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (69, 71). Dzięki znacznej zawartości kwasów wielonienasyconych, oraz niskiej zawartości cholesterolu błony SR charakteryzują się szczególnie płynną strukturą (72). Przejście lipidów tych błon z fazy stałego kryształu w kryształ płynny (*transition phase*) następuje już w stosunkowo niskiej temperaturze, około 25°C (73).

Duży postęp w badaniach molekularnej organizacji błon osiągnięto po wprowadzeniu do badań techniki elektronowego rezonansu spinowego (ESR) (74—77) oraz związków piętnowanych znacznikami spinowymi (angielski termin *spin labels*) zawierającymi wolne rodniki w reszcie nitroksydowej. Do badań struktury i molekularnej organizacji lipidowego składnika błon używano kwasów tłuszczowych zawierających reszty nitroksydowe w różnych pozycjach łańcucha węglowodorowego (72) lub lecytyny piętnowanej w grupie cholinowej (tzw. TEMPO-choliny) (75). Stwierdzono (78), że piętnowane spinem kwasy tłuszczowe penetrujące do błon pęcherzyków SR wykazują dużą ruchliwość. Widmo cząsteczki „piętnowanej spinem” ma charakter anizotropowy jeżeli grupa nitroksydowa znajduje się blisko polarnego końca łańcucha kwasu tłuszczowego. Kiedy zaś grupa nitroksydowa znajduje się bliżej grupy metylowej kwasu tłuszczowego, widmo wykazuje strukturę nieuporządkowaną. Wyniki te świadczą, że część cząsteczki kwasu tłuszczowego znajdująca się bliżej polarnego końca łańcucha na skutek interakcji z innymi cząsteczkami lipidów, lub interakcji z białkami jest do pewnego stopnia „unieruchomiona”, podczas gdy część łańcucha od strony grupy metylowej, znajdująca się w hydrofobowym rejonie błony, jest „wolna” i charakteryzuje się dużą ruchliwością (78).

Ruchliwość piętnowanych spinem kwasów tłuszczowych dodanych do błon SR pozbawionych lipidów jest ograniczona, co wskazuje, że o „płynności” struktury błon decyduje ich lipidowy składnik (78).

McC onnel i wsp. (75—77) używając piętnowanych spinem analogów fosfatydylocholiny stwierdzili, że dyfuzja tego związku do błon sarkoplazmatycznego retikulum zachodzi niemalże tak szybko jak w błonach sztucznych (liposomach). Wielkość stałej dyfuzji cząsteczek lecytyny zawierających TEMPO-cholinę świadczy o możliwości zachodzenia ruchów w płaszczyźnie lateralnej błony. Fosfolipidy dodane w odpowiedniej formie do pęcherzyków SR dyfundują w głąb błon i penetrują w dwumolekularne warstwy fosfolipidów. Wyniki te świadczą, że można zmieniać w błonach biologicznych stosunek fosfolipidów do białek.

Obecność w błonach SR dwumolekularnej warstwy lipidów przez którą penetrują białka globularne wykazano również metodą dyfrakcji promieni X (38).

### III-2. Rola fosfolipidów w specyficznej funkcji błon SR

Aktywność wielu enzymów powiązanych z błonami zależy od obecności fosfolipidów (79—81). W badaniach mających na celu ustalenie roli fosfolipidów w funkcji błon i aktywności enzymów stosuje się różne metody usuwania fosfolipidów i ponownego ich dodawania. Stwierdzono, że wymagania enzymów związanych z błonami w stosunku do określonych fosfolipidów są bardzo różne (81). Aktywność niektórych enzymów reakty-



wowana jest jedynie przez kwaśne fosfolipidy. Wynika to prawdopodobnie stąd, że interakcja lipid-białko jest w tym przypadku typu elektrostatycznego. Gdy interakcja lipid-białko jest typu hydrofobowego, działanie fosfolipidów polega na zapewnieniu hydrofobowego środowiska i utrzymaniu określonej konformacji białka. W takim przypadku kwasy tłuszczowe lub nawet detergenty mogą zastąpić fosfolipidy w zachowaniu aktywności niektórych enzymów związanych z błonami (81).

Do usunięcia lipidów z błon biologicznych używa się bądź rozpuszczalników organicznych, bądź fosfolipaz działających w sposób bardziej łagodny, a zarazem selektywny. Według obecnie przyjętej nomenklatury (82) rozróżniamy cztery fosfolipazy:  $A_1$ ,  $A_2$ , C i D. Fosfolipaza  $A_1$  odszczepia kwas tłuszczowy z pozycji 1 fosfolipidu, w wyniku czego powstaje 2-acylo-lizofosfolipid i nasycony kwas tłuszczowy. Fosfolipaza  $A_2$  odszczepia kwas tłuszczowy z pozycji 2 dając w efekcie 1-acylo-lizofosfolipid i nienasycony kwas tłuszczowy. W tkankach zwierzęcych występują obie fosfolipazy. Fosfolipaza C odszczepia od fosfolipidów ufosforylowaną zasadę, przekształcając je w dwuglicerydy. Fosfolipaza D zaś odszczepia zasadę azotową, a produktem hydrolizy jest kwas fosfatydowy.

Wykazano, że obecność fosfolipidów jest również niezbędnym warunkiem prawidłowego funkcjonowania błon SR (2, 28—30). Zależnie od użytej metody odlipidowania następuje bądź całkowite zahamowanie transportu i akumulacji  $Ca^{2+}$  przez pęcherzyki SR, bądź rozprzęgnięcie aktywności ATP-azy i transportu  $Ca^{2+}$ .

Zarówno kwasy tłuszczowe jak i lizolecytyna powstałe w wyniku trawienia mikrosomów mięśniowych fosfolipazą  $A_2$  pozostają jednak nadal związane z błonami. Związki te mając właściwości detergentów zmieniają znacznie strukturę błon, co w konsekwencji powoduje wydłużenie się pęcherzyków i ich fragmentację (83).

W wyniku długotrwałej inkubacji mikrosomów z fosfolipazą  $A_2$  w obecności albuminy surowicy wiążącej zarówno kwasy tłuszczowe jak i lizofosfolipidy i następnym kilku płukaniach roztworem albuminy można prawie całkowicie odlipidować błony SR, nie powodując denaturacji białek (84). Tak odlipidowane mikrosomy nie akumulują wapnia, zahamowana jest również aktywność ATP-azy. Natomiast krótkotrwałe trawienie błon SR fosfolipazą  $A_2$  powoduje rozprzęgnięcie zdolności do zatrzymywania pobranego wapnia i aktywności stymulowanej wapniem ATP-azy (65, 76, 87). Jest to wynikiem działania niewielkiej ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych, których detergentowe właściwości zwiększają przepuszczalność błony a zatem zwiększają też bierny wpływ wapnia. W ich obecności pęcherzyki SR są również niezdolne do aktywnego uwalniania wapnia i sprzężonej z tym syntezy ATP (44). Podobne zjawisko rozporzęgnięcia zdolności do akumulacji  $Ca^{2+}$  i aktywności ATP-azy obserwowano także w czasie „starzenia” mikrosomów, kiedy to ulegały uwolnieniu niewielkie ilości kwasów tłuszczowych pod wpływem endogennej fosfolipazy. Mikro-

somy przetrzymywane w obecności albuminy zachowywały aktywność znacznie dłużej (85).

Traktowanie mikrosomów mięśniowych fosfolipazą C powoduje hydrolizę 70-90% fosfolipidów zawartych w błonach. Produkty hydrolizy: dwuglicerydy i ufosforylowane zasady azotowe uwalniają się z błon. Tylko niewielka część dwuglicerydów, widoczna pod mikroskopem jako małe kropelki, pozostaje nadal związana z powierzchnią błon (37). Zależnie od źródła z jakiego pochodzi fosfolipaza C trawi ona różne fosfolipidy. Fosfolipaza C z *Clostridium velchi* trawi głównie lecytynę, podczas gdy analogiczny enzym izolowany z *Bacillus cereus* hydrolizuje również fosfotydyloetanolaminę i fosfatydyloserynę (70). Jednak zhydrolizowanie różnych fosfolipidów w jednakowy sposób wpływa na funkcję błon SR.

Pozbawione fosfolipidów mikrosomy zachowują w dalszym ciągu charakterystyczną trójwarstwową strukturę błony a jedyną widoczną zmianą jest zmniejszenie średnicy pęcherzyków (37).

Działanie fosfolipazą C na błony SR prowadzi w efekcie zhydrolizowania 70—90% fosfolipidów do niemal kompletnej inaktywacji ATP-azy (88, 89) i zaniku zdolności do transportu wapnia oraz wymiany ATP i ADP (90). W mikrosomach traktowanych fosfolipazą C stwierdza się nagromadzenie ufosforylowanego intermediatu co wskazuje na rolę fosfolipidów w defosforylacji intermediatu podczas transportu  $\text{Ca}^{2+}$  (91).

Hydroliza fosfolipazą D nie wpływa na akumulację  $\text{Ca}^{2+}$  i na aktywność ATP-azy stymulowanej jonami wapnia (70, 86). W tym bowiem przypadku po odszczepieniu zasady azotowej z fosfolipidów, głównie z lecytyny powstaje kwas fosfatydowy, a więc fosfolipid pozostający w formie związanej z błoną.

Jak widać z powyższych przykładów nawet łagodne usunięcie fosfolipidów powoduje zanik aktywności błon SR. Dodanie fosfolipidów w formie micelli do błon odlipidowanych fosfolipazami przywraca aktywność ATP-azy i częściowo zdolność do akumulacji  $\text{Ca}^{2+}$ . Stopień reaktywacji ATP-azy przez fosfolipidy nie zależy od rodzaju kwasów tłuszczowych zawartych w dodanych fosfolipidach (70). Doświadczenia z fosfolipazą D świadczą, że nie tylko kwasy tłuszczowe, lecz również zasada azotowa nie wykazuje specyficzności.

### III-3. Rola cholesterolu i innych lipidów obojętnych

W błonach biologicznych cholesterol „upakuje” fosfolipidy zmniejszając w ten sposób przepuszczalność błon dla szeregu jonów. W sarkoplazmatycznym retikulum cholesterol stanowi około 5—7% lipidów (33, 61, 69). Ekstrakcja zliofilizowanych błon SR rozpuszczalnikami apolarnymi (eter etylowy, heptan) w środowisku bezwodnym usuwa niemal ilościowo cholesterol i inne lipidy obojętne, nie usuwając fosfolipidów. Wskazuje

to, że lipidy obojętne, w tym i cholesterol, są „luźno” związane z błonami SR (33).

Traktowanie mikrosomów eterem etylowym w środowisku wodnym hamuje akumulację  $\text{Ca}^{2+}$  i aktywuje ATP-azę (92, 93). Wysłunięto przypuszczenie (93), że na skutek usunięcia części estrów cholesterolu pęcherzyki „ciekną” nie zatrzymując pobranego wapnia. Na skutek wyciekania  $\text{Ca}^{2+}$  z pęcherzyków stężenie tego jonu w środowisku zewnętrznym jest stale dostatecznie duże, by proces transportu zachodził w sposób ciągły, powodując obserwowany wzrost aktywności ATP-azy. Jak się jednak okazało, zjawisko rozprężnięcia akumulacji  $\text{Ca}^{2+}$  i aktywności ATP-azy nie wiąże się z usunięciem z błon SR estrów cholesterolu, a dotyczy specyficznego działania mieszaniny eter—woda. Całkowite bowiem usunięcie cholesterolu bezwodnym eterem ze zliofilizowanych mikrosomów (33) nie powoduje zmian w aktywności błon SR po ich wtórnym uwodnieniu.

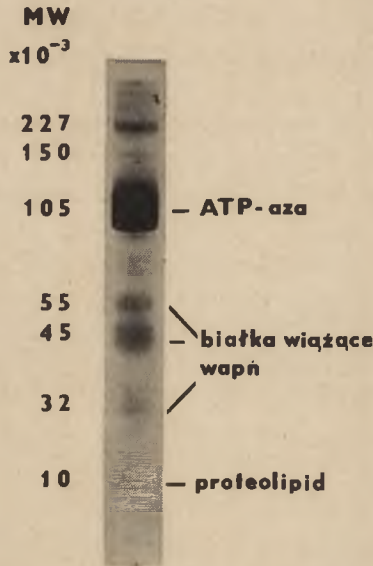
Przy pomocy filipiny, polienowego antybiotyku wiążącego się specyficznie z cholesterolem i wykazującego wzmożoną fluorescencję w środowisku hydrofobowym (94) wykazano, że cholesterol rozpuszczony w fosfolipidach błon SR znajduje się w pobliżu reszt tryptofanowych białek.

#### IV. Białka sarkoplazmatycznego retikulum

Mimo, że sarkoplazmatyczne retikulum jest jednym z najlepiej poznanych systemów błon biologicznych, że znany jest jego skład chemiczny, struktura i funkcja, poszczególni autorzy różnią się w poglądach dotyczących między innymi ilości i ciężarów cząsteczkowych białek występujących w tych błonach (95—100). Niektórzy autorzy uważają nawet, że ze względu na bardzo wyspecjalizowaną funkcję błony SR powinny zawierać i zawierają tylko dwa białka: stymulowaną wapniem ATP-azę i białko wiążące wapń (101).

Białka stanowią około 50% suchej masy błon SR (1—3). Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu wykazuje (Ryc. 4), że około 70% całkowitej ilości białek błon SR stanowi białko o ciężarze cząsteczkowym około 105 000. Około 20% stanowią kwaśne białka o ciężarach cząsteczkowych 55, 45 i 32 000. Szereg dowodów wskazuje, że białko 105 000 daltonów jest transportującą wapń ATP-azą. Białko to po wyizolowaniu wykazuje wyższą aktywność ATP-azy niż błony natywne (65). Aktywność oczyszczonej ATP-azy uzależniona jest od obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Optymalne stężenie  $\text{Mg}^{2+}$  jest równe stężeniu dodanego ATP a stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w nosi  $10^{-6}\text{M}$ . Niskie stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  potrzebne do optymalnej aktywacji ATP-azy świadczy o wysokim powinowactwie enzymu do  $\text{Ca}^{2+}$ . Enzym jest również odpowiedzialny za wymianę ATP/ADP i inkorporację fosforu z  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Wiązanie wapnia i tworzenie ufosforylonego intermediatu są również bezpośrednim dowodem, że białko

105 000 daltonów jest transportującą wapń ATP-azą (29, 67). Według niektórych autorów ATP-aza zbudowana jest z podjednostek (2) według innych jest pojedynczym polipeptydem rozpadającym się dopiero pod wpływem działania enzymów proteolitycznych (100).



**Ryc. 4.** Spektrum białkowe błon sarkoplazmatycznego retikulum uzyskane drogą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (68)

Białko o ciężarze cząsteczkowym 44 000 stanowi około 7% całkowitej ilości białek. Zostało wyizolowane po raz pierwszy przez MacLennana (102) i nazwane przez niego „Calsequestrin” na tej zasadzie, że okazało się zdolne do wiązania znacznych ilości wapnia. Jest to białko kwaśne, kwasy glutaminowy i asparaginowy stanowią w nim 47% a lizyna i arginina tylko 8%. W przeciwieństwie do niektórych innych białek wiążących wapń nie zawiera ono ani lipidów ani cukrów (68, 99, 100). Późniejsze badania wykazały jednak, że drugie kwaśne białko o masie cząsteczkowej 55 000 stanowiące około 7% białek SR (95, 100), wiąże jeden mol wapnia na cząsteczkę ze stałą wiązania rzędu  $10^6 M^{-1}$ . Niezależnie od tego białka jak również od calsequestrin, pozostałe kwaśne białka o masie cząsteczkowej 20 000—38 000 wiążą znaczne ilości wapnia (do jednego  $\mu$ mola na mg) ze stałą wiązania rzędu  $10^3$ — $10^4 M^{-1}$  (103).

Ponadto z błon SR wyizolowano białko o ciężarze 10 000, które rozpuszczając się w rozpuszczalnikach organicznych (95, 98) ma właściwości proteolidu. Białku temu MacLennan przypisuje rolę w tworzeniu wraz z ATP-azą podstawowej struktury błony (96, 100).

W błonach SR stwierdza się poza tym obecność niewielkich ilości białek o ciężarze cząsteczkowym 227 000, 150 000, 83 000, 73 000 (29, 62, 65, 68, 97, 100). Rola tych białek jest jak dotychczas nieznana.

**IV-1. Solubilizacja, oczyszczanie i charakterystyka białek SR**

W badaniach nad białkami błon biologicznych stosuje się kilka rodzajów ekstrakcji i solubilizacji przy użyciu rozpuszczalników organicznych, detergentów jonowych i niejonowych, roztworów soli itp. (99, 104—107).

Według współczesnych poglądów we wszystkich błonach biologicznych można wyróżnić dwie grupy białek w zależności od ich lokalizacji w stosunku do warstwy lipidowej: białka wewnętrzne (ang. *integral* (107) lub *intrinsic* (108—109)) penetrujące warstwę lipidów stanowiącą trzon błony i białka powierzchniowe, (ang. *periferal* (107) lub *extrinsic* (109)).

Białka wewnętrzne błon mają charakter hydrofobowy i są rozpuszczalne w wodzie tylko w obecności detergentów. W ich strukturze konformacja  $\alpha$ -heliksu stanowi około 40% i prawie nie występują one w konformacji  $\beta$ . (105, 106). W interakcji tych białek z lipidami główną rolę odgrywają wiązania hydrofobowe. Do izolacji białek wewnętrznych należy użyć drastycznych metod, jak solubilizacja błony detergentami, lub niektórymi rozpuszczalnikami organicznymi.

Białka powierzchniowe można usuwać z błon przez ekstrakcję detergentami o niskich stężeniach, roztworami o wysokiej sile jonowej lub z kolei wodą dejonizowaną, albo przez ekstrakcję związkami chelatującymi metale dwuwartościowe. Są one związane z błonami wiązaniami elektrostatycznymi lub poprzez mostki jonowe. Usunięcie tego rodzaju białek na ogół nie wpływa na zasadnicze właściwości błon (105, 106).

**IV-1a. Solubilizacja błon rozpuszczalnikami organicznymi**

Najczęściej używanymi do solubilizacji błon rozpuszczalnikami organicznymi są n-butanol (98, 104, 110) i 2-chloroetanol (98, 111). Stosując mieszaninę n-butanol-woda do solubilizacji błon erytrocytów uzyskano przejście 90% białek do fazy wodnej, podczas gdy wszystkie lipidy znajdowały się w fazie organicznej (104, 111). Oddzielenie białek od lipidów i otrzymanie białek błon w formie rozpuszczalnej w wodzie umożliwiło badania rekombinacji białek i lipidów (110). W przeciwieństwie do erytrocytów traktowanie n-butanolem błon SR powoduje przejście do fazy wodnej jedynie 25% białek; około 70% całkowitej ilości białek w formie zdenaturowanej znajduje się na granicy faz. Jak wykazały badania elektroforetyczne na granicy faz znajdowało się białko 105 000 daltonów, podczas gdy w fazie wodnej białka powierzchniowe. Do fazy organicznej przechodziło 99% lipidów i białko 10 000 daltonów (98).

W wyniku traktowania błon SR 90% 2-chloroetanołem otrzymywano całkowitą solubilizację błon. Po oddializowaniu rozpuszczalnika udało się uzyskać rekombinację lipidów i białek oraz strukturalną rekonstytucję błon. 2-chloroetanol powodował jednak nieodwracalną utratę aktywności enzymatycznej (98).

#### IV-1b. Solubilizacja błon detergentami

Solubilizację błon biologicznych przeprowadza się głównie przy pomocy takich detergentów, w obecności których białka i lipidy błon ulegają dysocjacji. Wybór odpowiedniego detergentu ma ogromne znaczenie, gdyż niektóre z nich jak siarczan dodecyłu powodując całkowitą solubilizację błon inaktywują jednocześnie enzymy.

W badaniach błon SR jako związki solubilizujące na ogół stosuje się dezoksycholan (DOC) lub Triton X-100 ponieważ oba te detergenty nie obniżają wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  i ATP i nie powodują inaktywacji ATP-azy (65, 67, 68). Stosując odpowiednie stężenie Tritonu X-100 w stosunku do białka uzyskano 80% solubilizacji błon SR i otrzymano oczyszczone preparaty stymulowanej  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-azy i białka wiążącego wapń. (98, 99).

Triton X-100 jest jednak detergentem trudnym od usunięcia, dlatego wygodniejszy w użyciu jest dezoksycholan, który można łatwo usunąć przez dializę.

MacLennan (95) a za nim szereg innych badaczy używając DOC do solubilizacji błon SR, otrzymało oczyszczony preparat białka o ciężarze cząsteczkowym 102 000 wykazującego aktywność stymulowanej  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-azy. Deoksycholan, dzięki temu, że w niskich stężeniach solubilizuje wszystkie białka błon SR z wyjątkiem ATP-azy może służyć zarówno do badań nie tylko nad tym białkiem ale również i do charakterystyki pozostałych białek.

#### IV-2. Badania nad rekonstytucją błon SR

W ostatnich latach obserwuje się ogromne zainteresowanie badaniami nad rekonstytucją błon biologicznych. Zdaniem wielu badaczy przywrócenie strukturalnych i funkcjonalnych właściwości błon przez łączenie rozdzielonych uprzednio składników wydaje się być najlepszą drogą do poznania molekularnej organizacji błon.

Względnie łatwo uzyskuje się rekonstytucję morfologiczną i strukturalną (105), dużo trudniej uzyskać całkowitą funkcjonalną rekonstytucję. Błony SR są jednym z nielicznych przykładów błon, gdzie próby rekonstytucji zakończyły się prawie pełnym sukcesem.

Chociaż już w roku 1964 Martonos (28) otrzymał pęcherzyki SR po uprzednim zsolubilizowaniu błon DOC i usunięciu detergentu, tego typu badania na szerszą skalę rozpoczęto dopiero w r. 1971 równolegle w trzech pracowniach MacLennan'a w Kanadzie, Racker'a oraz Fleischer'a w Stanach Zjednoczonych.

Racker (102) używał do rekonstytucji oczyszczonej ATP-azy i fosfolipidów i uzyskał pęcherzyki zdolne do transportu  $\text{Ca}^{2+}$  znacznie zwiększając stosunek fosfolipidy/białko i to zarówno po zmieszaniu fosfolipidów sonifikowanych w obecności cholanów i dializie mieszaniny w środowisku zawierającym szczawian potasu, jak również po bezpośredniej sonifikacji

fosfolipidów i ATP-azy w środowisku zawierającym szczawian (113). Do uzyskania maksymalnej aktywności potrzebna była zarówno lecytyna jak i fosfotydyloetanolamina. Następowala w tym przypadku inkorporacja ATP-azy do liposomów. W stosunku do układów stosowanych przez Racker'a wysunięto jednak szereg zastrzeżeń ze względu na bardzo duży nadmiar fosfolipidów i duże stężenie szczawianu.

MacLennan po całkowitym zsolubilizowaniu błon SR dezoksychohanem i usunięciu detergentu przez dializę otrzymał pęcherzyki, których struktura nie różniła się od struktury błon natywnych (65). Niemal wszystkie lipidy obecne w oryginalnych błonach znajdowały się w błonach rekonstruowanych, podczas gdy białka kwaśne pozostały w roztworze wodnym. Powstałe po rekonstrukcji pęcherzyki tworzyły się więc tylko z ATP-azy, fosfolipidów i proteolipidu. Jest to jeszcze jednym dowodem, że te trzy składniki są odpowiedzialne za podstawową strukturę błon SR (100).

Rekonstruowane w ten sposób pęcherzyki wykazywały wysoką aktywność ATP-azy jednak nie były zdolne do wiązania  $Ca^{2+}$  ani do jego akumulacji w obecności szczawianu.

Tabela 1.

Właściwości oryginalnych i rekonstruowanych pęcherzyków SR (67)

	Pęcherzyki SR		
	oryginalne	rekonstruowane	rekonstruowane z ATP-azy
Fosfor fosfolipidowy ( $\mu$ mole P/mg białka)	0,78	0,95	0,64
$^{32}P$ -fosfoenzym ( $\mu$ mole $^{32}P$ /mg białka)	6,40	7,00	7,40
ATP-aza ( $\mu$ mole P/mg białka/min)	0,35	1,90	2,20
Akumulacja wapnia ( $\mu$ mole $Ca^{2+}$ /mg białka) kompletny system	6,00	3,60	1,70
– ATP	0,10	0,10	0,10
+ X 537A	0,10	0,10	0,10
Wiązanie wapnia ( $\mu$ mole $Ca^{2+}$ /mg białka) kompletny system	0,16	0,044	0,027
– ATP	0,014	0,012	0,010
+ X 537A	0,020	0,009	0,010

Ostatnio w pracowni Fleischer'a zdołano zrekonstruować pęcherzyki zdolne w znacznym stopniu do wiązania i akumulacji wapnia (63, 67). Okazało się, że rekonstrukcja funkcjonalnych pęcherzyków zależy od pH, składu środowiska dializacyjnego, czasu oraz temperatury w jakiej odbywa się dializa. W tabeli 1 (67) porównano właściwości pęcherzyków błon natywnych, rekonstruowanych z ekstraktu dezoksychohanowego całych błon i z oczyszczonej ATP-azy. Jak wynika z tabeli zawartość fosfo-

lipidów jest wyższa w pęcherzykach izolowanych z całego ekstraktu niż w pęcherzykach powstałych z oczyszczonej ATP-azy. Ilość ufosforylowanego intermediatu była taka sama we wszystkich trzech typach pęcherzyków, co świadczy, że po solubilizacji i dializie ta sama ilość enzymu znalazła się w rekonstruowanych błonach. Aktywność ATP-azy była kilkakrotnie wyższa w błonach rekonstruowanych niż w natywnych, podczas gdy akumulacja wapnia w obecności szczawianu jest znacznie niższa. Dodanie jonoforu X 537 A powoduje uwalnianie wapnia ze wszystkich trzech typów pęcherzyków. Wysoka aktywność stymulowanej wapniem ATP-azy i mniejsza zdolność rekonstruowanych błon do zatrzymania pobranego wapnia świadczy, że przez takie nowo powstałe błony kation ten łatwiej przenika. W pęcherzykach rekonstruowanych w powyższy sposób znajduje się mniej białek wiążących wapń w porównaniu z błonami natywnymi, co może być powodem mniejszej zdolności nowopowstałych pęcherzyków do zatrzymywania pobranego  $\text{Ca}^{2+}$ . Możliwe, że zmniejszenie zdolności zrekonstruowanych pęcherzyków do akumulacji  $\text{Ca}^{2+}$  wynika też z bardzo subtelnych różnic w molekularnej organizacji błony rekonstruowanej w porównaniu z natywną. O słuszności ostatniego przypuszczenia wydaje się świadczyć fakt, że stopień reaktywacji zdolności do zatrzymywania wapnia zależy od temperatury w jakiej odbywa się dializa prowadząca do rekonstrukcji błon. Optymalna okazała się temperatura około  $25^{\circ}\text{C}$ , tj. temperatura, w której lipidy znajdują się już w formie płynnego kryształu. Sugeruje to, że prawidłowa molekularna organizacja błony zależy od fizykochemicznego stanu w jakim znajdują się poszczególne składniki błon.

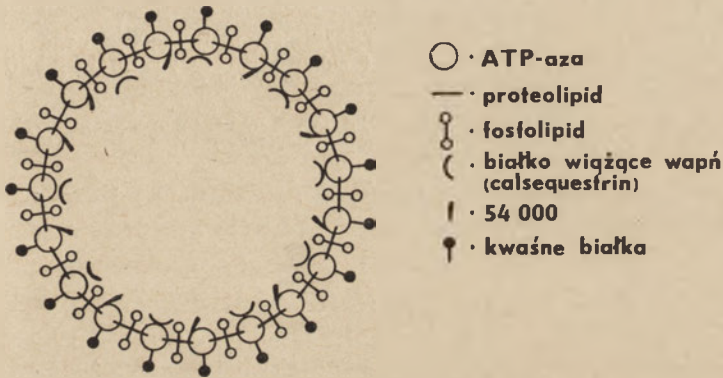
#### IV-3. Lokalizacja białek w błonach SR

Łatwość usuwania kwaśnych białek za pomocą roztworów związków chelatujących i niskich stężeń detergentów świadczy o ich stosunkowo luźnym powiązaniu w błonie SR i o ich powierzchniowej lokalizacji. Brak natomiast danych czy znajdują się one na zewnętrznej czy też wewnętrznej powierzchni błony. Szereg danych sugeruje, że białka silnie wiążące wapń, to jest białka 54 000 i 44 000 daltonów znajdują się wewnątrz pęcherzyków i odpowiadają za wiązanie pobranego wapnia. O lokalizacji tych białek na wewnętrznej stronie błony wskazuje między innymi fakt, że po usunięciu białek powierzchniowych obraz błon pęcherzyków otrzymanych techniką barwienia negatywnego nie różni się od obrazu błon natywnych (100).

W badaniach nad lokalizacją i funkcją białek błon biologicznych szerokie zastosowanie znalazły enzymy proteolityczne, takie jak trypsyna czy pronaza (100, 113—116). Enzymy te nie przenikają do wnętrza pęcherzyków mogą zatem trawić jedynie białka znajdujące się na powierzchni. Długie trawienie trypsyną błon SR powoduje usunięcie buławek z po-



wierzchni pęcherzyków, spadek aktywności ATP-azy i zdolności do akumulacji wapnia (115). Takie substancje jak 1M sacharoza, ATP, i jony wapnia zwalniają znacznie zachodzenie tych zjawisk (114—116). Pęcherzyki zachowują w tych warunkach zdolność do akumulacji wapnia, aktywność ATP-azy i posiadają nadal buławki. Równolegle prowadzony rozdział w żelu poliakrylamidowym wykazał, że nawet w obecności 1M sacharozy ATP-aza rozpadła się na dwa polipeptydy o ciężarze cząsteczkowym 45 000 i 55 000. W tych warunkach enzym jest w dalszym ciągu aktywny (115, 116). Przedłużenie czasu trawienia powoduje rozpad tych peptydów do mniejszych fragmentów, zanik buławek i spadek aktywności ATP-azy (114—116).



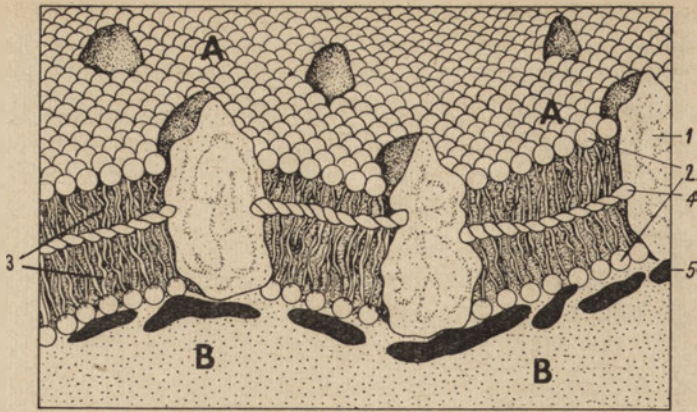
MACLENNAN 1972

Ryc. 5. Schemat budowy błony pęcherzyka SR (95)

Jak wykazano techniką *freeze-etching* w błonach SR trawionych trypsyną w dalszym ciągu widoczne są cząstki białkowe o średnicy około 90Å. Obecność tych cząstek w trawionych błonach wskazuje, że fragmenty ATP-azy pozostają nadal związane hydrofobowo między sobą i z lipidami, dzięki czemu struktura błony zostaje zachowana. Po solubilizacji dezoksychohanem błon SR trawionych trypsyną i oddializowaniu detergentu obserwowano również rekonstytucję błon (100), mimo że ATP-aza była już rozbita na małe polipeptydy.

Inne białka, poza ATP-azą, nie ulegają trawieniu nawet po stosunkowo długim działaniu enzymami proteolitycznymi. Jest to prawdopodobnie wynikiem trudnego dostępu enzymu, co również wydaje się wskazywać na lokalizację tych białek wewnątrz pęcherzyków, tym bardziej, że białka te po wyizolowaniu są bardzo wrażliwe na działanie trypsyny (100).

Zgodnie z omówionymi powyżej obserwacjami zaproponowano następujący schemat budowy błon SR (95, 100) (Ryc. 5). Globularne cząsteczki ATP-azy o średnicy około 80—90Å toną w dwumolekularnej warstwie



**Ryc. 6** Model budowy błony pęcherzyka SR na podstawie ogólnego modelu błon biologicznych Singera (107) i schematu MacLennana (95)

A — zewnętrzna powierzchnia pęcherzyka

B — wewnętrzna powierzchnia pęcherzyka

1. cząsteczka ATP-azy, 2. polarne grupy fosfolipidów, 3. hydrofobowe łańcuchy kwasów tłuszczowych, 4. proteolipid, 5. kwaśne białka powierzchniowe.

lipidów i widoczne są techniką *freeze-etching* w postaci cząstek na rozłupanych powierzchniach błony. Natomiast hydrofilna część łańcucha ATP-azy wystaje na zewnątrz powierzchni błony, można ją przeto zobaczyć w postaci buławek po negatywnym barwieniu błony. Proteolipid znajdujący się w fazie lipidowej błony spełnia być może rolę ogniwa łączącego między sobą poszczególne cząsteczki ATP-azy leżące w odległości około 100Å. Reszta przestrzeni zajęta jest przez fosfolipidy, które łączą się hydrofobowo między sobą oraz hydrofobowymi częściami polipeptydowego łańcucha ATP-azy (Ryc. 6.).

Przypuszcza się, że wiążące wapń białka o masie 44 i 54 000 wyściełają wewnętrzną powierzchnię pęcherzyka wiążąc się z częścią łańcucha ATP-azy. Są sugestie, że białko o masie 32 000 znajduje się na zewnętrznej powierzchni błony SR, natomiast nie ma żadnych danych co do lokalizacji białek 20—38 000 daltonów.

Artykuł otrzymano 2.5.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 22.6.1974.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Hasselbach W., (1964), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **14**, 167—222.
2. Martonosi A., (1971) w *Biomembranes* red. Manson L. A., **1**, 191—256, Plenum Press, New York.
3. Inesi G., (1972), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1**, 191—210.
4. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 405—420.
5. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
6. Veratti E., (1902), *Memoire Lomb., Cl. Sci., Nat.*, **19**, 87—133.
7. Porter K. R., Palade G. E., (1957), *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 269—300.
8. Bennett, H. S., (1960) w *The Structure and Function of Muscle*, red. Bourne G., New York, t. 1, str. 137—181, Academic Press.

9. Peachey L. D., Huxley A. F., (1962), *J. Cell. Biol.*, **13**, 177—180.
10. Hoyle G., (1970), *Sci. Am.* **222**, 85—93.
11. Franzini-Armstrong C., Porter K. R., (1964), *J. Cell. Biol.*, **22**, 675—696.
12. Peachey L. D., (1965), *J. Cell. Biol.*, **25**, 209—231.
13. Zachar J., (1971) *Electrogenesis and Contractility in Skeletal Muscle Cells*, University Park Press Baltimore and London, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
14. Huxley A. F., Taylor R. E., (1958), *J. Physiol.*, **144**, 426—441.
15. Lee K. S., Ladinsky H., Choi S. J., (1966), *J. Gen. Physiol.*, **49**, 689—715.
16. Kasai M., Miyamoto H., (1973), *FEBS Letters* **34**, 299—301.
17. Jöbsis F. F., O'Connor M. J., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **25**, 246—252.
18. Winegrad S., (1965), *J. Gen. Physiol.*, **48**, 455—479.
19. Winegrad S., (1968), *J. Gen. Physiol.*, **51**, 65—83.
20. Winegrad S., (1973), *J. Gen. Physiol.*, **62**, 693—707.
21. Marsh B. B., (1951), *Nature* **167**, 1065—1066.
22. Marsh B. B., (1952), *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 247—260.
23. Bendall J. R., (1953), *J. Physiol. (London)*, **121**, 232—254.
24. Hasselbach W., Weber H. H., (1953), *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 160—161.
25. Portzehl H., (1956), *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 373—377.
26. Ebashi S., (1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, **76**, 410—423.
27. Hasselbach W., Makinose M., (1964), *Biochemistry of Muscle Contraction* red. Gergely J., str. 247—252, Little, Brown and Company, Boston.
28. Martonosi A., Feretos R., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 648—658.
29. Meissner G., Conner G. E., Fleischer S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 246—269.
30. Martonosi A., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 71—81.
31. Seraydarian K., Mommaerts W. F. H. M., (1965), *J. Cell. Biol.*, **26**, 641—656.
32. Sreter F. A., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 25—33.
33. Drabikowski W., Sarzała M., Wroniszewska A., Łągwińska E., Drzewiecka B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **274**, 158—170.
34. Hasselbach W., Elfvin L. G., (1967), *J. Ultrastructure Res.*, **17**, 598—622.
35. Ikemoto N., Sreter F. A., Nakamura A., Gergely J., (1968), *J. Ultrastructure Res.*, **23**, 216—222.
36. Muscatello U., Andersson-Cedergren E., Azzone G. F., von der Decken A., (1961), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 2, 201—218.
37. Finean J. B., Martonosi A., (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 547—553.
38. Dupont Y., Harrison S. C., Hasselbach W., (1973), *Nature* **244**, 555—558.
39. Martonosi A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 694—704.
40. Deamer D. W., Baskin (1969), *J. Cell. Biol.* **42**, 296—307.
41. Baskin R. J., Deamer D. W., (1969), *Abst. Biophys. Soc. Biophys. J.* **9**, A 238.
42. Branton D., (1969), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**, 209—238.
43. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I., (1969), *Quart. Rev. Biophys.*, **2**, 351—370.
44. Hasselbach W., Makinose M., Migala M., (1973) w *Mechanisms in Bioenergetics*, str. 219—237, Academic Press.
45. Katz M., Repke D. I., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 270—278.
46. Ohnishi T., Ebashi C., (1963), *J. Biochem. (Tokyo)*, **54**, 506—511.
47. Carvalho A. P., Lee B., (1967), *J. Gen. Physiol.*, **50**, 1327—1352.
48. Carvalho A. P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **27**, 491—502.
49. Ebashi S., Lipman F., (1962), *J. Cell Biol.*, **14**, 389—400.

50. Weber A., (1966), Current Topics in Bioenergetics, red. Sandi P. R. t. I, 203—254, Academic Press New York.
51. Ulbrecht G., Ulbrecht M., (1957). *Biochim. Biophys. Acta* 25, 100—110.
52. Ulbrecht M., (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 57, 438—454.
53. Yamamoto T., Tonomura Y., (1968). *J. Biochem. (Tokyo)* 64, 137—145.
54. Makinose M., (1969). *Eur. J. Biochem.*, 10, 74—82.
55. Martonosi A., (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 753—757.
56. Makinose M., (1971). *FEBS Letters* 12, 269—271.
57. Makinose M., Hasselbach W., (1971). *FEBS Letters* 12, 271—272.
58. Penet R., Pick U., Selinger J., (1971). *J. Biol. Chem.*, 246, 7349—7356.
59. Makinose M., (1973). *FEBS Letters* 37, 140—143.
60. Meissner G., (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 298, 906—927.
61. Drabikowski W., Dominas H., Dąbrowska R., (1966). *Acta Biochim. Polon.*, 13, 11—24.
62. Meissner G., Fleischer S., (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 255, 19—33.
63. Meissner G., Fleischer S., (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 913—920.
64. Sanslone W. R., Bortrand H. A., Yu B. P., Masoro E. J., (1972). *J. Cell Physiol.* 79, 97—101.
65. MacLennan D. H., Seeman P., Iles, G. H., Yip C. C., (1971). *J. Biol. Chem.*, 246, 2702—2710.
66. Waku K., Uda Y., Nakazawa Y., (1971). *J. Biochem. (Tokyo)* 69, 483—491.
67. Meissner G., Fleischer S., (1974). Calcium Binding Proteins, red. Drabikowski W., Strzelecka-Gołaszewska H., Carafoli E., str. 281—314. Elsevier Co. and Polish Scientific Publishers.
68. Sarzała M. G., Zubrzycka E., Drabikowski W., (1974). Calcium Binding Proteins, red. Drabikowski W., Strzelecka-Gołaszewska H., Carafoli E., str. 315—346. Elsevier Co. and Polish Scientific Publishers.
69. Marai L., Kuksis A., (1973). *Canad J. Biochem.*, 51, 1248—1261.
70. Martonosi A., Donley J., Halpin R. A., (1968). *J Biol. Chem.* 243, 61—70.
71. Fiehn W., Peter J. B., (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 5617—5620.
72. Chapman D., (1968) Biological Membranes, London-New York: Academic Press, 125—202.
73. Davis D., Inesi G., (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 241, 1—8.
74. Hubbell W. L., McConnel M. M., (1968). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 61, 12—16.
75. Scandella G. J., Devaux P., McConnel M. M., (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 2056—2060.
76. McConnel H. M., (1969). *J. Gen. Physiol.*, 54, 277—279.
77. McConnel H. M., Wright K. L., McFerland B. G., (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 273—281.
78. Seelig J., Hasselbach W., (1971). *Eur. J. Biochem.*, 21, 17—21.
79. Hegvary G., Post R. C., (1970). The Molecular Basis of Membrane Function, red. Tosteson P., str. 519—528. Prentice-Hall, New Jersey.
80. Rossi C. R., Carignani G., (1971). w Membrane Bound Enzymes, red. Porcellati G., de Joso E., str. 147—159. Plenum Press, New York.
81. Finean J. B., (1973). w Form and Function of Phospholipids B. B. A. Library, t. 3, 171—198, red. Ansell G. B. Dowson R. M. C., Elsevier Sci. Pub. Com.
82. van Deenen L. L. M., De Haas G. M., (1966). *Ann. Rev. Biochem.*, 35, 157—194.
83. Agostini B., Drabikowski W., (1969). *J. Submicrosc. Cytol.*, 1, 207—214.
84. Fiehn W., Hasselbach W., (1970). *Eur. J. Biochem.*, 13, 510—518.

85. Sarzała M. G., Drabikowski W., (1969). *Life Sci.*, **8**, 477—483.
86. Yu B. P., De Martinis F. D., Masoro E. J., (1968). *J. Lipid Res.*, **9**, 492—500.
87. The R., Hasselbach W., (1972). *Eur. J. Biochem.*, **28**, 357—363.
88. Walter H., Hasselbach W., (1973). *Eur. J. Biochem.*, **36**, 110—119.
89. Kielley W. W., Meyerhof O., (1950). *J. Biol. Chem.*, **183**, 391—401.
90. Martonosi A., (1969). *J. Biol. Chem.*, **244**, 613—620.
91. Donley J. R., Pucell A. G., Helpin R. A., (1971). *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**, 529—540.
92. Inesi G., Goodman J. J., Watanabe S., (1967). *J. Biol. Chem.*, **242**, 4637—4643.
93. Fiehn W., Hasselbach W., (1969). *Eur. J. Biochem.*, **9**, 574—578.
94. Drabikowski W., Łągwińska E., Sarzała M. G., (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **291**, 61—70.
95. MacLennan D. H., Yip C. C., Iles G. H., Seeman P., (1972). Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. **37**, str. 469—477. The Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
96. McFarland B. H., Inesi G., (1971). *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 456—464.
97. MacLennan D. H., (1970). *J. Biol. Chem.*, **245**, 4508—4518.
98. Sarzała M. G., Zubrzycka E., Pilarska M., Drabikowski W., (1973). *Protides of Biological Fluids* red. Peeters H., vol. **21**, str. 109—113, Pergamon Press, Oxford and New York.
99. Ikemoto N., Bhatnagar G. M., Gergely J., (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1510—1517.
100. Stewart P. S., MacLennan D. M., (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 985—993.
101. Ikemoto N., Bhatnagar G. M., Nagy B., Gergely J., (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 7835—7837.
102. MacLennan D. M., Wong P. T. S., (1971). *Proc. Nat. Acad. U.S.A.*, **68**, 1231—1235.
103. Ostwald J., MacLennan D. M., (1974). *J. Biol. Chem.*, **249**, 974—979.
104. Maddy A. H., (1972). *Sub. Cell Biochem.*, **1**, 293—310.
105. Razin S., (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 241—296.
106. Coleman R., (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **300**, 1—30.
107. Singer S. J., (1971). *Structure and Function of Biological Membranes*, red. Rothfield L. I., str. 146—190. Academic Press, New York.
108. Green D. E., (1971). *Science* **194**, 863—887.
109. Fleischer S., Zahler W. L., Ozawa H., (1971). *Biomembranes* **2**, 105—119.
110. Roelefsen B., Zwaal R. F. A., van Oenen L. L. M., (1971). *Membrane—Bound Enzymes*, red. Porcellati G., de Joso F., 209—228, Plenum Press, New York.
111. Zahler P. H., Weibel E. R., (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 320—388.
112. Racker E., (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 8198—8200.
113. Racker E., Eytan E., (1973). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **55**, 174—178.
114. Thorley-Lawson A., Green N. M., (1973). *Eur. J. Biochem.*, **40**, 403—413.
115. Ikemoto N., Sreter F. A., Gergely J., (1971). *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 571—582.
116. Migala A., Agostini B., Hasselbach W., (1973). *Z. Naturforsch.* **28**, 178—182.



WŁODZIMIERZ WNUK \*

## Sily oddziaływań między komórkami

### Forces of Interactions between Cells

Olbrzymią różnorodność składu i funkcji błon biologicznych starają się wyjaśnić różne modele ich struktury. Najbardziej prawdopodobny z proponowanych modeli wydaje się być model ciekłej mozaikowej struktury błon, zaproponowany przez Singera i Nicolsona (1). Według nich białka stanowią heterogeny zbiór globularnych cząsteczek, których jonowe, polarne grupy wystają z błony w fazę wodną, niepolarne grupy zaś są schowane w hydrofobowe lipidowe warstwy błony. Globularne cząsteczki białek tkwią umiejscowione w warstwie fosfolipidowej.\*\*.

Komórki okrywa „płaszcz” glikolipidowo-glikoproteidowy.\*\*\* Niektóre komórki, np. komórki wydzielające śluz, mają dodatkowo na swej powierzchni grubą warstwę wolnego polisacharydu. Drugi typ „płaszcz” opisany w literaturze jest luźniej związany z powierzchnią komórek — np. Moscona stwierdził pewną ilość mukoidalnych substancji makrocząsteczkowych w ośrodku po dezagregacji różnych tkanek na pojedyncze komórki przy pomocy enzymów i czynników chelatujących (2). Wydaje się, że określenie „Płaszcz” powierzchni komórek jest używane dosyć dowolnie. Tylko niektórzy autorzy używają tego określenia dla struktur węglowodanowych ściśle związanych z błoną komórkową. Szczegółowo omawiają ten problem Parson i Subject (3).

W badaniach nad funkcją błon komórkowych ważne miejsce zajmuje zagadnienie oddziaływań międzykomórkowych oraz między komórkami a elementami środowiska. One to decydują o zachowaniu pojedynczych komórek i zjawisku morfogenezy tkanek.

Urzęsionym komórkom do poruszania się służą wyspecjalizowane organelle, w których znajdują się składniki układu kurczliwego. Ameby i wiele komórek w kulturach tkankowych poruszają się dzięki zdolności wytwa-

---

\* Dr, Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Biofizyki, Akademia Medyczna, Wrocław.

\*\* Patrz w tym zeszycie artykuł M. G. Sarzały nt. „Struktura i funkcja endoplazmatycznego retikulum”, str. 403—423.

\*\*\* Patrz artykuł B. Grzelakowskiej-Sztaber nt. „Zmiany powierzchniowe komórek towarzyszące ich transformacji wirusowej”, *Post. Biochem.* (1974) 20, 3—21.

rzania wypustek lub nibynózek. Podczas gdy mechanizm ruchu wici i rzęsek komórkowych jest względnie dobrze poznany, to niestety badania ameboidalnego ruchu komórek są obecnie w bardzo kontrowersyjnym stanie.

Inną właściwość błon komórkowych można stwierdzić przez filmowanie kultur fibroblastów (np. 4). Przy brzegu kultury obserwuje się ciągły ruch błon komórkowych, szczególnie intensywny w tych częściach powierzchni komórek, które nie znajdują się w kontakcie z innymi. Przy zetknięciu się powierzchni komórek ruch ten zostaje zahamowany. Fibroblasty rosnące normalnie w kulturze tworzą jednokomórkową warstwę przylegających do siebie komórek. Niektóre zaś komórki pochodzące ze złośliwych nowotworów tkanki łącznej nie wykazują ani zahamowania ruchu błon przy zetknięciu, ani też właściwości rozrostu jednowarstwowego (5).

Jak wiadomo z klasycznej histologii, wiele komórek w tkankach graniczy między sobą bezpośrednio, choć w innych tkankach, zwłaszcza u osobników dojrzałych, obserwuje się często duże przestrzenie międzykomórkowe wypełnione zewnątrzkomórkowym materiałem wydzielniczym. Jednakże rzadko kiedy komórka w tkance jest oddzielona od sąsiednich komórek przez dużą przestrzeń międzykomórkową na całej swojej powierzchni. Dzięki mikroskopii elektronowej stwierdzono, że w tych miejscach przylegania między komórkami, gdzie w mikroskopie optycznym jest widoczny bezpośredni kontakt, występują odległości około 100—200Å między najbardziej zewnętrznymi i dającymi się cieniować częściami błon komórkowych. Wykazano, że błony odległe od siebie o 100—200Å występują w wielu tkankach różnych organizmów (6, 7).

Zauważano, że rozproszone komórki różnych tkanek asocjują raczej z komórkami podobnego typu, aniżeli z komórkami innych tkanek (2, 8, 9). M o s c o n a (10, 11) hodował razem fibroblasty i komórki nerek ssaków (np. myszy). Działając trypsyną lub etylenodwuaminoceteroocetanem rozdzielał komórki obu kultur. Następnie mieszał te dwa typy komórek — po kilku godzinach komórki rozdzielały się samorzutnie i zamiast przypadkowej mieszaniny komórek nerek i tkanki łącznej tworzyły się skupiska homologicznych komórek. Ponadto prowadząc kultury mieszane, zawierające komórki nerek i fibroblasty kurzcęcia, jak również komórki nerek i fibroblasty myszy stwierdzał, że specyficzność tkankowa dominuje nad specyficznością gatunkową; fibroblasty kurzcęcia łączyły się z fibroblastami myszy, a komórki nerek kurzcęcia — z komórkami nerek myszy. Wybiórczość tę komórki mogą utracić przez „transformację” nowotworową przechodząc w komórki zdolne do penetrowania populacji prawidłowych komórek. Selektywna asocjacja (12, 13) i zachowanie się komórek nowotworowych (14, 15, 16) zależą od rodzaju substancji znajdujących się na obwodzie komórki. Enzymatyczne usunięcie tych substancji może zmie-



nić zdolność komórek do histogenetycznej agregacji (17, 18). Zauważono również, że po usunięciu komórek ze stałego podłoża pozostawała na nim zaadsorbowana warstwa, która jest prawdopodobnie materiałem pochodzącym z powierzchni komórek (19—22), co mogłoby wskazywać na silniejszą adhezję warstwy zewnątrzkomórkowej do podłoża, aniżeli do samej komórki (23).

Komórki mogą również wykazywać zdolność do niespecyficznego adhezji zarówno do innych komórek jak i do różnych materiałów takich jak szkło, metale i tworzywa sztuczne, z którymi niemożliwe jest łączenie się poprzez wiązanie kowalencyjne. A oto przykład trochę paradoksalnego zachowania się komórek: ameby, które nie wchodzi w kontakt między sobą, wykazują zdolność przylegania do prawie wszystkich materiałów. Niespecyficzne adhezje mogą mieć miejsce również między komórkami różnych tkanek (24, 25).

Specyficzne i niespecyficzne siły oddziaływań między błonami biologicznymi omówiono w wielu artykułach (2, 23, 26, 27, 28). Poznanie oddziaływań między błonami komórkowymi ułatwić może zrozumienie różnorodności form adhezji komórek, szczególnie ważne w procesach embriogenezy, onkogenezy i regeneracji.

Istnieją dwa skrajnie różne punkty widzenia na problem oddziaływań między komórkami. Biofizyczny (np. 23, 27, 29) — rozpatruje dwa rodzaje sił dalekiego zasięgu, przeciwnie działających między błonami komórkowymi; są to elektrostatyczne siły odpychania i elektrodynamiczne siły przyciągania (Van der Waalsa). Biochemiczny — tłumaczy kontakt między powierzchniami komórek powstawaniem wiązań chemicznych (2, 23, 27). Niniejszy artykuł jest próbą przedstawienia siłowych modeli oddziaływań między błonami komórkowymi, zmierzających do wyjaśnienia adhezji komórek. Analizy teoretyczne teorii koloidów liofobowych (30), tylko częściowo tłumaczą wielką różnorodność zjawisk zachodzących podczas adhezji komórek. Obecnie dostępny do teoretycznego ujęcia jest statyczny obraz zjawisk fizycznej adhezji.

Jak dokładny obraz oddziaływań między błonami żywych komórek mogą dać obecnie proponowane fizyczne modele sił? W kontekście tego pytania chcę omówić w swym artykule próby teoretycznego wyjaśnienia natury sił działających między błonami komórkowymi.

## **I. Charakterystyka sił międzykomórkowych w oparciu o teorię stabilności koloidów liofobowych**

### **I-1. Rodzaje sił**

Często sugerowano, że siły dalekiego zasięgu mają ważne znaczenie w biologii zarówno wewnątrz niektórych struktur komórkowych jak i w kontakcie między dwiema komórkami. Za siły dalekiego zasięgu uważa

się te, które są większe od sił termicznych fluktuacji w odległościach zasadniczo większych niż długość wiązania chemicznego. B a n g h a m i P e t h i c a (31) oraz C u r t i s (32, 33) proponowali użycie teorii stabilności koloidów lifobowych (D e r j a g u i n - L a n d a u (34). V e r w e y - O v e r b e e k (30)) do rozwiązania trudności w zrozumieniu mechanicznego kontaktu między komórkami. Podstawą tej teorii jest krzywa energii potencjalnej, która jest sumą elektrostatycznej energii odpychania ( $V_r$ ) i energii przyciągania Londona-Van der Waalsa ( $V_a$ ).

Obecność grup jonogennych na powierzchni błon komórkowych powoduje charakterystyczny rozkład ładunku w obszarach granicznych, który nosi nazwę podwójnej warstwy elektrycznej, tworzącej jakby kondensator o okładkach, z których jedna ma wypadkowy ładunek ujemny, druga — dodatni. Jony przeciwnie naładowane w stosunku do ładunku powierzchniowego nie mogą całkowicie koncentrować się na powierzchni. Ruchy termiczne jonów spowodują rozmycie tej części warstwy podwójnej i stopniowy, rozciągnięty w pewnym obszarze spadek stężenia przeciwjonów od wartości maksymalnej przy powierzchni aż do wartości charakterystycznej dla całości roztworu. Rozmyciu rozkładu jonów towarzyszy łagodna zmiana potencjału elektrycznego od jego wartości  $\psi_0$  przy powierzchni do zera w fazie objętościowej roztworu.

Kiedy dwie podwójne warstwy elektryczne, otaczające naładowaną powierzchnię cząstki koloidowej lub komórki nakładają się, wzrasta potencjał powierzchniowy i stężenie przeciwjonów. Ta kompresja warstw elektrycznych powoduje lokalny wzrost wartości osmotycznej i skutkiem tego następuje odpychanie między powierzchniami niosącymi podwójne warstwy. W przypadku, gdy nakładanie się warstw podwójnych i w konsekwencji ich deformacja zachodzą głównie na ich krańcach, nie wpływając na ich strukturę w pobliżu powierzchni, można przyjąć, że potencjał powierzchniowy  $\psi_0$  jest stały. Wtedy energię odpychania dla dwóch identycznych cząstek kulistych i dla dużych  $\kappa$ , a można wyrazić wzorem:

$$V_r = -\frac{\epsilon_0 a \psi_0^2}{2} \ln(1 + \exp -\kappa l) \quad (1)$$

gdzie  $\epsilon_0$  — statyczna przenikalność dielektryczna ośrodka,  $a$  — promień krzywizny komórek lub cząstek,  $\psi_0$  — potencjał powierzchniowy, który często przyjmuje się jako w przybliżeniu równy potencjałowi zeta,  $\zeta$ ,  $\kappa$  — parametr Debye'a-Hückela,  $l$  — odległość między przypuszczalnie kontaktującymi się częściami komórek lub cząstek.

Równanie to uważa się za wystarczające przybliżenie energii odpychania dla  $\zeta < 25$  mV i  $a \gg 1$ .

Energia odpychania między dwiema płaskimi powierzchniami przyjmuje postać:

$$V_r = \frac{4ne^2\psi_0^2}{\kappa \cdot kT} \exp(-\kappa l) \quad (2)$$

gdzie  $n$  — liczba jonów każdego rodzaju w roztworze przypadająca na jednostkę objętości,  $e$  — ładunek elektronu,  $k$  — stała Boltzmana,  $T$  — temperatura bezwzględna w °K. I to równanie można stosować tylko wtedy, gdy potencjał powierzchniowy jest mały ( $\psi_0 < 40$  mV). Jest ono przybliżeniem bardzo dobrym, gdy  $l > 4/\kappa$ , a dość dobrym, gdy  $l > 1/\kappa$  (30).

Energia przyciągania wynika z oddziaływań Van der Waalsa; w teorii koloidów liofobowych przyjmuje się, że są to siły Londona. Ze względu na swoją genezę siły Van der Waalsa mają charakter elektromagnetyczny. Spontaniczna, przemijająca elektryczna polaryzacja może powstawać w dowolnym ośrodku wskutek ruchu elektronów, przesunięcia atomów wewnątrz cząsteczek lub orientacji cząsteczkowej. Polaryzacja ta będzie oddziaływać na otaczający obszar i zakłócać w nim spontaniczne fluktuacje. Wynikające z tych zakłóceń oddziaływanie obniża energię swobodną układu. W swojej słynnej pracy z 1930 r. London obliczył na podstawie mechaniki kwantowej siłę przyciągającą „dyspersyjną” dla fluktuacji elektronowych (35). Teoria Londona dała podstawę do dalszych oszacowań (30) sił „dyspersyjnych” między skondensowanymi ciałami. Według koloidów liofobowych energię potencjału przyciągania,  $V_a$ , między dwiema kulistymi cząstkami można wyrazić wzorem:

$$V_a = -\frac{A a}{12 l} \quad (3)$$

gdzie  $A$  — stała Londona—Van der Waalsa lub stała Hamakera przyciągania, która jest funkcją potencjału jonizacji, polaryzowalności i gęstości liczbowej atomów komórek, biorących udział w adhezji. Stała  $A$  zależy także od otoczenia kontaktujących się komórek; im więcej atomów w środowisku otaczającym komórki wykazuje podobieństwo do atomów zawartych w komórkach, tym mniejsza będzie wartość stałej  $A$  i mniejsze energie oddziaływań przyciągających.

Dla dwóch płaskich powierzchni energia przyciągania przyjmuje postać:

$$V_a = -\frac{A}{12 \pi l^2} \quad (4)$$

Różniczkowanie równań energii potencjalnych (1—4) daje wyrażenie na siły odpychające ( $F_r$ ) i przyciągające ( $F_a$ ).

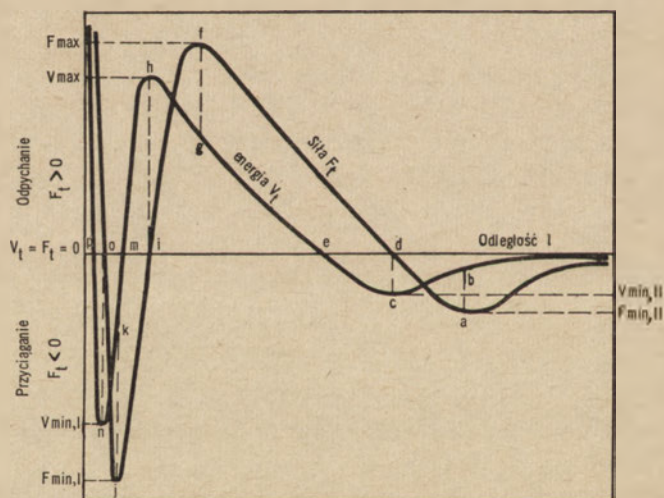
Połączenie odpowiednich wyrażeń na przyciąganie lub odpychanie prowadzi do równań na ogólną energię potencjalną ( $V_t$ ), a więc i na ogólną siłę ( $F_t$ ) między dwiema naładowanymi powierzchniami, jako funkcję odległości między nimi:  $V_t = V_r + V_a$  i  $F_t = F_r + F_a$ .

W małych odległościach między powierzchniami komórek, porównywalnych z odległościami międzyatomowymi, można pominąć odpychanie między podwójnymi warstwami elektrycznymi, ponieważ elektrolit jest mechanicznie wypchnięty z przestrzeni między powierzchniami. Pojawia się natomiast wzajemne odpychanie między cząsteczkami, którego energię

$V_r$  otrzymuje się z wyrażenia na potencjał Lennarda-Jonesa, proporcjonalny do  $r^{-12}$ , gdzie  $r$  jest odległością między atomami (36). Dla małych odległości stałą przyciągania Hamakera (równanie 4) powinno się przyjąć jako wartość wyrażającą przyciąganie między ciałami znajdującymi się w próżni (37). Oczywiście energia przyciągania  $V_a$ , wynikająca z oddziaływań Van der Waalsa może być wtedy znacznie zwiększona przez a) dipole powierzchniowe b) grupy chemiczne zdolne do utworzenia wiązań wodorowych, wiązań Lewisa kwas—zasada itd.

## I-2. Ogólne właściwości krzywych oddziaływań

Wyobraźmy sobie dwie płaszczyzny reprezentujące powierzchnie komórkowe, oddalone od siebie o kilkaset angstromów w roztworze 0,145M NaCl (Ryc. 1). Wystąpi słabe, wzajemne przyciąganie między nimi, które w miarę zbliżania będzie wzrastać aż do momentu, gdy płaszczyzny znajdą się w odległości około 150Å (a). Przy dalszym zbliżaniu przyciąganie będzie szybko maleć do zera (d) w odległości około 130Å. W tym punkcie nie ma ani sił przyciągania ani odpychania między płaszczyznami (netto) i znajdują się one w równowadze. Pozycja ta odpowiada tzw. drugiemu minimum energii potencjalnej; jest to dno lokalnej „studni” energii potencjalnej (c). Jeżeli zastosuje się siłę, aby bardziej zbliżyć powierzchnie do siebie, to wystąpi rosnąca siła odpychania, która osiąga maksimum w odległości około

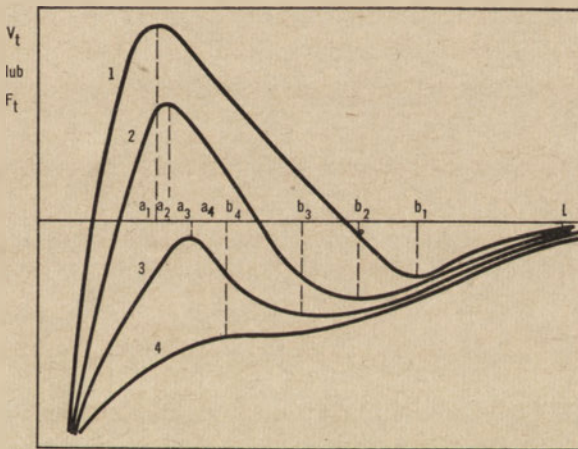


**Ryc. 1.** Schematyczne krzywe ogólnej energii potencjalnej i siły oddziaływania między równoległymi płaszczyznami przedstawiającymi biologiczne membrany

a-b, f-g, j-k łączą punkty przegięcia krzywej energii z ekstremami ( $F_{\min, II}$ ,  $F_{\max}$ ,  $F_{\min, I}$ ) krzywej siły. c-d, h-i, n-o łączą ekstrema ( $V_{\min, I}$ ,  $V_{\max}$ ,  $V_{\min, II}$ ) krzywej energii z pierwiastkami krzywej siły. e, m, p są pierwiastkami krzywej energii. Siła i energia zbliżają się asymetrycznie do  $+\infty$ , gdy odległość  $l$  osiąga zero i zbliżają się asymptotycznie do zera, gdy  $l$  osiąga  $\infty$ . Pierwsze minimum energii potencjalnej,  $V_{\min, I}$ , występuje w odległości  $l = 0$  (n). Drugie minimum energii potencjalnej,  $V_{\min, II}$ , jest w  $l = d$  (c).

20Å (f) i potem szybko spada do zera (i). Ta druga pozycja jest metastabilna, ponieważ nieznaczne fluktuacje termiczne, powodujące dalsze zbliżenie powierzchni, wywołają dużą siłę przyciągającą, która szybko rzuci płaszczyzny w pierwsze minimum (n) z dużą energią adhezji w odległości około 5Å lub mniejszej. Powyższy opis należy traktować jako przybliżone przedstawienie sił, których działaniu ulegają sąsiadujące powierzchnie komórek albo powierzchnie ciał stałych o ustalonym ładunku podobnym do tego, jaki ma komórka. C u r t i s sugerował (32,33), że odległość rzędu 100—200Å między powierzchniami komórek, często obserwowana w mikroskopie elektronowym, przedstawia odległość, w której odpychające siły elektrostatyczne są równe przyciągającym siłom Van der Waalsa — jest to położenie w drugim minimum energii potencjalnej. Co więcej, miejsca membran, gdzie komórki, znajdują się wyraźnie w ścisłym kontakcie, co stwierdzono także w mikroskopie elektronowym, mogą być spowodowane odhezną w pierwszym minimum energii.

Ponieważ nie zawsze w literaturze biologicznej można spotkać dokładne zrozumienie zależności między siłą i energią w tego rodzaju rozważaniach, odsyłam czytelnika do publikacji G i n g e l l a (29), który przeprowadził szczegółowo analizę podstawowych właściwości krzywych energii i siły oddziaływań.



**Ryc. 2.** Krzywe energii lub siły zmieniające się wraz ze zmianą stałej Hamakera (A) Przechodząc kolejno od krzywej 1 do 4 wzrasta wartość stałej A.  $a_1, a_2, a_3, a_4$  są kolejnymi położeniami  $V_{maks}$  lub  $F_{maks}$ ;  $b_1, b_2, b_3, b_4$  są odpowiednimi położeniami  $V_{min}$ ,  $\Pi$  lub  $F_{min}$ , I wraz ze wzrastającą wartością stałej Hamakera A.

Pierwsze minima energii i siły występują w każdym wypadku. Występowanie maksimów i drugich minimów będzie zależało od wzajemnego układu oddziaływań odpychających i przyciągających (30). I tak w dalszych odległościach kształt krzywych energii i siły w istotny sposób zależy od założonej wartości stałej Hamakera, A, (Ryc. 2.). Jeżeli znana byłaby ta wartość, to nie byłoby potrzeby analizować tych krzywych przez szeroki

zakres wartości stałej  $A$ . Jeżeli przyjmie się jedną funkcję  $V_r$  (1), lub  $F_r$  (1), to w miarę jak wzrasta  $A$ , cała krzywa zniekształca się i przesuwa w stronę ujemnych wartości; maksimum obniża się i przesuwa w stronę drugiego minimum, a drugie minimum przemieszcza się w kierunku krótszych odległości między powierzchniami. Wreszcie maksimum spada poniżej zera, aż w końcu zbiega się z drugim minimum ( $a_4 = b_4$ ). Podobną rodzinę krzywych można otrzymać przyjmując pojedynczą wartość stałej  $A$  i zmieniając czynniki decydujące o odpychaniu się podwójnych warstw np.  $\psi_0$ . W tym przypadku sytuacja będzie odwrotna — wzrost  $\psi_0$  może spowodować przejście od krzywej 4 do 1.

Krzywa zależność  $V_t$  od odległości daje wyobrażenie o stabilności w drugim minimum, którą zwykle wyraża się jako głębokość w „studni” potencjału,  $V_{\min,II}/kT$ , gdzie  $k$  jest stałą Boltzmanna, a  $T$  jest temperaturą bezwzględną. Dokładnie rozpatrując to zagadnienie okaże się, że takie kryterium stabilności nie jest całkowicie ścisłe, ale dla praktycznych celów to proste kryterium stabilności ( $V_{\min,II} \gg kT$ ) jest wystarczające (29).

## II. Typy adhezji między komórkami

W oparciu o teorię koloidów liofobowych na podstawie ogólnych właściwości krzywych oddziaływań można wyróżnić trzy główne typy adhezji międzykomórkowych: adhezje w drugim minimum, adhezje w pierwszym minimum (ściśle molekularny kontakt) i adhezje przez „mostkowanie”.

### I-1. Adhezje w drugim minimum

Ażeby drugim minimum było efektywne, musi mieć minimalną „głębokość” większą niż energia ruchów Browna. Dowodem przemawiającym za istnieniem drugiego minimum, odpowiedzialnego za utrzymywanie sąsiednich naładowanych powierzchni w ustalonych pozycjach, mogą być pomiary odległości między kropelkami oleju, wykonane przez Van den Tempela (38). Argumenty Curtisa (32, 33) są oparte częściowo: a) na obserwacji, że hemoglobina dyfunduje między sąsiadujące komórki np. w nerce szczura (39), b) na doświadczeniach Ambrose'a (40), który stwierdził, że istnieje przestrzeń między powierzchnią szkła a komórkami przylegającymi do niego, c) na spostrzeżeniu, że między sąsiednimi warstwami mielinowych włókien nerwowych istnieje wolna przestrzeń, widoczna w mikroskopie elektronowym i stwierdzona metodami dyfrakcji rentgenowskiej i elektronowej.

Brooks i inni (41) wykonali obliczenia energii oddziaływań dla krwinek czerwonych opierając się na modelu oddziaływujących kul. Ich obliczenia przewidują, że między cząstkami o promieniu  $5\mu\text{m}$ , mającymi potencjał powierzchniowy  $18\text{mV}$ , dla których wartość stałej Hamakera wynosi  $A = 1 \times 10^{-14}$  erga, w środowisku elektrolitu o sile jonowej  $0,15$  i sta-

tycznej przenikalności dielektrycznej około 80, może wystąpić drugie minimum o głębokości od 10 do 20kT w odległości między cząstkami rzędu 50—100Å. Weiss (42) wykonał podobne obliczenia używając równań dla kuli sąsiadującej z płaszczyzną. Z tych obliczeń wyciągnął on wniosek, że „słaba” adhezja komórek tucznych do szkła jest adhezją w drugim minimum. W oparciu o model oddziałujących powierzchni płaskich Good pokazał, że może mieć miejsce termicznie stabilna adhezja między komórkami w drugim minimum (36): gdy  $\psi_0 = 15\text{mV}$ ,  $A = 1 \times 10^{-14}$  erga, dla powierzchni kontaktu między dwiema komórkami  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup> energia  $V_{\text{min,II}}$  wynosi  $5,3 \times 10^{-11}$  erga lub 1300kT, a dla powierzchni kontaktu  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>

Można podać następujące argumenty przemawiające za tym, że adhezje mają miejsce raczej w drugim, aniżeli w pierwszym minimum:

a) Istnieje pewna zgodność między obliczonymi odległościami dla drugiego minimum z odległościami obserwowanymi.

b) Pierwsze minimum jest zbyt głębokie; jeżeli odhezja byłaby w pierwszym minimum, to zakres wartości stałej przyciągania A, oczekiwany *a priori* dla błon biologicznych, nie miałby wpływu na spotykaną różnorodność w zachowaniu się komórek podczas kontaktu.

c) Bariera między drugim a pierwszym minimum ( $V_{\text{maks}}$ ,  $F_{\text{maks}}$ ) jest na ogół tak wysoka, że jej pokonanie byłoby kinetycznie rzadkim wypadkiem. Lokalna penetracja tej bariery nie jest oczywiście wykluczona — będzie to dyskutowane w podrozdziale II-2.

d) Często obserwowano (6, 27, 43) zależność odległości między membranami od stężenia jonów. Nie miałyby to miejsce, gdyby adhezje zachodziły w pierwszym minimum, lub wskutek silnych specyficznych oddziaływań.

e) Niekiedy stwierdza się na mikrofotografiach elektronowych lokalne zmiany odległości międzykomórkowych. Można to wyjaśnić jako miejscowe zmiany w gęstości ładunku na powierzchni komórek. Te fluktuacje mogą być także wynikiem ruchów Browna. Ta druga możliwość przemawiałaby za adhezją w drugim minimum, ponieważ w obliczonych krzywych oddziaływań (Ryc. 1) uzyskuje się zazwyczaj małą krzywiznę w pobliżu drugiego minimum. Wtedy zmiany w miejscowej odległości międzykomórkowej np. 30Å dla peryferii komórkowych będących w kontakcie na powierzchni o promieniu rzędu kilku setek angstromów mogłyby towarzyszyć zmianom energii mniejszym niż kT.

## II-2. Adhezje w pierwszym minimum

Ogólna analiza warunków spotykanych w układach biologicznych prowadzi do wniosku, że głębokość pierwszego minimum,  $V_{\text{min, I}}$ , powinna być dla komórek około  $10^2$ — $10^3$  razy większa niż głębokość drugiego minimum,  $V_{\text{min, II}}$  (36). Jeżeli występowałyby wiązania wodorowe lub inne bardziej energetyczne oddziaływania, stosunek  $V_{\text{min, I}}$  do  $V_{\text{min, II}}$  może być nawet większy. Energia adhezji w pierwszym minimum będzie więc rzędu

$10^4$ — $10^6$  razy  $kT$  na jedną parę komórek dla powierzchni kontaktu  $10^{-8}$ — $10^{-7}$   $\text{cm}^2$ . Ale zanim dwie komórki wejdą w kontakt na odległość, odpowiadającą pierwszemu minimum, muszą pokonać barierę ( $V_{\text{maks}}$ ,  $F_{\text{maks}}$ ), będącą następstwem silnego odpychania elektrostatycznego podwójnych warstw. Uważa się, że dla potencjałów powierzchniowych typowych dla żywych komórek bariera energii potencjalnej jest „wysoko” ponad zerem. Jednakże nie można dokładnie obliczyć bariery energii potencjalnej, ponieważ  $V_{\text{maks}}$  występuje w tak małych odległościach międzykomórkowych, że przestają obowiązywać założenia, przy których wyprowadzone zostały wzory 1 i 2 teorii koloidów liofobowych na energię odpychania elektrostatycznego. Z teorii tej ogólnie wiadomo (30), że wysokość  $V_{\text{maks}}$  jest w przybliżeniu kilka rzędów większa niż głębokość drugiego minimum. To znaczy, że występują bariery rzędu  $1 \text{ erg/cm}^2$ . Jeżeli przyjmiemy, że najmniejsza część ściany komórkowej, która może poruszać się jako kinetyczna jednostka ruchem Browna, wynosi np.  $10^6 \text{ \AA}^2$ , to  $V_{\text{maks}}/kT$  będzie wielkością rzędu 100 lub więcej. Taka bariera więc „nigdy” nie powinna dopuścić powierzchni dwu komórek, aby mogły znaleźć się w pierwszym minimum energii.

Jednakże rozpatruje się możliwość pokonania bariery potencjalnej  $V_{\text{maks}}$  przez lokalne uwypuklenie błony komórkowej, które mogą mieć większą energię ruchu Browna i podlegają działaniu mniejszych sił odpychania elektrostatycznego (patrz podrozdział III-4). Czy takie nibynózkowe wypustki błon komórkowych, które przechodzą przez barierę potencjalną  $V_{\text{maks}}$ , mogą być spontaniczne (tzn. w ruchu Browna lub termicznym), jest problemem otwartym. Jako ilustrację tego geometrycznego argumentu przemawiającego za adhezją komórek w pierwszym minimum można podać następujący przykład. Wśród normalnych komórek krwi tylko granulocyty przylepiają się do szkła (Brooks i inni (41) opisali adhezję erytrocytów do szkła, ale poprzez fibrynę). Potencjały zeta granulocytów, limfocytów i erytrocytów wynoszą odpowiednio:  $-12 \text{ mV}$ ,  $-15,5 \text{ mV}$  i  $-18 \text{ mV}$  (27, 44). Dla szkła, potencjał zeta w  $0,145 \text{ M NaCl}$  wynosi  $-17 \text{ mV}$  (45). Niedawno zmierzono energie swobodne powierzchni różnych typów komórek (46) za pomocą wyznaczenia kąta kontaktu wody. Energia swobodna powierzchni może odpowiadać oddziaływaniom adhezji lub kohezji w pierwszym minimum. Znajomość wartości swobodnych energii powierzchniowych daje możliwość przewidywania, które typy bakterii ulegają fagocytozie i ustalenia, jakie komórki bakteryjne są podatne na spontaniczne usuwanie wody z ich powierzchni przez granulocyty (46, 47). Fagocytozę można więc rozpatrywać jako proces, który zapoczątkowuje adhezja w pierwszym minimum. Dla wymienionych trzech typów komórek krwi energie swobodne powierzchni są tego rzędu, że wszystkie te komórki powinny usuwać wodę ze szkła, a więc powinny „przylepiać” się do szkła (47). Jednak — jak już wspomniano — tak nie jest w tym przypadku. Niższy potencjał powierzchniowy granulocytów może prowadzić do niższej



bariery energii potencjalnej zarówno w kontakcie ze szkłem jak i z innymi komórkami. Prawdopodobnie ważniejszą jest inna właściwość granulocytów: z obserwacji mikroskopowych wiadomo, że w przeciwieństwie do limfocytów i prawidłowych krwinek czerwonych, granulocyty posiadają nibynóżkowe wypustki. Jeżeli zakończenia tych wypustek błony mają promień np. 1000Å i jeżeli są wystawiane ze znaczną energią ruchu, to mogą pokonać barierę energii potencjalnej  $V_{maks}$  i przejść w pierwsze minimum. Występowanie wybrzuszeń błony komórkowej i różne potencjały powierzchniowe mogą wyjaśnić więc różne zachowanie się tych trzech typów komórek w fagocytozie i w nieodwracalnej adhezji do szkła. Warto również wspomnieć, że podczas aglutynacji krwinek czerwonych i adsorpcji erytrocytów do innych komórek poddanych uprzednio infekcji wirusowej obserwowano wybrzuszenia o małym promieniu krzywizny (48, 49). Takie mocno zakrzywione regiony powierzchni komórek można więc brać pod uwagę jako czynniki umożliwiające lokalne pokonanie bariery energii i silną adhezję w pierwszym minimum.

### II-3. Adhezje przez mostkowanie

Kiedy Robertson (6) zaobserwował po raz pierwszy w różnych tkankach odstęp między błonami komórkowymi wynoszące około 100Å, spekulatywnie rozważano możliwość występowania w przestrzeni międzykomórkowej materiału odpowiedzialnego za adhezję, choć nie był on widoczny na mikrofotografiach elektronowych, otrzymanych stosowanymi wówczas technikami cieniowania. Stosując teorię koloidów liofobowych do jakościowego wyjaśnienia adhezji (32, 33) nie było oczywiście potrzeby przyjmować hipotezy, że jakiś inny materiał oprócz elektrolitu znajduje się między komórkami. Dzięki zastosowaniu nowszych technik cieniowania odkryto materiał międzykomórkowy np. mukopolisacharydy, które mogą być odpowiedzialne za ścisły kontakt między odpychającymi się wzajemnie warstwami elektrycznymi komórek i brać udział w adhezji (50, 51).

Mimo, że o fizykochemicznych podstawach tego typu adhezji wiadomo stosunkowo najmniej, przedyskutujmy tego rodzaju adhezję komórek. Ażeby cząsteczki w ośrodku zawieszającym mogły odgrywać rolę mostków w wiązaniu się komórek między sobą, nie mogą działać zbyt duże siły przyciągania lub odpychania między komórkami — z wyjątkiem sił wiążących cząsteczki mostkujące z powierzchnią komórkową. Jeżeli przyciąganie między komórkami jest bardzo duże, to rzuci komórki na tak małą odległość (w pierwszym minimum), że adhezja przez mostkowanie nie będzie miała znaczenia. Jeżeli odpychanie między komórkami jest bardzo duże (barzo „płytkie” drugie minimum i w bardzo dużej odległości od powierzchni komórek), to nie może z kolei mieć miejsca wiązanie poprzez cząsteczki w ośrodku, ze względu na ich zbyt mały wymiar. Mostkowanie wystąpi wtedy, gdy dwie komórki znajdują się we względnie słabym drugim minimum i działać będzie jako czynnik wzmacniający adhezję.

Jak bardzo adhezja przez mostkowanie zależy od sił oddziaływań między samymi komórkami wydaje się wskazywać fakt występowania tzw. „niekompletnych” przeciwciał, niezdolnych do aglutynacji komórek w pewnych warunkach. Aglutynację komórek przez przeciwciała należy zaliczyć do tego typu adhezji. Niezdolność przeciwciał (np. anti-Rh) do aglutynacji erytrocytów w roztworze soli wskazuje na zbyt duże siły odpychania elektrostatycznego między podwójnymi warstwami krwinek, które działają w warunkach testu aglutynacji. Siły te wyznaczają dopuszczalną odległość, na którą mogą zbliżyć się krwinki; zbyt dużą, aby cząsteczki przeciwciała mogły połączyć krwinki. Aglutynacja krwinek przez te przeciwciała ma miejsce wtedy, gdy w teście hemaglutynacji użyje się erytrocytów poddanych uprzednio działaniu enzymów proteolitycznych lub neuraminidazy, a także prawidłowych krwinek, zawieszonych w roztworze białka np. albuminy lub polimeru niejonowego w odpowiednim stężeniu. Wydaje się, że przeciwciała anti-Rh aglutynują erytrocyty dopiero po zmniejszeniu dopuszczalnej odległości między nimi (52): enzymatyczne odszczepienie grup jonogennych obniża potencjał powierzchniowy krwinek zmniejszając odpychanie elektrostatyczne między błonami erytrocytów, a dodanie albuminy lub polimerów niejonowych takich jak dekstran czy alkohol poliwinylowy do ośrodka zawieszającego krwinki powoduje wzrost przyciągających sił Van der Waalsa między błonami erytrocytów poprzez zmianę właściwości dielektrycznych ośrodka (53).

Innym przykładem ważności sił oddziaływań między samymi komórkami podczas adhezji przez mostkowanie jest aglutynacja erytrocytów przez aglutyniny (lektyny). Działanie enzymów proteolitycznych na erytrocyty może bardzo znacznie zredukować ilość aglutyniny potrzebnej do wywołania hemaglutynacji (np. 54). Zwiększoną zdolność krwinek do aglutynacji przypisywano odsłonięciu dodatkowych „receptorów” dla aglutynin przez działanie enzymów proteolitycznych (54). Ale poddane działaniu trypsyny erytrocyty królika wiązały tyle samo aglutyniny z soi co prawidłowe komórki, choć ich zdolność do aglutynacji wzrastała 100—200 krotnie (55). Wydaje się, że w interpretacji tego rodzaju doświadczeń należy brać pod uwagę fakt enzymatycznego odszczepienia jonogennych grup z powierzchni komórek, zmniejszającego odpychanie elektrostatyczne między nimi, jako jeden z powodów wzrostu zdolności do aglutynacji komórek.

Adhezja przez mostkowanie może być bardzo specyficzna i wtedy jeden czynnik mostkujący byłby odpowiedzialny za adhezję jednego typu komórek. Niekiedy chemiczna specyficzność może posiadać charakter bardziej ogólny; zdolność mostkowania wykazuje wtedy szeroki zakres makrocząsteczek np. posiadających na swoich łańcuchach grupy fosforanowe.

Teoria adhezji przez mostkowanie używając terminów biologicznych zwana jest „teorią cementu”.

### III. Możliwość stosowania teorii koloidów hydrofobowych w adhezji komórkowej — krytyczna ocena

Użycie teorii stabilności koloidów liofobowych do rozwiązywania problemów adhezji komórek (31, 32, 33) umożliwiło, przynajmniej jakościowo, wyjaśnienie niektórych cech kontaktu komórkowego. Jednakże słabości tej teorii, jako ogólnego modelu sił oddziaływań między błonami biologicznymi, nasuwają szereg wątpliwości i zastrzeżeń.

Proponując użycie teorii koloidów liofobowych w adhezji komórek Curtis (32, 33) zrobił założenie, że odległość między dwiema czarnymi liniami gęstości elektronowej na mikrofotografiach elektronowych jest rzeczywistą odlegością między peryferiami sąsiadujących komórek i że jasna strefa między liniami stanowi roztwór elektrolitu. Jak podkreślało wielu autorów (np. 23), stosowane techniki preparacyjne, które mogą współdziałać przy wytworzeniu zniekształceń strukturalnych, podają w wątpliwość to założenie. Nie ma pewności, że miejsca złogów produktów cieniowania jest miejscem ich tworzenia. Pomijając nawet fakt, że oglądany obiekt biologiczny w mikroskopie elektronowym jest preparatem artefaktów, bo dzięki nim otrzymuje się obraz, nasuwają się inne wątpliwości co do sugestii Curtisa.

Brak widocznej gęstości na obrazach w mikroskopie elektronowym nie jest jednoznacznym dowodem na to, że jest to przestrzeń zajmowana przez roztwór elektrolitu, choćby z powodu różnic w cieniowaniu pomiędzy białkami w zależności od zawartości niektórych aminokwasów. Dzięki zastosowaniu nowszych technik cieniowania np. lantanem (56), odkryto materiał w różnych przestrzeniach międzykomórkowych, który może mieć decydujące znaczenie w adhezji komórek. Ten fakt wskazał na konieczność modyfikacji klasycznej teorii koloidów liofobowych w zastosowaniu do adhezji komórkowych i rozważania możliwości nakładania się skutku działania sił wiążących komórki poprzez czynniki mostkujące (adhezja przez mostkowanie) na efekt działania sił rozpatrywanych w teorii koloidów liofobowych. Niektórzy autorzy np. Good (36) uważają, że obserwowany materiał może posiadać raczej funkcję zabezpieczenia komórek przed utratą wody, uniemożliwiając komórkom wejście w pierwsze minimum. Ale tak samo jak w przypadku wątpliwości co do dokładnego określenia odległości między błonami komórkowymi w mikroskopie elektronowym, nie można mieć pewności, że materiał międzykomórkowy, widoczny w cieniowanych preparatach, jest obecny między komórkami *in vivo*.

Znaczenie poszczególnych parametrów uwzględnionych w teorii koloidów liofobowych (równania 1—4) dla adhezji komórek będą dyskutowane w dalszej części tego rozdziału.

### III-1. Potencjał powierzchniowy ( $\psi_0$ )

Potencjału powierzchniowego komórki nie można zmierzyć bezpośrednio. Ocenia się go na podstawie pomiarów ruchliwości elektroforetycznej komórek. Równanie Smoluchowskiego daje następującą zależność:

$$u = \frac{\epsilon_0 \zeta}{4\pi\eta} \quad (5)$$

gdzie  $u$  — ruchliwość elektroforetyczna,  $\zeta$  — potencjał zeta,  $\epsilon_0$  — statyczna przenikalność dielektryczna,  $\eta$  — lepkość w hydrodynamicznej płaszczyźnie poślizgu.

Gdy komórka porusza się w gradiencie potencjału elektrycznego przez ośrodek zawieszający, cienka warstwa cieczy porusza się z komórką. Granica między cieczą poruszającą się z komórką a pozostałą, nieruchomą częścią cieczy jest hydrodynamiczną płaszczyzną poślizgu. Wewnątrz przestrzeni zawartej między płaszczyzną poślizgu i płaszczyzną jonogennych grup na właściwej powierzchni komórki są jony o przeciwnym znaku ładunku do grup powierzchniowych, które tworzą część dyfuzyjnej, elektrycznej warstwy podwójnej i dążą do tego, aby zubożyć udział prawdziwego potencjału powierzchniowego. A więc potencjał powierzchniowy,  $\psi_0$ , jest większy niż potencjał zeta. Jak dotąd nie została opracowana ogólna teoria zależności między potencjałem zeta i  $\psi_0$ .

Wyniki badań *Haydona* (57), wykonanych na kropelkach oleju w wodzie, doprowadziły go do wniosku, że potencjału powierzchniowego mniejszego niż 50mV nie popełnia się prawdopodobnie dużego błędu przyjmując, że potencjał powierzchniowy  $\psi_0$  jest równy potencjałowi zeta. *Overbek* sugerował (58), że w zakresie od 10 do 40mV i gdy  $1/\lambda$  wynosi 8Å (a więc parametry spotykane w układach biologicznych), potencjał  $\psi_0$  może być większy od potencjału zeta o 1—5mV.

Potencjały zeta żywych komórek nie są łatwe do zmierzenia z dużą dokładnością. Optymistyczne wydają się oszacowania, że dokładność jest lepsza niż  $\pm 5$ mV. Dla przykładu, *James i Carter* (59) wykazali duży wpływ przewodnictwa powierzchniowego na pomiary elektroforetyczne. Zjawisko to jest bardzo często pomijane. Należy również pamiętać o tym, że powszechnie używane równania elektroforetyczne są oparte na nie dającym się usprawiedliwić w biologicznych sytuacjach założeniu, że błony komórkowe są nieprzepuszczalne dla jonów. Jak podkreślał *Haydon* (60), to założenie może prowadzić do błędnych obliczeń potencjału powierzchniowego z pomiarów ruchliwości elektroforetycznej. Wątpliwości budzi także to, że wartości potencjałów zeta, otrzymanych w warunkach swobodnego ruchu komórek, mogą, ale nie muszą być rzeczywistymi potencjałami istniejącymi w miejscach kontaktu komórek w agregatach (patrz podrozdział IV-1).

Reasumując wydaje się, że elektroforetyczne dane mogą być używane tylko do porównania właściwości elektrostatycznych powierzchni komórek

i dla wykazania w półilościowy sposób zmian lub różnic w potencjałach powierzchniowych. Natomiast nie mogą być używane do wyznaczenia prawdziwego potencjału powierzchniowego lub przeciętnej gęstości ładunku w jednostkach absolutnych, jak to robiło wielu badaczy.

### III-2. Parametr Debye'a — Hückela, $\kappa$

Odwrotność parametru,  $1/\kappa$ , która ma wymiar długości, wskazuje na grubość dyfuzyjnej podwójnej warstwy elektrycznej przeciwjonów, które przychodzą z roztworu otaczającego naładowaną powierzchnię komórki. Parametr Debye'a — Hückela wyraża się wzorem:

$$\kappa = \left( \frac{4 \pi e^2}{kT \epsilon_0} \sum n_i Z_i^2 \right)^{1/2} \quad (6)$$

gdzie  $n_i$  — gęstość jonów  $i$ -tego rodzaju w roztworze,  $Z_i$  — wartościowość jonu  $i$ -tego rodzaju, a inne symbole tak jak w równaniu 1 i 2.

Odwrotność parametru,  $1/\kappa$ , można także uważać za odległość od płaszczyzny, gdzie występuje prawdziwy potencjał  $\psi_0$ , do miejsca, gdzie potencjał spada do  $1/e \psi_0$  (tj. w przybliżeniu 37%  $\psi_0$ ). Heard i Seaman (61) obliczyli, że w temperaturze 25°C, erytrocyt w 1M NaCl jest otoczony podwójną warstwą o „grubości” 3Å, w 0,145M NaCl podwójna warstwa wynosi około 10Å, a w 10<sup>-3</sup>M NaCl około 100Å.

Analizując równanie 6 można pokazać, że jeżeli wszystkie inne parametry równań 1 i 2 są stałe, to energia elektrostatycznego odpychania,  $V_r$ , może być efektywnie zredukowana przez wzrastającą siłę jonową i (lub) wartościowość przeciwjonów. Komórki są otoczone podwójną warstwą elektryczną i dlatego muszą wykazywać koloidową, elektrostatyczną naturę. Istnieją wystarczające dowody na to, że niektóre cechy kontaktu komórkowego są modyfikowane przez czynniki, które zmieniają elektrostatyczne siły odpychania. Rosnące stężenie soli wyraźnie redukuje międzykomórkową przestrzeń (6, 27, 43), zmniejsza przestrzeń między szkłem a komórkami tkanek, które są z nim w kontakcie (62) i zwiększa szybkość agregacji komórek śluzowca (63), co jest zgodne z teorią koloidów liofobowych. Jest to jeden z najczęściej cytowanych argumentów przemawiających za stosowalnością tej teorii.

Sztwywnie trzymanie się precyzyjnej zależności  $V_r$  od  $1/\kappa$  nie jest jednak całkowicie słuszne, ponieważ nie można założyć, że  $1/\kappa$  jest jedyną zmieniającą się właściwością peryferii komórek podczas zmiany siły jonowej i wartościowości przeciwjonów w otoczeniu. Co więcej, płyny międzykomórkowe, osocze krwi posiadają wysokie stężenie makrocząsteczek, które mogą zmieniać warunki elektrostatyczne w pobliżu powierzchni, także grubość podwójnej warstwy jonowej,  $1/\kappa$ . Dla przykładu, polimery takie jak dekstran, poliwinylpiperolidon i alkohol poliwinylowy, choć niejonogenne,

powodują wzrost ruchliwości elektroforetycznej liposomów (64) i erytrocytów (65). Jak widać z równania

$$u = \frac{\sigma}{\eta} \cdot \frac{1}{x} \quad (7)$$

gdzie  $u$  — ruchliwość elektroforetyczna,  $\sigma$  — gęstość ładunku powierzchniowego,  $\eta$  — lepkość w hydrodynamicznej płaszczyźnie poślizgu,  $1/x$  — grubość podwójnej warstwy jonowej, zjawisko to jest wynikiem zwiększenia wymiaru podwójnej warstwy jonowej, prawdopodobnie wskutek wypychania z niej przeciwjonów przez cząsteczki polimeru.

### III-3. Przenikalność dielektryczna ( $\epsilon$ )

Przenikalność dielektryczna jest bardzo złożonym parametrem zależnym od polaryzowalności trwałych i indukowanych dipoli. Stąd właściwości substancji, które determinują jej przenikalność dielektryczną, można dyskutować w oparciu o polaryzowalność. Za „stałą dielektryczną” — termin niezbyt fortunny, gdyż wielkość ta jest stała w bardzo ograniczonym sensie — należałoby uważać tę przenikalność dielektryczną, którą wykazuje dany ośrodek w polu statycznym.

Dla obliczenia sił odpychania elektrostatycznego potrzebna jest wartość statycznej przenikalności dielektrycznej  $\epsilon_0$  ośrodka między powierzchniami komórek, a dokładniej wartość  $\epsilon_0$  w podwójnej warstwie jonowej. Z podstawienia równania 6 w równanie np. 2 widać, że wzrost  $\epsilon_0$  daje wzrost energii elektrostatycznego odpychania, a co za tym idzie, obniżenie wielkości drugiego minimum i wzrost odległości między powierzchniami komórek, w której to minimum występuje. Z równania 6 wynika, że statyczna grubość warstwy jonowej,  $1/x$ , zwiększa się wraz z  $\epsilon_0^{1/2}$  i nałożenie podwójnych warstw elektrycznych jest w danej odległości większe. Duże stężenie niewodnego materiału powoduje z kolei zmniejszenie  $\epsilon_0$ , a więc redukcję  $1/x$  i obniżenie sił odpychania elektrostatycznego między membranami — odwrotnie do błędnej sugestii G o o d a (36, str. 427). Ta ostatnia zależność może być wzięta pod uwagę jako jeden z czynników redukcji odległości międzykomórkowej obserwowanej przez R o b e r t s o n a (6) przy wzrastającym stężeniu sacharozy w ośrodku zawieszającym komórki.

Często przyjmuje się, że dla biologicznego środowiska, w którym znajdują się komórki, wartość  $\epsilon_0$  wynosi 80. L y k l e m a i O v e r b e e k (66) pokazali, że w polu elektrostatycznym o bardzo dużym natężeniu, które może powstawać przez kombinację wysokiego potencjału i dużej siły jonowej, występują efekty nasycenia dielektrycznego. B a r l o v i R o s s - M a c d o n a l d (67) obliczyli nawet wartość  $\epsilon_0$  mniejszą niż 1, która wydaje się jednak pozbawiona sensu fizycznego. Opierając się tylko na rozważaniach Lyklemy i Overbeeka (66) możnaby wyciągnąć wniosek, że dla układów biologicznych, gdzie gęstości ładunku powierzchniowego są

zwykle niskie, a siły jonowe roztworów „fizjologicznych” umiarkowane, zjawisko nasycenia dielektrycznego jest do pominięcia. W e i s s (23) przypuszczał, że woda zaadsorbowana lub związana z powierzchnią komórek posiada wartość  $\epsilon_0$  niższą niż 30 ze względu na ograniczoną swobodę rotacji dipoli wody. Przypuszczeniu temu można przeciwstawić wyniki pomiarów właściwości dielektrycznych wodnych roztworów białek wykonanych przez S c h w a n a (68), G r a n t a (69) i ich współpracowników (70, 71). Z ich pomiarów wynika, że rzeczywiście woda „związana” z białkiem wykazuje dyspersję dielektryczną pośrednią między dyspersją lodu a „swobodnej” wody ciekłej, ale jej wartość  $\epsilon_0$  znajduje się w granicach 90—100. Inni np. G o o d (36), rozważali jeszcze bardziej skomplikowaną sytuację w podwójnej warstwie elektrycznej; w regionach położonych blisko naładowanej powierzchni prawdziwa wartość  $\epsilon_0$  jest niska i zwiększa się stopniowo w miarę oddalania się od powierzchni.

Niepewność, czy może być użyta wartość  $\epsilon_0$  czystej wody, pogłębia fakt, że roztwory „fizjologiczne” zawieszające komórki mogą zawierać duże stężenia makrocząsteczek — białek, polisacharydów. Roztwory białek, poliaminokwasów, DNA wykazują przyrost przenikalności dielektrycznej w niskich częstotliwościach w porównaniu do wody. Interpretacja widm (w zakresie częstotliwości radiowych) jest jeszcze trudnym problemem do wyjaśnienia mimo istnienia pewnej liczby teorii i starannie wykonanych eksperymentów. Rotacja całych makrocząsteczek, przewodnictwo jonów powierzchniowych, fluktacje protonów i występowanie wody „związanej” z makrocząsteczkami — każde z tych zjawisk daje tylko częściowo wytłumaczenie dyspersji dielektrycznych roztworów makrocząsteczek. Fakt, że zmierzona wartość  $\epsilon_0$  roztworów makrocząsteczek może być większa niż wody, brano pod uwagę w niektórych rozważaniach na temat sił elektrostatycznego odpychania (29, 41, 52). W rozważaniach nad wpływem obecności makrocząsteczek w ośrodku zawieszającym komórki nasuwa się jednak podstawowe pytanie, czy można podstawiać mierzoną wartość  $\epsilon_0$  roztworów makrocząsteczek do wzorów 1 i 2 na energię odpychania elektrostatycznego. Rozkład jonów w podwójnej warstwie jest konsekwencją potencjału powierzchniowego, który daje siłę działającą na jony przenoszoną przez wodę. A więc właściwa statyczna przenikalność dielektryczna w podwójnej warstwie elektrycznej jest wartością  $\epsilon_0$  wody po odjęciu efektów polaryzacji jonowej. Co więcej, mierzoną wartość  $\epsilon_0$  roztworów makrocząsteczek należałoby uważać za wielkość „makroskopową”, ponieważ wymiar makromolekuł jest porównywalny z wymiarem podwójnej warstwy jonowej. Lokalna wartość  $\epsilon_0$  wody, w najbliższym otoczeniu jonu, jest zmniejszona, a nie zwiększona, przez duży gradient pola w pobliżu jonu (72). Wydaje się więc, że wartość  $\epsilon_0$ , która charakteryzuje właściwości dielektryczne podwójnej warstwy w polu elektrostatycznym, nie może być większa niż statyczna przenikalność dielektryczna czystej wody.

Właściwości dielektryczne membran i ośrodka między nimi, choć de-

terminują wielkość sił przyciągania Van der Waalsa (73—79), nie są uwzględnione we właściwy sposób w teorii koloidów liofobowych (patrz III6 i IV7). W dodatku pomiary przenikalności dielektrycznych materiałów komórkowych napotykają na duże trudności (80), szczególnie w niskich częstotliwościach. Wg teorii koloidów liofobowych zmianę sił przyciągających wraz ze zmianą właściwości dielektrycznych ośrodka można wyrazić przez modyfikację stałej Hamakera. Wątpliwości co do poprawności takiego postępowania i szereg innych zastrzeżeń dotyczących obliczania stałej Hamakera będą przedstawione w podrozdziale III-6.

#### III-4. Promień krzywizny (a)

Na podstawie równania 1 można stwierdzić, że im mniejszy promień krzywizny, tym niższa energia potencjalna i siła odpychania między dwiema naładowanymi powierzchniami. B a n g h a m i P e t h i c a (31) sugerowali, że zbliżenie się dwóch komórek może być ułatwione przez powstanie lokalnych uwypukleń o mniejszym promieniu krzywizny.

Chociaż w wypadku sztywnych kul bardzo łatwo można opisać wartość ich promienia krzywizny, przedstawia to jednak bardzo duże trudności podczas oddziaływań między komórkami przylegającymi do siebie. Nawet gdy doświadczenia wykonuje się na świeżo zawieszonych komórkach, które pod mikroskopem optycznym wydają się kuliste, to nasuwają się wątpliwości, czy promień całej komórki ma tę samą wartość co promień krzywizny tej części komórki, która bierze udział w adhezji. W wypadku komórek przylepiających się do szkła, A m b r o s e stwierdził (40), że tylko mała część powierzchni bierze udział w rzeczywistym kontakcie komórek ze szkłem. Wydaje się, że często małe, lokalne pseudopodia są odpowiedzialne za adhezję komórek; wybrzuszenia te mają promień krzywizny mniejszy, niż cała komórka. Filmowanie kultur komórkowych pozwoliło na stwierdzenie, że adhezja może następować dzięki wzajemnej penetracji nibynózek z peryferii komórek. (81—84). Trudno jest ocenić promień krzywizny nitkowato zakończonych nibynózek w mikroskopie optycznym, ponieważ nie pozwala na to rozdzielczość mikroskopu świetlnego: wykonano więc zdjęcia w mikroskopie elektronowym (np. 84, 85). Chociaż istnieją wątpliwości w oszacowaniu promienia krzywizny wybruszeń komórkowych w mikroskopie elektronowym z powodu możliwości artefaktów podczas preparacji, sugerowano, że promień krzywizny pseudopodium komórek HeLa wynosi około 500Å (23).

Równanie 3 pokazuje, że również oddziaływanie przyciągające między dwiema powierzchniami zależy od promienia krzywizny; im mniejszy promień krzywizny, tym słabsze oddziaływanie przyciągające. Jednakże z punktu widzenia adhezji komórek wydaje się prawdopodobne, że istotna rola mniejszego promienia polegałaby nie na zmniejszeniu przyciągania, ale na zmniejszeniu odpychania, a więc na umożliwieniu komórkom poko-



niania bariery potencjalnej energii odpychania ( $V_{\text{maks}}$ ,  $F_{\text{maks}}$ ) (patrz także podrozdział II-2). Oddziaływanie przyciągające jest bardzo duże dopiero na bardzo małych odległościach. Z chwilą pokonania tej bariery pseudopodia mogłyby rosnąć powodując zwiększenie oddziaływania przyciągającego. Tę ostatnią ewentualność uważa się za mniej ważną w określeniu, czy wystąpi adhezja komórek.

### III-5. Odległość między oddziałującymi powierzchniami (I)

Znajomość odległości między dwiema powierzchniami komórkowymi wymaga określenia położenia w przestrzeni tych powierzchni. Gdy komórki są rozdzielone na odległość możliwą do obserwacji w mikroskopie optycznym, to oszacowanie położenia granicy między powierzchnią komórki a środowiskiem z dokładnością do kilkudziesięciu angstromów nie jest obciążone dużym błędem. Kiedy trzeba rozpatrywać oddziaływanie z dokładnością do kilku angstromów, powierzchnia komórki musi być precyzyjnie zdefiniowana. To z kolei wymaga wiedzy o szczegółowej strukturze peryferii komórki, w której to dziedzinie są znaczne luki. Ogólnie przyjęte w mikroskopii elektronowej techniki cieniowania dały możliwość stwierdzenia i dokładnego zlokalizowania zewnętrznego materiału naokoło w przybliżeniu 75Å-wej trójwarstwowej struktury, którą uważa się za zasadniczą błonę komórkową, widzianą na konwencjonalnych mikro fotografiach elektronowych. Zewnętrzną „puszystą” warstwę obserwowano wielokrotnie (3). Według opinii *W e i s s a* (23) jako odległość międzykomórkową powinno się brać odległość między zewnętrznymi granicami „puszystych” warstw, a nie między trójwarstwowymi strukturami. Jednakże pomiarów bardzo małych odległości między dwiema oddziałującymi komórkami, wykonanych w mikroskopie elektronowym, nie można przyjmować bezkrytycznie z powodu możliwości powstawania artefaktów podczas preparacji.

### III-6. Stała Hamakera (A)

Jedną z głównych trudności w interpretacji adhezji komórek na podstawie teorii koloidów liofobowych stanowi wyznaczenia stałej Hamakera, określającej międzyatomowe siły przyciągania.

Jak dotąd nie otrzymano niedwuznacznych wyników w przypadku pomiarów oddziaływań komórkowych. *Verwey i Overbeek* (30), stosując równanie Slatera-Kirkwooda, wydedukowali, że stała ta powinna mieć wartość około  $10^{-12}$  erga. Większość wartości, które były obliczone z danych doświadczalnych, są znacznie niższe niż ta wielkość (Tabela 1).

Istnieją także wątpliwości natury formalnej odnośnie teoretycznego obliczania sił Van der Waalsa w teorii koloidów liofobowych. Oszacowanie sił Van der Waalsa w teorii koloidów liofobowych (30) jest ograniczone

przez kilka założeń ad hoc. Są to: a) założenie addytywności indywidualnych międzyatomowych oddziaływań w skondensowanym ośrodku, b) przybliżenie, że w siłach Van der Waalsa najważniejszy, a nawet wyłączny udział posiada siła Londona; siły Van der Waalsa mogą być traktowane jako wynik elektromagnetycznych sygnałów, a więc wg tego założenia najważniejsze korelacje elektromagnetyczne, jako konsekwencja fluktuacji jedynie elektronowych, zależałyby wyłącznie od właściwości dielektrycznych substancji w polu elektromagnetycznym o częstotliwości w zakresie ultrafioletu, c) wprowadzenie dość dowolnej poprawki na „stałą dielektryczną” w pojedynczej częstotliwości, aby ominąć trudności w obliczeniu sił spowodowanych obecnością ośrodka zawieszającego (np. woda między regionami lipidowymi). Co więcej, potrzebne są szczegółowe informacje o atomowych polaryzacjach i częstotliwościach relaksacji.

Tabela 1.

Układ	Wartość A (erg)	Uwagi
Emulsja wody w oleju	$4 \cdot 10^{-15}$ (86)	
Lateks polistyrenowy w wodzie	$5 \cdot 10^{-13}$ (87) $4-7 \cdot 10^{-14}$ (88) $1,03-1,1 \cdot 10^{-14}$ (89)	
Zawiesina kwasu arachidonowego w wodzie	$6 \cdot 10^{-15}$ (90)	
Zawiesina parafiny w wodzie	$1,6 \cdot 10^{-13}$ (91)	
Cienkie błony lipidowe (dekan)	$5,6 \cdot 10^{-14}$ (92)	
Leukocyty owcy	$10^{-14}$ i $10^{-15}$ (93 i 94)	wartości obliczone z połączenia danych elektroforetycznych z wynikami pomiarów kinetyki agregowania leukocytów
Erytrocyty ludzkie	$1-5 \cdot 10^{-14}$ (41)	wartość wyznaczona raczej arbitralnie na podstawie koloidalnego modelu oddziałujących kul.

Jak podkreślali późniejsi badacze (95), obliczenie sił Van der Waalsa oparte na tych założeniach (ważnych dla rozrzedzonych gazów) jest wewnętrznie sprzeczne. I tak na przykład założenia addytywności nie można stosować dla oddziaływań w skondensowanych fazach, szczególnie gdy są nimi tak polarne substancje jak woda.

Ze względu na niepewność wyników wyznaczonych doświadczalnie lub obliczonych teoretycznie, istnieje tendencja do ustalania stałej Hamakera raczej arbitralnie, aby móc oszacować siły i energie oddziaływań między komórkami.

### III-7. Podsumowanie

Teoria koloidów liofobowych, choć pożyteczna w analizie sił i energii oddziaływań międzykomórkowych, stanowi jednak przybliżenie zbyt niskiego rzędu, aby na jej podstawie można było wyjaśnić wszystkie biochemiczne, immunologiczne i fizyczne problemy w adhezji komórek. Zbyt duża ilość parametrów, które nie są dokładnie znane i niedokładności modelu sił, jaki proponuje ta teoria, nie pozwalają w licznych przypadkach na uzyskanie dobrej zgodności przewidywanych odległości międzykomórkowych z obserwowanymi. Te ostatnie są zresztą obarczone niedokładnościami doświadczalnymi.

Aktualne wątpliwości o równaniach energii potencjalnej przemawiają za ostrożnością w interpretowaniu pojedynczych diagramów energii oddziaływań. Bardziej celowe wydaje się rozpatrywanie rodziny krzywych obliczonych z najwyższych i najniższych oczekiwanych wartości dla każdego mającego znaczenie parametru. Szczególnie obliczone drugie minima, które uważa się za wystarczająco „głębokie”, aby wytłumaczyć stabilność adhezji komórek, powinny być przyjmowane ze sceptyzmem. Dla przykładu — obliczenia Brooks a i współpr. (41), przewidujące występowanie drugiego minimum o głębokości od 10 do 20kT między krwinkami czerwonymi (szczegóły w podrozdziale II-1), były zrobione dla cząstek o promieniu 50 $\mu\text{m}$ . Jeżeli efektywny promień krzywizny kontaktujących się części komórek weźmie się jako 0,1 $\mu\text{m}$ , to ta zmiana nie pociąga za sobą zmiany pozycji drugiego minimum, ale wyraźnie redukuje wartości energii. Występowanie adhezji w drugim minimum jest więc prawdopodobne, zwłaszcza adhezji komórek „swobodnych” np. erytrocytów, ale pełne potwierdzenie tego typu adhezji wymaga dalszych badań.

## IV. Modyfikacje teorii koloidów liofobowych

Zastrzeżenia dotyczące stosowalności teorii koloidów liofobowych do problemów adhezji komórek stały się „zaczynem” prac nad stworzeniem lepszych modeli sił oddziaływań międzykomórkowych.

### IV-1. Model o stałej gęstości ładunku powierzchniowego ( $\sigma$ )

Zrozumienie oddziaływania między indentykcznymi cząstkami koloidowymi otoczonymi podwójnymi warstwami jonowymi wywodzi się z pionierskich, teoretycznych prac Derjaguina i Landau'a (34) oraz

Verwey'a i Overbeeka (30). Rozszerzenie teorii koloidów liofobowych na cząstki z nieidentycznymi gęstościami ładunku powierzchniowego,  $\sigma$ , przeprowadzili Devereux i de Bruyn (96), którzy obliczyli dla takich cząstek siły i energie odpychania. Wszyscy wymienieni autorzy w swoich teoretycznych rozważaniach wychodzą z sytuacji koloidu liofobowego, w którym jony odpowiedzialne za ładunki powierzchniowe są w termodynamicznej równowadze między powierzchnią a roztworem. Daje to model, w którym oddziaływanie odpychające (np. równania 1 i 2) między zbliżającymi się cząstkami występuje przy stałym potencjale powierzchniowym, a zmiennej gęstości ładunku powierzchniowego. Tymczasem powierzchnie błon komórkowych, które były badane, noszą hydrofilowe grupy karboksylowe (patrz Cooks (97) i Winzler (98)), które decydują w znacznej części o ładunku i potencjale. Z tej przyczyny nie można w pełni traktować komórek jako hydrofobowych cząstek koloidowych (99).

Nie można twierdzić stanowczo, że ładunki zaadsorbowanych jonów nie odgrywają roli w determinowaniu potencjału powierzchniowego komórki w warunkach fizjologicznych. Z drugiej strony wiadomo, że tak różniące się między sobą powierzchnie, jak krwinek czerwonych (100) i *Aerobacter aerogenes* (101) wykazują brak wykrywalnych ilości zaadsorbowanych jonów. Stwierdzono to doświadczalnie za pomocą dwuazometanu, który reaguje z wszystkimi grupami karboksylowymi i redukuje ruchliwość elektroforetyczną do zera. Alternatywnym podejściem do problemu jest założenie, że duża część ładunku powierzchniowego jest stała i stanowią ją grupy karboksylowe, ale istnieje także część zawierająca zaadsorbowane jony, łatwo desorbujące się podczas oddziaływania. Analiza takiej sytuacji pokazuje, że około 60% ładunku musiałoby desorbować, jeżeli oddziaływanie miałoby charakter podlegający modelowi o stałym potencjale tzn. wg równań 1 i 2 (99). Ten wniosek jest silnym argumentem przemawiającym za modelem o stałej gęstości ładunku (a zmiennym potencjale powierzchniowym) dla komórek, ponieważ z tego modelu wynika mały rozmiar desorpcji.

Overbeew podał wyrażenie na siłę odpychania,  $F_r$ , jako funkcję potencjału istniejącego w połowie odległości między płaskimi powierzchniami,  $\psi_0$ , bez różnicowania, czy potencjał powierzchniowy lub gęstość ładunku są stałe podczas oddziaływania (102). Wychodząc z tego równania i zakładając stałą gęstość ładunku jako lepsze przybliżenie dla adhezji komórkowych otrzymuje się wyrażenie na siłę odpychającą dla niskich potencjałów powierzchniowych (29):

$$F_r = 2 n^2 T \left\{ \cosh \left[ \frac{e}{kT \epsilon_0} \left( \frac{4 \pi \sigma \operatorname{sech} \kappa x}{\Theta t + \tanh \kappa x} \right) \right] - 1 \right\} \quad (8)$$

gdzie  $n$  — liczba jonów w roztworze przypadająca na jednostkę objętości,  $k$  — stała Boltzmanna,  $T$  — temperatura bezwzględna,  $e$  — ładunek elek-

tronu,  $\sigma$  — gęstość ładunku powierzchniowego,  $\kappa$  — parametr Debye'a — Hückela,  $\epsilon_0$  — statyczna przenikalność dielektryczna,  $x$  — połowa odległości między płaszczyznami,  $\Theta = (1 - \alpha)$ ;  $(1 - \alpha)$  — część objętości wewnątrz warstwy powierzchniowej dostępnej dla przeciwnonów (103),  $t$  — grubość tej warstwy. Gingell wykonał liczbowe całkowanie ogólnej siły (sumy siły odpychania wyrażonej wzorem 8 i siły przyciągania wg wzoru 4) od odległości nieskończenie dużej do danej odległości  $x = 1/2$ , co daje różnicę między energią w nieskończoności i w odległości  $l$  tj. energię oddziaływania (129). Nieoczekiwanym wynikiem tych obliczeń było to, że zmiana w potencjale powierzchniowym ma mały wpływ na drugie minimum energii i siły ( $V_{\min, II}$ ,  $F_{\min, II}$ ), dużo mniejszy niż na siłę potrzebną do wprowadzenia dwóch powierzchni w pierwsze minimum czyli konieczną do pokonania bariery potencjalnej ( $F_{\max}$ ). Małe zmiany w potencjale  $\sim 2$  mV mają tylko nieznaczny wpływ na drugie minimum przez szeroki zakres rozpatrywanych stałych Hamakera.

Wg modelu o stałej gęstości ładunku powierzchniowego zbliżenie podwójnych warstw na bliską odległość powinno powodować wzrost absolutnej wartości potencjałów powierzchniowych wszystkich membran (99, 104). Gingell sugerował możliwość znaczenia tego zjawiska w międzykomórkowym komunikowaniu się i w zahamowaniu wzrostu komórek przy ich zetknięciu (*contact inhibition*) (104).

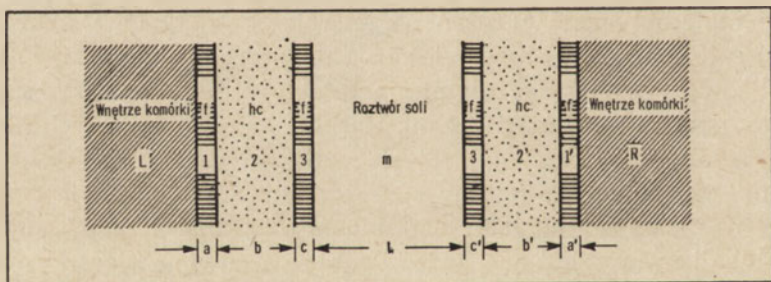
Oprócz zastrzeżeń co do stałości potencjału powierzchniowego,  $\psi_0$ , podczas zbliżania się powierzchni komórek, w teorii koloidów liofobowych zakłada się pewne przybliżenia w tym celu, aby można było uzyskać rozwiązanie matematyczne wyrażen na energię oddziaływań (np. równania 1 i 2): a) założenie ostrej nieciągłości na powierzchni komórki, b) ładunki są zlokalizowane w płaszczyźnie nieciągłości, c) ładunki są rozłożone z jednolitą gęstością na całej powierzchni. Rozkład grup chemicznych niosących ładunki w objętości rozciągającej się tylko kilka angstromów od „powierzchni” nie zmienia w istotny sposób analizy, ponieważ jest to dobre przybliżenie płaskiego rozkładu ładunku. Jeżeli jednak ładunek powierzchniowy zlokalizowany jest w bardzo grubej warstwie związanego anionowego poli. lektrolitu, analiza matematyczna staje się o wiele bardziej skomplikowana. Po pierwsze, przestrzenna gęstość ładunku zmieniałaby się z odległością. Po drugie, odpychanie entropowe miałoby większy udział w siłach odpychania międzykomórkowego. Koniecznym wydaje się przebadanie w przyszłości tych założeń w rozważaniach wyższego rzędu nad problemem adhezji komórkowej.

#### IV-2. Model Parsegiana i Gingella

W modelu tym, podobnie jak w teorii koloidów liofobowych rozpatruje się dwa rodzaje oddziaływań dalekiego zasięgu: siły elektrostatyczne (koulombowskie), które są siłami odpychającymi między powierzchniami no-

szącymi ładunki o tym samym znaku i siły elektrodynamiczne, które są siłami przyciągającymi między podobnymi powierzchniami (105, 106). Określenie „elektrodynamiczny” pokrywa znaczenie używanych terminów „Van der Waalsa” i „elektromagnetyczny”. Przedstawiona w tym modelu analiza sił dalekiego zasięgu oparta na teoretycznych pracach *N i n h a m a*, *Parsegiana* i *Gingella* (29, 74—79, 99, 107, 108), wydaje się przybliżeniem wyższego rzędu aniżeli teoria koloidów liofobowych. Oczywiście ogólne właściwości krzywych oddziaływań (I-2) będą występowały i w tym przypadku.

W analizie sił dalekiego zasięgu autorzy użyli uproszczonego modelu błon komórkowych *Daniellego* i *Davsona*. Jest to dwumolekularna warstwa lipidowa, grubości około  $40\text{\AA}$ , opłaszczona z jednej strony lub z obydwu stron warstwą materiału białkowego i cukrowego. Zewnętrzna „puszysta” warstwa nosi ustalony ładunek elektrostatyczny, który jest odpowiedzialny za elektrostatyczną warstwę podwójną w najbliższym sąsiedztwie błony. Właśnie w tym regionie membrany różne typy komórek wykazują znaczną odmienność pod względem grubości, masy i gęstości ładunku. Ze względu na brak pełnych danych doświadczalnych autorzy założyli, że właściwości dielektryczne wewnętrznego rdzenia membrany są właściwościami ciekłych węglowodorów, a właściwości dielektryczne zewnętrznych „puszystych” warstw są właściwościami cukrów o bardzo dużym stężeniu. Ten próbny obraz oddziaływań między dwiema błonami przedstawiony jest na rycinie 3.



**Ryc. 3.** Schemat oddziaływania dwóch błon komórkowych pokrytych tzw. „puszkiem” przez roztwór soli (105)

f — „puszek”, hc — węglowódor, m — roztwór soli. W środkowej części przekroju są oznaczone właściwościami materiałów 1, 2, 3, 1', 2', 3', warstw, których grubości są wskazane poniżej.

#### IV-2a. Siły elektrostatyczne

Składniki błon komórkowych posiadają grupy kwaśne, które dysocjując dają ładunek na powierzchni komórki. Potencjał, który jest wynikiem obecności ładunku, zależy od dysocjacji grup kwaśnych, ich przestrzennego rozmieszczenia i składu jonowego ośrodka zawieszającego. *Gingell*, *Parsegiana* i *Ninham* wyprowadzili równania dla tych parametrów

(107, 108). Według nich, aby obliczyć elektrostatyczne odpychanie między powierzchniami komórkowymi mającymi ładunki o tym samym znaku, trzeba wziąć pod uwagę skład jonowy ośrodka zawieszającego, gęstość ładunku powierzchniowego komórek i to, że ładunek ten nie jest dokładnie zlokalizowany na cienkiej powierzchni, ale może zajmować region o skończonej grubości. Energię oddziaływań elektrostatycznych między jednakowymi powierzchniami można oszacować z dobrym przybliżeniem wg równania:

$$G^{es}(l) = \frac{8\pi^2\sigma^2}{\epsilon_0\kappa} \cdot e^{-\kappa l} \quad (9)$$

gdzie  $l$  — odległość między kontaktującymi powierzchniami,  $\epsilon_0$  — statyczna przenikalność dielektryczna,  $\kappa$  — parametr Debye'a — Hückela,  $\sigma$  — efektywna gęstość ładunku powierzchniowego, który znajduje się w regionie peryferii komórki o skończonej grubości. Poprzez parametr  $\sigma$  uwzględniony jest wpływ grubości zewnętrznej warstwy „puszystej” ( $c$  i  $c'$  na Ryc. 3) na energię oddziaływania elektrostatycznego. W tak oszacowanej energii odpychania elektrostatycznego ujawniły się dwie ważne cechy:  $a_1$  energia ta maleje, gdy wzrasta grubość warstwy „puszystej” — jest to wynik większej populacji ruchliwych przeciwjonów obecnych w grubszej warstwie; przeciwjony te częściowo znoszą pole spowodowane ustalonym ładunkiem wewnątrz „puszku” i obniżają elektrostatyczne odpychanie między warstwami,  $a_2$  energia elektrostatycznego odpychania jest umiarkowanie zależna od zmian gęstości ładunku powierzchniowego.

Wyrażenie na energię oddziaływań elektrostatycznych  $G^{es}$  (wzór 9) zostało wyprowadzone w oparciu o analizę odpychania między naładowanymi powierzchniami z założoną stałą gęstością grup jonogennych i stopniem jonizacji, zależnym bezpośrednio od ekranowanego potencjału znajdujących się naprzeciwko siebie powierzchni, a więc zależnego od odległości między powierzchniami. Czy żywe komórki stanowią taki układ? Zależy to od tego, czy grupy jonogenne, np. jony karboksylowe z jonami metali na powierzchni, mogą być charakteryzowane przez stałe jonizacji analogiczne do stałych jonizacji słabych kwasów.

#### IV-2b. Siły elektrodynamiczne

Ażeby obliczyć przyciągające siły elektrodynamiczne należy wg Parsegiana i Nihama (74—78) zrezygnować z powszechnie stosowanego założenia, że energie elektromagnetyczne między danymi ciałami są sumą odwrotności szóstej potęgi oddziaływań między ich atomami. Dla oddziaływań między makroskopowymi ciałami w skondensowanym stanie skupienia Lifshitz w 1955 r. zaproponował teorię (73), później uogólnioną przez Dzyaloshinskiego, Lifshitza i Pitaevskiego (95). Podstawą tej teorii jest idea, że oddziaływania między ciałami odby-

wają się poprzez fluktuujące pole elektromagnetyczne. Z powodu termodynamicznych fluktuacji pole to jest zawsze obecne wewnątrz materialnego ośrodka, a także rozchodzi się poza jego granice. Dobrze znaną konsekwencją tego pola jest promieniowanie cieplne ciał. „Makroskopowa” teoria Dzialoshinskiego, Lifshitz’a i Pitaevskiego omija trudności związane z oszacowaniem sił Van der Waalsa w teorii koloidów liofobowych — włącza wszystkie siły działające w układzie wielu ciał, bierze pod uwagę udziały wszystkich częstotliwości oddziaływań i wprowadza poprawnie efekty pośrednich substancji np. ośrodka zawieszającego. Co ważniejsze, informacja potrzebna do obliczeń jest zawarta we właściwościach dielektrycznych materiałów składowych — informacja dostępna w zasadzie z niezależnych pomiarów spektroskopowych. Elektrodynamiczna energia może być obliczona dla odległości większych niż międzyatomowe przez sumowanie energii oscylatora o wszystkich elektromagnetycznych fluktuacjach rozciągających się przez całą strukturę. Przez dłuższy okres czasu uważano (109), że teorii tej niemożna zastosować praktycznie do obliczenia sił elektrodynamicznych z powodu braku kompletnych danych spektralnych. Jednakże niedawno Parsegian i Ninham (74—78) wprowadzili kilka upraszczających założeń dotyczących korzystania z danych spektralnych, co doprowadziło ich do wniosku, że nie są konieczne kompletne dane spektralne, szczególnie gdy składowe substancje mają podobną gęstość.

Dla dziewięciu warstw (Ryc. 3) modelu Parsegiana i Gingella — po wprowadzeniu upraszczających założeń — ogólne wyrażenie na elektrodynamiczną energię swobodną względem nieskończonej dużej odległości ( $l = \infty$ ) przyjmuje postać:

$$G^{ed}(l, a, b, c, a', b', c'; T) = \frac{kT}{8\pi l^2} \sum_{n=0}^{\infty} \int_r^{\infty} x \ln \left[ \bar{D}(x) \right] dx \quad (10)$$

Tutaj  $r = 2l \cdot \epsilon_m^{1/2} \cdot \xi_n / c$ , gdzie  $c$  — szybkość światła w próżni,  $k$  — stała Boltzmana,  $T$  — temperatura bezwzględna. Symbol  $\Sigma'$  oznacza, że wyraz  $n = 0$  mnoży się przez  $1/2$ . W całce  $x$  jest zmienną pozorną. Grubości  $a, b, c$  materiałów 1, 2, 3 po lewej stronie i grubości  $a', b', c'$  materiałów  $1', 2', 3'$  po prawej stronie są widoczne na rycinie 3. Materiał  $m$  (roztwór soli w tym modelu) ma grubość  $l$ , która jest zmienną odległością oddziaływania. Na rysunku  $L$  i  $R$  są półnieskończonymi materiałami po lewej i prawej stronie. Dyspersja  $D^-$  zawiera właściwości materiałowe i geometryczne, specyficzne dla danego układu.

Ze względu na poglądowy charakter artykułu czytelników zainteresowanych szczegółowym rozwinięciem równania 10 odsyłam do oryginalnych publikacji (74—78, 105, 106). Tutaj przedstawię tylko zależność energii elektrodynamicznej od właściwości materiałowych układu w bardzo uproszczonej postaci. Dyspersja  $D(x)$  jest określona wzorem:



$$\bar{D}(x) = 1 - \bar{A}_{mL} \cdot \bar{A}_{mR} \cdot e^{-x} \quad (11)$$

Funkcje materiałowe są przedstawione jako:

$$\bar{A}_{jk} = \frac{\varepsilon_j - \varepsilon_k}{\varepsilon_j + \varepsilon_k} \quad ; n = 0, 1, 2 \quad (12)$$

$$\varepsilon_j = \varepsilon_j(\xi_n); \xi_n = \frac{2\pi kTn}{\hbar} \quad (13)$$

gdzie stała Plancka —  $2\pi \cdot \xi_n$  są częstotliwościami i dla każdej z nich oblicza się całkę równania 10. Zależność oddziaływania od częstotliwości jest wyrażona przenikalnościami dielektrycznymi  $\varepsilon_j$  każdego rodzaju materiału  $j$ .

Analiza elektrodynamicznej energii przyciągania dostarczyła dwóch rodzajów wyników: *a.* W bardzo dużych odległościach, rzędu kilku setek angstromów, komórki ulegają niespecyficznemu, wzajemnemu przyciągnięciu dzięki błonie lipidowej. *b.* Mukoproteidowa warstwa, peryferyjna względem lipidu, może wywierać specyficzne przyciągnięcie na krótszych odległościach, rzędu 50Å, gdzie oddziaływanie między warstwami mukoproteidowymi ma dominujący udział w energii elektrodynamicznej.

#### IV-2c. Wielkość oddziaływań

Krzywe zsumowanych energii elektrostatycznych i elektrodynamicznych, obliczona przez Parsegiana i Gingella, pokazują dwa lokalne minima energii: *a.* Względnie słabe drugie minimum energii, o głębokości  $\sim 5 \cdot 10^{-4}$  erg/cm<sup>2</sup>, występuje w odległościach 50 do 80Å. *b.* Silne pierwsze minimum energii, rzędu 0,1 erg/cm<sup>2</sup>, może wystąpić w granicznym, ścisłym kontakcie komórek (< 5Å). Głębokości obydwu minimów są wystarczająco duże, aby utrzymać komórki razem — a więc na podstawie obecnych informacji model ten nadal nie rozwiązuje problemu, które z minimów jest ważniejsze w jakimś szczególnym przypadku adhezji komórek.

#### IV-2d. Ocena

Fizyczny model sił dalekiego zasięgu Parsegiana i Gingella jest dalszym krokiem naprzód do zrozumienia adhezji komórek, choć jest jeszcze daleki od tego, aby wystarczająco wyjaśnić wiele zagadnień biochemicznych, immunologicznych i fizycznych związanych z tym zjawiskiem. Choćby wykorzystanie tej analizy, które obecnie polega na spekulatywnych założeniach co do grubości i właściwości dielektrycznych błon komórkowych, zwłaszcza ich naładowanej warstwy zewnętrznej (warstwa *c* i *c'* na rycinie 3).

## V. Specyficzność adhezji komórek

Można pokazać, że siły dalekiego zasięgu mogą być odpowiedzialne za takie oddziaływania między komórkami, które uważa się za specyficzne (podrozdział V-1). Z drugiej strony szereg doświadczeń wskazuje na rolę specyficznych ugrupowań chemicznych w adhezji komórek, sugerując udział wiązań chemicznych w oddziaływaniach międzykomórkowych specyficznych. Zagadnienie to wymaga jednak obszernego opracowania w odrębnym artykule.

### V-1. Specyficzność adhezji a fizyczna analiza sił oddziaływań międzykomórkowych

Good przeprowadził teoretyczne rozważania, aby wyjaśnić zjawisko samorzutnego rozdzielania się komórek z mieszanych agregatów (36).

Zastosował on obliczenia energii adhezji, przypadającej na parę komórek, w oparciu o klasyczną teorię koloidów liofobowych dla powierzchni płaskich (równania 2 i 4). Aby przewidzieć warunki, w których komórki typu a oraz typu b dążyłyby do kontaktu raczej z komórkami tego samego typu (asocjacje a-a i b-b), aniżeli z komórkami innymi (asocjacje a-b), Good użył dobrze znaną teorię rozpuszczalności nieelektrolitów i zastosował zasadę, którą można wyrazić nierównością:

$$|V_{\min, II}(ab)| < \left| \frac{1}{2} \{V_{\min, II}(aa) + V_{\min, II}(bb)\} \right| \quad (14)$$

gdzie  $V_{\min, II}(ab)$  — energia potencjalna oddziaływań między komórkami typu a i typu b w drugim minimum,  $V_{\min, II}(aa)$  — między jednakowymi komórkami typu a,  $V_{\min, II}(bb)$  — między jednakowymi komórkami typu b.

Z obliczeń Gooda, niestety opartych częściowo na spekulatywnych założeniach, wynika, że różnice w elektrostatycznym potencjale powierzchniowym  $\Psi_0$  lub w stałej przyciągania Hamakera  $A$  między dwoma typami komórek dają podstawę dla zrozumienia obserwowanego zjawiska segregacji komórek z mieszanych agregatów.

W oparciu o siłowy model oddziaływań Parsegiana i Gingella (105, 106), analiza termodynamicznego warunku segregacji jednakowych komórek z mieszaniny doprowadziła autorów tego modelu do odmiennego wniosku w porównaniu z rozważaniami Gooda — z sił dalekiego zasięgu tylko elektrodynamiczne mogą wykazywać specyficzność. Warunek specyficzności oddziaływań międzykomórkowych można wyrazić nierównością:

$$G_{aa} + G_{bb} < 2G_{ab} \quad (15)$$

gdzie  $G_{aa}$  — energia oddziaływań między jednakowymi komórkami typu

a,  $G_{bb}$  — energia oddziaływań między jednakowymi komórkami typu b,  $G_{ab}$  — energia oddziaływań między komórkami typu a i typu b. Ale energia  $G$  jest sumą energii elektrodynamicznego przyciągania  $G^{ed}$  i energii elektrostatycznego odpychania  $G^{es}$ , tak, że  $G$  może być rozbite na dwa wyrazy:  $G = G^{ed} + G^{es}$ . Energia elektrodynamicznego przyciągania między dwoma ciałami i oraz  $j$  przez substancję  $w$  jest proporcjonalna do sumy wyrażań, które są funkcjami polaryzowalności materiałów w ściśle określonych częstotliwościach (równania 10—13):

$$G_{ij}^{ed} \sim - \sum \left( \frac{\varepsilon_w - \varepsilon_i}{\varepsilon_w + \varepsilon_i} \right) \left( \frac{\varepsilon_w - \varepsilon_j}{\varepsilon_w + \varepsilon_j} \right)$$

Jeżeli zdefiniuje się

$$\frac{\varepsilon_w - \varepsilon_a}{\varepsilon_w + \varepsilon_a} \equiv A; \quad \frac{\varepsilon_w - \varepsilon_b}{\varepsilon_w + \varepsilon_b} \equiv B$$

to można napisać

$$G_{aa}^{ed} \sim -\sum' AA; \quad G_{bb}^{ed} \sim -\sum' BB; \quad G_{ab}^{ed} \sim -\sum' AB$$

Gdy  $A$  nie jest równe  $B$ , dla każdego wyrazu w sumie wynika nierówność:  $-AA - BB < -2AB$ . W konsekwencji ogólna elektrodynamiczna energia dla mieszaniny dwóch typów komórek prowadzi do rozdzielania ich na agregaty jednakowych komórek na mocy nierówności:

$$G_{aa}^{ed} + G_{bb}^{ed} < 2G_{ab}^{ed} \quad (16)$$

Odpychające oddziaływanie elektrostatyczne przez roztwór jonowy między dwiema płaskimi powierzchniami o gęstości ładunku  $\sigma_1$  i  $\sigma_2$  można wyrazić wzorem:

$$G_{ij}^{es} = \sigma_1 \sigma_2 f(l) \quad 17$$

gdzie  $f(l)$  jest wykładniczą funkcją odległości między płaszczyznami (108). Jeżeli ładunki powierzchniowe mają podobny znak (błony komórkowe posiadają zwykle przewagę ładunku ujemnego), to energie odpychania  $G_{ab}^{es}$  między niejednakowymi ciałami podlegają zależności  $G_{ab}^{es} = \sqrt{G_{aa}^{es} \cdot G_{bb}^{es}}$  tak, że

$$G_{aa}^{es} + G_{bb}^{es} > 2G_{ab}^{es} \quad (18)$$

Wśród dodatnich wartości  $G^{es}$  składowa odpychająca ogólnej energii będzie sprzyjała oddziaływaniom między niejednakowymi ciałami. Energia elektrostatyczna może być więc przyczyną tendencji do mieszania populacji komórek.

Jeżeli dwie komórki zlepiają się samorzutnie, to znaczy, że sumaryczna energia oddziaływań jest ujemna. Ujemna energia elektrodynamiczna musi być większa niż dodatnia energia odpychania elektrostatycznego. Ta energia przyciągania jest także źródłem specyficzności adhezji. Wg obliczeń Parsegiana i Gingella (105, 106) różnice tylko kilku procent w przyciąganiu elektrodynamicznym są wystarczająco duże, aby zapewnić stabilną

specyficzną adhezję tj. spełnić warunek specyficzności wyrażony nierównością:

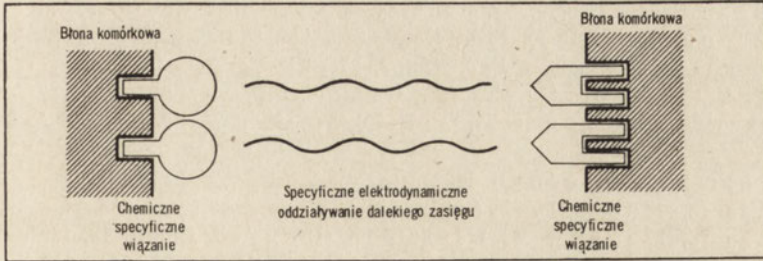
$$|G_{aa} + G_{bb} - 2G_{ab}| > kT \quad (19)$$

Choć z ich obliczeń wynika, że następujące trzy zmienne właściwości powierzchniowej warstwy „puszystej” błon komórkowych: grubość, gęstość, spektrum absorpcji białek i cukrów, mogą dać wymagane różnice w przyciąganiu elektrodynamicznym, to lista kandydujących zmiennych strukturalnych jest zbyt długa, aby na podstawie modelu Parsegiana i Gingella (105, 106) (podrozdział IV-2) można było dokładnie „wyjaśnić”, dlaczego komórki asocjują z komórkami podobnego typu.

Siły dalekiego zasięgu niewątpliwie odgrywają ważną rolę w oddziaływaniach międzykomórkowych i można obliczyć, że są one dostatecznie duże, aby regulować te oddziaływania. Przyciąganie dalekiego zasięgu można rozważać obecnie wyłącznie na podstawie prawdopodobnej struktury błon komórkowych. Jest ono potencjalnym źródłem specyficznej adhezji, ale nie jedynym. Ze względu na zjawisko specyficznego rozpoznawania się komórek, obok fizycznego podejścia do problemu adhezji komórkowej istnieje alternatywny punkt widzenia, który opowiada się za kontaktem powierzchni komórek w wyniku powstawania wiązań chemicznych (np. 2). Rzeczywiście nie ma powodu odrzucać a priori modeli oddziaływań międzykomórkowych, które zakładają, że adhezja komórek odbywa się dzięki wiązaniom kowalencyjnym, lub dzięki zgodności strukturalnej podobnej jak w oddziaływaniach antygen-przeciwciało w procesach immunochemicznych. Na podstawie proponowanych aktualnie biofizycznych modeli sił oddziaływań między błonami komórkowymi nie można znaleźć ścisłej zależności między mechanizmami strukturalnej zgodności, przyjmowanymi przez biochemików i immunologów, a fizycznymi siłami, którym muszą podlegać te mechanizmy.

Wiele trudnością związanych ze ścisłym trzymaniem jednego z tych dwu skrajnych punktów widzenia znika, jeżeli dopuści się możliwość, że obydwie są w pewnym zakresie poprawne (29). Takie połączenie fizycznego i biologicznego podejścia może dać pełniejsze zrozumienie oddziaływania komórkowego (10, 106). Wiązanie materiału, stanowiącego warstwę „puszystą”, do powierzchni komórek może być wynikiem enzymatycznie utworzonego wiązania kowalencyjnego, immunologicznej zgodności strukturalnej dzięki elektrostatycznym siłom bliskiego zasięgu, działania elektrodynamicznych sił dalekiego zasięgu itd. Na rycinie 4 przedstawiony jest schemat, zgodnie z którym wiązanie substancji stanowiących warstwę „puszystą” błon komórkowych wymaga bardzo specyficznego „dopasowania” strukturalnego, opartego na zasadzie klucz-zamek, a mniej specyficzne elektrodynamiczne siły dalekiego zasięgu działają przybliżając komórki do siebie. Modyfikację adhezji międzykomórkowej przez wiązanie jednowartościowego przeciwciała (145) można rozpatrywać według tego

schematu oddziaływań. W podrozdziale V-2 przedstawiono niektóre badania nad izolowaniem substancji z powierzchni komórek, zwiększających zdolność do adhezji, kiedy doda się je napowrót do zawiesiny komórek. Prace te wydają się pokazywać, jakie składniki powierzchni komórek mogą być odpowiedzialne za specyficzność tkankową.



**Ryc. 4.** Model specyficzności adhezji komórkowych (105). Wiązanie glikoproteidu powierzchniowego jest chemicznie specyficzne dla każdego typu membran. Następne oddziaływania między „puszystymi” warstwami glikoproteidowymi (Ryc. 3) wykazuje elektrodynamyczną specyficzność niższego rzędu. (Szczegóły w tekście).

Takie wyodrębnienie sił przyciągających i odpychających dalekiego zasięgu od sił bliskiego zasięgu, działających po zbliżeniu się komórek na niewielką odległość, może być pożyteczne — przy obecnym stanie wiedzy — w rozróżnieniu między fizycznymi a biochemicznymi lub immunologicznymi poglądami na oddziaływanie komórkowe. Po zadziałaniu sił dalekiego zasięgu przybliżających komórki, chemiczne reakcje, prawdopodobnie wskutek elektrostatycznie kierowanych odpowiedzi fizjologicznych komórek na takie zbliżenie (99, 104), mogą dalej kontrolować zachowanie się komórek, znajdujących się w niewielkiej odległości od siebie. Dla przykładu — podwójna warstwa elektryczna może determinować szybkość, z którą wchodzi komórki w kontakt np. we wspomnianym doświadczeniu, gdy rosnące stężenie soli zwiększało szybkość agregowania komórek śluzowca (63), a wiązanie chemiczne z kolei może odgrywać rolę w wybiórczym tworzeniu stabilnych agregatów. Takie rozróżnienie sił dalekiego zasięgu (tj. działających w odległościach większych niż odległości międzyatomowe) od sił bliskiego zasięgu daje możliwość precyzyjnego określenia i badania specyficznych oddziaływań bliskiego zasięgu w adhezji komórek po odjęciu tych pierwszych.

Artykuł otrzymano 20.10.1973, po rewizji autorskiej przyjęto 14.6.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Singer S. J., Nicolson G. L., (1972), *Science*, **175**, 720—731.
2. Moscona A. A., (1968), *Dev. Biol.* **18**, 250—292.
3. Parson D. F., Subjeck J. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 85—113.

4. Ambrose E. J., (1961), *Exp. Cell Res.* (Suppl.), **8**, 54—59.
5. Abercrombie M., Ambrose E., (1962), *J. Cancer Res.* **22**, 525—532.
6. Robertson J. D., (1960), *Progr. Biophys. biophys. Chem.* **10**, 344—396.
7. Brightman M. W., Palay S. I., (1963), *J. Cell. Biol.*, **19**, 415—439.
8. Steinberg M. S., (1970), *J. Exper. Zool.* **173**, 395—402.
9. Trinkaus J. P., Lentz J. P., (1964), *Dev. Biol.* **9**, 115—121.
10. Moscona A. A., (1961), *Exp. Cell Res.* **22**, 455—475.
11. Moscona A. A., (1962), *Intern. Rev. Exp. Pathol.* **1**, 371—376.
12. Moscona A. A., (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **49**, 742—754.
13. Humphreys T., (1963), *Dev. Biol.* **8**, 27—32.
14. Burger M. M., (1961), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **62**, 994—1001.
15. Polack R. E., Burger M. M., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **62**, 1074—1076.
16. Burger M. M., Noonan K. D., (1970), *Nature* **228**, 512—515.
17. Weiss L., Kapes D. L., (1966), *Exp. Cell Res.* **41**, 601—608.
18. Weiss L., Mayhew E., Ulrich K., (1966), *Lab. Invest.* **15**, 1304—1309.
19. Weiss L., Coombs R. R. A., (1963), *Exp. Cell Res.* **30**, 331—338.
20. Rosenberg M. D., (1960), *Biophys. J.* **1**, 137—159.
21. Poste G., Greenham L. W., (1970), *Cytobios* **2**, 243—249.
22. Poste G., Greenham L. W., (1971), *Cytobios* **3**, 5—12.
23. Weiss L., (1967), *The Cell Periphery, Metastasis and Other Contact Phenomena*, Elsevier, Amsterdam.
24. Curtis A.S.G., (1970), *J. Embryol. Exp. Morph.* **23**, 253—261.
25. Curtis A. S. G., (1970), *Nature* **226**, 260—261.
26. Winzler R. J., (1970), *Int. Rev. Cytol.* **29**, 77—108.
27. Curtis A. S. G., (1967), *The Cell Surface: Its Molecular Role in Morphogenesis*, Academic Press, London.
28. Hay E. D., (1968), w *Epithelial Mesenchymal Interaction*, red. Fleischmager R., Billingham R. E., Williams-Williams Co., Baltimore.
29. Gingell D., (1971), *J. Theor. Biol.* **30**, 121—149.
30. Verwey E. J. W., Overbeek J. Th. G., (1948), *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, Amsterdam.
31. Bangham A. D., Pethica B. A., (1960), *Proc. R. Soc. Edinburgh* **28**, 43—49.
32. Curtis A. S. G., (1960), *Am. Naturalist* **94**, 37—62.
33. Curtis A. S. G., (1962), *Biol. Rev.* **37**, 82—114.
34. Derjaguin B. V., Landau L. D., (1941), *Acta Physicochemica URSS* **14**, 633—679.
35. London F., (1930), *Z. Phys.* **63**, 245—249.
36. Good R. J., (1972), *J. Theor. Biol.* **37**, 413—434.
37. Good R. J., (1966), w *Treatise on Adhesion*, red. Patrick R. L., Marcel Dekker Co., New York.
38. Van Den Tempel M., (1958), *J. Coll. Sci.* **13**, 125—137.
39. Farquhar M. G., Palade G., (1963), *J. Cell Biol.* **17**, 375—412.
40. Ambrose E. J., (1956), *Nature* **178**, 1194—1195.
41. Brooks D. E., Miller J. S., Seaman G. V. F., Vassar P. S., (1967), *J. Cell. Physiol.* **69**, 155—160.
42. Weiss L., (1968), *Exp. Cell Res.*, **53**, 603—614.
43. Robertson J. D., (1958), *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 349—356.
44. Ruhlenstroth-Bauer G., (1965), w *Cell Electrophoresis*, red. Ambrose E. J., Little, Brown and Co., Boston.
45. Ghosh S., Bull H. B., (1963), *J. Coll. Interface Sci.* **18**, 157—160.
46. Gillman C. J., Van Oss C. J., (1971), *Biophys. J.* **11**, 96a—98a.

47. Van Oss C. J., Good R. J., Neumann A. W., (1972), *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **37**, 387—390.
48. Baker R. F., (1967), *Fed. Proc.* **26**, 1785—1801.
49. Carr K. E., (1971), *Intern. Rev. Cytol.* **30**, 204—237.
50. Revel J. P., Karnovsky M. J., (1967), *J. Cell Biol.* **33**, C7—C12.
51. Khan T. A., Overton J., (1970), *J. Cell Biol.* **44**, 433—438.
52. Polack W., Hager H., Reckel R. P., Toren D. A., Singher H. O., (1965), *Transfusion* **5**, 158—183.
53. Wnuk W., (1972), IV Intern. Biophys. Congress, Moskwa, Abstracts, **3**, 69.
54. Prokop O., Uhlenbruck G., Kohler W., (1968), *Vox Sang.* **14**, 321—333.
55. Gordon J. A., Sharon N., Lis H., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **264**, 387—391.
56. Rambourg A., Leblond C. P., (1967), *J. Cell Biol.* **32**, 27—32.
57. Haydon D. A., (1964), w *Recent Progress in Surface Science*, red. Danielli J. F., Pankhurst K. G. A., Riddiford A. C., t. 1, str. 94, Academic Press, New York.
58. Overbeek J. Th. G., (1971), cyt. za (36).
59. James A. M., Carter M. N. A., (1969), *J. Coll. Interface Sci.* **29**, 696—711.
60. Haydon D. A., (1961), *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 450—457.
61. Heard D., Seaman G. V. F., (1960), *J. Gen. Physiol.* **43**, 635—651.
62. Curtis A. S. G., (1964), *J. Cell Biol.* **20**, 199—215.
63. Born G. V. R., Garrod D. R., (1968), *Nature*, **220**, 616—618.
64. Wnuk W., (1972), X Zjazd P. T. Biochem., Poznań, Streszczenia, str. 17.
65. Brooks D. E., Seaman G. V. F., (1972), *Nature, New Biology*, **238**, 251—253.
66. Lyklema J., Overbeek J. Th. G., (1961), *J. Coll. Sci.* **16**, 501—512.
67. Barlow C. A., Ross Macdonald J., (1967), *Adv. Electrochem.* **6**, 1—53.
68. Schwan H. P., (1965), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **125**, 344—348.
69. Grant E. H., (1965), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **125**, 418—421.
70. Pennock B. E., Schwan H. P., (1969), *J. Phys. Chem.* **73**, 2600—2609.
71. Grant E. H., Keefe S. E., Takashima S., (1968), *J. Phys. Chem.* **72**, 4373—4389.
72. Grahame D. C., (1947), *Chem. Rev.* **41**, 441—455.
73. Lifshitz E. M., (1955), *Zh. Eks. Teor. Fiz.* **29**, 94—112.
74. Parsegian V. A., Ninham B. W., (1970), *Biophys. J.* **10**, 664—674.
75. Parsegian V. A., Ninham B. W., (1971), *J. Coll. Interface Sci.* **37**, 332—341.
76. Ninham B. W., Parsegian V. A., (1970), *Biophys. J.* **10**, 646—663.
77. Ninham B. W., Parsegian V. A., (1970), *J. Chem. Phys.* **52**, 4578—4587.
78. Parsegian V. A., Ninham B. W., (1973), *J. Theor. Biol.* **38**, 101—109.
79. Gingell D., Parsegian V. A., (1972), *J. Theor. Biol.* **36**, 41—52.
80. Parsegian V. A., (1970), w *NAS-NRC 1968 Digest of Literature on Dielectrics*, red. Barker Jr. R. E., t. 32, str. 285, National Academy of Science, Washington.
81. Gustafson T., Wolpert L., (1962), *Intern. Rev. Cytol.* **15**, 139—151.
82. Gey G. O., Shapras P., Borysko E., (1954), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **58**, 1089—1092.
83. Weiss P., (1958), *Intern. Rev. Cytol.* **7**, 391—408.
84. Taylor A. C., Robbins E., (1963), *Dev. Biol.* **7**, 660—672.
85. Lesseurs R. J., (1963), *J. Ex. Zool.* **153**, 171—179.
86. Albers W., Overbeek J. Th. G., (1960), *J. Coll. Sci.* **15**, 489—500.
87. Schenkel J. H., Kitchener J., (1960), *Trans. Faraday Soc.* **56**, 161—166.
88. Watillon A., Joseph-Petit A. M., (1966), *Disc. Faraday Soc.* **42**, 143—154.
89. Ottewill R. H., Shaw J. N., (1966), *Disc. Faraday Soc.* **42**, 154—158.

90. Ottewill R. H., Wilkins D. J., (1962), *Trans. Faraday Soc.* **58**, 608—613.
91. Srivastava S. N., Haydon D. A., (1964), *Trans. Faraday Soc.* **60**, 971—978.
92. Haydon D. A., Taylor J., (1968), *Nature* **217**, 739—740.
93. Wilkins D. J., Ottewill R. H., Bangham A. D., (1962), *J. Theor. Biol.* **2**, 165—170.
94. Wilkins D. J., Ottewill R. H., Bangham A. D., (1962), *J. Theor. Biol.* **2**, 176—181.
95. Dzyaloshinskii I. E., Lifshitz E. M., Pitaevskii L. P., (1959), *Adv. Phys.* **10**, 165—179.
96. Devereux O. F., De Bruyn P. L., (1963), *Interaction of Plane-Parallel Double Layer*, M. I. T. Press, Cambridge (U.S.A.).
97. Cook G. M. W., (1968), *Biol. Rev.* **43**, 363—370.
98. Winzler R. J., (1970), w *Glicoproteins—Their Structure and Function*, red. Gottschalk A., Elsevier, Amsterdam.
99. Gingell D., (1967), *J. Theor. Biol.* **17**, 451—462.
100. Seaman G. V. F., Cook G. M. W., (1965), w *Cell Electrophoresis*, red. Ambrose E. J., str. 48, J. and A. Churchill Co., London.
101. Gittens G. J., James A. M. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **66**, 237—248.
102. Overbeek J. Th. G., (1952), w *Colloid Science*, red. Kruyt H. R., t. 1, Elsevier, Amsterdam.
103. Haydon A. D., Taylor F. H., (1969), *Proc. R. Soc.* **A252**, 225—226.
104. Gingell D., (1970), w *Membrane Metabolism and Ion Transport*, red. Bittar E. E., t. 3, str. 317, J. Wiley Co., New York.
105. Parsegian V. A., Gingell D., (1972), *J. Adhesion*, **4**, 283—305.
106. Parsegian V. A., Gingell D. (1973) w *Recent Advances in Adhesion*, red. Lee L. H., Gordon and Breach Science Publishers, New York, London, str. 153—192.
107. Ninham B. W., Parsegian V. A., (1971), *J. Theor. Biol.* **31**, 405—428.
108. Parsegian V. A., Gingell D., (1972), *Biophys. J.* **12**, 1192—1204.
109. Overbeek J. Th. G., (1966), *Disc. Faraday Soc.* **42**, 7—15.
110. Beug H., Gerisch G., Kempff S., Riedel V., Cremer G., (1970), *Exp. Cell. Res.* **63**, 147—158.



BEATA BRYSCH\*

## Sekwencje poli(A) w kwasach rybonukleinowych

### Poly(A) Sequences in Ribonucleic Acids

Pierwsze doniesienia o obecności w komórkach eukariotów kwasu poliadenylowego (poli(A)) ukazały się już przed 10 laty. Wtedy jednak sekwencji poli(A) nie wiązano z kwasami rybonukleinowymi, ani nie badano czy sekwencje te są integralną częścią składową łańcucha RNA. Edmonds i wsp. w czasie badań nad polimerazą poli(A) w jądrach grasicy cielęcej, wykryli i wyizolowali cząsteczki poli(A), występujące w oczyszczonych preparatach RNA (1, 2). Następnie Hadjivassiliou i Brauerman wyizolowali segment poli(A) z mikrosomów wątroby szczura, który to segment — uważali — nie stanowi części składowej RNA (3), lecz przyłączony do błon mikrosomalnych, jest przyczyną uzyskiwania podwyższonej zawartości AMP w szybkoznakującym się cytoplazmatycznym RNA (4). W późniejszych latach wyizolowano i scharakteryzowano poli(A) występujący w komórkach wysiękowego raka Ehrlicha (5) oraz w jądrach i cytoplazmie komórek wątroby myszy (6, 7), nadal jednak nie było wiadomo czy sekwencje poli(A) są częścią składową RNA. Dopiero wykrycie sekwencji poli(A) w elektroforetycznie czystym 10S mRNA hemoglobiny królika (8) i stwierdzenie, że sekwencje poli(A) występujące w mRNA wirusa (9, 10), mRNA (11) i HnRNA (12) komórek HeLa nie oddzielają się od cząsteczki RNA w warunkach niszczących słabsze, niekowalencyjne wiązania — wskazały, że segment poli(A) jest integralną częścią łańcucha RNA. Obecnie wiadomo, że do RNA zawierających sekwencje poli(A) należy HnRNA, większość mRNA, mitochondrialny RNA oraz RNA niektórych wirusów. Odkrycia te zrodziły ciekawe koncepcje co do znaczenia i roli sekwencji poli(A) w komórce.

W niniejszym przeglądzie będą omówione właściwości segmentu poli(A) oraz RNA zawierających te segmenty ze szczególnym uwzględnieniem informacyjnego RNA, a także poglądy dotyczące roli poli(A) w RNA.

\* Mgr, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice.

Wykaz stosowanych skrótów: poli(A) — kwas poliadenylowy; poli(U) — kwas poliurydylowy; oligo (dT) — kwas oligodezoksytymidylowy; HnRNA — heterogenny, jądrowy kwas rybonukleinowy; poli(A)(+) RNA — kwas rybonukleinowy zawierający sekwencje kwasu poliadenylowego; poli(A)(-) RNA — kwas rybonukleinowy nie zawierający sekwencji kwasu poliadenylowego.

Tabela 1.

Zawartość procentowa poli(A) w preparatach RNA (ogólnego, cytoplazmatycznego lub polirybosomalnego) pochodzących z różnych komórek i tkanek

Pochodzenie RNA	Frakcja RNA	Znakowanie	Aktywność D	% poli(A) w danej frakcji RNA <sup>(1)</sup>	% poli(A) w danym poli(A) (+) RNA <sup>(2)</sup>	% poli(A) (+) RNA w danej frakcji RNA <sup>(3)</sup>	Metoda izolowania poli(A) lub poli(A) (+) RNA	Pismienictwo
Komórki puchlinowego raka Ehrlicha <i>in vitro</i>	RNA ogólny pH 5	<sup>32</sup> P kw. ortofosf. 2 godz.	—	około 0,5		około 4,0	celuloza poli(dT)	(5)
Komórki puchlinowego raka Ehrlicha <i>in vitro</i>	RNA ogólny pH 9	<sup>32</sup> P kw. ortofosf. 2 godz.	—	około 1,1		około 1,4	celuloza poli(dT)	(5)
Komórki puchlinowego raka Ehrlicha <i>in vivo</i>	RNA ogólny pH 9	<sup>32</sup> P kw. ortofosf. 2 godz.	—	3,5	34,0	9,7	celuloza poli(dT)	(5)
Jajowody kurcząt	RNA ogólny	nie znakowany	—			(2,0)*	celuloza	(15)
Jajowody kurze	RNA ogólny	nie znakowany	—			2,5	filtry miliporowe	(20)
Mózg szczura <i>in vivo</i>	RNA ogólny	<sup>3</sup> H-urydyna 1 godz.	—			40,0 (7,2)*	celuloza oligo(dT)	(19)
Komórki mózgu szczura <i>in vitro</i>	RNA ogólny	<sup>3</sup> H-urydyna 1 godz.	—			38,0 (5,4)*	celuloza oligo(dT)	(19)
Komórki HeLa po infekcji wirusem Vaccinia	RNA cytoplazmatyczny gospodarza	<sup>3</sup> H-AMP <sup>3</sup> H-UMP	—	20,0		56,0 53,0	celuloza poli(U)	(9)
Plazmocytoza 5563 myszy	RNA cytoplazmatyczny pH 9	<sup>3</sup> H-adenozyna 1,5 godz.	0,25 µg/ml	13,5	32,0	>43,0	filtry miliporowe	(31)
Komórki puchlinowego raka Ehrlicha <i>in vitro</i>	RNA cytoplazm. pH 5	<sup>32</sup> P kwas ortofosfor.	—			1,6	celuloza poli(dT)	(5)
	RNA cytoplazm. pH 9	<sup>32</sup> P kwas ortofosfor.	—			3,0		(5)
Limfocyty ludzkie	RNA polirybosomalny pH 9	<sup>3</sup> H-adenozyna 1 godz. <sup>3</sup> H-urydyna 1 godz.	0,05 µg/ml 0,05 godz.		42—50 0—2	75—80	filtry miliporowe	(84)
Komórki linii HeLa	RNA polirybosomalny	<sup>3</sup> H-adenozyna 2,5 godz.	—, —	11,0			filtry miliporowe	(29)
Komórki puchlinowego mięsaka 180	RNA polirybosomalny pH 9	<sup>3</sup> H-adenozyna 1 godz. <sup>3</sup> H-urydyna 1 godz.	0,04 g/ml 0,5 godz.	42,0		56,0	filtry miliporowe	(23)
			—, —	4,0		50,0	filtry miliporowe	(23)

Komórki linii HeLa	RNA polirybosomalny (mRNA)	<sup>32</sup> P kw. ortofosfor. 1 godz. <sup>3</sup> H-adenozyna 1 godz. <sup>3</sup> H-urydyna 1 godz.	0,05 µg/ml 3—4 godz. —, — —, —	15,0—20,0  <1,0			na podstawie radioaktywności nierozpuszczalnej w TCA produktów trawienia RNA RNazą T <sub>1</sub> i RNazą trzustkową	(11)
Komórki linii HeLa po infekcji wirusem Vaccinia	RNA polirybosomalny gospodarza	<sup>3</sup> H-AMP <sup>3</sup> H-UPM	— —	11,0 —			celuloza poli(U)	(9) (30)
Komórki linii L	RNA polirybos. (mRNA)	<sup>3</sup> H-adenozyna <sup>3</sup> H-urydyna	0,08 µg/ml 0,5 godz. —, —			około 75,0 62,0	hydroksypatyt	(28)
Retikulocyty królika	RNA polirybos. (mRNA)	nie znakowany				(1,0—1,1)*	celuloza	(15)
Retikulocyty królika	RNA polirybosomalny	nie znakowany				(10,0)*	celuloza oligo(dT)	(61)
Retikulocyty królika	RNA polirybos. pH 9	nie znakowany				(0,5)*	filtry miliporowe	(24)
Retikulocyty królika	10S mRNA dla globiny	<sup>32</sup> P-ortofosforan 18 godz.	—	10,0			kolumna polistyrenowa	(8)
Komórki linii L	RNA polirybos. (mRNA)	<sup>3</sup> H-urydyna 1 godz.	0,05 µg/ml 0,5 godz.	74,0			filtry z włókna szklanego impregnowane poli(U)	(51)
Komórki linii L	RNA polirybos. (mRNA)	<sup>32</sup> P ortofosforan 27 godz.	—			około 2,0	hydroksypatyt-celuloza	(27)
Komórki linii L	RNA polirybos. (mRNA)	<sup>3</sup> H-adenozyna 1 godz.	—			około 15,0	hydroksypatyt-celuloza	(27)
Komórki puchlinowego mięsaka 180	RNA polirybosomalny pH 9	<sup>3</sup> H-adenozyna 0,5 godz.	0,04 µg/ml 0,5 godz.	20,0	28,0	69,0	filtry miliporowe	(25)
Myeloma myszy	RNA polirybosomalny	nie znakowany	—			(2,0)*	celuloza-oligo(dT)	(32)
Myeloma myszy	RNA polirybosomalny	<sup>32</sup> P 8 godz.	—		15—21	5—6 (2,5)*	celuloza poli(dT)	(33)

\* dane przedstawiają % µg danej frakcji RNA związanej z filtrami lub kolumną zależnie od metody podanej w odpowiedniej rubryce.

RNA zawierający sekwencje kwasu poliadenylowego będą w dalszej części artykułu nazywać poli(A)(+)RNA, RNA nie zawierający tych sekwencji — poli(A)(-)RNA.

### I. Występowanie sekwencji poli(A) w kwasach rybonukleinowych

Sekwencje poli(A) wykryto w RNA komórek zwierzęcych (Tabela 1 i 2), roślinnych, w RNA drożdżowym, w genomach wirusów typu RNA jak i w RNA kodowanych przez wirusy typu DNA (Tabela 3).

U zwierząt poli(A) wyizolowano z mRNA hemoglobiny królika (8, 13, 14, 15, 16) i kaczki (17), z polirybosomalnego cytoplazmatycznego i ogólnego RNA komórek prawidłowych rosnących zarówno *in vivo* jak i hodowanych w kulturach; z RNA wątroby szczura (18) mózgu szczura (19), jajowodów kur (20) i kurcząt (15).

Sekwencje poli(A) występują w RNA limocytów stymulowanych fitohemaglutyniną (21, 22), jak i w polisomalnym i ogólnym RNA komórek nowotworowych: mięsaka 180 myszy (23, 24, 25, 26) linii L myszy (18, 27, 28), komórek linii HeLa (11, 12, 29, 30), raka Ehrlicha (5), szpiczaka myszy (31, 32, 33).

Sekwencje poli(A) stwierdzono także w HnRNA fibroblastów linii L myszy (28), komórek HeLa (11, 12, 29, 30), raka Ehrlicha (5, 34, 35), mięsaka 180 myszy (23, 25), szpiczaka myszy (31) oraz w mitochondrialnym RNA (36).

Ostatnio sekwencje poli(A) wykryto w RNA roślin wyższych (37, 38), śluzowców (39) i drożdży (40, 41).

Poli(A) zawierają genomy wirusów typu RNA: Rous Sarcoma i wirus Rauschera (42), wirusy Sindbis i Columbia SK (43, 44), wirusy Polio i Eastern Encephalitis (45, 46), jak również RNA kodowane przez wirusy typu DNA: Vaccinia (9, 30), SV-40 (47), adenowirusy (48).

W Tabeli 1 i 2 przedstawiono zawartość procentową poli(A) lub zawartość poli(A)(+)RNA w różnych frakcjach RNA organizmów eukariotycznych, w Tabeli 3 przedstawiono zawartość procentową poli(A) i poli(A)(+)RNA w RNA wirusowo specyficznych.

Stwierdzono, że sekwencji poli(A) nie zawierają tRNA (28, 49) i rRNA (8, 9, 12, 23, 28, 30, 49). Początkowo uważano, że również bakteryjny mRNA zawiera sekwencje poli(A) choć w mniejszej ilości (50), jednak badania przy użyciu bardziej precyzyjnych metod nie potwierdziły tych spostrzeżeń (51).

Spośród mRNA organizmów eukariotycznych znane są mRNA nie zawierające poli(A). Należy do nich mRNA kodujący fibroinę jedwabnika (52) i mRNA kodujący histony (28, 53, 54). Dokładniej badano mRNA wyizolowany z polisomów komórek linii HeLa o stałej sedimentacji 7—9S kodujący histon. W przeciwieństwie do pozostałych mRNA tych samych

Zawartość procentowa poli(A) w jądrowym RNA pochodzącym z różnych komórek

Materiał	Frakcja RNA (nomenklatura wg autorów)	Znakowanie	Aktywność D	% poli(A) w danej frakcji RNA <sup>1</sup>	% poli(A) w danym poli(A)(+) RNA <sup>2</sup>	% poli(A)(+) RNA w danej frakcji RNA <sup>3</sup>	Met. izolowania poli(A) lub poli(A)(+)RNA	Pismien- nictwo
Komórki linii HeLa	HnRNA	<sup>3</sup> H-adenozyna 2,5 godz.	0,05 µg/ml 0,5 godz.	1,2			filtry miliporowe	(29)
Komórki linii HeLa	HnRNA > 35S	<sup>3</sup> H-adenozyna	—, —	4,1			na podstawie % radioakt. nireozpuszczalnej w TCA pozostającej po trawieniu RNA RNazą T <sub>1</sub> i RNazą trzustkową	(11)
		<sup>3</sup> H-urydyna	—, —	1,1				
Komórki puchlinowego raka Ehrlicha <i>in vitro</i>	RNA jądrowy pH 5	<sup>32</sup> P kw. ortofosforowy 2 godz.	—			2,6	celuloza poli (dT)	(5)
	RNA jądrowy izolowany w pH 9	—, —	—			1,2		
Komórki linii L	HnRNA > 28S	<sup>3</sup> H-adenozyna	0,08 µg/ml			17,0	hydroksypapatyt	(28)
		<sup>3</sup> H-urydyna	—, —			18,0		
	HnRNA pH 9	<sup>3</sup> H-adenozyna 1,5 godz.	0,25 µg/ml	2,1	11,0	19,0	filtry miliporowe	(31)
Komórki wysiękowego mięśnaka 180	RNA jądrowy pH 9	<sup>3</sup> H-adenozyna 0,5 godz.	0,04 µg/ml 0,5 godz.	2,5			filtry miliporowe	(25)

Tabela 3.

Zawartość procentowa poli(A) w RNA wirusów lub RNA kodowanych przez wirusy

Frakcje RNA	Znakowanie	% poli(A) w danej frakcji RNA	% poli(A)(+) RNA w danej frakcji RNA <sup>3</sup>	Met. izolowania poli(A) lub RNA poli(A)(+)	Pikmieniowość
RNA polisomalny, specyficzny dla wirusa Adeno 2	<sup>3</sup> H-adenozyna 2—6 godz.	6,1		filtry miłporowe	(48)
	<sup>3</sup> H-urydyna 2—6 godz.	<0,1			
RNA jądrowy, specyficzny dla wirusa Adeno 2	<sup>3</sup> H-adenozyna 2—6 godz.	1,4		—, —	(48)
	<sup>3</sup> H-urydyna 2—6 godz.	<0,1			
Późny RNA kodowany fagiem T <sub>4</sub>	<sup>3</sup> H-UMP	0,5	0,47	celuloza—poli(U)	(9)
	<sup>3</sup> H-AMP		0,74		
RNA kodowany <i>in vitro</i> wirusem Vaccinia	<sup>14</sup> C-AMP	27,0—30,0	55,0	—, —	(9)
	<sup>3</sup> H-UMP	<1,0	35,0		
60-70S RNA wirusa mięsaka Rousa	<sup>3</sup> H-adenozyna	9±1		na podstawie radioaktywności nierozpuszczalnej w TCA po trawieniu RNA RNazą T <sub>1</sub> i trzustkową	(42)
	<sup>3</sup> H-urydyna	0,7±0,2			
RNA wirusa Polio	<sup>32</sup> P	2,5±0,5		DEAE Sephadex	(45)
	<sup>33</sup> P	1,14±0,02			

komórek, mRNA kodujący histony nie zawierał fragmentów poli(A) (53). Podobnie histonowy mRNA izolowany z polirybosomów komórek mysich linii L nie zawiera poli(A) (28). Brak sekwencji poli(A) w mRNA kodującym histony może mieć związek z różnicami metabolicznymi między tą frakcją mRNA a pozostałymi frakcjami mRNA. Informacyjny RNA histonów pojawia się w polirybosomach wcześniej niż inne frakcje mRNA (zawierające poli(A) (55), oraz posiada krótszy od innych mRNA okres półtrwania (56, 57, 58). Krótszy okres półtrwania mRNA histonów od okresu półtrwania poli(A)(+)mRNA może być również spowodowany brakiem sekwencji poli(A), gdyż obecność tych sekwencji zdaje się podwyższać stabilność cząsteczki mRNA (28).

Z powyższego przeglądu wynika, że w komórkach eukariotycznych segment poli(A) jest częścią składową prawie wszystkich mRNA oraz HnRNA, który uważamy za prekursora mRNA.

## II. Metody izolowania RNA zawierającego sekwencje poli(A)

Najczęściej stosowane techniki izolowania i oczyszczania poli(A)(+) RNA oparte są na hybrydyzacji poli(A)(+)RNA z kwasem poliurydylowym lub politymidylowym utrwalonym na nośniku. Należy do nich technika polegająca na powstawaniu na kolumnie kompleksu RNA z celulozą zawierającą trwale przyłączony poli(U) (9, 16, 30, 59) lub kompleksu RNA na filtrach z włókna szklanego z przyłączonym do nich poli(U) (30, 49). Analogiczne kompleksy tworzy RNA poli(A)(+) z celulozą zawierającą kowalencyjnie przyłączony kwas oligodezoksytymidylowy (5, 19, 60, 61). Nieco odmienną jest metoda polegająca na hybrydyzowaniu w roztworze poli(A)(+)RNA z poli(U) a następnie oddzielaniu na kolumnie z hydroksyapatytu tak utworzonego hybrydu od poli(A)(-)RNA (28). Stosowana jest też adsorpcja poli(A)(+)RNA na filtrach miliporowych (20, 23, 24, 42), lub na samej celulozie (15, 62), oraz chromatografia kolumnowa na odpowiednio przygotowanym polistyrenie (6, 7, 8).

## III. Lokalizacja i niektóre właściwości segmentu poli(A) w RNA

Analiza zmierzająca do zlokalizowania segmentu poli(A) w poli(A)(+) RNA polega na strawieniu RNA rybonukleazami: trzustkową i  $T_1$ , a następnie przeprowadzeniu alkalicznej hydrolizy segmentu poli(A) opornego na działanie tych rybonukleaz i na analizie produktów hydrolizy. Gdyby poli(A) znajdował się u końca 3' cząsteczki RNA, produkt hydrolizy powinien zawierać adenozyne i (AMP)<sub>n</sub>, jeżeli u końca 5' — adenzynocząterofosforan i (AMP)<sub>n</sub>, natomiast w przypadku lokalizacji poli(A) wewnątrz

cząsteczki RNA produkt trawienia powinien zawierać tylko  $(AMP)_n$ . Taka analiza alkalicznego hydrolizatu segmentu poli(A) w RNA kodowanym przez wirusa wykazała obecność jednej 3' końcowej adenozyiny i 0,2 5' końcowego adenozynoczterofosforanu na 110 cząsteczek AMP zlokalizowanych wewnątrz segmentu (9). Sekwencje poli(A) w wirusowym RNA przypuszczalnie są więc dołączone do końca 3' łańcucha RNA. Do takich samych wniosków doszli inni autorzy na podstawie podobnej analizy segmentu poli(A) pochodzącego z RNA komórek wysiękowego mięsaka 180 (25) oraz na podstawie oznaczania 3' końcowego nukleotydu po utlenianiu nadjodanem i redukcji borowodorkiem mRNA polirybosomów retikulocytów królika (13). Również trawienie egzorybonukleazą specyficznie trawiącą RNA od końca 3'OH pozwoliło ustalić położenie segmentu poli(A) u końca 3' mRNA komórek HeLa i fibroblastów linii L (63).

Podobne wyniki otrzymali inni autorzy (64) stosując fosforylaze poli-nukleotydomową do stopniowej hydrolizy mRNA wirusa Vaccinia. Hydroliza tym enzymem, degradującym RNA w kierunku od końca 3' do 5', dawała początkowe produkty hydrolizy bogate w AMP, co wskazywało na lokalizację segmentu poli(A) u końca 3' RNA. Metodą tą wykazano, że 93% poli(A) z mRNA wirusa Vaccinia, 97,6% poli(A) z polirybosomalnego RNA komórek linii HeLa i 99,7% poli(A) z jądrowego RNA komórek linii HeLa znajduje się przy końcu 3'RNA. Dodatkowym potwierdzeniem lokalizacji poli(A) przy końcu 3'cząsteczki RNA jest przebieg syntezy poli(A)(+)RNA. W miarę wydłużania się cząsteczek mRNA kodowanego wirusem zwiększa się ilość poli(A)(+ RNA, co najprościej można wyjaśnić tym, że dopiero ukończone cząsteczki RNA zawierają segment poli(A)(64), i że segment ten dodany jest do końca 3', gdyż synteza RNA odbywa się w kierunku od 5' do 3'.

Oznacza to, że praktycznie wszystkie sekwencje poli(A) badane w mRNA wirusowym, mRNA i HnRNA komórek jądrazstych stanowią ich 3' koniec.

Skład nukleotydomowy segmentu poli(A) pochodzącego z frakcji RNA różnych komórek podano w tabeli 4. Segmenty poli(A) uzyskane z różnych frakcji RNA tych samych komórek zawierają bardzo zbliżony procent AMP. Również poli(A) uzyskany z mRNA kodowanego wirusem zawiera podobną ilość AMP do tej, jaka znajduje się w segmencie poli(A) pochodzącym z komórek gospodarza niezakażonych wirusem. Wyniki przedstawione w tabeli 4 wskazują na obecność w segmencie poli(A) niewielkich ilości trzech pozostałych nukleotydomów.

Skład nukleotydomowy poli(A) zależy od procedury izolowania frakcji RNA, z której pochodził poli(A), co ilustruje tabela 5.

Segment poli(A) odcięty od reszty RNA występuje w czasie wirowania w gradiencie sacharozy w postaci odrębnego szczytu w rejonie 4S (Ryc. 1B). Segment poli(A) poddany elektroforezie w 2,5% żelu poliakrylamidowym znajduje się w dość szerokim szczycie w rejonie powyżej 4S (Ryc. 2B),



a w bardziej stężonym żelu (10<sup>0</sup>%) w mniej rozmytym szczycie w rejonie powyżej 7S (5). Porównując wartości stałych sedymentacji dla poli(A) pochodzącego z RNA z wartością S uzyskaną dla handlowego poli(A) ustalono, że segment poli(A) pochodzący z RNA jest względnie długim polinukleotydem zawierającym około 300 nukleotydów (5). Na podstawie stosunku ilościowego adenozyliny do AMP uzyskiwanych w wyniku hydrolizy alkalicznej segmentu poli(A) (9,25) oraz na podstawie ruchliwości w żelu poliakrylamidowym (11, 12, 21, 29, 33, 34, 47) wyznaczono dla segmentu poli(A) przeciętną długość 100—200 nukleotydów. W piśmiennictwie można spotkać także dane o oznaczeniu krótszych (30—70 nukleotydów) segmentów poli(A) (8, 14, 21, 23, 46). Ponadto spostrzegano bardzo krótkie odcinki, bo zawierające zaledwie 5—6 nukleotydów adenylowych (13, 34, 65) umiejscowione również przy końcu 3' łańcucha RNA. Sprawa krótkich segmentów nie jest w pełni jasna, możliwe że są one produktami nieukończonyj syntezy poli(A) lub hydrolizy dłuższego segmentu poli(A), gdyż jak wiadomo segment poli(A) w miarę upływu czasu ulega skracaniu, o czym będzie mowa w dalszej części artykułu.

Tabela 4.

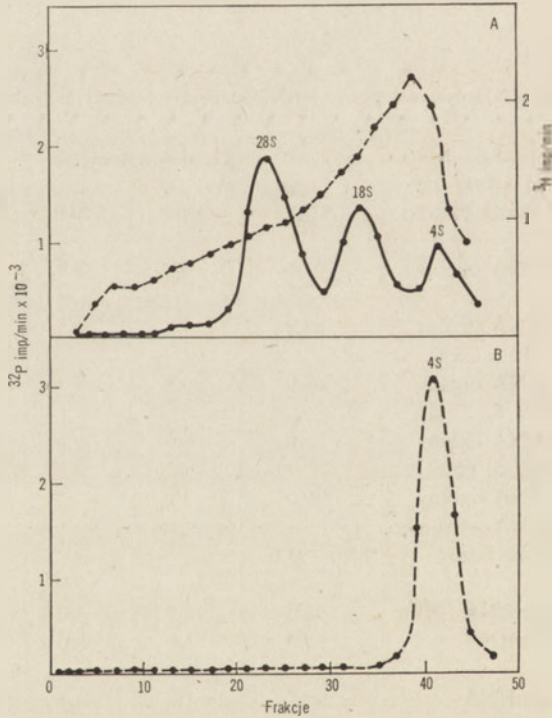
Skład nukleotydowy poli(A) pochodzącego z różnych frakcji RNA

Źródło RNA	Fracja RNA z której uzyskano poli(A)	Skład nukleotydowy				Piśmiennictwo
		AMP	GMP	CMP	UMP	
Komórki raka Ehrlicha <i>in vivo</i>	RNA ogólny	91,0	0,8	3,0	5,2	(5)
Komórki raka Ehrlicha <i>in vitro</i>	RNA ogólny pH 9, 38°C	68,3	9,2	6,5	16,0	(5)
	RNA ogólny pH 5, 23°C	66,0	10,9	7,3	15,8	(5)
	RNA ogólny pH 5, 65°C	75,0	6,6	6,6	11,3	(5)
Komórki HeLa	RNA ogólny	90,0				(29)
Komórki HeLa zakażone adenowirusem Typ 2	RNA wirusowo specyficzny	81,0—95,0				(48)
Komórki HeLa	HnRNA	92,0	1,0	4,0	3,0	(29)
Komórki raka Ehrlicha <i>in vitro</i>	HnRNA	92,0	3,0	3,0	2,0	(34)
Mięsak 180	HnRNA	96,7	1,9	0,7	0,7	(25)
Komórki HeLa Retikulocyty królika	mRNA dla hemoglobiny	85,0	0,5	5,0	9,0	(29)
Komórki myszy linia L	RNA polisomalny	70,3	11,9	3,8	14,0	(8)
Mięsak 180	RNA polisomalny	85,0				(27)
	RNA polisomalny	98,8	0,6	0,3	0,3	(25)

Tabela 5.

Skład nukleotydowy segmentu poli(A) pochodzącego z poli(A)(+)mRNA komórek myeloma w zależności od stosowanej procedury izolowania RNA (33)

Nr	Metoda izolowania RNA	Skład nukleotydowy (%)			
		AMP	GMP	CMP	UMP
1	Zawieszenie polisomów w buforze: 0,1M Tris-HCl pH 9+1% SDS, ekstrakcja RNA fenolem	78,5	7,4	1,1	13,0
2	Wstępne trawienie polisomów proteinazą K (200 µg/ml)+0,1% SDS inkubacja w 0°C 10 min. Dalsza procedura jak met. 1.	75,0	10,7	1,0	13,3
3	Wstępne trawienie polisomów proteinazą K (200 µg/ml+0,1% SDS inkubacja w 23°C 3 min. Dalsza procedura jak w met. 1.	82,5	8,1	0,0	9,5



**Ryc. 1.** Profil wirowania w liniowym gradiencie sacharozy RNA zawierającego segment poli(A) izolowanego z komórek raka Ehrlicha oraz wydzielonego segmentu poli(A), (5).

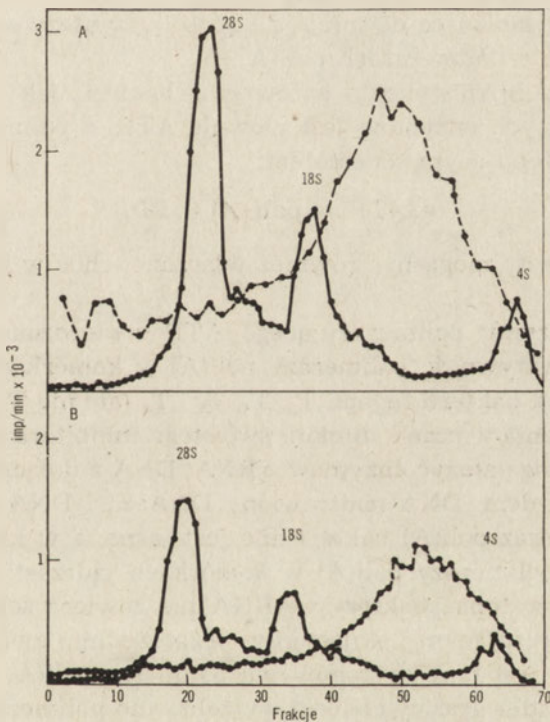
A — (---) poli(A)(+)RNA znakowany  $^{32}\text{P}$

(—) cytoplazmatyczny  $^3\text{H}$ -RNA użyty jako marker;

B — segment poli(A) uzyskany z poli(A)(+)RNA przedstawionego na Ryc. 1A metodą trawienia RNazą  $\text{T}_1$  i wiązania z celulozą poli(dT).

## IV. Synteza segmentu poli(A)

Miejszem syntezy poli(A) jest jądro, a pierwotną cząsteczką, do której dołącza się poli(A) jest cząsteczką HnRNA. Już uprzednio HnRNA uważano za prekursorową cząsteczkę mRNA przy czym mRNA lokalizowano u końca 3' cząsteczki macierzystej. mRNA uwolniony z HnRNA, zapewne w drodze hydrolizy enzymatycznej, wraz z segmentem poli(A) u swego końca 3' przenoszony jest do cytoplazmy. Za takim przemieszczeniem sekwencji poli(A) przemawia spostrzeżenie, że po krótkiej ekspozycji ze znakowaną adenozyną piętno gromadzi się w poli(A) HnRNA, natomiast radioaktywności nie oznacza się w segmentach poli(A) w mRNA cytoplazmy. Natomiast po przedłużonym znakowaniu, albo po przeniesieniu komórek do pożywek bez izotopu, piętno przemieszcza się i stopniowo gromadzi się w sekwencjach poli(A) cytoplazmatycznego mRNA (29).



**Ryc. 2.** Elektroforeza na 2,5% żelu poliakrylamidowym poli(A)(+)RNA izolowanego z komórek raka Ehrlicha oraz wydzielonego segmentu poli(A), (5).

A — (---) poli(A)(+)RNA znakowany  $^{32}\text{P}$

(—) cytoplazmatyczny  $^3\text{H}$ -RNA użyty jako marker;

B — segment poli(A) uzyskany z poli(A)(+)RNA przedstawionego na rycinie 2A.

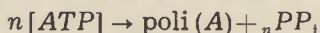
Wcześniejsze badania wskazywały, że synteza segmentu poli(A) może przebiegać łącznie z RNA (6); lecz aktynomycyna D hamowała syntezę poli(A) w mniejszym stopniu niż syntezę (transkrypcję) HnRNA i mRNA

(25, 29). Natomiast swoistym inhibitorem syntezy poli(A) okazała się kor-dycepina (3'-dezoeksyadenozyna), analog adenozy (25, 29). Ponadto kom-plementarny (negatywny) łańcuch wirusowego RNA do łańcucha poli(A)(+ +)RNA (pozytywnego) nie zawiera komplementarnych sekwencji poli(U) (45). Powyższe dane oraz prace innych autorów (66) sugerują, że segment poli(A) jest syntetyzowany niezależnie od transkrypcji i przyłączony do cząsteczki RNA dopiero po zakończeniu jej syntezy.

Segment poli(A) zapewne nie jest spisywany z matrycy DNA, gdyż nie stwierdzono aby DNA zawierał długie sekwencje poli(dT). Ponadto wykazano, że sekwencje poli(A) pochodzące z wirusowego RNA nie hybrydyzują z homologicznym DNA (44). Obecnie przyjmuje się, że synteza seg-mentu poli(A) przebiega niezależnie od transkrypcji HnRNA; segment poli(A) zostaje dołączony do końca 3' łańcucha HnRNA prawdopodobnie przez kolejne enzymatyczne dołączenie nukleotydów adenylowych po za-kończeniu transkrypcji HnRNA (64).

Pewnych wyjaśnień co do miejsca i sposobu syntezy segmentu poli(A) dostarczają dane o polimerazach poli(A).

Polimerazy poli(A) wykryto zarówno u bakterii jak i u eukariotów. Substratem dla tych enzymów jest głównie ATP, a polimeryzację można przedstawić następującym schematem:



Inne nukleotydy mogą być również włączone, choć w mniejszym stop-niu niż ATP.

Obecność enzymu polimeryzującego ATP stwierdzono w komórkach *E.coli* (67, 68). Aktywność polimerazy poli(A) w komórkach bakteryjnych zanika po infekcji bakterii fagami T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> i T<sub>6</sub> (ale nie T<sub>3</sub> i λ) najpewniej wskutek uwolnienia w czasie infekcji swoistego inhibitora polimerazy (67). Jako inicjator mogą służyć enzymowi rRNA, DNA z dołączonym terminal-nie rybonukleotydem. DNA nadtrawiony DNAazą i DNA zdenaturowany (68). Rola polimeraz poli(A) bakterii nie jest jasna, a w każdym razie od-mienna od roli polimerazy poli(A) w komórkach jądrazystych, gdyż jak to wspomniano na wstępie, bakteryjny RNA nie zawiera sekwencji poli(A).

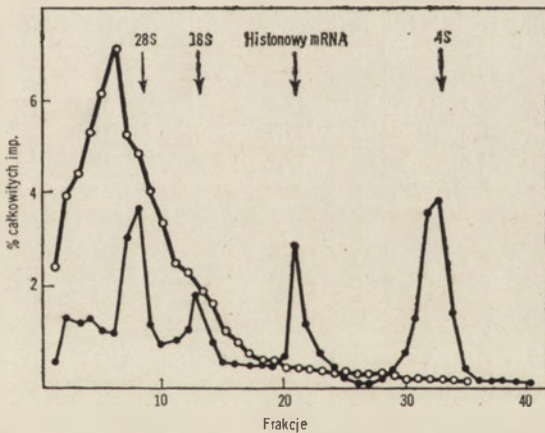
Bardziej interesującym i stojącym w bezpośrednim związku z omawia-nym problemem jest fakt występowania polimeraz poli(A) w organizmach zwierzęcych. Z jąder grasicy cielęcej wyizolowano polimerazę poli(A), któ-ra katalizuje polimeryzację i włączenie AMP wewnątrz łańcucha RNA (1). Podobny enzym znaleziono w jądrach komórek wysiękowego raka Ehrlicha (69). Enzym ten w obecności RNA jako inicjatora oraz ATP jako substratu, katalizuje syntezę łańcucha poli(A) dołączonego do RNA (69). W jądrach wątroby kurzej znaleziono polimerazę poli(A) zależną od DNA (70). Nie ulega ona stymulacji przez RNA, a długość syntetyzowanego łańcucha poli(A) wynosi około 100 nukleotydów. Natomiast w wątrobie szczura wy-kryto polimerazę poli(A) dla której substratem jest AMP a inicjatorem

mogą być bądź RNA bądź to syntetyczne oligo- lub polinukleotydy (71). Syntetyzowany przez ten enzym łańcuch poli(A) zawiera od 20 do 50 nukleotydów i jest związany z końcem 3' inicjatora.

Enzym polimeryzujący ATP do poli(A) wykryto również w mitochondriach wątroby szczura. Interesującym jest stwierdzenie znacznego obniżenia aktywności mitochondrialnej polimerazy poli(A) w wątrobiaku Morrisa w porównaniu do zdrowej wątroby (72). Stwierdzono, że utrata aktywności mitochondrialnej polimerazy poli(A) w komórkach wątrobiaka nie wynika z obecności ATP-azy w tym enzymie, ani z obecności specyficznych inhibitorów (72).

### V. Właściwości RNA zawierających sekwencje poli(A)

Całkowity poli(A)(+)RNA izolowany z komórek jest heterogenny, o czym świadczą wyniki wirowania w gradiencie sacharozy (Ryc. 1A), lub elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 2A). Na obu rycinach widoczny jest heterogenny rozkład radioaktywności pochodzący ze znakowanego poli(A)(+)RNA z przewagą w rejonie pomiędzy 18 a 4S (5). Jednak część cząsteczek RNA posiadających wyznakowany segment poli(A) ma



Ryc. 3. Elektroforeza na 2,7% żelu poliakrylamidowym poli(A)(+)RNA (○—○) i poli(A)(-)RNA (●—●) z polirybosomów komórek linii HeLa (28).

stałe sedymentacji większe niż 28S, podobnie jak ciężkie frakcje HnRNA. Cytoplazmatyczny lub polisomalny poli(A)(+)RNA izolowany z różnych komórek zwierzęcych składa się z heterogennych frakcji rozmieszczonych w rejonach od 30 do 4S (8, 12, 23, 25, 28, 31, 61). Dla przykładu na Ryc. 3 przedstawiono heterogenny (od około 40 do około 10S) rozkład polisomalnego poli(A)(+)RNA komórek linii HeLa w elektroforogramie w żelu poliakrylamidowym porównany z rozkładem polisomalnego poli(A)(-)RNA,

który to RNA zawiera wyraźne szczyty 4S, 18S i 28S, oraz szczyt zlokalizowany pomiędzy 18S a 4S, odpowiadający histonowemu mRNA (28) nie zawierającemu poli(A).

Skład nukleotydowy poli(A)(+)RNA i poli(A)(-)RNA pochodzących z całych komórek raka Ehrlicha hodowanych *in vivo* podano w tabeli 6. Jak wynika z tabeli zarówno poli(A)(+)RNA izolowany w pH 5 jak i w pH 9 jest bogatszy w AMP w porównaniu z odpowiednimi preparatami poli(A)(-)RNA. Frakcja poli(A)(+)RNA izolowana w pH 9 jest bogatsza w AMP niż odpowiadająca jej frakcja poli(A)(+)RNA uzyskana w pH 5. W tabeli 7 przedstawiono skład zasad polisomalnego poli(A)(+)RNA oraz mRNA izolowanych (innymi metodami) z fibroblastów L myszy oraz komórek HeLa. Jak widać z danych średni skład zasad obu frakcji RNA jest zbliżony, co przemawia za podobieństwem (lub identycznością) obu rodzajów cząsteczek.

Tabela 6

Skład nukleotydowy poli(A)(+)RNA pochodzącego z całych komórek raka Ehrlicha izolowanego w pH 5 i pH 9, znakowanego <sup>32</sup>P 12 godz. Frakcje RNA zawierające poli(A) otrzymywano przez kompleksowanie z celulozą-oligo (dT). Dla porównania podano skład nukleotydowy odpowiednich preparatów poli(A)(-)RNA (wg 5)

Mol %	pH 5 RNA		pH 9 RNA	
	poli(A)(+)RNA	poli(A)(-)RNA	poli(A)(+)RNA	poli(A)(-)RNA
CMP	23,5	29,8	21,4	26,8
AMP	23,7	17,6	39,7	19,4
GMP	28,3	33,7	19,7	37,5
UMP	25,6	18,9	19,2	17,2

Tabela 7

Skład zasad polisomalnego poli(A)(+)RNA oraz mRNA

Materiał	Mol %					Piśmien- nictwo
	A	U	G	C	G+C	
	Polisomalny poli(A)(+)RNA					
Komórki myszy linia L	28,9	22,4	26,5	22,1	48,6	(27)
Komórki HeLa	30,1	23,8	21,8	24,4	46,2	(11)
	mRNA					
Retikulocyty królika	28,2	19,1	27,9	24,9	52,8	(85)
Komórki HeLa	30,1	23,8	21,8	24,4	46,2	(11)

Jak już wspomniano, segmenty poli(A) zawarte w mRNA ulegają skróceniu w miarę upływu czasu (25, 27). Takie skracanie poli(A) w mRNA szczególnie wyraźnie spostrzegano przy jednoczesnym blokowaniu syntezy RNA dużą dawką (5 µg/ml) aktynomycyny D (73). W miarę upływu czasu od momentu podania aktynomycyny i po przeniesieniu komórek do poży-

wek nie zawierających znakowanej adenozy, segmenty poli(A) w RNA polisomów (lub mRNA) zmniejszały się i były bardziej różnorodne pod względem wielkości. W przypadku jądrowego RNA nie znaleziono znakowanego poli(A) już w 22 godziny po przeniesieniu komórek na pożywki bez znakowanego prekursora (73).

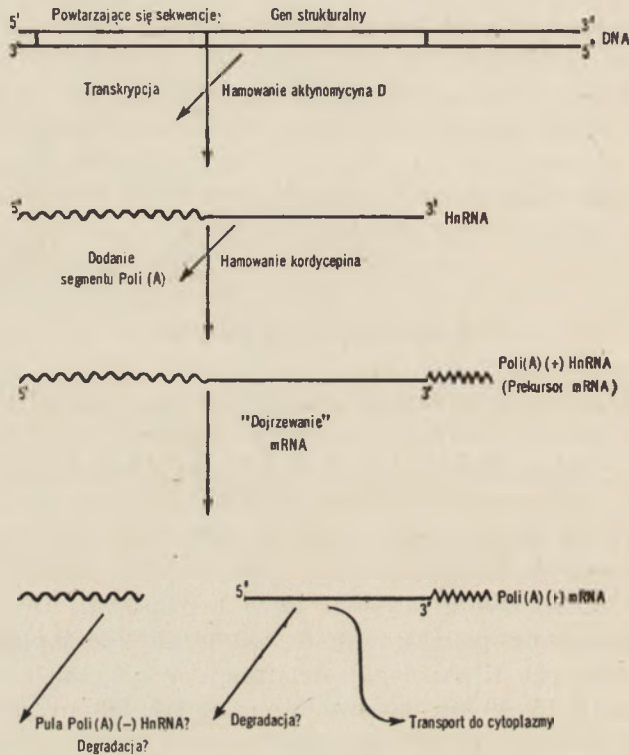
Segment poli(A) w HnRNA uzyskany w czasie 48 godzin znakowania jest dłuższy niż segment poli(A) w RNA cytoplazmatycznym. Różnica ta występuje jedynie wówczas, gdy okres znakowania jest długi. W krótkim (12 min) czasie znakowania długość segmentu w HnRNA i cytoplazmatycznym RNA jest jednakowa (73). Skracanie segmentu poli(A) w miarę upływu czasu musi odbywać się zatem dopiero po przetransportowaniu mRNA do cytoplazmy, co sugeruje związek z procesem „starzenia” się mRNA (73), jakkolwiek ostatnio ukazały się pierwsze dane przemawiające za degradacją poli(A) już na terenie jądra (74).

## VI. Rola segmentu poli(A)

Przedstawione w poprzednim rozdziale niektóre właściwości cząsteczki polisomalnego poli(A)(+)RNA sugerują, że stanowi ona właściwy informacyjny RNA. Bezpośrednio na to dowody pochodzą z badań aktywności matrycowej poli(A)(+)RNA w syntezie białka. Polisomalny poli(A)(+)RNA ulega translacji do specyficznych białek w systemach pozakomórkowych. I tak na przykład 9S mRNA zawierający poli(A), izolowany z polisomów retikulocytów myszy syntetyzuje *in vitro* hemoglobinę myszy (16, 75). Podobnie odpowiednie poli(A)(+)RNA izolowane z cytoplazmatycznego czy też polisomalnego RNA ulegają translacji w systemie *in vitro* dając globinę królika (8, 15, 49, 61, 62), owoalbuminę (15, 20), awidynę (20) oraz lekki łańcuch białkowy specyficzny dla komórek myeloma (32). Uzyskiwane w drodze syntezy *in vitro* białka są identyczne, lub tylko nieznacznie różne od odpowiadających im frakcji białkowych syntetyzowanych endogennie, co stwierdzono przy pomocy elektroforezy na żelach, chromatografii oraz immunoprecypitacji tych białek ze specyficznymi dla nich przeciwciałami. Polisomalny poli(A)(+)RNA posiada więc istotne cechy informacyjnego RNA.

Rola sekwencji poli(A) w HnRNA i mRNA nie jest jednak jednoznacznie określona. Wiele danych wskazuje na udział sekwencji poli(A) w tworzeniu RNA informacyjnego z prekursorów HnRNA i w transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy. Jak wspomniano wyżej segment poli(A) jest przyłączony kowalencyjnie do końca 3' zarówno HnRNA jak i mRNA (29). W trakcie znakowania pulsowego segment poli(A) pojawia się jednak wcześniej w HnRNA niż mRNA. Informacyjny RNA jest z całą pewnością transkryptem chromatyny a więc synteza jego zachodzi na terenie jądra. Dane te sugerują, że mRNA może być produktem powstającym w wyniku

przemian HnRNA. Przemawia za tym poglądem również homologia sekwencji nukleotydów mRNA i części HnRNA komórek HeLa (76), a także komórek transformowanych wirusem SV40 (77) i identyczne produkty translacji pochodzące z poli(A)(+)HnRNA i poli(A)(+)mRNA komórek szpiczaka, uzyskane po wstrzyknięciu obu matryc oocytom *Xenopus laevis* (31).



**Ryc. 4.** Model powstawania i przenoszenia mRNA z jądra do cytoplazmy. Na schemacie przedstawiono sytuację gdy HnRNA zawiera transkrypt (mRNA) tylko z jednego cistronu;

(~~~~) sekwencje powtarzające się  
 (—) sekwencje unikalne  
 (〰) segment poli(A).

Rola sekwencji poli(A) w przemianie HnRNA w mRNA jest bardzo prawdopodobna, lecz molekularny mechanizm takiej przemiany nie jest jasny. Sugeruje się, że segment poli(A) bierze udział w wyborze miejsca odcięcia mRNA od pozostałych, powtarzających się sekwencji HnRNA (34, 65). Dołączenie segmentu poli(A) byłoby niezbędne dla rozpoczęcia procesu „przeróbki” (processing) HnRNA w mRNA. Być może iż mRNA pochodzący z „prawej” (bliżej końca 3') części HnRNA wraz z segmentem poli(A) po enzymatycznym odcięciu od powtarzających się sekwencji części „lewej” (bliżej końca 5') zostaje przetransportowany do cytoplazmy



(Ryc. 4). Za udziałem poli(A) w transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy przemawia obserwacja, że po zahamowaniu syntezy poli(A) kordycepiną nowo syntetyzowane HnRNA i mRNA są pozbawione segmentu poli(A), a jednocześnie spostrzega się znaczny spadek ilości mRNA w polirybosomach (25, 29).

Pewnych danych mogących wyjaśnić rolę poli(A) w procesie transportu mRNA dostarczają odkrycia frakcji białkowych skompleksowanych z sekwencjami poli(A) polisomalnego RNA. Segment poli(A) polisomalnego RNA komórek mięsaka 180 istnieje w kompleksie z białkiem o stałej sedymentacji równej 12—15S (78). Kompleks poli(A) — białko można rozdzielić, przy czym uwolniony segment poli(A) posiada tę samą stałą sedymentacji co poli(A) uzyskany z polisomalnego RNA tych komórek. Podobne kompleksy stwierdzono we frakcji mRNA komórek myszy linii L i komórek wątroby szczura (18) oraz w globinowym mRNA komórek królika (79). Kompleksy poli(A) — białko stwierdzono również w mRNA nie związanym z polisomami, istniejącym w cytoplazmie oraz w mRNA, który znajdował się jeszcze na terenie jądra (78). Wiele danych przemawia za występowaniem mRNA ssaków w postaci kompleksów rybonukleoproteidowych uważanych za formę transportową mRNA (26, 80, 81, 82). Kompleksy mRNA — białko sedymentują w rejonie 30—150S, a odbiałczony mRNA w rejonie 10—30S. Również gęstość tych kompleksów w gradiencie soli ciężkich jest niższa od gęstości wolnego mRNA.

Informacyjny RNA histonów nie posiada segmentu poli(A), a mimo to przemieszcza się z jądra do cytoplazmy i pojawia się w polisomach wcześniej niż inne poli(A)(+)mRNA. W komórce mogą więc istnieć jeszcze inne mechanizmy kształtowania się cząsteczki mRNA, jak również mechanizmy transportu mRNA bez udziału poli(A). Nie można wykluczyć, że geny kodujące histony są inaczej zorganizowane niż geny pozostałych białek, stąd unikalna postać produktu ich transkrypcji.

Możliwy jest również udział sekwencji poli(A) w stabilizowaniu cząsteczki mRNA. Wykryty w mRNA kompleks poli(A) — białko, o którym wspomniano powyżej, nie tworzy wprawdzie na tyle zwartej struktury, by całkowicie ochraniać poli(A) przed hydrolizą RNazą T<sub>2</sub>, częściowo jednak go ochrania; szybkość hydrolizy poli(A) w kompleksie z białkiem jest obniżona w porównaniu z szybkością hydrolizy wolnego poli(A) (79). Ponadto wspomniana już częściowo korelacja między obniżoną stabilnością bakteryjnych mRNA (44, 49, 83) i histonowego mRNA (56, 57, 58) w porównaniu z innymi mRNA eukariotów (zawierającymi poli(A)) a brakiem sekwencji poli(A) w tych frakcjach mRNA może również przemawiać za możliwą rolą poli(A) w stabilizowaniu cząsteczki mRNA. Należy jednak zwrócić uwagę, że porównywanie systemu bakteryjnego z systemem komórek jądrazastych nie jest całkowicie adekwatne.

Sugerowana przez niektórych badaczy funkcja segmentu poli(A) w procesie translacji nie jest jasna i jednoznacznie określona. Za taką funkcją

poli(A) miałyby przemawiać występowanie poli(A) w pozytywnym (ulegającym translacji) pasmie RNA wirusów, a z drugiej strony brak poli(A) w pasmie negatywnym (43):

Wykazano, że enzymatyczne odcięcie segmentu poli(A) w mRNA polisomów limfocytów ludzkich stymulowanych fitohemaglutyniną uniemożliwia przyłączenie N-formylo-metionylo-tRNA do rybosomów, a zatem uniemożliwia inicjację syntezy łańcucha białkowego (21). Informacyjny RNA z retikulocytów królika uzyskany z cięższych polirybosomów zawiera więcej poli(A) niż mRNA lżejszych polisomów, co sugeruje zależność między ilością poli(A) w mRNA a wiekiem mRNA. Dojrzwaniu retikulocytów towarzyszy ponadto obniżenie zdolności do syntezy białka oraz zmniejszenie ilości cięższych polisomów (8). Te pojedyncze obserwacje nie pozwalają jednakże wyciągnąć jednoznacznych wniosków co do udziału i roli sekwencji poli(A) w procesie syntezy białka.

Zahamowanie syntezy białka emetyną, cykloheksimidem czy paktamyciną nie zapobiega skracaniu segmentu poli(A) w mRNA (73), co przemawia za brakiem związku między skracaniem poli(A) w mRNA a udziałem mRNA w syntezie białka. Związek taki zapewne jednak istnieje, bo jak już wspomniano „starsze” mRNA mają krótsze poli(A) (25, 27, 73).

Odkrycie sekwencji poli(A), a następnie zlokalizowanie ich w określonych frakcjach RNA zrodziło ciekawe koncepcje dotyczące biosyntezy i funkcji mRNA w komórkach eukariotycznych. Niektóre z tych koncepcji zostały już sprawdzone i potwierdzone doświadczalnie. Znalazienie sekwencji poli(A) w informacyjnym RNA oraz w jądrowym, heterogennym RNA (HnRNA) pozwoliło ustalić wzajemne współzależności między obiema frakcjami i wykazać, że HnRNA jest prekursorem mRNA. Wykrycie segmentu poli(A) w informacyjnym RNA stwarza także nowe, znacznie szersze możliwości metodyczne, zwłaszcza pozwala na izolowanie mRNA i jego prekursora w stanie dużego oczyszczenia.

Artykuł otrzymano 9.4.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 24.6.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Edmonds M., Abrams R., (1960), *J. Biol. Chem.* **235**, 1142—1149.
2. Edmonds M., Abrams R., (1963), *J. Biol. Chem.* **238**, 1186—1187.
3. Hadjivassiliou A., Brawerman G., (1966), *J. Mol. Biol.* **20**, 1—7.
4. Hadjivassiliou A., Brawerman G., (1967), *Biochemistry* **6**, 1934—1941.
5. Edmonds M., Caramela M. G., (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 1314—1324.
6. Lim L., Canellakis Z. N., Canellakis E. S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **209**, 112—127.
7. Lim L., Canellakis Z. N., Canellakis E. S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **209**, 128—138.
8. Lim L., Canellakis E. S., (1970), *Nature*, **227**, 710—712.
9. Kates J., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 743—752.

10. Kates J., Beeson J., (1970), *J. Mol. Biol.* **50**, 19—33.
11. Darnell J. E., Wall R., Tushinski R. J., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1321—1325.
12. Edmonds M., Vaughan M. H., Nakazato H., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1336—1340.
13. Burr H., Lingrel J. B., (1971), *Nature New Biology* **233**, 41—43.
14. Hunt J. A., (1973), *Biochem. J.* **131**, 327—333.
15. Schutz G., Beato M., Feigelson P., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **49**, 680—689.
16. Morrison M. R., Górski J., Lingrel J. B., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **49**, 775—781.
17. Pemberton R. E., Baglioni C., (1972), *J. Mol. Biol.* **65**, 531—535.
18. Blobel G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 924—928.
19. De Larco J., Guroff G., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **49**, 1233—1240.
20. Rosenfeld G. C., Comstock J. P., Means A. R., O'Malley B. W., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 387—392.
21. Rosenfeld M. G., Abrass I. B., Perkins L. A., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **49**, 230—238.
22. Torelli U., Torelli G., (1973), *Nature New Biology* **244**, 134—136.
23. Lee S. Y., Mendecki J., Brawerman G., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 1331—1335.
24. Brawerman G., Mendecki J., Lee S. Y., (1972), *Biochemistry*, **11**, 637—641.
25. Mendecki J., Lee S. Y., Brawerman G., (1972), *Biochemistry*, **11**, 792—798.
26. Lee S. Y., Krsmanovic V., Brawerman G., (1971), *Biochemistry*, **10**, 895—900.
27. Greenberg J. R., Perry R. P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 361—366.
28. Greenberg J. R., Perry R. P., (1972), *J. Mol. Biol.* **72**, 91—98.
29. Darnell J. E., Philipson L., Wall R., Adesnik M., (1971), *Science*, **174**, 507—510.
30. Sheldon R., Jurale Ch., Kates J., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 417—421.
31. Stevens R. H., Williamson A. R., (1972) *Nature*, **239**, 143—146.
32. Swan D., Aviv H., Leder P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1967—1971.
33. Faust C. H., Diggelman H., Mach B., (1973), *Biochemistry*, **12**, 925—931.
34. Hyskov A. P., Farashyan V. R., Georgiev G. P., (1972), *FEBS Letters*, **20**, 355—358.
35. Ryskov A. P., Farashyan V. R., Georgiev G. P., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 227—230.
36. Hirsch M., Penman S., (1973), *J. Mol. Biol.* **80**, 379—391.
37. Higgins T. J. V., Mercer J. F. B., Goodwin P. B., (1973), *Nature, New Biology* **246**, 68—70.
38. Manahan C. O., App A. A., Still C. C., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **53**, 588—595.
39. Firtel R. A., Jacobson A., Lodish H. F., (1972), *Nature New Biology* **239**, 225—228.
40. Reed J., Wintersberger E., (1973), *FEBS Letters* **32**, 213—217.
41. McLaughlin C. S., Warner J. R., Edmonds M., Nakazato H., Vaughan M. H., (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 1466—1471.

42. Lai M. M. C., Duesberg P. H., (1972), *Nature*, **235**, 383—386.
43. Johnston R. E., Bose H. R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1514—1516.
44. Johnston R. E., Bose H. R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **46**, 712—718.
45. Yogo J., Wimmer E., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 1877—1882.
46. Armstrong J. A., Edmonds M., Nakazato H., Phillips B. A., Vaughan M. H., (1972), *Science*, **176**, 526—528.
47. Weinberg R. A., Ben-Ishai Z., Newbold J. E., (1972), *Nature, New Biology* **238**, 111—113.
48. Philipson L., Wall R., Glickman G., Darnell J. E., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 2806—2809.
49. Singer R. H., Penman S., (1972), *Nature*, **240**, 100—102.
50. Edmonds M., Kopp D. W., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41**, 1531—1537.
51. Perry R. P., Kelley D. E., La Torre J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **48**, 1593—1600.
52. Suzuki Y., Brown D. D., (1972), *J. Mol. Biol.* **63**, 409—429.
53. Adesnik M. Darnell J. E., (1972), *J. Mol. Biol.* **67**, 397—406.
54. Perry R. P., La Torre J., Kelley D. E., Greenberg J. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 220—226.
55. Schochetman G., Perry R. P., (1972) *J. Mol. Biol.* **63**, 591—596.
56. Borun T. W., Scharff M. D., Robbins E., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **58**, 1977—1983.
57. Gallwitz D., Mueller G. C., (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 5947—5952.
58. Craig N., Kelley D. E., Perry R. P., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **246**, 493—498.
59. Britten R. J., (1963), *Science*, **142**, 963—965.
60. Gilham P. T., (1964), *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 4982—4985.
61. Aviv H., Leder P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1408—1412.
62. Kitos P. A., Saxon G., Amos H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 1426—1437.
63. Molloy G. R., Sporn M. B., Kelley D. E., Perry R. P., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3256—3260.
64. Sheldon R., Kates J., Kelley D. E., Perry R. P., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3829—3834.
65. Hunt J. A., (1973), *Biochem. J.* **131**, 315—325.
66. Slater D. W., Slater I., Gillespie D., (1972), *Nature*, **240**, 333—337.
67. Ortiz P. J., August J. T., Watanabe M., Kaye A. M., Hurwitz J., (1965), *J. Biol. Chem.* **240**, 423—431.
68. Gottesman M. E., Canellakis Z. N., Canellakis E. S., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 34—42.
69. Burdon R. H., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 472—476.
70. Chambon P., Weill J. D., Mandel P., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 39—43.
71. Klemperer H. G., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 416—420.
72. Jacob S. T., Schindler D. G., Morris H. P., (1972), *Science*, **178**, 639—640.
73. Sheiness D., Darnell J. E., (1973), *Nature New Biology*, **241**, 265—268.
74. La Torre J., Perry R. P., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **335**, 93—101.
75. Brawerman G., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 322—324.
76. Lindberg U., Darnell J. E., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 1089—1096.
77. Penman S., Rosbash M., Penman M., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*,

- 67, 1878—1885.
78. Bishop J. O., Pemberton R., Baglioni C., (1972), *Nature, New Biology* 235, 231—234.
79. Kwan S. W., Brawerman G., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 3247—3250.
80. Blobel G., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47, 88—95.
81. Perry R. P., Kelley D. E., (1966), *J. Mol. Biol.* 16, 255—268.
82. Perry R. P., Kelley D. E., (1968), *J. Mol. Biol.* 35, 37—59.
83. Miller O. L., Beatty B. R., Hamkalo B. A., Thomas C. A., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 505—512.
84. Rosenfeld M. G., Abrass I. B., Mendelsohn J., Roos B. A., Boone R. F., Garren L. D., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2306—2311.
85. Marbaix G., Burny A., Huez G., Chantrenne H., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 114, 404—406.



EDWARD BAŃKOWSKI\* I WŁADYSŁAW GAŁASIŃSKI\*\*

## Biosynteza kolagenu

### Collagen Biosynthesis

Kolagen wzbudził zainteresowanie jako białko strukturalne, występujące powszechnie w tkankach zwierzęcych, charakteryzujące się unikalnymi cechami budowy i ulegające zmianom w wielu stanach patologicznych.

Ponad 30% reszt aminokwasowych kolagenu stanowi glicyna, a około 15% stanowią reszty prolilowe. Na szczególną uwagę zasługuje jednak obecność hydroksyproliny i hydroksylizyny, aminokwasów niezmiernie rzadko spotykanych w innych białkach zwierzęcych oraz bardzo niska zawartość aminokwasów aromatycznych i siarkowych (1, 2, 3).

Podstawową jednostką strukturalną kolagenu \*\*\* jest tzw. tropokolagen, cząsteczka o wymiarach  $15 \times 3\ 000 \text{ \AA}$ , złożona z trzech łańcuchów peptydowych o masie około 100 000, zwanych podjednostkami  $\alpha$ . W większości tkanek zwierząt wyższych tropokolagen składa się z dwu identycznych łańcuchów  $\alpha_1$  i jednego łańcucha  $\alpha_2$ , różniącego się nieznacznie od poprzednich składem i sekwencją aminokwasową (4). Obecność dużej liczby reszt prolilowych i hydroksyprolilowych sprawia, iż łańcuchy kolagenowe nie tworzą typowej  $\alpha$ -spiralii. Spirala wytworzona przez łańcuchy kolagenowe jest bardziej rozciągnięta w porównaniu z  $\alpha$ -spiralą. Odległość osiowa sąsiadujących ze sobą reszt aminokwasowych wynosi  $2,91 \text{ \AA}$ , podczas gdy w przypadku  $\alpha$ -spiralii wynosi ona jedynie  $1,5 \text{ \AA}$ . Tak duże rozciągnięcie łańcuchów kolagenowych uniemożliwia wytworzenie wewnątrzłańcuchowych wiązań wodorowych, pozwala jednak na powstanie wiązań typu wodorowego między sąsiadującymi łańcuchami, utrwalając w ten sposób typową dla kolagenu strukturę potrójnej spiralii (5, 6).

Ponieważ glicyna stanowi 1/3 reszt aminokwasowych kolagenu i jest równomiernie rozmieszczona na całej długości łańcuchów, białko to może być rozpatrywane jako polimer trójpeptydu o składzie Gly-X-Y. W pozycji

\* Dr, Zakład Biochemii Akademii Medycznej, Białystok,

\*\* Doc. dr habil., Zakład Chemii Ogólnej Akademii Medycznej, Białystok

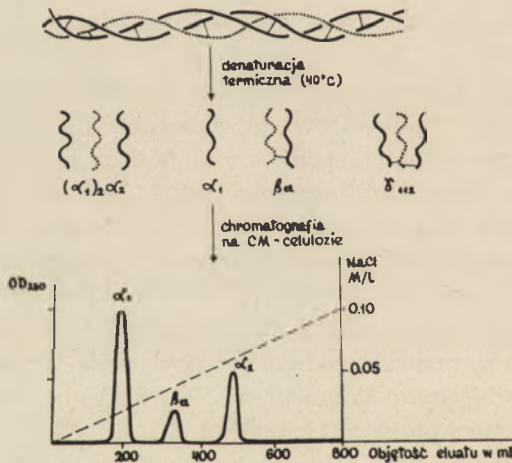
Wykaz stosowanych skrótów: Gal — galaktoza, Glc — glukoza, HyLys — hydroksylizyna, HyPro — hydroksyprolina, m-RNA — informacyjny kwas rybonukleinowy, transfer RNA — przenośnikowy kwas rybonukleinowy, UDP — urydynodwufosforan, peptyd  $\alpha_1$  — CB-8-HA-1.

\*\*\* Patrz *Postępy Biochemii* (1975), 21, zeszyt 1. A. Mazanowska „Prokolagen”

X najczęściej występuje prolina, a w pozycji Y hydroksyprolina. Grupa C=O proliny wbudowanej do jednego z łańcuchów jest nośnikiem silnie elektroujemnego ładunku tworzącego dość trwale wiązanie wodorowe z grupą N—H glicyny wbudowanej do sąsiedniego łańcucha. Wykazano, że na jeden tryplet Gly-X-Y przypada jedno wiązanie wodorowe (7). Powstaje ono zawsze pomiędzy grupą N—H glicyny i grupą C=O proliny lub innego aminokwasu występującego w pozycji X (8, 9). W miarę dojrzewania kolagenu jego struktura przestrzenna stabilizuje się przez powstawanie wiązań poprzecznych typu kowalencyjnego (10, 11).

Kolagen cechuje się dość niską temperaturą denaturacji cieplnej wynoszącą około 40°C. W temperaturze tej wiązania wodorowe ulegają rozerwaniu, a do roztworu przechodzą pojedyncze łańcuchy  $\alpha$ , ich dimery (podjednostki  $\beta$ ) lub trimery (podjednostki  $\gamma$ ) zawierające wszystkie trzy łańcuchy tropokolagenu lecz ułożone w sposób przypadkowy, nieuporządkowany. Podjednostki te można rozdzielić na drodze chromatografii kolumnowej (12) lub elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (13).

Synteza kolagenu zachodzi w komórkach tkanki łącznej w fibroblastach (14, 15, 16, 17), chondroblastach (18), osteoblastach (19) i odontoblastach (20).



Ryc. 1. Schemat cząsteczki tropokolagenu i procesu jego denaturacji (2, 12)

Ostatnie doniesienia sugerują, że czynność tę mogą spełniać również niektóre komórki pochodzenia ektodermalnego (21, 22) i entodermalnego (23). Proces biosyntezy kolagenu można podzielić na sześć kolejno po sobie następujących etapów według następującego schematu:

- a) transport aminokwasów do wnętrza komórki syntetyzującej,
- b) synteza łańcuchów peptydowych,
- c) hydroksylacja niektórych reszt prolilowych i lizylowych,



- d) glikozylacja niektórych reszt hydroksylizylowych,
- e) transport nowopowstałego białka do przestrzeni pozakomórkowej,
- f) powstawanie włókien kolagenowych.

### I. Transport aminokwasów przez błonę komórki tkanki łącznej

Transport aminokwasów do wnętrza komórki syntetyzującej kolagen odbywa się wbrew gradientowi stężeń, a więc wymaga dostarczenia energii. Najwięcej uwagi poświęcono transportowi glicyny i proliny, jako głównych składników aminokwasowych kolagenu. Współczynnik podziału aminokwasów pomiędzy komórką i płynem pozakomórkowym waha się zależnie od rodzaju aminokwasu i wieku zwierzęcia od około 8 do 42. Kość płodowa szczura wchłania w tym samym czasie kilkakrotnie więcej znakowanego aminokwasu niż kość osobnika dorosłego. Inkubacja kości szczura w środowiskach o różnych zawartościach aminokwasów wskazuje, że ich wchłanianie przez komórkę zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia osiągając *plateau* przy określonych stężeniach charakterystycznych dla poszczególnych aminokwasów (24, 25).

Obecność glicyny, kwasu  $\alpha$ -aminoizomasłowego, kwasu azetydno-2-karboksyloвого i hydroksy L-proliny działa hamująco na transport L-proliny do wnętrza komórki, natomiast glicyloprolina, proliloglicyna, glicylohydroksyprolina i hydroksyproliloglicyna nie wykazują takiego działania (24, 26).

L-prolina hamuje nieco transport glicyny lecz w sposób niekompetycyjny. Usunięcie ze środowiska jonów  $\text{Na}^+$  lub zastąpienie ich  $\text{Trisem}^+$ ,  $\text{Li}^+$  lub choliną<sup>+</sup> obniża wchłanianie glicyny o 50 do 60%, natomiast całkowicie znosi czynny transport proliny. Powyższe spostrzeżenia świadczą, iż mechanizm transportu glicyny różni się w istotny sposób od transportu proliny (24).

Hamującemu działaniu hydroksyproliny na transport proliny przypisuje się pewne znaczenie w procesie regulacji biosyntezy kolagenu. Jak wiadomo, przyspieszonej biosyntezie kolagenu towarzyszy wzmożona degradacja tego białka powodująca wzrost zawartości wolnej hydroksyproliny w przestrzeni międzykomórkowej. Iminokwas ten może zwrótnie hamować biosyntezę kolagenu (26). Hydroksyprolina pochodząca z rozpadu kolagenu tkankowego nie wbudowuje się ponownie do tego białka (27).

Amid kwasu jodooctowego nieodwracalnie wiążący grupy SH, jest inhibitorem transportu aminokwasów. Podobny, choć ilościowo słabszy, efekt wykazują cyjanki lub fluorki. Ouabaina, swoisty inhibitor ATP-azy (E. C. 3.6.1.3.), której aktywność zależy od obecności jonów sodowych, zmniejsza wchłanianie glicyny i proliny o około 50%. Przy braku jonów  $\text{Na}^+$  fluorki, cyjanki i ouabaina nie działają, podczas gdy amid kwasu jodo-

octowego w dalszym ciągu hamuje ten proces. Spostrzeżenia te wskazują, że fluorki, cyjanki i oubaina hamują reakcje zależne od obecności jonów sodowych, podczas gdy amid kwasu jodooctowego działa przez blokowanie grup SH błony komórkowej lub enzymów wewnątrzkomórkowych (24).

## II. Biosynteza łańcuchów peptydowych kolagenu

Synteza łańcuchów peptydowych kolagenu zachodzi na polisomach związanych z błonami siateczki endoplazmatycznej (28). Ponieważ łańcuchy kolagenu mają bardzo wysoką masę cząsteczkową w porównaniu z innymi białkami (około 100 000) przypuszczano, że powstają one z kilku oddzielnie syntetyzowanych podjednostek, które po oddzieleniu od rybosomów łączą się ze sobą niepeptydowymi wiązaniami kowalencyjnymi (29, 30). Badania Vuusta i Pieza (31) wykazały jednak niezbiecie, że łańcuch  $\alpha$  powstaje w sposób ciągły na jednej matrycy m-RNA. Czas syntezy jednego łańcucha wynosi około 6 minut. Ponieważ łańcuchy  $\alpha$  zawierają po około 1 000 reszt aminokwasowych, stąd m-RNA uczestniczący w ich syntezie musi mieć masę cząsteczkową wynoszącą około 1 000 000 i należy do największych ze spotykanych w przyrodzie (32).

Kompleks rybosomalny zaangażowany w tym procesie musi być również nieprzeciętnie duży. Badania wykonane w różnych laboratoriach dały bardzo rozbieżne wyniki odnośnie wielkości tych kompleksów. Przyczyną tych niezgodności jest prawdopodobnie różnorodność układów, z których były izolowane oraz możliwość kompleksowania rybosomów z kolagenem w czasie preparatyki (14, 29, 32, 33, 34).

Typowe dla kolagenu aminokwasy, hydroksyprolina (28, 35) i hydroksylizyna (36) nie są bezpośrednio wbudowywane do łańcuchów peptydowych kolagenu. Ich obecność i zawartość w kolagenie nie jest determinowana przez m-RNA. Powstają one w wyniku hydroksylacji proliny i lizyny poprzednio wbudowanych do prekursorowej formy tego białka, zwanego protokolagenem (37). Na uwagę zasługuje fakt, iż nie występujący w przyrodzie izomer hydroksyproliny, 3,5 cis-hydroksyprolina wbudowuje się do kolagenu w miejscu przeznaczonym dla proliny, hamując w ten sposób inkorporację tego aminokwasu. Badania wykonane na izolowanej chrząstce zarodka kurzego wykazały, że ilość cis-hydroksyproliny wbudowanej do nowopowstającego kolagenu zwiększa się w miarę wzrostu stężenia tego izomeru w płynie inkubacyjnym. Przy zawartości 194  $\mu\text{g/ml}$  około 61% reszt prolinowych i transhydroksyprolinowych zostaje zastąpione przez cis-hydroksyprolinę. Obecność cis-hydroksyproliny w płynie inkubacyjnym nieznacznie tylko zmniejsza inkorporację innych aminokwasów do kolagenu. Kolagen syntetyzowany w obecności cis-hydroksyproliny ma prawidłowy ciężar cząsteczkowy, prolina i lizyna są prawidłowo hydroksylowane, a hydroksylizyna jest prawidłowo glikozylowana, natomiast wydzielanie

poza komórki powstałego w tych warunkach kolagenu jest wybitnie zmniejszone (38) z powodu niemożności osiągnięcia struktury potrójnej spirali (39).

Inkorporacja do protokolagenu w miejsce proliny jej analogów, jak kwas azetyldyno-2-karboksylowy (40, 41, 42, 43), 3-4 dehydroprolina (44) lub cis-4-fluoroprolina (42, 43) zmniejsza zawartość L-proliny w tym białku i hamuje hydroksylację zarówno proliny jak i lizyny. Wynikające stąd obniżenie zawartości hydroksylizyny pociąga za sobą spadek ilości hydroksylizynopochodnych glikozydów.

Trans-4,5-dehydrolizyna kompetycyjnie hamuje interakcję lizyny z transfer RNA. Inkubacja kości piszczelowej zarodka kurzego w środowisku zawierającym 4,6mM stężenie dehydrolizyny powoduje niemal całkowite zastąpienie lizyny przez jej analog w nowopowstającym kolagenu. 3-4 dehydrolizyna nie wpływa w istotny sposób na inkorporację innych aminokwasów ani nie hamuje procesu hydroksylacji proliny i lizyny. Ponieważ 4,5-dehydrolizyna nie podlega hydroksylacji ani glikozylacji, powstający w tych warunkach kolagen jest ubogi w hydroksylizynę i hydroksylizynopochodne glikozydy, zawiera natomiast prawidłową ilość trans-hydroksyproliny (45).

Kolagen zawierający wyżej wymienione analogi proliny i lizyny jest bardzo wolno wydzielany do przestrzeni pozakomórkowej (40, 42, 43, 44, 45).

Zastosowanie potężnego inhibitora procesu hydroksylacji protokolagenu,  $\alpha$ - $\alpha^1$  dwupirydyłu, umożliwiło izolację i bliższe poznanie prekursorowej postaci kolagenu (18, 46, 47). Krótkotrwałe działanie  $\alpha$ - $\alpha^1$  dwupirydyłu (do 90 min.) na fibroblasty izolowane ze ścięgien zarodka kurzego niemal całkowicie znosi hydroksylację protokolagenu i powoduje jego akumulację wewnątrz komórki, nie hamuje natomiast syntezy tego białka (47). Zniesienie hamowania przez dodanie jonów żelazawych umożliwia hydroksylację i prawidłowe wydzielanie nagromadzonego w komórce prekursora kolagenu (37). Przedłużone działanie inhibitora powoduje zmniejszenie inkorporacji aminokwasów do kolagenu prawdopodobnie na skutek zwrotnego hamowania jego syntezy przez nadmiar niehydroksylowanego prekursora. Nagromadzony protokolagen ulega wewnątrzkomórkowej degradacji, a produkty jego rozpadu przechodzą do przestrzeni pozakomórkowej (47).

Protokolagen posiada skład aminokwasowy podobny do kolagenu nie posiada jedynie hydroksyproliny i hydroksylizyny przy odpowiednio wyższej zawartości proliny i lizyny. Masa cząsteczkowa łańcuchów protokolagenu równa jest masie cząsteczkowej kolagenu wydzielanego do środowiska inkubacyjnego (46). Wyniki badań spektropolarymetrycznych protokolagenu (48) oraz jego zdolność do tworzenia agregatów pod działaniem ATP (47) wskazują, że białko to może występować w postaci potrójnej spirali. Struktura ta jest jednak nietrwała. Jak wiadomo kolagen natywny

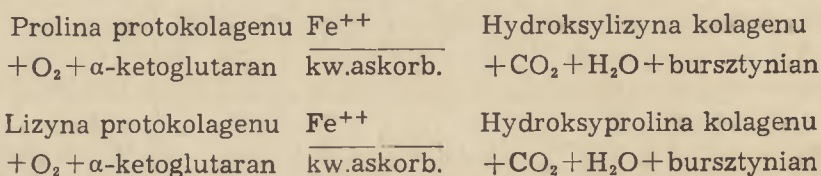
jest oporny na działanie nieswoistych proteaz co najmniej do temperatury 35°C, natomiast protokolagen jest już trawiony przez pepsynę w temperaturze niższej (49, 50). Spostrzeżenie to, uzupełnione wynikami badań spektropolarymetrycznych (48) wskazuje, iż „temperatura topnienia” protokolagenu wynosi 24°C, a zatem w temperaturze organizmu nie posiada on uporządkowanej struktury. Zjawisku temu przypisuje się istotne znaczenie biologiczne. Wykazano bowiem, że hydroksylacja zdenaturowanego termicznie protokolagenu jest ponad trzykrotnie wydajniejsza niż hydroksylacja protokolagenu występującego w formie potrójnego heliksu (51). Z badań Berga i Prockopa (46) wynika, że poniżej temp. 20°C, protokolagen w ogóle nie ulega hydroksylacji. Być może, iż niższa zawartość hydroksyproliny u zwierząt zmiennociepłych jest konsekwencją mniejszej podatności protokolagenu na hydroksylację przy niższych temperaturach organizmu. Część autorów uważa, że hydroksylacja protokolagenu zachodzi po odłączeniu łańcuchów polipeptydowych kolagenu od rybosomów (33, 47, 52, 53), natomiast badania innych wskazują na możliwość przynajmniej częściowej hydroksylacji na etapie rybosomalnym (54, 55). Wiadomo jednak, że hydroksylacja nie jest warunkiem niezbędnym do odłączenia nowopowstałego białka od rybosomu (53).

Niedobór cynku w diecie powoduje rozpad polisomów i obniżenie inkorporacji glicyny i proliny do łańcuchów kolagenowych skóry szczura o 30—50% (56).

### III. Hydroksylacja proliny i lizyny protokolagenu

Hydroksylacja protokolagenu zachodzi przy udziale dwu układów enzymatycznych, hydroksylazy proliny protokolagenu (E.C.1.14.11.2.) i hydroksylazy lizyny protokolagenu (E.C.1.14.11.4.). Ponieważ częściowo oczyszczone preparaty tych enzymów katalizują obydwie reakcje, a ponadto wymagają tych samych kofaktorów i kosubstratów (kwas askorbinowy,  $Fe^{++}$ ,  $\alpha$ -ketoglutaran i  $O_2$ ) do niedawna przypuszczano, że hydroksylacja proliny i lizyny zachodzi przy współudziale tego samego enzymu (37, 57). Wnikliwsze badania doprowadziły jednak do oddzielenia tych aktywności (58, 59).

Zarówno wolna prolina jak i wolna lizyna nie ulegają hydroksylacji. Do zajścia tej reakcji potrzebna jest odpowiednia długość łańcucha peptydowego i odpowiednia sekwencja aminokwasowa (53, 57, 58, 59). Przebieg procesu hydroksylacji można przedstawić sumarycznie następującym równaniem:



Proces hydroksylacji proliny protokolagenu został już wyczerpująco omówiony w innych pracach poglądowych (35, 60, 61, 62) i w niniejszym artykule zostaje pominięty.

W odróżnieniu od hydroksylazy proliny protokolagenu o hydroksylazie lizyny protokolagenu wiemy znacznie mniej. Badania wykonane przy użyciu syntetycznych substratów peptydowych o składzie aminokwasowym i ich sekwencji podobnych do tychże we fragmentach łańcuchów kolagenowych wykazały, że lizyna występująca w trójpeptydzie o sekwencji Lys-Gly-Pro nie ulega hydroksylacji, natomiast w trójpeptydzie o sekwencji Ile-Lys-Gly, proces ten zachodzi, jakkolwiek z niewielką wydajnością. Podwojenie długości łańcucha przy zachowaniu tej samej sekwencji (Ile-Lys-Gly)<sub>2</sub> zwiększa wydajność hydroksylacji ponad dziesięciokrotnie. Wydłużenie łańcucha peptydowego o fragment o przypadkowej sekwencji aminokwasowej również zwiększa wydajność hydroksylacji lizyny zawartej we fragmencie Ile-Lys-Gly- jednak w znacznie mniejszym stopniu, niż w przypadku przedłużenia peptydu o fragment zbliżony składem i sekwencją do kolagenu. Powinawactwo enzymu do sztucznego substratu rośnie przy wydłużeniu łańcucha z 12 do 21 reszt aminokwasowych; dalsze wydłużanie peptydu jest już bez wpływu (63).

Tabela 1.

Wpływ długości łańcucha peptydowego substratu na powinowactwo względem hydroksylazy lizyny protokolagenu (63)

	Stała Michaelisa (mM)
I Ala-Arg-Gly-Ile-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly	0,4
II Ala-Arg-Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg-Gly-(Pro-Pro-Gly) <sub>4</sub>	0,2
III (Pro-Pro-Gly) <sub>4</sub> Ala-Arg-Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg-Gly-(Pro-Pro-Gly) <sub>4</sub>	0,2

Peptyd II i III dodany do układu hydroksylującego, zawierającego protokolagen hamuje hydroksylację naturalnego substratu prawdopodobnie na drodze kompetycji o centrum aktywne enzymu (63).

Zdumiewające wyniki dały próby zastosowania kolagenu z *Ascaris* jako substratu do pomiaru aktywności hydroksylazy lizyny protokolagenu. Białko to zawiera niezwykle mało hydroksyproliny (16 reszt HyPro/1000 reszt aminokwasowych) i jest całkowicie wolne od hydroksylizyny. Wykazuje ono równocześnie wyższą od przeciętnie spotykanych zawartość proliny i lizyny. Kolagen pochodzący z tego źródła można było stosować z powodzeniem jako substrat do oznaczania hydroksylazy proliny protokolagenu, natomiast zawarta w nim lizyna okazała się całkowicie oporna

na enzymatyczną hydroksylację. Przyczynę tego zjawiska upatruje się w odmiennej sekwencji aminokwasowej tego typu kolagenu występującej w bezpośrednim sąsiedztwie lizyny (63).

Powyższe obserwacje zestawione z wynikami badań nad sekwencją aminokwasów w kolagenie wskazują, że hydroksylacji ulega jedynie lizyna poprzedzająca glicynę, a wydajność tego procesu zależy od składu długości i sekwencji aminokwasowej łańcucha peptydowego.

Obserwacje dokonane przez K i v i r i k o i wsp. (63) wskazują, że na wydajność procesu hydroksylacji lizyny wpływa nie tylko kolejność aminokwasów w bezpośrednim sąsiedztwie podlegającej hydroksylacji lizyny, ale również w miejscach od niej odległych. Jedynie tym można tłumaczyć dwukrotnie niższą zawartość hydroksylizyny w łańcuchu  $\alpha_1$  niż w łańcuchu  $\alpha_2$  oraz szczególną oporność na hydroksylację jednego z fragmentów łańcucha  $\alpha_1$  peptydu  $\alpha_1$  (CB-8-HA-1) 99 aminokwasowego peptydu uzyskanego przez rozkład łańcucha bromocyanem.

Stopień hydroksylacji lizyny protokolagenu jest uzależniony od wieku zwierzęcia. Badania B a r n e s a i wsp. (64) wykazały, że w tkankach zarodka kurzego hydroksylacji ulega dwukrotnie więcej lizyny protokolagenu niż w tkankach osobnika dojrzałego. Zjawisko to dotyczy w równym stopniu łańcucha  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ .

Stopień hydroksylacji lizyny występującej w obrębie telepeptydów jest jeszcze bardziej zróżnicowany zależnie od okresu rozwoju osobniczego. W kolagenie skóry 14-dniowego zarodka kurzego 48—62% lizyny telepeptydów ulega hydroksylacji. W dalszych etapach rozwoju następuje spadek zdolności tkanki skórnej do hydroksylacji reszt lizylowych telopeptydów, aż do całkowitego zaniku tej zdolności u 3-tygodniowego kurczęcia. W kolagenie ścięgien stopień hydroksylacji lizyny telopeptydów maleje o około 50%, a w kolagenie kości nie zaobserwowano istotnych zmian zawartości hydroksylizyny w trakcie rozwoju osobniczego kurczęcia (64).

Brak zależności ilościowej pomiędzy stopniem hydroksylacji lizyny w telopeptydach i w pozostałych częściach łańcucha pozwala przypuszczać, że hydroksylacja lizyny telopeptydów zachodzi przy udziale odrębnego enzymu (64).

Inkubacja kolagenu z hydroksylazą lizynową w obecności niezbędnych do jej działania kofaktorów wywołuje hydroksylację dodatkowych reszt lizylowych. W przypadku użycia jako substratu natywnego kolagenu przyrost produktu reakcji był znikomy, natomiast w zdenaturowanym termicznie substracie zawartość reszt hydroksylizylowych ulegała podwojeniu. Dodatkowa hydroksylacja reszt prolilowych w zdenaturowanym termicznie kolagenie jest również możliwa, lecz przebiega ze znacznie mniejszą wydajnością (65).

Powyższe spostrzeżenia utwierdzają w przekonaniu, że hydroksylacja zachodzi łatwiej, gdy substrat nie posiada uporządkowanej struktury. Pro-

tokolagen występujący w komórce w postaci przypadkowo zwiniętych łańcuchów ulega łatwo temu procesowi, a po przekształceniu się określonej liczby reszt proliny i lizyny w odpowiednie hydroksyaminokwasy, przyjmuje strukturę potrójnej spirali, co z kolei hamuje dalszą jego hydroksylację (65).

O ile zawartość hydroksyproliny w kolagenie pochodzącym z różnych narządów różnych gatunków zwierząt wyższych jest dość stała i wynosi od 92 do 100 reszt na jeden łańcuch  $\alpha$ , to zawartość hydroksylizyny jest bardziej zróżnicowana i waha się od 5 do 40 reszt na jeden łańcuch (63, 64, 65, 66, 67, 68).

Zróżnicowanie zawartości hydroksylizyny w kolagenach różnego pochodzenia może być konsekwencją niejednakowej zawartości hydroksylazy i jej kofaktorów w tkankach oraz zależności wydajności procesu od sekwencji aminokwasów substratu (65).

Badania Toole'a i wsp. (69) oraz Barnesa i wsp. (70, 71) wykazały, że niedobór wapnia w tkankach spowodowany awitaminozą D lub niedoborem tego pierwiastka w pożywieniu powoduje wzrost hydroksylacji lizyny kolagenu kostnego o 50—70%. Odpowiada to 5 dodatkowym resztom hydroksylizyłowym w łańcuchu  $\alpha_1$  i 6—7 resztom w łańcuchu  $\alpha_2$ . Wzrost zawartości hydroksylizyny w kolagenie skóry jest znacznie mniejszy i dotyczy wyłącznie łańcucha  $\alpha_1$  (1—2 dodatkowe reszty HyLys na 1 łańcuch  $\alpha_1$ ). Mechanizm tego zjawiska nie został wyjaśniony. Przypuszczano, że zjawisko to ma związek z nadczynnością przytarczyc, towarzyszącą niedoborowi wapnia. Okazało się jednak, że usunięcie tych gruczołów pozostaje bez wpływu na hydroksylację lizyny (71).

Krane i wsp. (72) opisali 2 przypadki wrodzonego defektu enzymatycznego, polegającego na niedoborze hydroksylazy lizyny protokolagenu, uniemożliwiający hydroksylację odpowiedniej ilości reszt lizylowych. Klinicznymi objawami tego schorzenia były skrzywienia kręgosłupa, skłonność do zwichnięć stawów, nadmierna rozciągliwość skóry i upośledzone bliznowacenie ran.

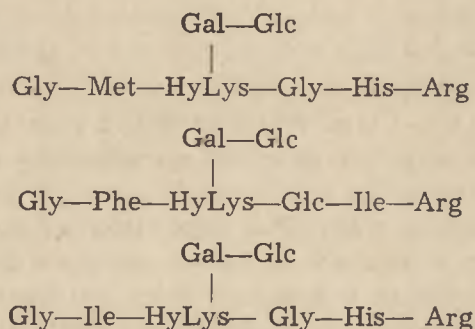
#### IV. Glikozylacja reszt hydroksylizylowych

Grupa OH hydroksylizyny jest miejscem wiązania składników cukrowych galaktozy i galaktozyloglukozy. Drugi z nich powstaje przez przyłączenie glukozy do już uprzednio wbudowanej galaktozy (73, 74).

W tkance łącznej wykazano obecność swoistych transferaz, galaktozylo-transferazy: UDP-galaktoza-kolagen (E.C.2.4.1.50.) i glukozylo-transferazy: UDP-glukoza-kolagen (E.C.2.4.1.66.), katalizujących syntezę tych połączeń. Enzymy te wykazują swoistość względem hydroksylizyny. Obydwa są związane z błonami komórkowymi i do czynności katalitycznej wymagają jonów manganu (75, 76, 77, 78).

Wiązanie galaktozy z hydroksylizyną jest typu  $\beta$ -glikozydowego, natomiast glukoza łączy się z galaktozą wiązaniem  $\alpha$ -1-2-O-glikozydowym. Obecność grupy  $\epsilon$ -aminowej lizyny w bezpośrednim sąsiedztwie pierwszego wiązania czyni je wyjątkowo opornym na działanie glikozydaz (79).

Nie wszystkie reszty hydroksylizylowe są jednakowo podatne na glikozylację. Część z nich w ogóle nie wiąże się z cukrowcem, inne tylko z galaktozą, jeszcze inne za pośrednictwem galaktozy wiążą glukozę. Decyduje o tym sekwencja aminokwasów występujących w sąsiedztwie hydroksylizyny. Na przykładzie kolagenu z trzech różnych źródeł wykazano, że glikozylacji ulegają są reszty hydroksylizylowe w miejscach o następującej sekwencji aminokwasowej:



Prawdopodobnie obecność argininy stanowi czynnik decydujący o glikozylacji poprzedzającej ją hydroksylizynę (80).

Zawartość hydroksylizynopochodnych glikozydów w kolagenie wykazuje daleko idące zróżnicowanie gatunkowe i narządowe (81, 82), wiąże się to prawdopodobnie z różną aktywnością glikozylo-transferaz.

Badania nad względną zawartością obydwu glikozydów w chrząstce embrionu kurzego na kolejnych etapach rozwoju wykazały, że we wczesnym okresie zawartość galaktozylohydroksylizyny przeważa znacznie nad ilością glukozylogalaktozylohydroksylizyny. Wybitny wzrost aktywności Glc-transferazy w ósmym dniu rozwoju zarodkowego powoduje natychmiastowe przesunięcie równowagi na korzyść drugiego z glikozydów. Dalsze badania wykazały, iż proces glikozylacji hydroksylizyny jest bardzo podatny na oddziaływanie czynników hormonalnych. Obecność tyroksyny, trójiodotyroniny, kortyzolu lub hormonu wzrostowego hamuje przejście Gal-MyLys w Glc-Gal-HyLys utrzymując stosunek tych glikozydów na poziomie charakterystycznym dla wczesnego etapu rozwoju embrionalnego (83).

Hyperglikemia cukrzycowa sprzyja nadmiernej glikozylacji kolagenu naczyń krwionośnych co zmniejsza jego podatność na degradację metaboliczną, a w konsekwencji prowadzi do nadmiernej akumulacji tego białka i patologicznego zwiększenia grubości błon podstawowych drobnych naczyń krwionośnych (84, 85, 86).



## V. Transport kolagenu poza obręb komórki syntetyzującej

Bariera komórkowa chroni protokolagen przed wydzieleniem poza obręb komórki. Do pokonania tej bariery potrzebna jest obecność określonej ilości reszt hydroksyprolilowych. Dzięki temu mechanizmowi kolagen z różnych źródeł zawiera podobną ilość hydroksyproliny (87). Zahamowanie procesu hydroksylacji proliny i lizyny przez zastosowanie swoistych inhibitorów tego procesu lub zastąpienie proliny kolagenu przez nie ulegające hydroksylacji analogi tego aminokwasu powoduje wewnątrzkomórkową akumulację protokolagenu (38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93). W przypadku zahamowania hydroksylacji protokolagenu przez  $\alpha$ ,  $\alpha'$  dwupirydył do przestrzeni pozakomórkowej przechodzą jedynie produkty rozpadu tego białka (47, 88).

J i m e n e z i wsp. (49) sugerują, iż gotowość kolagenu do wydzielenia przez komórkę nie zależy bezpośrednio od osiągnięcia określonej liczby hydroksyproliny lecz od zmian konformacji nowopowstałego kolagenu zachodzących w następstwie procesów hydroksylacji. Jak wynika z badań opisanych w poprzednim rozdziale, protokolagen w temperaturze organizmu nie tworzy potrójnego heliksu (48, 49, 50). Przestrzenna forma łańcuchów protokolagenowych odpowiada strukturze kolagenu zdenaturowanego, podatnego na proteolizę nieswoistymi proteazami. Pojawienie się odpowiedniej liczby reszt hydroksyprolilowych umożliwia powstawanie typowej dla kolagenu struktury potrójnej spirali chroniącej przed wewnątrzkomórkową proteolizą i umożliwiającą pokonanie bariery komórkowej (49, 80, 94). Osiągnięcie uporządkowanej struktury potrójnej spirali ma być czynnikiem bezpośrednio decydującym o gotowości kolagenu do opuszczenia komórki. Wprowadzenie do kolagenu analogów proliny uniemożliwia osiągnięcie odpowiedniej liczby reszt hydroksyprolinowych i przyjęcie wyżej wymienionej struktury, a w konsekwencji powoduje wewnątrzkomórkową retencję i degradację nowopowstałego białka.

Ciekawy pogląd na mechanizm transportu glikoproteidów, w tym również i kolagenu, reprezentuje E y l a r (95). Według jego poglądu gotowość kolagenu do wydzielenia przez komórkę zależy od osiągnięcia odpowiedniego stopnia glikozylacji reszt hydroksylizynowych. Hipoteza ta opiera się na spostrzeżeniu, że żadne ze znanych białek wewnątrzkomórkowych nie zawiera w swoim składzie komponent cukrowych, natomiast 97 spośród 112 białek pozakomórkowych zawiera jedną lub więcej reszt heksozowych integralnie z nimi związanych. Być może komórka rozróżnia białko znakowane heksozą jako kwalifikujące się do wydzielania.

Wyniki badań mikroskopowych wskazywały na możliwość kilku sposobów transportu kolagenu do przestrzeni pozakomórkowej. Rozstrzygające znaczenie w tym względzie wydają się mieć badania D i e g e l m a n a i P e t r k o f s k i e g o (96) oraz D e h m a i P r o c k o p a (97), którzy wykazali, że kolchicina, kolcemid i winoblastyna, alkaloidy uszkadzające

strukturę mikrotubuli błon komórkowych, znacznie hamują wydzielanie nowopowstałego kolagenu z komórek kości czołowej zarodka kurzego i fibroblastów mysich nie mając wpływu na proces hydroksylacji. Ponieważ podobny efekt wywierają te alkaloidy na transport hormonów z komórek tarczycy, insuliny z wysepek Langerhansa, histaminy z komórek tucznych, ziaren melaniny z melanocytów oraz amin z komórek nerwowych, można przypuszczać, iż transport kolagenu podobnie jak i wyżej wymienionych substancji zachodzi systemem merkorinowym. Białko to jest transportowane w pęcherzykach przez układ mikrotubuli do powierzchni błony komórkowej. Błona pęcherzyka zlewa się ze ścianą komórki uwalniając jego zawartość do przestrzeni pozakomórkowej (96).

Kolagen wydzielany poza obręb komórki nazywamy prokolagenem lub transportową formą kolagenu (66, 98, 99—106). Łańcuchy prokolagenu są dłuższe w porównaniu z łańcuchami tropokolagenu od strony N-końca (106, 107, 108) o dodatkowy peptyd bogaty w aminokwasy kwaśne, nadające temu białku charakter aninowy (100, 101). Nie jest wykluczone, że ten dodatkowy fragment peptydowy ulega syntezie na innym rybosomie (98). Uważa się, że rola tego fragmentu polega na ułatwianiu tworzenia struktury potrójnej spirali, na zapobieganiu wewnątrzkomórkowej fibrogenzie oraz na ułatwieniu transportu kolagenu z komórki (98). W przestrzeni międzykomórkowej następuje proteolityczne odszczepienie transportującego fragmentu przez peptydazę prokolagenu i uwolnienie tropokolagenu (65, 109, 110).

Upośledzenie procesu konwersji prokolagenu w kolagen, uniemożliwiająca prawidłową fibrogenzę obserwowano w przypadkach dermatosperaktozy u bydła. Schorzenie to objawia się wybitnie wzmożoną kruchością skóry. Jak wykazały badania Lapière'a i wsp. (106—108, 111, 112) stan ten jest spowodowany wrodzonym niedoborem peptydazy prokolagenu. Podobną anomalię metaboliczną zaobserwowano u pacjentów z pewną postacią zespołu Ehlersa-Danlosa (113).

Prokolagen będzie przedmiotem oddzielnego artykułu pogładowego (114).

## VI. Powstawanie włókien kolagenowych

Powstawanie włókien kolagenowych zwane fibrogenzą zachodzi w przestrzeni międzykomórkowej.

W procesie tym uczestniczą glukozaaminoglikany, proteoglikany i glikoproteidy tkanki łącznej. Substancje te ułatwiają polimeryzację cząsteczek tropokolagenu i stabilizują strukturę włókien kolagenowych (115—125). Natury połączeń tropokolagenu z wymienionymi komponentami tkanki łącznej nie znamy dotąd dokładnie. Badania Öbrinka (118, 125, 126) sugerują, iż połączenia takie mogą zachodzić na drodze oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanym tropokolagenem a gluko-

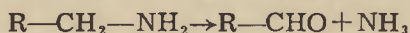
zaminoglikanami i proteoglikanami będącymi nośnikami ładunków ujemnych. Badania przeprowadzone *in vitro* wskazują, że tropokolagen wiąże się z siarczanem chondroityny, siarczanem dermatanu, z siarczanem heparanu i proteoglikanami zawierającymi siarczan chondroityny. Powstałe kompleksy rozpadają się przy wzroście siły jonowej roztworu, co przema-  
wia za elektrostatycznym charakterem tych połączeń. Polisacharydy, które zawierają kwas L-iduronowy wykazują silniejszą interakcję z tropokola-  
genem niż polisacharydy zawierające tylko kwas D-glukoronowy. Inter-  
akcja polisacharydów z tropokolagenem zwiększa się w miarę wzrostu  
długości łańcucha i ładunku polisacharydu. Za wiązanie proteoglikanu  
z kolagenem odpowiedzialny jest składnik polisacharydowy (126).

Warunkiem interakcji polisacharydu z tropokolagenem jest obecność  
w nim co najmniej dwu ujemnie naładowanych grup w przeliczeniu na  
jeden fragment dwucukrowy, np. grupy siarczanowej i reszty kwasu hek-  
suronowego. Substancje cukrowcowe nie spełniające tego warunku, jak np.  
kwas hialuronowy lub siarczan keratanu, nie wiążą się z tropokolage-  
nem (126).

W chrząstce żebrowej człowieka wykazano obecność trwałych połączeń  
proteoglikanów z kolagenem nie dających się rozerwać przez ekstrakcję  
roztworami soli. Nawet po strawieniu kolagenu kolagenazą, uwolnione pro-  
teoglikany zawierały znaczne ilości hydroksyproliny nie dające się od-  
dzielić na drodze ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu, na drodze  
chromatografii ani przez działanie stężonych roztworów chlorowodoru  
guanidyny. Obserwacje te wskazują, iż proteoglikany mogą też tworzyć  
z kolagenem trwałe połączenia typu kowalencyjnego (123). Podobnego  
typu kompleksy może tworzyć kolagen z niektórymi glikoproteidami (120,  
127).

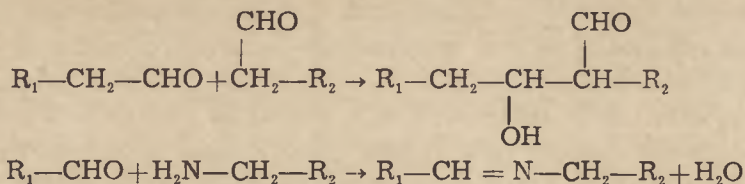
Strukturę włókien kolagenowych stabilizują kowalencyjne wiązanie  
poprzeczne tworzące się pomiędzy poszczególnymi łańcuchami tej samej  
cząsteczki tropokolagenu (wiązanie wewnątrzcząsteczkowe) oraz pomię-  
dzy łańcuchami sąsiadujących ze sobą cząstek tropokolagenu (wiązanie  
międzycząsteczkowe). Zagadnieniem tym zajmowało się wielu autorów,  
lecz wyniki ich prac nie dały jak dotąd jednolitego poglądu na charakter  
tych wiązań. Na istnienie niektórych typów proponowanych połączeń nie  
ma dotąd przekonujących dowodów (10, 11).

Najlepiej poznany i prawdopodobnie najważniejszym typem wiązań  
poprzecznych są połączenia wytwarzane przez pochodne lizyny. Pierwszym  
etapem w ich powstawaniu jest oksydacyjna dezaminacja grup ε-amino-  
wych lizyny z wytworzeniem peptydowo związanej δ-semialdehydu  
α-aminoadypinowego, zwanego allizyną (128, 129, 130, 131).



Aldehyd ten może reagować na drodze kondensacji aldolowej z cząsteczką  
allizyny wbudowaną do sąsiedniego łańcucha peptydowego lub może two-

rzyć połączenie typu zasady Schiffa z grupą ε-aminową lizyny lub hydroksylizyny należącej do innej cząsteczki białkowej. Zachodzące reakcje można przedstawić następującymi równaniami (87):



Z chrząstki embrionu kurzego wyizolowano enzym, oksydazę lizylową katalizującą wytwarzanie allizyny w kolagenie i w elastynie (132). Masa cząsteczkowa tego enzymu wynosi około 170.000. Niezbędnym kofaktorem reakcji utleniania grup ε-aminowych lizyny są jony miedziowe. Związanie  $\text{Cu}^{++}$  przez substancję chelatującą α,α'-dwupirydył niemal całkowicie znosi aktywność katalityczną oksydazy lizylowej. Jony żelazawe  $\text{Fe}^{++}$  i kobaltowe ( $\text{Co}^{++}$ ) częściowo przywracają aktywność tego enzymu. Inne kationy dwuwartościowe ( $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) oraz jon żelazowy ( $\text{Fe}^{+++}$ ) nie mają tej właściwości (132).

Nieodwracalnym inhibitorem oksydazy lizylowej jest β-aminopropionitryl — najsilniejszy ze znanych związków lityrogennych (inhibitor ten łączy się trwale z enzymem). Nie znamy charakteru tego połączenia, przypuszcza się jednak, że pewna analogia strukturalna β-aminopropionitrylu względem lizyny umożliwia związanie inhibitora z centrum aktywnym enzymu (133).

Zahamowanie aktywności oksydazy lizylowej w tkankach przez podanie substancji lityrogennych lub zmniejszenie podaży miedzi w pożywieniu prowadzi do upośledzenia tworzenia się wiązań poprzecznych, wzrostu rozpuszczalności kolagenu i wybitnego spadku jego wytrzymałości mechanicznej (134, 135, 136).

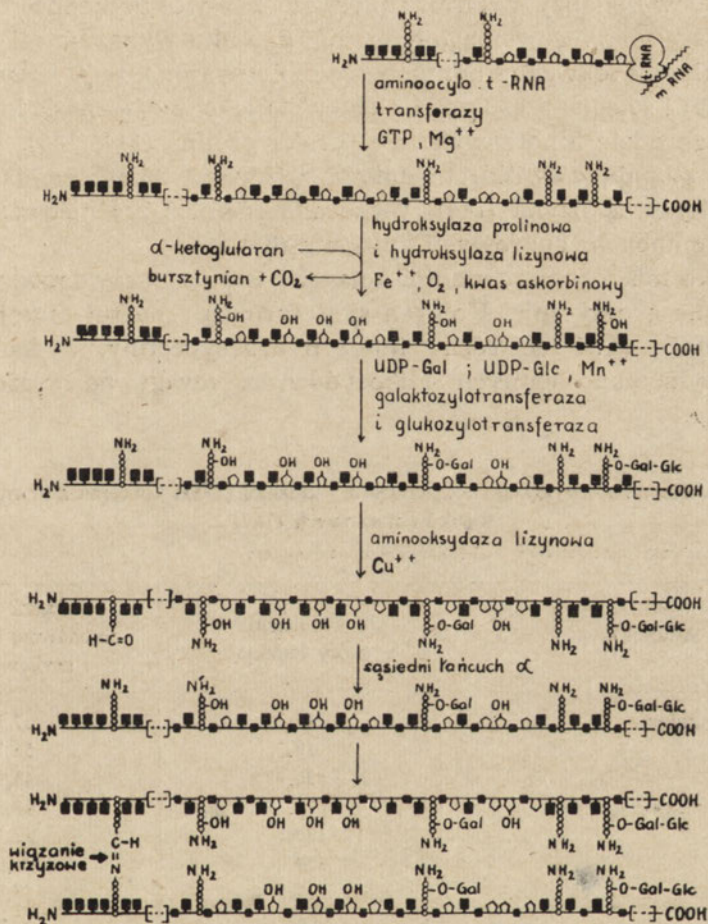
Podobne zjawisko wywołuje podanie zwierzęciu penicyliny. Wprawdzie nie hamuje ona procesu dezaminacji lizyny lecz wchodzi w połączenie z produktem tej reakcji uniemożliwiając udział powstałego aldehydu w tworzeniu się wiązań krzyżowych (137).

Doświadczenia wykonane na hodowlach fibroblastów ludzkich wskazują, że niemal cała aktywność oksydazy lizylowej znajduje się w pożywce. Obserwacje te sugerują, że dopiero po wydzieleniu do przestrzeni pozakomórkowej, enzym ten spełnia swą czynność katalityczną (138). Największą aktywność oksydazy lizylowej, podobnie jak i hydroksylazy proliny protokolagenu (139) obserwowano pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu hodowli fibroblastów. Najwyższa aktywność enzymów modyfikujących strukturę łańcuchów kolagenowych przypada w fibroblastach na okres najintensywniejszej syntezy tego białka (138).

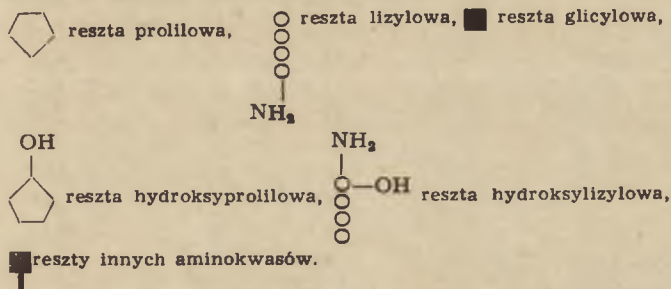
W niektórych chorobach tkanki łącznej, jak lattyryzm (140), zespół Marfana (141), zespół Ehlersa-Danlosa (142) obserwowano upośledzenie

procesu powstawania wiązań poprzecznych. Pociąga to za sobą osłabienie wytrzymałości mechanicznej kolagenu, objawiające się zmianami deformacyjnymi w obrębie narządów łącznotkankowych.

Nadmierną ilość wiązań poprzecznych zawiera kolagen chorych na sklerodermię (143). Kolagen taki staje się mniej podatny na proteolityczne



Ryc. 2. Schemat procesu biosyntezy kolagenu



działanie kolagenazy tkankowej, co w konsekwencji powoduje nadmierną akumulację tego białka w tkance podskórnej, w błonie podśluzowej przełyku, w mięśniu sercowym i w mięśniach szkieletowych.

## VII. Przyczyny heterogenności kolagenu

Szczegółowe analizy struktury pierwszorzędowej podjednostek kolagenu pochodzącego z tego samego narządu i gatunku wykazują mikroheterogenność składu i sekwencji aminokwasów. Zauważono, że w kolagenie skóry szczurzej i ścięgni szczurzego niektóre łańcuchy  $\alpha_1$  — posiadają prolinę w miejscach gdzie inne zawierają hydroksyprolinę (114, 145). W jeszcze większym stopniu zjawisko to dotyczy hydroksylizyny, zamiast której może występować lizyna (146). Wykazano również zróżnicowanie w zawartości komponent cukrowych kolagenu (83).

Zjawisko mikroheterogenności kolagenu nie jest prawdopodobnie zeterminowane genetycznie. Kolagen syntetyzowany na tej samej matrycy m-RNA może zawierać różne ilości hydroksyproliny, hydroksylizyny i hydroksylizynopochodnych glikozydów, z uwagi na zróżnicowanie

Tabela 2

Porównanie składu aminokwasowego kolagenu skóry ludzkiej (155) i kolagenu z błony podstawnej kłębków nerkowych (147)

Ilość reszt poszczególnych aminokwasów na 1000 reszt aminokwasowych

Aminokwas	Kolagen skóry ludzkiej	Kolagen błony podstawnej kłębków nerkowych
Kwas asparaginowy	47,2	67,7
Treonina	18,3	36,7
Seryna	36,9	48,9
Kwas glutaminowy	77,7	98,3
Prolina	125,1	57,9
Glicyna	324,4	221,0
Alanina	114,5	59,8
Cysteina	śląd	22,8
Walina	24,5	35,6
Metionina	7,0	13,2
Izoleucyna	10,4	31,3
Leucyna	24,8	65,3
Tyrozyna	3,5	15,3
Fenylalanina	12,6	24,9
Lizyna	26,6	19,5
Histydyna	5,4	14,2
Arginina	49,0	38,0
Hydroksyprolina	90,9	103,5
Hydroksylizyna	5,9	26,1

aktywności hydroksylazy proliny i lizyny protokolagenu oraz UDP-Gal-transferazy i UDP-Glc-transferazy, a także ze względu na zróżnicowanie mechanizmów komórkowych regulujących wydzielanie nowopowstałego kolagenu (87).

Porównanie kolagenu pochodzącego z różnych gatunków zwierząt wyższych wykazuje niewielkie lecz istotne różnice w składzie aminokwasowym, co przypisuje się mutacjom genetycznym zachodzącym w procesie ewolucji (87).

Niektóre typy omawianego białka bardzo odbiegają swym składem aminokwasowym i właściwościami od typowego kolagenu. Należy do nich przede wszystkim kolagen z błony podstawnej kłębków nerkowych. Zawiera on znacznie mniejsze ilości glicyny i proliny przy znacznie wyższej zawartości hydroksyproliny, hydroksylizyny, aminokwasów siarkowych i aromatycznych (21, 147).

W chrząstce kurzej wykazano obecność tropokolagenu złożonego z trzech identycznych łańcuchów  $\alpha$  odbiegających swym składem od łańcuchów  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  kolagenu występującego w innych tkankach (148, 149).

Syntezę każdego z dwóch typów kolagenu kontroluje inny gen (87).

### VIII. Praktyczne aspekty postępu badań nad biosyntezą kolagenu

Jak wspomniano w poprzednich rozdziałach w wielu stanach chorobowych obserwuje się patologiczną syntezę kolagenu. Polega ona najczęściej na nadmiernej, niekontrolowanej produkcji tego białka, (marskość, (150, 151), nowotwory, (152)), na niedostatecznym wytwarzaniu wiązań poprzecznych (zespół Ehlersa-Danlosa, zespół Marfana, 141), lub ich nadmiernej ilości (sklerodermia, 143, 153). Wykrycie hamującego działania analogów proliny na syntezę kolagenu i poznanie substancji oddziaływujących na formowanie wiązań poprzecznych pozwala przypuszczać, iż związki tego typu będą mogły mieć zastosowanie w terapii schorzeń tkanki łącznej (87, 151, 154), w tym być może również chorób nowotworowych (152).

*Artykuł otrzymano 15.2.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 10.6.1974.*

### PIŚMIENNICTWO

1. Banga J., (1966) Structure and function of Elastin and Collagen, 105—118. Akademiai Kiado, Budapest.
2. Reich G., (1970) Kolagen. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa.
3. Skonieczna M., Sopata I., Wize J., Wojtecka-Łukasik E., (1968) *Post. Biochem.*, **14**, 85—104.
4. Piez K. A., Balian G., Glick E. M., Bernstein P., (1972) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 990—998.

5. Ramachandran G. N., (1967) w Structure of Collagen at the Molecular Level, Treatise on Collagen, tom 1, 103—184. Academic Press, New York.
6. Grant M. E., Prockop D. J., (1972) *New England J. Med.*, **286**, 194—199.
7. Veis A., Nawrot C. P., (1970) *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3910—3914.
8. Traub W., (1969) *J. Mol. Biol.*, **43**, 479—485.
9. Traub W., Yonath A., Segal D. M., (1969) *Nature*, **221**, 914—917.
10. Jeleńska M. M., (1971) *Post. Biochem.*, **17**, 137—149.
11. Piez K. A., (1968) *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 547—570.
12. Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S., (1963) *Biochemistry*, **2**, 58—66.
13. Nagai Y., Gross J., Piez K. A., (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 494—500.
14. Goldberg B., Green H., (1967) *J. Mol. Biol.*, **27**, 1—18.
15. Steinberg J., (1973) *J. Cell. Sci.*, **12**, 217—234.
16. Layman D. L., McGoodwin E. B., Martin G. R., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 454—458.
17. Green H., Goldberg B., (1964) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **117**, 258—261.
18. Kivirikko K. I., Prockop D. J., (1967) *Biochem. J.*, **102**, 432—442.
19. Peterson C. R., Fourman P., (1968) *Biochem. J.*, **109**, 101—106.
20. Carneiro J., Leblond C. P., (1955) *Exp. Cell. Res.* **18**, 291—300.
21. Kefalides N. A., (1968) *Biochemistry*, **7**, 3103—3112.
22. Hay E. D., Dodson J. W., (1973) *J. Cell. Biol.*, **57**, 190—213.
23. Klose J., Flickinger R. A., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 207—209.
24. Finerman G. A. M., Rosenberg L. E., (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 1487—1493.
25. Phang J. M., Finerman G. A. M., Singh B., Rosenberg L. E., Berman M., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **230**, 146—159.
26. Finerman G. M., Downing S., Rosenberg L. E., (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 1008—1015.
27. Stetten M. R., (1949) *J. Biol. Chem.*, **181**, 31—37.
28. Diegelman R. F., Bernstein L., Peterkofsky B., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 6514—6521.
29. Fernandez - Madrid F., (1967) *J. Cell. Biol.*, **33**, 27—42.
30. Gallop P. M., Blumenfeld O. O., Seifter S., (1967) *Treatise on Collagen*, tom 1, 185—206, Academic Press, New York.
31. Vuust J., Piez K. A., (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6201—6207.
32. Grant M. E., Prockop D. J., (1972) *New England J. Med.*, **286**, 242—249.
33. Manner G., Kreitsinger R. H., Gould B., Rich A., (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **134**, 411—429.
34. Fernandez - Madrid E., (1970) *Clin. Orthop.*, **68**, 163—181.
35. Rosenbloom J., (1971) *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 718—719.
36. Sinex F. M., VanSlyke D. D., (1955) *J. Biol. Chem.*, **216**, 245—250.
37. Prockop D. J., (1971) *Fed. Proc.*, **30**, 984—990.
38. Rosenbloom J., Prockop D. J., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1549—1555.
39. Uitto J., Dehm P., Prockop D. J., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 601—605.
40. Lane J. M., Dehm P., Prockop D. J., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 517—527.
41. Lane J. M., Parkers L. J., Prockop D. J., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **236** (3), 528—541.
42. Takeuchi T., Prockop D. J., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 142—155.
43. Takeuchi T., Rosenbloom J., Prockop D. J., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 156—164.
44. Rosenbloom J., Prockop D. J., (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 3361—3368.



45. Christner P. J., Rosenbloom J., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, (24) 7551—7556.
46. Berg R. A., Prockop D. J., (1973) *Biochemistry*, **12**, 3395—3401.
47. Jimenez S. A., Dehm P., Olsen B. R., Prockop D. J., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248** 725—729.
48. Berg R. A., Prockop D. J., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 115—120.
49. Jimenez S., Harsch M., Rosenbloom J., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 106—114.
50. Ramaley P. B., Jimenez S. A., Rosenbloom J., (1973) *FEBS Letters*, **33**, 187—191.
51. Murphy L., Rosenbloom J., (1973) *Biochem. J.*, **135**, 249—251.
52. Bachra B. N., van der Eb A. J., (1970) *Biochemistry*, **9**, 3001—3010.
53. Bhatanagar R. S., Prockop D. J., Rosenbloom J., (1967), *Science*, **158**, 492—494.
54. Lazarides E. L., Lukens L. N., Infante A. A., (1971) *J. Mol. Biol.*, **38**, 831—846.
55. Miller R. L., Udenfrind S., (1970) *Arch. Biochem. Biophys.*, **139**, 104—113.
56. McClain P. E., Wiley E. R., Beecher G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **304**, 457—465.
57. Bańkowski E., (1972) *Post. Hig. Med. Dośw.*, **26**, 207—223.
58. Weinstein E., Blumenkrantz N., Prockop D. J., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 745—750.
59. Miller R., (1971) *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 339—342.
60. Wojtecka-Łukasik E., (1966) *Post. Biochem.*, **12**, 235—242.
61. Sopata I., (1972) *Reumatologia*, **10**, 171—180.
62. Tomaszewski J., (1972) *Post. Biochem.*, **18**, 115—124.
63. Kivirikko K. I., Shudo K., Sakakibara S., Prockop D. J., (1972) *Biochemistry*, **11**, 123—129.
64. Barnes M. J., Constable B. J., Morton L. F., Royce P. M., (1974) *Biochem. J.*, **139**, 461—468.
65. Kivirikko K. I., Rysänen L., Anttinen H., Bornstein P., Prockop D. J., (1973) *Biochemistry*, **12**, 4966—4971.
66. Dehm P., Prockop D. J., (1973) *Eur. J. Biochem.*, **35**, 159—166.
67. Kefalides N. A., (1971) *Int. Rev. Exp. Path.*, **10**, 1—39.
68. Spiro R. G., Fukushi S., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2049—2058.
69. Toole B. P., Kang A. H., Trelsatd R. L., Gross J., (1972) *Biochem. J.*, **127**, 715—720.
70. Barnes M. J., Constable B. J., Morton L. F., Kodicek E., (1973) *Biochem. J.*, **132**, 113—115.
71. Barnes M. J., Constable B. J., Morton L. F., Kodicek E., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 373—382.
72. Krane S. M., Pinnell S. R., Erbe R. W., (1972) *Proc. Nat. Acad. USA*, **69**, 2899—2903.
73. Spiro R. C., (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 602—612.
74. Butler W. T., Cunningham L. W. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 3882—3888.
75. Bosmann H. B., Eylar E. H., (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 89—94.
76. Bosmann H. B., Eylar E. H., (1968) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 340—346.
77. Spiro R. C., Spiro M. J., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 4899—4909.
78. Spiro M. J., Spiro R. G., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 4910—4918.
79. Spiro R. G., (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 4813—4823.

80. Morgan P. H., Jacobs H. G., Segrest J. P., Cunningham L. W., (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 5042—5048.
81. Pinnell S. R., Dox R., Krane S. M., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 119—122.
82. Spiro R. G., Lucas F., Rudall K. M., (1971) *Nature, New Biology*, **231**, 54—56.
83. Blumenkrantz N., (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 461—466.
84. Siperstein M. D., Ungar R. H., Madison L. L., (1968) *J. Clin. Invest.*, **47**, 1973—1999.
85. Merimee T. J., Siperstein M. D., Hall J. D., Fineberg S. E., (1970) *J. Clin. Invest.*, **49**, 2161—2164.
86. Beisswenger P. J., Spiro R. G., (1970) *Science* **168**, 596—598.
87. Grant M. E., Prockop D. J., (1972) *New England J. Med.*, **286**, 291—300.
88. Hurych J., Chvapil M., Tichy M., Bieniĉ F., (1967) *Eur. J. Biochem.*, **3**, 242—247.
89. Ramsley P. B., Rosenbloom J., (1971) *FEBS Letters* **15**, 59—64.
90. Peterkofsky B., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1343—1350.
91. Ramsley P. B., Rosenbloom J., (1971) *FEBS Letters* **15**, 59—64.
92. Dehm P., Prockop D. J., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 358—369.
93. Bhatnagar R. S., Kivirikko K. I., Prockop D. J., (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 196—207.
94. Sakakibara S., Inouya K., Shudo K., Kinhida Y., Kobayashi Y., Prockop D. J., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **303**, 198—202.
95. Eylar E. H., (1966) *J. Theor. Biol.*, **10**, 89—113.
96. Diegelman R. F., Peterkofsky B., (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **69**, 892—896.
97. Dehm P., Prockop D. J., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **264**, 375—382.
98. Bellamy G., Bernstein P., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1138—1142.
99. Ramsley P. B., Rosenbloom J., (1971) *FEBS Letters* **15**, 59—64.
100. Church L. R., Pfeifer S. E., Tanzer M. L., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2638—2642.
101. Vuust J., Piez K. A., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 856—862.
102. Dehm P., Jiminez S. A., Olsen B. R., Prockop D. J., (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 60—64.
103. Burgeson B. E., Wyke A. U., Fessler J. H., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 892—897.
104. Bańkowski E., Mitchell W. M., (1972) *Fed. Proc.* **31**, 836—836.
105. Bańkowski E., Mitchell W. M., (1973) *Biophys. Chem.*, **1**, 73—86.
106. Lapiere Ch. M., Lenserz A., Kehn L. D., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 3054—3058.
107. Furthmayer H., Timpl R., Stark M., Lapiere Ch. M., Kühn K., (1972) *FEBS Letters* **28** (2) 247—250.
108. Bailey A. J., Lapiere Ch. M., (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 91—96.
109. Layman D. L., Ross R., (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**, 451—456.
110. Nernstein P., Ehrlich H. P., Wyke A. W., (1972) *Science*. **175**, 544—546.
111. Lenears A., Ansay M., Nusgens B. V., Lapiere Ch. M., (1971) *Eur. J. Biochem.*, **23**, 533—543.
112. Stark M., Lenaers A., Lapiere Ch. M., Kühn K., (1971) *FEBS Letters* **18**, 225—225.
113. Lichtenstein J. R., Martin G. R., Kohn L. D., Byers P. H., McKusick V. A., (1973) *Science*, **182**, 298—300.

114. Mazanowska A., (1975) *Post. Biochem.* 21 (w druku).
115. Lowther D. A., (1963) *Int. Rev. Connect. Tiss. Res.*, 4, 63—119, Academic Press, New York, London.
116. Toole B. P., Lowther D. A., (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, 128, 567—578.
117. Schofield J. D., Freeman I. L., Jackson D. S., (1971) *Biochem. J.*, 124, 467—473.
118. Obrink B., Wasteson A., (1971) *Biochem. J.*, 121, 227—233.
119. Podražky V., Steven F. S., Jackson D. S., Weiss J. B., Leibovich S. J., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 229, 690—697.
120. Anderson J. C., Jackson D. S. (1972) *Biochem. J.*, 127, 179—186.
121. Steven F. S., Broady K., Jackson D. S., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 175, 225—227.
122. Muthian P., Kühn K., Jackson D. S., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 304, 12—19.
123. Kobayashi T. K., Pedrini V., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 303, 148—160.
124. Tomaszewski J., (1973) *Post. Biochem.* 19, 447—469.
125. Öbrink B., Sundeföl L. O., (1973) *Eur. J. Biochem.*, 37, 226—232.
126. Öbrink B., (1973) *Eur. J. Biochem.*, 33, 387—400.
127. Bańkowski E., Ratkiewicz A., Gałasiński W., Rzczycki W., *Neoplasma* (w druku).
128. Tanzer M. L., (1965) *Int. Rev. Connect. Tissue Rev.*, 3, 91—112.
129. Bornstein P., (1970) *Am. J. Med.*, 49, 429—435.
130. Bailey A. J., Peach C. M., Fowler L. J., (1970) *Biochem. J.*, 117, 819—831.
131. Pinnel S. R., Martin G. R., (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 708—711.
132. Siegel R. S., Pinnel S. R., Martin G. R., (1970) *Biochemistry*, 9, 4486—4492.
133. Narsyanan A. S., Siegel R. C., Martin C. R., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 745—751.
134. Ruckar R. B., Parker H. E., Rogler J. C., (1969) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 34, 28—33.
135. Chou W. S., Savage J. E., Odell B. L., (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 5785—5789.
136. Carres W. H., (1971) *Fed. Proc.*, 30, 995—1000.
137. Deshmukh K., Nimni M. E., (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 1787—1795.
138. Gribble T. J., Comstock J. P., Udenfriend S., (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 308—316.
139. Leyman D. L., Narayanan A. S., Martin G. R., (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 149, 97—101.
140. Ardelt W., (1968) *Post. Biochem.* 14, 105—118.
141. Laitinen O., Uitto J., Iivabakhen M., Hannuksela M., Kivirikko K. J., (1968) *Clin. Chim. Acta*, 21, 321—326.
142. Mechanic G., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 267—272.
143. Herbert C. M., Lindberg K. A., Jayson M. J. V., Bailey M. J., (1974) *Lancet*, 1, 187—191.
144. Bornstein P., (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2572—2574.
145. Bornstein P., (1967) *Biochemistry*, 6, 3082—3093.
146. Butler W. T., (1968) *Science*, 161, 796—798.
147. Westberg N. C., Michael A. F., (1970) *Biochemistry*, 9, 3837—3846.
148. Miller E. J., Matukes V. J., (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 64, 1264—1268.
149. Miller E. J., (1971) *Biochemistry*, 10, 3030—3035.

150. Huberman A., Recic A., Rojkind M., (1969) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 131, 200—203.
151. Levene C. J., Bye I., Saffiotti U., (1968) *Brit. J. Exp. Path.*, 49, 152—159.
152. Sjoërdsma A., Udenfriend S., Keiser H., LeRoy E. C., (1965) *Ann. Int. Med.*, 63, 672—694.
153. Uitto J., Helia P., Rasmussen O., (1970) *Ann. Clin. Res.*, 2, 228—234.
154. Rojkind M., (1973) *J. Clin. Invest.*, 52, 2451—2456.
155. Fleischmajer R., Fishman L., (1965) *Nature*, 205, 264—266.

KRZYSZTOF WOROWSKI\*

## Podobieństwa strukturalne enzymów proteolitycznych

### Structure Similarities of Proteolytic Enzymes

Wiele homologicznych funkcjonalnie białek zwierzęcych wykazuje duże podobieństwa strukturalne. Podobieństwa takie występują między innymi w cząsteczkach insuliny, fibrynogenu, hemoglobiny, cytochromu c, kortykotropiny, a także w cząsteczkach wielu enzymów proteolitycznych.

Ustalenie podobieństwa struktury enzymów proteolitycznych ma istotne znaczenie w rozważaniach nad zależnością struktury i funkcji, w badaniach nad aktywacją proenzymów, mechanizmem wiązania substratu i rozszczepiania wiązań peptydowych oraz swoistością działania tych enzymów (1—3). Pozwala także na ustalenie pokrewieństwa genetycznego różnych zwierząt opartego na głębszych podstawach niż cechy morfologiczne. Z tego względu zagadnienia te są szeroko dyskutowane w literaturze dotyczącej biochemii ewolucyjnej (3—8).

Obecny stan badań nad strukturą pierwszorzędową enzymów proteolitycznych pozwala na dokonanie porównań struktury tylko niektórych z tych enzymów, a w wielu wypadkach porównanie to ogranicza się jedynie do poznanych dotąd jej fragmentów.

### I. Podobieństwa struktury pierwszorzędowej proteaz zwierzęcych

Podobieństwa struktury enzymów proteolitycznych pepsyny, renniny i gastryksyny dotyczą sekwencji aminokwasów N-końca cząsteczki, okolicy mostków dwusiarczkowych i C-końca cząsteczki (Tabela 1).

Z podobieństwem struktury wiąże się zapewne podobna swoistość substratowa i kwaśne optimum pH tych enzymów (12, 13).

Także trypsynogeny i trypsyny różnych zwierząt są do siebie pod wieloma względami bardzo podobne. Trypsynogen wołowy, wieprzowy i wielu innych zwierząt posiada podobną sekwencję aminokwasów w N-końcowym odcinku łańcucha polipeptydowego, który spełnia rolę maskującego peptydu. W tym obszarze cząsteczki trypsynogenu różnych zwierząt wy-

\* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Fizjologiczno-Biochemiczny, Akademia Medyczna, Białystok

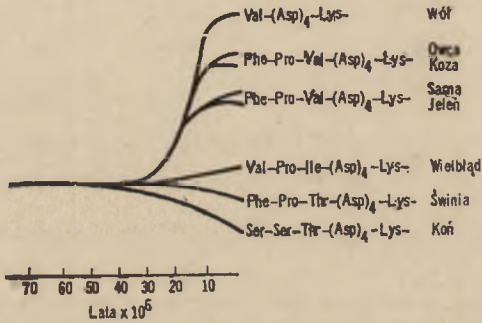
Tabela 1.

Porównanie sekwencji aminokwasów N- i C-końcowego odcinka cząsteczki oraz okolicy mostków dwusiarczkowych reniny wołu (R), pepsyny wieprza (P), pepsyny człowieka (Pc) i gastrynyksyny człowieka (G), (9, 10, 11)

Region cząsteczki	Enzym	Sekwencja aminokwasów
N-końiec	R	Gly—Glu—Val—Ala—Ser—Val—Pro—Leu—Thr—Asn—Tyr—
	P	—Ile—Glu—Asp—Glu—Pro—Leu—Glu—Asn—Tyr—
Mostki dwusiarczkowe	R	—Cys—Thr—Ser— —Cys—Glu—Gly—Gly—Cys—Gln
	P	—Cys— —Cys—Thr—Ser— —Cys—Ser—Gly—Gly—Cys—Glu
C-końiec	R	—Val—Phe—Asp—Arg—Ala—Asn—Asn—Leu—Val—Gly—Leu—Ala—Lys—Ala—Ile
	P	—Val—Phe—Asp—Arg—Ala—Asn—Asn—Lys—Val—Gyl—Leu—Ala—Pro—Val—Ala
	Pc	—Val—Phe—Asp—Arg—Ala—Asn—Asn—Gln—Val—Gly—Leu—Ala—Pro—Val—Ala
	G	—Gln—Phe—Tyr—Thr—Val—Phe—Asp—Arg—Ala—Asn—Asn—Lys—Glu—Gly—Leu—Ala—Pro—Val—Ala

stępuje identyczna sekwencja  $-(\text{Asp})_4\text{Lys}$ , ale dołączone do niej aminokwasy są różne (8, 11, 15—17). Grupy  $\beta$ -karboksylowe reszt kwasu asparaginowego tworzą wiązania jonowe i wodorowe z odległym miejscem łańcucha polipeptydowego cząsteczki i uniemożliwiają uformowanie się centrum aktywnego. Odłączenie maskującego peptydu w drodze ograniczonej proteolizy aktywuje proenzym (18).

Poznanie sekwencji aminokwasów maskującego peptydu trypsynogenu różnych zwierząt nie tylko potwierdziło rolę reszt kwasu asparaginowego w strukturze trypsynogenu, ale stanowi także dobrą ilustrację poglądów ewolucjonistów<sup>\*)</sup>, którzy zakładają, że ewolucja zachodziła w drodze mutacji i selekcji. Bricteux - Grégoire i wsp. (19) przedstawili hipotetyczny schemat zmian ewolucyjnych sekwencji aminokwasów N-końcowego fragmentu trypsynogenu, z uwzględnieniem danych paleontologicznych, co pozwala na określenie czasu ich pojawiania się. Jak wynika z ryciny 1, im bardziej organizmy są ze sobą spokrewnione i im później rozeszły się w drodze ewolucji, tym mniejsze są różnice w składzie i sekwencji aminokwasów tego odcinka struktury trypsynogenu.



Ryc. 1. Zmiany sekwencji aminokwasów N-końcowego odcinka łańcucha polipeptydowego trypsynogenu zachodzące w toku ewolucji, (19).

Zmiany sekwencji aminokwasów w N-końcowym odcinku trypsynogenu rozpoczęły się prawdopodobnie przed 70 milionami lat i spowodowane są niewątpliwie szeregiem mutacji punktowych. Zamiana seryny na fenyloalaninę i seryny na prolinę, stanowi różnicę między trypsynogenem konia i świni (Tablica 2). Jest ona następstwem wymiany dwóch trypletów UCX, od których zależy kodowanie seryny, na tryplet UUX kodujący fenyloalaninę i tryplet CCX kodujący prolinę.

Wymiana trypletu UUX kodującego fenyloalaninę na tryplet GUX kodujący walinę oraz trypletu ACX kodującego treoninę na tryplet AUX kodujący izoleucynę nastąpiła prawdopodobnie przy rozejściu się dróg rozwojowych świni i wielbłąda. Z porównania sekwencji aminokwasów

<sup>\*)</sup> Ewolucję białek omawia również artykuł M. Kochmana i A. Dżugaja w *Postęпах Biochemii* 19, 499, 1973.

trypsynogenu wielbłąda oraz jelenia, owcy i kozy wynika, że nastąpiła wymiana waliny na fenyloalaninę, będącą wynikiem zastąpienia trypletu GUX kodującego walinę na tryplet UUX kodujący fenyloalaninę oraz wymiana izoleucyny na walinę w wyniku zastąpienia trypletu AUX kodującego izoleucynę na tryplet GUX kodujący walinę. Również sekwencja aminokwasowa N-końcowego odcinka trypsynogenu psa morskiego (*Squalus acathias*), złożona z —Ala—Pro—(Asp)<sub>4</sub>—Lis—Ile— (20) jest podobna do wymienionych na rycinie 1. Najbardziej odmienną strukturę maskującego peptydu posiada trypsynogen ryby płucodysznej (*Protopterus aethiopicus*), posiadający sekwencję Phe—Pro—Ile—(Glu)<sub>2</sub>—Asp—Lis—Ile— (17) i prokokonaza jedwabnika, której sekwencja aminokwasów maskującego peptydu jest następująca: (Lis)<sub>2</sub>—Tre—Pro—Gln—Arg—The—Gln—(Asp)<sub>2</sub>—Gly—Gly—Lis—Ile— (21, 22).

Tabela 2.

Mechanizm zmian sekwencji aminokwasów N-końcowego odcinka łańcucha polipeptydowego trypsynogenu na poziomie kodu genetycznego, (16)

Aminokwas	Kodon	Gatunek zwierzęcia
Ser—Ser—Thr	UCX—UCX—ACX	koń
↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	
Phe—Pro—Thr	UUX—CCX—ACX	świnia
↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	
Val—Pro—Ile	GUX—CCX—AUX	wielbłąd
↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	
Phe—Pro—Val	UUX—CCX—GUX	jeleń, owca, koza
↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	
Val	GUX	wół

Także trypsyny różnych zwierząt wykazują duże podobieństwo. I tak skład aminokwasowy trypsyny kozy, sarny, jelenia i wielbłąda (19), psa morskiego (20), wołu (23), świni (24), owcy (25), indyka (26), raka rzecznoego (27), kraba (28), krewetki (29) i jamochłonu *Renilla reniformis* (30) jest bardzo podobny. Trypsyny wymienionych zwierząt charakteryzują się dużą zawartością kwasu asparaginowego i jego amidu, seryny i glicyny oraz identycznością sekwencji aminokwasów wokół seryny centrum aktywnego (31).

Również chymotrypsynogeny i chymotrypsyny różnych zwierząt wykazują znaczne podobieństwo struktury. Sekwencja aminokwasów N-końcowego odcinka chymotrypsynogenu A, B i C wołu i świni jest prawie identyczna (Tabela 3).

Mechanizm aktywacji wyszczególnionych w tablicy chymotrypsynogenów jest również identyczny. Polega on na rozszczepieniu przez trypsynę wiązania peptydowego utworzonego przez grupę karboksylową argininy znajdującej się w pozycji 15.



Sekwencja aminokwasów N-końcowego odcinka łańcucha polipeptydowego różnych chymotrypsynogenów (32,33)

Gatunek	Chymotrypsynogen	Sekwencja aminokwasów N-końca
Wół	A	Cys—Gly—Val—Pro—Ala—Ile—Gln—Pro—Val—Leu—Ser—Gly—Leu—Ser—Arg—Ile—Val—
	B	Cys—Gly—Val—Pro—Ala—Ile—Gln—Pro—Val—Leu—Ser—Gly—Leu—Ala—Arg—Ile—Val—
	C	Cys—Gly—Val—Pro—Ile—Phe—Gln—Pro—Asn—Leu—Ser—Ala—Arg—Val—
Świnia	A	Cys—Gly—Val—Pro—Ala—Ile—Pro—Val—Leu—Ser—Gly—Leu—Ser—Arg—Ile—Val—
	B	Cys—Gly—Val—Pro—Ala—Ile—Pro—Val—Leu—Ser—Gly—Leu—Ser—Arg—Ile—Val—
	C	Cys—Gly—Val—Pro—Ser—Phe—Pro—Pro—Asn—Leu—Ser—Ala—Arg—Val—Val—

Stwierdzono liczne podobieństwa trypsynogenów i chymotrypsynogenów różnych zwierząt. Dotyczą one zarówno składu aminokwasowego jak i sekwencji aminokwasów (5, 34—41). Z 229 aminokwasów trypsynogenu wołu, aż 101 reszt aminokwasowych usytuowanych jest identycznie również w chymotrypsynogenie A wołu, a stanowi to 44<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wszystkich aminokwasów. Liczba i położenie aminokwasów decydujących o konformacji trypsynogenu i chymotrypsynogenu (proliny, glicyny, cysteiny i mostków dwusiarczowych) jest także bardzo podobna (42). Z 8 reszt proliny trypsynogenu aż 6 zajmuje podobne pozycje jak w chymotrypsynogenie, a z 25 reszt glicyny pierwszego z proenzymów, aż 22 reszty są zlokalizowane w podobnych pozycjach w drugim. Trypsynogen posiada 12 reszt cysteiny i 6 mostków dwusiarczowych, a chymotrypsynogen 10 reszt cysteiny i 5 mostków dwusiarczowych. W obu proenzymach mostki te występują w podobnych pozycjach i podobne jest wokół nich ułożenie aminokwasów. Zarówno trypsyna jak i chymotrypsyna powstają z nieczynnych prekursorów na drodze ograniczonej proteolizy. W obu przypadkach powstaje nowy N-końcowy aminokwas, którym jest izoleucyna. Obydwa enzymy zaczynają się identycznym dwupeptydem —Ile—Val—, posiadają identyczny aminokwas C-końcowy, którym jest asparagina i centrum aktywne zbudowane z tych samych aminokwasów, a mianowicie z seryny, histydyny i izoleucyny. Seryna centrum aktywnego znajduje się w identycznych pozycjach w obu proenzymach. W obu proenzymach w bezpośrednim pobliżu histydyny centrum aktywnego występuje mostek dwusiarczowy. Bardzo podobna jest również sekwencja aminokwasów wokół aminokwasów tworzących centrum aktywne tych enzymów.

Stwierdzono także znaczne podobieństwo składu aminokwasowego i sekwencji aminokwasów N-końcowego odcinka trombiny człowieka i wołu (43, 44) oraz okolicy centrum aktywnego karboksypeptydazy A i B wołu (45) i C-końca cząsteczki tych enzymów (46).

Kokonazy z jedwabników różnych odmian wykazują także wiele istotnych podobieństw (22), jak mapy peptydowe trypsynowego hydrolizatu, uzyskane techniką elektrochromatografii (47). Proenzymy kokonaz posiadają identyczną sekwencję aminokwasową N-końcowego odcinka łańcucha polipeptydowego. Skład aminokwasowy oraz ciężary cząsteczkowe kokonaz są również bardzo podobne.

## II. Podobieństwa struktury pierwszorzędowej proteaz roślinnych

Proteolityczne enzymy roślinne, takie jak bromelina zawarta w owocach *Ananas comosus*, papaina otrzymywana z lateksu drzewa *Carica* i ficyna występująca w lateksie *Ficus carica* posiadają też zbliżoną struk-

ture. W centrum aktywnym wymienionych enzymów występują grupy -SH cysteiny. Związki sulfhydrylowe aktywują te enzymy, a hamuje je jodoacetamid i p-chlorortęciobenzoesan. Sekwencja aminokwasów wokół cysteiny centrum aktywnego jest także bardzo podobna (Tabela 4). Ponadto mają one zbliżone ciężary cząsteczkowe, punkty izoelektryczne oraz podobną specyficzność substratową (51).

Tabela 4.

Podobieństwa sekwencji aminokwasów okolicy cysteiny centrum aktywnego roślinnych proteaz sulfhydrylowych

Enzym	Sekwencja aminokwasów
Bromelina (48)	—Ans—Gln—Asp—Pro—Cys—Gly—Ala—Cys*—Try—
Papaina (49)	—Asn—Gln—Gly—Ser—Cys—Gly—Ser—Cys*—Try—
Ficyna (50)	—Gln—Gln—Gly—Gln—Cys—Gly—Ser—Cys*—Try—

Gwiazdką oznaczono cysteinę centrum aktywnego.

### III. Podobieństwa struktury proteaz z drobnoustrojów

Wykazano znaczne podobieństwa struktury pierwszorzędowej proteaz z drobnoustrojów różnych szczepów rodzaju *Bacillus*. Jako przykład służyć mogą subtilizyna BPN' z *B. amyloliquefaciens* i subtilizyna Carlsberg z *B. subtilis* w których strukturze 70% aminokwasów występuje w analogicznych sekwencjach (52, 53). Centrum aktywne tych enzymów stanowi Ser<sub>221</sub>, His<sub>64</sub> i Asp<sub>32</sub>, w których otoczeniu znajdują się również podobne aminokwasy. Struktura przestrzenna subtilizyn o różnym pochodzeniu jest również bardzo zbliżona (54, 55).

Zasadowe proteazy izolowane z przesączu hodowli pleśni rodzaju *Aspergillus* również posiadają serynowe centra aktywne, identyczną sekwencję aminokwasów wokół niego złożoną z —Gly—The—Ser\*—Met—Ala—, są inhibowane dwuizopropylodifluorofosforanem, ich ciężary cząsteczkowe zawierają się w zakresie 20 000—22 000, wykazują podobną swoistość substratową i w większości nie posiadają w strukturze cysteiny i mostków dwusiarczkowych (56). Z porównania składu aminokwasowego enzymów z *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. sojae* i *A. sulphureus* wynika, że zawierają one dużą ilość reszt asparaginy i kwasu asparaginowego, seryny, glicyny i alaniny, a nie zawierają cysteiny (57). Mapy peptydowe jak również liczba reszt aminokwasowych w cząsteczkach tych enzymów jest prawie identyczna.

#### IV. Podobieństwa struktury niektórych enzymów proteolitycznych organizmów odległych genetycznie

W cząsteczkach proteolitycznych enzymów z organizmów zaliczanych do odległych ewolucyjnie gatunków stwierdzono w wielu przypadkach podobieństwo struktury (Tabela 5).

Proteazy zwierzęce i niektóre proteazy drobnoustrojów posiadają w regionie centrum aktywnego cząsteczki identyczną sekwencję (—Asp—Ser\*—Gly—), większość zaś proteaz drobnoustrojów posiada sekwencję

Tabela 5.

Sekwencja aminokwasów wokół seryny centrum aktywnego niektórych enzymów proteolitycznych

Enzym	Sekwencja aminokwasów
Chymotrypsyna wołu (58)	—Ser—Cys—Met—Gly—As —Ser*—Gly—Hly—Pro—Leu—Val—Cys—
Trypsyna wołu (31)	—As —Ser—Cys—Gln—Gly—As —Ser*—Gly—Gly—Pro—Val—Val—Cys—Ser—Gly—
Trypsyna owcy (31)	—Asn—Ser—Cys—Gln—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—Pro—Val—Val—Cys—Ser—Gly—
Trypsyna świni (31)	—Asn—Ser—Cys—Gln—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—Pro—Val—Val—Cys—Gly—Gln—
Trombina wołu (58)	—Ala—Cys—Glu—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—Pro—Phe—Val—Met—
Elastaza wieprza (58)	—Gly—Cys—Gln—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—Pro—Leu—His—Cys—
Plazma człowieka (58)	—Ser—Cys—Gln—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—Pro—Leu—Val—Cys—
Trypsynopodobna proteaza raka rzecznoego (59)	—Asp—Ser*—Gly—
$\alpha$ -proteaza z <i>Myxobacter</i> (60)	—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—
Pronaza (61)	—Asp—Thr—Gys—Gln—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—Pro—Met—Phe—
Kokonaza z <i>Antherae a polyphemus</i> (22)	—Asp—Ala—Cys—Gln—Gly—Asp—Ser*—Gly—Gly—Pro—Val—Gln—Asn—Ala—
Subtilizyna BPN (62)	—Asn—Gly—Thr—Ser*—Met—Ala—Ser—Pro—His—
Subtilizyna Carlsberg (63)	—Asn—Gly—Thr—Ser*—Met—Ala—
Zasadowa proteaza z <i>Aspergillus flavus</i> (64)	—Gly—Thr—Ser*—Met—Ala—
Zasadowa proteaza z <i>Aspergillus oryzae</i> (65)	—Thr—Ser*—Met—Ala—
Kazeinaza z fasoli (66)	—Thr—Ser*—Met—Ala—
Proteaza z <i>Arthrobacter</i> (67)	—Ser—Ser*—Gly—
Proteaza z drożdży piekarskich (66)	—Glu—Ser*—Val—

Gwiazdką oznaczono serynę centrum aktywnego.

—Tre—Ser\*—Met—. Od powyższych schematów odbiega sekwencja aminokwasów w proteazie izolowanej z drożdży piekarskich i proteazie z *Arthrobacter*.

Wyraźne podobieństwa sekwencji aminokwasów okolicy histydyny centrum aktywnego (Tabela 6), wykazano w proteazach przewodu pokarmowego zwierząt, proteazie z *Myxobacter* oraz w proteazach wytwarzanych przez drobnoustroje rodzaju *Bacillus*. Kwas asparaginowy wchodzący w skład centrum aktywnego w wielu proteazach (Tabela 7) otoczony jest również podobnymi aminokwasami.

Interesujący jest fakt, że  $\alpha$ -proteaza z *Myxobacter* i elastaza z trzustki wieprzowej charakteryzują się zbliżoną sekwencją aminokwasów w N-koń-

cowej części łańcucha polipeptydowego oraz w pobliżu aminokwasów centrum aktywnego, które stanowi seryna i histydyna. W cząsteczkach tych enzymów liczba reszt aminokwasów zasadowych oraz lokalizacja mostków dwusiarczkowych są również zbliżone, a w konsekwencji enzymy te posiadają zbliżoną strukturę przestrzenną (Ryc. 2).

Porównywane enzymy wykazują podobną aktywność przy pomiarach z zastosowaniem jako substratów estrów metylowych różnych benzoilo-aminokwasów, estrów metylowych pochodnych acylowych alaniny i estrów N-propionylkarboksylowych alaniny (60).

Sekwencja aminokwasów w C-końcowym odcinku cząsteczki niektórych proteaz drobnoustrojów i zwierząt jest również bardzo podobna (Tabela 8).

Tabela 6.

Sekwencja aminokwasów okolicy histydyny centrum aktywnego niektórych enzymów proteolitycznych

Enzym	Sekwencja aminokwasów
Trypsyna wołu (68)	—Val—Val—Ser—Ala—Ala—His*—Cys—Tyr—Lys—Ser—
Chymotrypsyna wołu (68)	—Val—Val—Thr—Ala—Ala—His*—Cys—Gly—Val—Thr—
Elastaza wieprza (68)	—Val—Met—Thr—Ala—Ala—His*—Cys—Val—Asp—Arg—
<i>α</i> -proteaza z <i>Myxobacter</i> (60)	—Phe—Val—Thr—Ala—Gly—His*—Cys—Gly—Thr—Val—
Subtilizyna BPN' (69)	—Gln—Asp—Asp—Asn—Ser—His*—Gly—Thr—His—Val—
Subtilizyna Carlsberg (69)	—Thr—Asp—Gly—Asn—Gly—His*—Gly—Thr—His—Val—

Gwiazdką oznaczono histydynę centrum aktywnego.

Tabela 7.

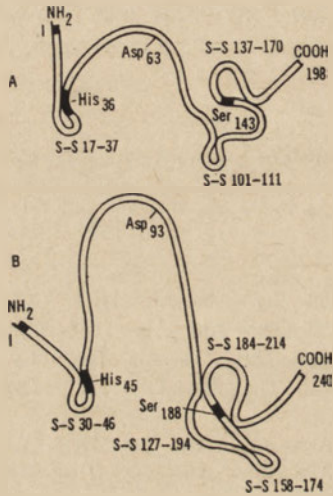
Sekwencja aminokwasów wokół kwasu asparaginowego centrum aktywnego niektórych enzymów proteolitycznych

Enzym	Sekwencja aminokwasów
Chymotrypsyna A wołu (70)	—Thr—Ile—Asn—Asn—Asp*—Ile—Thr—Leu—Leu—
Chymotrypsyna B wołu (70)	—Thr—Ile—Asn—Asn—Asp*—Ile—Thr—Leu—Leu—
Trypsyna wołu (70)	—Thr—Leu—Asn—Asn—Asp*—Ile—Met—Leu—Ile—
Elastaza świni (70)	—Ala—Ala—Gly—Tyr—Asp*—Ile—Ala—Leu—Leu—
Trombina wołu (70)	—Asx—Leu—Asp—Agr—Asp*—Ile—Ala—Leu—Leu—
Subtilizyna BPN' (71)	—Val—Ala—Val—Ile—Asp*—Ser—Gly—Ile—Asp—
Subtilizyna Carlsberg (71)	—Val—Ala—Val—Leu—Asp*—Thr—Gly—Ile—Gln—
Pepsyna (72)	—Ile—Val—Asp*—Thr—Gly—Thr—Ser—
Penicylopepsyna (72)	—Ile—Ala—Asp*—Thr—Gly—Thr—Ser—

Gwiazdką oznaczono kwas asparaginowy centrum aktywnego.

Stwierdzono istotne podobieństwa między trypsyną raka rzeczno-  
go i trypsyną ssaków (59). Obydwa enzymy charakteryzują się identyczną  
sekwencją aminokwasów wokół aktywnej seryny i podobnym składem  
aminokwasowym, swoistością substratową oraz inhibitorami (28, 74). Iden-  
tyczną specyficzność substratową jak trypsyna ssaków posiada także tryp-  
synopodobna proteaza wytwarzana przez *Streptomyces fradie* (75).

Karboksypeptydazy A i B wołu i karboksypeptydaza B odległej gatun-  
kowo ryby płucodysznej (76, 77) posiadają podobny N-końcowy fragment  
łańcucha polipeptydowego. Trypsyna wołu i kokonaza z jedwabników mają



**Ryc. 2.** Model struktury przestrzennej  $\alpha$ -proteazy z *Myxobacter* (A) i elastazy wie-  
przowej (B), (60).

Odcinki łańcuchów polipeptydowych o podobnej sekwencji aminokwasów zaznaczono kolorem  
czarnym.

**Tabela 8.**

Porównanie sekwencji aminokwasów C-końcowego odcinka proteazy A ze *Streptomyces griseus*  
z innymi serynowymi proteazami (61,73)

Enzym	Liczba porówny- wanych reszt aminokwasowych	% identyczności	% podobieństwa <sup>1</sup>
$\alpha$ -proteaza z <i>Myxo- bacter</i>	72	32	53
Elastaza wieprza	69	19	32
Chymotrypsyna A wołu	69	25	32
Trypsyna wołu	68	22	32

<sup>1</sup> — podobieństwo aminokwasów zdefiniowane jest następująco:

Arg = Lys, Ala = Gly, Asp = Asn = Glu = Gin, Ser = Thr, Val = Try = Ile = Leu = Tyr = Phe = Met

także podobny skład aminokwasowy i sekwencję aminokwasów wokół seryny centrum aktywnego (21, 22).

Podobieństwa struktury kwaśnych proteaz wielu organizmów odległych genetycznie ilustruje tabela 9.

Podobna jest również sekwencja aminokwasów wokół cysteiny centrum aktywnego sulfhydrylowych proteaz zwierzęcych i roślinnych, a także sekwencja aminokwasów okolicy seryny centrum aktywnego proteaz zwierzęcych i poblize aktywnej cysteiny proteaz roślinnych (7, 78).

Tabela 9.

Podobieństwa sekwencji aminokwasów N-końcowego odcinka penicylopepsyny, pepsyny I i II z *Rhizopus chinensis* i renniny (72)

Enzym	Sekwencja aminokwasów
Penicylopepsyna	Ala—Ala—Ser—Gly—Val—Ala—Thr—Asx—Thr—Pro—Thr
Pepsyna I z <i>Rhizopus chinensis</i>	Ala—Gly—Val—Gly—Thr—Val—Pro—Asx—Thr—
Pepsyna II z <i>Rhizopus chinensis</i>	Ala—Gly—Val—Gly—Thr—Val—Pro—
Rennina	Gly—Glu—Val—Ala—Ser—Val—Pro—Leu—Thr

## V. Zakończenie

Podobieństwa strukturalne proteaz drobnoustrojów, roślin i zwierząt próbuje wyjaśnić szereg hipotez. Jedna z nich opiera się na założeniu, że w toku ewolucji następowała selekcja w kierunku tworzenia czynnej enzymatycznie sekwencji aminokwasów, która doprowadziła do upodobnienia się struktury białek o podobnych funkcjach (79). Inna hipoteza zakłada zaś, że enzymy te powstały w wyniku ewolucji dywergencyjnej ze wspólnej praproteazy (6). Analogie między sekwencjami aminokwasów centrum aktywnego enzymów proteolitycznych pozwalają przypuszczać, że fragmenty łańcuchów polipeptydowych odpowiadające centrum aktywnemu ulegały tylko niewielkim zmianom w procesie ewolucji, a istniejące różnice są wynikiem wymiany określonych aminokwasów na inne o podobnej strukturze i funkcji katalitycznej. Według Love (7) szczególnie duże znaczenie miała wymiana cysteiny na serynę w obrębie centrum aktywnego proteaz. Pozostałe fragmenty białka enzymatycznego były natomiast bardzo różnorodnie modyfikowane. Choć modyfikacje te nie wpłynęły w zasadniczy sposób na aktywność katalityczną, to spowodowały jednak zmiany swoistości substratowej, masy cząsteczkowej, optimum pH i temperatury oraz niektórych innych właściwości fizyko-chemicznych (4).

Dotychczasowe badania z zakresu enzymologii porównawczej wskazują na to, że ewolucja struktury cząsteczki enzymatycznej polegała na utrwalaniu przede wszystkim zmian zapewniających właściwą metabolicznie aktywność enzymu.

Artykuł otrzymano 30.11.1973, po rewizji autorskiej przyjęto 20.6.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Koshland D. E., (1963), *Science*, **142**, 1533—1541.
2. Oosterbaan R. A., Cohen J. A., (1965), w *Structure and Activity of Enzymes*, str. 87—95, red. Goodwin T. W., Harris J. I., Hartley B. S., Academic Press, New York.
3. Watts D. C., (1968), *Adv. Comparative Physiol. Biochem.*, **3**, 1—114.
4. Walsh K. A., Neurath H., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **52**, 884—889.
5. Hartley B. S., Brown J. R., Kauffman D. L., Smillie L. B., (1965), *Nature*, **207**, 1157—1159.
6. Dixon G. H., (1966), w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N. i Greville G. D., t. 2, str. 147—204, Academic Press, New York.
7. Love G., (1966), *Nature*, **212**, 1263—1264.
8. Neurath H., Bradshaw R. A., Arnon R., (1970), w *Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes*, red. Desnuelle P., Neurath H., Ottesen M., str. 113—124, Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
9. Foltman B., Hartley B. S., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 1064—1074.
10. Huang W. Y., Tang J., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2189—2193.
11. Tang J., Hartley B. S., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 611—623.
12. Sanger F., Tuppy H., (1951), *Biochem. J.*, **49**, 481—490.
13. Foltmann B., (1966), *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **35**, 143—231.
14. Schyns R., Bricteux-Gregoire S., Florkin M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 97—112.
15. Bricteux-Grégoire S., Schyns R., Florkin M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 123—135.
16. Bricteux-Grégoire S., Schyns R., Florkin M., (1971), w *Biochemical Evolution and the Origin of Life*, red. Schoffeniels E., str. 130—149, North-Holland Publishing Company.
17. Hermodson M. A., Tye R. W., Reeck G. R., Neurath H., Walsh K. A., (1971), *FEBS Letters*, **14**, 222—224.
18. Neurath A., (1964), *Sci. Am.*, **211**, 68—79.
19. Bricteux-Grégoire S., Schyns R., Florkin M., (1972), *Comp. Biochem. Physiol.*, **42 B**, 23—39.
20. Bradshaw R. A., Neurath H., Tye R. W., Walsh K. A., Winter W. P., (1970), *Nature*, **226**, 237—239.
21. Felsted R. L., Kramer K. J., Law J. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3012—3020.
22. Kramer K. J., Felsted R. L., Law J. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3021—3028.
23. Mikeš O., Tomašek V., Holeyšovský V., Šorm F., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 281—284.



24. Travis J., Liener J. E., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1967—1973.
25. Buck F. F., Vithayathil A. J., Bier M., Nord F. F., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 417—424.
26. Ryan C. A., Clary J. I., Tomimatsu Y., (1965), *Arch. Biochem., Biophys.*, **110**, 175—183.
27. Zwilling R., Tomašek V., (1970), *Nature*, **228**, 57.
28. Kleine R., Uhlig H., Kretschmer K., Marquardt J., (1972), *Enzymologia*, **42**, 155—173.
29. Gates B. J., Travis J., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4483—4489.
30. Coan M. H., Travis J., (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, **32**, 127—139.
31. Dayhoff M. O., (1972), Atlas of Protein Sequence and Structure, t. 5, str. D 99—11, The National Biochemical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
32. Peansky R. J., Gratecos D., Baratti J., Rovey M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **181**, 82—92.
33. Travis J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1111—1116.
34. Gratecos D., Guy O., Rovey M., Desnuelle P., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 82—96.
35. Desnuelle P., Gratecos D., Charles M., Peansky R., Baratti J., Rovey M., (1970), Structure—Function Relationships of Proteolytic Enzymes, red. Desnuelle P., Neurath H., Otteson M. str. 21—35, Munksgaard, Copenhagen.
36. Hartley B. S., (1964), *Nature*, **201**, 1284—1287.
37. Smillie L. B., Furha A., Nagabhushan N., Stevenson K. J., Parkes L. O., (1968), *Nature*, **218**, 344—346.
38. Folk J. L., Schrimmer W. E., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 181—192.
39. Charles M., Gratecos D., Rovey M., Desnuelle P., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 395—409.
40. Mikeš O., Holeyšovský V., Tomašek V., Šorm F., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 346—352.
41. Charles M., Rovey M., Guidoni A., Desnuelle P., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 115—129.
42. Mikeš O., Kelil B., Šorm F., (1966), w Enzymy v potravinarskom priemysle, Sbornik s Konference, str. 9—36, SNTL, Bratislava.
43. Magnuson S., (1970), w Methods in Enzymology, red. Perlman G. E., Lorand L., t. 19, str. 157—165, Academic Press, New York, London.
44. Fenton J. W., Campbell W. P., Harrington J. C., Miller K. D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 26—32.
45. Elzinga M., Hirs C. H., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 361—367.
46. Wintersberger E., (1965), *Biochemistry*, **4**, 1533—1537.
47. Kafates F. C., Tartakoff A. M., Law J. H., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1477—1487.
48. Husain S. S., Love G., (1968), *Chem. Commun.*, 1387—1389.
49. Light A., Frater R., Kimmel J., Smith E. L., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 1276—1283.
50. Friedenson B., Liener I. E., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 169—174.
51. Murachi T., Takahashi N., (1970), w Structure-Function of Proteolytic Enzymes, red. Desnuelle P., Neurath H., Otteson M., str. 298—309, Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
52. Markhland F. S., Smith E. L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5198—5211.
53. Smith E. L., De Lange R. J., Evans W. H., London M., Markhland F. S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2184—2191.
54. Glazer A. N., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 433—436.

55. Smith E. L., Markland F. S., Glazer A. N., (1970), w *Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes*, red. Desnuelle P., Neurath H., Ottesen M., str. 160—174, Munksgaard, Copenhagen.
56. Kędziora J., (1971), *Acta Biochim. Polon.*, **18**, 109—119.
57. Turkova J., Mikeš O., Hayashi K., Danno G., Polgar L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 257—263.
58. Hartley B. S., (1970), *Phil. Trans. R. Soc. (Lond.) B.*, **257**, 77—87.
59. Tomašek V., Šorm F., Zwilling D., Pfleiderer G., (1970), *FEBS Letters*, **6**, 229—231.
60. Whitaker D. R., (1970), *Miami Winter Symposia*, t. 1, 210—222. North Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
61. Olson M. O. I., Nagabhushan N., Dzwiniel M., Smillie L. B., Whitaker D. R., (1970), *Nature*, **228**, 438—442.
62. Smith E. L., Markland F. S., Kasper B., De Lange R. J., London M., Evans W. H., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 5974—5976.
63. Sanger F., Shaw D. C., (1970), *Nature*, **187**, 872—873.
64. Mikeš O., Turkova J., Toan N. B., Šorm F., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 112—117.
65. Sanger F., (1963), *Proc. Chem. Soc.*, **3**, 76—183.
66. Shaw D. C., Wells J. R. E., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 5 c.
67. Wählby S., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 409—413.
68. Smillie L. B., Hartley B. S., (1966), *Biochem. J.*, **101**, 232—241.
69. Markland F. S., Shaw E., Smith E. L., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 1440—1447.
70. Blow D. M., Birktoff J. J., Hartley B. S., (1969), *Nature*, **221**, 337—340.
71. Wright C. S., Alden R. A., Kraut J., (1969), *Nature*, **221**, 235—242.
72. Graham J. E. S., Šodek J., Hofmann T., (1973), *Canad. J. Biochem.* **51**, 789—796.
73. Johnson P., Smillie L. B., (1972), *Canad. J. Biochem.*, **50**, 589—599.
74. Zwilling R., Pfleiderer G., Sonneborn H. H., Kraft V., Stucky I., (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**, 1275—1287.
75. Morihara K., Tsuzuki H., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 971—973.
76. Reeck G. R., Neurath H., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3947—3955.
77. Reeck G. R., Walsh K. A., Hermodson M. A., Neurath H., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1226—1230.
78. Tomašek V., Keilova H., (1971), *Celostatni biochemicke dny, Praha*, III—2.
79. Haggis G. H., Mickie D., Muir A. R., Roberts K. B., Walker P. B. M., (1968), *Wstęp do biologii molekularnej*, str. 263, PWRiL, Warszawa.

## SPRAWOZDANIA

### IV Kolokwium „Bioenergetyka i Mitochondria”

Magdeburg (NRD) 13—15 maj 1974 r.

Coroczne kolokwia bioenergetyczne, organizowane kolejno w różnych krajach socjalistycznych, stały się już ustaloną formą kontaktów i wymiany myśli biochemików Bułgarii, Czechosłowacji, N.R.D., Polski, Węgier i ZSRR. Po Warszawie (1971), Pradze (1972) i Tihany (1973), czwarte Kolokwium odbyło się w Magdeburgu (NRD). Było ono najliczniejsze z dotychczasowych (około 100 uczestników); najliczniejszy był też, poza kolokwium warszawskim, udział biochemików polskich (22 osoby). Kolokwium trwało 3 dni, podczas których wygłoszono 10 referatów przeglądowych, a mianowicie:

1. H. David (Berlin) — Morfometria mitochondriów.
2. J. Popinigis (Gdańsk) — „Struktury krystaliczne” mitochondriów.
3. A. Fonyó (Budapeszt) — Charakterystyka in situ systemów transportujących aniony.
4. A. Girbardt (Jena) — Zmiany konformacyjne mitochondriów filamentarnych (referat i film).
5. A. D. Vinogradov i J. V. Evtodienko (Moskwa i Puszcziino) — Badania nad transportem wapnia w mitochondriach.
6. Sungchul Ji (Madison, USA) — Konformacyjny model „sprężenia energetycznego”.
7. K. R. H. Repke i R. Schön (Berlin-Buch) — Reakcje (Na, K)-ATP-azy jako model produkcji ATP w oksydacyjnej fosforylacji.
8. L. Wojtczak i A. B. Wojtczak (Warszawa) — Transport metabolitów i jonów przez błony mitochondrialne jako czynnik regulujący zależność między mitochondriami a cytoplazmą.
9. L. Kovač (Pezinok k/Bratysławy) — Genetyka mitochondriów jako jeden z aspektów biogenezy mitochondriów.
10. S. M. Rapoport (Berlin) — Degradacja mitochondriów.

Ponadto przedstawiono około 40 doniesień o tematyce zbliżonej do tematów referatów przeglądowych. Inowacją Kolokwium w Magdeburgu było to, że doniesienia zaprezentowano wyłącznie w formie „plakatowej”. Każdego dnia obrad po południu (przedpołudnia poświęcone były referatom przeglądowym) przez 3 godziny kilkunastu autorów objaśniało umieszczone na specjalnych tablicach wykresy, tabele i tezy swych doniesień. Następnie odbywała się ogólna dyskusja, dotycząca zarówno przedstawionych danego dnia „plakatów” jak i rannych referatów przeglądowych. Ta forma prezentacji doniesień, wypróbowana już zresztą wcześniej na ostatnich dwóch zjazdach FEBS, na IX Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Sztokholmie i na zjazdach Biochemicznego Towarzystwa NRD, zyskała na ogół uznanie uczestników Kolokwium. Pozwalała ona poszczególnym uczestnikom kolokwium na dokładniejsze zapoznanie się z interesującymi ich doniesieniami, a autorom — na bardziej swobodne ich przedstawienie. Niedogodnością takiego systemu

był jednak niedostatek szerszej dyskusji i krytyki a także możliwość przeoczenia niektórych doniesień.

Następne, piąte Kolokwium bioenergetyczne odbędzie się w dniach 10—13 czerwca 1975 r. w Puszczyku w ZSRR. Organizatorem będzie Instytut Biofizyki Akademii Nauk ZSRR.

*L. Wojtczak*

## Międzynarodowa Konferencja na temat

### „Metabolism of Folate and Related Compounds in Different Biological Systems”

Warszawa, 10—12.VI.1974

W dniach 10—12 czerwca 1974 odbyła się w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, konferencja robocza na temat „Metabolism of folate and related compounds in different biological systems” zorganizowana przez Pracownię Procesów Biosyntetycznych Zakładu Biochemii Komórki.

W konferencji, oprócz pracowników Zakładu Biochemii Komórki i kolegów z kilku placówek warszawskich uczestniczyli: K. R. Harrap (Institute of Cancer Research, Belmont, W. Brytania); S. F. Zakrzewski (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, USA); G. Gerzeli (Universita di Pavia, Włochy) oraz K. Přistoupilova i J. Souček (Ustav Hematologie, Praga, Czechosłowacja).

Konferencję otworzyła Z. Zielińska, przewodnicząca i organizator spotkania. Referaty dotyczyły zagadnień związanych z różnymi aspektami metabolizmu folianu w bakteriach, komórkach zwierzęcych hodowanych *in vitro* oraz w narządach zwierząt wyższych (K. R. Harrap, S. F. Zakrzewski, K. Přistoupilova, B. Grzelakowska-Sztabert i wsp.). Szczególnie wiele uwagi poświęcono mechanizmom oporności komórek na działanie analogów folianu (K. R. Harrap) jak również badaniom pozwalającym na identyfikację wewnątrzkomórkowych produktów metabolizmu folianu (S. F. Zakrzewski).

Jeden dzień obrad poświęcono na szczegółowe omawianie różnych problemów dotyczących reduktazy dihydrofolianowej, enzymu kluczowego w syntezie koenzymatycznych form folianu. Dyskutowano histochemiczne i autoradiograficzne techniki oznaczania reduktazy dihydrofolianowej *in situ* w komórkach i tkankach zwierząt wyższych (G. Gerzeli; K. Ostrowski). Szereg referatów dotyczyło biochemicznych metod oczyszczania reduktazy dihydrofolianowej i syntetazy tymidylanowej przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa lub izoelektrycznego fokusowania (J. Souček; M. Manteuffel-Cymborowska; W. Rode).

Uczestnicy konferencji uznali zorganizowane spotkanie za dobrą okazję do przedyskutowania wyników uzyskanych w różnych pracowniach, przy użyciu różnych technik. Uznano, że podobne spotkania należałoby organizować co rok lub dwa.

B. Grzelakowska-Sztabert, M. Landman

## RECENZJA

### Recenzja książki

**B. Filipowicz, A. Więckowski**

**„Zarys Biochemii”**

**P.Z.W.L., Warszawa 1973.**

Na rynku księgarskim można znaleźć kilka dobrych podręczników biochemii autorów polskich, jak i zagranicznych. Zapotrzebowanie na nowe książki wynika ze stałego postępu nauki, bowiem osiągnięcia i wyniki dostarczają nowych informacji, które uzupełniają lub modyfikują dotychczasowe dane z tej dziedziny wiedzy. Młodzież akademicka chętniej jednak sięga po zwięzłe podręczniki, obejmujące swym zakresem tylko najistotniejsze wiadomości, które w okresie nauki przedmiotu stanowią bazę, a dopiero w celu rozbudowy i szerszego potraktowania wybranego zagadnienia korzysta z obszerniejszych podręczników. Ponadto dużą popularnością wśród studentów cieszy się, szczególnie w okresie przedegzaminacyjnym podręcznik o charakterze kompendium, który pozwala na szybkie powtórzenie całości materiału. W tym aspekcie książka p.t. „Zarys Biochemii” przeznaczona dla studentów medycyny i farmacji stanowi cenną pozycję pomocy dydaktycznej.

Podręcznik uwzględnia wszystkie tematy zawarte w programie nauczania biochemii studentów II roku Wydziału Lekarskiego. Materiał jest ujęty w 14 rozdziałach, przy czym najobszerniejsze są rozdziały dotyczące białek, kwasów nukleinowych i enzymów. Nie negując dominującej roli tych związków w procesach życiowych, wyraża się, że studenci — szczególnie Wydziału Lekarskiego — winni otrzymać proporcjonalny zasób wiadomości we wszystkich dziedzinach. Treść podręcznika została wzbogacona licznymi przejrzystymi schematami i tabelami zbiorczymi, które ułatwiają zrozumienie i przyswojenie materiału. Należy żałować, że Wydawca nie uwzględnił erraty błędów drukarskich.

Autorzy podręcznika są dobrze znani czytelnikom, a szereg pozycji wydawniczych prof. Filipowicza można znaleźć we wszystkich pracowniach biochemicznych. „Zarys Biochemii” przeznaczony dla studentów zainteresuje niewątpliwie również szerokie grono biochemików-dydaktyków.

*I. Borkowska*

## KOMUNIKAT

Ukazały się pierwsze numery nowego czasopisma *Postępy Biologii Komórki*. Czasopismo, będące kwartalnikiem drukuje artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki.

Na treść 1 numeru składają się artykuły:

- M. Olszewska, Ultrastruktura chromatyny i chromosomów
- A. Myśliwski, Histony
- L. Cieciora, Postępy cytogenetyki lekarskiej
- T. Żak, C. Radzikowski, Wirusy onkogenne RNA
- A. Vorbrodt, Cytochemia enzymatyczna jądra komórkowego
- T. Gołaszewski i M. Rytel, Względna intensywność syntezy kwasów rybonukle-  
inowych w komórce

W numerze 2 ukazały się następujące artykuły:

- J. Michejda, Mitochondrialny DNA i zakres jego działania
- J. Zurzycki, Peroksysomy, ich struktura i funkcje metaboliczne
- B. Gabara, Struktury Golgiego w świecie roślin
- A. Koj, Cykl rybosomowy w komórkach bakterii, roślin i zwierząt
- K. Strzałka, S. Więckowski, Autonomia genetyczna chloroplastów w świetle ba-  
dań biochemicznych
- I. Pańczewska, Struktura i funkcje lizosomów w komórkach roślinnych
- M. Kwiatkowska, Mikrotubule
- I. Budowa i skład chemiczny mikrotubul
- II. Funkcje mikrotubul.

Czasopismo można nabyć we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa, w księgarniach naukowych „Domach Książki” albo w RSW „Prasa-Książka-Ruch” ul. Hubska 8/14 50-502 Wrocław.

## SPIS TREŚCI

Biochemia polska i jej reprezentacje ( <i>B. Filipowicz</i> ) . . . . .	359
K. Krzystyniak—Fizjologiczna rola cyklicznej fotofosforylacji . . . . .	369
S. Maleszewski—Tlen jako element regulacji fotosyntezy . . . . .	379
M. G. Sarzała—Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum (mięśni szkieletowych) . . . . .	403
W. Wnuk—Siły oddziaływań między komórkami . . . . .	425
B. Brysch—Sekwencje poli(A) w kwasach rybonukleinowych . . . . .	459
E. Bańkowski, W. Gałasiński—Biosynteza kolagenu . . . . .	481
K. Worowski—Podobieństwa strukturalne enzymów proteolitycznych . . . . .	503
Sprawozdania: IV Kolokwium „Bioenergetyka i Mitochondria”, Magdeburg (NRD) ( <i>L. Wojtczak</i> ) . . . . .	517
Międzynarodowa Konferencja na temat „Metabolism of Folate and Related Compounds in Different Biological Systems”, (Warszawa) ( <i>B. Grzelakowska-Sztabert, M. Landman</i> ) . . . . .	519
Recenzja: „Zarys Biochemii”— <i>B. Filipowicz, A. Więckowski (J. Borkowska)</i> . . . . .	520
Komunikat: Nowe czasopismo „Postępy Biologii Komórki” . . . . .	521



POSTĘPY BIOCHEMII

December 1974

ARTICLES IN POLISH

Volume 20

Number 4

Biochemistry in Poland and its Organisations ( <i>B. Filipowicz</i> ) . . . . .	359
K. Krzysztyniak—Physiological Role of Cyclic Photophosphorylation (Inst. Biochem., University of Warsaw, Warszawa) . . . . .	369
S. Maleszewski—Oxygen Regulation of Photosynthesis (Inst. Bot., University of Warsaw, Warszawa) . . . . .	379
M. G. Sarzała—Structure and Function of Sarcoplasmic Reticulum Membranes (Nencki Inst. Exp. Biol. Polish Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	403
W. Wnuk—Forces of Interactions between Cells (Inst. Biochem. Biophys., School of Medicine, Wrocław) . . . . .	425
B. Brysch—Poly(A) Sequences in Ribonucleic Acids (Inst. Oncology, Gliwice) . . . . .	459
E. Bańkowski, W. Gałasiński—Collagen Biosynthesis (Dept Biochem. School of Medicine, Białystok, and Dept. General Chem. School of Medicine, Białystok) . . . . .	481
W. Worowski—Structure Similarity of Proteolytic Enzymes (Inst. Physiol. Biochem., School of Medicine, Białystok) . . . . .	503
Meeting Reports: 4th Colloquium „Bioenergetic and Mitochondria”, Magdeburg, DDR ( <i>L. Wojtczak</i> ) . . . . .	517
International Conference on „Metabolism of Folate and Related Compounds Different Biological Systems, Warszawa), <i>B. Grzelakowska-Sztabert, M. Landman</i> ) . . . . .	519
Book review . . . . .	520
Communion . . . . .	521



Redakcja zastrzega sobie możliwość 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 przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy cytować jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem będzie obejmował prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnosiniki 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 stroną 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 strony 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 na 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:  $\triangle$   $\square$   $\circ$   $\blacktriangle$   $\blacksquare$   $\bullet$  Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku podejmuje wydawca.

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.

## SPIS TREŚCI

Biochemia polska i jej reprezentacje (B. Filipowicz) . . . . .	359
K. Krzystyniak—Fizjologiczna rola cyklicznej fotofosforylacji . . . . .	369
S. Maleszewski—Tlen jako element regulacji fotosyntezy . . . . .	379
M. G. Sarzała—Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum (mięśni szkieletowych) . . . . .	403
W. Wnuk—Siły oddziaływań między komórkami . . . . .	425
B. Brysch—Sekwencje poli(A) w kwasach rybonukleinowych . . . . .	459
E. Bańkowski, W. Gałasiński—Biosynteza kolagenu . . . . .	481
K. Worowski—Podobieństwa strukturalne enzymów proteolitycznych . . . . .	503
Sprawozdania: IV Kolokwium „Bioenergetyka i Mitochondria”, Magdeburg (NRD) (L. Wojtczak) . . . . .	517
Międzynarodowa Konferencja na temat „Metabolism of Folate and Related Compounds in Different Biological Systems”, (Warszawa) (B. Grzelakowska-Sztabert, M. Landman) . . . . .	519
Recenzja: „Zarys Biochemii”—B. Filipowicz, A. Więckowski (J. Borkowska) . . . . .	520
Komunikat: Nowe czasopismo „Postępy Biologii Komórki” . . . . .	521