

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

**1974**

**tom 20**

**nr 3**

**KWARTALNIK**

PSTBAH 20(3)

215-356 (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 prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły są honorowane według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na 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 okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, tytuł pracy oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

**Strona tytułowa** (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z POMOCĄ FINANSOWĄ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 4  
tom XX  
zeszyt 3

KWARTALNIK

PSTBAH 20 (3) 213-356 (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. Pawełekiewicz (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. Szumiel (Warszawa)

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1974

Nakład 2.240 (2118+122)	Oddano do składania 23.IV.1974 r.
Ark. wyd. 11,5, druk. 9,0+0,25 wkł.	Podpisano do druku w lipcu 1974 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w lipcu 1974 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 710/74      W-122

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

**TADEUSZ WINCENCY  
SZCZEPKOWSKI**

(21.10.1916—11.11.1973)



W dniu 11 listopada 1973 r. zmarł przedwcześnie dr habil. Tadeusz Wincenty Szczepkowski, profesor nadzwyczajny, kierownik Zakładu Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej w Krakowie oraz wicedyrektor tegoż Instytutu. Odszedł w pełni sił twórczych, żywo zaangażowany w pracę badawczą, w nauczanie studentów i pracę społeczną. Uczelnia, w której pracował ponad 25 lat oraz nauka polska poniosły niepowetowaną stratę.

Prof. Szczepkowski urodził się 21 października 1916 r. w Dreglinie, pow. Sierpc, w rodzinie inteligentnej. Szkołę średnią ukończył w Warszawie w 1936 r., po czym rozpoczął studia na Uniwersytecie Warszawskim, najpierw w zakresie fizyki, skąd po dwu latach przeniósł się na chemię. Po wyzwoleniu kraju spod okupacji hitlerowskiej w 1945 r. przybył do Krakowa gdzie kontynuował studia na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Jagiellońskiego, otrzymując w 1949 r. stopień magistra filozofii w zakresie chemii.

Tadeusz Szczepkowski już jako student w 1948 r. rozpoczął pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Lekarskiej UJ. W rok później z inicjatywy kierownika Zakładu prof. B. Skarżyńskiego rozpoczęto badania nad metabolizmem samożywnych bakterii siarkowych; do badań tych Szczepkowski włączył się z pełnym entuzjazmem, będąc w późniejszych latach ich głównym wykonawcą. W początkowym okresie badań postawiono pytanie czy w takich pierwotnych — jak myślano wówczas organizmach —

jak *Thiobacillus thioparus* i *Thiobacillus thiooxydans*, procesy utleniania przebiegają podobnie do przemian w innych aerobach, czy też są one swoiste. Tadeusz Szczepkowski wykazał wówczas, że szczep *Th. thioparus* zawiera tylko jeden cytochrom, którego własności są różne zarówno od cytochromu c tkanek zwierzęcych, jak i od cytochromu f występującego w komórkach roślinnych. Cytochrom bakteryjny nazwany przez Szczepkowskiego cytochromem s został następnie wyizolowany w czystym stanie, scharakteryzowano jego widmo i wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego.

Wyniki badań nad cytochromami autotrofów wzbudziły późniejsze zainteresowania Szczepkowskiego innymi związkami hemoproteidowymi. W 1958 roku we krwi noworodków z żółtaczką hemolityczną wykrył on obecność endogennej tlenkowej hemoglobiny i postulował, że tlenek węgla powstający w organizmie z rozkładu  $\beta$ -metinowego węgla hemu bywa przyczyną ciężkiego uszkodzenia tkanki mózgowej dzieci dotkniętych tym schorzeniem. Wykazał on następnie, że cytochrom c podawany noworodkom z żółtaczką hemolityczną wywiera korzystny, leczniczy wpływ. W związku z zastosowaniem cytochromu c, jako leku potrzebna była uproszczona metoda izolowania tego hemoproteidu na skalę przemysłową. Dzieła tego dokonał Tadeusz Szczepkowski a metodę przez niego opracowaną stosuje się nadal w produkcji.

Dążąc do wyjaśnienia sposobu wiązania układów hematynowych przez grupy hemofilne białek Szczepkowski zajął się własnościami połączeń hemoproteidów z tlenkiem azotu. Badania te, przeprowadzone częściowo w pracowni prof. H. Theorella w Karolinska Institutet w Sztokholmie w latach 1956—1957 wykazały, że cytochrom c i inne hemoproteidy dające połączenia z tlenkiem azotu są diamagnetyczne przeto w swej strukturze posiadają jon żelazawy. Uzyskane w tym zakresie wyniki opracował Szczepkowski jako swą rozprawę doktorską pt. „Połączenia hematynowe tlenku azotu”, którą przedstawił w 1959 r. Radzie Wydziału Matematyczno-Fizycznego-Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dr Szczepkowski podjął następnie doświadczenia nad kinetyką denaturacji hemoglobin ludzkich i zwierzęcych, opracowując stosowaną metodę badania szybkości denaturacji tych białek. Dalszym rozwinięciem powyższych badań było zastosowanie pomiarów rezonansu jądrowego do badania stopnia uwodnienia białek rodzimych i zdenaturowanych.

Drugim równoległym torem zainteresowań badawczych dr Szczepkowskiego było badanie mechanizmu utleniania tiosiarczanu przez samożywne bakterie siarkowe. Tiosiarczan u *Th. thioparus* jest jedynym źródłem siarki, jak również energii niezbędnej w procesach chemosyntezy. Przez opracowanie swoistej metody chromatografii bibułowej dr Szczepkowski wraz ze swymi współpracownikami wykazał, że utlenianie i degradacja cząsteczki tiosiarczanu u *Th. thioparus* nie przebiega przez stadium tetrathionianu i politionianów jak to postulowali wcześniejsi badacze. Stosując izomery

tiosiarczaniu znakowanego  $^{35}\text{S}$  w atomie siarki zewnętrznej i wewnętrznej udało mu się wykazać, że tylko zewnętrzny atom siarki (w pierwszym stopniu utlenienia) może przenikać przez błonę do cytoplazmy komórki podczas gdy atom siarki tiosiarczaniu będący na piątym stopniu utlenienia pozostaje w pożywce w postaci jonu  $\text{SO}_4^{-2}$ .

Fakt, że tiosiarczan jest prekursorem organicznych związków siarki niezbędnych dla normalnego metabolizmu komórek autotrofów, nasuwa Szczepkowskiemu myśl sprawdzenia roli tego związku w przemianach siarki w tkankach zwierzęcych. Za pomocą prostych doświadczeń Szczepkowski wraz ze swymi współpracownikami wykazuje, że tiosiarczan ulega zmetabolizowaniu w wątrobie szczura przy czym atom siarki wewnętrznej jest szybko usuwany z organizmu w postaci siarczaniu, atom siarki zewnętrznej natomiast ulega wbudowywaniu w szereg związków organicznych. Przy pomocy badań izotopowych Szczepkowski stwierdził później występowanie w tkankach zwierzęcych endogennej puli tiosiarczaniu, w tworzeniu którego bierze udział rodanaza. Szczepkowski rozwinął dalej badania w tym kierunku przygotowując również z tej dziedziny swą rozprawę habilitacyjną, pt. „Rola fizjologiczna i mechanizm działania rodanazy” przedstawioną w 1961 r. Radzie Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Krakowie. W 1963 roku zostaje powołany na stanowisko docenta w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie. W tym samym roku na zaproszenie Uniwersytetu w Memphis, Tennessee doc. Szczepkowski wyjechał do USA, gdzie w pracowni prof. J. Woodsa kontynuował swoje badania nad rodanazą. Między innymi wykazał on, że pośrednik przemiany tiosiarczaniu w tkankach zwierzęcych — tiocystyna — wytwarzana przez cystationazę — ulega z kolei rozkładowi przez rodanazę w wyniku procesu transsulfuracji siarki na cyjanek, grupę siarczynową lub inne akceptory. Po powrocie do kraju doc. Szczepkowski został powołany na stanowisko kierownika Zakładu Biochemii Międzywydziałowej Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie. Rozwijając dalej badania nad rodanazą i cystationazą (tzw. system cystationazo-rodanazowy), stwierdził na przykład, że są one kluczowymi enzymami metabolizmu siarki w ustrojach heterotroficznych. Wykazał także, że cystationaza jest enzymem indukcyjnym, którego aktywność wzrasta w wątrobie myszy pod wpływem podawania metioniny, cysteiny, tiocystyny, tiosiarczaniu i siarczku. Aktywność enzymu nie ulegała jednak podwyższeniu, gdy wspomniane metabolity podawano myszom obciążonym nowotworem Ehrlicha lub guzem Guerin.

Śledzenie reakcji przemian tiosiarczaniu w bakteriach samożywnych oraz w tkankach zwierzęcych nasunęło doc. Szczepkowskiemu myśl otrzymania połączeń tego metabolitu z innymi związkami siarki. W konsekwencji uzyskał nową serię związków siarkowych, tzw. cysteinotiosulfonianów, które następnie wykorzystał w późniejszych badaniach radiobiologicznych. W tym zakresie Szczepkowski zauważył przede wszystkim, że tiosiarczan

wykazuje dużą reaktywność z białkami. Wspomniane powyżej kwasy cysteinotiosulfonowe tworzyły z łatwością podobne mieszane dwusiarczki z białkami. Sugerowało to ochronne działanie tych związków przed wpływem promieniowania jonizującego. Seria prac wykonana przy współpracy z Kliniką Radiologiczną i Zakładem Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Krakowie udowodniła słuszność przedstawionej koncepcji Szczepkowskiego. Badania nad metabolizmem związków siarki przyniosły doc. Szczepkowskiemu wiele wyróżnień i nagród, między innymi dwie nagrody Państwowej Rady d/s Pokojowego Wykorzystania Energii Jądrowej w latach 1958 i 1960.

Uchwałą Rady Państwa w 1970 roku został Tadeusz Szczepkowski mianowany profesorem nadzwyczajnym w zakresie nauk medycznych. W latach 1969 do 1972 pełnił funkcję Prodziekana na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Krakowie. Był czynnym członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, chętnie biorąc udział w pracach szeregu komisji Zarządu Głównego oraz Krakowskiego Oddziału PTBioch. Był członkiem Komisji Medycznej Oddziału Krakowskiego PAN. Od 1945 r. Tadeusz Szczepkowski był czynnym członkiem Stronnictwa Demokratycznego. Pracował również społecznie w Komisji Zdrowia miasta Krakowa, a także przez szereg lat pełnił funkcję przewodniczącego Kasy Zapomogowej ZZPS Zdrowia przy Akademii Medycznej w Krakowie. Za swą działalność społeczną został odznaczony Złotym Krzyżem Zasługi, a także — pośmiertnie — Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski.

Tadeusz Szczepkowski był z wykształcenia chemikiem, odznaczał się jednak także szerokim zrozumieniem problemów ogólnobiologicznych oraz medycznych. W pracy badawczej szczególnie zainteresował się biochemią lekarską. Wysoko ceniono Go jako pedagoga; cieszył się sympatią studentów. W ocenie postępowania młodzieży był obiektywny, tolerancyjny i sprawiedliwy, a jej problemy traktował z powagą i taktem. Wrażliwy na piękno otaczającego nas świata chłonał każdy rodzaj sztuki inspirowanej przez piękno przyrody. Najbardziej jednak lubił poezję, sięgając do niej często, zwłaszcza w trudnych chwilach swego życia. Współpracując przez ponad ćwierć wieku z prof. Szczepkowskim danym mi było poznać w Nim dociekliwego i rzetelnego pracownika nauki, prawdziwego przyjaciela, wyjątkowo wrażliwego na ludzkie troski i niedole.

Włodzimierz Ostrowski



PIOTR WĘGLEŃSKI \*)

## Genetyczna regulacja metabolizmu argininy u grzybów

### Genetic Regulation of Arginine Metabolism in Fungi

Badania nad mechanizmami genetycznej regulacji metabolizmu organizmów wyższych są daleko mniej zaawansowane niż analogiczne badania metabolizmu bakteryjnego. Wynika to przede wszystkim z większej złożoności procesów regulacyjnych w organizmach wyższych jak i trudności w wykorzystywaniu szeregu metod genetycznych stosowanych z powodzeniem w przypadku bakterii. Stosunkowo najbardziej obiecujące są wyniki prac nad regulacją genetyczną metabolizmu grzybów takich jak drożdże, *Aspergillus* i *Neurospora*. Przykładem mogą być badania genetycznej regulacji argininy, których wyniki podsumowano w niniejszym opracowaniu.

Grzyby, jako proste organizmy eukariotyczne, stanowią dogodny obiekt badań nad regulacją metabolizmu, ponieważ można zastosować do nich wiele precyzyjnych metod analizy genetycznej. Atrakcyjność zaś badania regulacji i kontroli genetycznej metabolizmu argininy wynika przede wszystkim z faktu, że znamy już dobrze drogi przemian tego aminokwasu. Aktywność większości enzymów związanych z biosyntezą i rozkładem argininy łatwo można oznaczać; kilka z nich charakteryzuje się dużą zmiennością poziomu w zależności od warunków w jakich organizm się znajduje, co ułatwia badanie kinetyki indukcji bądź represji ich syntezy. System argininowy stwarza możliwość badania mechanizmów genetycznej kontroli procesów hamowania zwrotnego i represji syntezy enzymów (droga biosyntezy argininy) oraz procesu indukcji i represji katabolicznej (droga rozkładu argininy). Wykrycie mechanizmów odpowiedzialnych za poszczególne formy regulacji i ustalenie ich wzajemnych powiązań stanowi niewątpliwie interesujące zagadnienie.

Przedstawione w tym artykule koncepcje dotyczące regulacji katabolizmu argininy u *Aspergillus nidulans* oparto na wynikach prac (częściowo nieopublikowanych) autora. Dla porównania omówiono dokładniej system regulacji metabolizmu argininy w komórkach drożdży. Dokładniej omó-

\*) Dr, Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego

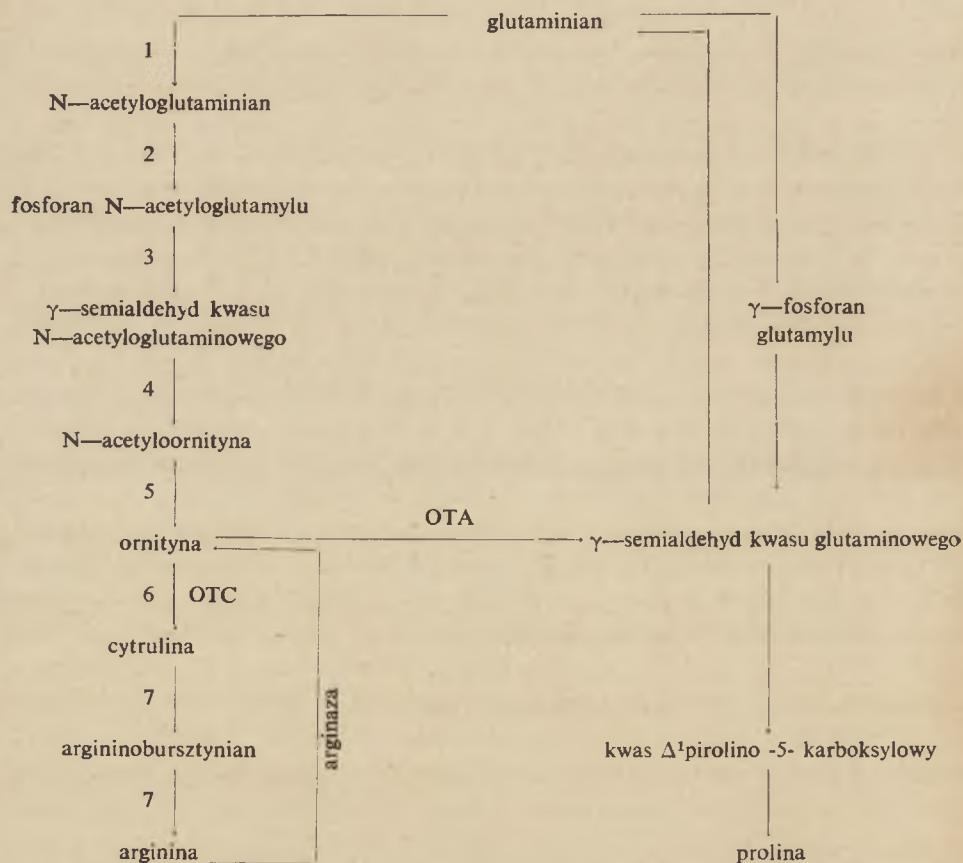
Stosowane skróty: OTC — transkarbamylaza ornitynowa (karbamoilofosforan: L-ornityna, E.C. 2.1.3.3); OTA —  $\delta$ -transaminaza ornitynowa (aminotransferaza L-ornityna: 2-oksokwas, E.C. 2.6.1.13); GDH — dehydrogenaza glutaminianowa (oksydoreduktaza L-glutaminian: NADP, E.C. 1.4.1.4).

wiono również zjawisko represji azotowej, biorąc pod uwagę fakt, że zagadnienie to wiąże się ściśle z problemem regulacji katabolizmu argininy, a także to, że genetyczna strona tego zagadnienia stała się przedmiotem badań dopiero w ostatnich dwóch latach.

## I. Metabolizm argininy i jego regulacja u mikroorganizmów

### I-1. Biosynteza argininy

Biosynteza argininy zachodzi podobnie u wszystkich zbadanych mikroorganizmów. Jej przebieg ustalono najpierw w badaniach nad *Escherichia coli* (1) a następnie nad szeregiem innych bakterii (2, 3) oraz grzybów *Saccharomyces cerevisiae* (4), *Neurospora crassa* (5) i *A. nidulans* (6). Arginina powstaje z kwasu glutaminowego w 8 etapach enzymatycznych (Ryc. 1) a różnice pomiędzy poszczególnymi gatunkami mikroorganizmów



Ryc. 1. Uproszczony schemat metabolizmu argininy i prolina u grzybów. Na schemacie podane są nazwy trzech enzymów, arginazy,  $\delta$ -transaminazy ornitynowej (OTA) i transkarbamylazy ornitynowej (OTC), o których mowa w tej pracy

mogą dotyczyć jedynie etapu 5 i wynikają z występowania bądź deacylazy acetyloornitynowej (E.C. 3.5.1.16) bądź acetylotransferazy glutaminianowej (E.C. 2.3.1.35), bądź też obu enzymów jednocześnie (3).

Droga biosyntezy argininy jest klasycznym przykładem systemu represyjnego. Egzogenna arginina powoduje represję enzymów tej drogi między innymi w komórkach *E. coli* K12 (7, 8, 9), *S. cerevisiae* (4, 10, 11, 12), *Chlamydomonas reinhardtii* (13). Represji przez egzogenną argininę nie stwierdza się w komórkach dzikiego szczepu *A. nidulans*. Natomiast w warunkach głodu argininowego, które można osiągnąć przez hodowanie auksotrofa argininowego *A. nidulans* na pożywce nie zawierającej argininy, obserwuje się derepresję syntezy niektórych enzymów. Wydaje się więc, że w szczepie dzikim tego organizmu pula endogennie tworzonej argininy jest wystarczająco duża aby spowodować represję syntezy enzymów biosyntetycznych do charakterystycznego poziomu podstawowego, który nie ulega dalszemu obniżeniu (6). Synteza poszczególnych enzymów drogi argininowej nie jest w pełni skoordynowana, co wykazano zarówno w komórkach *E. coli* (8) jak i *A. nidulans* (6) i *S. cerevisiae* (10, 12). W przypadku *A. nidulans* synteza transkarbamylazy ornitynowej (OTC, E.C. 2.1.3.3) w warunkach głodu argininowego ulega 7—10 krotnej derepresji, podczas gdy synteza deacylazy acetyloornitynowej lub aminotransferazy acetyloornitynowej (E.C. 2.6.1.11) tylko 1,5—2 krotnej (14).

Jakkolwiek synteza enzymów drogi argininowej zależy od obecności lub braku argininy, nie wiadomo jednak na pewno czy sama arginina działa tu jako korepresor. Istnieją dowody wskazujące na to, że aminoacylo-tRNA spełnia rolę korepresora szeregu dróg biosyntezy aminokwasów. Próby wyjaśnienia roli aminoacylo-tRNA w biosyntezie argininy przyniosły sprzeczne rezultaty. Pośrednie dowody udziału arginylo-tRNA w represji uzyskano badając *Ch. reinhardtii* (13) i *N. crassa* (19). Bezpośrednie natomiast oznaczanie ilości poszczególnych rodzajów arginylo-tRNA w warunkach represji i derepresji w komórkach odpowiednio dobranych pod względem genetycznym szczepów *E. coli*, nie wykazało jakiegokolwiek udziału arginylo tRNA w regulacji drogi biosyntezy argininy (20, 21). W przypadku *A. nidulans* sprawa właściwego korepresora biosyntezy argininy pozostaje otwarta. Stwierdzono natomiast, że synteza OTC w komórkach tego organizmu zależy nie tylko od poziomu argininy, lecz również od poziomu ornityny. Ornityna powoduje indukcję syntezy OTC, a zatem działa przeciwstawnie do argininy (14).

Biosynteza argininy oprócz represji podlega również inhibicji zwrotnej przez egzogenną argininę. Zarówno w komórkach drożdży (4) jak sinic (22) i szeregu bakterii (2), zahamowaniu ulega aktywność drugiego z kolei enzymu tej drogi (kinazy N-acetyloglutaminianu — E.C. 2.7.2.8.). W przypadku *S. cerevisiae* opisano ponadto niezwykle interesujący mechanizm regulacyjny, polegający na inhibicji OTC przez pierwszy enzym katabolizmu argininy — arginazę (E.C. 3.5.3.1) (24, 25). Wykazano bezpośrednio

wiązanie się tych dwóch białek enzymatycznych w obecności argininy i ornityny. Sens tego mechanizmu sprowadza się do uniemożliwienia recykliczacji ornityny w argininę, w sytuacji gdy arginina służy jako źródło azotu i ulega przemianie do ornityny, kwasu glutaminowego i amoniaku. Nie można wykluczyć, że podobny mechanizm występuje i u innych mikroorganizmów, aczkolwiek recykliczacji ornityny może również zapobiec fizyczne rozdzielenie pul ornityny „anabolicznej” i „katabolicznej”. Badania nad *N. crassa* (26, 27, 28) a także nad supresorami prolinowymi *A. nidulans* (29) przemawiają za możliwością takiego rozdziału.

### I-2. Katabolizm argininy

Spośród szeregu możliwych dróg rozkładu argininy, wydaje się że w przypadku grzybów takich jak drożdże, *Neurospora* i *Aspergillus*, główną i jedyną istotną fizjologicznie jest ta, którą przedstawiono na rycinie 1. Świadczy o tym fakt, że w przeciwieństwie do szczepów dzikich, mutanty grzybów nie wykazujące aktywności arginazy nie mogą korzystać z argininy jako jedyne źródła azotu (25, 30, 31). Droga ta występuje również u niektórych bakterii, np. *Bacillus subtilis* (32), podczas gdy u szeregu innych jak *E. coli* i *Mycobacterium*, arginina ulega rozkładowi poprzez agmatynę i 1,4 dwuaminomaślan do spermidyny i sperminy, lub też jak w przypadku *Streptococcus* i *Pseudomonas* przekształceniu przez cytrulinę do ornityny, dzięki obecności deiminazy argininowej (E.C. 3.5.3.6) i OTC (33, 34, 35, 36).

Egzogenna arginina powoduje w komórkach grzybów indukcję syntezy enzymów katabolicznych, arginazy i  $\delta$ -transaminazy ornitynowej (OTA, E.C. 2.6.1.13). W grzybni *A. nidulans* poziom indukowanych enzymów kilkunastokrotnie przewyższa ich poziomy podstawowe, obserwowane w grzybni hodowanej na pożywce nie zawierającej argininy (29). Prócz argininy także homoarginina, cytrulina, kanawanina i lizyna (37) indukują obydwie te enzymy.

Badania kinetyki indukcji arginazy wykazały, że wzrost jej aktywności po dodaniu induktora wynika z syntezy enzymu *de novo*, a nie z aktywacji gotowego prekursora. W temperaturze 30°C i przy czasie podwajania grzybni równym 3,9 godz., czas potrzebny na transkrypcję i translację genu kodującego arginazę wynosi w przypadku *A. nidulans* 11 minut a czas półtrwania arginazowego mRNA wynosi 2,7 minut (38). Porównując te dane z analogicznymi danymi uzyskiwanymi w badaniach np.  $\beta$ -galaktozydazy (E.C. 3.2.1.23) z *E. coli* (39, 40) i uwzględniając różnice w tempie wzrostu badanych organizmów, zauważono daleko idącą zgodność. Wydaje się więc (a nie było to *a priori* oczywistym), że podstawowe procesy związane z indukcją syntezy enzymów w komórkach bakterii i grzybów przebiegają w podobny sposób i charakteryzują się podob-

nymi parametrami. Nie oznacza to jednak, że genetyczna kontrola procesu indukcji była u grzybów równie prosta co u bakterii.

## II. Regulacja genetyczna

### II-1. Geny struktury

Geny struktury wszystkich enzymów drogi biosyntezy argininy zidentyfikowano w chromosomie *E. coli*, a niemal wszystkich w chromosomach *S. cerevisiae*, *N. crassa* i *A. nidulans*. W żadnym z badanych organizmów geny te nie tworzą jednego operonu, lecz występują w różnych miejscach genomu. Jedynie w przypadku *E. coli* 4 spośród 8 genów znajdują się w jednym odcinku chromosomu, ale i one nie stanowią pojedynczego operonu, ponieważ w tym odcinku stwierdzono obecność dwóch operatorów (41, 42). Geny struktury arginazy i OTA zidentyfikowano w przypadku *A. nidulans* (Guzewska, nieopubl., 43), *S. cerevisiae* (25) i *N. crassa* (30, 31, 44). W żadnym z tych organizmów geny struktury arginazy i OTA nie są ze sobą sprzężone. Brak arginazy i OTA nie prowadzi do aukstrofii. Mutanty nie produkujące tych enzymów można wyróżnić na tej zasadzie, że nie mają zdolności do wykorzystywania argininy jako jedynego źródła azotu. Wzrost mutantów bezarginazowych *N. crassa* ulega silnemu zahamowaniu w obecności egzogennej argininy. Fakt ten tłumaczy się tym, że arginina poprzez inhibicję zwrotną blokuje syntezę ornityny, niezbędnego prekursora putrescyny i innych poliamin. Dodanie do pożywki putrescyny przywraca mutantowi bezarginazowemu zdolność do wzrostu w obecności argininy (30). Arginina nie hamuje wzrostu analogicznych mutantów *A. nidulans*. Może to wskazywać na brak lub mniejszą efektywność inhibicji zwrotnej drogi biosyntezy argininy w komórkach *A. nidulans* w porównaniu z *N. crassa*.

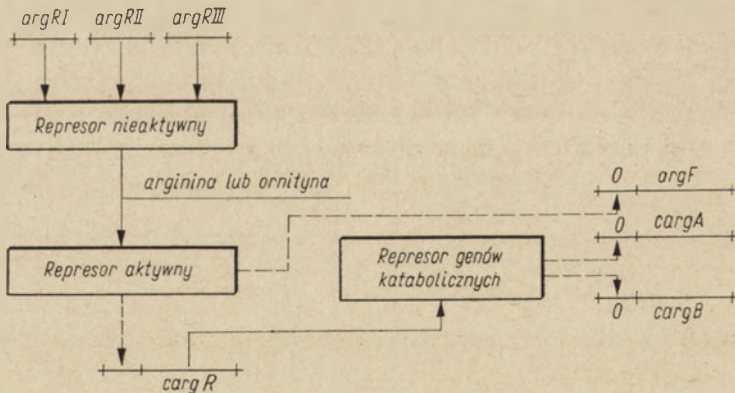
### II-2. Model genetycznej regulacji metabolizmu argininy w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*

Mutacje w genach regulacyjnych, kontrolujących biosyntezę argininy uzyskano w szczepach *E. coli* (45, 46) i *S. cerevisiae* (25, 47). W obu przypadkach zastosowano klasyczną metodę selekcji, polegającą na poszukiwaniu mutantów opornych na toksyczny analog produktu końcowego danej drogi biosyntetycznej. W badaniach nad *E. coli* i *S. cerevisiae* posłużono się kanawaniną, uzyskując mutanty o zderepresjonowanych poziomach enzymów biosyntezy argininy. W przypadku *E. coli* wykazano istnienie jednego genu regulacyjnego, który oznaczono symbolem *argR*, natomiast w przypadku *S. cerevisiae*, trzech genów *argRI*, *argRII* i *argRIII*. Produkt genu *argR E. coli* został zidentyfikowany jako białko o ciężarze cząsteczkowym około 45 000 (48). Prawdopodobnie spełnia on bezpośrednio funkcję

represora syntezy wszystkich enzymów drogi biosyntezy argininy. Postuluje się, że represor *S. cerevisiae* jest kompleksem złożonym z produktów wszystkich trzech zidentyfikowanych genów regulacyjnych (25, 47), ale kompleksu tego nie wyizolowano i nie przeprowadzono badań jego fizykochemicznych właściwości.

Mutacje w dowolnym genie *argR* *S. cerevisiae* prowadzą nie tylko do derepresji enzymów biosyntetycznych, ale również do nieindukcyjności enzymów katabolicznych, arginazy i OTA. Jak więc widać, w komórkach *S. cerevisiae* istnieje wspólna regulacja ana- i katabolizmu argininy nie tylko poprzez kontrolę aktywności enzymów (arginaza jest inhibitorem OTA) ale również ich syntezy. Nieindukcyjność arginazy i OTA w szczepach *argR* powoduje niezdolność do wykorzystywania przez nie argininy bądź ornityny jako jedyne źródła azotu. Właściwość tę wykorzystano do selekcji mutacji w genach bezpośrednio związanych z regulacją syntezy enzymów katabolicznych.

Stosując jako szcep wyjściowy podwójnego mutantu *argRI argRII* poszukiwano rewertantów o przywróconej zdolności do wykorzystywania argininy lub ornityny (gdyby używano pojedynczych mutantów *argR*, to duża część otrzymanych rewertantów powstawałaby w wyniku rewersji mutacji *argR*). Mutanty takie otrzymano i zakwalifikowano do dwóch klas. Pierwszą z nich stanowiły mutanty zdolne do wykorzystywania ornityny jako jedyne źródła azotu lecz nadal niezdolne do wykorzystywania argininy. Mutanty te charakteryzowały się wysoką aktywnością OTA i nieindukcyjnością arginazy. Miejsce mutacji znajdowało się w bezpośrednim sąsiedztwie genu struktury OTA (oznaczonego symbolem *cargB*), a sama



Ryc. 2. Schemat genetycznej regulacji biosyntezy i rozkładu argininy w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* (25)

Represor kodowany przez trzy geny *argRI*, *argRII*, i *argRIII* i zaktywowany przez argininę lub ornitynę blokuje operator (0) genu struktury transkarbamylazy ornitynowej (*argF*). Zaktywowany represor blokuje jednocześnie syntezę represora genów struktury arginazy (*cargA*) i  $\delta$ -transaminazy ornitynowej (*cargB*), który jest produktem genu regulacyjnego *cargR*. Liniami przerywanymi oznaczono na schemacie oddziaływania pomiędzy represorami a operatorami.

mutacja była dominująca. Tak więc mutacje te spełniają kryteria mutacji genu operatora OTA. Drugą klasę mutantów stanowiły mutanty zdolne do wykorzystywania argininy i ornityny i charakteryzujące się podwyższonymi poziomami obu enzymów katabolicznych. Wszystkie mutacje tego typu są recesywne i występują w jednym locus nazwanym *cargR*. Postuluje się, że produkt tego genu stanowi represor syntezy arginazy i OTA.

Wykorzystując mutanty operatorowe OTA (*cargB<sup>+</sup>O*) wyizolowano z kolei szczep o zmutowanym genie operatorze arginazy. Mutant taki w przeciwieństwie do użytego szczepu wyjściowego o genotypie *argRI argRII cargB<sup>+</sup>O* rośnie na podłożu z arginina jako jedynym źródłem azotu.

Tak więc, badania nad *S. cerevisiae* pozwoliły na zidentyfikowanie operatorów genów struktury kodujących dwa kolejne enzymy katabolizmu argininy oraz niesprzężony z nimi gen regulator. Warto zaznaczyć, że jest to pierwszy i jak dotychczas jedyny przypadek wykrycia genów operatorów organizmów eukariotycznych. Wykrycie genów operatorów jak też i innych genów związanych z regulacją metabolizmu argininy w komórkach *S. cerevisiae* jest wynikiem wieloletnich prac prowadzonych przez prof. Wiame'a i jego zespół w Brukseli.

Zgodnie z hipotezą Wiame'a (25) synteza arginazy i OTA podlega dwustopniowej regulacji. Arginina powoduje aktywację kompleksu produkowanego przez geny *argRI*, *argRII* i *argRIII*, który niezależnie od represji genów kodujących enzymy anaboliczne, powoduje represję syntezy (lub inaktywację) produktu genu regulatora katabolizmu (*cargR*), a tym samym odblokowanie genów struktury arginazy i OTA. Innymi słowy, aktywność genów kodujących zarówno enzymy anaboliczne jak i kataboliczne jest pod kontrolą negatywną, z tym, że działanie genu regulatora specyficznego dla katabolizmu zależy od obecności lub braku aktywnego produktu genów regulujących anabolizm argininy. Taki system regulacji genetycznej gwarantuje wzajemne wykluczanie się anabolizmu i katabolizmu argininy: w obecności egzogennej argininy anabolizm ulega wyłączeniu przy jednoczesnym włączeniu katabolizmu, natomiast przy jej braku obserwuje się sytuację odwrotną. Model regulacji metabolizmu argininy w komórkach *S. cerevisiae* jest przedstawiony na rycinie 2.

### II-3. Genetyczna regulacja katabolizmu argininy w komórkach *Aspergillus nidulans*

Mimo pewnych podobieństw, regulacja metabolizmu argininy w komórkach *A. nidulans* wydaje się odbywać na innych niż przedstawione wyżej zasadach. Oporność dzikiego szczepu *A. nidulans* na kanawaninę i szereg innych analogów argininy nie pozwala na otrzymywanie mutantów w genach odpowiedzialnych za regulację biosyntezy argininy. Opracowano natomiast metodę izolowania mutantów w genach regulujących katabolizm.

**Mutantów o zdepresjonowanej syntezie enzymów katabolicznych. Mu-**

tanty prolinowe *A. nidulans* (*proA* i *proB*), zablokowane w pierwszym lub drugim etapie biosyntezy proliny, nie rosną na pożywce minimalnej. Wzrost można uzyskać uzupełniając pożywkę proliną, arginina lub ornityną. Wydaje się więc, że alternatywna droga syntezy proliny (patrz schemat na rycinie 1) funkcjonuje jedynie w warunkach nadmiaru argininy lub ornityny. Mutanty prolinowe rewertują ze stosunkowo dużą częstością (rzędu  $10^{-7}$ ), przy czym większość przypadków rewersji polega nie na mutacjach powrotnych, lecz na mutacjach w genach supresorach (49). Zidentyfikowano dotychczas 22 loci genów supresorowych (50). Mutacje supresorowe nie wykazują specyficzności w stosunku do poszczególnych alleli genów *proA* i *proB* i generalnie biorąc, mechanizm supresji we wszystkich przypadkach polega na uruchomieniu drogi syntezy proliny z argininy lub ornityny, która w szczepach supresorowych funkcjonuje nawet w nieobecności egzogennej argininy lub ornityny. Można to wykazać wprowadzając do szczepu supresorowego mutację *otaA1* (jest to mutacja w genie struktury OTA powodująca całkowitą utratę aktywności enzymu), która znosi działanie supresorów (43).

Mechanizmy działania poszczególnych supresorów różnią się między sobą. Z najprostszym mechanizmem mamy do czynienia w przypadku supresora *suC*, gdzie mutacja dotyczy genu struktury OTC i prowadzi do znacznego obniżenia aktywności tego enzymu (29, 50). Mutanty *suC* rosną wolno na pożywce minimalnej a dodanie argininy stymuluje ich wzrost. W wyniku obniżenia aktywności OTC następuje akumulacja ornityny w grzybni, dzięki czemu aminokwas ten staje się dostępny jako substrat OTA i zostaje wykorzystany do syntezy proliny.

Większość spośród zbadanych mutantów supresorów prolinowych charakteryzuje się wysokimi lub podwyższonymi poziomami enzymów katabolicznych argininy. Tak więc, jako supresory prolinowe można izolować mutanty w genach odpowiedzialnych za regulację syntezy tych enzymów.

Dotychczasowe badania wykazały istnienie siedmiu genów (*suA*, *suD*, *suE*, *suG*, *suH*, *suJ* i *suL*), których mutacje prowadzą do derepresji syntezy arginazy i OTA do poziomu kilkunastokrotnie przewyższającego poziom obserwowany w szczepie dzikim (Tabela 1). Ustalono pozycje na mapie genetycznej niektórych spośród tych genów i wykazano, że nie są one sprzężone ze sobą ani też z genami struktury badanych enzymów (50). Mutacje we wszystkich genach są recesywne, z wyjątkiem mutacji w genie *suG*, które są półdominujące. Występowanie tak dużej liczby genów, których mutacje prowadzą do jednakowej derepresji syntezy obu enzymów, stwarza pierwszą trudność interpretacyjną. O ile przyjmiemy, że jeden z recesywnych genów warunkuje powstawanie specyficznego represora (analogicznego do produktu genu *cargR* *S.cerevisiae*), to jaka jest rola pozostałych? Założenie, że takim represorem jest kompleks produktów sześciu genów, wydaje się mało prawdopodobne. Recesywny charakter mutacji w tych genach skłania do przyjęcia modelu regulacji nega-



tywnej, z kolei właściwości mutantów *suG* mogą wskazywać na istnienie regulacji pozytywnej. Odpowiedź na pytanie czy regulacja enzymów katabolizmu argininy ma charakter negatywny (tzn. jeden lub więcej genów produkuje represor unieczynniany przez argininę) czy też pozytywny (tzn. indukcyjna synteza enzymów wymaga produktu genu np. *suG* zaktywowanego przez argininę), można było otrzymać jedynie w przypadku uzyskania mutantów nieindukcyjnych, allelicznych w stosunku do mutantów o wysokich poziomach badanych enzymów.

**Mutanty o nieindukcyjnych enzymach katabolicznych.** Mutantów takich poszukiwano selekcionując szczepy niezdolne do wykorzystywania egzogennej argininy i ornityny jako źródła proliny lub azotu.

Zastosowana metoda pozwoliła na uzyskanie opisanych wyżej mutantów w genach struktury arginazy i OTA, mutantów permeazowych, a także mutantów regulacyjnych, które oznaczono symbolem *anuA*.

Mutant *anuA1* charakteryzuje się podobnym poziomem podstawowym arginazy i OTA co szczep dziki, jednak arginina nie indukuje w nim syntezy żadnego z tych enzymów. Gen *AnuA* zlokalizowano przy pomocy metody haploidyacji w chromosomie VIII, a następnie mutantą *anuA1* skrzyżowano z mutantem *suG47*, wiedząc że locus genu *suG* znajduje się również w tym chromosomie. Krzyżówkę przeprowadzono w układzie *proA suG anu<sup>+</sup> × proA suG<sup>+</sup> anuA*. Wśród 600 kolonii potomnych nie otrzymano żadnej o genotypie *proA suG<sup>+</sup> anuA<sup>+</sup>*, co uznano za dowód alleliczności mutacji *suG* i *anuA*. Tak więc, mutacje w jednym locus prowadzą do dwóch przeciwstawnych fenotypów: zderepresjonowanej (*suG*) i nieindukcyjnej (*anuA*) syntezy arginazy i OTA. Wszystkie otrzymane allele typu *anuA* są recesywne zarówno w stosunku do alleli *suG* jak i *anuA<sup>+</sup>*.

**Mechanizm genetycznej regulacji katabolizmu argininy.** Celem sprawdzenia zależności pomiędzy poszczególnymi genami supresorowymi otrzymano i przebadano szereg mutantów podwójnych. Uzyskane wyniki wykazały, że efekty mutacji w locus *suG* i mutacji w dowolnym z pozostałych loci są addytywne, tzn. poziom badanych enzymów w podwójnych mutantach jest wyższy niż w każdym z pojedynczych mutantów. Nie zaobserwowano natomiast addytywności efektów mutacji np. w loci *suD* i *suE* lub *suA* i *suD*. Wyniki uzyskane w badaniach niektórych podwójnych mutantów przedstawiono w tabeli 1. Warto podkreślić, że zarówno mutacje w locus *suG* jak i w pozostałych sześciu loci, nie prowadzą do pełnej derepresji syntezy arginazy i OTA. W mutantach tych egzogenna arginina może indukować obydwa enzymy do poziomu obserwowanego w podwójnym mutancie *suG47 suE11* (Tabela 1).

W wyniku krzyżówek otrzymano również podwójne mutanty *suA anuA* i *suD anuA*. W szczepach tych poziom arginazy i OTA jest taki sam jak w szczepach *su<sup>+</sup> anuA* i żaden z enzymów nie ulega indukcji przez egzogenną argininę (Tabela 1). Mutacja *anuA1* jest więc epistatyczna w stosunku do recesywnych mutacji w genach regulacyjnych a produkt genu

Tabela 1

Niektóre własności mutantów *Aspergillus nidulans* o zmienionej regulacji katabolizmu argininy\* (50, 50a)

Szczep	Aktywność		Derepresja OTA w warunkach głodu azotowego lub glukozowego	Indukcyjność arginazy i OTA przez argininę
	arginaza	OTA		
dziki	0,2	7	+	+
<i>suA25</i>	2,1	87	+	+
<i>suD19</i>	1,9	85	+	+
<i>suE11</i>	2,0	80	+	+
<i>suH45</i>	2,1	72	+	+
<i>suJ65</i>	1,9	67	+	+
<i>suL18</i>	2,2	75	+	+
<i>suG47</i>	2,4	48	-	+
<i>anuA1</i>	0,2	6	-	-
<i>suF105</i>	0,2	36	-	+
<i>AniA1</i>	0,2	7	+	- **
<i>suA25 suD25</i>	2,0	92	+	+
<i>suD25 suE11</i>	2,1	85	+	+
<i>suG47 suE11</i>	3,0	200		
<i>suG47 suF105</i>	2,5	45	-	+
<i>anuA1 suD25</i>	0,2	7	-	-
<i>anuA1 suE11</i>	0,2	7	-	-
<i>AniA1 suD25</i>	2,1	80	+	- **
<i>AniA1 suE11</i>	1,9	88	+	- **
<i>AniA1 suF105</i>	0,2	38	-	+

\* Wszystkie dane uzyskano z hodowli grzybni szczepów *A. nidulans* na standartowej pożywce minimalnej. Przy badaniu derepresji pożywka nie zawierała źródła węgla (glukozy) lub azotu ( $\text{NaNO}_3$ ) a przy badaniu indukcyjności zawierała dodatkowo 0,001M argininę. Aktywność enzymów podano w takich samych jednostkach jak na rycinie 4.

\*\* W szczepach posiadających mutację *AniA1* synteza OTA i arginazy ulega indukcji pod warunkiem, że arginina stanowi jedyne źródło azotu lub węgla w pożywce.

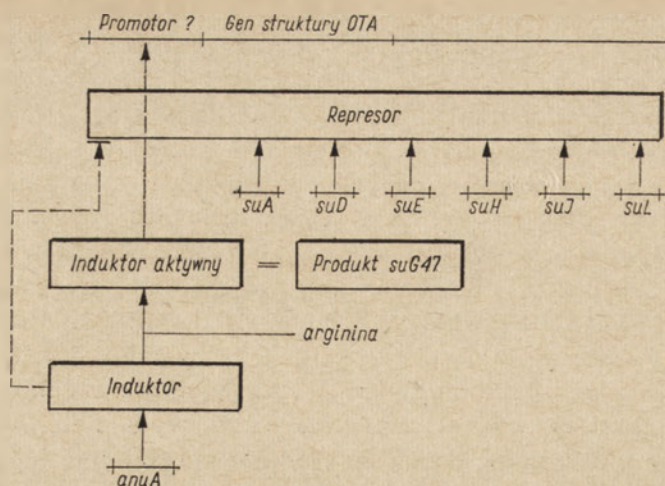
*anuA* okazał się niezbędny aby mogła zajść indukcyjna synteza arginazy i OTA.

Zgodnie z klasycznymi modelami regulacji pozytywnej, opracowanymi w oparciu o wyniki badań prowadzonych nad bakteriami (patrz np. 51, 52), można postulować, że indukcja syntezy arginazy i OTA w komórkach dzikiego szczepu *A. nidulans* polega na aktywacji przez argininę induktora kodowanego przez gen *anuA*. Zaktywowany induktor umożliwia transkrypcję genów struktury arginazy i OTA. Mutacja *suG47* powodowałaby taką zmianę induktora, że nie wymagałby on argininy dla uruchomienia transkrypcji tych genów.

Funkcja sześciu genów typu *suD*, których mutacje prowadzą do ponad 10 krotnej derepresji syntezy arginazy i OTA staje się w świetle dowodów przemawiających za istnieniem systemu regulacji pozytywnej, tym bar-

dziej niezrozumiała. Derepresja ta zachodzi bowiem w nieobecności egzogennej argininy, z czego wynika, że aktywacja produktu genu *anuA* nie stanowi warunku koniecznego aby synteza arginazy osiągnęła poziom obserwowany np. w mutantach *suA25* i *suD19*. Z drugiej jednak strony, epistatyczność mutacji *anuA1* w stosunku do mutacji w genach *suA* i *suD* wskazuje na to, że obecność normalnego produktu genu *AnuA* jest niezbędna aby synteza obu enzymów mogła osiągnąć poziom wyższy niż charakterystyczny dla szczepu dzikiego poziom podstawowy. Powyższe obserwacje nasuwają wniosek, że aktywacja produktu genu *anuA* jest potrzebna jedynie do zlikwidowania bariery uniemożliwiającej transkrypcję genów struktury, która istnieje, o ile wszystkie geny typu *suD* są aktywne. Posiadane dane nie pozwalają na jednoznaczne określenie charakteru tej „bariery”. Jak wspomniano wyżej, wydaje się mało prawdopodobne aby sześć genów kodowało represor specyficznie blokujący operatory genów struktury arginazy i OTA. W przypadku *A. nidulans* nie otrzymano mutantów o właściwościach odpowiadających mutantom operatorowym bakterii czy drożdży, mimo że powinno się je otrzymać np. jako supresory prolinowe. Nie stanowi to oczywiście wystarczającego dowodu aby twierdzić że u *A. nidulans* operatory nie występują. Faktem jest jednak, że badając różne systemy metaboliczne tego organizmu, stwierdza się regulację pozytywną a nie negatywną. Byłoby kuszącym przyjęcie hipotezy, że geny w rodzaju *suD* kontrolują powstawanie niespecyficznych represorów, być może stanowiących stały składnik chromatyny, lub też mają związek z powstawaniem określonego niskocząsteczkowego metabolitu niezbędnego dla utrzymania normalnej struktury chromatyny. W takiej sytuacji mutacje w genach typu *suD* powinny wpływać na aktywność wielu genów, a nie tylko genów związanych z katabolizmem argininy. Badania nad tym zagadnieniem są obecnie w toku. Dotychczas stwierdzono, że wszystkie mutanty typu *suD* charakteryzują się derepresją reduktazy azotanowej (E.C. 1.6.6.3). Ponadto, mutacje w locus *suD* oddziałują na biosyntezę argininy. W mutancie *suD19*, w przeciwieństwie do szczepu dzikiego, obserwuje się tylko nieznaczną derepresję syntezy OTC w warunkach głodu argininowego oraz niewrażliwość syntezy tego enzymu na zwiększanie wewnątrzkomórkowej puli argininy lub ornityny (53). Postulowano, że gen *suD* stanowi gen regulacyjny jednocześnie kontrolujący biosyntezę i rozkład argininy, wydaje się jednak, że mutacje w tym genie mają bardziej plejotropowe efekty. Za tym przypuszczeniem przemawiają również wyniki pracy Arsta i Cove'a (54), którzy wykazali, że mutacja *suD19* znosi niektóre efekty mutacji w genie *areA*, powodujących niezdolność do wykorzystywania wielu różnych źródeł azotu.

Na rycinie 3 przedstawiono schematycznie model regulacji syntezy arginazy i OTA, stanowiący podsumowanie omówionych wyżej zależności pomiędzy kontrolą pozytywną warunkowaną przez gen *anuA* i kontrolą negatywną uzależnioną od sześciu genów typu *suD*. Model ten stanowi



**Ryc. 3.** Schemat zależności pomiędzy mechanizmami pozytywnej i negatywnej regulacji  $\delta$ -transaminazy ornitynowej (OTA) w komórkach *Aspergillus nidulans*

Powstający pod kontrolą sześciu genów represor blokuje gen struktury OTA. Represor ulega usunięciu (unieczynnieniu) przez induktor (produkt genu *anuA*) zaktywowany przez argininę. W przypadku gdy na skutek mutacji w jednym z genów kontrolujących powstawanie represora represor nie tworzy się (lub jest nieaktywny), induktor umożliwia transkrypcję genu struktury nawet w nieobecności argininy. Oddziaływanie pomiędzy induktorem a postulowanym promotorem genu struktury zaznaczono na schemacie linią przerywaną

najprostszą interpretację właściwości zbadanych mutantów regulacyjnych. Zakłada wiązanie się koinduktora (argininy) z induktorem produkowanym przez gen *anuA*. Induktor spełnia dwie funkcje: usuwa bądź unieczynnia represor, którego powstawanie kontrolują geny typu *suD*, a także ułatwia transkrypcję genów struktury. Pierwsza z tych funkcji wymaga aktywacji induktora przez argininę. Do modelu tego powrócimy po omówieniu wpływu represji katabolicznej na syntezę arginazy i OTA.

### III. Represja azotowa i glukozowa

Rozpatrując regulację syntezy arginazy i OTA należy wziąć pod uwagę efekty represji katabolicznej, przy czym w grę może wchodzić zarówno represja azotowa jak i glukozowa.

Zjawisko katabolicznej represji azotowej zostało wykryte stosunkowo niedawno a materiał do badania jej mechanizmu stanowią głównie drożdże i *Aspergillus*. Punktem wyjściowym do badań na tym rodzaju represji było stwierdzenie, że jony amonowe hamują indukcję szeregu enzymów przez specyficzne dla nich koinduktory. Przykładami takich enzymów w przypadku *A. nidulans* są reduktaza azotanowa (54, 55), amidaza (E.C. 3.5.1.4) (56), enzymy katabolizmu puryn (57, 58), egzogenne proteazy (59) a także arginaza i OTA zarówno w przypadku *A. nidulans* (60) jaki i *S. ce-*

*revisiae* (25, 61). Z drugiej strony, usunięcie azotu z pożywki powoduje częściową derepresję syntezy wielu enzymów katabolicznych, w tym również arginazy i OTA w komórkach drożdży (61) oraz OTA (lecz nie arginazy) w komórkach *A. nidulans* (60).

Sole amonowe, podobnie jak wiele innych dobrych źródeł azotu, powodują represję syntezy tych enzymów, nie wiadomo jednak na pewno, czy zjawisko represji przez  $\text{NH}_4^+$  i zjawisko hamowania przez  $\text{NH}_4^+$  indukcji, można sprowadzić do tego samego mechanizmu.

Badając działanie  $\text{NH}_4^+$  na syntezę arginazy i OTA w komórkach *A. nidulans* (60) ustalono że:

1)  $\text{NH}_4^+$  w koncentracjach hamujących indukcję enzymów nie hamuje pobierania argininy z podłoża, a zatem jego efekt na indukcję nie polega na wykluczaniu koinduktora;

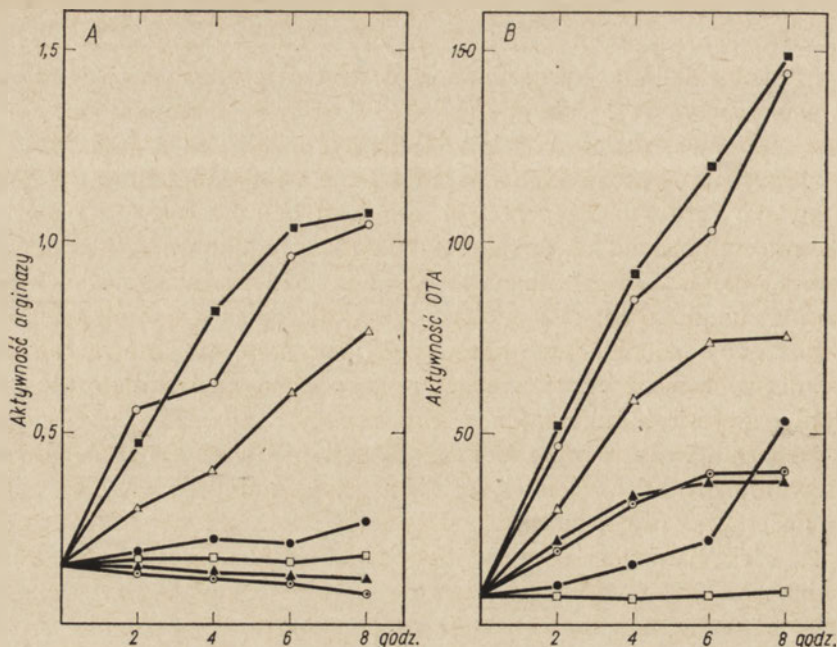
2)  $\text{NH}_4^+$  nie wpływa na proces translacji mRNA odpowiedzialnego za powstawanie arginazy, co wskazuje na to, że hamując syntezę enzymu działa na etapie transkrypcji;

3) Za efekt hamowania indukcji odpowiedzialne są jony amonowe a nie inne niskocząsteczkowe związki azotu.

Brak wpływu  $\text{NH}_4^+$  na translację wykazano w doświadczeniu polegającym na indukowaniu argininy syntezą arginazy w obecności inhibitora syntezy białek (cykloheksimidu) a następnie badaniu efektu obecności  $\text{NH}_4^+$  na pojawienie się aktywności arginazy w grzybni przeniesionej do pożywki nie zawierającej argininy i inhibitora, a zatem w warunkach w których zachodzi synteza enzymu jedynie z zakumulowanego poprzednio mRNA.

Bezpośredni udział  $\text{NH}_4^+$  w hamowaniu indukcji wykazano badając wpływ metyloaminy na syntezę arginazy. Chlorowodorek metyloaminy, jako analog soli amonowych, hamuje indukcję szeregu enzymów katabolicznych (62). Chlorowodorek metyloaminy zapobiega indukcji arginazy przez argininę zarówno w grzybni szczepu dzikiego jak i mutantu *mauA* nie posiadającego aktywnej oksydazy monoamin (E.C. 1.4.3.4), a zatem niezdolnego do rozłożenia metyloaminy. Ponieważ chlorowodorek metyloaminy działa w przypadku mutantu *mauA* równie efektywnie jak w przypadku szczepu dzikiego, można przyjąć że związek ten (a przez analogię  $\text{NH}_4^+$ ) bezpośrednio oddziałuje na indukcję arginazy. Nie można jednak wykluczyć, że  $\text{NH}_4^+$  powoduje aktywację lub indukcję syntezy nieznanego białka, które spełnia rolę represora w syntezie arginazy i innych enzymów katabolicznych. Zagadnienie to będzie rozpatrywane w dalszej części tej pracy.

Synteza OTA w komórkach *A. nidulans* podlega również represji glukozowej. W warunkach głodu glukozowego obserwuje się derepresję syntezy OTA tego samego rzędu co w warunkach głodu azotowego, natomiast synteza arginazy nie ulega derepresji, podobnie jak nie ulega ona derepresji w warunkach głodu azotowego. Synteza obu enzymów wydaje się



Ryc. 4. Aktywność OTA (A) i arginazy (B) w ekstraktach grzybni dzikiego szczepu *Aspergillus nidulans* w różnych warunkach hodowli (60)

Grzybnię wyhodowano na standartowej pożywce minimalnej (MM) zawierającej  $\text{NaNO}_2$  jako źródło azotu i glukozę jako źródło węgla, a następnie przełożono (czas 0 na wykresach) do pożywek: MM ( $\square-\square$ ), nie zawierającej  $\text{NaNO}_2$  ( $\odot-\odot$ ) lub glukozy ( $\blacktriangle-\blacktriangle$ ), zawierającej argininę ( $\triangle-\triangle$ ), zawierającej argininę lecz pozbawionej  $\text{NaNO}_2$  ( $\blacksquare-\blacksquare$ ) lub glukozy ( $\circ-\circ$ ) oraz zawierającej argininę i dodatkowo  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  ( $\bullet-\bullet$ ). Aktywność OTA wyrażono w nmolach semialdehydu kwasu glutaminowego/min/mg białka, a aktywność arginazy w  $\mu\text{mol}$ ach mocznika/min/mg białka

więc identycznie reagować na oba typy głodzenia (Ryc. 4). Wpływ glukozy na syntezę arginazy jest widoczny w doświadczeniach nad indukcję tego enzymu: tempo indukcji na pożywce bezglukozowej jest dużo silniejsze niż na pożywce zawierającej glukozę, przy czym to samo odnosi się do OTA (Ryc. 4). Warto jednak zaznaczyć, że nawet najwyższe stosowane stężenia glukozy w pożywce nie powodowały całkowitego zahamowania indukcji arginazy i OTA, tak jak to się dzieje w przypadku  $\text{NH}_4^+$ .

Represji arginazy i OTA przez glukozę nie stwierdzono u drożdży (61), natomiast synteza obu enzymów jest wrażliwa na glukozę w przypadku *Bacillus licheniformis* (63). Jak wiadomo, mechanizm represji glukozowej u bakterii został w ostatnich latach poznany. Polega on na interakcji określonego białka receptorowego i cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu z promotorami poszczególnych operonów (patrz prace przeglądowe 64, 65, 66). Nie jest wykluczone, że podobny mechanizm występuje u grzybów, ale jak dotąd sprawa nie została wyjaśniona.

### III-1. Genetyczna kontrola procesu represji azotowej

W ostatnich latach w kilku laboratoriach otrzymano niezależnie mutanty *Aspergillus*, *Neurospora*, *Ustilago* i drożdży o zmienionej wrażliwości na represję azotową (54, 58, 59, 62, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76). W przypadku *A. nidulans* wyizolowano na przykład mutanty, w których represji azotowej nie podlegały amidaza (71), NAD zależna dehydrogenaza glutaminianowa (E.C. 1.4.1.2) (72, 73), egzogenna proteaza (59) i reduktaza azotanowa (54). Arst i Cove (54) wykazali, że większość spośród tych mutantów jest ze sobą alleliczna. Warto jednak podkreślić, że poszczególne mutacje w locus *areA* (symbol używany przez Arsta i Cove'a) różnią się znacznie między sobą pod względem efektów na poszczególne systemy enzymatyczne. Stosunkowo najbardziej plejotropowy efekt mają mutacje otrzymane przez Cohena (59) i oznaczone przez niego symbolem *xprD*. Mutacje te powodują derepresję syntezy kilku enzymów, takich jak reduktaza azotanowa, dehydrogenaza ksantynowa (E.C. 1.2.1.37), oksydaza moczanowa (E.C. 1.7.3.3), egzogenna proteaza i amidaza (54). Inne mutacje w locus *areA* wpływają na syntezę tylko jednego lub dwóch z wymienionych wyżej enzymów.

W locus *areA* umiejscowiono również szereg mutacji (oznaczanych symbolem *areA'*) charakteryzujących się niezdolnością do wykorzystywania dużej liczby związków, wykorzystywanych przez szczep dziki jako źródła azotu. Do związków tych należy kilkanaście różnych L-aminokwasów, a także azotan, azotyn, adenina, hipoksantyna, kwas moczowy, alantoina, acetamid i inne. Testy enzymatyczne wykazały, że mutacje typu *areA'* powodują obniżenie poziomu i nieindukcyjność np. reduktazy azotanowej i oksydazy moczanowej. Niektóre spośród mutantów *areA'* są termowrażliwe (tzn. nie wykorzystują określonych źródeł azotu w temperaturze 37°C a wykorzystują w 25°C), przy czym w niższych temperaturach przywracana jest zdolność do wykorzystywania tylko niektórych związków. Biorąc pod uwagę fakt, że mutacje *areA'* są recesywne a mutacje w tym genie prowadzące do derepresji są półdominujące, Arst i Cove (54) postulują, że produkt genu *areA* jest niezbędny do syntezy wszystkich enzymów podlegających represji azotowej. Innymi słowy, postulują istnienie wspólnej, pozytywnej regulacji syntezy tych enzymów.

W toku prac nad *S. cerevisiae* (77) i *A. nidulans* (67) otrzymano jeszcze inny rodzaj mutantów (oznaczonych symbolem *gdh*) niewrażliwych na represję azotową. Są to mutanty w genie struktury NADP zależnej dehydrogenazy glutaminianowej (GDH, E.C. 1.4.1.4). W związku z tym postulowano, że enzym ten niezależnie od swojej funkcji katalitycznej spełnia funkcje regulacyjne, tzn. jest represorem syntezy szeregu enzymów katabolicznych. Interesującym jest fakt, że w komórkach *Klebsiella aerogenes* podobną rolę wydaje się spełniać syntetaza glutaminy (E.C. 6.3.1.2) (78). Jednakże w przypadku *A. nidulans* Arst i Cove (54) wykazali, że

w podwójnym mutancie *areA<sup>r</sup> gdhA*, mutacja *areA<sup>r</sup>* jest epistatyczna. Na tej podstawie twierdzą oni, że produkt genu *areA* jest bezpośrednio zaangażowany w regulację syntezy szeregu enzymów, podczas gdy GDH jedynie pośrednio, być może poprzez regulację poziomu i rozmieszczenia  $\text{NH}_4^+$  wewnątrz komórki. Sprawa roli GDH w represji azotowej wymaga jednak na pewno dalszych badań.

### III-2. Genetyczna kontrola represji azotowej i glukozowej katabolizmu argininy w komórkach *A. nidulans*

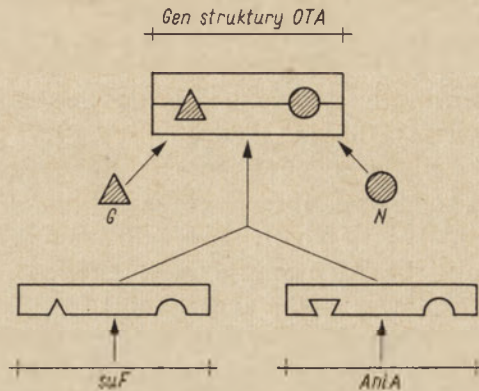
Jak wspomniano wyżej, w grzybni dzikiego szczepu *A. nidulans* w warunkach głodu azotowego lub glukozowego następuje derepresja syntezy OTA (lecz nie arginazy) do poziomu przewyższającego około 4 krotnie poziom podstawowy tego enzymu. Wśród mutantów selekcjonowanych jako supresory prolinowe otrzymano również i takie, które charakteryzowały się podwyższonym (około 4 krotnie) poziomem OTA przy niezmienionym poziomie arginazy (Tabela 1). Dokładniejsze badania przeprowadzono nad mutantami tego typu należącymi do locus *suF* (67). W mutantach *suF* synteza OTA nie ulega dalszej derepresji pod wpływem głodu azotowego lub glukozowego a tempo indukcji obu enzymów przez argininę w grzybni hodowanej na pożywce minimalnej (zawierającej glukozę i  $\text{NaNO}_3$ ) nie różni się od tempa indukcji w grzybni hodowanej na pożywce bezazotowej lub bezglukozowej. Sądzić więc można, że mutacje w locus *suF* prowadzą do jednoczesnego zniesienia wrażliwości katabolizmu argininy na represję azotową i glukozową.  $\text{NH}_4^+$  nadal hamuje jednak indukcję arginazy i OTA w komórkach mutantów *suF*. Obserwacje te wskazują na to, że istnieją dwa (co najmniej) miejsca oddziaływania  $\text{NH}_4^+$  i jony amonowe wpływają na dwa różne procesy. Jednym jest proces derepresji syntezy OTA w warunkach głodu azotowego lub glukozowego ( $\text{NH}_4^+$  hamuje derepresję) a drugim proces indukcji arginazy i OTA przez specyficzny koinduktor, argininę ( $\text{NH}_4^+$  przeciwdziała indukcji). Gen *suF* ma związek jedynie z pierwszym z tych procesów.

Selekcjonując mutanty niezdolne do wykorzystywania argininy jako źródła proliny, otrzymano mutanty oznaczone symbolem *AniA*. W grzybni tych mutantów hodowanej na pożywce minimalnej arginina nie powodowała indukcji syntezy arginazy i OTA. Indukcja obu enzymów w mutantach *AniA* staje się jednak możliwa o ile arginina stanowi jedyne źródło azotu lub węgla w pożywce. Właściwość ta odróżnia mutanty *AniA* od opisanych wyżej mutantów *anuA*, w których indukcja badanych enzymów nie zachodzi, niezależnie od obecności lub braku w pożywce glukozy lub innego niż arginina źródła azotu. Mutacje w locus *AniA* nie powodują więc utraty zdolności do indukcji arginazy i OTA, lecz nadwrażliwość tego procesu na represję glukozową i azotową.

Mutacje *AniA* występują w jednym locus położonym na chromosomie



II (Guzowska, nieopubl.) i nie są sprzężone z żadnym z loci supresorów prolinowych z *suF* włącznie. Wszystkie zbadane mutacje *AniA* mają charakter dominujący, podczas gdy mutacje *suF* recesywne. W warunkach głodu glukozowego lub azotowego w grzybni mutantów *AniA* obserwuje się derepresję syntezy OTA, analogiczną do obserwowanej w grzybni szczepu dzikiego. Podwójny mutant *AniA47 suF105* (Tabela 1) zachowuje wszystkie właściwości mutantu *suF*, tzn., mutacja w locus *suF* jest epistatyczna w stosunku do mutacji w locus *AniA*.



Ryc. 5. Schemat współdziałania genów *suF* i *AniA* w tworzeniu represora genu struktury  $\delta$ -transaminazy ornitynowej (OTA)

Symbolami G i N oznaczono niskocząsteczkowe efektorzy (niezidentyfikowany katabolit glukozowy i metabolit azotowy, prawdopodobnie  $\text{NH}_4^+$ ), których obecność jest niezbędna aby produkty genów *suF* i *AniA* połączyły się w funkcjonalny represor

Funkcję genu *suF* w najprostszy sposób można zinterpretować następująco: gen *suF* kontroluje powstawanie represora, który w obecności efektorów (katabolitu glukozy i niskocząsteczkowego związku azotowego, prawdopodobnie  $\text{NH}_4^+$ ), blokuje transkrypcję genów struktury arginazy i OTA. Usunięcie jednego lub obu efektorów bądź też mutacja w locus *suF*, prowadzą do inaktywacji represora.

Trudniej wytłumaczyć rolę genu *AniA*. Możliwe, że produkt tego genu łączy się bezpośrednio z produktem genu *suF* i stanowi stałą składową część represora, który musi być usunięty aby mogła zajść transkrypcja genów struktury arginazy i OTA. Koncepcję tę przedstawiono schematycznie na rycinie 5. W przypadku otrzymanych i zbadanych mutantów *AniA* represor w wyniku mutacji staje się niewrażliwy na czynnik (być może aktywowany produkt genu *anuA*, patrz następny podrozdział), który w komórkach szczepu dzikiego powoduje inaktywację represora. Takie założenie tłumaczy dominację *AniA* nad *AniA*<sup>+</sup>, a także fakt znoszenia efektów mutacji *AniA* przez głód azotowy lub glukozowy oraz przez mutacje w genie *suF*.

Niezależnie od tego czy powyższą interpretację uznamy za prawidłową, z badań nad mutantami *suF* i *AniA* wpływa jeden istotny wniosek: istnieje

je ścisła zależność pomiędzy represją glukozową i azotową. Pojedyncze mutacje prowadzą albo do jednoczesnego zmniejszenia albo do jednoczesnego zwiększenia wrażliwości na oba typy represji. Nie można obecnie definitywnie odpowiedzieć na pytanie, na czym polega zależność pomiędzy represją azotową i glukozową. Wydaje się, że w grę wchodzi dwie możliwości:

1) Represor powstający pod kontrolą genu regulacyjnego (np. *suF*) posiada powinowactwo do dwóch efektorów, metabolitów glukozowego i azotowego; usunięcie obu lub jednego z nich powoduje inaktywację represora (ten typ interpretacji zastosowano powyżej, patrz rycina 5);

2) Synteza produktu genu regulacyjnego odpowiedzialnego za represję azotową i mającego powinowactwo do efektora azotowego zależy od obecności dobrego źródła węgla. Innymi słowy, represja azotowa mogłaby zachodzić jedynie wtedy gdy występuje represja glukozowa. Tego typu interpretację zależności pomiędzy represją azotową i glukozową faworyzują Arst i Cove (54). Kinghorn i Pateman (79) wykazali, że aktywność GDH, której brak powoduje niewrażliwość syntezy szeregu enzymów na represję azotową, zanika w grzybni *A. nidulans* w warunkach głodu glukozowego. W przypadku udowodnienia bezpośredniego udziału GDH w represji azotowej, fakt ten mocno przemawiałby za słusznością powyższej interpretacji.

W odniesieniu do katabolizmu argininy nie wykazano jakiegokolwiek związku pomiędzy aktywnością GDH a syntezą arginazy i OTA. Zarówno mutanty *suF* jak i mutanty *AniA* nie różnią się pod względem aktywności GDH od szczepu dzikiego (Piotrowska, nieopubl.). Żaden z tych mutantów nie wykazuje też podobieństwa do mutantów genu *areA*. Dotychczasowe badania nie wykazały by mutacje w genach *suF* i *AniA* wpływały na syntezę innych enzymów oprócz arginazy i OTA. Wydaje się więc, że system genetyczny *suF AniA* działa specyficznie w stosunku do katabolizmu argininy.

#### IV. Związek pomiędzy represją kataboliczną a regulacją procesów indukcji i represji syntezy arginazy i OTA w komórkach *A. nidulans*

Na podstawie właściwości mutantów omówionych w poprzednich częściach tego opracowania, geny biorące udział w regulacji syntezy arginazy i OTA w komórkach *A. nidulans* można podzielić na trzy kategorie:

1) Geny, których mutacje są recesywne i powodują kilkunastokrotną derepresję syntezy obu enzymów (*suA*, *suD*, *suE*, *suH*, *suJ* i *suL*);

2) Gen odpowiedzialny za regulację pozytywną, którego mutacje powodują derepresję (*suG47*) lub nieindukcyjność (*anuA1*) syntezy obu enzymów;

3) Geny związane z represją azotową i glukozową (*suF* i *AniA*).

Przeprowadzono badania celem sprawdzenia czy mutacje w genach należących do grup 1 i 2 powodują również zmiany we wrażliwości syntezy arginazy i OTA na represję azotową i glukozową. Okazało się, że w warunkach głodu azotowego lub glukozowego obserwuje się derepresję syntezy OTA w dwóch zbadanych mutantach grupy 1, *suD19* i *suE11*. Tak więc, mimo że w grzybni tych mutantów występuje dużo wyższy poziom OTA niż w grzybni szczepu dzikiego, mechanizm warunkujący wrażliwość na represję azotową i glukozową nie został w wyniku mutacji uszkodzony. W mutantach *suD* i *suE*  $\text{NH}_4^+$  nie hamuje indukcji OTA przez argininę, a nawet powoduje indukcję syntezy tego enzymu, równorzędną do tej jaka występuje po podaniu argininy.

W grzybni mutantu *anuA1* nie obserwuje się derepresji OTA w warunkach głodu azotowego lub glukozowego. W grzybni mutantu *suG47* również nie obserwuje się derepresji OTA w tych warunkach, a ponadto  $\text{NH}_4^+$  nie hamuje indukcji arginazy i OTA przez argininę.

Mutacje w genach zaliczonych do grupy 1, a także mutacja *suG47*, powodują derepresję syntezy OTA do poziomu wyższego niż ten, który obserwuje się w grzybni szczepu dzikiego w warunkach głodu azotowego lub glukozowego. Co więcej, powodują derepresję arginazy, czego nie obserwuje się w czasie głodzenia w szczepie dzikim. Na tej podstawie można twierdzić, że geny te nie mają bezpośredniego związku z mechanizmem represji katabolicznej (azotowej lub glukozowej), a raczej kontrolują proces indukcji. Przedstawione wyżej dane wskazują jednak na to, że w przypadku mutacji *suG47* ulega zniesieniu wrażliwość syntezy badanych enzymów na represję kataboliczną, a w przypadku zarówno tej mutacji jak i mutacji w genach *suD* i *suE*,  $\text{NH}_4^+$  nie hamuje indukcji syntezy tych enzymów. Ta ostatnia obserwacja potwierdza przypuszczenie wysunięte na podstawie badań nad mutantami *suF*, a dotyczące wpływu  $\text{NH}_4^+$  na dwa różne procesy: jeden związany z represją kataboliczną i drugi z indukcją syntezy enzymów przez specyficzny koinduktor, argininę. Gen *suF* ma związek z pierwszym z tych procesów, natomiast geny *suG* oraz *suD* i *suE* z drugim.

Celem ustalenia zależności pomiędzy genami należącymi do trzech wymienionych wyżej grup uzyskano szereg podwójnych mutantów i zbadano ich właściwości (Tabela 1). Wnioski płynące z tych doświadczeń można podsumować następująco:

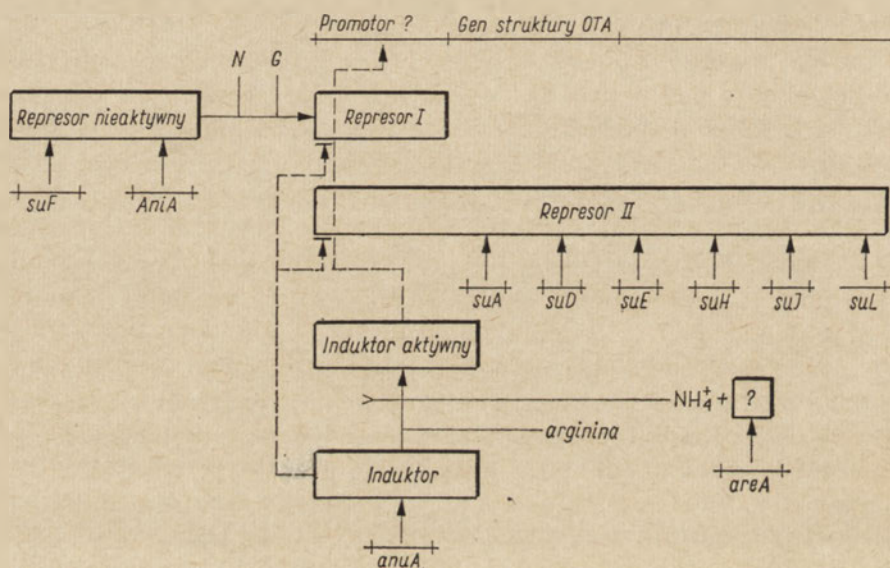
1) Obecność normalnego produktu genu *anuA* (= *suG*) jest niezbędna aby mogła zajść indukcyjna synteza arginazy i OTA, a także derepresja OTA w warunkach głodu azotowego lub glukozowego; mutacja *anuA1* (powodująca brak lub nieaktywność tego produktu) jest w pełni epistatyczna w stosunku do wszystkich pozostałych mutacji regulacyjnych;

2) Efekty mutacji *suF* i *suD* oraz *suF* i *suE* są addytywne, tzn. podwójne mutanty charakteryzują się wyższym poziomem enzymów niż każdy z mutantów pojedynczych. Jak już podawano wyżej, podobną sytuację

obserwuje się w przypadku mutacji *suG* i *suD*, natomiast nie stwierdzono addytywności efektów mutacji *suG* i *suF*, a także addytywności efektów mutacji w genach zaliczonych do grupy 1;

3) Mutacja *AniA1* nie wpływa na poziom enzymów w szczepach *suD* i *suE* ale uniemożliwia dalszą indukcję OTA przez argininę w tych szczepach hodowanych na pożywkach zawierających glukozę i inne niż arginina źródło azotu. W grzybni podwójnego mutantanta *AniA1 suG47* hodowanej na takiej pożywce, arginina indukuje syntezę OTA, ale tempo indukcji jest słabsze niż obserwowane w szczepie *AniA<sup>+</sup> suG47*.

Właściwości pojedynczych mutantów oraz omówione wyżej właściwości mutantów podwójnych, pozwalają na zaproponowanie modelu regulacji syntezy arginazy i OTA, uwzględniającego efekty represji katabolicznej i działanie  $\text{NH}_4^+$ . Model przedstawiono graficznie na rycinie 6.



**Ryc. 6.** Schemat genetycznej regulacji syntezy  $\delta$ -transaminazy ornitynowej (OTA) w komórkach *Aspergillus nidulans* (z uwzględnieniem mechanizmu represji katabolicznej)

Zaznaczono (odwrócona strzałka) hamujący wpływ  $\text{NH}_4^+$  na aktywację induktora przez argininę oraz ewentualny udział w tym procesie produktu genu *areA*. Pozostałe objaśnienia w tekście oraz w podpisach rycin 3 i 5

Model zakłada współlistnienie kontroli pozytywnej i negatywnej. W kontroli negatywnej biorą udział dwa represory. Pierwszy (represor I) powstaje przy współdziałaniu genów *suF* i *AniA* i aby był aktywny wymaga obecności efektorów „azotowego” (prawdopodobnie  $\text{NH}_4^+$ ) i „glukozowego” (tzn. powstającego w warunkach wzrostu grzybni na glukozie). Nie można obecnie wykluczyć możliwości, że nie tylko aktywność ale również synteza represora zależy od jednego lub obu wymienionych efektorów. Inakty-

wacja represora I w wyniku usunięcia jednego z efektorów lub w wyniku mutacji w genie *suF* prowadzi do częściowej derepresji syntezy OTA.

Powstawanie drugiego represora (represor II) zależy od sześciu genów. Represor II nie wymaga korepresora i działa niezależnie od represora I. Funkcje represora II nie polegają tylko na hamowaniu transkrypcji genów struktury arginazy i OTA. Jego inaktywacja (lub inaktywacja jednego z jego elementów) powoduje derepresję syntezy arginazy i OTA a także szeregu innych enzymów.

Kontrolę pozytywną warunkuje gen *anuA* (= *suG*). Produkt tego genu (induktor) ulega aktywacji przez koinduktor, argininę. Aktywacja induktora jest konieczna do usunięcia represorów I i II. W sytuacji gdy na skutek mutacji w genach *suF* i np. *suD* represory te nie powstają (lub są nieaktywne), induktor pozostaje nadal niezbędny aby mogła zajść derepresja genów struktury, ale nie musi być zaktywowany przez argininę.

Jony amonowe hamują aktywację induktora. Można rozpatrywać dwa mechanizmy tego procesu. Albo polega on na bezpośrednim wiązaniu się  $\text{NH}_4^+$  z produktem genu *anuA*, albo oddziaływanie to zależy od obecności produktu jeszcze innego genu (być może zidentyfikowanego przez Arsta i Cove'a genu *areA*). W obu przypadkach zwiększenie koncentracji  $\text{NH}_4^+$  w komórce zapobiega aktywacji induktora przez argininę. Mutacja typu *suG47* prowadzi do tego, że induktor nie wymaga aktywacji do uruchomienia syntezy enzymów w obecności obu represorów. Fakt, że w grzybni mutanta *suG47*  $\text{NH}_4^+$  nie hamuje indukcji arginazy i OTA przez argininę do poziomu wyższego niż charakterystyczny dla tego szczepu potwierdza postulowany wyżej mechanizm działania  $\text{NH}_4^+$ . Brak addytywności efektów mutacji *suG47* i *suF105* oraz brak derepresji OTA w grzybni szczepu *suG47* w warunkach głodu azotowego lub glukozowego, wskazują na to, że produkt genu *anuA* (= *suG*) wyklucza działanie represora I, powstającego między innymi pod kontrolą genu *suF*. Jak wspomniano wyżej, mutacja *suG47* nie prowadzi jednak do maksymalnej derepresji OTA. W grzybni szczepu *suG47* obserwuje się indukcję syntezy tego enzymu po podaniu argininy, a co więcej, poziom OTA w grzybni podwójnego mutantu *suG47 suE11* znacznie przewyższa poziom enzymu w grzybni szczepu *suG47 suE<sup>+</sup>*. Można więc wnioskować, że produkt genu *anuA* w mutancie *suG47* zachował pewne powinowactwo do argininy i może ulec dalszej aktywacji. Aktywacja ta jest konieczna do całkowitego usunięcia represora II. O ile rolę genu *anuA* (= *suG*) przewidziano w proponowanym modelu prawidłowo, to należałoby się spodziewać, że różne mutacje w tym genie będą w różnym stopniu wpływać na poziom omawianych enzymów w komórkach, a także na wrażliwość procesu ich indukcji przez argininę na działanie  $\text{NH}_4^+$ . Założenie to będzie można sprawdzić po uzyskaniu większej liczby mutacji typu *suG47* w locus *anuA*.

Ponieważ poziom arginazy w przeciwieństwie do poziomu OTA nie ulega derepresji w grzybni hodowanej w warunkach głodu azotowego lub

glukozowego i nie jest też podwyższony w komórkach mutantów *su<sup>F</sup>*, należy założyć, że system represji II działa skuteczniej w przypadku genu struktury arginazy niż genu struktury OTA, tak że mimo inaktywacji represora I nie następuje derepresja syntezy enzymu. Udział represora I w regulacji syntezy arginazy staje się jednak widoczny w doświadczeniach nad indukcją enzymu. We wszystkich pozostałych punktach obserwuje się identyczne efekty zarówno poszczególnych mutacji jak i warunków hodowli na syntezę obu badanych enzymów.

Przedstawiony na rycinie 6 model uwzględnia w zasadzie wszystkie efekty mutacji w genach związanych z regulacją syntezy arginazy i OTA. Stanowi on oczywiście jedynie hipotezę roboczą i wymaga dalszego badania zarówno przy użyciu metod genetycznych jak i biochemicznych. Przede wszystkim brak dotychczas informacji dotyczących rodzaju i liczby miejsc w genach struktury (lub w ich sąsiedztwie) wiążących poszczególne represory lub mających powinowactwo do induktora. Zakładając istnienie specjalnego odcinka genu struktury odpowiadającego promotorowi w operonach bakteryjnych, nie wiadomo czy represor(y) wiąże się z tym samym odcinkiem, czy też istnieją niezależne odcinki odpowiadające operatorom. Warto podkreślić, że mimo wypracowania dobrych metod selekcji, w przypadku *A. nidulans* nie otrzymano mutantów operatorowych ani genów katabolizmu argininy jak też reduktazy azotanowej, czy amidazy. U grzybów z reguły występuje pozytywna regulacja syntezy enzymów (80). Według proponowanego w tej pracy modelu, regulacja ta sprowadzałaby się do odblokowania matrycy DNA a nie tylko do nadania specyficzności polimerazie RNA do danego promotora, tak jak to proponuje Englesberg w oparciu o wyniki badań nad operonem arabinozowym *E. coli* (81). Niezależnie od przedstawionych wyżej wyników przemawiających za tą hipotezą, nie jest ona sprzeczna z tym co ogólnie wiadomo o budowie chromosomów organizmów eukariotycznych. Hipoteza stałaby się szczególnie interesująca, gdyby okazało się, że geny w rodzaju *suA* czy *suD* kontrolują powstawanie elementów wchodzących w skład chromatyny.

Powszechność występowania zjawiska pozytywnej regulacji syntezy enzymów indukcyjnych w komórkach grzybów, skłania do rozważenia odmiennej niż dotychczas proponowane koncepcji zależności pomiędzy mechanizmem specyficznej regulacji działania danego genu a mechanizmami regulacji ogólnej (takimi jak represja azotowa i glukozowa), którym podporządkowane jest działanie wielu genów. Wydaje się możliwym, że regulacji ogólnej podlega synteza lub aktywność induktorów specyficznych dla określonych genów lub grup genów. W przedstawionym w tej pracy modelu zaproponowano taką właśnie interpretację działania  $\text{NH}_4^+$ , zakładając zresztą, że oprócz tego istnieje niezależny system regulacyjny (geny odpowiedzialne za powstawanie represora I), którego działanie jest również zależne od poziomu  $\text{NH}_4^+$  w komórce i który bezpośrednio kontroluje transkrypcję badanych genów.

- Przedstawiony model oparto przede wszystkim na wynikach badań genetycznych. Dalsze prace powinny objąć badania nad efektami mutacji w kilku innych genach (50), którymi dotychczas nie zajmowano się, a które są prawdopodobnie również związane z regulacją metabolizmu argininy. W odniesieniu do problemu represji azotowej interesujące wyniki powinno się uzyskać ze zbadania zależności pomiędzy zidentyfikowanymi w różnych laboratoriach genami kontrolującymi przebieg tego procesu. Ostateczna weryfikacja zaproponowanego w tej pracy modelu, czy też innych modeli tłumaczących mechanizm regulacji genetycznej u organizmów eukariotycznych, będzie jednak możliwa dopiero po przeprowadzeniu badań, które pozwoliłyby na bezpośrednie ustalenie charakteru produktów genów biorących udział w regulacji, miejsc ich występowania w komórce i sposobu ich wiązania z niskocząsteczkowymi efektorami. Badania takie są skomplikowane ze względów technicznych a także ze względu na dużą liczbę genów zaangażowanych w regulację syntezy każdego z enzymów, niemniej należy oczekiwać, że w najbliższych latach przyniosą one decydujące rozwiązania.

Artykuł wpłynął dnia 28.1.1974, wrócił po rewizji autorskiej dnia 12.3.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Vogel H. J. (1953) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **39**, 578—583.
2. Udaka S., Kinoshita S. (1958) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**, 272—282.
3. Udaka S. (1966) *J. Bacteriol.* **91**, 617—621.
4. De Deken R. H. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**, 462—466.
5. Vogel R. H., Vogel H. J. (1963) *Genetics* **49**, 914.
6. Cybis J., Piotrowska M., Węgleński P. (1972) *Acta Microbiol. Polon. Ser. A*, **4**, 163—169.
7. Vogel H. J. (1961) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 163—172.
8. Maas W. K. (1961) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 183—191.
9. Gorini L., Gundersen W., Burger M. (1961) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 173—182.
10. De Deken R. H. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 606—616.
11. Lacroute F., Pierard A., Grenson M., Wiame J. M. (1965) *J. Gen. Microbiol.* **40**, 127—142.
12. Bechet J., Wiame J. M., Grenson M. (1965) *Arch. Int. Physiol.* **73**, 137—139.
13. Sussenbach J. S., Strijkert P. J. (1969) *Eur. J. Biochem.* **8**, 403—407.
14. Cybis J., Piotrowska M., Węgleński P. (1970) *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.* **18**, 669—672.
15. Schlesinger S., Magasanik B. (1964) *J. Mol. Biol.* **9**, 670—682.
16. Silbert D. F., Fink G. R., Ames B. N. (1966) *J. Mol. Biol.* **22**, 335—347.
17. Martin R. G. (1969) *Ann. Rev. Genet.* **3**, 181—216.
18. Nazario M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 138—145.
19. Nazario M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 146—152.
20. Celis T. F. R., Maas W. K. (1971) *J. Mol. Biol.* **62**, 179—188.

21. Hirshfield I. N., De Deken R. H., Horn P. C., Hopwood D. A., Maas W. K. (1968) *J. Mol. Biol.* **35**, 83—93.
22. Hoare D. S., Hoare S. L. (1966) *J. Bacteriol.* **92**, 375—379.
23. Vyas S., Maas W. K. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 542—546.
24. Messenguy F., Penninckx M., Wiame J. M. (1971) *Eur. J. Biochem.* **22**, 277—286.
25. Wiame J. M. (1971) *Current Topics in Cellular Regulation* **4**, 1—38.
26. Andersson-Kotto I., Ehrensvar G. (1963) *Hereditas* **50**, 1—52.
27. Davis R. H. (1968) *J. Bacteriol.* **96**, 389—395.
28. Weiss D. (1972) *Neurospora Newsl.* **19**, 12.
29. Węgleński P. (1967) *J. Gen. Microbiol.* **47**, 77—85.
30. Davis R. H., Lawless M. B., Port L. A. (1970) *J. Bacteriol.* **102**, 299—305.
31. Morgan D. H. (1970) *Molec. Gen. Genet.* **108**, 291—302.
32. De Hauver G., Lavalley R., Wiame J. M. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 257—269.
33. Morris D. R., Pardee A. B. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 3129—3135.
34. Stalon V., Ramos F., Pierard A., Wiame J. M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 91—97.
35. Wilson O. H., Holden J. T. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 2737—2742.
36. Zeller E. A., Van Orden L. S., Vogtli W. (1954) *J. Biol. Chem.* **209**, 429—435.
37. Cybis J., Węgleński P. (1969) *Molec. Gen. Genet.* **104**, 282—287.
38. Cybis J., Węgleński P. (1972) *Eur. J. Biochem.* **30**, 262—268.
39. Kepes A. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 293—309.
40. Kepes A., Beguin S. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 546—550.
41. Baumberg S., Bacon D. F., Vogel H. J. (1966) *Genetics* **54**, 322.
42. Jacoby G. A. (1972) *Molec. Gen. Genet.* **117**, 337—348.
43. Piotrowska M., Sawicki M., Węgleński P. (1969) *J. Gen. Microbiol.* **55**, 301—305.
44. Davis R. H., Mora J. (1968) *J. Bacteriol.* **96**, 383—388.
45. Umbarger H. E. (1969) *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 323—370.
46. Jacoby G. A., Gorini L. (1969) *J. Mol. Biol.* **39**, 73—88.
47. Bechet J., Grenson M., Wiame J. M. (1970) *Eur. J. Biochem.* **12**, 31—39.
48. Udaka S. (1970) *Nature* **228**, 336—338.
49. Węgleński P. (1966) *Genet. Res.* **8**, 311—321.
50. Klimczuk J., Węgleński P. (1974) *Acta Microbiol. Polon. Ser. A* **6**, 93—100.
- 50a. Bartnik E., Guzewska J., Węgleński P., — dane niepublikowane.
51. Englesberg E., Irr J., Power J., Lee N. (1965) *J. Bacteriol.* **90**, 946—957.
52. Englesberg E., Squires C., Meronk F. (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **62**, 1100—1107.
53. Cybis J., Piotrowska M., Węgleński P. (1972) *Molec. Gen. Genet.* **118**, 273—277.
54. Arst H. N., Cove D. J. (1973) *Molec. Gen. Genet.* **126**, 111—141.
55. Cove D. J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 51—56.
56. Hynes M. J. (1970) *J. Bacteriol.* **103**, 482—487.
57. Darlington A. J., Scazzocchio C. (1967) *J. Bacteriol.* **93**, 937—940.
58. Scazzocchio C., Darlington A. J. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **166**, 557—568.
59. Cohen B. L. (1972) *J. Gen. Microbiol.* **71**, 293—299.
60. Bartnik E., Węgleński P., Piotrowska M. (1973) *Molec. Gen. Genet.* **126**, 75—84.



61. Middelhoven W. J. (1970) *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **36**, 1—19.
62. Arst H. N., Cove D. J. (1969) *J. Bacteriol.* **98**, 1284—1293.
63. Laishley E. J., Bernlohr R. W. (1968) *J. Bacteriol.* **96**, 322—329.
64. Magasanik B. (1970) w *The Lactose Operon*, red. J. R. Beckwith i D. Zipser, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 189—219.
65. Pastan I., Perlman R. (1970) *Science* **169**, 339—345.
66. Kahl A. (1972) *Post. Biochem.* **18**, 199—223.
67. Arst H. N., MacDonald D. W. (1973) *Molec. Gen. Genet.* **122**, 261—265.
68. Bartnik E., Guzewska J., Węgleński P. (1973) *Molec. Gen. Genet.* **126**, 85—92.
69. Hynes M. J. (1972) *J. Bacteriol.* **111**, 717—722.
70. Hynes M. J., Pateman J. A. (1970) *Molec. Gen. Genet.* **108**, 97—106.
71. Hynes M. J., Pateman J. A. (1970) *Molec. Gen. Genet.* **108**, 107—116.
72. Kinghorn J. R., Pateman J. A. (1973) *J. Gen. Microbiol.* **78**, 39—46.
73. Kinghorn J. R., Pateman J. A. (1973) *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 675—676.
74. Lewis C. M., Fincham J. R. S. (1970) *Genet. Res.* **16**, 151—163.
75. Pateman J. A., Kinghorn J. R., Dunn E., Forbes E. (1973) *J. Bacteriol.* **114**, 943—950.
76. Dubois E., Grenson M., Wiame J. M. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**, 967—972.
77. Grenson M., Hou C. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 749—756.
78. Prival M. J., Brenchley J. E., Magasanik B. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 4334—4344.
79. Kinghorn J. R., Pateman J. A. (1974), *Molec. Gen. Genet.* (w druku).
80. Gross S. R. (1969) *Ann. Rev. Genet.* **3**, 395—424.
81. Englesberg E., Sheppard D., Squires C., Meronk F. (1969) *J. Mol. Biol.* **43**, 281—298.



Andrzej Kaliński\*, Tomasz Mężykowski\*\*, Andrzej Jerzmanowski\*\*\*

## Badania nad strukturą nukleohistonu

### Studies on the Structure of Nucleohistone

#### Wstęp

Trwały kompleks z białkami jest często spotykaną formą występowania kwasów nukleinowych w organizmach żywych. W przypadku kwasów rybonukleinowych przykładem mogą być rybosomy lub kompleksy rybonukleoproteidowe zawierające mRNA. Kwas dezoksyrybonukleinowy występuje w postaci dezoksyrybonukleoproteidu w jądrach organizmów eukariotycznych. Spośród kompleksów DNA-białko stosunkowo najlepiej poznano dezoksyrybonukleoproteidy z jąder komórek organizmów wyższych, znane pod nazwą chromatyny. Termin ten odnosi się zasadniczo do nukleoproteidu jądra interfazalnego, podczas gdy terminu chromosom używa się dla określenia tego samego nukleoproteidu w czasie podziału jądra.

Wielocząsteczkowymi składnikami chromatyny są: DNA, białka zasadowe — histony, białka niehistonowe oraz różnej wielkości fragmenty RNA. Chromatyna zawiera też nieznaczne ilości lipidów oraz jony metali jedno i dwuwartościowych. Zasadniczymi elementami strukturalnymi w tym kompleksie są DNA i histony. (Zagadnienia związane z występowaniem, budową i metabolizmem histonów były już omawiane w *Postęпах Biochemii* (1)).

Stosunek ilościowy DNA: histony w chromatynach pochodzących z różnych tkanek tego samego organizmu oraz z organizmów należących do różnych gatunków a nawet królestw (rośliny i zwierzęta) jest bardzo podobny i w przybliżeniu wynosi wagowo 1:1 (2, 3, 4, 5). Nie stwierdzono też istotnych różnic w stosunku ilościowym DNA : histony między chromatyną a chromosomami z tego samego rodzaju komórek (6).

Biologiczna rola histonów nie jest dotychczas jednoznacznie wyjaśniona. Od dość dawna białkom tym przypisuje się rolę niespecyficznego represora aktywności matrycowej chromatyny (7, 8, 9) mimo iż brak jest na to jak dotąd wiarygodnych, bezpośrednich dowodów. Jednocześnie uważa się, iż histony są niezbędne do organizowania jądrowego DNA

\* Mgr, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego,

\*\* mgr, Instytut Hematologii, Warszawa,

\*\*\* mgr, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

w określone struktury morfologiczne, a co za tym idzie, do segregacji i przekazywania materiału genetycznego. Obie wspomniane funkcje nie muszą się wzajemnie wykluczać.

Niniejszy artykuł poświęcono omówieniu danych dotyczących budowy chromatyny, a ściślej jej strukturalnego szkieletu t.j. nukleohistonu. Dane te, chociaż nie pozwalają jeszcze na zbudowanie kompletnej struktury, rzucają ciekawe światło na zależności między elementami nukleohistonu.

### I. Charakter połączeń składników w nukleohistonie

Histony nie tworzą wiązań kowalencyjnych z DNA. Można je całkowicie usunąć z nukleohistonu przez ekstrakcję roztworem chlorku sodu o odpowiednio wysokiej sile jonowej (10, 11, 12, 13). Zasadniczymi oddziaływaniami między DNA a histonami są typowe wiązania jonowe między grupami zasadowymi aminokwasów: lizyny, argininy i histydyny a resztami fosforanowymi w DNA. Między DNA a histonami w nukleohistonie stwierdzono też występowanie oddziaływań hydrofobowych (14, 15). Ich roli w utrzymaniu struktury nukleohistonu nie zbadano jeszcze całkowicie. Badania nad oddziaływaniem między fragmentami polipetydowymi a dwuniciowym DNA wskazują, iż dzięki oddziaływaniom typowo hydrofobowym możliwa jest interkalacja płaskich, aromatycznych reszt aminokwasowych między płaszczyzny zasad w podwójnej spirali DNA (16). Możliwe są również zewnętrzne oddziaływania hydrofobowe między zasadami a niepolarnymi resztami aminokwasów alifatycznych, przy czym można wskazać nawet na pewną specyficzność tego typu oddziaływań w stosunku do sekwencji peptydu (17). Oddziaływania hydrofobowe między histonami i DNA zależą w dużym stopniu od wielkości odcinków spiralnych w strukturze białka. Wykazano, że największa ilość oddziaływań hydrofobowych występuje między DNA a histonami argininowymi t.j. F3 i F2a1, zawierającymi większy niż pozostałe histony procent spirali  $\alpha$ , najmniejsza natomiast — między DNA a histonem bogatym w lizynę, F1, który ze względu na znaczną zawartość proliny ma niewiele fragmentów spiralnych (14, 15, 17).

Bardzo istotne w ogólnym bilansie wiązań w nukleohistonie są oddziaływania między cząsteczkami histonów. Są to oddziaływania hydrofobowe a prawdopodobnie również i wiązania wodorowe (18, 19). Ze względu na nierównomierny rozkład aminokwasów zasadowych w cząsteczce histonu (20, 21, 22, 23) można np. dla F2a1 lub F1 wyróżnić fragment lub fragmenty bogate w lizynę i argininę, wiążące się silnie, jonowo z DNA. Pozostała część cząsteczki może uczestniczyć w oddziaływaniach białko-białko (18, 19). Szczególną rolę takich oddziaływań między cząsteczkami histonu F1 w kondensacji i dekondensacji chromatyny postulują, na podstawie badań metodą jądrowego rezonansu magnetycznego, B r a d b u r y

i wsp. (18). Kooperatywne wiązanie histonu F2a1 do DNA oraz fałdowanie powstającego kompleksu wymaga warunków umożliwiających agregację cząsteczek F2a1, zatem niezbędne są tu międzycząsteczkowe oddziaływania między hydrofobowymi resztami aminokwasów (19).

Ważnym problemem, dotychczas jednoznacznie nierozwiązanym, jest ustalenie, jaka część DNA w natywnym nukleohistonie pozostaje nieosłonięta histonami. Dotychczasowe badania nad wrażliwością DNA nukleohistonu na działanie DNazy oraz dane z miareczkowania nukleohistonu polilizyną wskazują, że około 50% grup fosforanowych w DNA nie tworzy wiązań jonowych z histonami (24, 25). Jednak wyniki badań nad termiczną denaturacją nukleohistonu pozwalają oszacować ilość nie związanego z histonami DNA tylko na około 20% (26).

Jak dotąd nie udało się wykazać, jaka jest kolejność i wzajemna relacja w ułożeniu poszczególnych histonów względem DNA w nukleohistonie. Nieliczne i pośrednie dane wskazują na możliwość występowania dużych agregatów tego samego rodzaju histonów wzdłuż cząsteczki DNA (19, 27).

Mało mamy również danych co do tego, czy występuje jakakolwiek specyficzność między cząsteczką histonu a sekwencją zasad skompleksowanego z nią odcinka DNA. Ostatnio Clark i Felsenfeld (28) badając skład zasad fragmentów DNA pozostałych po trawieniu DNazą kompleksu zbudowanego z DNA i histonu F2a1 stwierdzili, że we fragmentach tych występuje przewaga par GC. Z drugiej strony badania rentgenograficzne sztucznych kompleksów fagowego DNA i histonów (dodawanych w proporcjach takich jak w nukleohistonie) wskazują, iż ogólna struktura takich kompleksów bardzo przypomina strukturę natywnego nukleohistonu (29). Te ostatnie dane świadczą raczej o braku specyficzności między histonami a sekwencją DNA.

## II. Konformacja cząsteczki nukleohistonu

Zastosowanie hydrodynamicznych metod badania nukleohistonu w roztworze pozwoliło wyznaczyć kształt tej makrocząsteczki (30, 31, 32, 33).

W 1971 roku Henson i Walker (31) dokonali pomiarów lepkości dla natywnego nukleohistonu oraz nukleohistonu z częściowo oddysocjowanymi histonami. Wykazali oni, że natywny nukleohiston i nukleohiston z selektywnie usuniętym histonem F1, zarówno w roztworach o niskiej jak i wysokiej sile jonowej, mają taką samą lepkość wewnętrzną wynoszącą 10dl/g. Niezależność lepkości od siły jonowej wskazuje że obie cząsteczki nukleohistonu — natywna i bez histonu F1 — występują w roztworze w postaci sztywnych pałeczek. Zależność lepkości wewnętrznej od siły jonowej roztworu zaczyna być widoczna dopiero wówczas, gdy oddysocjuje się dalsze frakcje histonów. I tak dla nukleohistonu, z którego wyekstrahowano 75% wszystkich histonów za pomocą roztworu 1M chlorku

sodu, lepkość maleje z 53dl/g w roztworze 0,7mM fosforanu sodu ( $\text{pH} = 7,0$ ) do wartości 31dl/g w 0,6M chlorku sodu, 0,7mM fosforanie sodu ( $\text{pH} = 7,0$ ). Oznacza to, że nukleohiston po usunięciu z niego przez ekstrakcję 1M roztworem chlorku sodu 75% histonów, nie jest już w roztworze sztywną, lecz giętką pałeczką. Nukleohiston zatem zatracza własności hydrodynamiczne sztywnej pałeczki, gdy oprócz histonu F1 zaczynają odysocjować inne histony.

Usunięcie z nukleohistonu wszystkich histonów (ekstrakcja roztworem 2M chlorku sodu) a pozostawienie tylko białek niehistonowych powoduje, że makrocząsteczka przyjmuje konformację półsztywnego kłębaka charakterystyczną dla DNA wolnego. Fakt ten świadczy o tym, że histony, a nie białka niehistonowe, nadają cząsteczce nukleohistonu określoną konformację (31).

Na podstawie danych hydrodynamicznych dokonano ilościowej oceny niektórych parametrów cząsteczki nukleohistonu (31). Przyjmując wartość 10dl/g dla lepkości wewnętrznej cząsteczki nukleohistonu oraz wartość 0,66 ml/g dla objętości właściwej (objętość właściwa =  $N_A V/M$ , gdzie:  $N_A$  — liczba Avogadro,  $V$  — objętość cząsteczki i  $M$  — masa cząsteczkowa), otrzymuje się z równania  $S$  i  $m h a$  (34) stosunki półosi odpowiedniej elipsoidy równe około 170. Lepszym modelem dla cząsteczki nukleohistonu jest cylinder o tej samej długości i masie jak elipsoida. Z dalszych obliczeń mamy: długość cylindra:  $1160 \pm 120\text{nm}$ , średnica  $5,6 \pm 3\text{nm}$  przy masie cząsteczkowej:  $26 \pm 2,6 \times 10^6$ .

Przyjmując masę cząsteczkową DNA w preparatach nukleohistonu na  $11 \pm 1,1 \times 10^6$  (35), otrzymuje się długość DNA w pojedynczej cząsteczce nukleohistonu o masie około  $26 \times 10^6$  wynoszącą około 5 800 nm. Tak więc długość cząsteczki nukleohistonu (1 160 nm) jest znacznie mniejsza niż długość zawartego w niej DNA (5 800 nm). Obliczenia te wskazują wyraźnie, że DNA w nukleohistonie musi być znacznie bardziej upakowany, niż nie związany z histonami DNA, w roztworze.

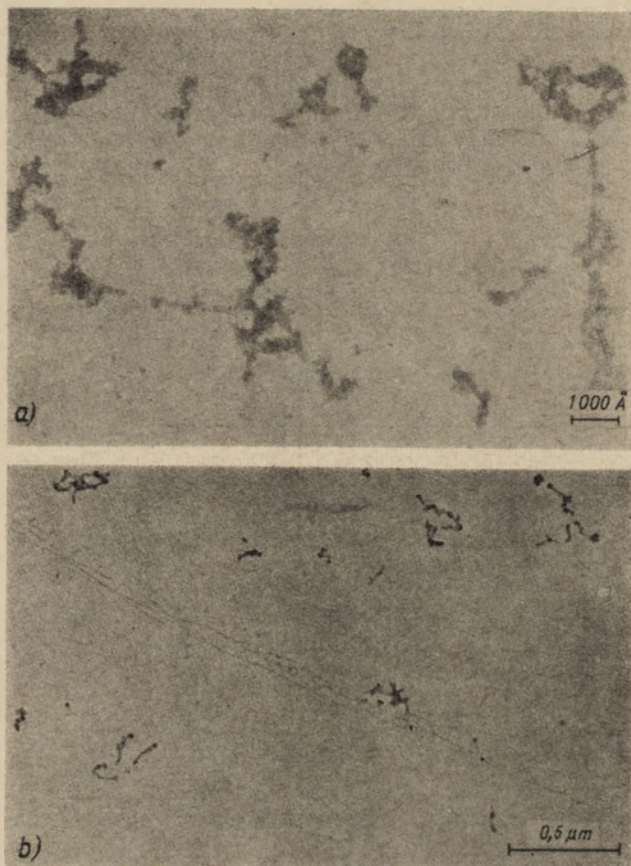
Stopień upakowania DNA w nukleohistonie można w przybliżeniu określić również z danych mikroskopii elektronowej (36, 37, 38, 39). Nukleohiston na typowych elektronogramach wykazuje strukturę siateczkową, w której oprócz wyciągniętych włókien widać liczne zgrubienia i węzły (Ryc. 1a).

Na rycinie 1b przedstawiony jest elektronogram częściowo rozdysocjowanego nukleohistonu. Wydłużone włókna DNA pochodzą wyraźnie z bardziej zwartych fragmentów nukleoproteidowych.

Ostatnio Kreuger i Allison (36) podali wymiary obserwowanych przez siebie pojedynczych włókien: średnica: 8—10nm, długość: od 50 do 500nm.

Włókna nukleohistonu o średnicy około 10nm poddawano mechanicznemu rozciąganiu a następnie badano w mikroskopie elektronowym (37). Okazało się, że na skutek rozciągania średnica włókna maleje aż do gra-

nicznej wartości 2,5—3,0nm. Przy dalszym rozciąganiu następuje zerwanie włókna. Dane te wskazywałyby na to, że włókno o średnicy 10nm nie jest wiązką kilku włókien, lecz jedną w jakiś sposób skręconą lub pofalowaną cząsteczką.



**Ryc. 1a.** Mikrofotografia elektronowa włókien dezoksyrybonukleoproteinowych, **b.** Mikrofotografia elektronowa preparatu dezoksyrybonukleoproteinowego po uprzednim rozdysocjowaniu go w 0,5M octanie amonu — 0,001M EDTA (pH 6,0). Kontrastowanie wykonano octanem uranylu (36)

### III. Struktura DNA i histonów w nukleohistonie

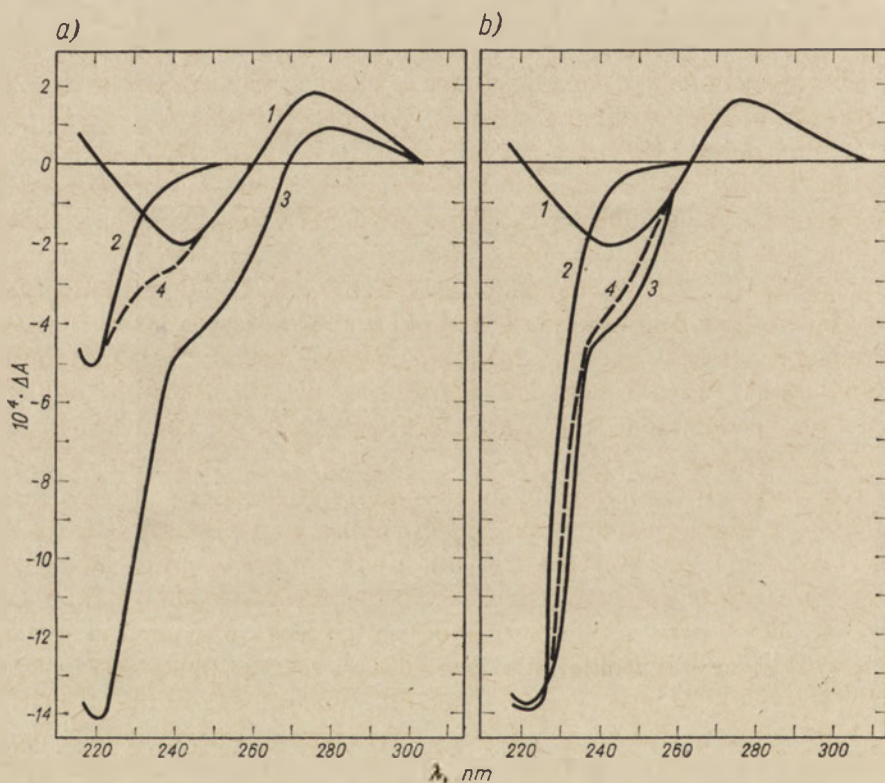
Strukturę DNA i histonów w nukleohistonie bada się wieloma metodami fizykochemicznymi. Jak dotąd jednak najwięcej informacji pochodzi z analizy danych spektropolarymetrycznych oraz z rentgenografii.

#### III-1. Analiza krzywych dichroizmu kołowego

Dyspersja skręcalności optycznej (ORD) — ma ograniczony zasięg stosowalności w badaniach konformacji ze względu na to, że krzywe ORD dla

DNA i histonów zachodzą na siebie (33, 40, 41, 42). Trudno jest zatem stwierdzić, czy przyczyną określonej zmiany w przebiegu krzywej ORD nukleohistonu jest zmiana konformacji DNA, histonów czy obu składników jednocześnie.

Zastosowanie dichroizmu kołowego (CD) pozwala uzyskać bardziej jednoznaczne informacje o strukturze DNA i związanych z nim histonów (43, 44, 45, 46, 47). Optycznie czynne pasmo w zakresie 260nm odpowiada przejściom  $\pi \rightarrow \pi^*$  w zasadach azotowych, zaś pasmo w zakresie około 220nm jest związane z przejściem  $n \rightarrow \pi^*$  w grupach peptydowych. Badając widmo CD nukleohistonu łatwo odróżnić efekty powodowane przez DNA od efektów powodowanych przez białka.



Ryc. 2. Krzywe dichroizmu kołowego DNA, nukleohistonu oraz sumy histonów; a) w  $H_2O$ , pH 6—7,5; b) w 2 M NaCl, pH 7;

(1) — DNA, (2) — histony, (3) — nukleohiston, (4) — suma 1 i 2. (43)

Rycina 2a przedstawia krzywe CD dla nukleohistonu oraz oddzielnie dla DNA i histonów (43). Widmo CD nukleohistonu rejestrowane w wodzie posiada szerokie dodatnie pasmo z maksimum przy 277nm oraz wykazuje niewielkie ujemne ramię przy 245nm i jedno pasmo przy 222nm. Przebieg



krzywej CD nukleohistonu różni się zarówno od krzywej CD dla DNA jak i dla histonów. Widmo nukleohistonu nie jest również prostą sumą widm CD wolnych składników (DNA i histonów). Przesunięcie dodatniego pasma absorpcji w nukleohistonie w stronę czerwieni wraz z obniżeniem wartości  $\Delta A$  (różnica absorpcji światła spolaryzowanego kołowo w lewo i prawo) wskazuje na zmianę struktury DNA w nukleohistonie w stosunku do DNA wolnego. Z kolei w ujemnym zakresie krzywej CD przy 222nm wartość ujemna  $\Delta A$  wzrasta bardzo znacznie w nukleohistonie w porównaniu z natywnymi histonami. Świadczyłoby to o tym, że histony mają większą zawartość struktury spiralnej w stanie związanym w nukleohistonie niż w stanie wolnym w roztworze o tej samej sile jonowej (43). Ram m i wsp. (43) na podstawie widm CD oceniają zawartość spirali  $\alpha$  w histonach związanych z DNA na 25%, co jest zgodne z danymi Oriela (40) uzyskanymi za pomocą ORD.

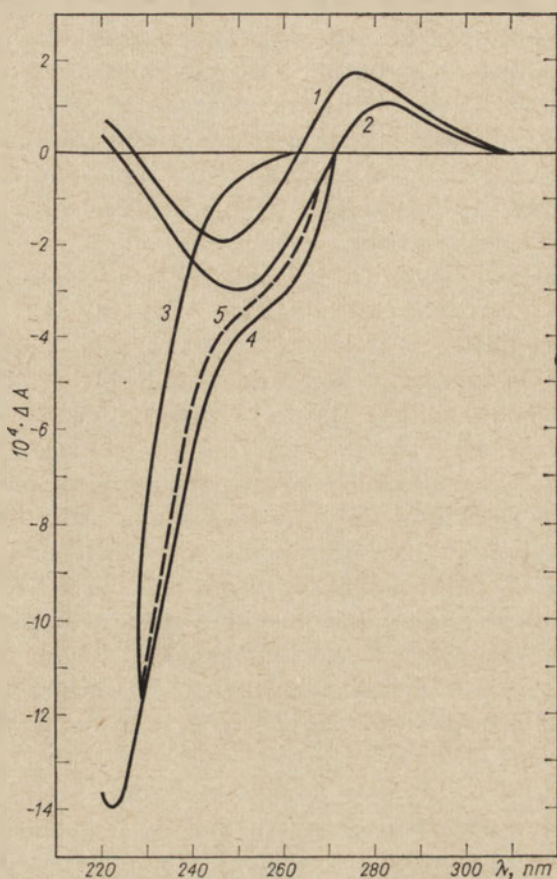
Rozdysocjowanie natywnego kompleksu nukleohistonu w roztworze 2M chlorku sodu powoduje zmianę krzywej CD nukleohistonu w zakresie powyżej 260nm do postaci charakterystycznej dla wolnego DNA. (Ryc. 2b). Z rysunku widać, iż w warunkach całkowitego rozdysocjonowania nukleohistonu otrzymuje się widmo CD, które jest sumą widm DNA i histonów.

Istotne jest pytanie, jaka forma podwójnego heliksu DNA występuje w nukleohistonie. Z porównania krzywych CD dla DNA w roztworach o wysokim stężeniu soli i dla nukleohistonu w niskim stężeniu soli wynika, że przebieg tych krzywych w zakresie powyżej 260nm jest zasadniczo podobny (43, 47) (Ryc. 3). Fakt ten sugeruje, że struktura DNA w nukleohistonie jest podobna do tej, jaką DNA przyjmuje w roztworach soli o wysokim stężeniu.

W roztworach o wysokiej sile jonowej następuje częściowa dehydratacja DNA (43), która powoduje określone zmiany w geometrii podwójnego heliksu. Wiadomo, że obniżenie względnej wilgotności w preparatach soli litowej DNA powoduje przejście formy B w formę C (48). Widmo CD soli litowej DNA przy niskiej względnej wilgotności przypomina widmo DNA w roztworze o wysokiej sile jonowej (4–6M NaCl). Identyczny zaś przebieg krzywej CD obserwuje się, jak już wspomniano wyżej, dla DNA w nukleohistonie w roztworze o niskiej sile jonowej. Przedstawione dane umożliwiają jednoznaczne wnioskowanie o tym, że DNA w nukleohistonie występuje w formie zbliżonej do formy C (43, 47).

Jednakże taki wniosek pozostaje w tej chwili w pewnej sprzeczności z danymi uzyskanymi metodą dyfrakcji promieni X. Analiza dyfrakcji rentgenowskiej (punkt III-2) wskazuje bowiem, że DNA w nukleohistonie występuje w formie B. Obecnie dość trudno jest wytłumaczyć tę sprzeczność co do formy DNA w nukleohistonie między danymi CD a dyfrakcją rentgenowską. Mógłby to być, między innymi, efekt różnych warunków eksperymentalnych, zwłaszcza siły jonowej, stosowanych w obu metodach (43).

Badanie własności krzywych CD nukleohistonu i jego wolnych składników wyraźnie wskazuje na to, że zarówno DNA jak i histony wpływają wzajemnie w istotny sposób na swoją konformację w nukleohistonie.



**Ryc. 3.** Krzywe dichroizmu kołowego DNA, sumy histonów oraz nukleohistonu w różnych stężeniach NaCl.

(1) — DNA w 0,007M NaCl, (2) — DNA w 4M NaCl, (3) — histony w 2M NaCl, (4) — nukleohiston w H<sub>2</sub>O, (5) — suma 2 i 3, (43)

### III-2. Analiza rentgenograficzna

Badania rentgenograficzne nukleohistonu wykonywano od dość dawna w pracowniach Wilkinsa (1959) (49, 59, 51) oraz Luzzatiego i Nicolaieff'a (1959, 1963) (52, 53). Interpretacje rentgenogramów w kategoriach struktury różnią się jednak dość znacznie a przy tym nie tłumaczą dostatecznie wszystkich właściwości obrazu dyfrakcyjnego (49).

Sama metodyka otrzymywania obrazów rentgenowskich jest podobna do tej, jaką stosowano dla DNA (54, 55). Nukleohiston, pochodzi zazwyczaj z grasicy cielęcej i jeśli nie jest uprzednio poddawany ekstrakcji kwasem lub solą, zawiera DNA i histony w stosunku 1:1.

Dla zorientowanych włókien nukleohistonów otrzymuje się obrazy rentgenowskie stosując metodę rozpraszania pod dużymi kątami. Ostatnio stosuje się często metodę rozpraszania pod małymi kątami pozwalającą uzyskać rentgenogramy rozcieńczonych roztworów nukleohistonów.

W 1967 roku Pardon, Wilkins i Richards (50) opierając się na wynikach badań rentgenograficznych, zarówno dla wysokokątowej jak i niskokątowej dyfrakcji, opublikowali model przypisujący cząsteczce nukleohistonu strukturę regularnej superspirali. Modelu tego dotychczas jednoznacznie nie udowodniono, tym niemniej pozostaje on jak dotąd najbardziej atrakcyjną hipotezą dla struktury nukleohistonu. Poniżej przedstawiono skrótowo najważniejsze przesłanki oraz opis modelu.

Obrazy dyfrakcyjne uzyskiwane dla zorientowanych włókien i nieorientowanych żeli, przy wysokiej względnej wilgotności, składają się z trzech rodzajów elementów:

- 1) grupy refleksów pochodzących od DNA zawartego w nukleohistonie — grupa ta składa się głównie z równikowych refleksów różniących się położeniem (od 21 do 35Å) w zależności od względnej wilgotności oraz z refleksów o położeniu 11Å, 8Å, 3,4Å.

Orientacja refleksów nie jest tak wyraźna jak dla czystego DNA lub DNA w nukleoprotaminie, jakkolwiek ich zmienność w zależności od względnej wilgotności przypomina analogiczną zmienność dla DNA i DNA w nukleoprotaminie.

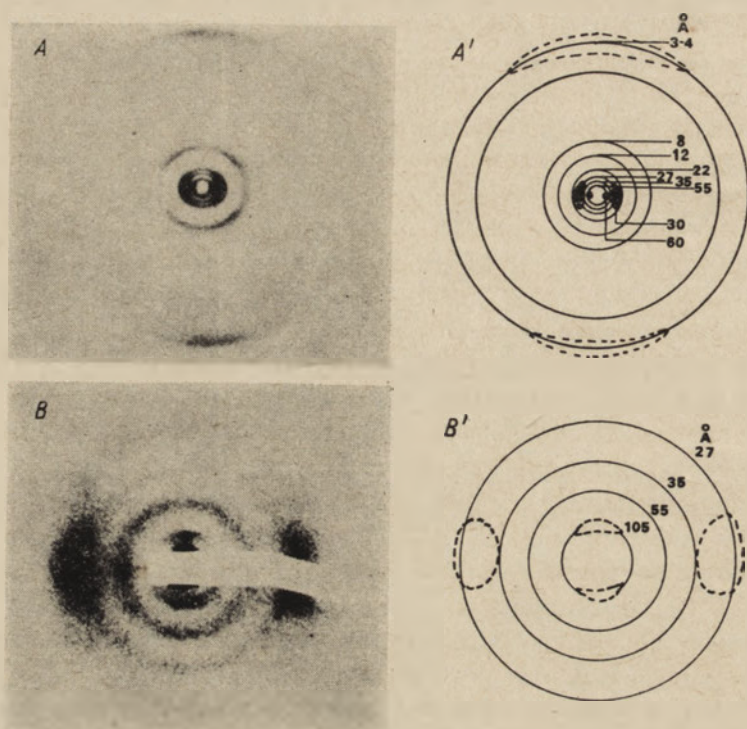
- 2) refleksów charakterystycznych dla nukleohistonu — obserwuje się refleks przy 110Å oraz jego podwielokrotności (55Å, 37Å, 27Å, 22Å i 18Å) przy względnej wilgotności preparatu powyżej 98%. Przy obniżeniu względnej wilgotności, czyli wzroście stężenia nukleohistonu w próbce, następuje generalnie przesunięcie względnej intensywności ku refleksom o większych kątach rozpraszania. Już redukcja względnej wilgotności do 98% powoduje zniknięcie refleksu przy 110Å a odpowiednia redukcja do 92% — również znaczne osłabienie refleksu przy 55Å. W bardzo stężonych roztworach nukleohistonu (względna wilgotność poniżej 75%) cała seria refleksów stanowiących podwielokrotność 110Å zanika, pojawiają się natomiast szerokie pasma przy około 76Å i 36Å. W przypadku włókien refleksy te wykazują lekko południkową orientację.

- 3) równikowego, dobrze zorientowanego refleksu przy 60Å, przypisywanego lipidom wchodzącym w skład preparatu.

Rycina 4 przedstawia rentgenogramy i ich schematy uzyskane przez Pardona i Richardsa w 1970 roku (54) (położenie niektórych refleksów nieco inne niż podawane wcześniej (49)). Autorzy uznają, iż obecność charakterystycznego obrazu rozpraszania pod niskimi kątami, nie dawanego osobno przez DNA ani przez histony, wynika z występowania regularnej trzeciorzędowej struktury cząsteczki DNA w nukleohistonie.

Słaba orientacja obrazu dyfrakcyjnego pochodzącego z DNA (punkt 1)

wskazuje na to, że cząsteczki podwójnej spirali są złożone lub zwinięte tak że nie mogą się rozprostować wzdłuż osi włókna (49). Richards i wsp. przyjmują, iż najbardziej prawdopodobną, trzeciorzędową strukturą jest



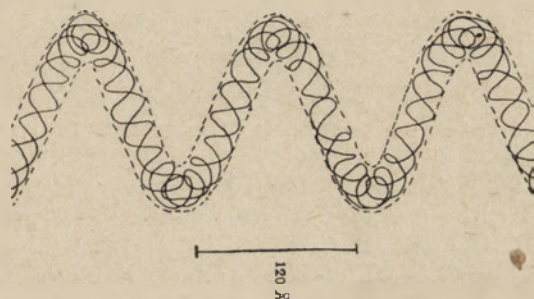
**Ryc. 4.** Rentgenogramy natywnego nukleohistonu. (A) — rozpraszanie pod dużymi kątami na włóknach, względna wilgotność 98%; (B) — rozpraszanie pod małymi kątami na żelu, względna wilgotność 100%. Obok zdjęć zamieszczone są odpowiednie diagramy (54)

w tym przypadku spirala. Struktura taka jest w istocie superspiralą, ponieważ zbudowana jest z podwójnej spirali DNA (Ryc. 5). Wykonując obliczenia transformacji Fouriera dla układów modelowych według zasad podanych w pracy Cochran, Cricka i Vand'a (56). Richards i wsp. stwierdzili najlepszą zgodność między obliczonym a obserwowanym rozproszeniem dla superspirali o średnicy 100Å, skoku — 120Å i kącie wznoszenia linii śrubowej — 21Å. Model taki odpowiadałby strukturze nukleohistonu w rozcieńczonych roztworach. Poważną trudność interpretacyjną stanowi jednak obserwowane zanikanie refleksów serii 110Å w stężonych roztworach nukleohistonu.

Wilkins i Pardon przypisują ten efekt tworzeniu się specyficznych agregatów superspiralnych włókien w roztworach o wyższym stężeniu (49). Obliczenia prowadzone przy założeniu pewnego typu agregacji wydają się być zgodne z obserwowanymi zmianami intensywności reflek-

sów. Wyjaśnienie to nie daje jednak pewnej odpowiedzi na pytanie, w jaki dokładnie sposób agregują poszczególne superspirale, ponieważ obserwowane zmiany można przypisać również i innym typom ułożenia (49). Część krystalografów nie zaprzeczając samej idei superspirali wydaje się mieć wątpliwości co do szczegółów modelu, zwłaszcza co do wyjaśnienia zachowania się włókien nukleohistonowych w stężonych roztworach (37, 57).

Z rentgenograficznych badań Pardona i Richardsa (54) nad strukturą nukleohistonów pozbawionych przez selektywną ekstrakcję określonych rodzajów histonów wynika, że szczególną rolę w utrzymywaniu struktury DNA odgrywa histon F2a1 (bogaty w argininę). Odwrotnie, histon bogaty w lizynę — F1 wydaje się nie wpływać lub wpływać w niewielkim stopniu na istnienie superspirali (58).



Ryc. 5. Model superspiralnej struktury nukleohistonu wg Wilkinsa i wsp. (49, 50, 54)

Do tej pory nie ustalono jeszcze jednoznacznie do jakiego stopnia w utrzymywaniu superspirali istotne są oddziaływania białko-białko.

### Podsumowanie

Przedstawione wyżej wyniki eksperymentalne dotyczące struktury nukleohistonu można interpretować jednoznacznie tylko w ograniczonym zakresie.

Nie ulega wątpliwości, w związku z wynikami badań hydrodynamicznych i optycznych, że DNA w nukleohistonie przyjmuje pod wpływem histonów określoną strukturę trzeciorzędową, różniącą się od struktury wolnego DNA większym stopniem zwartości (upakowania). Wydaje się też nie ulegać wątpliwości, że istnieje wzajemny wpływ DNA na strukturę przestrzenną histonów.

Potrzeba wciąż jeszcze dużej ostrożności w określaniu wpływu poszczególnych frakcji histonów na strukturę trzeciorzędową DNA w nukleohistonie. Stosunkowo najmniejszą rolę odgrywa tu prawdopodobnie histon F1, natomiast kluczowe znaczenie może mieć histon F2a1.

Struktura nukleohistonu ma najprawdopodobniej postać spirali wyższego rzędu niż podwójna spirala DNA. Potrzebne są jednak dalsze dowody by można było przyjąć szczegółowy model superspirali proponowany przez Wilkinsa i wsp. Jednoznaczne wykazanie, że superspirala jest regularna na całej długości (podobnie jak regularna jest podwójna spirala DNA) miałyby bardzo istotne znaczenie dla interpretacji struktury i funkcji genomu.

Intensywność prowadzonych obecnie badań nad strukturą nukleohistonu oraz waga tego problemu pozwalają oczekiwać nowych, ważnych wyników w ciągu najbliższych lat.

*Artykuł wpłynął dnia 7.2.1974, wrócił po rewizji autorskiej dnia 19.3.1974.*

## PIŚMIENNICTWO

1. Kłyszajko-Stefanowicz L., Bartkowiak J., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 347—388.
2. Marushige K., Bonner J., (1966), *J. Mol. Biol.*, **15**, 160—174.
3. Shih T. Y., Bonner J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **182**, 30—35.
4. Huang R. C. C., Huang P. C., (1969), *J. Mol. Biol.*, **39**, 365—378.
5. Ochalska-Czepulis M., Toczko K., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 347—351.
6. Shih T. Y., Lake R. S., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4811—4817.
7. McClure M. E., Hnilica L. S., (1972), *Sub-Cell. Biochem.*, **1**, 311—332.
8. Bolund L. A., Johns W. E., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 546—553.
9. Cedar M., Felsenfeld G., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 237—254.
10. Georgiev G. P., Ananieva L. N., Kozlov J. V., (1966), *J. Mol. Biol.*, **22**, 365—371.
11. Ohlenbush H., Olivera B., Tuan D., Davidson N., (1967), *J. Mol. Biol.*, **25**, 299—315.
12. Fambrough D., Bonner J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 601—603.
13. Kleiman L., Huang R. C. C., (1972), *J. Mol. Biol.*, **64**, 1—8.
14. Bartley J. A., Chalkley R., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3647—3655.
15. Kaliński A., Toczko K., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21** 67—72.
16. Novak R. L., Dohnal J., (1973), *Nature, New Biology*, **243**, 155—156.
17. Gabbay E. J., Sanford K., Baxter C. S., Kapicak L., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4021—4029.
18. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W. E., (1973), *Nature*, **243**, 123—126.
19. Ziccardi R., Schumaker V., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3231—3235.
20. Bustin M., Rall S. C., Stellwagen R. H., Cole R. D., (1969), *Science*, **163**, 391—393.
21. DeLange R. J., Hooper J. A., Smith E. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3261—3274.
22. Palan J., Padros E., (1972), *FEBS Letters*, **27**, 157—160.
23. Olson M. O. J., Jordan J., Busch H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 50—53.
24. Clark R. J., Felsenfeld G., (1971), *Nature, New Biology*, **229**, 101—106.

25. Kaliński A., Seyfried A., Toczko K., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 377—382.
26. Li H. J., Chang C., Weiskopf M., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1763—1772.
27. Varshavsky A. J., Georgiev G. P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **281**, 669—674.
28. Clark R. J., Felsenfeld G., (1972), *Nature New Biology*, **240**, 226—229.
29. Baldwin J. P., Bradbury E. M., Butler-Browne G. S., Stephens R. M., (1973), *FEBS Letters*, **34**, 133—136.
30. Henson P., Walker I. O., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **14**, 345—350.
31. Henson P., Walker I. O., (1971), *Eur. Biochem.*, **22**, 1—4.
32. Toczko K., Dobrzańska M., Chmielewska I., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 19—24.
33. Sponar J., Boublik M., Frič I., Šormova Z., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **209**, 532—540.
34. Simha R., (1940), *J. Phys. Chem.*, **44**, 25—27.
35. Zubay G., Doty P. J., (1959), *J. Mol. Biol.*, **1**, 1—20.
36. Krueger R. C., Allison D. P., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 259—266.
37. Bram S., Ris H., (1971), *J. Mol. Biol.*, **55**, 325—336.
38. Toczko K., Jaźwiński S. M., (1971), *Acta Biochim. Polon.*, **18**, 31—38.
39. Ris H., (1967) w *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis* red. Koningsberger V. V., Bosch L., str. 11—12, Elsevier, Amsterdam.
40. Oriel P. J., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 577—582.
41. Bradbury E. M., (1969), *Biochem. J.*, **114**, 49—51.
42. Tuan D. Y. H., Bonner J., (1969), *J. Mol. Biol.*, **45**, 59—76.
43. Ramm E. I., Vorob'ev V. I., Birshtein T. M., Bolotina I. A., Volkenshtein M. V., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 245—253.
44. Permogorov V. I., Debabov V. G., Sladkova I. A., Rebentish B. A., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **199**, 556—558.
45. Simpson R. T., Sober H. A., (1970), *Biochemistry*, **9**, 3103—3109.
46. Wagner T., Spelsberg T. C., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2599—2605.
47. Shih T. Y., Fasman G. D., (1970), *J. Mol. Biol.*, **52**, 125—129.
48. Marvin D. A., Spenser M., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., (1961), *J. Mol. Biol.*, **3**, 547—565.
49. Pardon J. F., Wilkins M. H. F., (1972), *J. Mol. Biol.*, **68**, 115—124.
50. Pardon J. F., Wilkins M. H. F., Richards B. M., (1967), *Nature*, **215**, 508—509.
51. Wilkins M. H. F., Zubay G., Wilson H. R., (1959), *J. Mol. Biol.*, **1**, 179—185.
52. Luzzati V., Nicolaieff A., (1959), *J. Mol. Biol.*, **1**, 127—133.
53. Luzzati V., Nicolaieff A., (1959), *J. Mol. Biol.*, **7**, 142—163.
54. Richards B. M., Pardon J. F., (1970), *Exptl. Cell Res.*, **62**, 184—196.
55. Feugelman M., Langridge R., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Barclay R. K., Hamilton L. D., (1955), *Nature*, **175**, 834—838.
56. Cochran W., Crick F. H. C., Vand V., (1952), *Acta Cryst.*, **5**, 581—586.
57. Histones, Favourite Models (from a Correspondent), (1973), *Nature, New Biology*, **243**, 1.
58. Skidmore C., Walker I. O., Pardon J. F., Richards B. M., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 175—178.



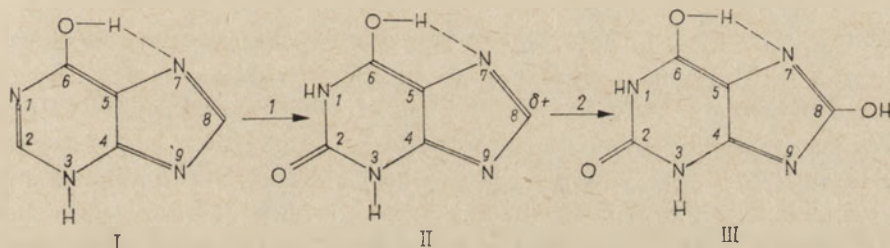


MARIA MONIKA JEŻEWSKA \*

## Mechanizm działania i rola oksydoreduktaz ksantynowych

### Mechanism of Action and Role of Xanthine Oxidoreductases.

Oksydoreduktazy ksantynowe, katalizujące reakcje hydroksylacji rozmaitych substratów z jednoczesną redukcją akceptorów elektronów, są szeroko rozpowszechnione w tkankach zwierząt kręgowych i bezkręgowych oraz w drobnoustrojach. Główną rolą fizjologiczną tych enzymów jest katalizowanie hydroksylacji hipoksantyny do ksantyny i z kolei — do kwasu moczowego (schemat 1) w końcowym etapie przemiany związków purynowych; enzymy te biorą także udział w przemianie pterydyn — barwników skrzydeł owadzi.



**Schemat 1.** Hydroksylacja hipoksantyny przez oksydoreduktazy ksantynowe

Hipoksantyna (I) i ksantyna (II) w formach tautomerycznych ulegających hydroksylacji (42) do kwasu moczowego (III). W reakcjach tych nie ustala się stan równowagi, przebiegają one praktycznie aż do wyczerpania substratu i są nieodwracalne (2,5)

Dwie kolejne reakcje hydroksylacji hipoksantyny, obie katalizowane przez te same oksydoreduktazy ksantynowe, mają swoisty przebieg, charakteryzujący się nagromadzeniem produktu pośredniego — ksantyny (1, 2, 3, 4). Zależność między stężeniem hipoksantyny i enzymu a ilością nagromadzającej się ksantyny (2, 5) nasuwa myśl o roli oksydoreduktaz ksantynowych w regulacji przemiany purynowej, roli, której dotychczas nie brano pod uwagę (6, 7, 8).

\* Dr habil., Zakład Biochemii Porównawczej, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa.

Wykaz używanych skrótów: Hyp — hipoksantyna, Xan — ksantyna, Uri — kwas moczowy, PRPP — 5-fosforybozylo-1-pirofosforan, FAD — dwunukleotyd flawinoadeninowy, NAD — nukleotyd nikotynamidowy, Fe/S — chromofor żelazowo-siarkowy w oksydazie ksantynowej.

Badania nad oksydoreduktazami ksantynowymi trwają już prawie 70 lat, od wykrycia w 1905 roku przez Buriana (cyt. za 9) oksydazy ksantynowej w mleku. Enzymy te odznaczają się wyjątkowo skomplikowaną budową centrów aktywnych, zawierających aż cztery składniki biorące udział w katalizie: dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD) znaleziony w cząsteczce oksydazy ksantynowej w 1939 roku, atomy molibdenu i żelaza, wykryte w latach 1953—1954 (9, 9a) oraz ugrupowanie nadsiarczkowe, którego obecność stwierdzono dopiero w 1972 roku (10). W latach 60-tych uzyskano wiele danych o reakcjach oksydoredukcyjnych zachodzących w centrum aktywnym oksydoreduktaz ksantynowych, stosując technikę szybkiego zamrażania mieszaniny reakcyjnej (pozwala ona badać przebieg reakcji w odstępach czasu rzędu milisekund) (11) w połączeniu z badaniem kolejności pojawiania się sygnałów elektronowego rezonansu paramagnetycznego wysyłanych przez zredukowane składniki centrum aktywnego. Dane te stały się podstawą nowego schematu działania centrum aktywnego oksydoreduktaz ksantynowych.

### I. Oksydazy i dehydrogenazy ksantynowe

Zależnie od rodzaju naturalnego akceptora elektronów wśród oksydoreduktaz ksantynowych wyróżnia się oksydazy współdziałające z tlenem i dehydrogenazy redukujące dwunukleotyd nikotynamidowy (NAD) lub ferredoksynę — niehemowy żelazoproteid. Specyficzność dehydrogenaz względem tych akceptorów nie jest absolutna, w niewielkim stopniu mogą one współdziałać z tlenem. *In vitro* zarówno oksydazy jak i dehydrogenazy mogą redukować różne sztuczne akceptory elektronów oraz cytochrom c. Niewiadomo, czy ta ostatnia reakcja ma jakieś znaczenie *in vivo*.

Do niedawna sądzono, że w drobnoustrojach występują dehydrogenazy współdziałające z ferredoksyną, w tkankach zwierząt poza ssakami — dehydrogenazy zależne od NAD, zaś w tkankach ssaków — oksydazy ksantynowe. Jednakże przyspieszenie hydroksylacji ksantyny obserwowane po dodaniu błękitu metylenowego lub metosiarczanu metylofenazoniowego do homogenatów i preparatów z tkanek ssaków (9, 14, 15, 16) zdawało się wskazywać, że obok oksydazy ksantynowej może w nich występować także dehydrogenaza ksantynowa. Większe zużycie tlenu, a mniejsza redukcja innych akceptorów elektronów przez preparaty oksydaz ksantynowych z tkanek ssaków po przechowywaniu w niskiej temperaturze (14), po sonifikacji, działaniu trypsyny i niektórych czynników utleniających grupy tiolowe (15) nasunęło natomiast przypuszczenie, że preparaty te zawierają jedną oksydoreduktazę ksantynową w dwóch formach — dehydrogenazowej (D) i oksydazowej (O) (15). To przypuszczenie potwierdziło się, gdy zapobiegając działaniu enzymów proteolitycznych otrzymano (16, 17) z tkanek ssaków preparaty wykazujące głównie aktywność dehydrogenazy

ksantynowej, zmieniającą się pod wpływem trypsyny (nieodwracalnie) lub czynników utleniających grupy tiolowe (odwracalnie) w aktywność oksydazową (18). Nawet tak typową oksydazę ksantynową jak enzym Schar-dingera udało się wyodrębnić z mleka w formie niejako przejściowej, reagującej zarówno z tlenem jak i z NAD (19). Tę formę przejściową przekształcono w formę dehydrogenazową inkubując preparat z 10mM dwutiotreitolem lub kwasem dwuhydroliponowym, a w formę oksydazową przez inkubację w 37°C bez dwutiotreitolu. Być może forma przejściowa powstaje w gruczole mlecznym przy przejściu enzymu z tkanki do mleka. Przemiana ta byłaby związana z utworzeniem układu dwusiarczkowego z grup tiolowych (18), a naturalnym czynnikiem powodującym ją mógłby być termolabilny czynnik, wykryty w mleku (17), być może występujący w mikrosomach enzym, który katalizuje odwracalnie utlenianie grup tiolowych (20).

Stirpe i Della Corte (15) przypuszczają, że przemiana formy dehydrogenazowej w oksydazową jest wspólną właściwością oksydoreduktaz ksantynowych ssaków i że może ona mieć jakieś fizjologiczne znaczenie. Współdziałanie enzymu z tlenem zamiast z NAD mogłoby na przykład zmieniać równowagę hydroksylacji hipoksantyny do kwasu moczowego; *in vitro* w przypadku dehydrogenazy ksantynowej z wątrobo-trzustki ślimaka *H. pomatia* ilość nagromadzającej się ksantyny zależy od rodzaju akceptora elektronów (21). Przejście formy dehydrogenazowej w oksydazową umożliwiłoby także wytwarzanie przez enzym rodników nadtlenkowych, biorących udział w niektórych reakcjach zachodzących *in vivo* (22).

Na podstawie przytoczonych danych można przyjąć, że powszechnie występującą *in vivo* formą oksydoreduktaz ksantynowych jest forma dehydrogenazowa. Forma dehydrogenazowa oksydoreduktaz ssaków jest nietrwała i podczas wyodrębniania z tkanek łatwo przechodzi w formę oksydazową (tzw. oksydazy ksantynowe), natomiast oksydoreduktazy z innych źródeł są trwałe w formie dehydrogenazowej (tzw. dehydrogenazy ksantynowe). Można przypuszczać, że zamiana jednej formy enzymu w drugą jest związana ze zmianami konformacyjnymi łańcucha polipeptydowego, którego struktura w oksydazach ksantynowych byłaby inna niż w dehydrogenazach ksantynowych.

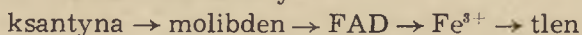
## II. Budowa i działanie oksydoreduktaz ksantynowych

Oksydoreduktazy ksantynowe z różnych tkanek myszy (16) wykazują różną ruchliwość elektroforetyczną. Podobnie preparaty tych enzymów z tkanek szczura (23), *Drosophila melanogaster* (24) i z pleśni *Aspergillus nidulans* (25) wykazują obecność elektroforetycznie różnych form oksydoreduktaz ksantynowych. Dotychczas nie wiadomo, czy działanie katalitycz-

ne tych form jest różne i czy są to odrębne izoenzymy. Na tę ostatnią możliwość mógłby wskazywać fakt, że w *Drosophila* (26) i *Aspergillus* (27) aktywność oksydoreduktaz ksantynowych jest kontrolowana co najmniej przez trzy geny. Jednakże w przypadku tkanek myszy odrębne elektroforetycznie formy powstają najprawdopodobniej wskutek proteolizy podczas otrzymywania enzymu z tkanek, bowiem tripsyna przekształca formę elektroforetyczną otrzymaną z wątroby w formę elektroforetyczną wyodrębnioną z dwunastnicy (28).

Wyosobnione w stanie czystym oksydoreduktazy ksantynowe: oksydaza ksantynowa z mleka i dehydrogenazy ksantynowe z wątroby kurczęcia i z *Micrococcus lactilyticus* mają ciężar cząsteczkowy około 300 000 (29). W kwaśnym środowisku dwa pierwsze enzymy rozpadają się na dwie nieaktywne podjednostki o ciężarze cząsteczkowym około 150 000, które nie dysocjują na mniejsze fragmenty pod działaniem 8M mocznika i 4—8M chlorowodoru guanidyny z dodatkiem 0,1M merkptoetanolu (30). Przy rozpadzie enzymu na podjednostki uwalnia się FAD i żelazo (30). Z kinetyki uwalniania FAD wynika, że już niewielka zmiana konformacji łańcucha polipeptydowego wystarcza do odłączenia się FAD, natomiast żelazo jest związane bardziej trwale (12). Molibdenu nie udało się dotychczas usunąć z cząsteczki enzymu bez jej znacznego zniszczenia (31). Na udział molibdenu w utrzymywaniu natywnej struktury łańcucha polipeptydowego wskazuje podatność niezawierającej molibdenu, naturalnej formy oksydazy ksantynowej z mleka na czynniki denaturujące (32). Skład aminokwasowy oznaczono dotychczas jedynie dla oksydazy ksantynowej z mleka, jej cząsteczki zawierają dużo reszt aminokwasów zasadowych: histydyny, lizyny i argininy (30, 33).

Trzy wymienione oksydoreduktazy ksantynowe mają po dwa centra aktywne w cząsteczce, a każde z nich zawiera 1 cząsteczkę FAD, 1 atom molibdenu i 4 atomy żelaza (29). Początkowo, gdy jedynym znanym składnikiem niebiałkowym enzymu był FAD, sądzono, że oddziaływanie między układem izoalloksazynowym flawiny a układem purynowym ksantyny i tlenem ułatwia utlenianie ksantyny do kwasu moczowego (34). Później, po wykryciu molibdenu i żelaza, przypuszczano, że trzy niebiałkowe składniki enzymu tworzą liniowy układ przenoszący elektrony, który przypomina łańcuch oddechowy:



Składniki te były ułożone według wzrastających potencjałów oksydoredukcyjnych, a atom żelaza miał ulegać odwracalnej redukcji do  $\text{Fe}^{2+}$ , podobnie jak w cytochromach. Za takim układem zdawały się przemawiać dane uzyskane w badaniach sygnałów elektronowego rezonansu paramagnetycznego powstających podczas redukcji oksydazy ksantynowej z mleka (35). Udoskonalenie tej techniki i badania nad zmodyfikowanymi formami oksydoreduktaz ksantynowych wpłynęły jednak na zmianę poglądów o działaniu centrów aktywnych tych enzymów.

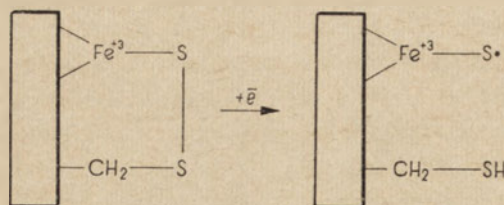
## II-1. Rola poszczególnych składników centrum aktywnego

**Dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD).** Istotny postęp w badaniach nad działaniem oksydoreduktaz ksantynowych osiągnięto po opracowaniu metod usuwania FAD z enzymu bez straty aktywności (12, 36). Dysocjacja FAD od utlenionej cząsteczki enzymu prowadzi do rozbicia jej na nieaktywne podjednostki (30), natomiast po redukcji enzymu FAD odszczepia się od jego cząsteczki prawie bez naruszenia struktury jej części białkowej (36). Badania nad oksydazą ksantynową z mleka i dehydrogenazą ksantynową z kurcząt, przed i po usunięciu FAD, wykazały że FAD jest składnikiem, z którego elektrony są przenoszone na tlen i NAD, oraz składnikiem pobierającym elektrony ze zredukowanego NAD. Oba enzymy pozbawione FAD zachowują zdolność do hydroksylowania ksantyny w obecności wielu sztucznych akceptorów, często reakcja zachodzi ze zwiększoną szybkością (12, 36). Ponieważ FAD jest tym składnikiem enzymu, który warunkuje reakcję zarówno z tlenem jak i z NAD, prawdopodobnie zmiana konformacji łańcucha polipeptydowego w otoczeniu FAD jest przyczyną zmiany formy dehydrogenazowej oksydoreduktaz ksantynowych w formę oksydazową.

**Chromofor Fe/S.** Danych o udziale żelaza w procesach katalizowanych przez oksydoreduktazy ksantynowe dostarczyły badania porównawcze widm tych enzymów z widmami flawoproteidów nie zawierających niehemowego żelaza (żółty enzym oddechowy Warburga, oksydaza aminokwasowa, dehydrogenaza liponianowa) i białek wiążących niehemowo żelazo (konalbumina, transferryna) (37). Okazało się, że żelazo nie zmienia swojej wartościowości podczas redukcji cząsteczki enzymu, choć jest integralną częścią układu przenoszącego elektrony. Wyjaśnienia tego faktu dostarcza koncepcja chromoforu Fe/S, wysunięta w pracowni M a s s e y ' a (38), a opierająca się na obserwacji, że wiele żelazoproteidów niehemowych zawiera równomolarnie ilości żelaza i tzw. siarki labilnej, odszczepiającej się w postaci siarkowodoru pod wpływem rozcieńczonych kwasów. Według tej koncepcji chromofor Fe/S, którego budowę przedstawia schemat 2, składa się z atomu żelaza i atomu siarki labilnej, tworzącej układ dwusiarczkowy z grupą tiolową cysteiny. Po pobraniu elektronu tworzyłyby się rodnik żelazowo-siarczkowy, przy czym wiązanie dwusiarczkowe ulegałoby rozerwaniu. Żelazo po redukcji chromoforu byłoby nadal trójwartościowe.

W cząsteczce oksydazy ksantynowej z mleka znajduje się 8 atomów żelaza i 8 atomów siarki labilnej, zredukowana cząsteczka enzymu zawiera o 8 grup tiolowych więcej niż utleniona (38). A zatem na każde z dwóch centrów aktywnych przypadająby 4 chromofory Fe/S. Jednakże każde centrum aktywne w oksydazie ksantynowej może pobrać tylko dwa elektrony. Przypuszczano zatem, że chromofory Fe/S są zgrupowane parami, i że każda para może pobrać tylko jeden elektron (39). Dane z pracowni

Bray'a (40) wskazują natomiast, że w cząsteczce oksydazy ksantynowej są dwa rodzaje chromoforów Fe/S — jeden o budowie przypominającej układ żelazowo-siarkowy w ferredoksynie ze szpinaku i drugi o niezidentyfikowanej dotychczas strukturze, oba zdolne do tworzenia rodników podczas redukcji enzymu.



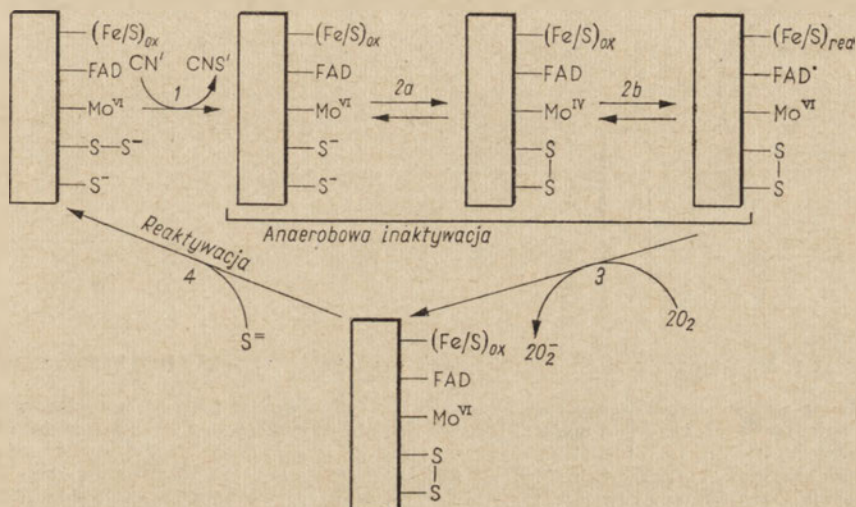
**Schemat 2.** Budowa chromoforu Fe/S oksydoreduktazy ksantynowej (38)

Atom żelaza chromoforu Fe/S, związany z białkiem enzymu prawdopodobnie przez tyrozynę, nie zmienia swojej wartościowości podczas redukcji enzymu przez substrat. Atom siarki labilnej chromoforu Fe/S, tworzący w utlenionym enzymie wiązanie dwusiarczkowe z grupą tiolową cysteiny, podczas redukcji enzymu pobiera 1 elektron, przy czym wiązanie dwusiarczkowe rozpada się i powstaje rodnik żelazowo-siarkowy

**Molibden.** Składnik ten tworzy w centrach aktywnych oksydoreduktaz ksantynowych układ oksydoredukcyjny  $\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$  (lub  $\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$  jak w dehydrogenazie z *M. lactilyticus*) o potencjale bardzo zbliżonym do potencjału układu ksantyna/kwas moczowy. Atom molibdenu jest pierwszym składnikiem centrum aktywnego, który ulega redukcji podczas reakcji hydroksylacji katalizowanych przez enzym (35). Występująca w mleku, naturalna forma oksydazy ksantynowej nie zawierająca molibdenu nie jest zdolna do hydroksylacji ksantyny (32). W latach 60-tych sądzono, że przy współdziałaniu molibdenu tworzy się kompleks enzym-hydroksylowany substrat (9a), a hamujące działanie cyjanku na hydroksylację tłumaczono powstawaniem kompleksu molibden-cyjanek, analogicznego do kompleksu żelazo-cyjanek w hemoglobinie. Przeciwno temu świadczył jednak brak zmiany wysyłanego przez molibden sygnału elektronowego rezonansu paramagnetycznego podczas redukcji oksydazy ksantynowej zainaktywowanej cyjankiem (12). Zapobieganie inaktywacji enzymu przez dodatek podsiarczynu sodu (41) także wskazywało na inny mechanizm działania cyjanku. Udział molibdenu w tworzeniu kompleksu enzym-hydroksylowany substrat wykluczyło ostatecznie wykrycie drugiej niezdolnej do hydroksylowania ksantyny formy oksydazy ksantynowej z mleka (32). Forma ta zawierała molibden, FAD i chromofory Fe/S w tym samym stosunku ilościowym jak forma aktywna względem ksantyny. Porównanie redukcji tych dwóch form enzymu przez  $\text{NADH}_2$  i podsiarczyn sodu wskazywało, że cząsteczki formy nieaktywnej różnią się od aktywnych cząsteczek prawdopodobnie jedynie zmianą w otoczeniu molibdenu pojedynczego ligandu ułatwiającego kontakt enzymu z substratem i przeniesienie elektronu na molibden (29).

**Grupa nadsiarczkowa ( $-\text{S}-\text{S}^-$ ).** Ligand biorący udział w tworzeniu

kompleksu enzym-hydroksylowany substrat jest według Massey' a i wsp. (10) ugrupowaniem nadsiarczkowym. Wskutek działania cyjanku na oksydazę ksantynową tworzą się produkty dwojakiemu rodzaju: związane z enzymem ugrupowanie -CNS, powstające z grup tiolowych, oraz wolne jony rodankowe  $\text{CNS}^-$ , które mogą powstawać tylko w wyniku reakcji cyjanku z grupą nadsiarczkową. Enzym pozbawiony grupy nadsiarczkowej nie hydroksyluje ksantyny, a zmiany jego widma świadczą o tworzeniu się flawosemichinonu i rodnika żelazowo-siarkowego, co można tłumaczyć utlenianiem się grup tiolowych w centrum aktywnym do układu dwusiarczkowego z jednoczesną redukcją FAD i Fe/S (schemat 3).



**Schemat 3.** Zmiany w centrum aktywnym oksydazy ksantynowej po reakcji z cyjankiem potasu (10)

1) — przekształcenie ugrupowania nadsiarczkowego w tiolowe pod wpływem cyjanku potasu, powodujące zanik zdolności enzymu do hydroksylacji ksantyny,

2) — odwracalne reakcje oksydoredukcyjne zachodzące w centrum aktywnym enzymu w warunkach beztlenowych: a) — utlenianie grup tiolowych do układu dwusiarczkowego z jednoczesną redukcją atomu molibdenu; b) — przeniesienie elektronów z molibdenu na FAD (z utworzeniem rodnika flawosemichinonu) i na chromofor Fe/S

3) — utlenienie składników centrum aktywnego w warunkach tlenowych

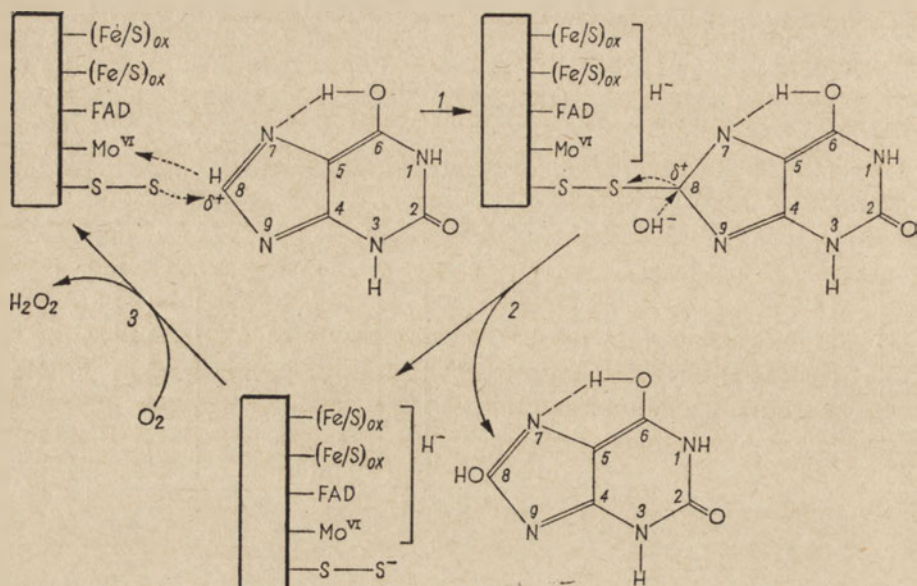
4) — odtworzenie ugrupowania nadsiarczkowego w centrum aktywnym enzymu w reakcji z siarczkiem sodu; proces ten przywraca zdolność enzymu do hydroksylacji ksantyny

Po utlenieniu tlenem składników centrum aktywnego można działając siarczkiem sodu odtworzyć grupę nadsiarczkową i w ten sposób przywrócić zdolność enzymu do hydroksylacji ksantyny. Nietrwałość grupy nadsiarczkowej jest prawdopodobnie przyczyną tworzenia się nieaktywnej formy oksydazy ksantynowej podczas wyodrębniania tego enzymu z mleka.

## II-2. Mechanizm hydroksylacji ksantyny przez oksydoreduktazy ksantynowe

W 1972 roku Massey i wsp. zaproponowali (13) schemat reakcji hydroksylacji ksantyny przez oksydoreduktazy ksantynowe, w którym za-

sadniczą rolę odgrywa grupa nadsiarczkowa w centrum aktywnym (schemat 4).



**Schemat 4.** Mechanizm reakcji hydroksylacji ksantyny przez oksydazę ksantynową (13)

Grupa nadsiarczkowa w centrum aktywnym przyciąga swoim ładunkiem ujemnym ksantynę w tautomerycznej formie mającej ładunek dodatni na atomie węgla w pozycji C-8 układu purynowego. 1) — powstaje kompleks enzym-substrat, przy czym anion wodorkowy  $H^-$  redukuje centrum aktywne. 2) — grupa hydroksylowa ze środowiska reakcji przyłącza się do atomu węgla w pozycji C-8 ksantyny, powstaje kwas moczowy, przy czym kompleks enzym-produkt rozpada się. 3) — zredukowany enzym utlenia się w reakcji z tlenem

W przedstawionej reakcji bierze udział jedyna z tautomerycznych form ksantyny, która ulega hydroksylacji (42). Forma ta ma na hydroksylowanym atomie węgla C-8 układu purynowego ładunek dodatni, który ułatwia zwiążanie ksantyny z ujemnie naładowaną grupą nadsiarczkową i utworzenie kompleksu enzym-substrat. Należy jednak podkreślić, że ulegająca hydroksylacji tautomeryczna forma hipoksantyny (42) nie ma ładunku dodatniego na hydroksylowanym atomie węgla C-2 (schemat 1); nie wiadomo także, dlaczego dehydrogenaza ksantynowa z *M. lactilyticus* wprowadza grupę hydroksylową w pozycję C-8 hipoksantyny, a nie w pozycję C-2 jak inne oksydoreduktazy ksantynowe (29). Spośród możliwych mechanizmów redukcji (za pomocą protonów i elektronów, atomów wodoru oraz anionów wodorkowych) autorzy przedstawionego schematu wybrali redukcję anionem wodorkowym  $H^-$ . O udziale tego anionu w reakcji hydroksylacji świadczą identyczne zmiany widma enzymu podczas hydroksylacji ksantyny i podczas redukcji enzymu borowodorkiem sodu (10). Anion wodorkowy redukuje atom molibdenu (43), co potwierdza wcześniejsze dane (35) o redukcji molibdenu jako o pierwszej reakcji oksy-

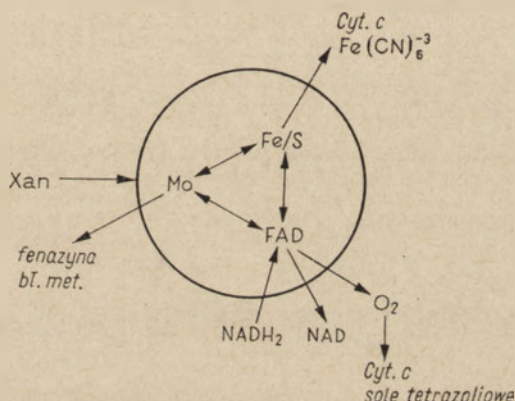


doredukcyjnej zachodzącej w centrum aktywnym podczas hydroksylacji ksantyny.

Proponowany mechanizm (schemat 4) jest mechanizmem ping-pong, ustalonym dla oksydoreduktaz ksantynowych na podstawie danych kinetycznych (44, 45). Według schematu 4 reakcja hydroksylacji przebiega niezależnie od utleniania zredukowanego enzymu. W istocie w warunkach beztlenowych, w nieobecności akceptora elektronów, mogą powstawać co najmniej trzy cząsteczki kwasu moczowego na jedno centrum aktywne enzymu przy jego pełnej redukcji.

### II-3. Reakcje oksydoredukcyjne w centrum aktywnym oksydoreduktaz ksantynowych

W 1969 roku *M a s s e y* i wsp. (12) zaproponowali kołowy układ składników przenoszących elektrony w centrum aktywnym oksydazy ksantynowej, jako zgodny z danymi o miejscach pobierania elektronów przez niektóre akceptory. Schemat 5 przedstawia ten układ w postaci nieco zmodyfikowanej i uzupełnionej według danych (29, 36, 46).



#### Schemat 5. Reakcje oksydoredukcyjne w centrum aktywnym oksydazy ksantynowej

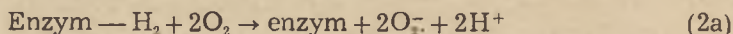
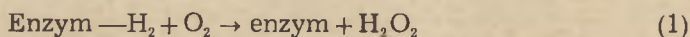
Składnikiem centrum aktywnego ulegającym redukcji podczas hydroksylacji ksantyny jest atom molibdenu. Elektrony z tego atomu mogą przechodzić bezpośrednio na niektóre akceptory elektronów, np. na metosiarczan metylofenazoniowy (fenazylna) i błękit metylenowy, lub na pozostałe składniki układu przenoszącego elektrony — na chromofor Fe/S i na FAD. Z Fe/S elektrony mogą przechodzić na cytochrom c i żelazocyjanek, natomiast z FAD — na NAD (w dehydrogenazach ksantynowych i w formie dehydrogenazowej oksydaz ksantynowych) lub na tlen (w oksydazach ksantynowych). Cytochrom c i sole tetrazoliowe pobierają elektrony z FAD za pośrednictwem tlenu. NADH<sub>2</sub> może redukować centrum aktywne enzymu wyłącznie poprzez FAD

Według tego schematu elektrony z molibdenu zredukowanego przez ksantynę mogą przechodzić zarówno na FAD jak i na chromofor Fe/S. Redukcja akceptora elektronów, katalizowana przez enzym, może przebiegać bądź z udziałem jednego składnika centrum aktywnego bądź dwóch lub wszystkich trzech składników, zależnie od rodzaju akceptora. Na

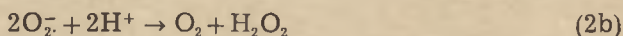
przykład błękit metylenowy pobiera elektrony bezpośrednio z molibdenu, natomiast cytochrom c dopiero po przejściu ich na FAD i chromofor Fe/S. Składniki centrum aktywnego, nie biorące udziału w przenoszeniu elektronów na dany akceptor, mogą służyć jako magazyny równoważników redukcyjnych (29).

Ze schematu widać, że zarówno oksydazy jak i dehydrogenazy ksantynowe (patrz część I) mogą redukować wiele sztucznych akceptorów jak błękit metylenowy, metosiarczan metylofenozoniowy i żelazocyjanek. Zatem redukcja tych akceptorów nie może być wskaźnikiem aktywności dehydrogenazowej oksydoreduktaz ksantynowych, jak to się często przyjmuje (9, 14, 15, 16).

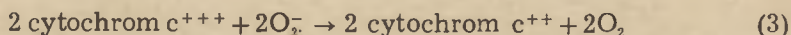
Za przejaw dehydrogenazowej aktywności enzymu uważano również redukcję soli tetrazoliowych (47), jednakże okazało się, że reakcja ta jest w istocie ukrytym procesem tlenowym, podobnie jak redukcja cytochromu c z udziałem FAD (schemat 5). Reakcja zredukowanej oksydazy ksantynowej z tlenem może przebiegać w dwojaki sposób (48): dwuelektronowo (reakcja 1) lub jednoelektronowo (reakcja 2a):



Liczba elektronów przenoszonych drogą jednoelektronową zwiększa się ze wzrostem pH i stężenia tlenu; w pH 7 około 22% elektronów przechodzi drogą jednoelektronową, a w pH 10—80%. Powstający rodnik nadtlenkowy (reakcja 2a) pod wpływem dysmutazy nadtlenkowej daje wodę utlenioną i tlen (reakcja 2b):



Z dysmutazą nadtlenkową może współzawodniczyć cytochrom c (lub sole tetrazoliowe) w reakcji 3:



W reakcji 3 regenerują się obie cząsteczki tlenu biorące udział w utlenieniu enzymu (reakcja 2a) i w ten sposób zużycie tlenu spada całkowicie, mimo że w przeniesieniu elektronów na cytochrom c pośredniczą rodniki nadtlenkowe; tylko około 5% elektronów przechodzi bezpośrednio na cytochrom c z chromoforu Fe/S (schemat 5).

Zaobserwowane uprzednio hamowanie reakcji oksydoreduktaz ksantynowych z cytochromem c przez mioglobinę (49), anhydrazę węglanową (50) i erytrokupreinę (51) polega na katalizowaniu przez preparaty tych białek reakcji 2b, a więc jest związane z obecnością dysmutazy nadtlenkowej w tych preparatach. Dysmutazą nadtlenkową okazało się też białko, które na podstawie hamowania redukcji soli tetrazoliowych uznano za naturalny inhibitor aktywności dehydrogenazowej oksydoreduktaz ksantynowych (22). Można wspomnieć, że dotychczas nie znaleziono inhibitora, który wy-

biórczo hamowałyby hydroksylację ksantyny przez dehydrogenazy ksantynowe lub przez oksydazy ksantynowe.

Należy zwrócić uwagę, że reakcja z solami tetrazoliowymi, używana często w badaniach histochemicznych i do lokalizacji oksydoreduktaz ksantynowych na chromatogramach, może nie ujawniać obecności oksydaz ksantynowych, jeśli w środowisku reakcji jest dysmutaza nadtlenkowa.

#### II-4. Równocенność centrów aktywnych oksydoreduktaz ksantynowych

Ogólnie przyjmuje się, że oksydoreduktazy ksantynowe zawierają dwa centra aktywne, nie wiadomo jednak czy są one równocenne. Różnice między nimi mogłyby polegać na różnej strukturze części białkowej otaczającej centra w dwóch podjednostkach białkowych cząsteczki enzymu, lub na braku któregoś ze składników niebiałkowych centrum. Przypuszczenie o nierównocенności centrów aktywnych nasunęło się w toku badań nad uwalnianiem FAD z cząsteczek dehydrogenazy ksantynowej z wątroby kurczęcia (52). Enzym ten z porównywalną szybkością hydroksyluje ksantynę i utlenia  $\text{NADH}_2$ ; mimo to po redukcji za pomocą  $\text{NADH}_2$  jego preparaty tracą pod wpływem jodku potasu całą ilość związanego FAD, a po redukcji ksantyną — tylko połowę tej ilości. To wskazywałoby, że podczas hydroksylacji ksantyny działa tylko jedno centrum ulegając redukcji ułatwiającej dysocjację FAD (36). Podobne wyniki otrzymano dla oksydazy ksantynowej z mleka (53). Jednakże uwalnianie tylko części cząsteczek FAD z danego preparatu enzymu może być także spowodowane obecnością nieaktywnej formy enzymu, niezdolnej do hydroksylacji ksantyny, a ulegającej redukcji przez  $\text{NADH}_2$  (32). Okazało się bowiem, że po przedłużeniu czasu reakcji enzymu z ksantyną, wystarczającym do zajścia powolnej redukcji nieaktywnych cząsteczek enzymu przez aktywne cząsteczki redukowane przez ksantynę (54), odszczepienie FAD jest całkowite (55). Z powyższego wynika, że nierównocенność centrów aktywnych mogłyby się wiązać z obecnością grupy nadsiarczkowej, niezbędnej do utworzenia kompleksu enzym-ksantyna, tylko w jednym centrum. Byłoby to zgodne z danymi wskazującymi, że w każdym z dwóch centrów aktywnych otoczenie atomu molibdenu może być różne (29) i że różnica ta dotyczy tylko pojedynczego ligandu. Preparaty oksydoreduktaz ksantynowych, obok formy niezawierającej molibdenu (32), mogłyby zawierać jeszcze trzy rodzaje cząsteczek enzymu: o dwóch centrach aktywnych zdolnych do hydroksylacji ksantyny, o jednym centrum hydroksylującym ksantynę a drugim pozbawionym grupy nadsiarczkowej, oraz cząsteczki nieaktywne względem ksantyny, bez grup nadsiarczkowych w obu centrach aktywnych (13).

Nierównocенność centrów aktywnych mogłyby także polegać na odmiennym rozmieszczeniu w każdym z nich dwóch rodzajów chromoforów Fe/S o różnej budowie (40).

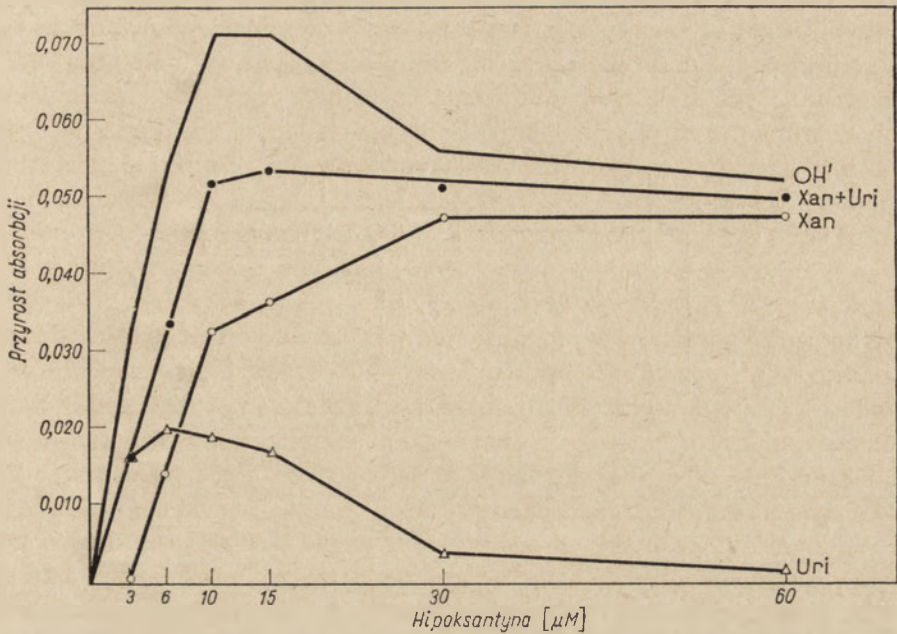
### III. Regulacyjna rola oksydoreduktaz ksantynowych

#### III-1. Hydroksylacja hipoksantyny

Wszystkie dotąd opisane mechanizmy dotyczą hydroksylowania ksantyny, najłatwiejszego do badania przy tak złożonej budowie enzymu. Jednakże fizjologiczną rolą oksydoreduktaz ksantynowych jest katalizowanie dwóch kolejnych hydroksylacji hipoksantyny (schemat 1). Mógłby to być proces dwuetapowy, w którym produkt przejściowy, ksantyna, pozostaje związana z enzymem lub też dwie reakcje kolejne: po pierwszej z nich ksantyna odłączałaby się od enzymu, a druga zachodziłaby po utworzeniu nowego kompleksu enzym-ksantyna. Ponieważ obie te puryny, hipoksantyna i ksantyna, są hydroksylowane w tym samym centrum aktywnym, a centrum może katalizować potrójną hydroksylację w nieobecności akceptora elektronów, można było przypuszczać, że hydroksylacja hipoksantyny jest procesem dwuetapowym. Jednakże ze schematu 4 wynikałoby, że cząsteczka substratu musi być związana z enzymem poprzez ten atom węgla, który ma ulec hydroksylacji. A zatem powstająca ksantyna musi się odłączyć od enzymu przed dalszą hydroksylacją. To wskazywałoby, że hydroksylacja hipoksantyny do kwasu moczowego przebiega w dwóch kolejnych reakcjach. Odłączanie i przyłączanie ksantyny mogłoby być bardzo szybkie, jeśli na przykład zachodziłoby kolejno w dwóch centrach aktywnych enzymu. Byłby to proces analogiczny do katalizy dwóch kolejnych, odrębnych reakcji przez enzym mający dwa centra aktywne, każde katalizujące jedną z reakcji (56); w takim przypadku produkt pośredni nie nagromadza się w środowisku reakcji. Jednakże nagromadzanie się ksantyny obserwuje się podczas hydroksylacji hipoksantyny przez oksydoreduktazy ksantynowe działające *in vitro* (1, 2, 3, 4). Pula ksantyny jest tym większa, im początkowe stężenie hipoksantyny jest większe, przy czym zależność ta nie jest liniowa (Ryc. 1), a w większych stężeniach hipoksantyny hydroksylacja ksantyny do kwasu moczowego rozpoczyna się dopiero po pewnym okresie czasu (2). Taki przebieg reakcji można wytłumaczyć na zasadzie współzawodnictwa hipoksantyny i ksantyny o te same centra aktywne enzymu. To współzawodnictwo powoduje, że nie wytwarza się stan równowagi i stosunek ksantyna:kwas moczowy zmienia się w czasie reakcji w sposób odmienny dla każdego stężenia hipoksantyny. Taki obraz jak na rys. 1 otrzymuje się przy każdym stężeniu enzymu, jeśli odpowiednio dobierze się stężenia hipoksantyny lub czas reakcji.

Krzywe na rycinie 1 odzwierciedlają różnice aktywności enzymu otrzymywane przy mierzeniu jej różnymi metodami (57). Aktywność enzymu mierzy się bowiem oznaczając bądź ilość powstającego kwasu moczowego (krzywa Uri), bądź ilość obu puryn (krzywa Xan+Uri), bądź redukcję akceptora elektronów (krzywa OH<sup>-</sup>). Pierwsza z tych metod nie uwzględnia powstającej ksantyny, druga nie uwzględnia wprowadzenia drugiej

grupy hydroksylowej do układu purynowego hipoksantyny, trzecia uwzględnia obie kolejne reakcje hydroksylacji, biegnące z różną szybkością.



Ryc. 1. Zależność szybkości dwóch kolejnych reakcji hydroksylacji hipoksantyny od jej stężenia (2)

Enzymem katalizującym reakcje była oksydaza ksantynowa z mleka. ●—●— Xan + Uri (przyrost absorpcji w 278,5nm, czyli w punkcie isobestycznym tych dwóch puryn),  $\Delta$ — $\Delta$ — $\Delta$ — Uri (przyrost absorpcji w 300,5nm), ○—○—○— Xan (różnica przyrostów absorpcji w 278,5 i 300,5nm); współczynniki molowe absorpcji dla kwasu moczowego są sobie równe w tych dwóch długościach fali i równe współczynnikowi dla ksantyny w 278,5nm. Suma przyrostów absorpcji w tych dwóch długościach fali obrazuje całkowitą aktywność enzymu, tzn. wprowadzanie pierwszej grupy OH<sup>-</sup> (tworzenie ksantyny) i drugiej grupy OH<sup>-</sup> (tworzenie kwasu moczowego) do układu purynowego hipoksantyny. W nasycającym enzym stężeniu hipoksantyny tworzy się dużo ksantyny i mało kwasu moczowego

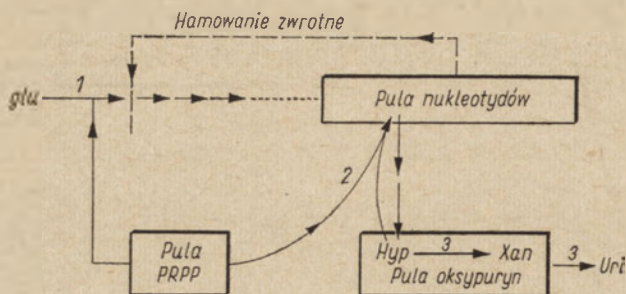
Wielu autorów podaje stałą Michaelisa dla hipoksantyny, jednakże opisany wyżej jednoczesny przebieg obu kolejnych reakcji hydroksylacji wyklucza możliwość otrzymania prawidłowych wartości tej stałej.

Ksantyna nagromadza się w środowisku reakcji podczas hydroksylacji hipoksantyny zarówno przez oksydazę ksantynową z mleka (1, 2) jak i przez dehydrogenazy ksantynowe: z wątroby kurczęcia (3), wątrobo-trzustki ślimaka *H. pomatia* (4) i z komórek *Micrococcus lactilyticus* (2).

### III-2. Przemiana puryn a mechanizm działania oksydoreduktaz ksantynowych

W organizmach ssaków kataboliczna przemiana puryn jest przede wszystkim końcowym etapem ściśle kontrolowanej przemiany kwasów nukleinowych i koenzymów nukleotydowych. Końcowe produkty tej prze-

miany, kwas moczowy i allantoina, nie mają wpływu na jej przebieg, natomiast hipoksantyna i ksantyna (tzw. pula oksypuryn) silnie hamują pierwszy etap biosyntezy układu purynowego (6, 7, 58), katalizowany przez amidotransferazę 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu (PRPP) (schemat 6). Na enzym ten oksypuryny nie działają bezpośrednio, a dopiero po przekształceniu w nukleotydy pod wpływem fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej.



**Schemat 6.** Regulacja przemiany purynowej

- 1) — reakcja rozpoczynająca syntezę nukleotydów *de novo*, katalizowana przez amidotransferazę glutamina: PRPP
- 2) — reakcja syntezy nukleotydów z wolnych puryn i PRPP, katalizowana przez fosforybozylotransferazę hipoksantyno-guaninową
- 3) — reakcje hydroksylacji katalizowane przez oksydoreduktazy ksantynowe.

Gdyby hydroksylowanie hipoksantyny było reakcją dwuetapową, w której nie nagromadzałyby się ksantyna, wówczas większe stężenie hipoksantyny powodowałoby szybszą syntezę kwasu moczowego, gdyż enzym w warunkach fizjologicznych jest daleki od nasycenia substratem, i hamowanie zwrotne przez nukleotydy nie mogłoby zachodzić. Jeśli natomiast hydroksylacja hipoksantyny do kwasu moczowego zachodzi w dwóch kolejnych reakcjach, to gdy poziom hipoksantyny w środowisku reakcji zwiększy się (wskutek większego pobierania puryn w pokarmie czy zwiększonego rozpadu kwasów nukleinowych) wówczas oksydaza ksantynowa wytwarza mniej kwasu moczowego, a więcej ksantyny (Ryc. 1). Wskutek działania enzymu pula oksypuryn zmniejsza się tym wolniej, im większe jest stężenie hipoksantyny w środowisku. Ogólne zwiększenie puli oksypuryn będzie powodowało szybszą syntezę nukleotydów, a co za tym idzie silniejsze zahamowanie biosyntezy puryn. W rezultacie poziom związków purynowych powróci do normy. Z powyższych rozważań wynikałoby zatem, że w organizmach ssaków sposób działania oksydoreduktaz ksantynowych ma decydujący wpływ na hamowanie zwrotne biosyntezy puryn przez fosforybozylotransferazy.

W organizmach zwierząt purynotelicznych puryny są przede wszystkim końcowymi produktami przemiany białkowej i ich biosynteza *de novo* nie może być zależna od poziomu oksypuryn; zwiększenie przemiany białkowej musi u tych zwierząt prowadzić do zwiększenia wydalania puryn.

Purynoteliczny ślimak lądowy, *H. pomatia*, w okresie snu zimowego, gdy przemiana białkowa jest mała, wytwarza prawie wyłącznie kwas moczowy. Natomiast w okresie aktywnego życia, gdy przemiana białkowa zwiększa się około 5-ciokrotnie, ślimak syntetyzuje w większych ilościach dwie puryny — ksantynę i kwas moczowy, wydalone w stosunku 1:1 (59).

Inne zwierzęta purynoteliczne jak ptaki i owady przy zwiększonej ilości białka w pokarmie wydają natomiast kwas moczowy w zwiększonych ilościach. W przypadku kurcząt jest to możliwe dzięki specyficznej właściwości dehydrogenazy ksantynowej, której aktywność zwiększa się pod wpływem ksantyny (45). Badania nad aktywacją substratową tego enzymu wykazały, że już stężenia  $10^{-7}$  M substratu aktywują enzym (60). Z drugiej strony okazało się, że zwiększona podaż białka powoduje wzrost aktywności amidotransferazy PRPP w wątrobie kurcząt (61) i że oksypuryny nie hamują tego enzymu (58). Gdy zatem poziom hipoksantyny zwiększy się, dehydrogenaza wytwarza więcej ksantyny, aktywuje się pod jej wpływem i przemiana ksantyny na kwas moczowy przyspiesza się. Dopiero przy dużym zwiększeniu się stężenia oksypuryn, dłużej trwającym, następuje indukowana przez te substraty synteza dehydrogenazy ksantynowej i jej poziom w tkankach zwiększa się (62).

W ciele tłuszczowym muszki owocowej, *Drosophila melanogaster*, pod wpływem diety z dużą zawartością białka, następuje podobnie jak w wątrobie kurcząt aktywacja dehydrogenazy ksantynowej przez nieznaną czynnik, przy czym poziom enzymu nie zwiększa się (24).

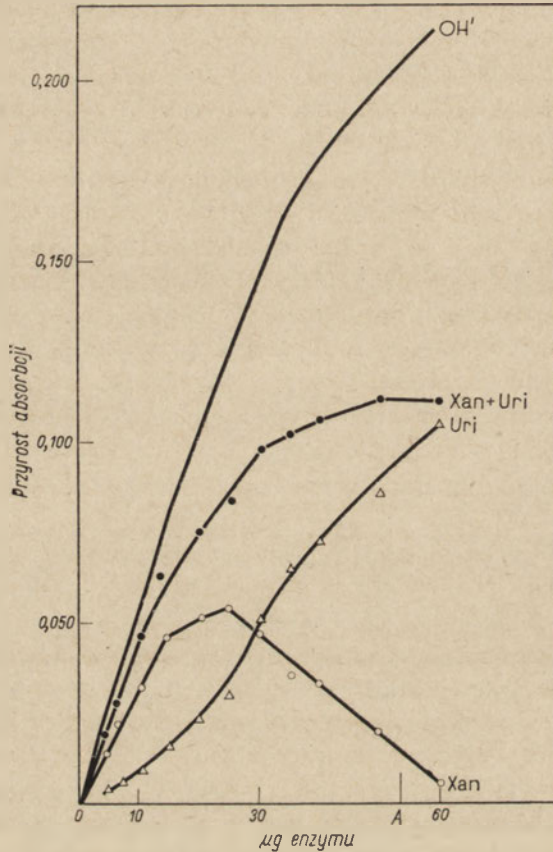
W organizmach zwierząt purynotelicznych właściwość oksydoreduktaz ksantynowych aktywowania się pod wpływem substratu lub innych czynników może odgrywać zasadniczą rolę w szybkim przystosowaniu się do zmiany intensywności przemiany białkowej.

### III-3. Przemiana puryn a poziom oksydoreduktaz ksantynowych w organizmie

Stężenie oksydoreduktaz ksantynowych w komórce może być drugim, obok stężenia hipoksantyny, czynnikiem wpływającym na przemianę puryn. Zależność między stężeniem enzymu a szybkością obu kolejnych reakcji hydroksylacji hipoksantyny przedstawia rycina 2 (5). Przy niskich stężeniach enzymu przeważa wytwarzanie ksantyny, przy wyższych — kwasu moczowego. Stosunek ksantyna:kwas moczowy jest zatem zależny od stosunku enzymu do hipoksantyny.

W omówionych wyżej organizmach żywych pula ksantyny jest zazwyczaj znacznie mniejsza niż pula kwasu moczowego (allantoiny). W surowicy krwi zdrowego człowieka stosunek tych obu pul wynosi około 0,13 (63), co odpowiada punktowi A na rycinie 2, a zatem takiemu stosunkowi enzymu do hipoksantyny, przy którym obie reakcje hydroksylacji przebiegają praktycznie do końca. W istocie stosunek hipoksantyna:ksantyna:kwas moczowy w surowicy zdrowego człowieka wynosi 1:1:5,8 (63). W są-

siedztwie punktu A na rycinie 2 niewielkie zmiany poziomu enzymu będą powodować duże zmiany stosunku ksantyna: kwas moczowy, a więc i zmieniać pulę oksypuryn. W tkankach ssaków zmiana stężenia enzymu mogłaby więc wpływać na biosyntezę puryn podobnie jak zmiana stężenia hipoksantyny.



**Rycina 2.** Zależność szybkości dwóch kolejnych reakcji hydroksylacji hipoksantyny od stężenia oksydazy ksantynowej (5)

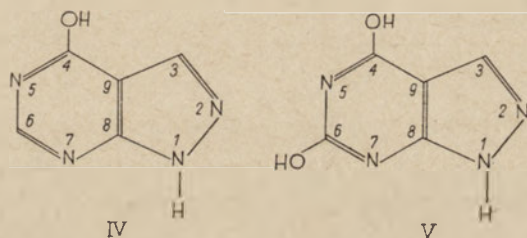
Stężenie hipoksantyny  $30 \mu\text{M}$ . Oznaczenie krzywych i metoda pomiaru jak w opisie ryciny 1. Przy niższych stężeniach enzymu w środowisku reakcji przeważa ksantyna, przy wyższych kwas moczowy. W obszarze koło punktu A liczbową wartość molowego stosunku Xan:Uri odpowiada wartościom oznaczonym w surowicy krwi zdrowego człowieka (0,13(63)). Wskazywałoby to, że w warunkach fizjologicznych enzym daleki jest od nasycenia substratem

Patologiczne obniżenie poziomu oksydoreduktaz ksantynowych w tkankach człowieka (ksantynuria) powoduje zwiększenie ilości hipoksantyny i ksantyny wydalanych w moczu przy jednoczesnym zmniejszeniu wydalania kwasu moczowego (64). Objawy te przypisuje się zwykle wybiórczemu zahamowaniu hydroksylacji ksantyny lub powstawaniu ksantyny inną drogą, a mianowicie poprzez ksantozynomonofosforan i guanozynomonofosforan z guaniny (65, 66). Jak widać jednak na rycinie 2 obniżenie



poziomu enzymu powoduje początkowo zastąpienie kwasu moczowego przez ksantynę (obszar za skrzyżowaniem krzywych), a przy dalszym obniżaniu poziomu enzymu synteza obu puryn zmniejsza (obszar przed skrzyżowaniem krzywych). Zwiększone wydalanie oksypuryn w ksantynurii może więc być także wynikiem obniżonego poziomu oksydoreduktaz ksantynowych. W niektórych przypadkach ksantynurii wydalanie puryn w moczu jest obniżone, w innych nie ma wyraźnego wpływu zwiększonej puli oksypuryn na biosyntezę puryn *de novo* (64); poziomu fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej w ksantynurii nie badano.

Objawy występujące w ksantynurii można wywołać w organizmie kurczęcia (67), szczura (68) i człowieka (69) podawaniem 4-hydroksypirazolo (3,4-d)pirymidyny (allopurinolu, wzór IV). Związek ten, jak również powstająca z niego pod wpływem oksydoreduktaz ksantynowych hydroksylowa pochodna, 4,6-dwuhydroksypirazolo (3,4-d) pirymidyna (alloksantyna, wzór V), są silnymi inhibitorami tych enzymów.



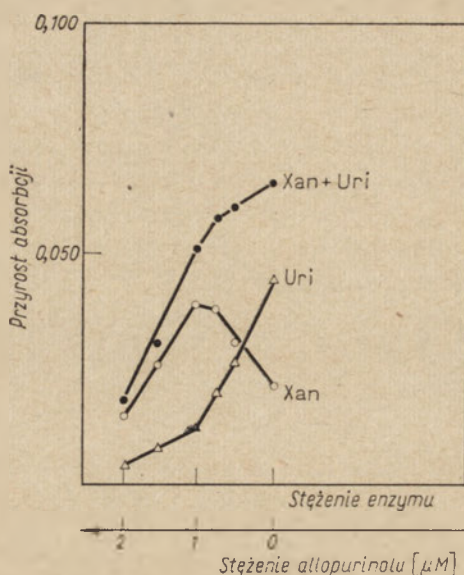
VI. 4-hydroksypirazolo/3,4-d/pirymidyna (allopurinol)  
V. 4,6-dwuhydroksypirazolo/3,4-d/pirymidyna (alloksantyna)

W leczeniu schorzeń charakteryzujących się między innymi zwiększonym wydalaniem kwasu moczowego stosuje się allopurinol w celu częściowego zastąpienia kwasu moczowego ksantyną i hipoksantyną, co zapobiega tworzeniu się złożeń moczanych w tkankach. Zwiększenie się puli oksypuryn pod wpływem allopurinolu polega prawdopodobnie przede wszystkim na zmianie stosunku oksydoreduktazy ksantynowe/hipoksantyna w komórce. Wskazuje na to kształt krzywych na rycinie 3, przedstawiającym zależność między stężeniem allopurinolu a szybkością kolejnych reakcji hydroksylacji hipoksantyny przez oksydazę ksantynową *in vitro* (5). Kształt tych krzywych jest analogiczny do kształtu krzywych na rycinie 2.

Należy zwrócić uwagę, że hydroksylację ksantyny allopurinol hamuje już w stężeniu  $10^{-8}$  (70), a hydroksylację hipoksantyny dopiero w stężeniu  $10^{-6}$  (5). Przydatność związków proponowanych jako inhibitory oksydoreduktaz ksantynowych w celach leczniczych należałoby badać używając hipoksantyny jako substratu. Niedostateczne obniżenie poziomu oksydoreduktaz ksantynowych może bowiem powodować tworzenie się złożeń ksantyny, podobnie jak w ksantynurii (obszar przed skrzyżowaniem krzy-

wych na rycinach 2 i 3); takie przypadki obserwowano podczas leczenia allopurinolem (71) i obecnie uzyskały one teoretyczne uzasadnienie (5).

Zwiększona po podaniu allopurinolu pula oksypuryn w tkankach kur-



**Rycina 3.** Wpływ allopurinolu na szybkość kolejnych reakcji hydroksylacji hipoksantyny katalizowanych przez oksydazę ksantynową z mleka (5)

Stężenie hipoksantyny  $15\mu\text{M}$ , enzym  $25\mu\text{g}/3\text{ ml}$ . Oznaczenie krzywych i sposób pomiaru jak w opisie do ryciny 1.

czął indukuje biosyntezę oksydoreduktaz ksantynowych i poziom oksypuryn powraca do normy (62). W organizmie człowieka chorego na dnę, jeśli poziom fosforybozylotransferazy jest normalny, to po podaniu allopurinolu w wyniku zwiększenia puli oksypuryn (rycina 3) biosynteza puryn *de novo* zmniejsza się (72), zgodnie ze schematem 6. Przypuszczenie, że allopurinol hamuje biosyntezę puryn *de novo* ulegając przemianie na nukleotyd i hamując amidotransferazę PRPP (schemat 6) należy raczej wykluczyć (73), ponieważ związek ten jest złym substratem dla fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej. W przypadkach dny i w zespole Lesch-Nyhamy (74), w których poziom fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej jest znacznie obniżony lub brak wogóle tego enzymu (75), zwiększony pod wpływem allopurinolu poziom oksypuryn nie hamuje biosyntezy puryn *de novo*. W moczu tych chorych po podaniu allopurinolu pojawiają się hipoksantyna i ksantyna w zwiększonych ilościach, a poziom kwasu moczowego obniża się.

Przy analizowaniu przebiegu krzywych na rycinie 1 nasuwa się następujące zagadnienie. Zwiększone stężenie hipoksantyny powinno znacznie zmieniać stosunek ksantyna:kwas moczowy, a tymczasem stosunek ten w przypadkach chorób z kilkakrotnie zwiększoną biosyntezą puryn *de*

*novo* ma wartość zbliżoną do wartości właściwej ludziom zdrowym (65, 76). Jaki czynnik wpływa na przesunięcie równowagi kolejnych reakcji hydroksylacji hipoksantyny w stronę kwasu moczowego? Mógłby nim być znacznie wyższy poziom oksydoreduktaz ksantynowych lub zaburzenia transportu, sprawiające, że substraty pozostawałyby dłużej w środowisku reakcji.

Być może jednak, że ludzie z tymi zespołami chorobowymi mają oksydoreduktazy o budowie genetycznie zmienionej; na przykład enzymy te mogłyby być aktywowane przez substrat, jak dehydrogenaza ksantynowa z wątroby kurcząt (45, 60), i dzięki temu zmieniać stosunek ksantyna:kwas moczowy. W tych przypadkach chorobowych, w których poziom fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej jest normalny (na przykład niektóre przypadki dny), takie działanie oksydoreduktaz ksantynowych przyczyniałoby się do zwiększenia objawów patologicznych. Usuwając z tkanek hipoksantynę enzymy te uniemożliwiałyby regulację biosyntezy puryn *de novo*.

Artykuł wptynął dnia 28.12.1973, wrócił po rewizji autorskiej 20.3.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bergmann F., Dikstein S., (1956), *J. Biol. Chem.*, **223**, 765—780.
2. Jeżewska M. M., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 385—390.
3. Priest D. G., Fisher J. R., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **10**, 439—444.
4. Barankiewicz J., Jeżewska M. M., (1972), *Bull. Acad. Sci. Ser. sci. biol.*, **20**, 1—4.
5. Jeżewska M. M., *Eur. J. Biochem.*, in press.
6. Murray A. W., Elliott D. C., Atkinson M. R., (1970), w *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, wyd. Davidson J. N. i Cohn W. E., tom 10, str. 87—119, Academic Press, New York, London.
7. Murray A. W., (1971), w *Annual Review of Biochemistry*, red. Snell E. E., Boyer P. D., Meister A., Sinsheimer R. L., tom 40, str. 811—826, Annual Reviews Inc. Palo Alto, California, U.S.A.
8. Gots J. S., (1971), w *Metabolic Pathways*, wyd. 3, *Metabolic Regulation*, wyd. Vogel H. J., tom 5, 225—255, Academic Press, New York, London.
9. De Renzo E. C., (1956), w *Advances in Enzymology*, wyd. Nord F. F., tom 17, str. 293—328, Interscience Publishers, Inc. New York, London.
- 9a. Rajagopalan K. V., Handler P., (1968), w *Biological Oxidation*, red. Singer T. P., str. 301—337, Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York, London, Sydney.
10. Massey V., Edmondson D., (1970), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6595—6598.
11. Bray R. C., (1961), *Biochem. J.*, **81**, 189—193.
12. Komai H., Massey V., Palmer G., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1692—1700.
13. Edmondson D., Massey V., Palmer G., Beacham III L. M. and Elion G. B., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1597—1604.
14. Blair D. G. R., Mc Lennan B. D., (1968), *Can. J. Biochem.*, **46**, 1047—1056.
15. Stirpe F., Della Corte E., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855—3863.

16. Joyce P., Duke E. J., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 111P.
17. Stirpe F., Della Corte E., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 195—197.
18. Della Corte, E., Stirpe F., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 739—745.
19. Batelli M. G., Lorenzoni E., Stirpe F., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 191—198.
20. Fuchs S., DeLorenzo F., Anfinsen C. B., (1967), *J. Biol. Chem.*, **240**, 398—402.
21. Jeżewska M. M., Barankiewicz J., (1972), X Zjazd P. T. Bioch., Poznań, B24, komunikat.
22. Fried R., Fried L. W., Babin D. R., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 439—445.
23. Sackler M. L., (1965), *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 326—333.
24. Collins J. F., Duke E. J., Glassman E., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 294—303.
25. Scazzocho C., Holl F. B., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 17P.
26. King J. C., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **64**, 891—896.
27. Scazzocho C., Holl F. B., Foguelman A. I., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 428—445.
28. Duke E. J., Joyce P., Ryan J. P., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 187—180.
29. Bray R. C., Swann J. C., (1972), w *Structure and Bonding*, red. Dunitz J. D., Hemmerich P., Ibers J. A., Jörgensen C. K., Neilands J. B., Nyholm R. S. Sir, Reinen D., Williams R. J. P., tom **11**, str. 107—144, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
30. Nelson Ch. A., Handler P., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5368—5373.
31. Bray R. C., (1963), w *The Enzymes*, wyd. Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., tom **7**, str. 533—556, Academic Press, New York, London.
32. Hart L. J., McGartoll M. A., Chapman H. R., Bray R. C., (1970), *Biochem. J.*, **116**, 851—864.
33. Fridovich I., Handler P., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 1581—1585.
34. Bray R. C., Malmström B. G., (1964), *Biochem. J.*, **93**, 633—634.
35. Bray R. C., Palmer G., Beinert H., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2667—2676.
36. Kanda M., Brady F. O., Rajagopalan K. V., Handler P., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 765—770.
37. Rajagopalan K. V., Handler P., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 1509—1514.
38. Brumby P. E., Miller R. W., Massey V., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2222—2228.
39. Palmer G., Massey V., (1969), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2614—2620.
40. Lowe D. J., Lynden-Bell R. M., Bray R. C., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 239—249.
41. Coughlan M. P., Rajagopalan K. V., Handler P., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2658—2663.
42. Bergmann F., Kwietny H., Levin G., Brown D. J., (1960), *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 598—605.
43. Edmondson D., Ballou D., Heuleven A. Van, Palmer G., Massey V., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6135—6144.
44. Fridovich I., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3519—3521.
45. Rajagopalan K. V., Handler P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4097—4107.
46. Spector T., Johns D. G., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 1039—1044.
47. Fried R., Fried L. W., Babin D., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **16**, 399—406.
48. Fridovich I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4053—4057.
49. Fridovich I., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 584—586.
50. Fridovich I., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1445—1449.

51. McCord J. M., Fridovich I., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049—6055.
52. Kanda M., Rajagopalan K. V., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2177—2182.
53. Coughlan M. P., Johnson D. B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 200—204.
54. McGartoll M. A., Pick F. M., Swann J. C., Bray R. C., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 523—526.
55. Swann J. C., Bray R. C., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 407—415.
56. Koch G. L. E., Shaw D. C., Gibson F., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 719—730.
57. Fridovich I., Handler P., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 1581—1585.
58. Matsuda Y., (1972), *Saishin-igaku*, **27**, 798 (in Japanese), cyt. za 52.
59. Jeżewska M. M., (1969), *Acta Biochim. Polon.*, **16**, 313—320.
60. Priest D. G., Fisher J. R., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 391—399.
61. Matsuda J., Kuroda Y., Kobayashi K., Katunuma N., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 291—298.
62. Woodward W. D., Lee P. C., DeLapp N. W., Fisher J. R., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 537—542.
63. Appleton H. D., Haab W., Burti U., (1969), *Amer. J. Ment. Def.*, **74**, 196—200.
64. Wyngaarden J. B., (1966), w *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, red. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredericson D. S., wyd. 2, str. 729—738, McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, Sydney, London.
65. Sweetman L., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 1055—1058.
66. Chalmers R., Parker R., Simmonds H. A., Suedden W., and Watts R. W. E., (1969), *Biochem. J.*, **112**, 527—532.
67. Weir E., Fisher J. R., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 556—557.
68. Markley H. G., Faillace L. A., Mezey E., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **309**, 23—31.
69. Delbarre F., Ausher C., deGery A., and Kha Vang Thang, (1972), *Biochimie*, **53**, 709—720.
70. Watts R. W. E., Watts J. E., Seegmiller J. E., (1965), *J. Lab. Clin. Med.*, **64**, 688—698.
71. Seegmiller J. E., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 1097—1104.
72. Yu T. F., Gutman A. B., (1964), *Am. J. Med.*, **37**, 885—898.
73. Krenitsky T. A., Papaioannou R., Elion G. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1263—1270.
74. Nyhan W. L., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 1027—1033.
75. Kelley W. N., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 1047—1052.
76. Balis M. E., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 1067—1052.



JACEK ŚLIWOWSKI\*

## Mechanizmy cyklizacji skwalenu do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych

### Mechanisms of Squalene Cyclization to Tetra- and Pentacyclic Triterpenes

W 1963 r. został opublikowany w *Postęпах Biochemii* artykuł poświęcony biosyntezie trójterpenów (1) a w latach 1971—72 ukazała się seria artykułów omawiających biosyntezę, występowanie i własności biologiczne innych związków poliprenoidowych takich jak: monotereny metylocyklopentanowe (2), poliprenole (3), poliprenylowe chinony (4), sterole roślinne (5), karotenoidy (6) oraz bufadienolidy i kardenolidy (7).

Bardzo szybki postęp badań nad biosyntezą trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych wynikający zarówno z zastosowania nowych metod badawczych jak i z zainteresowania jakie wzbudziły niektóre spośród tych związków uzasadnia celowość powtórnego podjęcia po 10 latach tego tematu.

W 1953 r. Ruzička (8) wysunął przypuszczenie, że węglowodór alifatyczny — skwalen jest prekursorem wszystkich trójterpenów zarówno cztero- jak i pięciocyklicznych. W następnych pracach Ruzička, Eschenmoser i wsp. (9—11) przedstawili teoretyczne mechanizmy cyklizacji skwalenu do trójterpenów o różnych szkieletach. Propozycje te, jak również występowanie cyklicznych trójterpenów w organizmach żywych zostały omówione w poprzednich artykułach (1, 12), toteż obecnie ograniczono się tylko do przypomnienia założeń mechanizmów cyklizacji skwalenu do trójterpenów, a zreferowano wyniki szczegółowo eksperymentalnego sprawdzenia schematów biosyntezy trójterpenów dokonane w ostatnich latach.

#### I. Schematy biosyntezy trójterpenów według Ruzički i Eschenmosera

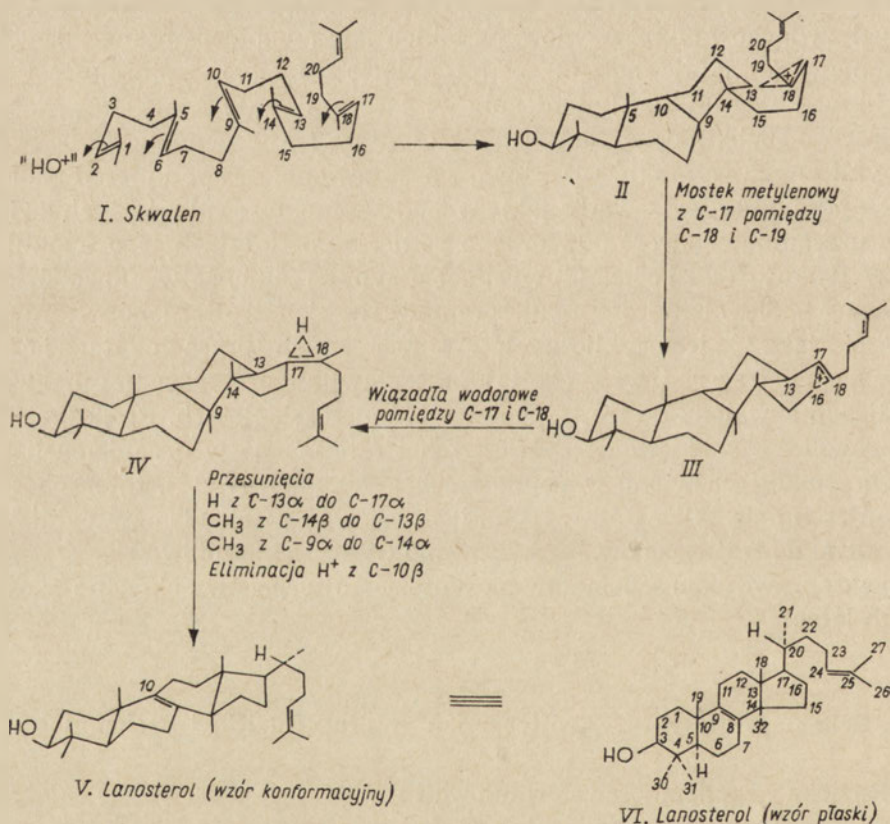
Ruzička i Eschenmoser sformułowali następujące teoretyczne założenia dotyczące przemian zachodzących zarówno bezpośrednio przed cyklizacją skwalenu, jak i w procesie cyklizacji:

Procesowi cyklizacji ulega wyłącznie forma skwalenu całkowicie trans. Łańcuch skwalenu zostaje specyficznie pofałdowany na powierzchni enzymu w określonej sekwencji układów krzesłowych lub łódkowych, które wa-

\* Dr. Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

runkują konformację pierścieni produktu cyklizacji. Cyklizacja skwalenu jest wynikiem szeregu następujących kolejno reakcji na sąsiadujących ze sobą atomach węgla to jest połączeń do podwójnych wiązań, przesunięć Wagnera-Meerweina i eliminacji protonów. Reakcje te mogą zajść tylko wtedy gdy odpowiednie grupy atomów są ustawione w tej samej płaszczyźnie i w pozycji trans względem siebie. Przekształcenie skwalenu w trójterpeny cztero- i pięciocykliczne o różnych szkieletach zachodzi w reakcji „non—stop” to jest bez utworzenia trwałego metabolicznie pośrednika, stabilizowanego przez utratę protonu lub nukleofilowe przyłączenie.

Na rycinie 1 przedstawiono postulowany przez tych autorów mechanizm powstawania lanosterolu (wzór konformacyjny — V, wzór płaski — VI) w wyniku cyklizacji skwalenu (I) pofałdowanego w sekwencję: krzesło—łódka—krzesło—łódka—niepofałdowany.

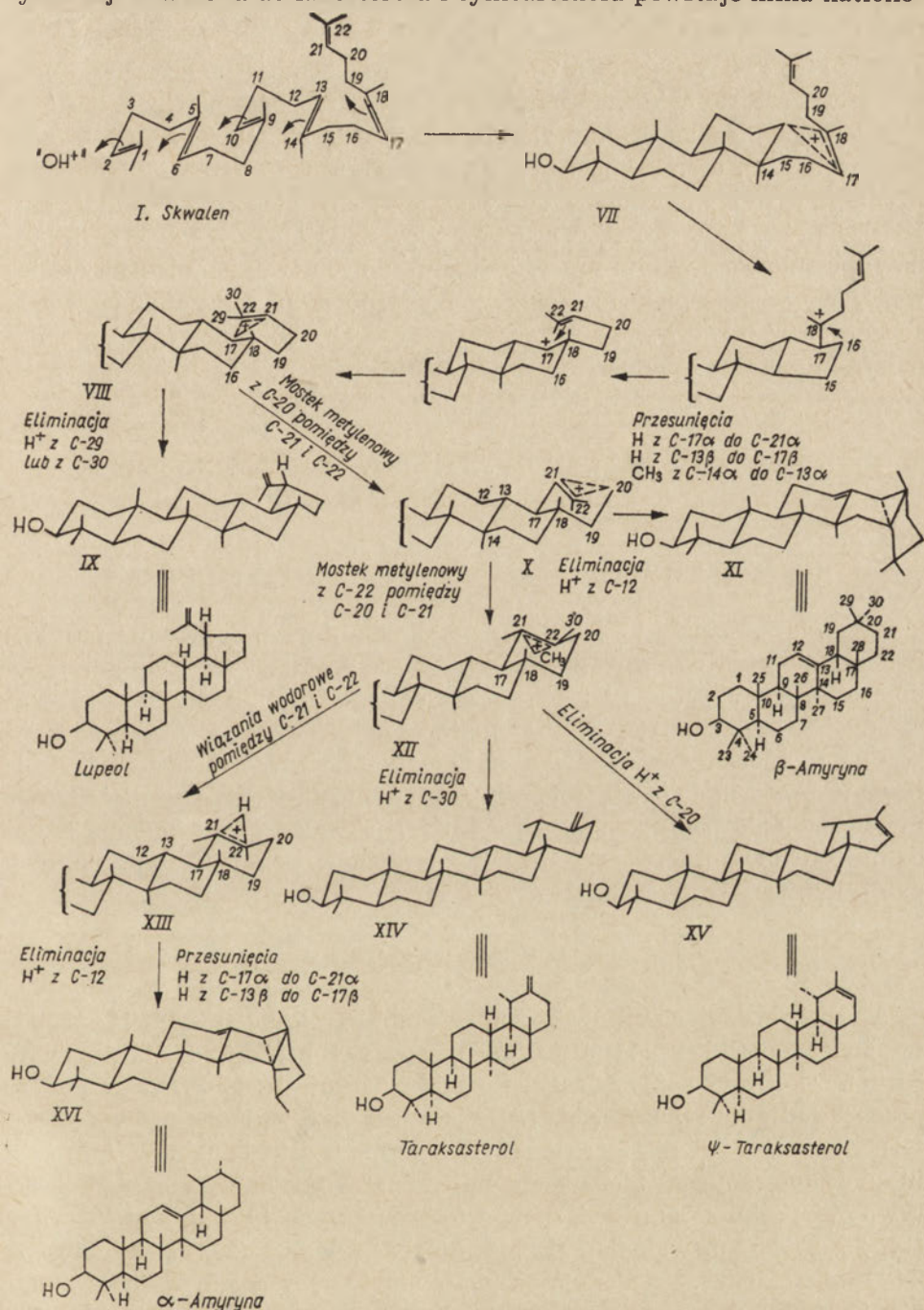


**Ryc. 1.** Cyklizacja skwalenu do trójterpenu czterocyklicznego — lanosterolu  
Znak  $\equiv$  oznacza odpowiedniość wzoru konformacyjnego i wzoru płaskiego

Podana w tym schemacie (Ryc. 1) numeracja atomów węgla w związkach jest taka sama jak w skwaleniu i różni się (ze względu na przegrupowania zachodzące w czasie cyklizacji) od numeracji przyjętej dla trój-



terpenów czterocyklicznych, którą dla porównania zastosowano we wzorze płaskim lanosterolu (VI). Ruzička i Eschenmoser założyli, że w procesie cyklizacji skwalenu do lanosterolu i cykloartenolu powstaje kilka kationo-



Ryc. 2. Cyklizacja skwalenu do trójterpenów pięciocyklicznych  
Znak  $\equiv$  oznacza odpowiedniość wzoru konformacyjnego i wzoru płaskiego

wych pośredników (I, III, IV). Pierwszym trwałym metabolicznie związkiem jest dopiero lanosterol stabilizowany przez eliminację protonu.

Na rycinie 2 przedstawiono postulowane mechanizmy cyklizacji skwalenu pofałdowanego w sekwencję krzesło-krzesło-krzesło-łódka-łódka.

Również i w tym przypadku Ruzička i Eschenmoser założyli występowanie w procesie cyklizacji skwalenu do trójterpenów pięciocyklicznych o szkieletach oleananu  $\beta$ -amyryna (XI), ursanu taraksasterol (XIV),  $\psi$ -taraksasterol (XV),  $\alpha$ -amyryna (XVI) i lupanu lupeol (XVII) wielu metabolicznie nietrwałych kationowych związków pośrednich (VII, VIII, X, XII, XIII). Oprócz przemieszczeń grup metylowych i atomów wodoru (protonów) postulowano w tym procesie dwukrotne rozerwanie łańcucha węglowego. We wzorze płaskim  $\beta$ -amyryny podano numerację atomów węgla stosowaną w trójterpenach pięciocyklicznych aby pokazać różnice pomiędzy tą numeracją a numeracją w skwalenie.

## II. Doświadczalne sprawdzenie schematów biosyntezy trójterpenów Ruzički i Eschenmosera

### II-1. Metody stosowane w badaniach nad biosyntezą trójterpenów

Schematy Ruzički i Eschenmosera zakładały przemieszczenia poszczególnych atomów lub grup atomów zachodzące w czasie cyklizacji skwalenu do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych. Uzyskanie danych doświadczalnych potwierdzających występowanie takich przemieszczeń atomów byłoby równoznaczne z potwierdzeniem powyższych schematów biosyntezy. W pracy nad rozwiązaniem tego zagadnienia stosowano dwie grupy metod: badania nad enzymatyką cyklizacji skwalenu oraz badanie metodami izotopowymi losów poszczególnych atomów skwalenu w produktach cyklizacji.

#### II-1.a. Metody enzymatyczne

W tych badaniach sprawdzono czy tkanki roślinne (13, 14, 15, 16, 17) lub zwierzęce (18), a w bardziej zaawansowanych pracach, czy homogenaty bezkomórkowe (19—21) lub frakcje subkomórkowe (22—25) są zdolne do przeprowadzania reakcji cyklizacji skwalenu oraz jego analogów do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych o różnych szkieletach. W tym celu inkubowano materiał biologiczny lub preparat enzymatyczny z radioaktywnymi prekursorami związków trójterpenowych takimi jak:  $^{14}\text{C}$ -octan (14, 26, 27)  $^{14}\text{C}$ -mewalonian (13, 15, 28),  $^{14}\text{C}$ -skwalen (20, 24, 29, 30) czy  $^3\text{H}$ -skwalen (20, 29, 30). Podejmowano również próby wyodrębnienia w stanie czystym lub znacznie oczyszczonym enzymów cyklizujących skwalen (29—32).

## II-1.b. Metody izotopowe

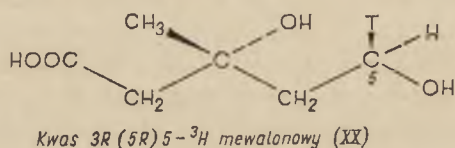
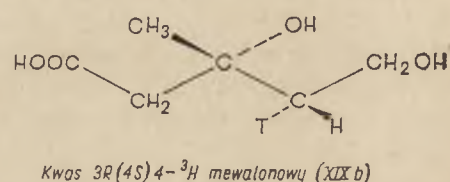
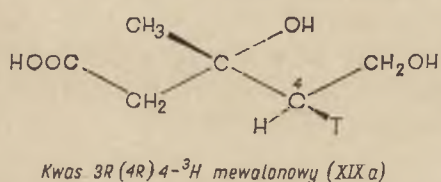
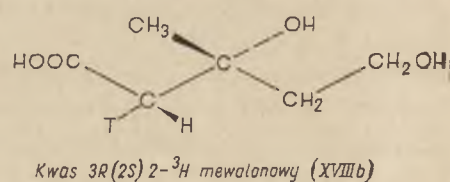
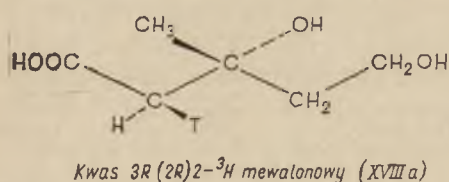
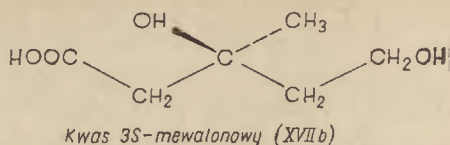
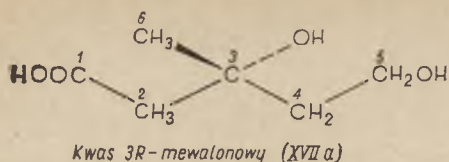
Prekursory związków trójterpenowych stosowane do inkubacji z materiałem biologicznym znakowane były izotopami nieradioaktywnymi, względnie izotopami radioaktywnymi (pojedynczo lub podwójnie).

W tych badaniach wypróbowano trzy nieradioaktywne izotopy:  $^{18}\text{O}$  (30, 33),  $^{13}\text{C}$  (34, 35) i  $^2\text{H}$  (17, 30).  $^{18}\text{O}_2$  i  $\text{H}_2$   $^{18}\text{O}$  użyto w badaniach nad wyjaśnieniem pochodzenia grupy  $3\beta$  OH wytwarzanej podczas cyklizacji skwalenu (30, 35, 36).  $^{13}\text{C}$  i  $^2\text{H}$  stosowano do inkubacji z materiałem biologicznym w postaci takich związków jak:  $^{13}\text{C}$ -mewalonian (34),  $^{13}\text{C}$ -skwaleń (35) i  $6\text{-}^2\text{H}_3$ -mewalonian (17). Analiza zawartości nieradioaktywnych izotopów w trójterpenach wydzielonych po inkubacji z prekursorami znakowanymi ciężkimi izotopami wymagała zastosowania nowoczesnych metod fizykochemicznych takich jak spektrografia masowa (badanie „nadmiaru”  $^{18}\text{O}$  i  $^{13}\text{C}$  w związkach) lub pomiary jądrowego rezonansu magnetycznego (badanie zawartości  $^2\text{H}$ ) (37).

W badaniach nad biosyntezą trójterpenów stosowano skwaleń i jego analogi oraz praktycznie wszystkie radioaktywne prekursory skwalenu, znakowane w różnych pozycjach za pomocą  $^{14}\text{C}$  lub  $^3\text{H}$  (38—40). Losy poszczególnych atomów w procesie cyklizacji skwalenu śledzono prowadząc degradację chemiczną produktów jego cyklizacji, wyodrębnionych po inkubacji materiału biologicznego z radioaktywnymi prekursorami (np. 41, 42). Porównywano znakowanie poszczególnych fragmentów lub atomów uzyskanych po degradacji trójterpenoidów z danymi teoretycznymi przewidującymi określone przegrupowania atomów skwalenu w czasie cyklizacji. Metoda degradacji chemicznej wymaga dosyć dużych ilości określonych związków naturalnych, niezbędnych do rozcieńczenia radioaktywnych trójterpenoidów wydzielanych w śladowych ilościach po inkubacji z prekursorami. Degradacja trójterpenoidów zachodząca często z małą wydajnością wymagała zastosowania drastycznych warunków (np. 43), w których były możliwe dodatkowe przegrupowania atomów w otrzymanych w wyniku rozbicia cząsteczek fragmentach, co bardzo utrudniało jednoznaczną interpretację wyników.

Zastosowanie jako prekursorów trójterpenoidów, preparatów kwasu mewalonowego podwójnie znakowanych za pomocą  $^{14}\text{C}$  w pozycji 2 i za pomocą  $^3\text{H}$  stereospecyficznie w różnych pozycjach cząsteczki spowodowało szybki postęp w badaniach biosyntezy tych związków (5, 39, 44). Metody otrzymywania podwójnie znakowanych preparatów kwasu mewalonowego opracowali w połowie lat sześćdziesiątych J. W. C o r n f o r t h i R. H. C o r n f o r t h (45). Wzory tego związku stereospecyficznie znakowanego trytem w pozycjach: 2, 4 i 5 przedstawiono na rycinie 3.

Kwas mewalonowy ma jeden węgiel asymetryczny (C-3). Istnieją więc dwa enancjomery: kwas 3R-mewalonowy (XVIIa) i kwas 3S-mewalonowy (XVIIb). Wykazano absolutną specyficzność kinazy mewalonianowej (jedy-



Ryc. 3. Stereospecyficzne znakowanie kwasu mewalonowego za pomocą <sup>3</sup>H (T) w różnych pozycjach cząsteczki

nego znanego dotychczas enzymu, dla którego kwas mewalonowy jest substratem) w stosunku do enancjomeru o konfiguracji R (46, 47).

Wiadomo, (np. 38, 40, 49, 50) że atomy C-2 z różnych enancjomerów kwasu mewalonowego znakowanym za pomocą <sup>14</sup>C ulegają wbudowywaniu do biosyntetyzowanego z nich skwalenu, a następnie do produktów jego cyklizacji. Tak więc użycie kwasu mewalonowego podwójnie znakowanego za pomocą <sup>14</sup>C w pozycji 2 i za pomocą <sup>3</sup>H w określonej pozycji pozwalało na śledzenie losów poszczególnych atomów wodoru wyłącznie na podstawie wartości stosunku <sup>3</sup>H:<sup>14</sup>C w izolowanych produktach cyklizacji skwalenu. Zastosowanie kwasu mewalonowego, podwójnie znakowanego w różnych pozycjach, do badań biosyntezy związków poliprenoidowych zostało szerzej omówione na łamach *Postępów Biochemii* (3,6).

## II-2. Aktywacja skwalenu w biosyntezie trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych

Ruzicka i Eschenmoser założyli, że biosynteza trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych odbywa się w przebiegającym „non—stop” procesie cy-

klizacji skwalenu. Tymczasem stwierdzono (20, 22), że w procesie biosyntezy lanosterolu (prekursora cholesterolu i hormonów sterydowych w organizmach zwierzęcych) ze skwalenu można wyróżnić dwa etapy: aktywację skwalenu i właściwą cyklizację. W reakcji katalizowanej przez specyficzną oksydazę następuje utlenienie skwalenu do 2,3-oksydoskwalenu, który cyklizuje do lanosterolu przy udziale drugiego enzymu — cyklazy 2,3-oksydoskwalenu. Stwierdzono, że inkubacja z 2,3-iminoskwalenem, analogiem 2,3-oksydoskwalenu, który jest inhibitorem cyklazy 2,3-oksydoskwalenu powodowała nagromadzenie się 2,3-oksydoskwalenu w materiale biologicznym (51). Stosując jako prekursor 2,3-<sup>18</sup>O-oksydoskwalen wykazano, że tlen pierścienia epoksydowego zostaje wbudowany do grupy 3 $\beta$ -OH trójtępenów. Dodatkowym potwierdzeniem faktu, że utlenienie skwalenu i cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu są oddzielnymi procesami enzymatycznymi były dane wskazujące, że 10,11-dwuhydrokskwalen jest w homogenatach wątroby ssaków utleniany do odpowiedniej 2,3-epoksydowej pochodnej, która nie ulega jednak dalszej cyklizacji (20).

Wykazano (31, 32) także, że aktywność cyklazy 2,3-oksydoskwalenu można zahamować podgrzewając surowy preparat enzymatyczny do 50°C w ciągu 5 minut. Po tym zabiegu aktywność cyklazy skwalenu mierzona na podstawie szybkości przekształcania skwalenu w 2,3-oksydoskwalen pozostaje niezmienną. Otrzymano również dosyć dobrze oczyszczone preparaty oksydazy skwalenu z wątroby szczura (31, 32, 52) i cyklazy 2,3-oksydoskwalenu z wątroby wieprza (32, 53). Cyklazę skwalenu uwalniano z mikrosomów działaniem dezoksyholanu. W roztworach o wysokiej sile jonowej (np. 0,4M KCl) i w obecności dezoksyholanu enzym zachowywał wysoką aktywność. Zastosowanie sączenia preparatów cyklazy 2,3-oksydoskwalenu przez Sephadex G-200 wykazało, że enzym ten może występować zarówno w aktywnej, zdysocjowanej formie jak i w nieaktywnej — zagregowanej. W roztworach o dużej sile jonowej i w obecności dezoksyholanu przeważała zdysocjowana, aktywna forma enzymu o masie cząsteczkowej około 90 000. Nie wykazano udziału jakichkolwiek kofaktorów w reakcji cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu do lanosterolu. Cyklaza jest również niewrażliwa na wiele powszechnie stosowanych inhibitorów, natomiast oksydaza skwalenu wymaga do swego działania dodatku składników zawartych w nadsączy oraz O<sub>2</sub> i NADPH<sub>2</sub>. Tlenek węgla i jony CN<sup>-</sup> nie powodują inaktywacji tego enzymu.

Podobny do stwierdzonego w biosyntezie lanosterolu w tkankach zwierzęcych mechanizm aktywacji skwalenu, występuje również w biosyntezie prekursora steroli roślinnych — cykloartenolu (54, 55), kwasu fusydikowego (56) czy pięciocyklicznego trójtępenu —  $\beta$ -amyryny (57). Sugerują to, że 2,3-oksydoskwalen jest wspólnym dla organizmów zwierzęcych i roślinnych prekursorem związków trójtępenoidowych zawierających w pozycji 3 szkieletu grupę hydroksylową lub inną funkcję tlenową.

### II-3. Cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu i jego analogów chemicznych do trójtępenów czterocyklicznych

#### II-3.a. Cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu do lanosterolu

W wyniku badań przeprowadzonych *in vivo* oraz *in vitro* na materiale zwierzęcym wykazano, że pierwszym metabolicznie trwałym produktem cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu jest lanosterol (np. 32). Cyklizację, 2,3-oksydoskwalenu do tego związku stwierdzono również w bezkomórkowych preparatach otrzymanych z grzybów (58, 59).

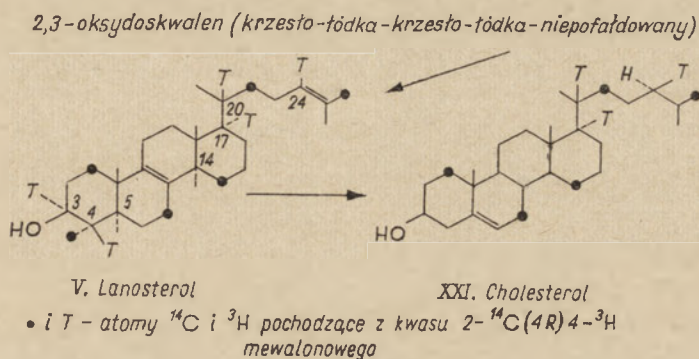
Badania nad mechanizmem przemieszczania grup metylowych w procesie cyklizacji skwalenu do lanosterolu podjęto już w 1958 r. (34—35) (Ryc. 1). Degradując lanosterol i cholesterol (XXI) wyodrębnione po inkubacji  $^{13}\text{C}$ -skwalenu z homogenatem wątroby stwierdzono na podstawie rozmieszczenia  $^{13}\text{C}$  w cząsteczkach tych związków, że w procesie cyklizacji skwalenu zachodzą dwie migracje grup metylowych pomiędzy sąsiadującymi atomami węgla.

Badaniem przemieszczeń atomów wodoru zachodzących w procesie cyklizacji skwalenu do lanosterolu zajęli się Cornforth i wsp. (60). Inkubowano kwas  $2\text{-}^{14}\text{C}(4\text{R})4\text{-}^3\text{H}$  mewalonowy z homogenatem wątroby. Wartość stosunku  $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  oznaczona w lanosterolu wydzielonym po inkubacji (5:6) wskazywała na utratę w procesie cyklizacji skwalenu jednego atomu  $^3\text{H}$  pochodzącego z pozycji 4-pro-R kwasu mewalonowego (skwalen jest syntetyzowany z 6-ciu cząsteczek tego kwasu). W cholesterolu (XXI) pochodzącym z lanosterolu stwierdzono natomiast eliminację kolejnych dwóch atomów  $^3\text{H}$  i jednego atomu  $^{14}\text{C}$  ( $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  równe 3:5).

Omówione powyżej badania zapoczątkowały dalsze, w których zastosowano jako prekursory: kwas mewalonowy znakowany za pomocą  $^{14}\text{C}$  w pozycji 2 i za pomocą  $^3\text{H}$  w pozycji 2 (konfiguracja R lub S, XVIIIa,b) (61—64), w pozycji 4 (konfiguracja R, XIXa) (65, 66) i 5 (konfiguracja R, XX) (67). Radioaktywne prekursory inkubowano z homogenatami wątroby ssaków lub z preparatami enzymatycznymi otrzymanymi z *Tetrahymena pyriformis*. Następnie w lanosterolu i cholesterolu wydzielonych z materiału biologicznego, a także w produktach ich chemicznej degradacji oznaczano stosunki radioaktywności  $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  i porównywano z wartościami  $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  otrzymanymi dla podwójnie znakowanego skwalenu również wyodrębnianego po inkubacji. Stwierdzono w ten sposób, że w procesie cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu do lanosterolu ulega eliminacji proton z pozycji 9 szkieletu (pozycja 10 skwalenu) co jest zgodne z postulowanym przez Ruzickę i Eschenmosera mechanizmem cyklizacji skwalenu do tego związku (Ryc. 1).

Bezpośrednie dane doświadczalne potwierdzające postulowane przemieszczenia atomów wodoru z C-13 i C-17 do C-17 i C-20 (pozycja 18 skwalenu) uzyskano w wyniku badań nad lokalizacją atomów  $^3\text{H}$  w cholesterolu wyodrębnionym po inkubacji z kwasem  $2\text{-}^{14}\text{C}(4\text{R})4\text{-}^3\text{H}$  mewala-

nowym (66). Wykazano, że atomy  $^3\text{H}$  pochodzą z pozycji 4-pro-R kwasu mewalanowego zgodnie z przewidywaniami uwzględniającymi wspomniane przemieszczenia zlokalizowane w pozycjach 17, 20 i 24-pro-R. Na rycinie 4 przedstawiono zaproponowane przez Cornfortha i wsp. (60) i potwierdzone w dalszych badaniach (np. 66) rozmieszczenie atomów  $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$  w lanosterolu i cholesterolu po inkubacji z kwasem  $2\text{-}^{14}\text{C}(4\text{R})4\text{-}^3\text{H}$  mewalanowym.



Ryc. 4. Rozmieszczenie atomów  $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$  w lanosterolu i cholesterolu biosyntetyzowanych z kwasu  $2\text{-}^{14}\text{C}(4\text{R})4\text{-}^3\text{H}$  mewalanowego

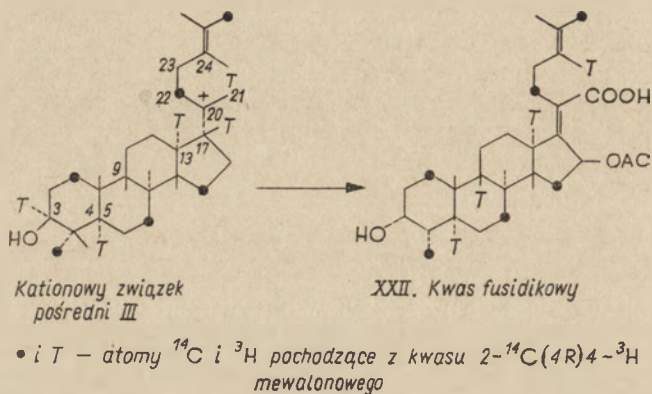
### II-3.b. Cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu do kwasu fusidikowego

Ze względu na brak trwałych związków pośrednich w procesie cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu do trójterpenów czterocyklicznych trudno było sprawdzić doświadczalnie czy postulowane przez Ruzičkę i Eschenmosera kationowe związki pośrednie biorą udział w tym procesie (Ryc. 1).

Badania biosyntezy kwasu fusidikowego (XXII), trójterpenu czterocyklicznego z pleśni *Fusidium coccineum* dostarczyły wyników przemawiających za udziałem kationowego związku pośredniego III (Ryc. 1) w cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu do trójterpenów czterocyklicznych. Struktura kwasu fusidikowego sugerowała, że powstaje on bezpośrednio z kationu III bez dodatkowych przekształceń polegających na przemieszczeniu atomów wodoru czy grup metylowych. Zgodnie z tym przypuszczeniem atomy wodoru pochodzące z pozycji 4-pro-R kwasu mewalanowego powinny znajdować się w kwasie fusidikowym w pozycjach, w jakich występowały w cyklizującym 2,3-oksydoskwalenie. Kwas fusidikowy wyodrębniony po inkubacji z kwasem  $2\text{-}^{14}\text{C}(4\text{R})4\text{-}^3\text{H}$  mewalanowym powinien więc zawierać atomy  $^3\text{H}$  w pozycjach: 3, 5, 9, 13 i 24. Rzeczywiście wykazano (68, 69), że otrzymany w takich warunkach podwójnie znakowany kwas fusidikowy zawiera w cząsteczce cztery atomy  $^3\text{H}$  i sześć atomów  $^{14}\text{C}$  (wartość  $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  po znormalizowaniu równa 4:6). Ustalona w wyniku degradacji chemicznej lokalizacja atomów  $^3\text{H}$  okazała się zgodną z przewidywaną (pozycje

5a, 9b, 13a i 24). Eliminacja atomu  $^3\text{H}$  z pozycji 3 w procesie biosyntezy kwasu fusydikowego wskazywała, że podczas demetylacji w pozycji 4 następuje utlenienie grupy  $3\beta\text{-OH}$  do grupy ketonowej. Brak eliminacji atomów  $^{14}\text{C}$  świadczył o tym, że w czasie przemiany kationu III w kwas fusydikowy eliminowana jest grupa  $4\beta\text{-metylowa}$ . Na rycinie 5 przedstawiono rozmieszczenie atomów  $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$  w kationowym związku pośrednim III i w kwasie fusydikowym (XXII) — po inkubacji z kwasem  $2\text{-}^{14}\text{C}(4\text{R})4\text{-}^3\text{H}$  mewalonowym.

*2,3-oksydoskwalen (krzesto-tódka-krzesto-tódka-niepofatdowany)*



Ryc. 5. Biosynteza kwasu fusydikowego (68, 69)

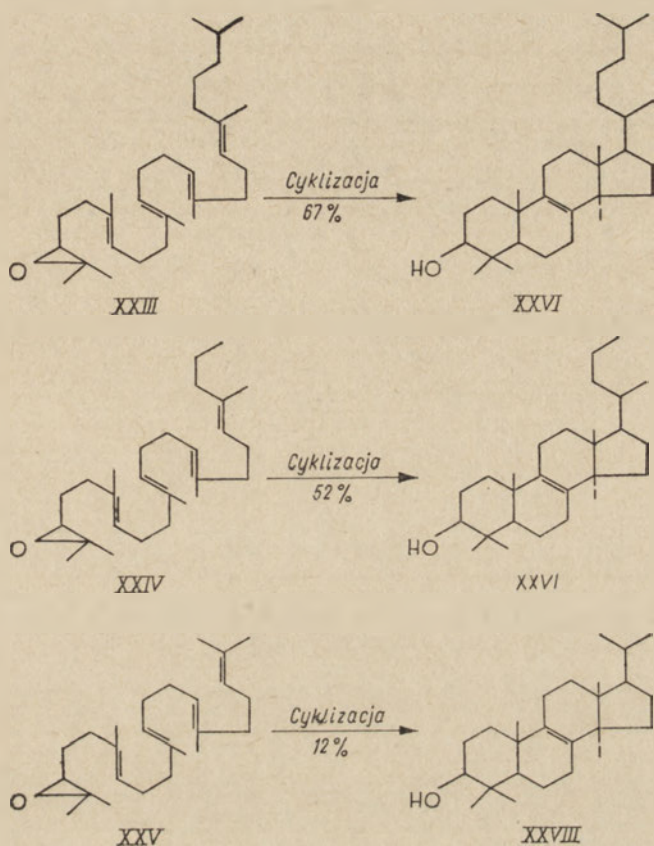
W końcu 1972 r. ukazało się doniesienie z pracowni Caspiego (70), w którym wykazano, że atomy wodoru pochodzące z pozycji 2 kwasu mewalonowego są włączane do kwasu fusydikowego w pozycji 22 bez zmiany konfiguracji. Sugeruje to, że w biosyntezie kwasu fusydikowego w *F. cocci-neum* nie występuje związek pośredni o wiązaniu podwójnym  $\Delta^{20}$  (22).

III3.c. Cyklizacja analogów chemicznych 2,3-oksydoskwalenu do trójtlenków czterocyklicznych

Po stwierdzeniu, że 2,3-oksydoskwalen jest właściwym substratem cyklazy katalizującej biosyntezę lanosterolu podjęto próby chemicznej syntezy radioaktywnych analogów 2,3-oksydoskwalenu znakowanych za pomocą  $^{14}\text{C}$  lub  $^3\text{H}$  w różnych pozycjach. Zsyntetyzowano analogi różniące się od 2,3-oksydoskwalenu w takich miejscach cząsteczki, które mogły zmienić oddziaływanie substratu z centrum aktywnym enzymu. Badając zachowanie się takich analogów w obecności cyklazy 2,3-oksydoskwalenu próbowano określić zależność pomiędzy mechanizmem działania enzymu a strukturą chemiczną substratu. Do tych doświadczeń stosowano częściowo oczyszczone, „upłynnione” preparaty cyklazy otrzymane w wyniku potraktowania mikrosonów wątroby szczura dezoksycholanem sodu (71).



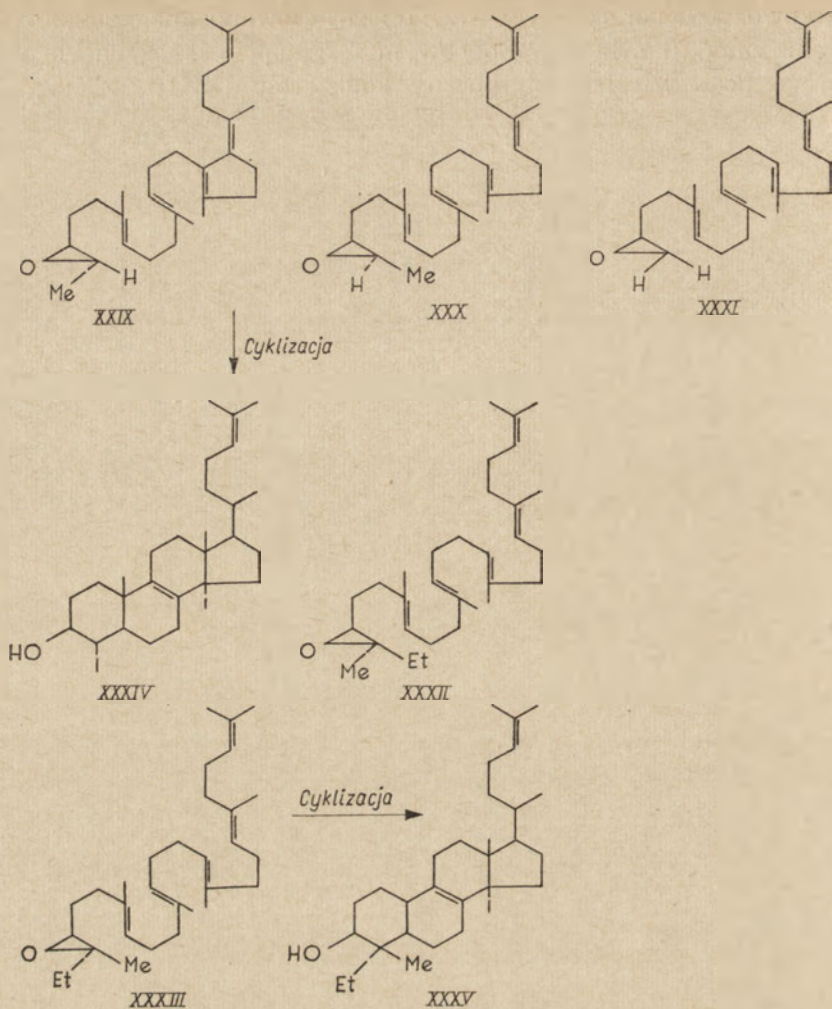
Początkowo w badaniach tych (72, 73) zastosowano analogi 2,3-oksydoskwalenu zmodyfikowane w końcowym fragmencie łańcucha węglowego z którego pochodził łańcuch boczny lanosterolu (XXIII, XXIV, XXV) (Ryc. 6).



Ryc. 6. Cyklizacja analogów 2,3-oksydoskwalenu zmodyfikowanych w końcowym fragmencie łańcucha węglowego (72, 73)

Stwierdzono, że chociaż wydajność cyklizacji zmniejszała się w miarę skracania łańcucha bocznego substratu, to wprowadzone modyfikacje chemiczne nie uniemożliwiły cyklizacji i przemieszczeń grup metylowych oraz atomów wodoru prowadzących do stabilizacji wytworzonych analogów trójterpenów (XXVI, XXVII, XXVIII). W dalszych badaniach próbowano wyjaśnić znaczenie czwartorzędowego układu na C-2 2,3-oksydoskwalenu w zapoczątkowaniu cyklizacji. W tym celu (74) przygotowano różne analogi zmodyfikowane w tej pozycji (XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIII) (Ryc. 7).

Tylko dwa z nich (XXIX, XXXIII) jak to zaznaczono na powyższym schemacie ulegały cyklizacji katalizowanej przez preparat enzymatyczny (XXXIV, XXXV). Wydajność cyklizacji nie przekraczała jednak kilku

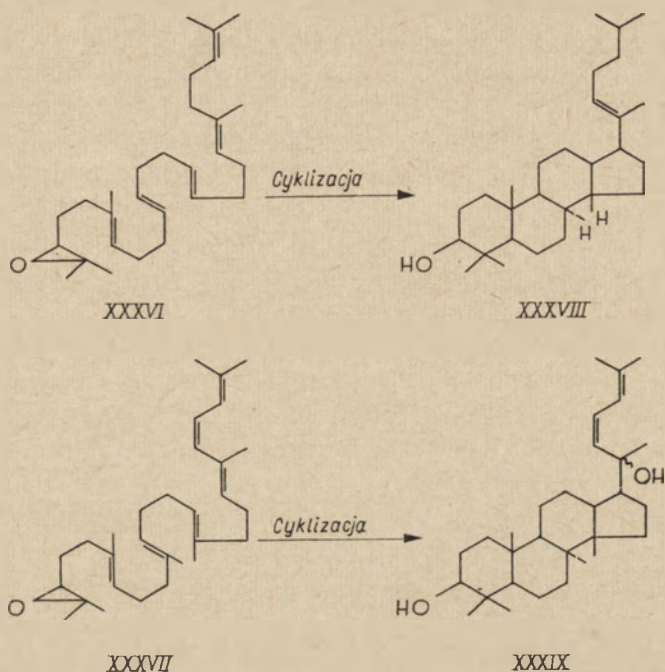


Ryc. 7. Cyklizacja analogów 2,3-oksydoskwalenu zmodyfikowanych w pozycji C2 (74)

procent. Pozostałe analogi nie wchodziły w ogóle w reakcję. Potwierdziło to decydujące znaczenie pozycji 2 dla zapoczątkowania cyklizacji, gdyż okazało się, że nawet niewielkie modyfikacje w tym miejscu cząsteczki uniemożliwiają zajście tego procesu.

Ze schematów 1 i 2 wynika, że mechanizm cyklizacji sprowadza się do oddziaływań pomiędzy jonami karbonyowymi a sąsiednimi podwójnymi wiązaniami. Zakłada się, że przemieszczenia grup metylowych i atomów wodorów zachodzą w sposób skoordynowany z procesem cyklizacji. Dane, które otrzymano badając biosyntezę kwasu fusydikowego wskazują jednak na możliwość cyklizacji bez przemieszczeń. Nasuwa się więc pytanie czy na przykład w biosyntezie lanosterolu można rozdzielić fazę cyklizacji od fazy przemieszczeń. Kontynuacja badań nad analogami 2,3-oksydoskwalenu

(75—77) potwierdziła taką możliwość. Stwierdzono (Ryc. 8), że kolejne analogi 2,3-oksydoskwalenu (XXXVI, XXXVII) ulegały enzymatycznej cyklizacji bez przemieszczeń grup metylowych i atomów wodoru (XXXVIII, XXXIX). Cyklizacja analogu 2,3-oksydoskwalenu (XXXVI) bez grup metylowych w pozycjach 10 i 15 prowadziła do wytworzenia produktu zbli-

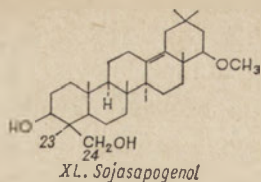


Ryc. 8. Cyklizacja analogów 2,3-oksydoskwalenu (75—77)

żonego do kwasu fusydikowego (XXXVIII), który powstawał prawdopodobnie w wyniku eliminacji protonu w pozycji 20 odpowiedniego jonu karbonyowego. Substrat XXXVII zawierał natomiast dodatkowe podwójne wiązanie sprzężone z podwójnym wiązaniem końcowej jednostki izoprenowej. Obecność tego wiązania spowodowała, że stabilizacja wytworzonego w czasie cyklizacji jonu karbonyowego była związana z przyłączeniem  $\text{OH}^-$  do C-20 prowadząc do wytworzenia dwuwodorotlenowego czterocyklicznego trójterpenu (XXXIX).

#### II-4. Cyklizacja 2,3-oksydoskwalenu i jego analogów chemicznych do trójterpenów pięciocyklicznych

Chociaż trójterpeny pięciocykliczne są związkami powszechnie występującymi w roślinach to badania nad ich biosyntezą zostały zapoczątkowane dopiero w 1958 r. przez Arigonięgo (41), który stwierdził, że młode siewki soi włączały do skwalenu i sojasapogenu radioaktywność z  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -octanu,  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -octanu i  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -mewalonianu (XL).



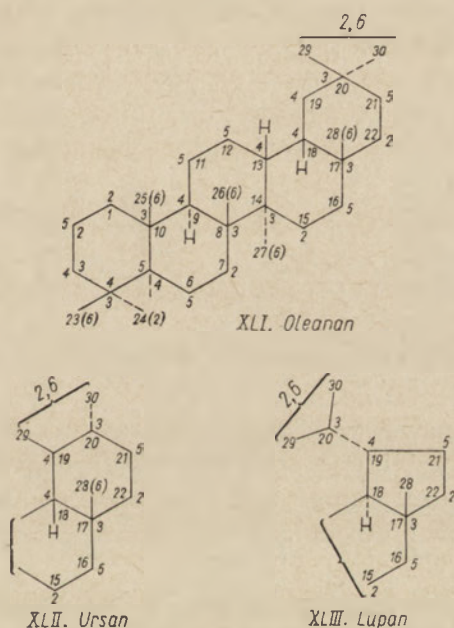
Przeprowadzając degradację chemiczną sojasapogenolu wyodrębnionego po inkubacji z kwasem 2-<sup>14</sup>C mewalonowym wykazano, że spośród dwóch grup metylowych C-23 i C-24 tego związku znakowaniu ulega wyłącznie ekwatorialna grupa metylowa C-23. Wskazuje to, że zarówno proces izomeryzacji pirofosforanu izopentenylu do pirofosforanu dwumetyloallilu jak i proces cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu są ściśle stereospécyficzne, gdyż nie zachodzi podczas nich randomizacja grup metylowych C-23 i C-24.

Wyniki badań nad biosyntezą β-amyryny (XI), które prowadzono inkubując kiełkujące nasiona grochu z kwasem 2-<sup>14</sup>C(4R)4-<sup>3</sup>H mewalonowym wykazały, że wartość stosunku <sup>3</sup>H:<sup>14</sup>C była taka sama w skwalenie i w β-amyrynie, jak w stosowanym preparacie kwasu mewalonowego. Do takich samych wniosków doprowadziły doświadczenia, w których inkubowano liście *Camelia sinensis* (16) również z kwasem mewalonowym znakowanym jak poprzednio. Także i w tej roślinie nie następowała utrata trytu z tych pozycji β-amyryny, które znakował zastosowany preparat kwasu mewalonowego. Inkubacja siewek grochu z tym samym preparatem kwasu mewalonowego oraz następcze oznaczenie stosunku <sup>3</sup>H:<sup>14</sup>C w produktach degradacji chemicznej podwójnie znakowanej β-amyryny pozwoliło na lokalizację 5-ciu z 6-ciu atomów <sup>3</sup>H znajdujących się w cząsteczce. Ustalone rozmieszczenie atomów <sup>3</sup>H było zgodne z rozmieszczeniem przewidzianym na podstawie postulowanego przez Ruzičkę i Eschenmosera mechanizmu cyklizacji skwalenu do β-amyryny (Ryc. 2). Uzupełnieniem tych rezultatów było badanie rozmieszczenia deuteru w skwalenie i β-amyrynie wyodrębnionych z siewek grochu po inkubacji z kwasem 6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub> mewalonowym. Wykazano, że końcowe grupy metylowe w pozycji cis skwalenu oraz grupa metylowa 4 (C-24) w β-amyrynie powstają stereospécyficznie z grupy metylowej (C-6) kwasu mewalonowego. Barton i wsp. (78) potwierdzili natomiast doświadczalnie postulowane przez Ruzičkę i Eschenmosera, a następnie przez innych (49, 50) przesunięcia atomów wodoru zachodzące w procesie cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu do β-amyryny.

Zarówno β-amyryna jak i sojasapogenol są zaliczane do trójterpenów pięciocyklicznych o szkielecie oleananu. W roślinach wyższych szeroko rozpowszechnione są również trójterpeny pięciocykliczne o szkieletach: ursanu, lupanu, serratu, fridelanu i gammaceranu (43).

Śliwowski i Kasprzyk (79, 80) prowadzili badania nad stereospécyficznością biosyntezy pięciocyklicznych alkoholi trójterpenowych

jedno- i dwuwodorotlenowych w izolowanych kwiatach języczkowych nagietka (*Calendula officinalis*). Poprzednio wykazano, że kwiaty i siewki tej rośliny biosyntetyzują monole trójterpenowe o szkieletach: lupanu (lupeol (IX)), oleananu ( $\beta$ -amyryna (XI)) i ursanu (taraksasterol XIV),  $\psi$ -taraksasterol (XV),  $\alpha$ -amyryna (XVI)), które są następnie hydroksylowane do odpowiednich dioli trójterpenowych (14, 27, 81—83). Stereospecyficzność biosyntezy trójterpenów pięciocyklicznych o szkieletach ursanu, lupanu i oleananu badano inkubując kwiaty nagietka z czterema preparatami kwasu mewalonowego podwójnie znakowanego za pomocą  $^{14}\text{C}$  w pozycji 2 i  $^3\text{H}$  w pozycjach 2R, 2S, 4R i 5R,S. Na rycinie 9 przedstawiono przewidywane w oparciu o mechanizmy cyklizacji skwalenu Ruzički i Eschenmosera rozmieszczenie atomów węgla i wodoru pochodzących z poszczególnych pozycji kwasu mewalonowego w szkieletach oleananu (XLI), ursanu (XLII) i lupanu (XLIII).

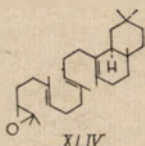


Ryc. 9. Rozmieszczenie atomów węgla pochodzących z poszczególnych pozycji kwasu mewalonowego w szkieletach trójterpenów pięciocyklicznych

W wyodrębnionych po inkubacji z preparatami podwójnie znakowanego kwasu mewalonowego alkoholach trójterpenowych, pochodnych chemicznych tych związków oraz w skwalenie oznaczano stosunki radioaktywności  $^3\text{H}$ : $^{14}\text{C}$ . W wyniku tych oznaczeń stwierdzono obecność atomów  $^3\text{H}$  w pozycjach 3, 12, 16, 21, 29 (taraksasterol) i 3, 12, 16, 21, 30 ( $\psi$ -taraksasterol) szkieletu ursanu; 3, 12, 29 i 30 szkieletu lupanu oraz 3, 11, 12 i 18 szkieletu oleananu. Wykazano także, że stabilizacja  $\alpha$ - i  $\beta$ -amyryn,  $\psi$ -taraksasterolu i lupeolu połączona jest ze stereospecyficzną eliminacją protonu odpowiednio z pozycji: 12, 29 lub 30.

Uzyskane przez tych autorów wyniki wskazują, że biosynteza alkoholi trójterpenowych o szkieletach ursanu, lupanu i oleananu zachodzi w kwiatach nagietka zasadniczo według mechanizmów postulowanych przez Ruzičkę i Eschenmosera (Ryc. 2). Ponadto wykryto odmienne pochodzenie grup metylowych C-29 i C-30 w  $\psi$ -taraksasterolu i taraksasterolu. Rozgałęzienie dróg biosyntezy tych związków zachodzi prawdopodobnie na etapie kationu X (Ryc. 2) na skutek różnicy w stereochemii przesunięcia jednej z bliźniaczych grup metylowych z pozycji 21 cyklizującego skwalenu. Stwierdzono także randomizację znakowania C-29 i C-30 grupy izopropylidenuowej lupeolu.

Wiadomo, że w jednej roślinie występują często obok siebie trójterpeny pięciocykliczne o różnych szkieletach, na przykład w nagietku, (14, 81) co sugeruje istnienie odrębnych cyklaz dla różnych typów szkieletów. Ciekawe wyniki uzyskano stosując analogi chemiczne 2,3-oksydoskwalenu. Stwierdzono, że 29,30-bis-nor-2,3-oksydoskwalen ulega w grochu przekształceniu w 29,30-bis-nor- $\beta$ -amyrynę (84). Ostatnio przeprowadzono również enzymatyczną (homogenat z siewek grochu) syntezę  $\beta$ -amyryny z otrzymanego na drodze chemicznej dwucyklicznego izomeru 2,3-oksydoskwalenu (XLIV) (85). Enzymy cyklizujące skwalen są więc zdolne do ka-



talizowania reakcji nawet wtedy gdy substrat jest w znacznym stopniu zmodyfikowany ale cyklizacja prowadzi zawsze do związków o określonym typie szkieletu (np.  $\beta$ -amyryna lub jej pochodne w przypadku zastosowania homogenatów z grochu).

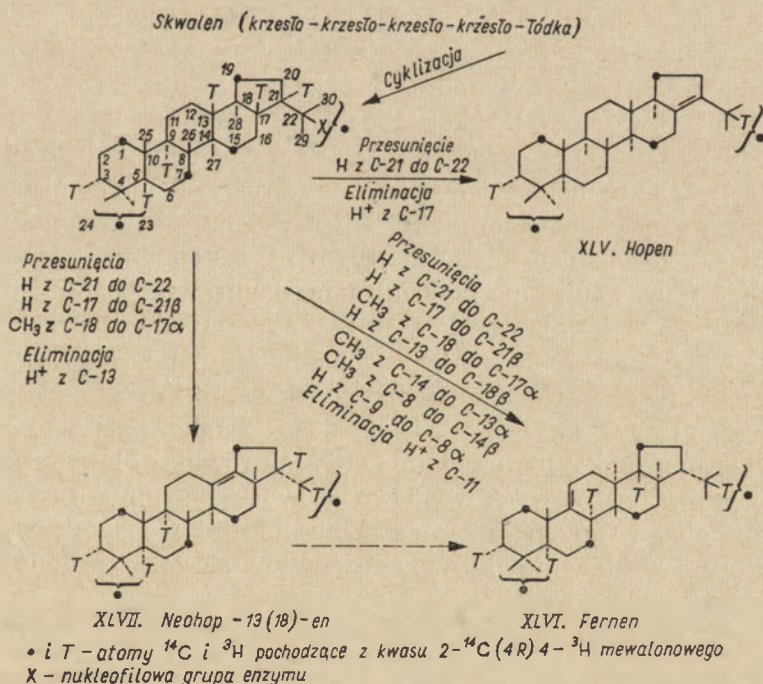
#### II-5. Nieoksydacyjna cyklizacja skwalenu do pięciocyklicznych węglowodorów trójterpenowych i 3-dezoksyalkoholi

W ostatnich latach wykryto również dużą grupę trójterpenów pięciocyklicznych, których budowa, wskutek braku grupy hydroksylowej lub innej tlenowej grupy funkcyjnej w pozycji 3 szkieletu, wskazywała na możliwość innych, niż przedstawione powyżej mechanizmów aktywacji i cyklizacji skwalenu. I tak, z różnych gatunków paproci wyodrębniono pięciocykliczne węglowodory trójterpenowe (89—91) jak również monole i diole trójterpenowe zawierające grupy hydroksylowe w pozycjach różnych od pozycji 3 (86, 92). Możliwość cyklizacji skwalenu inicjowanej atakiem protonu (a nie jak proponował Ruzička, atakiem kationu  $\text{OH}^+$ , czy jak to wykazano później — utlenieniem skwalenu do 2,3-oksydoskwa-

lenu) była rozważana już dawno (47, 93). Dopiero jednak w latach 1969—70 (29, 30, 33, 87, 94—96) uzyskano dane doświadczalne potwierdzające nieoksydacyjny mechanizm cyklizacji skwalenu do 3-dezoksyalkoholi i węglowodorów trójterpenowych.

Szczegółowe badania przeprowadzono na paproci *Polypodium vulgare* wytwarzającej pięciocykliczne węglowodory trójterpenowe o różnych szkieletach oraz  $\beta$ -sitosterol (97). Liście paproci inkubowano ze znakowanymi trytem prekursorami: skwalenem i 2,3-oksydiskwalenem. Wykazano (29), że radioaktywność ze skwalenu została włączona zarówno do węglowodorów trójterpenowych jak i do  $\beta$ -sitosterolu. Natomiast po inkubacji z  $^3\text{H}$ -2,3-oksydiskwalenem radioaktywność odnajdywano wyłącznie w  $\beta$ -sitosterolu. Wykazano więc, że *P. vulgare* cyklizuje skwalen na dwa różne sposoby: z udziałem 2,3-oksydiskwalenu jako związku pośredniego (biosynteza  $\beta$ -sitosterolu) oraz bez uprzedniego utlenienia skwalenu (biosynteza pięciocyklicznych trójterpenowych węglowodorów). Stwierdzono ponadto, że nie zachodzi przemiana 2,3-oksydiskwalenu w skwalen.

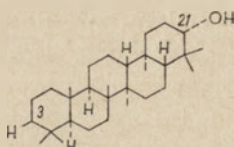
Dalszych danych odnośnie biosyntezy węglowodorów trójterpenowych dostarczyły badania (87), w których zastosowano kwas 2- $^{14}\text{C}$ (4R)4- $^3\text{H}$  mewalonowy. Po inkubacji z tym prekursorem wyodrębniono z *P. vulgare* cztery węglowodory trójterpenowe: hopen (XLV), fernien (XLVI), diploten i serraten a następnie oznaczono dla nich stosunki radioaktywności  $^3\text{H}$ : $^{14}\text{C}$ . W fernieniu, diplotenie i serratenie te stosunki były w przybliżeniu takie



Ryc. 10. Biosynteza węglowodorów trójterpenowych: hopenu, neohop-13(18)-enu (87)

same jak w wydzielonym radioaktywnym skwalenie (6:6). Natomiast wartość stosunku  $^3\text{H}:$  $^{14}\text{C}$  oznaczona dla hopenu wskazywała na utratę w procesie cyklizacji skwalenu jednego atomu trytu (5:6). Na tej podstawie zaproponowano teoretyczny schemat biosyntezy węglowodorów pięciocyklicznych, którego fragment przedstawiony jest na rycinie 10.

Równolegle prowadzone badania nad mechanizmem nieoksydacyjnej cyklizacji skwalenu do tetrahymanolu (XLVII), pięciocyklicznego monolu



XLVII. Tetrahymanol

trójterpenowego o szkielecie gammaceranu. Tetrahymanol syntetyzowany przez pierwotniaka *Tetrahymana pyriformis* wykryty został również w roślinie *Oleandra wallichii* (92). Wyniki badań nad biosyntezą tego trójterpenu prowadzone *in vitro*, przy użyciu preparatów enzymatycznych otrzymanych z tego pierwotniaka (30, 33) oraz *in vivo*, w kulturach *T. pyriformis* (96) wykazały, że cyklizacja skwalenu do tetrahymanolu zachodzi w warunkach beztlenowych i nie wymaga udziału 2,3-oksydoskwalenu, co sugerowało, że atom tlenu w tym związku nie pochodzi z  $\text{O}_2$  (95). Inkubacja kultur i preparatów enzymatycznych z *T. pyriformis* z mieszaniną  $^3\text{H}$ -2,3-oksydoskwalenu i  $^{14}\text{C}$ -skwalenu wykazała bowiem, że do tetrahymanolu włącza się radioaktywność wyłącznie z  $^{14}\text{C}$ -skwalenu (96). Doświadczenia z  $^2\text{H}_2\text{O}$  ujawniły natomiast włączenie w pozycji 3 jednego atomu deuteru z wody (94). Inkubacja z  $\text{H}_2\text{O}^{18}$  pozwoliła na stwierdzenie, że atom tlenu grupy OH w pozycji 21 tetrahymanolu pochodzi również z wody (33). Dane te nie pozwalają jednak na rozróżnienie pomiędzy dwoma możliwymi mechanizmami cyklizacji skwalenu do tetrahymanolu, to jest pomiędzy mechanizmem polegającym na wstępnym ataku protonu w pozycji 3 (tzw. „puli” mechanizm) a mechanizmem postulującym zapoczątkowanie cyklizacji skwalenu przez atak anionu hydroksylowego ( $\text{OH}^-$ ) w wyniku którego następuje utworzenie grupy hydroksylowej w pozycji 21 (tzw. *push mechanism*) (68). Jednak wyniki otrzymane w badaniach mechanizmów aktywacji i cyklizacji skwalenu do trójterpenów z tlenową grupą funkcyjną na atomie C-3, jak również biosynteza pięciocyklicznych trójterpenowych węglowodorów z podwójnie znakowanego kwasu mewalonowego opisana przez Ghisalberti i Goodwina wskazują, że mechanizm, w którym cyklizacja rozpoczyna się atakiem anionu  $\text{OH}^-$  jest mniej prawdopodobny.

### III. Uwagi końcowe

Trójterpeny cztero- i pięciocykliczne oraz sterole są doskonałym mo-



delem do badania mechanizmów stereospecyficznych reakcji enzymatycznych ze względu na trwałość szkieletów tych związków. Reakcje cyklizacji 2,3-oksydoskwalenu do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych są ściśle stereospecyficzne. Wiadomo, że na przykład  $\beta$ -amyryna może teoretycznie występować w 256 formach stereoizomerycznych, podczas gdy układy enzymatyczne występujące w roślinach warunkują powstawanie tylko jednego enancjomeru. Dlatego też postęp w badaniach nad mechanizmami biosyntezy związków trójterpenowych może przyczynić się do wyjaśnienia stereospecyficzności reakcji enzymatycznych (98, 99).

Artykuł wpłynął dnia 28.1.1974, po rewizji autorskiej wrócił dnia 12.3.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Jachymczyk W., (1963), *Post. Biochem.*, **9**, 91—104.
2. Jerzmanowski A., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 75—90.
3. Turowska G., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 483—495.
4. Jerzmanowski A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 273—284.
5. Turowska G., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 257—272.
6. Wojciechowski Z., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 285—302.
7. Janiszowska W., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 489—500.
8. Ruzicka L., (1953), *Experientia*, **9**, 357—396.
9. Eschenmoser A., Ruzicka L., Jeger O., Arigoni D., (1955), *Helv. Chim. Acta* **38**, 1890—1904.
10. Ruzicka L., (1959), *Proc. Chem. Soc.*, str. 341—360.
11. Ruzicka L., (1956) w *Perspectives in Organic Chemistry*, red. Sir A. Todd, str. 265—314, Interscience, New York.
12. Fonberg-Broczek M., (1966), *Post. Biochem.*, **12**, 347—361.
13. Baistead D. J., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 375—383.
14. Kasprzyk Z., Śliwowski J., Skwarko B., (1972), *Phytochemistry*, **11**,
15. Kasprzyk Z., Wojciechowski Z., Jerzmanowski A., (1971), *Phytochemistry*, **10**, 797—805.
16. Sharma R. K., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 565—568.
17. Suga T., Shishibori T., Kimoto S., (1972), *Chemistry Letters*, (Chem. Soc. Japan), 129—130.
18. Loud A. V., Bucher N. L. R., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 37—41.
19. Beastall G. H., Rees H. H., Goodwin T. W., (1972), *FEBS Letters*, **28**, 243—246.
20. Corey E. J., Russey W. E., (1966), *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 4751—4752.
21. Heintz R., Benveniste P., (1972), *C.R. Acad. Sci. Paris*, **274**, 947—950.
22. van Tamelen E. E., Willett J. D., Clayton R. B., Lord K. E., (1966), *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4752—4754.
23. Heintz R., Benveniste P., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 1499—1503.
24. Polito A., Popjak G., Parker T., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3464—3470.
25. Shah S. N., (1972), *FEBS Letters*, **20**, 75—78.
26. Hartman M. A., Benveniste P., Durst F., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 3003—3006.
27. Kasprzyk Z., Wojciechowski A., (1969), *Phytochemistry*, **8**, 1921—1926.

28. Waller G. R., (1969), *Progress in Chemistry of Fate and Other Lipids*, 10, cz. 2, Pergamon Press, Oxford.
29. Barton D. H. R., Gosden A. F., Mellows G., Widdowson D. A., (1969), *Chem. Commun.*, str. 184—186.
30. Zander J. M., Greig J. B., Caspi E., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 1247—1254.
31. Yamamoto S., Bloch K., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 1670—1674.
32. Yamamoto S., Bloch K., (1970), w *Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid*, red. T. W. Goodwin, str. 35—43, Academic Press, London, New York.
33. Zander J. M., Caspi E., (1969), *Chem. Commun.*, str. 209—210.
34. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Pelter A., Horning M. G., Popjak G., (1959), *Tetrahedron*, 5, 311—339.
35. Maudgal R. K., Tchen T. T., Bloch K., (1958), *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 2589—2590.
36. Willett J. D., Sharpless K. B., Lord K. E., van Tamelen E. R., Clayton R. B., (1967), *J. Biol. Chem.*, 242, 4182—4191.
37. Silverstein R. M., Bassler G. C., (1970), *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, PWN, Warszawa.
40. Popjak G., (1970) w *Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid*, red. T. W. Goodwin, str. 45—77, Academic Press, London, New York.
39. Mulheirn L. J., Ramm P. J., (1972), *Chem. Soc. Rev.*, 1, 259—291.
40. Popjak G., (1970) w *Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid*, red. T. W. Goodwin, str. 17—33, Academic Press, London, New York.
41. Arigoni D., (1958), *Experientia*, 14, 153—155.
42. Dauben W. G., Fonken G. J., Boswell G. A., (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1000—1001.
43. Boiteau P., Pasich B., Ratsimamanga A. R., (1964), *Les Triterpenoides*, Gauthier Villars, Paris.
44. Hanson J. R., (1971), *Advan. Steroid Biochem. Pharmacol.*, 1, 51—71.
45. Cornforth J. W., Cornforth R. H., (1970) w *Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid*, red. T. W. Goodwin, str. 5—15, Academic Press, London, New York.
46. Cornforth R. H., Cornforth J. W., Popjak G., (1962), *Tetrahedron*, 18, 1351—1354.
47. Tchen T. T., (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 6344—6345.
48. Williams R. J. H., Britton G., Charlton J. M., Goodwin T. W., (1967), *Biochem. J.*, 104, 767—777.
49. Rees H. H., Britton G., Goodwin T. W., (1968), *Biochem. J.*, 106, 659—665.
50. Rees H. H., Mercer E. J., Goodwin T. W., (1966), *Biochem. J.*, 99, 726—734.
51. Corey E. J., Ortiz de Montellano P. R., Lin K., Dean P. D. G., (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 2797—2798.
52. Tai H. H., Bloch K., (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 3767—3773.
53. Yamamoto S., Lin K., Bloch K., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 63, 110—117.
54. Eppenberger U., Hirth L., Ourisson G., (1969), *Eur. J. Biochem.*, 8, 180—183.
55. Hewlins M. J., Ehrhardt J. D., Hirth L., Ourisson G., (1969), *Eur. J. Biochem.*, 8, 184—188.
56. Godtfredsen W. O., Lork H., van Tamelen E. E., Willett J. D., Clayton R., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 208—209.

57. Corey E. J., Ortiz de Montellano P. R., (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3362—3363.
58. Barton D. H. R., Gosden A. F., Mellows G., Widdowson D. A., (1968), *Chem. Commun.*, str. 1067—1068.
59. Mercer E. J., Johnson M. W., (1969), *Phytochemistry*, **8**, 2329—2331.
60. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Donninger C., Popjak G., Shimizu Y., Icchii S., Rorchielli E., Caspi E., (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3224—3228.
61. Caspi E., Greig J. B., Ramm P. J., Varma K. R., (1968), *Tetrahedron Letters*, str. 3829—3832.
62. Caspi E., Zander J. M., (1969), *Chem. Commun.*, str. 1141—1143.
63. Gibbons G. F., Goad L. J., Goodwin T. W., (1968), *Chem. Commun.*, str. 1212—1214.
64. Zander J. M., Caspi E., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1682—1687.
65. Caspi E., Varma K. R., Greig J. B., (1969), *Chem. Commun.*, str. 45—46.
66. Mulheirn L. J., Caspi E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3948—3952.
67. Goad L. J., Gibbons G. F., Bolger L. M., Rees H. H., Goodwin T. W., (1969), *Biochem. J.*, **114**, 885—892.
68. Caspi E., Mulheirn L. J., (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 404—406.
69. Mulheirn L. J., Caspi E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2494—2501.
70. Caspi E., Ebersole R. C., Godfredsen W. O., Vengedal S., (1972), *Chem. Commun.*, str. 1191—1193.
71. Dean P. D. G., Ortiz de Montellano P. R., Bloch K., Corey E. J., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3014—3015.
72. Anderson R. J., Hanzlik R., Sharpless K. B., van Tamelen E. E., Clayton R. B., (1969), *Chem. Commun.*, str. 53—54.
73. van Tamelen E. E., Sharpless K. B., Willett J. D., Clayton R. B., Burlingame A. L., (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3920—3922.
74. Crosby L. O., van Tamelen E. E., Clayton R. B., (1969), *Chem. Commun.*, str. 532—533.
75. Corey E. J., Lin K., Yamamoto H., (1969), *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2132—2134.
76. Corey E. J., Ortiz de Montellano P. R., Yamamoto H., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6254—6255.
77. Corey E. J., Yamamoto H., (1970), *Tetrahedron Letters*, **27**, 2385—2386.
78. Barton D. H. R., Mellows G., Widdowson D. A., Wright J. J., (1971), *J. Chem. Soc.*, sec. C, str. 1142—1148.
79. Śliwowski J., Kasprzyk Z., (1974), *Phytochemistry* (w druku).
80. Kasprzyk Z., Śliwowski J., (1973), 4th International Congress of Biochemistry, Abstracts, Sztokholm 1973, str. 401.
81. Kasprzyk Z., Pyrek J., (1968), *Phytochemistry*, **7**, 1631—1639.
82. Śliwowski J., Dziewanowska K., Kasprzyk Z., (1973), *Phytochemistry*, **12**, 157—160.
83. Śliwowski J., Kasprzyk Z., (1972), *Tetrahedron*, **28**, 991—1000.
84. Corey E. J., Gross S. K., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5045—5046.
85. Horan H., Mc Cornick J. P., Arigoni D., (1973), *Chem. Commun.*, str. 73—74.
86. Berti G., Bottari F., (1968), w *Progress in Phytochemistry*, red. L. Reinhold, Liwshitz Y., **1**, str. 589—685, Interscience, New York.
87. Ghisalberty E. L., de Souza N. J., Rees H. H., Goodwin T. W., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 1817—1823.
88. Pandley G. N., Mitra C. R., (1967), *Tetrahedron Letters*, **23**, 1353—1357.

89. Pandley G. N., Mitra C. R., (1967), *Tetrahedron Letters*, **23**, 4683—4688.
90. Tsuda Y., Isobe K., (1965), *Tetrahedron Letters*, **21**, 3337—3343.
91. Yosicka I., Matsuda A., Kitagawa I., (1966), *Tetrahedron Letters*, **22**, 613—616.
92. Zander J. M., Caspi E., Pandley G. N., Mitra C. R., (1969), *Phytochemistry*, **8**, 1597—1600.
93. Barton D. H. R., de Mayo P., Orr J. C., (1958), *J. Chem. Soc.*, **7**, 2239—2248.
94. Caspi E., Greig J. B., Zander J. M., Mandelbaum A., (1969), *Chem. Commun.*, str. 28—29.
95. Caspi E., Greig J. B., Zander J. M., (1968), *Biochem. J.*, **109**, 931—932.
96. Caspi E., Zander J. M., Greig J. B., Mallory F. B., Conner R. L., Landre J. R., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3563—3564.
97. de Souza N. J., Ghisalberti E. L., Rees H. H., Goodwin T. W., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 1247—1252.
98. Goad L. J., Goodwin T. W., (1972), w *Progress in Phytochemistry*, red. L. Reinhold, Liwshitz Y., **3**, 113—198, Interscience, New York.
99. Ebersole R. C., Godfredsen W. O., Vangedal S., Caspi E., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 8133—8140.

IGNACY ZENON SIEMION\*

## Spektroskopia Ramana w badaniach struktury białek

### Raman Spectroscopy in Investigation of Protein Structure

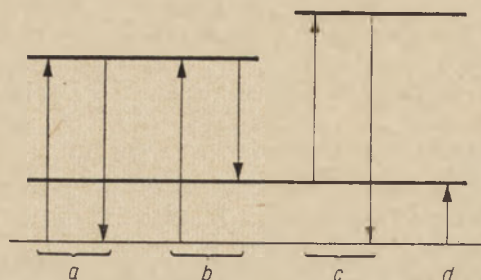
Spektroskopia Ramana traktowana jest w badaniach strukturalno-chemicznych jako metoda dopełniająca spektroskopię w podczerwieni (IR). W zakresie badań nad polipeptydami i białkami wykazuje ona jednak wyraźną przewagę nad spektroskopią IR. A to dzięki możliwości zastosowania techniki ramanowskiej do roztworów wodnych badanych związków chemicznych.

Woda bardzo silnie absorbuje promieniowanie podczerwone w zakresie częstości charakterystycznych dla grup w związkach organicznych, co praktycznie nieomal wyklucza możliwość dokonania pomiarów widm absorpcyjnych tych związków w roztworach wodnych. W spektroskopii Ramana bada się natomiast nie absorpcję, a rozproszenie promieniowania padającego na próbkę, i wykorzystuje zjawisko niesprężonych zderzeń kwantów promieniowania z badanym ośrodkiem. Podczas zderzeń niesprężystych dochodzi do wymiany energii między kwantem promieniowania, a cząsteczką. Energia kwantu podczas niesprężystego oddziaływania z cząsteczką może ulec zmianie — zmniejszeniu lub zwiększeniu — o takie porcje energii, które odpowiadają przejściom między kwantowymi poziomami drgań w cząsteczce. Jako następstwo zderzeń niesprężystych, w rozproszonym przez badany ośrodek promieniowaniu wystąpią obok kwantów o niezmienionej energii, kwanty różniące się odpowiadającą ich energii długością fali od długości fali źródła promieniowania. Można je zaobserwować jako dodatkowe linie w widmie promieniowania rozproszonego przez próbkę. Linie powstające w wyniku oddania części energii kwantów cząsteczkom noszą nazwę linii Stokesa, te zaś, które powstają w wyniku akceptacji przez kwanty energii cząsteczek — linii antystokesowych. Linia widma promieniowania rozproszonego o niezmienionej długości fali nosi nazwę linii Rayleigha. Schematyczny obraz zachodzących podczas zderzeń niesprężystych procesów przedstawia rycina 1.

Z uwagi na fakt, że większość cząsteczek występuje w niewzbudzonym stanie podstawowym, powstawanie linii stokesowych, związane z oddawaniem części energii kwantów cząsteczkom, jest bardziej prawdopodobne niżeli proces, prowadzący do pojawienia się linii antystokesowych. Linie stokesowe są więc intensywniejsze od antystokesowych i one są w pierw-

\* Prof. dr hab., Instytut Chemii, Uniwersytetu im. B. Bieruta, Wrocław.

szym rzędzie przedmiotem analizy. Widmo ramanowskie, podobnie jak widmo IR, daje informacje o poziomach energetycznych drgań w cząsteczce. Współczesny zapis widma Ramana jest w pełni analogiczny do zapisu widma w podczerwieni i wskazuje w skali częstości ( $\text{cm}^{-1}$ ) energie drgań



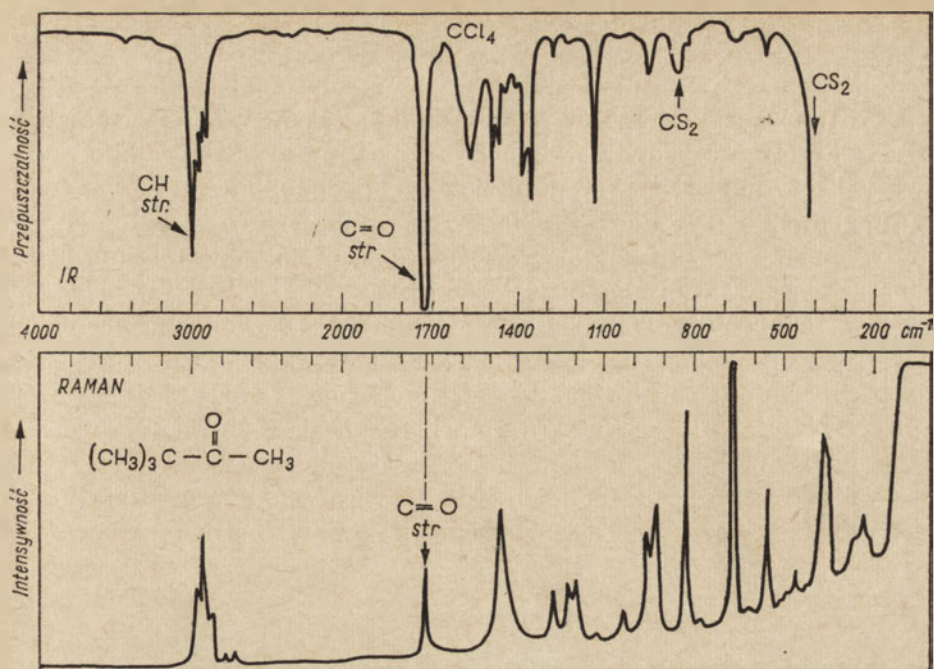
Ryc. 1. Diagram poziomów energetycznych obrazujący efekt Ramana (1):

- linia Rayleigha — energia kwantów promieniowania padającego na próbkę jest równa energii kwantów promieniowania rozproszonego,
- linia Stokesa — energia kwantów promieniowania rozproszonego przez próbkę jest mniejsza od energii kwantów promieniowania padającego na próbkę o porcję energii równą energii wzbudzenia określonego drgania w cząsteczkach próbki,
- linia antystokesowa — energia kwantów promieniowania rozproszonego jest zwiększona o porcję energii odpowiadającą energii określonego drgania w cząsteczkach,
- energia wzbudzenia określonego drgania w cząsteczkach próbki (podczerwony zakres promieniowania elektromagnetycznego)

poszczególnych grup atomów w badanej cząsteczce. W odróżnieniu jednak od spektroskopii IR, w której natężenie pasm absorpcji jest wykładniczą funkcją stężenia badanej substancji, natężenie linii w widmie Ramana wyraża z dobrym przybliżeniem liniowa funkcja stężenia.

Porównanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana ujawnia jednak obok podobieństw zasadnicze różnice. Pojawienie się pasm absorpcji w podczerwieni związane jest ze zmianami podczas drgań momentów dipolowych poszczególnych wiązań chemicznych. Silne pasma absorpcji w widmie IR przejawiają wszystkie grupy polarne, jak karbonylowa, hydroksylowa i amidowa ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}-$ ). Występowanie odpowiednich linii w widmie Ramana wiąże się natomiast ze zmianami polaryzowalności wiązań chemicznych, te zaś są silniejsze właśnie dla drgań grup niepolarnych. Silne linie Ramana dają więc na ogół, mało aktywne w widmie IR grupy, jak  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{S}-\text{S}$ ,  $\text{C}-\text{S}$ . Sytuację tę unocznia rycina 2, na której porównano widmo IR oraz widmo Ramana t-butylometyloketonu.

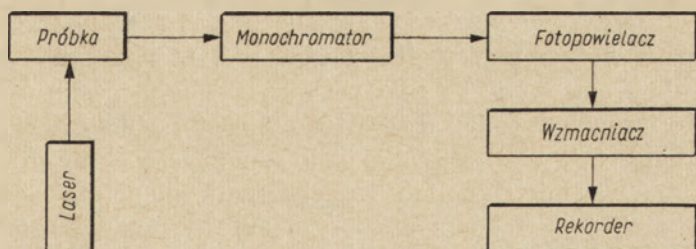
Zjawisko niesprężystych zderzeń kwantów promieniowania z cząsteczkami wykrył Raman w roku 1928. Rejestracja widm ramanowskich, z uwagi na bardzo małą intensywność światła rozproszonego niesprężysto, wywołanego naświetlaniem przez lampę rtęciową, była długotrwała. Dodatkowe kłopoty sprawiała nakładająca się na rozpraszanie ramanowskie fluorescencja próbek. Zasadniczy postęp wyrównujący szanse stosowania spektroskopii Ramana w stosunku do szybciej uprzednio rozwijającej się



Ryc. 2. Porównanie widm IR, oraz Ramana, t-butylo-metyloketonu (2)

Strzałka wskazuje znaczny relatywny spadek intensywności pasm drgań rozciągających grupy karbonylowej (około  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) i grupy metylowej (około  $3000\text{ cm}^{-1}$ ), oraz wzrost intensywności pasm leżących poniżej  $1000\text{ cm}^{-1}$

spektroskopii IR, przyniosło zastosowanie w charakterze źródła promieniowania laserów. Laserowe źródła promieniowania stosowane w spektroskopii ramanowskiej pracują w widzialnym zakresie widma. Zastosowanie lasera, wielokrotnie zwiększając szybkość zapisu widma, poważnie ogranicza również możliwość fluorescencji próbek. Przeniesienie pomiaru do zakresu widzialnego dodatkowo upraszcza problemy konstrukcji soczewek skupiających i siatek dyfrakcyjnych, oraz umożliwia użycie szkła jako elementu konstrukcyjnego. Uproszczony schemat współczesnego laserowego spektrometru Ramana przedstawia rycina 3.



Ryc. 3. Uproszczony schemat laserowego spektrometru Ramana

## I. Spektroskopia ramanowska białek

Możliwość zastosowania spektroskopii Ramana do badania struktury białek rozważał jeszcze w 1938 roku E d s a l l (3). W 1958 G a r f i n k e l i E d s a l l (4) przedstawili wykonane tradycyjną techniką widmo ramanowskie lizozymu. Dziesięć lat później T o b i n opublikował pierwsze widma ramanowskie krystalicznych białek: lizozymu, pepsyny i  $\alpha$ -chymotrypsyny wykonane przy użyciu laserowego źródła promieniowania (5). Szybko narastająca w ostatnim pięcioleciu liczba publikacji z tej dziedziny badań wywołała pojawienie się ostatnio kilku opracowań przeglądowych (6—9). Szczególne nadzieje, jeśli chodzi o zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniach nad białkami, budzi możliwość stosowania roztworów wodnych białka i w związku z tym możliwość bezpośredniego porównania widma białka w fazie stałej i w roztworze. Cząsteczki wody dają bardzo słabe własne rozpraszanie ramanowskie w charakterystycznym dla białek przedziale częstości  $300\text{--}1700\text{cm}^{-1}$ . Jednakże, w widmach ramanowskich wodnych roztworów białek obserwuje się znaczną intensywność zaciemniającego obraz tła. Pojawienie się tła wiązano bądź z wpływem zanieczyszczeń fluoryzujących (10), bądź z rozpraszaniem ramanowskim cząsteczek wody silnie związanych z polarnymi obszarami powierzchni cząsteczki białka (11—12), bądź z brakiem optycznej homogenności prób (13). Wydaje się jednak (14), że zjawiska tego nie można sprowadzić do prostych procesów ramanowskich lub fluorescencyjnych.

Jak wiadomo, podstawowe informacje o konformacji łańcucha polipeptydowego czerpie się w zakresie spektroskopii IR z analizy charakterystycznych częstości grupy amidowej. Częstości te ulegają w widmie ramanowskim poważnym modyfikacjom. Intensywność pasma Amid I, związanego głównie z drganiami rozciągającymi grup karbonylowych wiązań amidowych ( $\nu_{C=O}$ ) jest w widmie Ramana zredukowana, zaś pasmo Amid II przypadające na zakres ok.  $1550\text{cm}^{-1}$  zanika prawie kompletnie. Zmienia się również wkład poszczególnych składowych pasm w ogólny obraz widma. Szczególnie wyraźnie uwypukla się to na przykładzie pasma Amid I dla łańcucha polipeptydowego w  $\beta$ -antyrównoległej konformacji. Konformację taką stwierdzono w przypadku poliglicyny I. Komórkę elementarną kryształu poliglicyny stanowią 4 reszty aminokwasowe ułożonej po dwie w dwu antyrównoległych łańcuchach polipeptydowych. Zgodnie z wyliczeniami M i y a z a w y (15) można w tym przypadku oczekiwać rozszczepienia pasma Amid I na podpoziomy, oznaczone jako A,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ , o różnicach fazowych drgań odpowiednio  $\nu(0,0)$ ,  $\nu(0,\pi)$ ,  $\nu(\pi,0)$  i  $\nu(\pi,\pi)$ . Pierwsze drganie (typu A) jest całkowicie symetryczne i nie przejawia się w widmie IR. W widmie IR poliglicyny obserwuje się natomiast pasma odpowiadające drganiom  $B_1$  i  $B_2$  ( $1687$  i  $1644\text{cm}^{-1}$ ). W widmie ramanowskim poliglicyny (16—17) pojedyncze pasmo Amid I występuje przy  $1674\text{cm}^{-1}$ . Podobnie, pojedyncze pasmo Amid I znaleziono dla poli-L-lizyny przy



( $1672\text{cm}^{-1}$ ) (18) i heksa-L-alaniny (19) w konformacji  $\beta$ -antyrównoległej. Sugeruje się (9), że pojedyncze pasmo Amid I widma ramanowskiego struktury  $\beta$ -antyrównoległej peptydu odzwierciedla nieaktywne w zakresie podczerwieni drgania typu A, które, jak można stąd wnosić, dominuje w widmie ramanowskim.

Jak wskazuje analizowany tutaj przypadek, zakresy występowania poszczególnych charakterystycznych pasm amidowych w widmach IR i w widmach ramanowskich nie pokrywają się ściślej, a obserwowane efekty mają różne podłoża fizyczne. Wniosków, jakie określona technika badawcza pozwala wyciągnąć odnośnie konformacji peptydu, nie można mechanicznie przenosić na grunt drugiej, pokrewnej techniki. Ilustrację takiego stanu rzeczy daje tablica I, w której zestawiono charakterystyczne częstości ugrupowania amidowego w widmie Ramana, oraz w widmie IR, poliglicyny I:

Tabela 8

Porównanie charakterystycznych częstości ugrupowania amidowego w widmach R i IR poliglicyny I (16)

Raman	IR	Przyporządkowanie pasma
3301M	3308S	Amid A
	3088M	Amid B
1674S	1685M	Amid I
	1636S	Amid I
1564W		Amid II
1515W	1517S	Amid II
1234S	1236M	Amid III
1220W	1214W	Amid III
	708S	Amid V
601W	628W	Amid VI
	589M	Amid IV
207W	217W	Amid VII

S — pasmo silne, M — pasmo średniej intensywności, W — pasmo słabe

## II. Określenie konformacji łańcucha polipeptydowego na podstawie widm ramanowskich

Jak wykazały badania nad spektroskopią IR białek i polipeptydów znaczenie diagnostyczne przy określeniu konformacji łańcucha polipeptydowego może mieć położenie w widmie charakterystycznych pasm ugrupowania amidowego. Badania ostatnich lat wykazały wyraźnie, że analogiczne nadzieje można wiązać ze spektroskopią Ramana. Szczególnie obiecujące wydaje się być tutaj zwłaszcza pasmo Amid III.

Badając widmo ramanowskie wodnego roztworu lizozymu zaobserwował L o r d (13) rozszczepienie tego pasma na trzy składowe, występujące

przy 1240, 1262 i 1274 $\text{cm}^{-1}$ . Ponieważ natywny lizozym zawiera obszary o trzech różnych typach konformacji łańcucha polipeptydowego:  $\alpha$ -heliks, struktury  $\beta$ -antyrównoległej, oraz struktury nieuporządkowanej (aperiodycznej), nasuwał się wniosek, iż trzy składowe pasma Amid III w widmie Ramana tego białka odpowiadają tym trzem typom struktury. W widmie Ramana roztworu wodnego rybonukleazy obserwował natomiast Lord (20) tylko dwie składowe pasma Amid III (przy 1240 i 1262 $\text{cm}^{-1}$ ), które przyporządkował odpowiednio konformacji heliks (1262 $\text{cm}^{-1}$ ) i konformacji aperiodycznej (1240 $\text{cm}^{-1}$ ). W przypadku  $\alpha$ -chymotrypsyny składowe pasma Amid III wystąpiły przy 1245 i 1260 $\text{cm}^{-1}$ , a więc podobnie jak to miało miejsce dla rybonukleazy. Mankamentem dokonanych przez Lorda przyporządkowań była jednak ta okoliczność, że zarówno w rybonukleazie, jak i  $\alpha$ -chymotrypsynie struktura helikalna stanowi tylko niewielką część cząsteczki. Dlatego w dalszej pracy (21) dokonał Lord rewizji wcześniejszych przyporządkowań, postulując, iż składowa występująca przy ok. 1260 $\text{cm}^{-1}$  związana jest raczej ze strukturą  $\beta$ -antyrównoległą, składowa występująca ok. 1240 $\text{cm}^{-1}$  odnosi się do obszarów aperiodycznych, zaś składowa będąca wkładem struktury helikalnej przypada na najwyższe częstotliwości. Na podstawie tych ustaleń zinterpretował Lord z konformacyjnego punktu widzenia widma Ramana albuminy surowicy krwi wołu oraz  $\beta$ -laktoglobuliny. Wykorzystał je również (22) dla wyjaśnienia zmian konformacyjnych zachodzących podczas denaturacji lizozymu, wywołanej obecnością dużych stężeń bromku litu. Centrum pasma Amid III przemieszcza się podczas takiej denaturacji z zakresu 1260 $\text{cm}^{-1}$  do zakresu 1245 $\text{cm}^{-1}$ , co zdaniem Lorda oznacza zanik uporządkowania struktury łańcucha polipeptydowego białka. Widmo Ramana lizozymu nie zmienia się natomiast przy ogrzewaniu kwaśnego (pH 5) roztworu białka aż do temperatury 75°C.

Poczynione przez Lorda uogólnienia podważają jednak w znacznej mierze badania Yu i Liu (23). Autorzy ci porównali widma ramanowskie trzech konformacji glukagonu. Wiadomo, iż hormon ten w stanie krystalicznym przybiera w około 75% konformację helikalną, zaś jego świeżo przyrządzony roztwór wodny ma chaotyczną strukturę łańcucha. Przy dłuższym staniu roztwór wodny glukagonu przekształca się w żel zawierający cząsteczki o  $\beta$ -antyrównoległej konformacji łańcucha. Zmiany te uwidaczniają się w widmach ramanowskich przesunięciami pasma Amid III polipeptydu z zakresu 1266 $\text{cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -heliks), do zakresu 1248 $\text{cm}^{-1}$  (struktura nieuporządkowana), a następnie 1232 $\text{cm}^{-1}$  (konformacja  $\beta$ -antyrównoległa). Równocześnie pasmo Amid I przesuwają się z zakresu 1658 $\text{cm}^{-1}$  do 1640, a następnie 1672 $\text{cm}^{-1}$ . Należy tutaj zauważyć, że dokonane na tej podstawie przyporządkowanie określonych zakresów częstotliwości pasm Amid I i Amid III poszczególnym typom struktury łańcucha polipeptydowego pozostaje w dosyć dobrej korelacji z wynikami uzyskanymi dla syntetycznych polimerów aminokwasowych o znanej konformacji łańcucha. I tak,

F a n c o n i i wsp. (24) stwierdzili, iż w przypadku poli-L-alaniny w konformacji heliks pasmo Amid I przypada na 1660, a Amid III na  $1264\text{cm}^{-1}$ . Dla poliglicyny I (konformacja  $\beta$ -antyrównoległa) pasma te przypadają odpowiednio na 1674 i  $1234\text{cm}^{-1}$  (16).

Widma ramanowskie szeregu poliaminokwasów zbadał K o e n i g, otrzymując w szczególności dane dotyczące heliksoidalnej konformacji poli-L-alaniny (25), poli-L-lizyny (26), oraz poli-L-leucyny i poli- $\gamma$ -benzylol-L-glutaminowego kwasu (27). Pasma Amid I występowało na ogół w rejonie  $1652\text{cm}^{-1}$ . Pasma amid III identyfikował Koenig w zakresie 1310— $1330\text{cm}^{-1}$ . Dla poliaminokwasów w konformacji  $\beta$ -antyrównoległej pasmo Amid I wystąpiło przy 1663— $1668\text{cm}^{-1}$ , zaś pasmo Amid III wykazywało strukturę złożoną, z silną linią w rejonie 1230— $1236\text{cm}^{-1}$  (9).

Przyporządkowanie określonych zakresów częstości konformacji nieuporządkowanej jest zdaniem Koeniga (9) zamierzeniem dosyć wątpliwym. Dla poliaminokwasów w tej konformacji znalazł on wartości częstości 1649 i  $1247\text{cm}^{-1}$  w przypadku poliglutaminianu sodu oraz  $1657\text{cm}^{-1}$  w przypadku poli-L-lizyny (26). Zdaniem L o r d a (13) dla poli-glutaminianu sodu odpowiednie wartości wynoszą 1665 i  $1248\text{cm}^{-1}$ .

Oddzielnym wreszcie problemem jest przyporządkowanie odpowiednich częstości widma ramanowskiego konformacji  $\beta$ -równoległej. Znaczne ilości tej rzadko występującej konformacji zawiera łańcuch polipeptydowy karboksypeptydazy A. Porównując widma ramanowskie białka w stanie krystalicznym i w roztworze wodnym Y u i J o (28) stwierdzili, że składowe pasma Amid III występują w pierwszym przypadku przy 1247 i  $1270\text{cm}^{-1}$ , zaś w drugim — przy 1243 i  $1270\text{cm}^{-1}$ . Składowa występująca przy  $1270\text{cm}^{-1}$  jest ich zdaniem związana ze strukturą heliksoidalną, zaś zakres 1243— $47\text{cm}^{-1}$  odpowiada nie tylko obszarom aperiodycznym, lecz również łańcuchom polipeptydowym w konformacji  $\beta$ -równoległej.

Jak można wnosić z przedstawionego materiału, spektroskopia Ramana istotnie budzi określone nadzieje, jako metoda przybliżonego szacowania zawartości poszczególnych typów konformacji łańcuchów polipeptydowych w białkach. Jednym z ostatnich przykładów jej zastosowań na tym polu jest praca Y u i wsp. poświęcona badaniu widm ramanowskich insuliny i proinsuliny (29). Analiza ta wykazała, iż „część insulinowa” w proinsulinie ma konformację łańcucha peptydowego bliską konformacji insuliny, znaczna część łańcucha C proinsuliny natomiast posiada konformację heliksoidalną. Potwierdzenie tej konkluzji innymi metodami badawczymi mogłoby być ważkim argumentem świadczącym o dużej przydatności spektroskopii Ramana w badaniu konformacji białek.

### III. Badanie konformacji poliproliny

Porównanie widm Ramana (30) poliproliny I (prawoskrętny 10<sub>3</sub> heliks z wiązaniami amidowymi w konformacji cis) i poliproliny II (lewoskrętny

heliks z wiązaniami amidowymi w konformacji trans) wykazało istnienie szeregu różnic w widmach, mogących stanowić oparcie w badaniach struktury oligomerów prolinowych. W szczególności, widmo Ramana poliproliny I zawiera unikalne linie przy 363, 662 i 781 $\text{cm}^{-1}$ . Wyraźne różnice występują w zakresie intensywności pasma Amid I, oraz pasm położonych przy 1264 i 1239 $\text{cm}^{-1}$ . Porównanie widma Ramana poliproliny (10) oraz polihydroksyproliny (31) wykonanych w fazie stałej oraz roztworów wodnych tych polipeptydów wskazuje przy tym, iż wyjściowa konformacja jest zachowana po rozpuszczeniu peptydu w wodzie. Widma Ramana oligomerów proliny, zawierających 3—5 reszt prolinowych w łańcuchu (30) wskazują, iż peptydy te przybierają w roztworze wodnym konformację poliproliny II.

#### IV. Badanie konformacji mostków dwusiarczkowych

Wysoka intensywność linii widma Ramana związanych z drganiami rozciągającymi wiązań C—S i S—S czyni spektroskopię Ramana obiecującym narzędziem badań nad konformacją mostków dwusiarczkowych w białkach. Sugeruje się również (32) możliwość użycia tej metody badawczej do ilościowego określenia występowania mostków dwusiarczkowych w białkach błon komórkowych, co jest nadzwyczaj trudne do osiągnięcia na innych drogach.

Analizując położenie, oraz intensywność linii widma Ramana, związanych z drganiami rozciągającymi wiązań C—S i S—S w serii modelowych związków o znanych z analizy rentgenostrukturalnej wartościach kąta dwuściennego ugrupowania C—S—S—C Lord (13) doszedł do wniosku, iż wartości tego kąta są proporcjonalne do stosunku intensywności linii

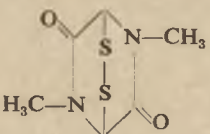


$\frac{I_{\text{C-S}}}{I_{\text{S-S}}}$  W widmie Ramana lizozymu silna linia drgań  $\nu_{\text{S-S}}$  występuje przy 509 $\text{cm}^{-1}$ , w rybonukleazie linia ta jest słabsza i przesunięta do zakresu 516 $\text{cm}^{-1}$ . Na podstawie wyników uzyskanych dla serii substancji wzorcowych określił Lord wartość kąta dwuściennego mostków dwusiarczkowych lizozymu na około 114°, zaś rybonukleazy na około 104°. W przypadku  $\alpha$ -chymotrypsyny (20) linia drgań  $\nu_{\text{S-S}}$  występuje przy 511 $\text{cm}^{-1}$  i jest rozmyta, co może, zdaniem Lorda, sugerować, że poszczególne mostki dwusiarczkowe tego białka różnią się konformacją. Dla  $\beta$ -laktoglobuliny określił Lord (21) w analogiczny sposób konformację mostków dwusiarczkowych jako podobną do konformacji tych mostków w lizozymie. Stosując podejście Lorda, Yu i wsp. (33) stwierdzili wreszcie, że wewnątrzłańcuchowy mostek dwusiarczkowy w insulinie różni się konformacją od dwu pozostałych mostków tego białka.

Półilościowe badania Lorda poddał jednak ostatnio krytyce Scheraga (34), przeprowadzając dokładne pomiary widm ramanowskich szeregu

związków modelowych o znanych wartościach kąta dwuściennego grupy C—S—S—C. Związki modelowe zostały dobrane przy tym w ten sposób, aby różniąc się wartością kąta dwuściennego w ugrupowaniu C—S—S—C, miały w przybliżeniu jednakowe konformacje ugrupowania C—S—S—C, tzn. aby kąt dwuścienny związany z możliwością rotacji wokół wiązania C—S nie odbiegał znacznie od wartości typowej dla konformacji skośnej (gauch). Wynikało to stąd, iż wcześniejsze badania Miyazawy (35) wykazały, że położenie pasma  $\nu_{S-S}$  zależy od przestrzennej orientacji  $\beta$ -atomów węgla przy mostku dwusiarczkowym. Dla dobranej w ten sposób serii związków Scheraga uzyskał liniową zależność między położeniem pasma  $\nu_{S-S}$ , a wartością kąta dwuściennego ugrupowania C—S—S—C, przy czym najwyższe wartości częstości linii przypadają na wartość kąta dwuściennego bliską  $90^\circ$  (Tablica 2). Wynik ten świetnie koreluje z wyliczeniami B o y d a (36), który ustalił, że wiązanie S—S jest najsilniejsze podczas, gdy kąt dwuścienny w ugrupowaniu C—S—S—C jest równy  $90^\circ$  (w tej sytuacji dochodzi do minimalizacji sił odpychania elektrostatycznego pomiędzy  $3p\pi$  orbitalami wolnych par elektronowych na atomie siarki). Ustalona zależność pozwoliła przewidzieć konformację mostka dwu-

Tabela 2

Zależności między wartościami kąta dwuściennego w ugrupowaniu C-S-S-C, a częstością linii  $\nu_{S-S}$  (34)

Związek	$\nu_{S-S} \text{ cm}^{-1}$	wartość kąta $\varphi$
 (bezwodnik epiditiesarkozyny)	486	$10^\circ$
 (4-podstawione ditiolany)	492	$22^\circ$
D,L-6,8-tiooktowy kwas	501	$35^\circ$
amid kwasu D,L-6,8-tiooktowego	496	ok. $35^\circ$
 ( <i>trans</i> -2,3-ditiadekalina)	506	ok. $56^\circ$
chlorowodorek cystyny	519	$81^\circ$
bromowodorek cystyny	519	$81^\circ$

siarczowego dla naturalnego pentapeptydu produkowanego przez różne szczepy *Aspergillus niger* — malforminy A. Przewidywanie oparte o dane spektroskopii Ramana wykazało całkowitą zgodność z wartościami wyznaczonymi z danych spektroskopii UV. Jeśli jednak liniowa zależność między wartościami częstości linii  $\nu_{S-S}$  w widmie Ramana a wartościami kąta dwusieczennego w ugrupowaniu C—S—S—C daje się z pożytkiem zastosować do ustalania konformacji mostków dwusiarczkowych, to nie daje się, ustalić żadnej korelacji pomiędzy konformacją mostka, a intensywnością linii  $\nu_{C-S}$  i  $\nu_{S-S}$ . Badania Scheragi, potwierdzając słuszność głównej myśli Lorda, wnoszą więc równocześnie istotne korekty do jego wyników.

Niedawna praca Brunnera i Sussnera (37) zwraca uwagę na inną jeszcze możliwość spożytkowania danych spektroskopii ramanowskiej w badaniach nad mostkami dwusiarczkowymi białek. Stwierdzili oni mianowicie, iż linia  $\nu_{S-S}$  lizozymu zanika w temperaturze 76°, tj. w temperaturze odwracalnej termicznej denaturacji tego białka. Zdaniem wymienionych wyżej autorów, ma to być wynikiem towarzyszącego denaturacji zerwania wszystkich mostków dwusiarczkowych w białku.

## V. Badanie różnic konformacyjnych białek w roztworze wodnym i fazie stałej

Porównanie widma Ramana białek krystalicznych i ich wodnych roztworów może być ważkim argumentem w dyskusji dotyczącej ewentualnych zmian konformacji białek podczas ich krystalizacji. Porównania takie przeprowadził ostatnio Koenig (9), oraz, niezależnie Yu i wsp. (28, 38). Linie widma Ramana białka w roztworze są ostrzejsze, niż w wykonanym dla fazy stałej. Dokonane przez Yu i wsp. porównanie widm liofilizowanego proszku rybonukleazy trzuskowej, pojedynczego kryształu tego białka, oraz jego wodnego roztworu, wykazało istnienie wyraźnych różnic w zakresie intensywności linii aromatycznej reszty tyrozonowej. Zmiany konformacji mają więc głównie zakres lokalny, ograniczony do mikrootoczenia reszt tyrozynowych „zamaskowanych” w hydrofobowym wnętrzu cząsteczki. Porównanie pasm Amid III pozwala natomiast przypuszczać, że konformacja łańcucha polipeptydowego jest we wszystkich trzech przypadkach jednakowa. Analogiczne porównania, wykonane dla lizozymu, wykazują, iż w tym przypadku w liofilizacie białka mają miejsce zmiany konformacji tak łańcucha bocznego, jak i łańcucha polipeptydowego. Stwierdzono również istnienie różnic konformacji reszt tyrozyny i fenyloalaniny w kryształach lizozymu, i w roztworze wodnym tego białka, aczkolwiek obserwowane efekty mogą być w dużej mierze wywołane różnicami w solwatacji reszt aromatycznych.

Szczególnie interesujące wyniki uzyskano ostatnio w tym zakresie w badaniach nad białkami jadu węży: kobry *Naja haje* —  $\alpha$ -neurotoksyną,

i dwoma zasadowymi białkami jadu kobry *Naja naja*: kobraminą A i kobraminą B (28, 39). Pierwsze z wymienionych białek zbudowane jest z 61 reszt aminokwasowych, zawiera cztery mostki dwusiarczkowe i jedną tylko resztę tyrozynową „zamaskowaną” we wnętrzu cząsteczki. Zmierzony eksperymentalnie stosunek intensywności linii reszty tyrozynowej, przypadających na częstości 644, 828 i 853 $\text{cm}^{-1}$ , wynosi 0,5:1,0:0,5. Stosunek taki proponuje Yu uznać za charakterystyczny dla „zamaskowanej” reszty tyrozynowej. Z drugiej strony w widmie modelowego peptydu glicylotyrozyny stosunek intensywności tych linii wynosi 0,7:1,0:1,4, co z kolei można uznać za wielkość typową dla reszty tyrozynowej eksponowanej w kierunku fazy wodnej.

Kobramina B zbudowana jest z 52 reszt aminokwasowych. Łańcuch polipeptydowy tego białka usztywnia trzy mostki dwusiarczkowe. Łańcuch nie zawiera ani tryptofanu, ani też histydyny, lecz zawiera trzy reszty tyrozynowe. Stosunek intensywności linii reszt tyrozynowych w widmie Ramana kobraminy B wynosi 0,5:1,0:0,5, co zgodnie z przedstawionymi wyżej przesłankami można uznać za dowód, iż wszystkie reszty tyrozynowe tego białka są „zamaskowane” we wnętrzu cząsteczki. Dopiero w temperaturze 85° stosunek intensywności linii zmienia się, przyjmując wartości charakterystyczne dla eksponowanych reszt tyrozynowych. Analogiczne badania kobraminy A wskazały, że również w tym białku wszystkie — w liczbie czterech — reszty tyrozynowe są „zamaskowane”.

Zmiany intensywności linii reszt aromatycznych obserwowane przy porównywaniu widm Ramana białek krystalicznych, liofilizowanych, i ich roztworów wodnych, można więc z dużym prawdopodobieństwem interpretować jako przejaw większego, lub mniejszego, odsłaniania tych reszt. Niezależnie od tego, przedstawione przez Yu podejście badawcze może posłużyć do szybkiej orientacji o mikrootoczeniu reszt tyrozynowych w natywnym białku. I tak np. z faktu, iż stosunek intensywności reszt tyrozynowych w widmie ramanowskim rybonukleazy A wynosi 0,6:1,0:0,8 można wnosić, że trzy reszty tyrozynowe tego białka są „zamaskowane”, zaś jedna jest odsłonięta. Podobnie, stosunek intensywności linii reszt tyrozynowych w widmie Ramana insuliny pozwala wnioskować, że wszystkie reszty tyrozynowe insuliny są odsłonięte.

## VI. Drgania cząsteczek białka jako całości

Niedawno Brown i wsp. (40) wykorzystując ulepszoną technikę badawczą, uzyskali widma Ramana  $\alpha$ -chymotrypsyny w zakresie częstości leżących poniżej 50 $\text{cm}^{-1}$ . Do pomiarów wykorzystano tak białko krystaliczne, jak jego liofilizowany proszek, i w rozmaity sposób preparowane filmy. Niezależnie od sposobu przygotowania próbki, w widmie Ramana wykrywano obecność linii o częstości 29 $\text{cm}^{-1}$ . Linia nie występowała na-

tomiast w białku zdenaturowanym za pomocą siarczanu dodecyłu. Zdaniem Browna i wsp. wskazana linia widma Ramana musi odzwierciedlać drgania obejmujące całą cząsteczkę białka, bądź jego znaczne fragmenty i prawdopodobnie związane jest z właściwą białku natywnemu periodycznym drganiom cząsteczki białka, jako całości.

## VII. Rezonansowa spektroskopia Ramana w badaniach białek

Rezonansowa spektroskopia Ramana może się stać perspektywiczną metodą badania oddziaływań związków niskocząsteczkowych, jak koenzymów, substratów enzymów i inhibitorów, z białkiem. Ta interesująca modyfikacja techniki ramanowskiej polega na napromieniowaniu badanej próbki w takim zakresie promieniowania elektromagnetycznego, w którym następuje wzbudzenie elektronowe badanej substancji. Przy spełnieniu tego wymogu intensywność rozproszenia ramanowskiego wzrasta o kilka rzędów. Rezonansowa spektroskopia Ramana pozwala więc znacznie ograniczyć stężenie badanej próbki. W przypadku białek zawierających rdzeń porfirynewy można uzyskać widmo Ramana już przy stężeniu 2mg/ml, podczas gdy w normalnej technice badawczej wymagane jest stężenie około 100mg/ml. Rezonansowe widmo Ramana zawiera silne linie składnika ulegającego wzbudzeniu: w przypadku chromoproteidów będą to na przykład związane z białkiem cząsteczki barwnika. Pozwala to śledzić zmiany widma związanego z białkiem barwnika w izolacji od tła, jakim, przy użyciu dużych stężeń, stanowiłyby linie widma Ramana samego białka.

Technika rezonansowej spektroskopii Ramana została w pierwszym rzędzie wykorzystana do badania hemoglobiny (41, 42), oraz cytochromu c (43, 44). Jak wiadomo, odwracalne wiązanie tlenu przez hemoglobinę wywołuje wyraźne przesunięcie atomu żelaza w hemie: w dezoksyhemoglobinie atom żelaza leży nieco ponad płaszczyznę układu porfirynewego, zaś w hemoglobinie utlenowanej — w płaszczyźnie tego układu (45). Zgodnie z danymi Brunnera (41) zmiana ta uwidacznia się w widmie Ramana hemoglobiny przesunięciem linii drgań rozciągających ugrupowania =C—N rdzeni pirolowych z zakresu  $1355\text{cm}^{-1}$  do zakresu  $1376\text{cm}^{-1}$ , oraz przesunięciem linii drgań zginających grup C—H z  $1210$  do  $1233\text{cm}^{-1}$ . Danych tych nie potwierdza jednak praca Streckasa (42), który w procesie utlenowania hemoglobiny obserwował bardzo małe zmiany widma ramanowskiego, sprowadzające się do pojawiania się charakterystycznych dla pochodnych z atomem żelaza ulokowanym w płaszczyźnie układu porfirynewego, nowych linii przy  $1589$  i  $1638\text{cm}^{-1}$ . Badacz ten stwierdził natomiast istnienie wyraźnych różnic w widmach Ramana zredukowanego i utlenionego cytochromu c, przy czym zauważył, iż widmo Ramana zredukowanej postaci cytochromu jest podobne do widma oksyhemoglobiny.

Technikę rezonansowej spektroskopii Ramana wykorzystali również



ostatnio Carey i wsp. (46) do badania procesu wiązania barwnika (metyloranżu) przez albuminę surowicy wołu. Technika ramanowska umożliwia wykonanie pomiaru przy nikłych stężeniach barwnika, wynoszących  $10^{-6}$ M. Widmo kompleksu barwnika z białkiem jest odmienne od widma barwnika w roztworze wodnym, jest zaś bardzo podobne do widma barwnika w fazie stałej. Zdaniem Carey'a i wsp. można stąd wnosić iż barwnik nie jest absorbowany na powierzchni cząsteczki białka, lecz przenika do wnętrza cząsteczki. Dokładna analiza widm Ramana wykazała przy tym, że konformacja rdzeni aromatycznych barwnika w jego kompleksie z białkiem jest podobna do konformacji tych rdzeni w roztworze wodnym barwnika, oraz, że grupa  $\text{SO}_3^-$  barwnika oddziałuje z dodatnio naładowym obszarem cząsteczki białka.

Artykuł wpłynął dnia 14.2.1974, wrócił po rewizji autorskiej dnia 5.3.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Koenig J. L., (1972), *Chemtech, The Innovator's Magazine*, str. 226—231.
2. Colthup N. B., (1972), w *Guide to Modern Methods of Instrumental Analysis*, red. Gouw T. H., str. 195, J. Wiley and Sons, New York.
3. Edsall J. T., (1938), *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.*, 6, 40.
4. Garfinkel D., Edsall J. T., (1958), *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 3818—3823.
5. Tobin M. C., (1968), *Science*, 161, 68—69.
6. Rippon W. B., Koenig J. L., Walton A. G., (1971), *J. Agr. Food Chem.*, 19, 692—697.
7. Krueger P. J., (1972), *Canadian Research and Development*, November-December, 1—4.
8. Lord L. C., (1971), w *XXIII Int. Congress of Pure and Applied Chemistry t. 7*, str. 179—191, Butterworths, London.
9. Koenig J. L., (1972), w *Macromolecular Reviews*, t. 6, str. 59—177, J. Wiley and Sons, New York.
10. Smith M., Walton A. G., Koenig J. L., (1969), *Biopolymers* 8, 173—179.
11. Careri G., Mazzacurati V., Signorelli G., (1970), *Phys. Letters* 31, 425—426.
12. Careri G., Mazzacurati V., Sampoli M., Signorelli G., Fasella P., (1970), *Phys. Letters* 32, 495—496.
13. Lord L. C., Yu N. T., (1970), *J. Mol. Biol.*, 50, 509—524.
14. Careri G., Mazzacurati V., Sampoli M., Signorelli G., Fasella P., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 310, 305—308.
15. Miyazawa T., (1967), w *Poly- $\alpha$ -Amino Acid*, red. Fasman G. D., str. 69—103, E. Arnold Ltd, London.
16. Small E. W., Fanconi B., Peticolas W. L., (1970), *J. Chem. Phys.*, 52, 4369—4379.
17. Smith M., Walton A. G., Koenig J. L., (1969), *Biopolymers* 8, 29—43.
18. Wallach D. F. H., Graham J. M., Oseroff A. R., (1970), *Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters*, 7, 330—334.
19. Sutton P. L., Koenig J. L., (1970), *Biopolymers*, 9, 615—634.

20. Lord R. C., Yu M. T., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 203—213.
21. Bellocq A. M., Lord R. C., Mendelsohn R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 280—287.
22. Lord R. C., Mendelsohn R., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 2133—2135.
23. Yu N. T., Liu C. S., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5127—5128.
24. Fanconi B., Nafie L. A., Small W., Peticolas W. L., (1969), *J. Chem. Phys.*, **51**, 3993—4005.
25. Koenig J. L., Sutton P. L., (1969), *Biopolymers*, **8**, 167—171.
26. Koenig J. L., Sutton P., (1970), *Biopolymers*, **9**, 1229—1237.
27. Koenig J. L., Sutton P., (1971), *Biopolymers*, **10**, 89—106.
28. Yu N. T., Jo B. H., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 5033—5037.
29. Yu N. T., Liu C. S., O'shea D. C., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 117—132.
30. Rippon W. B., Koenig J. L., Walton A. G., (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7455—7459.
31. Deveney M. J., Walton A. G., Koenig J. L., (1971), *Biopolymers*, **10**, 615—630.
32. Simons L., Bergström G., Blomfelt G., Forss S., Stenbäck H., Wansén G., (1972), *Comment. Phys. Mathematicae*, **42**, 125—207.
33. Yu N. T., Liu C. S., Culver J., O'Shea D. C., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 1—6.
34. Van Wart H. E., Lewis A., Scheraga H. A., Saeva F. D., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2619—2623.
35. Sugeta H., Go A., Miyazawa T., (1972), *Chem. Letters*, **1**, 83—86.
36. Boyd D. B., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8799—8804.
37. Brunner H., Sussner H., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **271**, 16—22.
38. Yu N. T., Jo B. H., Liu C. S., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 7572—7575.
39. Yu N. T., Jo B. H., O'Shea D. C., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 71—76.
40. Brown K. G., Erfurth S. C., Small E. W., Peticolas W. L., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1467—1469.
41. Brunner H., Mayer A., Sussner H., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 153—156.
42. Strekas T. C., Spiro T. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 830—833.
43. Strekas T. C., Spiro T. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 188—192.
44. Spiro T. G., Strekas T. C., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2622—2626.
45. Perutz M. F., (1970), *Nature*, **228**, 726—734.
46. Carey P. R., Schneider H., Bernstein H. J., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 588—595.

JAWIGA SKIERCZYŃSKA \*

## Elektryczne właściwości błon komórkowych

### Electrical Characteristics of the Cell Membranes

Błony biologiczne są wysokoopornymi strukturami, charakteryzującymi się dużą pojemnością elektryczną i selektywną przepuszczalnością. Pod względem właściwości elektrycznych wykazują one wiele podobieństw. Wciąż jeszcze jest jednak zbyt mało eksperymentalnych danych, aby omawiać i porównywać właściwości elektryczne błon różnych organelli komórkowych. Ograniczymy się zatem do omówienia tu tylko błon pokrywających powierzchnię protoplastu (błon plazmatycznych), ponieważ ich właściwości elektryczne poznano dotychczas stosunkowo najlepiej. Dane eksperymentalne pochodzą z badań głównie dużych pojedynczych komórek nerwowych, mięśniowych oraz międzywęzłowych komórek glonów z rodziny *Characeae*.

Potencjał spoczynkowy ( $E_m$ ), opór ( $R$ ) i pojemność ( $C$ ) są podstawowymi wielkościami stosowanymi przy opisach elektrycznych właściwości błon. Potencjałem spoczynkowym nazywamy różnicę potencjałów elektrycznych (inaczej napięcie elektryczne) jaka istnieje między dwoma punktami leżącymi po obu stronach błony tuż przy jej powierzchniach. Przy omawianiu wartości oporu i pojemności błon, podaje się zwykle wartości oporu jednostkowego ( $k\Omega \text{ cm}^2$ ) i pojemności jednostkowej ( $\mu\text{F cm}^{-2}$ ) tj. oporu i pojemności jaki wykazuje jednostka powierzchni błony, jeżeli prąd skierowany jest prostopadle do niej.

Na podstawie pomiaru oporów i pojemności wylicza się stałą czasową błony:  $\tau = RC$  i stałą przestrzenną:  $\lambda = \frac{R_m}{R_a + R_i}$ , gdzie  $R_m$  — opór błony przeliczony na jednostkę długości cylindrycznej komórki,  $R_a$  i  $R_i$  — opory ośrodka zewnętrznego i wewnętrznego.

### I. Potencjał spoczynkowy i czynnościowy

Pierwsze pomiary potencjału spoczynkowego, wykonali Hodgkin i Huxley w roku 1939 (40) oraz Curtis i Cole w roku 1940 (25). Badali oni aksony nerwu, stosując mikroelektrody wprowadzane do wnętrza komórek.

Do pomiaru różnicy potencjałów elektrycznych na błonie stosuje się

\* Doc. dr habil., Instytut Fizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.

przeważnie mikroelektrody cieczowe; są to mikropipety napełnione roztworem soli (zazwyczaj 3M KCl), połączone z aparaturą pomiarową poprzez elektrody chloro—srebrne lub kalomelowe (59). Mierzona takimi elektrodami różnica potencjałów jest w zasadzie algebraiczną sumą kilku różnic potencjałów: rozważanego potencjału spoczynkowego błony, różnic potencjałów na granicy dwu różnych cieczy przy końcach mikroelektrod i różnic potencjałów na granicy przylegającej do błony nieruchomej warstewki roztworu (11, 26). Analizując wynik pomiarów, przyjmuje się, że wszystkie wymienione wyżej różnice potencjałów są niewielkie w porównaniu z różnicą potencjałów na błonie i mogą być pominięte (26, 103).

Jak wykazały eksperymenty cytoplazma wszystkich komórek jest elektrycznie ujemna względem zewnętrznego ośrodka. Potencjał spoczynkowy błony plazmatycznej komórek zwierzęcych wynosi kilkadziesiąt miliwoltów, komórek roślinnych — około 150mV (13, 71, 81, 92, 93). Wartość potencjału spoczynkowego błony plazmatycznej komórek roślinnych jest trudna do określenia, ponieważ za znaczną część tego potencjału (~50mV) odpowiedzialna jest ścianka komórkowa (81).

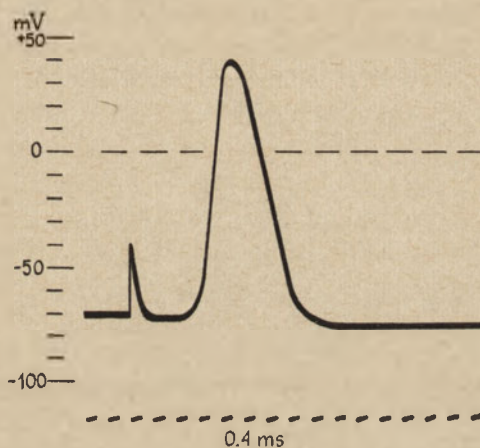
Potencjał spoczynkowy jest funkcją zarówno procesów życiowych badanego obiektu jak i szeregu czynników zewnętrznych między innymi temperatury, oświetlenia, składu omywającego komórkę roztworu. Na przykład przy wzroście w zewnętrznym roztworze koncentracji jonów  $K^+$  błona ulega depolaryzacji (tj. bezwzględna wartość jej potencjału spoczynkowego maleje), przy wzroście koncentracji  $HCO_3^-$  — hyperpolaryzacji (bezwzględna wartość potencjału rośnie) (35), przy występowaniu w roztworze jonów  $Ni^+$  następuje hyperpolaryzacja bądź depolaryzacja w zależności od koncentracji tych jonów (1), w roztworze NaCl pojawiają się spontaniczne oscylacje potencjału (76, 106). Błony są wrażliwe na zmiany pH zewnętrznego ośrodka. Jony  $H^+$  (a także  $Ca^{++}$ ) ulegają adsorpcji na powierzchni błony powodując wzrost wartości potencjału spoczynkowego (65). Zmianą koncentracji jonów  $H^+$  tłumaczy się też wspomniane wyżej działanie na błony roztworu zawierającego jony  $HCO_3^-$  (35, 86).

Wielkości elektryczne błon komórek roślinnych zmieniają się silnie przy zmianach oświetlenia (5, 6, 15, 88, 107), zmiany potencjału spoczynkowego zależą przy tym od wartości pH w zewnętrznym roztworze: np. przy pH 5,7 wyłączenie światła powoduje silną depolaryzację, przy pH 4,7 — hyperpolaryzację (19). Szybkość przebiegu procesu zależy od natężenia strumienia świetlnego (36). Badania wpływu oświetlenia na potencjał spoczynkowy wykazują, że reakcja fotosyntezy kontroluje zarówno przenikalność błon jak i pracę „elektrogenicznych pomp” (102). Istnieje szereg prac poświęconych działaniu inhibitorów metabolizmu na potencjał spoczynkowy (10, 94, 102).

Zależność potencjału spoczynkowego od czynników zewnętrznych ma często przebieg skomplikowany; nie zawsze jest on przy tym powtarzalny. Jedną z przyczyn tego mogą być uszkodzenia błony powstałe w procesie

wprowadzania mikroelektrod. Na artefakty, które występują przy pomiarze parametrów elektrycznych błony metodą mikroelektrod zwraca ostatnio uwagę kilku autorów (55, 80, 82, 87, 112).

Po zadziałaniu na błonę różnego typu bodźców (mechanicznych, elektrycznych, chemicznych itp.) o natężeniu większym od pewnego natężenia progowego błona komórkowa ulega pobudzeniu, które przejawia się między innymi w gwałtownej krótkotrwałej zmianie wielkości i znaku napięcia elektrycznego. Jest to tak zwany „potencjał czynnościowy” (Ryc. 1). Czas trwania tych zmian w komórkach zwierzęcych wynosi kilka msek; w komórkach roślinnych — kilka sekund (51). W czasie pobudzenia zmieniają się zarówno własności elektryczne komórki jak i mechaniczne: zatrzymuje się ruch cytoplazmy, zmniejsza się ciśnienie wewnętrzne (81).



Ryc. 1. Potencjał czynnościowy izolowanego aksonu kałamarnicy (39)

Przy lokalnym pobudzeniu potencjał czynnościowy rozprzestrzenia się po powierzchni komórki z prędkością zależną od ośrodka zewnętrznego, w komórkach nerwowych prędkość rozprzestrzeniania się impulsu jest rzędu dziesiątków metrów na sekundę (34, 77), a w komórkach roślinnych — zaledwie kilku cm na sekundę (78, 108).

Szeroko stosowaną dziś metodą badań potencjału czynnościowego jest metoda szybkiej stabilizacji różnicy potencjałów na błonie na zadanym poziomie i następnie badanie przepływającego przez błonę prądu (*clamp method technique*) (62).

W komórkach nerwowych — jak wykazały pierwsze prace przeprowadzone tą metodą — podczas potencjału czynnościowego jony  $\text{Na}^+$  wpływają do komórki a jony  $\text{K}^+$  — wypływają (22).

Istotną rolę w tworzeniu się potencjału czynnościowego odgrywają dwuwartościowe jony ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) (12, 58, 97). Obecność jonów  $\text{Ca}^{++}$  w ośrodku zewnętrznym jest konieczna do tego, aby błona stała się po-

budliwa (97). Udział tych jonów w tworzeniu się potencjału czynnościowego nie jest całkowicie wyjaśniony. Szereg eksperymentów wskazuje na to, że podczas procesu pobudzenia jony  $\text{Ca}^{++}$  a także  $\text{H}^+$  wypływają z neuronów i komórek mięśniowych (37, 49, 91, 105).

W komórkach roślinnych prądami przepływającymi przez błonę w procesie pobudzenia, są prawdopodobnie strumienie wypływających z komórki jonów  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  (28, 30, 44).

## II. Opór i pojemność

Pojemności błon komórek zwierzęcych i roślinnych zawierają się w granicach od kilku dziesiątych do kilku  $\mu\text{Fcm}^{-2}$ , a opory w granicach od kilku dziesiątych do kilkudziesięciu a nawet kilkuset  $\text{k}\Omega\text{cm}^2$ ; wartości oporów wyższe od dziesięciu  $\text{k}\Omega\text{cm}^2$  wykazują wyłącznie błony komórek roślinnych (22, 26, 90). W tabeli 1 podane są wartości oporu  $R$  i pojemności  $C$ , stałej przestrzennej  $\lambda$  i stałej czasowej  $\tau$  błon komórek nerwu kałamarnicy i kraba, komórki mięśnia żaby i komórki glonu *Nitella translucens*. (Wielkość  $\tau$  określa czas, po upływie którego napięcie elektryczne przy gwałtownym wyłączeniu prądu przepływającego przez błonę maleje o  $e$  gdzie  $e$  — podstawa log naturalnego; wielkość  $\lambda$  określa długość odcinka komórki na którym napięcie, przy prądzie płynącym wzdłuż komórki, zmienia się o  $e^{-1}$ ).

Tabela 1

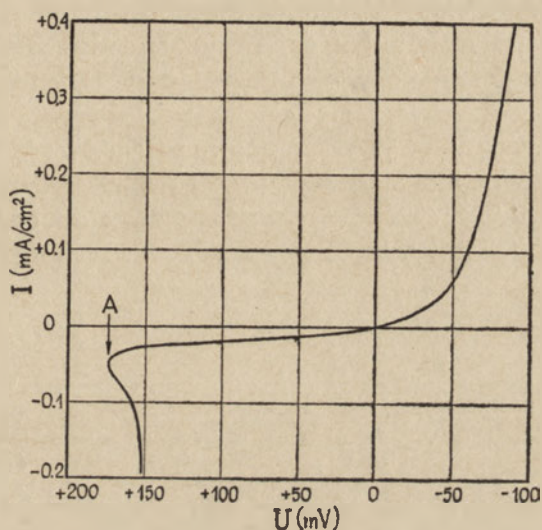
Parametry elektryczne błon różnych komórek (57)

Badany obiekt	Opór błony $R(\text{k}\Omega\text{cm}^2)$	Pojemność błony $C(\mu\text{Fcm}^{-2})$	Stała czasowa $\tau$ (msek)	Stała przestrzenna $\lambda(\text{cm})$	Autor
Nerw kałamarnicy	0,7	1	0,7	0,5	Katz (1966r)
Nerw kraba	5,0	1	5,0	0,25	
Mięsień żaby	4,0	6	24,0	0,2	
<i>Nitella translucens</i>	21,0	1	—	2,6	Williams i wsp. (1964r)

Opór błony jest jednym z najbardziej niestabilnych jej parametrów. Wartość jego zależy bardzo silnie od szeregu czynników zewnętrznych m.in. od składu chemicznego zewnętrznego roztworu i temperatury. I tak w zakresie pH 10—6 opór pozostaje stały, natomiast w roztworach bardziej kwaśnych i zasadowych maleje (35, 65). Przy obniżaniu temperatury opór wzrasta niemonotonicznie, co jest prawdopodobnie związane ze strukturalnymi zmianami błony (109).

Wartości oporu błony określane różnymi metodami wykazują znaczne różnice. Przyczyny tych różnic nie są dotychczas całkowicie wyjaśnione (26, 83, 84).

Stosunkowo dobrze powtarzalna i badana przez wielu autorów jest zależność oporu od przykadanego do błony napięcia elektrycznego. Charakterystyka prądowo napięciowa błony pokazana jest na rycinie 2. Na osi odciętych odkładana jest wartość napięcia liczona względem potencjału spoczynkowego błony. Na osi rzędnych  $I > 0$  oznacza prąd wypływający z komórki czyli depolaryzujący,  $I < 0$  — prąd wpływający do wnętrza komórki czyli — hyperpolaryzujący.



Ryc. 2. Charakterystyka prądowo-napięciowa plazmalemy glonu *Chara australis* (23)

Jak widać z ryciny 2, w zakresie małych natężeń prądów w granicach ułamka  $\mu\text{Acm}^{-2}$  napięcie zmienia się proporcjonalnie do natężenia, a zatem opór pozostaje wielkością stałą. Dla większych natężeń prądu obserwuje się zależność oporu od kierunku prądu tj. efekt prostowania: dla prądu hyperpolaryzującego opór elektryczny jest większy niż dla prądu depolaryzującego. W komórkach *Characeae* własności prostownicze nie są silne, natomiast w komórkach nerwowych, stosunek wartości oporów dla prądu wpływającego i wypływającego sięga stu (21).

Własności prostownicze można obserwować również w błonach sztucznych. Za efekt ten mogą być odpowiedzialne różne mechanizmy (21, 23).

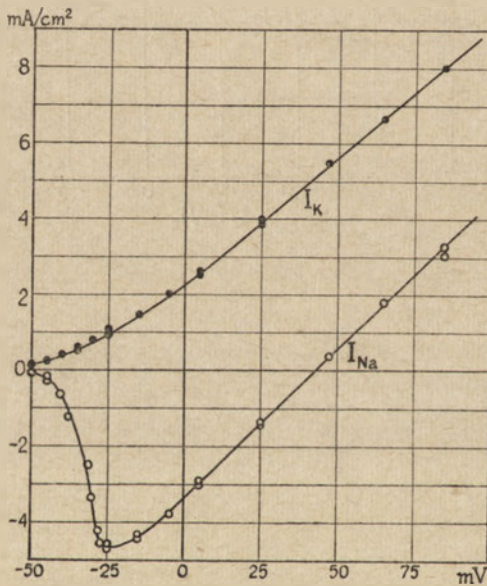
Przy bardzo dużych napięciach hyperpolaryzujących następuje efekt przebicia podobny do przebicia dielektryka i polegający na bardzo gwałtownym wzroście natężenia prądu (23). W odróżnieniu od przebicia dielektryka efekt ten dla błon nie jest destrukcyjny, może być powtarzany szereg razy i zawsze występuje przy tym samym potencjale.

Przy pewnej wartości prądu hyperpolaryzującego  $I_T$  występuje w wielu błonach efekt zwany „*hyperpolarizing response*” — nie uwidoczniiony na

rycynie 2 — polegający na gwałtownym wzroście oporu błony do wartości 2—3 a czasem i dziesięciokrotnie wyższej. Efekt ten zaobserwowany był po raz pierwszy przez Blinksa na komórkach roślinnych (12, 13) w latach 1936—1937 między innymi na komórkach *Nitella* ( $I_T = 2 \mu\text{A cm}^{-2}$ ), później rejestrowany był na komórkach nerwowych (96).

W stanie niskooporowym błona podczas przepływu prądu wykazuje istnienie elementów pojemnościowych, w stanie wysokooporowym — elementów zarówno pojemnościowych jak i indukcyjnych (18, 21, 50).

Przy prądzie depolaryzującym, którego natężenie przekracza pewną wartość progową występuje potencjał czynnościowy, podczas którego całkowity opór błony maleje około kilkunastu razy. Pojemność błony w procesie pobudzenia zmniejsza się zaledwie o ułamek swojej wielkości ( $\sim 15\%$ ) (31, 52). Charakterystyka prądowo napięciowa błon zarówno zwierzęcych jak i roślinnych w czasie procesu pobudzenia ma kształt przedstawiony na rycinie 3; jedna z wykreślonych gałęzi odpowiada prądowi  $\text{K}^+$  a druga  $\text{Na}^+$  (38, 41) (lub  $\text{Cl}^-$  w komórkach roślinnych (51)).



Ryc. 3. Prądowo — napięciowa charakterystyka błony komórkowej w czasie procesu pobudzenia (22)

Jak z powyższego widać, mimo szeregu różnic, nieraz bardzo interesujących z punktu widzenia badawczego, błony powierzchniowe protoplastu komórek zwierzęcych i roślinnych pod względem właściwości elektrycznych są podobne.

Jedną z metod poznawania struktury i właściwości błon plazmatycznych jest konstruowanie sztucznych błon i badanie ich właściwości.



Najwięcej prac wykonuje się na dwuwarstwowych błonach lipidowych. Pojemność takiej błony ma wartość około  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , opór jej jest wyższy od  $10^5 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$  (66) i zależy od rodzaju tworzących ją lipidów (4). Obniżenie oporu błon lipidowych do wartości takiej jaką posiadają błony naturalne można uzyskać — jak wykazali Mueller i Rudin (69) — dodając pewnych (dotychczas niezidentyfikowanych) substancji białkowych. Sztuczne błony mogą wykazywać właściwości mechaniczne i elektryczne analogiczne do właściwości błon naturalnych, nawet wytwarzać potencjał czynnościowy (47, 63, 67, 68, 69, 70). Warto zauważyć, że błony czysto lipidowe i lipido-białkowe nie wykazują selektywnej przepuszczalności dla jednowartościowych jonów. Przepuszczalność taką nadają sztucznym błonom pewne antybiotyki (np. walinomycyna (67, 70)), jednak znane dziś substancje nadające sztucznym błonom selektywną przepuszczalność nie występują w naturalnych błonach komórkowych. Mechanizm selektywnej przepuszczalności błon jest jeszcze mało znany.

### III. Interpretacja elektrycznych właściwości błon

Potencjał spoczynkowy błony jest sumą trzech różnic potencjałów (in. napięć) elektrycznych: dwu istniejących na powierzchniach błony (tak zwanych napięć Galvaniego) i trzeciego — w samej błonie. W rozważaniach teoretycznych często pomija się występowanie napięć elektrycznych na powierzchniach błony, co w zasadzie dopuszczalne jest tylko wtedy, gdy napięcia te są sobie równe co do bezwzględnych wartości albo niewielkie w porównaniu z napięciem na samej błonie. Różnica potencjałów istniejąca na błonie jest wynikiem przepływu przez błonę ładunków elektrycznych. Ładunki, których przepływ wytwarza omawiany spadek potencjału elektrycznego przenoszone są przez jony w procesie zarówno dyfuzji jak i tzw. elektrogenicznego aktywnego transportu.

W pierwszym z tych procesów przepływ występuje na skutek asymetrii rozkładu jonów po obu stronach błony i właściwości błony selektywnego przepuszczania jonów. Asymetria rozkładu jonów utrzymywana jest działaniem tzw. pomp metabolicznych, to jest procesów w trakcie których substancje przenoszone są przez błonę kosztem energii pobieranej bezpośrednio z reakcji biochemicznych. Transport taki nosi nazwę transportu aktywnego i może odbywać się w kierunku przeciwnym do kierunku jaki jonom nadaje gradient potencjału elektrochemicznego.

Jeżeli aktywnie transportowane cząstki są zjonizowane, to przepływ ich może wносить bezpośredni wkład do wartości napięcia na błonie i mówimy wtedy o elektrogenicznym aktywnym transporcie.

Ogólne równanie przepływu jonów (wzdłuż osi  $x$ ) podaje termodynamika procesów nieodwracalnych (45, 46):

$$P_i = - \frac{1}{r_{ii}} \left( \frac{\delta \bar{\mu}_i}{\delta x} + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n r_{ij} P_j \right) \quad (I)$$

gdzie  $P_i$ ,  $P_j$  — strumienie przepływających jonów

$\bar{\mu}_i$  — potencjał elektrochemiczny

$r_{ij}$  — współczynniki oporowe (funkcje koncentracji wszystkich składników roztworu).

Pierwszy składnik powyższego równania określa niezależny bierny transport substancji „i”, pozostałe składniki określają transport bierny wywołany oddziaływaniem na dany składnik „i” pozostałych transportowanych składników oraz elektrogeniczny aktywny transport  $-\frac{r_{in}}{r_{ii}} P_n$

Równanie powyższe bardzo dokładnie opisuje przepływ, ale słuszne jest tylko dla poszczególnych punktów błony i praktycznie mało użyteczne. Zasadniczą trudnością w teorii błony jest zcałkowanie tego równania i doprowadzenie go do postaci, w której występują wielkości łatwo mierzalne.

Zcałkowanie równania (I) wymaga wprowadzenia szeregu upraszczających założeń. Prac teoretycznych dotyczących tego zagadnienia jest wiele i wciąż pojawiają się nowe próby uzyskania równań przydatnych dla eksperymentatorów i wyprowadzonych przy możliwie najmniej rygorystycznych założeniach wyjściowych (27, 98).

W zależności od rodzaju założeń przyjętych przy całkowaniu równania (I) istnieje około 10 postaci równań końcowych. Najprostsze z nich to dobrze znane w elektrochemii równanie Nernsta słuszne dla stanu równowagi tj. równości potencjałów elektrochemicznych danego jonu po obu stronach błony oraz równanie Goldmana wprowadzone przy założeniu stałości pola elektrycznego w błonie i pominięciu zarówno wzajemnego oddziaływania jonów jak i elektrogenicznego aktywnego transportu.

Dla błony przenikalnej dla jonów  $K^+$  równanie Nernsta ma postać:

$$E_m = - \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o} \quad (II)$$

gdzie  $E_m$  — różnica potencjałów na błonie

$[K^+]_i$  i  $[K^+]_o$  — koncentracje (ściślej aktywności) jonów  $K^+$  odpowiednio wewnątrz komórki i w ośrodku zewnętrznym.

W sytuacji, którą opisuje równanie (II) strumienie jonów  $K^+$ , wpływający i wypływający z komórki, są jednakowe i przynajmniej jeden z jonów dla których błona jest nieprzepuszczalna ma różną koncentrację po obu stronach błony.

Równanie Goldmana dla błony przenikalnej dla jonów  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Cl^-$  ma postać:

$$E_m = - \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+}[K^+]_o + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_i}{P_{K^+}[K^+]_i + P_{Na^+}[Na^+]_o + P_{Cl^-}[Cl^-]_o}$$

gdzie  $P_{K^+}$ ,  $P_{Na^+}$  i  $P_{Cl^-}$  — tzw. współczynniki przenikalności jonów

$K^+$ ,  $Na^+$  i  $Cl^-$ .

Równanie powyższe określa wartość potencjału spoczynkowego w stanie stacjonarnym; całkowity prąd przepływający przez błonę jest wtedy równy zeru:  $I_{K^+} + I_{Na^+} + I_{Cl^-} = 0$  i różnica koncentracji po obu stronach błony utrzymywana jest dzięki aktywnemu transportowi substancji.

Równania Nernsta i Goldmana są wciąż stosowane przez elektrofizjologów [np. 3], chociaż jak wykazano w szeregu pracach, opisywane tymi równaniami zależności nie zawsze są spełnione (7, 43, 56, 89). Istnieje wiele danych wskazujących na to, że elektrycznych właściwości błon komórek roślinnych nie można wyjaśnić w sposób zadawalający biorąc pod uwagę tylko ruch jonów  $K^+$ ,  $Na^+$ , i  $Cl^-$  [85]. *Kitasato* (53), na podstawie przeprowadzonych przez siebie badań roli  $H^+$  w zjawiskach elektrycznych błon komórek *Characeae*, sugeruje występowanie szybkiej dyfuzji jonów  $H^+$  do wnętrza komórek. Utrzymanie neutralności elektrycznej cytoplazmy i stałej wartości pH wymagałoby w tej sytuacji zrównoważenia wpływającego strumienia jonów  $H^+$  aktywnym wypływem tych jonów. Istnieje szereg prac potwierdzających tę koncepcję (72, 73, 88), są jednak prace kwestionujące hipotezę *Kitasato* (104).

Właściwości prostujące błony można wyjaśnić w oparciu o termodynamiczną teorię transportu jonów przyjmując, że błona jest wielowarstwową strukturą. Dwuwarstwowe błony rozpatrywane były pod tym względem w pracach *Katchalskiego* w latach 1967—68. Rozszerzenie termodynamicznych analiz na błony wielowarstwowe prowadzi między innymi do wniosku, że w wielowarstwowym układach znajdujących się w równowadze, prawo Nernsta może nie obowiązywać (74).

Interesująca jest teoretyczna analiza właściwości błony — analogiczna do stosowanej przez *Shockley'a* do półprzewodnikowych prostowników (54), — w których przyjmuje się, że błona składa się z dwu warstw ładunków związanych o znakach przeciwnych. Na złączu takich warstw istnieje silne pole elektryczne, którego wielkość wzrasta lub maleje w zależności od kierunku przykładanych do układu zewnętrznych napięć elektrycznych. Role elektronów i dziur — nośników ładunków w półprzewodnikach — odgrywają w tej teorii swobodne kationy i aniony. Analiza równań ruchu tych nośników pozwala wyjaśnić zarówno zmiany oporu błony przy zmianach napięcia, jak i zdolność gromadzenia energii elektrycznej to jest występowanie pojemności (23, 64).

Zjawiska elektryczne obserwowane w procesie pobudzenia dobrze opisuje teoria *Hodgkina* — *Huxley'a* (59). Teoria ta — przedstawiająca element błony jako element obwodu elektrycznego, składającego się z oporów, ogniw i pojemności — jest teorią matematyczno — elektroniczną i nie daje fizyko — chemicznego obrazu procesów, które mogłyby być

przyczyną tych zmian. Wyjściowe równania tej teorii opisujące zmiany oporu błony dla jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  są równaniami empirycznymi.

W ostatnich latach ukazuje się wiele prac na temat kinetycznomolekularnego mechanizmu procesu pobudzenia. W molekularnych opisach właściwości błon wysuwane są koncepcje kanałów regulujących przepływ jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Kanały te pod wpływem zewnętrznego pola mogą otwierać się albo zamykać w wyniku przenikania do nich jonów albo obrotu dipoli związanych z białkami błony [99]. Rolę kanałów mogą odgrywać drobinny albo zespoły drobin dzięki specyficznej strukturze lub położeniu (32, 33).

Autorzy wielu prac rozwijają koncepcję T a s a k i z 1968 r. (96). Zgodnie z tą koncepcją błona jest układem globularnym lipidobiałkowych kompleksów „protomerów”, które mogą występować co najmniej w dwu stanach konformacyjnych (21, 9, 110).

Konformacyjny model błony zaproponowany np. przez C z i z m d z e w a i wsp. (110, 111) opiera się na założeniu, że błonę tworzy dwuwymiarowy układ protomerów, które mogą znajdować się w trzech stanach. W jednym ze stanów protomery wykazują powinowactwo do jonów  $\text{Na}^+$  i mają niski opór elektryczny, w drugim — powinowactwo do jonów  $\text{K}^+$  i wysoki opór, w trzecim stanie związane są z jonami  $\text{Ca}^{++}$  i przedstawiają sobą całkowicie zablokowane kanały. W zależności od liczby protomerów znajdujących się w każdym z tych stanów, błona jest bardziej lub mniej przenikalna dla jonów  $\text{Na}^+$  lub  $\text{K}^+$ .

Równania wyprowadzone w oparciu o ten model zupełnie dobrze wyjaśniają (jakościowo) szereg właściwości błon między innymi zależność potencjału spoczynkowego błony od koncentracji dwuwartościowych jonów w zewnętrznym ośrodku i przebieg zmian przewodnictwa w procesie pobudzenia

Wyjaśnienia właściwości elektrycznych błon oparte bywają też na innych założeniach. I tak niektórzy autorzy traktują błonę jako ciekło-mozaikową strukturę [48], inni jako strukturę białkową ciekło-kryształiczną (101) jeszcze inni przyjmują za model błony warstewkę ferroelektryka o kierunku osi prostopadłym do powierzchni (44).

#### IV. Przewodnictwo elektronowe

Otwarty wciąż jest problem istnienia w błonach swobodnych elektronów, to jest elektronów, które pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego mogłyby poruszać się tworząc prąd elektryczny analogiczny do prądu w metalach i półprzewodnikach. Występowanie w błonach przewodnictwa elektronowego pozwoliłoby zastosować do opisu właściwości błon kwantowo-mechaniczną teorię ciał stałych (tzw. teorię pasmową), która odnosiła duże sukcesy przy interpretacji zjawisk obserwowanych w półprzewodnikach. Koncepcja traktowania błony jako ciała krystalicznego o włas-

ciwościach półprzewodnika po raz pierwszy została wysunięta w roku 1941 przez *S z e n t - G y ö r g y ' e g o* (95). Szereg autorów powraca później do tej koncepcji (28, 29, 60).

Istnienie w błonach swobodnych elektronów wyjaśniłoby obserwowany w wielu pracach wpływ stałego i zmiennego pola magnetycznego na stan i funkcjonowanie różnych elementów układu nerwowego. Wysuwane są sugestie rozpatrywania pobudzenia jako procesu w pewnym stopniu elektronowego (30).

Uzyskanie eksperymentalnych dowodów na poparcie koncepcji występowania w błonie swobodnych elektronów nie jest łatwe. Jednym z niewielu doświadczeń pozwalających odróżnić prąd elektryczny od prądu jonowego jest pomiar tzw. napięcia Halla. Jeżeli obiekt wzdłuż którego przepływa prąd elektryczny zostanie umieszczony w silnym polu magnetycznym skierowanym prostopadle do kierunku prądu, to w wyniku działania pola magnetycznego nośniki ładunków ulegną przesunięciu i na badanym obiekcie w poprzek kierunku przepływu prądu, wytworzy się różnica potencjałów (napięcie Halla). Z wielkości i znaku tej różnicy potencjałów można określić rodzaj nośników.

Metodą pomiaru napięć Halla stwierdzono, że w pewnych uwodnionych drobinach białkowych np. w hemoglobinie występuje przewodnictwo elektronowe, a zatem drobinę tę można traktować jako elementy półprzewodnikowe [17, 29, 34]. Wszystkie próby wykrycia bezpośrednio w strukturach biologicznych przewodnictwa elektronowego nie dawały dotychczas pozytywnych wyników [61]. Dopiero doświadczenia przeprowadzone w ostatnich latach pozwalają sądzić, że przewidywania *S z e n t - G y ö r g y ' e g o* były słuszne (16, 100). Do doświadczeń wykazujących występowanie w błonach przewodnictwa elektronowego należą między innymi pomiary napięć Halla w komórkach glonów *Characeae* (20). Pomiary te, łącznie z pomiarami oporów i pojemności przeprowadzonymi równolegle kilku metodami — sugerują, że błona plazmatyczna składa się z dwu wysokooporowych warstw przedzielonych strukturą wykazującą właściwości półprzewodnikowe (79, 83, 84, 112).

## V. Uwagi końcowe

Celem niniejszego artykułu było zapoznanie czytelnika z dotychczasowymi osiągnięciami i obecnym stanem badań elektrycznych własności błon komórkowych. Artykuł ten nie jest opracowaniem monograficznym i cytowane pozycje literatury są często pozycjami dowolnie wybranymi dla zilustrowania poglądów znanych autorce zarówno z piśmiennictwa jak ze zjazdów naukowych, konferencji i indywidualnych spotkań.

W opisie właściwości elektrycznych błon, główny nacisk położono na wyniki badań parametrów elektrycznych i ich interpretację. Proces tran-

sportu jonów przez błonę potraktowano bardziej marginesowo, mimo, iż związek między właściwościami błony a przepływem przez nią nośników ładunku — co starano się podkreślić w artykule — jest ścisły i ma przy tym charakter niezwykle złożony.

Prac z zakresu badań zjawisk elektrycznych w błonach ukazuje się ostatnio bardzo dużo. Zawierają one bogaty materiał doświadczalny i podają różnorodnie jego interpretacje, ale założenia przyjmowane przy tych interpretacjach są często całkowicie sprzeczne. Podaje się oryginalne teoretyczne opisy poszczególnych efektów, ale brak jednolitej teorii opisującej wszystkie zjawiska elektryczne.

Wszystko to świadczy o tym, że dział nauki traktujący o elektrycznych właściwościach błon jest dopiero w stadium tworzenia się.

Artykuł wpłynął dnia 14.9.1973, po rewizji autorskiej wrócił dnia 2.3.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Adomonis V., Naruševičus E., (1972), w „Biofizika membran”, materiały sympoziuma, red. Zabłockajte, E. V. Naruševičus A. P. Skersis cz. II, 12—17, Kaunas.
2. Adomonis V. M., Zabłockajte D. P., Naruševičus E. V., Sabalauskas I. J., (1971), w „Biofizika membran”, materiały sympoziuma, red. D. P. Zabłockajte, E. V. Naruševičus, A. P. Skersis cz. II 15—36 Kaunas.
3. Akelene D., (1973), *Biofizika* 18, 279—284.
4. Alkatsis D., Merda A. J., Lehinger A. L., (1972), *J. Membrane Biol.* 10, 237—246.
5. Andrianov V. K., Bułyčev A. A., Kurełła G. A., Litvin F. F., (1971), w „Biofizika membran”, Materiały sympoziuma, red. D. D. Akelene cz. I 60—68, Kaunas.
6. Andrianov V. K., Bułyčev L. A., Kurełła G. A., Litvin F. F., (1971), *Biofizika* 16, 1031—1036.
7. Baker P. F., Hodgkin A. L., Show T. J., (1962), *J. Physiol.* 164, 330—354.
8. Barry P. H., (1970), *J. Membrane Biol.* 3, 313—334.
9. Bass L., Moore W. I., (1973), *J. Membrane Biol.* 12, 361—366.
10. Bentrup F. W., Gratz H. J., Unbehauen H., (1973), w „Ion Transport in Plants” red. W. P. Anderson, 171—182, Academic Press, London, New York.
11. Bernhard J., Pauly H., (1967), *Biophysik* 4, 101—112.
12. Blinks L. R., (1935/36), *J. Gen. Phys.*, 19, 633—672.
13. Blinks L. R., (1936/37), *J. Gen. Phys.* 20, 229—250.
14. Blinks L. R., Skow R. K., (1940), *J. Gen. Phys.* 24, 247—261.
15. Bobrov V. A., Kurełła G. A., Jagłova I. P., (1971), w „Biofizika membran” materiały sympoziuma, red. D. D. Akelene cz. I. 137—145, Kaunas.
16. Bogusławskij L. J., (1969) *Biofizika* 14, 421—426.
17. Bogusławskij L. I., Vannikov A. V., (1968), „Organiceskije połuprowodniki i biopolimery” Izdatielstwo Nauka, Moskwa.
18. Bradley J., Williams E. J., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 797—811.
19. Brown D. F., Ryan T. E., Barr C. E., (1973), w „Ion Transport in Plants” red. W. P. Anderson, 141—152 Academic Press, London, New York.

20. Bulanda W., Gładyszewski L., Skierczyńska J., (1973), *Ann. UMCS* **28**, 43—50.
21. Changeux J. P., Tiery J., Tung Y., Kittel C., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 335—341.
22. Cole K. S., (1968), w „Teoretičeskaja i matematičeskaja biologija”, red. H. Waterman i H. J. Morowitz, tł. z ang. 154—193, Izdatielstwo Mir, Moskwa.
23. Coster H. G. L., (1965), *Biophys. J.*, **5**, 669—686.
24. Curtis H. J., Cole K. S., (1938), *J. Gen. Phys.*, **21**, 189—201.
25. Curtis H. J., Cole K. S., (1950, w „Medical Physics”, red. O. Glasser, t. 2, 584—595, Year Book, Chicago.
26. Dainty J., (1962), *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **13**, 379—402.
27. De Levie R., Moreira H., (1972), *J. Membrane Biol.*, **9**, 241—260.
28. Ernst E., (1956), *Biofizika* **1**, 296—300.
29. Ernst E., (1963) *Biophysics of the Striated Muscle* 217—238, Budapeszt.
30. Ernst E., (1972) *Acta Biochim. Biophys.* **7**, 377—385.
31. Findley G. P., Hope A. B., (1964) *Austr. J. Biol. Sci.* **17**, 62—77.
32. Fisman S. N., Chodorov B. I., Volkenstejn M. V., (1972) *Biofizika* **17**, 421—427 i 611—617.
33. Fisman S. N., Vokenstejn M. B., (1972) *Biofizika* **17**, 794—800.
34. Garret C. G., (1962) „Półprzewodniki organiczne” red. W. Hanney tłum. z ang. Warszawa.
35. Gillet C., Lefebvre J., (1973) w „Ion Transport in Plants”, red. W. P. Anderson, 101—112 Academic Press, London, New York.
36. Hanson U. P., Warncke J., Keunecke P., (1973), *Biophysic* **9**, 197—207.
37. Hirst G. D. S., Spence I., (1973) *Nature, New Biology* **243**, 54—56.
38. Hodgkin A. L., (1958) *Proc. R. Soc. B.* **148**, 1—37.
39. Hodgkin A. L., (1964) „The Conduction of the Nervous Impulse”, Liverpool University Press, Liverpool.
40. Hodgkin A. L., Huxley A. F., (1945) *J. Physiol.* **104**, 176—195.
41. Hodgkin A. L., Huxley A. F., (1952) *J. Physiol.* **117**, 500—549.
42. Hodgkin A. L., Katz B., (1949) *J. Physiol.* **108**, 37—77.
43. Hope A. B., Walker N. A., (1961) *Austr. J. Biol. Sci.* **14**, 26—44.
44. Inov S. P., Inova G. V., (1972) *Dokł. Akad. Nauk SSSR (Biol.)*, **202**, 960—962.
45. Katchalsky A., (1961) w „Membrane Transport and Metabolism” red. Kleinzeller A., Kotyk A., 69—86, Academic Press, New York, London.
46. Katchalsky A., Curran P. F., (1965) „Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysics” Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
47. Kavanau J. L., (1965) „Structure and Function in Biological Membranes”, Holden-Day, INC., San Francisco, London, Amsterdam.
48. Keynes R. D., (1972) *Nature* **239**, 29—32.
49. Kidokoro Yoshiaki, (1973), *Nature, New Biology* **241**, 158—159.
50. Kishimoto U., (1966) *Plant Cell Physiol.* **7**, 429—439.
51. Kishimoto U., (1966) *Plant Cell Physiol.* **7**, 559—572.
52. Kishimoto U., (1968) *Plant Cell Physiol.* **9**, 539—551.
53. Kitasato H., (1968) *J. Gen. Physiol.* **52**, 60—87.
54. Kittel Ch., (1969) „Wstęp do fizyki ciała stałego” tłum. z ang. PWN, Warszawa.
55. Kongres Biofizyczny w Baden (1971) *Nature, New Biology* **47**, 233.
56. Kostiuk P. G., Krystal O. A., Pidoplicko V. I., (1972) *Biofizika* **17**, 1048—1054.
57. Kotyk A., Janacek, (1970) „Cell Membrane Transport” Plenum Press, New York, London.

58. Krasts I. V., Zereleva O. M., Rezonov A. N., (1972) w „Biofizika membran”, materiały sympoziuma red. D. P. Zabiłockajte, E. V. Naruševičius, A. P. Skersis, cz. II, 258—264, Kaunas.
59. Kureiła G. A., (1958) *Biofizika* 3, 243—249.
60. Liberman E. A., (1958) *Biofizika* 3, 743—745.
61. Liberman E. A., Topały V. P., (1971) w „Biofizika membran” materiały sympoziuma, red. D. P. Zabiłockajte, E. V. Naruševičius, A. P. Skersis, cz. II, Kaunas.
62. Markin V. S., Liberman E. A., (1973) *Biofizika* 18, 453—459.
63. Markin V. S., Pastusenko, Cizmadzev J. A., (1972) *Biofizika* 17, 809—816.
64. Mauro A., (1962) *Biophys. J.* 2, 179—198.
65. Mazajeva F. M., Naumov A. D., (1972) *Biofizika* 17, 412—420.
66. Montal M., Meller P., (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3561—3566.
67. Mueller R. U., Finkelstein A., (1972) *J. Gen. Physiol.* 60, 263—284.
68. Mueller P. M. D., Rudin D. O., Ti Tien H., Wescott W. C., (1962) *Circulation* 26, 1167—1175.
69. Mueller P., Rudin D. O., (1963) *J. Theor. Biol.* 4, 268—280.
70. Mueller P., Rudin D. O., (1967) *Nature* 213, 603—604.
71. Paszewski A., Stolarek J., Gębal, (1968) *Acta Soc. Bot. Pol.* 37, 327—336.
72. Poole R. J., (1973) w „Ion Transport in Plants”, red. W. P. Anderson, 129—134, Academic Press, London, New York.
73. Rent R. K., Johnson R. A., Barr C. E., (1971) *J. Membrane Biol.* 7, 231—244.
74. Richardson J. W., (1972) *J. Membrane Biol.* 8, 219—236.
75. Ridge R. M. A. P., Walker R. J., (1963) „Bioelectric Potential Problems in Biology”, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris.
76. Scott B. J. H., (1967) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 18, 409—418.
77. Seifritz, (1936) „Protoplazma”, McGraw-Hill Book Company, New York, London.
78. Sibaoka T., (1966) *Sym. Soc. Exp. Biol.*, 20, 49—73.
79. Skierczyńska J., (1968) *J. Exp. Bot.* 19, 389—406.
80. Skierczyńska J., (1968) *J. Exp. Bot.* 19, 407—414.
81. Skierczyńska J., (1969) *Kosmos (seria A)* 18, 43—55.
82. Skierczyńska J., Zołnierczuk R., Śpiewła E., Bulanda W., Przygodzka A., (1971/1972) *Ann. UMCS* 25/27, 41—48.
83. Skierczyńska J., Zołnierczuk R., Śpiewła E., Bulanda W., Przygodzka A., (1972) *J. Exp. Bot.* 23, 591—599.
84. Skierczyńska J., Śpiewła E., Zołnierczuk R., Bulanda W., Wardak A., (1973) *J. Exp. Bot.* 24, 1015—1023.
85. Smith F. A., Lucas W., (1973) w *Ion Transport in Plants* red. W. P. Anderson, 223—231, Academic Press, London, New York.
86. Spanswick R. M., (1970) *Membrane Biol.*, 2, 59—70.
87. Spanswick R. M., (1970) *J. Exp. Bot.* 21, 617—627.
88. Spanswick R. M., (1973) w „Ion Transport in Plants” red. W. P. Anderson 113—128, Academic Press, London, New York.
89. Spanswick R. M., Stolarek J., Williams E. J., (1967) *J. Exp. Bot.* 8, 1—16.
90. Stacy R. W., Williams D. T., Worden R. E., McMorris R. O., (1955) w „Essentials of Biological and Medical Physics” 395—483, McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, London.
91. Stinnakre J., Taue L., (1973) *Nature, New Biology* 242, 113—115.



92. Stolarek J., (1966) *Ann. UMCS* **22**, 395—405.
93. Stolarek J., (1968) *Acta Soc. Bot. Pol.* **37**, 561—577.
94. Strunk T. H., (1971) *J. Exp. Bot.* **22**, 863—874.
95. Szent-Györgyi A., (1960) „Introduction to a Submolecular Biology”, Academic Press, New York, London.
96. Tasaki I., (1959) *J. Physiol.* **148**, 306—331.
97. Tashifumi Takenaha, Isao Inoue, Yoshio Ishima, Hidenori Horie (1971) *Proc. Jap. Acad.* **47**, 554—560.
98. Thain J. F., (1973) w „Ion Transport in Plants” red. W. P. Anderson 77—94 Academic Press, London, New York.
99. Tredgold R. H., (1973) *Nature, New Biology* **242**, 209—210.
100. Truchan È. M., (1966) *Biofizika* **11**, 412—419.
101. Vaderkoci, Garret, Green D. E., (1971) *Bioscience* **21**, 409—413.
102. Vredenberg W. J., (1973) w „Ion Transport in Plants”, red. W. P. Anderson 153—169 Academic Press, London, New York.
103. Walker N. A., (1955) *Austr. J. Biol. Sci.* **8**, 476—489.
104. Walker N. H., Hope A. B., (1969) *Austr. J. Biol. Sci.* **22**, 1179—1195.
105. Veprancev B. N., Evtodienko J. B., Zerełova O. M., Krasts I. V., (1972), w „Biofizika membran” materiały sympoziuma, red. D. P. Zabłockajte, E. V. Naruševičius, A. P. Skersius, cz. II, 113—119, Kaunas.
106. Vodianoj V. J., Zubov A. N., (1972) *Citoplazma* **14**, 144—150.
107. Vołkov G. A., Misiuk L. A., (1972) *Citologia* **14**, 1127—1132.
108. Vołkov G. A., Piatonova P. V., (1970) *Biofizika* **16**, 636—642.
109. Vorobuev L. M., Gostautajte L., Litvin A. I., Mielnikov P. V., Motejunene È., Fedułow J. P., Chitrov J. A., (1972) w „Biofizyka membran” materiały sympoziuma, red. D. P. Zabłockajte, E. V., Naruševičius, A. P. Skersius, cz. II, 148—166, Kaunas.
110. Cizmadzev J. A., Markin V. C., Muler A. L., (1973) *Biofizika* **18**, 69—74.
111. Cizmadzev J. A., Muler A. L., Markin V. C., (1972) *Biofizika* **17**, 1012—1016.
112. Żołnierczuk R., Śpiewła E., Skierczyńska J., (1972) *Folia Soc. Scien. Lubinensis* **14**, 11—14.



## SPRAWOZDANIA

### IX Międzynarodowy Kongres Biochemii

Sztokholm, 1—7 lipiec 1973

IX Międzynarodowy Kongres Biochemii otworzył prezydent Międzynarodowej Unii Biochemicznej prof. Hugo Theorell, a Adres powitalny wygłosił Lars Ernster — Główny Organizator Kongresu.

Wykłady plenarne podczas sesji otwarcia dotyczyły:

Ewolucji enzymów (*B. S. Hartley*),

Interakcji między błonami komórkowymi (*G. E. Palade*).

Obrady toczyły się w ramach 9 sekcji i 4 kolokwίων. Schemat organizacyjny sekcji obejmował posiedzenia sympozjalne, posiedzenia przeznaczone na ustne doniesienia oraz prezentację doniesień w postaci plakatów. Podobny był też organizacyjny schemat kolokwίων.

Tematyka sekcji i kolokwίων była następująca:

Sekcja 1 — Metody rozdziału makrocząsteczek;

Sekcja 2 — Struktura i funkcja białek;

Sekcja 3 — Biosynteza kwasów nukleinowych i białek;

Sekcja 4 — Bioenergetyka;

Sekcja 5 — Biochemia błon;

Sekcja 6 — Immunochemia;

Sekcja 7 — Metaboliczne funkcje oksygenaz;

Sekcja 8 — Regulacja metabolizmu pośredniego;

Sekcja 9 — Biochemia lipidów.

Kolokwium A

— Biochemia struktur pozakomórkowych;

Kolokwium B

— Ewolucja molekularna;

Kolokwium C

— Biochemia przekaźnictwa synoptycznego;

Kolokwium D

— Polipeptydy o właściwościach hormonalnych, toksycznych i anytbiotycznych.

Sekcja M

— doniesień różnych (wyłącznie plakatowych).

Oprócz naukowych sesji podczas Kongresu zorganizowano 4 wykłady popularno-naukowe dla osób towarzyszących oraz prasy, radia i telewizji. Wykłady te cieszyły się również dużym zainteresowaniem czynnych członków Kongresu.

Podczas sesji zamknięcia wykłady plenarne wygłosili:

*E. C. Slater* — „Transport elektronów a zachowanie energii”,

*S. Spiegelman* — „Etiologia raka tkanek ludzkich — dowody molekularne”.

Wyrazy podziękowania ze strony organizatorów przekazał Lars Ernster, uwagi końcowe zaś ustępujący prezydent Unii Hugo Theorell. Po czym podziękowanie ze strony uczestników złożył nowoobрани prezydent Unii O. Hayaishi.

Kongres zgromadził ponad 6000 biochemików z całego świata. Biochemików polskich reprezentowało 40 czynnych uczestników Kongresu z różnych ośrodków krajowych

Ogółem podczas Kongresu przedstawiono 200 wykładów, 680 doniesień ustnych i 1390 doniesień plakatowych (co stanowiło odpowiednio 10, 30 i 60% wszystkich prezentacji). Uczestnicy z Polski przedstawili 2 referaty sympozjalne oraz 23 doniesienia (w tym 2 ustne, 21 plakatowych).

Wielu uczestników Zjazdu szczególnie pozytywnie oceniło dyskusje jakie miały miejsce podczas plakatowej prezentacji doniesień.

Polskich członków Kongresu zainteresowały szczególnie problemy omówione poniżej. Wybór zagadnień i szczegółowość relacji wynikają z zainteresowań referentów, stanowią przeto — rzecz jasna — jedynie cząstkowy obraz prac przedstawionych podczas Kongresu.

### Ewolucja enzymów

Wykładowca, B. S. Hartley, omówił na wstępie proteazy serynowe trzustki (trypsyna, chymotrypsyna, elastaza) oraz enzymy biorące udział w tworzeniu i rozpuszczaniu skrzepów krwi (protrombina, trombina, plazmina) wskazując na zawarte w nich analogiczne sekwencje aminokwasów pomimo dużych różnic w specyficzności działania, co wskazuje na ewolucję od wspólnego „przodka”. Szczególnie podobne są w tych enzymach sekwencje łańcuchów leżących wewnątrz struktury przestrzennej cząsteczki. Różnice w sekwencji reszt aminokwasowych łańcuchów leżących na powierzchni cząsteczek enzymów są znaczne i sięgają dwóch trzecich ich całkowitej ilości natomiast różnice w miejscach wiążących substrat są minimalne; np. chymotrypsyna i trypsyna różnią się tylko jedną resztą aminokwasową (seryna w chymotrypsynie a kwas asparaginowy w trypsynie).

Podobne homologie strukturalne istnieją prawdopodobnie w grupie syntetaz aminocyno-tRNA. Mimo dużych różnic w długości łańcuchów enzymy te wywodzą się prawdopodobnie również od jakiegoś wspólnego „przodka”, gdyż ich łańcuchy peptydowe zawierają dwa lub trzy powtarzające się „intramery” o identycznej sekwencji aminokwasów. Niektóre z tych syntetaz uzyskano w formie krystalicznej i obecnie grupa Hartley'a bada strukturę przestrzenną tych enzymów.

Postulowany przez autora mechanizm powstawania takich rodzin enzymów to duplikacja genów. W tym procesie jedna kopia genu zachowuje swoją oryginalną aktywność a druga (inna) ulega mutacji w rezultacie czego powstają enzymy o nowych specyficznościach.

W dalszej części wykładu prof. Hartley opisał badania nad doświadczalną ewolucją niektórych enzymów bakteryjnych przy pomocy urządzenia nazwanego chemostatem albo „evolutionstat”. Bakterie hoduje się w tym urządzeniu w całkowitej izolacji od zewnętrznej atmosfery przy jednoczesnej możliwości monitorowania ewolucji enzymów bakteryjnych poprzez mieszalne zmiany poziomu zużywanych substratów. Wzrost biomasy bakterii można również mierzyć gdyż urządzenie działa w warunkach równowagi a nadmiar bakterii przechodzi do dołączonego drugiego naczynia. Ten chemostat jest swego rodzaju zamkniętą niszą ekologiczną, w której substancje pokarmowe (substraty) zamieniane są na biomasę komórek. Biologiczne zdolności żyjących w takiej niszy organizmów można mierzyć przez pomiar ilości pobranego pokarmu (substratu).

### Ewolucja molekularna

Tematowi temu poświęcono kolokwium (5 wykładów, 32 doniesienia). Oto tytuły niektórych wykładów i doniesień: interakcje między aminokwasami i nukleotydami w środowisku nie zawierającym materii ożywionej, rola nieorganicznych fosforanów w ewolucji chemicznej i biologicznej, molekularna ewolucja hormonów luteinizujących i hormonów tyreotropowych, filogenetyka trypsynogenów u ssaków, strukturalne podobieństwo między białkami jadu żmii, ewolucja hemoglobin (porównanie hemoglobin niższych i wyższych kręgowców) itd.

### Biosynteza kwasów nukleinowych i białka

Obrady w sekcji 3, gdzie ogłoszono 19 referatów sympozjalnych, 108 komunikatów i przedstawiono w formie plakatywnej 207 doniesień, dotyczyły zagadnień związanych ze strukturą i funkcją aparatu rybosomalnego oraz replikacyjnego i z regulacją transkrypcji. Tak więc obrady obejmowały zespół problemów zaliczanych do dziedziny biologii molekularnej. Dziedzina ta dynamicznie rozwijająca się w ciągu ubiegłych 20 lat, przechodzi w tej chwili okres mutacji. W poprzednim okresie praktycznie co roku uzyskiwano rewelacyjne dane dotyczące działania podstawowych mechanizmów biologicznych. Kongres Sztokholmski rewelacji na miarę odczytania kodu genetycznego nie dostarczył, nie oznacza to jednak by w obrębie dziedziny istniała stagnacja. Poprzednie badania dały zarys schematów i stworzyły nowe idee. Kongres Sztokholmski zaś był próbą rekapitulacji prac poświęconych wnikaniu w szczegółowe mechanizmy poznanych już procesów. Kongres był też świadectwem poważnego rozwoju metodycznego biologii molekularnej. Badanie sekwencji kwasów nukleinowych i białek, wydzielanie białek biologicznie czynnych w stanie homogenym, zastosowanie technik immunologicznych weszło do normalnego arsenału metod niejednego laboratorium. Ten rozwój metodyczny, z towarzyszącą mu koncentracją na badaniach mechanizmu reakcji, prowadzi do zjawiska wyraźnie podkreślonego przez Hugo Theorella w uwagach zamykających kongres — w biochemii zaczynają znajdować zastosowanie metody matematyczne i położony zostaje nacisk na badania fizykochemiczne. Taka jest też w tej chwili sytuacja w biologii molekularnej. Elementem spajającym różne działy tej dziedziny wydaje się być obecnie problem oddziaływania między białkiem a różnymi formami kwasów nukleinowych.

Po tych kilku ogólnych uwagach, omawiamy ciekawsze referaty i doniesienia ogłoszone w ramach sekcji, grupując je tematycznie.

### Procesy replikacji

Referat N. Sueoki i współpracowników (3Sa2) dotyczył replikacji DNA u *Bacillus subtilis*. Autorzy ci wykazali, że DNA związane jest w komórce z pewną frakcją błony komórkowej, różniącą się składem białkowym od pozostałej części błony. Stwierdziwszy, że *in vitro* replikacja DNA wymaga dodatku ATP, zajęli się udziałem wysokoenergetycznego związku w replikacji i wykazali, że najprawdopodobniej jest on niezbędny do miejscowego rozplecenia podwójnej nici DNA. Tego typu działanie ATP wiąże się z funkcją DN-azy zależnej od ATP, enzymu wyizolowanego przez autorów i rozkładającego w obecności ATP tylko natywne DNA. Enzym ten jednocześnie wykazuje aktywność ATP-azy zależną od obecności DNA. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego, mieszaniny zawierającej omawiany enzym, ATP i natywne DNA, wykazują, że w początkowym stadium działania enzymu, podwójna nić DNA ulega miejscowym rozpleceniom.

Zaawansowane badania nad mechanizmem replikacji faga T4 przedstawia pracownia B. Albertsa (3Sa3). W obrębie genomu faga T4 występuje 6 genów kontrolu-

jących produkcję białek wchodzących w skład aparatu replikacyjnego tego faga. Pierwsze z nich — białko pozostające pod kontrolą genu 43 to fagowa polimeraza DNA. Wyizolowany i oczyszczony enzym ten nie kopiuje jednak podwójnej, a tylko pojedynczą nić DNA i rozpoczyna replikację tylko pofragmentowanych matryc — nie wykazuje więc własności wymaganych w przypadku enzymu odpowiedzialnego za przebieg replikacji *in vivo*. Aktywność wyizolowanej polimerazy DNA jest jednak podnoszona przez dodatek białka pozostającego pod kontrolą genu 32. Białko to wiąże się z DNA destabilizując podwójną spiralę, jest więc białkiem „rozplatającym” wiążącym się jako pierwszy składnik aparatu replikacyjnego z wybranymi fragmentami DNA. DNA „rozplecione” przez „białko 32” staje się substratem dla polimerazy DNA, której specyficzność w stosunku do fragmentów inicjatorowych kwasu nukleinowego i zdolność do reinicjacji pojawia się w rezultacie interakcji między enzymem a czterema białkami kontrolowanymi przez pozostałe cztery geny odpowiedzialne za działanie aparatu replikacyjnego faga.

Model DNA Watsona i Cricka sprawiał zawsze trudności przy interpretowaniu przebiegu replikacji — liczone z jaką szybkością miała by się poruszać wzdłuż podwójnej nici replikaza i jak znaczna energia musiała by zostać zużyta na rozplecenie całej podwójnej nici DNA oraz zastanawiano się czy długie nici DNA nie splątały by się ze sobą podczas replikacji. Rekapitulacja prac grupy z Uniwersytetu z Nagoya dokonana przez Okazaki i współpracowników (3Sa4) stawia w nowym świetle rozważania dotyczące mechanizmu replikacji. Otóż replikacja DNA nie zachodzi w sposób ciągły, a jest inicjowana w wielu miejscach na nici DNA przy czym tworzą się tzw. fragmenty Okazaki. Co więcej, każdy taki względnie krótki fragment dezoksyrybonukleotydu (500—2000 nukleotydów) poprzedza związany z nim kowalencyjnie fragment rybonukleotydu o długości 50—100 nukleotydów. Być może każdy z tych fragmentów RNA ma identyczną sekwencję — w każdym razie na końcu 5' każdego z tych fragmentów występuje zawsze sekwencja pppGpUp... a na końcu 3' (połączonym kowalencyjnie z DNA wiązaniem 3'→5' (sekwencja ...p/rPy/p/rA/p/rU lub rC/p/dC/... Tak więc replikacja DNA zaczyna się najprawdopodobniej syntezą krótkich fragmentów RNA leżących wzdłuż nici DNA. W tych miejscach zostaje zainicjowana synteza fragmentów DNA komplementarnych do nici macierzystych, a następnie kowalencyjne związane z fragmentami DNA odcinki RNA zostają wytrawione przez RN-azę. Poszczególne fragmenty DNA połączone zostają za pośrednictwem enzymów reperujących w długą potomną nić DNA.

#### Transkrypcja

Istotne osiągnięcia w badaniach DNA/RNA przedstawione zostały przez M. J. Chamberlina (3Sb1) pracującego nad transkrypcją DNA z faga T7 przez bakteryjną polimerazę RNA. Interakcja między fragmentem promotorowym DNA, a polimerazą RNA prowadzi do powstawania kompleksu mogącego znajdować się w dwu stanach przejściowych przy czym w jednym z tych stanów następuje inicjacja syntezy mRNA. Co więcej *in vivo* transkrypcja fagowego RNA zachodzi odcinkami. Podobnie działa wyizolowana przez Chamberlina polimeraza RNA odczytująca fagowe DNA.

Innym poważnym osiągnięciem w badaniach nad transkrypcją były przedstawione przez B. Müller-Hilla (3Sb3) wyniki dotyczące mechanizmu działania represora operonu *Lac* u *E. coli*. W pracowni tej stosując odpowiednie metody genetyczne uzyskano szczepy bakteryjne syntetyzujące białko represorowe w ilości około stukrotnie wyższej niż normalne szczepy. Białko to zostało wyizolowane w stanie homogenym w ilości 10g. Jego sekwencja i własności zostały poznane, przy czym okazało się, że nie jest to białko typu histonu. Następnie zajęto się badaniem mechanizmu wiązania tego białka z chromosomem *E. coli* i wykazano, że białko to tworzy na nici DNA

kompleks tetrameryczny. Badania nad działaniem zmutowanych form białka represorowego wykazały, że miejsce wiążące się z operatorem znajduje się w okolicy N-końca białka, a miejsce wiążące induktor w centralnym fragmencie cząsteczki. Delegacje prowadzące do utracenia fragmentów C końca białka represorowego znosiły obie jego funkcje. Mutacje takie znoszą również tendencję białka represorowego do tworzenia tetramerów.

#### Translacja

A. Rich i współpracownicy przedstawili trójwymiarowy model drożdżowego tRNA<sup>fen</sup>. Model ten wynika z badań rentgenograficznych ortorombowych kryształów tRNA. Zgodnie z nim cząsteczka tRNA ma kształt dużej litery L, przy czym na końcu krótszej kreseczki L występuje koniec CCA ulegający aminoacylacji, zaś anty-kodon znajduje się na końcu dłuższej kreseczki litery L. Doświadczalne dane wskazujące, że tRNA w roztworze posiada również strukturę proponowaną przez Richa oraz, że ta struktura ma charakter ogólny dla wszystkich rodzajów tRNA zostały przedstawione przez J. Ofenganga i współpracowników (3k9). Procent wprowadzonych fotochemicznie wiązań między 4 tiourydyną w pozycji 8 i cytydyną w pozycji 13 był zgodny dla różnych rodzajów tRNA z modelem Richa. Model ten w istotny sposób różni się od dotychczas przyjmowanego „gruszkowego” modelu Cramera i będzie miał napewno istotne znaczenie przy rozważaniu nad mechanizmami oddziaływania między tRNA i rybosomem i nad przebiegiem aminoacylacji tRNA. Zastrzeżenia dotyczące modelu Richa wynikają z polimorfizmu kryształów tRNA, co sugeruje istnienie różnych form przestrzennych w populacji cząsteczek tRNA. Należy zwrócić uwagę, że Rich przedstawił pierwszą analizę rentgenograficzną cząsteczki tRNA.

W rozważaniach nad działaniem między syntetazą aminoacylo-tRNA, a tRNA Smith i Celis (3Sc2) zastosowali typowo genetyczne metody. Okazuje się, że zamiana pojedynczej zasady w obrębie dwu końcowych par przy końcu CCA (A1, A2, A80, U81) lub zasady bezpośrednio poprzedzającej koniec CCA (G82), decydują o zmianie specyficzności w rozpoznawaniu supresorowego, tyrozynowego tRNA przez syntetazę aminoacylo-tRNA. Tak więc w rozpoznaniu struktury danego tRNA przez odpowiedni enzym istotną rolę odgrywa sekwencja i kształt końca akceptorowego tRNA.

Istotny udział w badaniach procesów translacji mają prace dotyczące organizacji rybosomu i związku tej organizacji z biosyntezą białka. M. Nomura (3Cc4) przedstawił schemat przebiegu organizowania się *in vitro* aktywnej podjednostki rybosomowej 30S z 16S RNA i 21 oczyszczonych białek rybosomowych, ustalając kolejność w jakiej do RNA dołączają się poszczególne białka. Schemat organizacji rybosomu u protokariotów prawdopodobnie ma znaczenie ogólne, bowiem większość białek rybosomowych *E. coli* daje się zastąpić białkami rybosomowymi z *B. stearothermophilus* (z punktu widzenia chemicznego — dość różnych od białek *E. coli*). Za fenotyp rybosomowy charakterystyczny dla danego gatunku, odpowiada prawdopodobnie tylko parę białek rybosomowych (może S1?). W pracowni Kurlanda (3Sc5) stosując odczynniki sprzęgające białka, badano wzajemne sąsiedztwo różnych białek rybosomowych i wykazano, że w podjednostce rybosomowej lżejszej sąsiadują ze sobą białka S5-S8, S18-S21, S13-S19. Podobny typ badań topograficznych nad rozmieszczeniem białek rybosomowych przedstawił J. Gordon (3Sd3) oraz J. Highland i współpracownicy (3g4). Oparte one były na zastosowaniu specyficznych, w stosunku do 50 białek rybosomowych, przeciwciał i określaniu wpływu tych przeciwciał na asocjację podjednostek rybosomowych i pojawienie się aktywności rybosomowej GTP-azy.

Przedstawione też zostały nowe poglądy na przebieg inicjacji specyficznych polipeptydów w układzie bakteryjnym. H. O. Voorma i współpracownicy (3g5) stosując znakowane faktory inicjacyjne potwierdzili, że tworzenie kompleksu inicjacyjnego

przebiega poprzez kolejne stadia polegające na przyłączeniu do podjednostki 30S kolejno czynników inicjujących IF3, IF1, IF2 (proces dołączania się faktorów ma charakter kooperatywny). Dopiero po przyłączeniu faktorów, dołącza się do rybosomów mRNA, a N-formylo-tRNA<sup>Met</sup> dołącza się w ostatnim etapie tworzenia kompleksu inicjacyjnego. Tak więc wybór właściwego odcinka mRNA mającego znaleźć się w obrębie kompleksu inicjacyjnego nie wymaga obecności inicjatorowego tRNA, co jest nowym elementem w poznaniu procesu inicjacji.

Obszerny referat M. Revela i współpracowników (3Sd2) dotyczył udziału faktora i (interferującego) w procesie inicjacji. Różne formy tego faktora wiążąc się z czynnikiem IF3 nadają mu odpowiednią specyficzność w stosunku do określonych fragmentów inicjacyjnych mRNA. Białka aparatu inicjacyjnego wydają się wpływać na proces transkrypcji. Komplikuje to oczywiście obraz mechanizmu inicjacji. Revel przedstawił też interesujący spekulatywny schemat działania czynników inicjacyjnych, zgodnie z którym mają one leżeć na powierzchni rybosomu bezpośrednio się ze sobą stykając. Współdziałanie ich wzajemnego ułożenia (narzucanego przez konformację powierzchni rybosomu) oraz zmian alloesterycznych w obrębie faktora i prowadzi do specyficznego wyboru przez dany kompleks rybosomowy właściwego odcinka inicjującego w obrębie mRNA.

Tematycznie związany z omawianą sekcją był odczyt plenarny wygłoszony podczas sekcji zamknięcia Kongresu przez S. Spiegelmana n.t. „Etiologia raka tkanek ludzkich — dowody molekularne”. Odczyt ten przyjęty z wielkim zainteresowaniem rekapitulował jakby ostatnie dwadzieścia lat pracy nad kwasami nukleinowymi, przynosząc dane co do molekularnych mechanizmów odgrywających rolę przy rakowaceniu tkanki. Stosując techniki opracowane przez biologów molekularnych (a wiele spośród nich powstało w pracowni samego Spiegelmana) wykazał on, że w przypadku określonych typów raka w zaatakowanej tkance pojawia się RNA o sekwencji podobnej do RNA zawartego w wirusach powodujących podobne procesy rakowacenia u zwierząt doświadczalnych. RNA w tkance ma również ciężar cząsteczkowy zbliżony do ciężaru RNA wirusowego i co więcej w gradiencie sacharozowym sedymentuje pod postacią kompleksu z „odwrotną transkryptazą”, enzymem specyficznym dla działania wirusów onkogennych. Wreszcie doświadczenia przeprowadzone nad białaczką ludzką wykazały, że w przypadku tego raka w komórkach nie występuje segment DNA, którego transkrypcja prowadziła by do powstania RNA wirusowego. Referat ten wykazał istotne znaczenie badań podstawowych w dziedzinie biologii molekularnej dla poznania mechanizmu zmian raktwórczych.

W ramach sekcji przedstawiono w postaci plakatowej 8 prac z laboratoriów krajowych.

### Bioenergetyka

Szeroko dyskutowano w Sztokholmie zagadnienia biologicznych przemian energetycznych. Oprócz sekcji pod nazwą „Bioenergetyka”, będącej częścią składową Kongresu, odbyło się bezpośrednio po Kongresie dwudniowe sympozjum na temat procesów energetycznych w błonach biologicznych. Niniejsze sprawozdanie obejmuje również najważniejsze problemy omawiane na tym „satelitarnym” sympozjum.

Dwa zagadnienia z zakresu bioenergetyki wysunęły się na czoło w ostatnich kilku latach i były też przedmiotem szczególnego zainteresowania na Kongresie i pokongresowym Sympozjum. Pierwsze, to formy cytochromów, zdolne do udziału w procesach przekształcania energii, drugie — rekonstrukcja błony zdolnej do „sprzężenia energetycznego”. Odkrycia wysokoenergetycznych form cytochromu b dokonał kilka lat temu B. Chanć (Filadelfia). Zagadnienie to podjęło następnie kilka innych pracowni, m.in. Słatera w Amsterdamie. Chanć i jego współpracownicy przedstawili na Kongresie badania w zakresie cytochromu a<sub>3</sub>, z których wynika, że i ten



cytochrom, podobnie jak cytochrom  $b_T$ , może zmieniać potencjał oksydoredukcyjny w zależności od stanu energetycznego błony mitochondrialnej, a więc może uczestniczyć w przekształceniu energii transportu elektronów w energię syntezy ATP. Referat plenarny E. C. Slatera wygłoszony na zamknięcie Kongresu zawierał przekonujące dane doświadczalne na to, że w dwóch tzw. „miejscach sprzężenia energetycznego” w łańcuchu oddechowym istotną rolę w przekształcaniu energii odgrywają te właśnie „przełącznikowe” (ang. „transducing”) formy cytochromów. Wydaje się prawdopodobne, że zmiany potencjału oksydoredukcyjnego tych cytochromów związane są z jakimiś zmianami konformacyjnymi ich cząsteczek.

Niezwykle ważne dla zrozumienia mechanizmu sprzężenia energetycznego, a zarazem bardzo efektywne, są badania E. Rackera (Ithaca, USA) nad rekonstrukcją liporoteidowej błony zdolnej do prowadzenia procesów przekształcania energii. Pracę w tym kierunku podjął niezależnie V. P. Skulachev (Moskwa). Otrzymane przez niego tzw. proteoliposomy, złożone ze specjalnie dobranej mieszaniny fosfolipidów oraz oksydazy cytochromowej lub mitochondrialnej ATP-azy, zdolne są do tworzenia transmembranowego potencjału elektrycznego i do aktywnego transportu jonów kosztem energii utleniania cytochromu c (gdy składnikiem białkowym proteoliposomu jest oksydaza cytochromowa) lub kosztem energii hydrolizy ATP (gdy składnikiem tym jest ATP-aza). Zrekonstruowane błony zawierające zarówno oksydazę cytochromową jak i ATP-azę fosforylują ADP kosztem energii utleniania cytochromu c. Badania Rackera zmierzają obecnie do rekonstrukcji innych (poza mitochondrialnymi) błon zdolnych do aktywnego transportu jonów, np. błony sarkoplazmatycznego retikulum transportującej jony  $Ca^{++}$  i błon komórkowych nerki przenoszących jonu  $K^+$  i  $Na^+$ . Skulachev natomiast dąży do dalszego udowodnienia, że w „sprzężonych energetycznie” błonach mitochondrialnych możliwe jest wzajemne i odwracalne przekształcenie trzech źródeł energii: potencjału elektrycznego, procesów oksydoredukcyjnych i hydrolizy ATP. Stanowi to piękne potwierdzenie „chemiosmotycznej” koncepcji oksydacyjnej fosforylacji zaproponowanej z górami 10 lat temu przez P. Mitchella. Jakkolwiek koncepcja ta nie wyjaśniła chemizmu syntezy ATP, to zasługą jej było zwrócenie uwagi badaczy na ścisłą współzależność między transportem elektronów, transportem jonów i syntezą ATP w błonach mitochondriów i chloroplastów.

Nową próbą przedstawienia mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji był referat P. D. Boyera (Los Angeles). Badacz ten, twórca, tak zwanej konformacyjnej teorii oksydacyjnej fosforylacji, zaproponował obecnie koncepcję, według której połączenie ADP i ortofosforanu z wydzieleniem wody i wytworzeniem ATP zachodzi w centrum katalitycznym odpowiedniego enzymu bez nakładu energii. Energia pochodząca z procesów oksydoredukcyjnych potrzebna jest dopiero do uwolnienia powstałego ATP od enzymu. Grają tu, według autora, decydującą rolę konformacyjne zmiany enzymu. Na potwierdzenie swojej teorii przedstawia Boyer dane doświadczalne z wymiany izotopowej  $^{32}P$  między ortofosforanem a ATP i  $^{18}O$  między ATP a wodą i ortofosforanem. Dane te są jednak trudne do jednoznacznej interpretacji. Argumentem przemawiającym za koncepcją Boyera stało się ostatnio wykazanie m.in. w pracowni E. C. Slatera w Amsterdamie, że mitochondrialna ATP-aza zawiera ściśle związane ATP i ADP.

Z przedstawionych na Kongresie referatów i toczonych dyskusji zaczynają wyłaniać się wzajemne zaleźnienia między trzema, dotychczas odrębnymi a często wręcz sprzecznymi, koncepcjami oksydacyjnej fosforylacji: teorią „chemicznego sprzężenia”, teorią „chemiosmotyczną” i teorią „konformacyjną”. Można zatem żywić ostrożną nadzieję, że najbliższe lata pozwolą na sformułowanie teorii, godzącej różne aspekty i różnorodne przejawy jednego z najważniejszych procesów życiowych, jakim jest biologiczne przekształcenie energii.

### Regulacja metabolizmu pośredniego

W sekcji tej wygłoszono 20 referatów sympozjalnych i przedstawiono 174 komunikaty w tym około połowę na tzw. *poster sessions*.

Dotychczasowy stan badań nad mechanizmem działania hormonów oraz przegląd podejść eksperymentalnych przedstawiono w referatach T. R. Taty (Londyn) i O. Hechtera (Chicago). Badanie interakcji hormon-receptor, właściwości kompleksu hormon-receptor, następnie poznanie natury chemicznej sygnału wytworzonego przez taki kompleks — oto problemy, na których skupia się obecnie uwaga badaczy. Jakkolwiek chemiczna natura różnych hormonów została już dość dobrze poznana, to w dalszym ciągu brak danych o szczegółach budowy receptorów. Obecnie prowadzi się intensywne badania składników białkowych i lipidowych błon cytoplazmatycznych będących głównym siedliskiem receptorów hormonalnych. Dane te są pierwszym krokiem w kierunku zrozumienia fizykochemicznych mechanizmów, dzięki którym hormon powoduje zmianę aktywności cyklazy adenilowej (znajdującej się w błonach cytoplazmatycznych). Zostało stwierdzone (M. Rodbell, Bethesda), że glukagon wiąże się do grup hydrofobowych receptora (błony plazmatyczne wątroby szczura) swymi resztami histydynowymi, co w następstwie powoduje zmianę konformacji i aktywności cyklazy. W procesie tworzenia kompleksu hormon-receptor (błony) konieczna jest obecność GTP lub GDP, lecz rola ich jest narazie niewyjaśniona. Podobne zjawisko zaobserwowano (G. Krishna, Bethesda) w przypadku interakcji prostaglandyny z płytkami krwi; GTP bardzo znacznie stymulowało działanie tego hormonu. Autor przytoczył szereg danych wskazujących, że natura aktywacji polega na zmianach konformacji błony.

Dość dużą trudność w zrozumieniu bardzo zróżnicowanego działania hormonów stanowił fakt, że systemem przekaźnikowym dla większości z nich jest jeden uniwersalny związek — cykliczny AMP. Obecnie ustala się pogląd, że specyficzne działanie poszczególnych hormonów realizuje się głównie poprzez obecność specyficznych receptorów w danej tkance. Ilość tych specyficznych miejsc wiążących w komórkach zmienia się wraz z rozwojem organizmu (R. I. Salganik, Nowosybirsk) lub na skutek szczególnych warunków zewnętrznych niskie temperatury (J. Himms Hagen, Ottawa i R. W. Butcher, Worcester).

Fosforylacja i defosforylacja białek regulujących stanowią system znany od lat kilku, rozpracowany szczegółowo na przykładzie rozkładu glikogenu. Obecnie doniesiono o zależnej od wapnia fosforylacji troponiny fosforylującej podjednostki enzymu, które z kolei ulegają defosforylacji przez fosfatazy (E. G. Krebs, Kalifornia). Są także w toku dalsze badania nad aktywną (nieufosforylowaną) i nieaktywną (ufosforylowaną) formą dehydrogenazy pirogronianowej. Insulina, która w komórkach tkanki tłuszczowej podwyższa aktywność dehydrogenazy pirogronianowej, działa poprzez podwyższenie przepuszczalności błony mitochondrialnej dla wapnia, powodując szybszą defosforylację dehydrogenazy. Jony wapnia okazały się silnymi aktywatorami fosfatazy dehydrogenazy pirogronianowej (R. N. Denton, Bristol) oraz B. R. Martin i T. Clausen, Kopenhaga).

System hormon-receptor-cykliczny AMP nie reguluje procesów zachodzących w mitochondriach, ponieważ błony mitochondrialne nie posiadają receptorów hormonalnych ani cyklazy adenilowej. Aktywność enzymów mitochondrialnych jest natomiast pod kontrolą bezpośredniego oddziaływania substratów, produktów i kofaktorów na białka enzymatyczne. Szczególnie ważną rolę odgrywają w metabolizmie mitochondriów tzw. enzymy regulatorowe to znaczy takie, które podlegają efektom allosterycznym. Pod tym kątem bada się od kilku lat kinetykę zależnej od NAD dehydrogenazy izocytrynianowej oraz dehydrogenazy glutaminianowej z tkanek zwierzęcych, roślinnych i z bakterii. Nowość w tej dziedzinie stanowią doniesienia

o allosterycznych efektorach dehydrogenazy bursztynianowej, jak szczawiooctan, ATP, zredukowany ubiquinon (T. P. Singer Kalifornia i M. Gutman Tel Aviv).

Innym mechanizmem kontrolującym procesy mitochondrialne są zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej względem substratów i kofaktorów. Zmiany te mogą wywoływać bądź metabolity, bądź hormony, w tym ostatnim przypadku niebezpośrednio, lecz w wyniku łańcuchowych reakcji, które np. zmieniają stężenie kationów. (Wspomniany wyżej przykład działania insuliny na dehydrogenazę pirogronianową).

Wzajemne powiązania procesów glukoneogenezy, ketogenezy i utleniania w cyklu Krebsa były tematem serii referatów: M. Lopez-Cardozo, Utrecht; A. Van Tol, Rotterdam; P. K. Tubbs, Cambridge; A. B. Wojtczak et. al, Warszawa; L. Wojtczak et al., Warszawa). Wiele uwagi poświęcono w nich roli kwasów tłuszczowych i ich acyloowych pochodnych. Estry długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z CoA hamują transport przez błonę mitochondrialną nukleotydów adeninowych i anionów trójkarboksylowych. Prowadzi to z kolei do poważnych konsekwencji w całym metabolizmie mitochondriów. Wykazano np., że zahamowanie wymiany ATP—ADP pomiędzy mitochondriami a medium (cytoplazmą) powoduje obniżenie utleniania w cyklu Krebsa, podwyższenie ketogenezy i ponadto może być powodem stymulacji różnych syntez (np. cytruliny lub szczawiooctanu), na skutek podwyższenia stosunku ATP/ADP wewnątrz mitochondriów.

Metabolizmem etanolu w wątrobie zajmuje się wiele grup badawczych, między innymi I. Bötter et al. z Monachium; E. R. Gordon z Montrealu; H. Thieden et al. z Kopenhagi; J. R. Williamson z Filadelfii i inni. Stwierdzono, że w wyniku adaptacji może w wątrobie zwiększyć się znacznie aktywność dehydrogenazy alkoholowej. Przedstawiono dane, że tzw. otłuszczona wątroba (patologiczny skutek alkoholizmu) powstaje na skutek zahamowania utleniania kwasów tłuszczowych w wątrobie, spowodowane znacznym zredukowaniem NAD przez dehydrogenazę alkoholową (istnieje kompetycja o NAD pomiędzy etanolem i kwasami tłuszczowymi, którą wygrywa etanol). Z powodu dużego zainteresowania tematem odbyło się po Kongresie osobne, dwudniowe sympozjum dotyczące przemian etanolu i enzymologii dehydrogenazy alkoholowej.

### Biochemia błon

W szerokim wachlarzu tematów poruszonych w 20 referatach sympozjalnych i 243 komunikaty dają się wyróżnić następujące grupy zagadnień: organizacja membran i struktura jej składników; biogeneza membran; rola membran w procesach metabolicznych komórki; rola składników membran w ich oddziaływaniu z czynnikami zewnętrznymi; transport jonów i związków niskocząsteczkowych poprzez membrany.

Ogólnie akceptowany „płynny” mozaikowy model membran komórkowych zakłada, fazę płynną stanowi podwójna warstwa lipidowa, w której „zawieszono” są cząsteczki białek (glikoproteidów). Tak zwane białka integralne o charakterze „amfipatycznym” mają część hydrofilową usytuowaną na zewnątrz błony (na zewnątrz lub we wnętrzu komórki), a część hydrofobową w warstwie lipidowej. Białka integralne wydziela się przy zastosowaniu metod powodujących całkowitą deorganizację membran (detergenty, rozpuszczalniki). Do białek integralnych zaliczono np. sjałoglikoproteidy erytrocytów oraz cytochrom  $b_5$  mikrosomów. Białka peryferyjne łączą się przypuszczalnie z błonami poprzez niekowalencyjne oddziaływania z odsłoniętymi fragmentami białek integralnych lub (Lenaz i wsp.) z grupami polarnymi fosfolipidów. Białka peryferyjne udaje się wydzielać z membran metodami łagodnej ekstrakcji, nie naruszającej ich struktury. Przykładami białek peryferyjnych są cytochrom c mitochondriów, alfa-laktoalbumina gruczołów mlekowych, spektryna erytrocytów.

Uważa się, że białka peryferyjne stanowią „rusztowanie” powierzchni błon zwiększając ich mechaniczną odporność (Singer).

Badania porównawcze sztucznych układów lipidowych z naturalnymi membranami o różnym składzie lipidowym wykazały korelację właściwości (transport, liza) i składu lipidowego błon. Nawet drobne różnice w składzie lipidowym powodują znaczne różnice właściwości błon, czy nawet poszczególnych regionów tej samej błony. Użycie oczyszczonych i zdefiniowanych fosfolipaz dostarczyło wielu informacji o zróżnicowanej lokalizacji lipidów w membranach, o oddziaływaniach lipidy—białka i o mechanizmie działania zależnych od lipidów enzymów membran (Van Deenen).

Lipidy membran są w stanie dynamicznej równowagi i mogą ulegać wymianie z lipidami otoczenia (Fujii). Wymianę fosfolipidów między różnymi membranami stymuluje szeroko rozpowszechniony czynnik białkowy. Czynnik ten oczyszczony z wątroby wołu specyficznie stymulował wymianę fosfatydylocholiny. Pozostaje do wyjaśnienia czy istnieją czynniki swoiste dla każdej z klas fosfolipidów (Wirtz).

Badania struktury membran metodą dyfrakcji rentgenowskiej mają duże ograniczenia spowodowane heterogennością organizacji błon. Większość informacji uzyskuje się drogą pośrednią przez badanie prostych systemów modelowych, jak liposomy czy kompleksy lipidowo-białkowe (Luzatti). Badania mikroskopowe, a zwłaszcza technika *freeze-etching* daje bezpośrednią wizualizację hydrofobowego wnętrza membrany. Badania mikroskopowe i rentgenowskie nadają się szczególnie do membran o ograniczonej heterogenności, jak np. membrany *Halobacterium halobium*, membrany „*retional rod outer segment*” i in. (Stoeckenius).

W cyklu referatów sympozjalnych omówiono problemy biosyntezy membran retikulum endoplazmatycznego komórek wątroby (Omura), mitochondriów drożdży (Poyton i wsp.; Tzagaloff) i chloroplastów (Ohad). Z referatów tych wyłania się wniosek, że białka (enzymy) powstają po części *in situ*, tzn. w błonach odpowiednich elementów subkomórkowych, po części zaś w cytoplaźmie. Np.: niekatalityczne podjednostki wieloenzymowych kompleksów powstają w mitochondriach, katalityczne zaś w cytoplaźmie. Po połączeniu kompleks wiąże się z wewnętrzną błoną mitochondrialną.

Biosynteza białek sekrecyjnych zachodzi z udziałem polirybosomów związanych z membranami reticulum endoplazmatycznego. Wykryto dwa rodzaje wiązań łączących rybosomy z membranami: wiązanie za pośrednictwem powstającego polipeptydu wrażliwe na puromycynę oraz wiązanie bezpośrednie, rozrywane przy wysokiej sile jonowej. Badania idą w kierunku scharakteryzowania elementów membran zaangażowanych w wiązanie rybosomów (Sabatini i wsp.).

Łańcuchy peptydowe syntezowane przez związane z membranami rybosomy ulegają następnie stopniowej glikozylacji przy udziale transferaz związanych z błonami endoplazmatycznego reticulum i aparatu Golgi'ego. Udział alkoholu poliizoprenyloвого w procesach glikozylacji jest znacznie lepiej wyjaśniony u bakterii (Strominger) niż w komórkach zwierzęcych (Carminatti i wsp.; Molnar). Rozważne są dwa mechanizmy biosyntezy glikoproteidów: 1) kolejne dodawanie pojedynczych monocukrów do powstającego łańcucha peptydowego; 2) synteza pośrednich jednostek oligosacharydowych na nośniku lipidowym i następne ich włączenie do łańcucha peptydowego. Mechanizm biosyntezy glikoproteidów może być uzależniony od rodzaju komórki. Na podstawie trzech referatów i około 20 komunikatów dotyczących tego zagadnienia zaznacza się wyraźny fakt, że udział związków o naturze lipidowej, głównie pochodnych długołańcuchowych *cis/trans* poliizoprenoidów ma charakter powszechny. Ogólnie biorąc, dobrze ilustruje on procesy wytwarzania makrocząsteczek w bogatych w lipidy strukturach membranowych, gdyż uwzględni również procesy translokacji. W referacie J. Stromingera szczegółowo omówiono zagadnienie wpływu

detergentów na aktywność enzymów pochodzących ze struktur membranowych. Przedstawione obserwacje, mówiące o tym, że efekt wywierany przez detergent na aktywność enzymatyczną zależy wyłącznie od jego natury hydrofilowo-lipofilowej (liczbowa wartość RHL, cz. równowagi hydrofilowo-lipofilowej). To dobrze udokumentowane stwierdzenie ma ważne znaczenie dla badań nad funkcją enzymów zawartych w błonach biologicznych.

W dziedzinie badania mechanizmu transportu jonów i innych związków niskocząsteczkowych przez błony najwięcej uwagi poświęcono transportowi jonów sodu i potasu i charakterystyce ATP-azy aktywowanej przez  $\text{Na}^++\text{K}^+$ , oraz transportowi jonów wapnia przez błony różnych komórek i charakterystyce makrocząsteczek pośredniczących w tym transporcie (np. glikoproteid membrany mitochondrialnej). Wiele komunikatów dotyczyło transportu nukleotydów, aminokwasów i cukrów.

W omawianej sekcji znalazły się dwa komunikaty z Polski. Jeden z nich dotyczył zmian konformacji białek membran erytrocytów pod wpływem promieniowania gamma (Leyko i Koter), drugi — obrazu elektroforetycznego białek i zawartości cukrów w membranie mięśnia szkieletowego królika (sarkolemma) (Zubrzycka i wsp.).

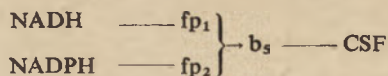
W Sekcji Biochemii Lipidów, grupa referatów (K. Biemann, H. M. Fales i C. C. Sweeley z U.S.A. i R. Ryhage ze Szwecji) w Sympozjum poświęconym spektrometrii masowej stanowiła dobry przegląd stosowania w biochemii nowoczesnych metod i identyfikacji lipidów, fragmentów cząsteczek białkowych (polipeptydy złożone z kilkunastu aminokwasów), wielocukrów itp. Duże osiągnięcia w tej dziedzinie są wynikiem wprowadzenia znacznych udoskonaleń technik rozdzielania chromatografii gazowej, stosowaniu w metodzie spektrometrii masowej różnych technik jonizacji oraz wydoskonaleniu sposobów interpretacji widm w drodze zastosowania systemów komputerowych o dużej pojemności. Jak wynikało z przedstawionego również materiału filmowego stosowaniem spektrometrii masowej w biochemii zajmują się wydzielenie 5—10 osobowe zespoły (łącznie z personelem technicznym) głównie chemików w doskonale wyposażonych laboratoriach. Jak można się zorientować są to wzorowe „laboratoria środowiskowe” o charakterze usługowym. Widać również duże współautorskie zaangażowanie personelu tych laboratoriów w pracach naukowych dotyczących różnych dziedzin biologii oraz twórczy udział w opracowywaniu i dostarczaniu biologom nowych technik badawczych. Nasuwa się refleksja, że bez podobnej organizacji badań w drodze tworzenia pojedynczych silnych ośrodków metodycznych koncentrowanie oddzielnych tematycznie jednorodnych laboratoriów umożliwi realizację jedynie przeciętnego poziomu prac. W ramach sekcji przedstawiono 3 prace (jako posters).

#### Metaboliczne funkcje oksygenaz

W sekcji tej wygłoszono 20 referatów sympozjalnych i przedstawiono 74 komunikaty. Między innymi dotyczyły one roli oksygenaz w przemianach kwasów tłuszczowych i sterydów, a także funkcji cytochromu P-450.

W tlenowym mechanizmie biosyntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych, działa na kwasy tłuszczowe powiązane tioestrowo z CoA, system enzymatyczny zlokalizowany we frakcji mikrosomalnej komórek zwierzęcych. To, że reakcja odwodorowania wymaga obecności tlenu cząsteczkowego oraz  $\text{NAD(P)H}$  znano już stosunkowo od dawna, jednakże do ostatnich lat nie znano obiegu tego procesu. Nie stwierdzono bowiem, aby odpowiednie hydroksykwas, lub tlenowe pochodne kwasów nasyconych stanowiły intermedyaty w procesie powstawania kwasów nienasyconych. Dla wyłączenia tego faktu wysuwano szereg hipotez. Badania przedstawione przez R. Sato i innych z Uniwersytetu w Osace (Japonia) wykazały, że powstawanie nienasyconych kwasów tłuszczowych zachodzi nie poprzez enzymatyczną hydroksylację (jak przypuszczano), a poprzez odmienny układ enzymatycznych. Mianowicie, z systemu enzymatycznego katalizującego syntezę kwasów nienasyconych w mikrosomach wątroby

wyodrębniono czynnik czuły na cjanek *cyjanide* — *sensitive factor* (CSF). Czynnik ten jest oksydazą i przeprowadza reakcję desaturacji *per se*, poprzez zużycie tlenu i redukujących równoważników pochodzących od NAD(P)H. Zaproponowano następujący schemat:



gdzie przejście elektronów z NAD(P)H do CSF zachodzi poprzez (fp<sub>1</sub>)—NADH—cytochrom b<sub>5</sub> reduktazę, (fp<sub>2</sub>)—NADH—cytochrom c reduktazę, oraz b<sub>5</sub>—cytochrom b<sub>5</sub>. Przez połączenie wyodrębnionych uprzednio z b<sub>5</sub> i fp<sub>1</sub> udało się zrekonstruować desaturazę zależną od NADH. Synteza tego białka CSF zachodzi na polisomach związanych z szorstkimi błonami endoplazmatycznego retikulum, skąd zostaje ono przeniesione na błonę szorstkiego, a następnie gładkiego endoplazmatycznego retikulum.

Stumpf (California, USA) podsumował badania nad procesami utleniania w tkankach roślinnych kwasów tłuszczowych, poprzez wprowadzenie do nich grupy hydroksylowej. Wyróżniono trzy drogi wprowadzenia grupy hydroksylowej do cząsteczki kwasu tłuszczowego. Pierwsza stanowi β-oksydację (zarówno w tkankach fotosyntetyzujących jak i nie fotosyntetyzujących). System enzymatyczny działa tutaj na kwasy tłuszczowe nie związane tioestrowo z CoA i o długości łańcucha nie mniejszej niż C<sub>14</sub>. Drugi system enzymatyczny znaleziony w wyciągach z avocado kieruje do powstania DL-α-hydroksykwasów i działa na kwasy tłuszczowe powiązane z CoA, o długości łańcucha C<sub>8</sub>—C<sub>12</sub>. W trzecim systemie (znalezionym tylko w nasionach *Ricinus communis*) występuje hydroksylaza właściwa (oksydaza o funkcji mieszanej), wymagająca obecności O<sub>2</sub> i NADH i działająca specyficznie na decylo-CoA.

Zagadnieniami związanymi z „ω” oksydacją kwasów tłuszczowych, kierującą do powstania odpowiednich kwasów dwukarboksylowych zajmowała się dość duża ilość badaczy. Reakcje utleniania kwasów tłuszczowych typu „ω” zachodzą we frakcji mikrosomalnej komórki i jak wiadomo wymagają obecności O<sub>2</sub> i NADPH. Hydroksykwasów występują jako intermediaty reakcji. W procesie tym występuje kilka białkowych komponentów, oprócz bowiem hydroksylazy właściwej, występuje NADP-cytochrom c reduktaza i cytochrom P-450. S. Orrenius, Å. Ellin i inni (Stockholm, Szwecja) wykazali, że w różnych tkankach zwierzęcych procesy te zachodzą w różnym stopniu (np. mikrosomy kory nadnercza nie przeprowadzają w ogóle tej reakcji).

Podobne reakcje hydroksylacji zachodzą również przy biosyntezie cholesterolu i kwasów żółciowych. Hydroksylacje tutaj są wysoce specyficzne, grupa OH ulega przyłączeniu do określonego ściśle atomu węgla. Hydroksylacje w pozycji C-6α, C-6β, C-7, C-12 i C-24 zachodzą w mikrosomach i wymagają obecności cytochromu P-450. Hydroksylacja C-26 zachodzi także we frakcji mitochondrialnej. Referaty sympozjalne na te tematy wygłosili G. S. Boyd i K. E. Suckling (Edynburg, Anglia), oraz L. Björkhem i H. Danielson (Stockholm, Szwecja).

Właściwości enzymów włączonych w procesy hydroksylacji są od kilku lat przedmiotem badań M. J. Coona i jego zespołu.

Z kolei M. Katagiri i S. Takemori (Kanazawa, Japonia) wyodrębnili i oczyścili z systemu kierującego hydroksylacją 11-β-steroli w mitochondriach kory nadnercza trzy białkowe składniki. Są to: adrenodoksyna, NADPH adrenodoksyno reduktaza i cytochrom P-450.

Mechanizm działania cytochromu P-450 w mitochondriach kory nadnercza w hydroksylacji 11-β-steroli został przedstawiony przez D. T. Coopera, H. Schleyera i O. Rosenthala (Philadelphia, USA). Według tych autorów cytochrom P-450 w formie zredukowanej przyłącza początkowo cząsteczkę tlenu dając P-450 (Fe<sup>2+</sup>)O<sub>2</sub>. Kompleks ten nie jest jednak właściwym czynnikiem hydroksylującym. Hydroksylacja zachodzi dopiero w połączeniu ze zredukowaną formą adrenodoksyny.

### Biochemia struktur międzykomórkowych

Przedstawiono w ramach kolokwium A pięć wykładów oraz 46 doniesień. Tematyka wykładów była następująca: nowe tendencje w badaniach nad kolagenem; rozpoczęcie biosyntezy łańcuchów polisacharydowych tkanki łącznej; fizykochemiczne aspekty biologicznej roli polisacharydów pozakomórkowych; immunologiczne badania nad rozpadem makrocząsteczek zawartych w przestrzeniach międzykomórkowych; błędy metabolizmu glikozaminoglikanów. Doniesienia dotyczyły podobnej tematyki.

W badaniach dotyczących hydroksylazy prolinowej, jednego ze swoistych enzymów w biosyntezie kolagenu stwierdzono, że hydroksylacja zachodzi na rosnących łańcuchach  $\alpha$ -kolagenu w czasie a być może po zakończeniu translacji (Udenfried, USA). Na szczególną uwagę zasługuje stwierdzenie, że hydroksylacja indywidualnych reszt prolinowych jest reakcją wysoce selektywna. W hodowlach fibroblastów stwierdzono metodą immunologiczną obecność nieczynnego proenzymu wymagającego do swej aktywacji znacznych ilości mleczanu ( $10^{-3}M$ ) oraz niewielkich ilości askorbinianu ( $10^{-6}M$ ), (Udenfriend), co jest wynikiem szczególnie ciekawym.

### Struktura i funkcja białek

Sekcja ta była najobszerniejszą — pod względem liczby referatów i komunikatów — sekcją Kongresu. Złożyło się na nią: 20 referatów sympozjalnych i około 470 komunikatów (w tym 3 z Polski).

Na tematyce referatów sympozjalnych zaważył, dający się wyraźnie odczuć w ostatnich latach, wpływ osiągniętych za pomocą rentgenograficznych metod badania struktury białek. Znaczna część referatów oparta była bezpośrednio na wynikach tych badań, w wielu zaś dalszych referatach dane rentgenograficzne używano dla weryfikacji innych metod. Tendencja ta zaznaczała się wyraźnie, pomimo, iż bezpośrednio przed Kongresem miało miejsce w Sztokholmie specjalne sympozjum poświęcone strukturze makrocząsteczek biologicznych, na którym przedstawiono najważniejsze osiągnięcia w dziedzinie rentgenografii białek.

Neurath, w referacie otwierającym sympozjum, przedstawił poglądy na istotę procesów aktywacji zymogenów. Omówiwszy szereg danych strukturalnych i kinetycznych wysunął przypuszczenie, że w zymogenach proteaz serynowych mechanizm rozszczepiania wiązań w substratach jest w pełni funkcjonalny, brak jest natomiast uformowanego miejsca wiązania substratów. Wydaje się, że w prokarboksypeptydazie A sytuacja może być odwrotna.

Strout i Krieger oraz Kraut przedstawili w swych referatach poglądy na mechanizmy działania proteaz serynowych, w oparciu o dane strukturalne proteaz i ich kompleksów z różnego rodzaju substratami i inhibitorami.

Grupa badaczy z Uppsali przedstawiła wyniki badań rentgenograficznych dehydrogenazy alkoholowej z wątroby konia. Uzyskano rozdzielczość 2,9Å, co pozwoliło na dobre rozeznanie struktury enzymu i rozmieszczenie koenzymów w drobinie białka.

H. C. Watson omówił serię prac swej grupy z Bristolu nad strukturą szeregu enzymów glikolitycznych, jakkolwiek z rozdzielczością nie pozwalającą jeszcze na zorientowanie się we wszystkich szczegółach ich budowy, zaś Blake i Evans omówili dokładniej strukturę kinazy fosfoglicerynianowej z mięśni konia. Z rozdzielczością 5,5Å została zbadana transkarbamylaza asparaginianowa — wyniki pracy harwardzkiej grupy krystalografów przedstawił Lipscomb.

Dzięki zastosowaniu innych technik: NMR i badań kinetycznych, poznano bliżej mechanizm działania fosfoglukomutazy (Ray jr.), drożdżowej kinazy fosfoglicerynianowej (Larsson-Rażnikiewicz) oraz mechanizm tworzenia wtórnej struktury w cząsteczce nukleazy stafilocokowej (Schechter).

Perutz przedstawił w swoim referacie mechanizmy oddziaływań pomiędzy jonami żelazowymi skoordynowanymi z hemem, a łańcuchami polipeptydowymi hemoglobiny i *vice versa*. Zmiana utlenowania (i spinu) jonu żelazowego wywołuje zmianę jego promienia jonowego i przemieszczenie względem hemu, a to pociąga za sobą zmiany w położeniu sąsiadującej z żelazem reszty histydyny; zmiana ta przenosi się na dalsze obszary cząsteczki białkowej.

Regulacji i organizacji procesów enzymatycznych poświęcono referaty Raddy, Hessa oraz Stadtmana. W końcowym referacie sympozjum Koshland jr. przedstawił aktualne poglądy na temat podstawowych procesów katalizy enzymatycznej.

Mnogość krótkich komunikatów należących od tej sekcji uniemożliwia pełniejsze przedstawienie ich treści, można jedynie wspomnieć o pewnych grupach komunikatów, wskazujących jakie dziedziny były badane szczególnie intensywnie — jeśli liczba komunikatów może tu być odpowiednią miarą.

Kilka komunikatów było poświęconych szczegółowym wynikom strukturalnych badań rentgenograficznych, a mianowicie: kompleksów chymotrypsyny z różnymi inhibitorami (Blow), heksokinazy drożdżowej (Steitz i wsp.), izomerazy fosfotrioz (Phillips i wsp.), dehydrogenazy 3-fosfogliceraldehydu (Rossman i wsp.) oraz konkanawaliny A. Strukturę tego ostatniego białka zademonstrowano ponadto na dobrze zrobionym filmie instruktażowym, który przedstawiono wraz z innymi, na specjalnym seansie.

Autorzy kilku komunikatów zajmowali się teoretycznymi aspektami tworzenia specyficznej konformacji białek. Wetlaufer przedstawił pogląd, że struktura rodzimych białek jest metastabilną i to jest przyczyną szybkiego metabolizmu tych związków. Craig i Harris stosując syntetyczne, modelowe oligopeptydy wykazali bardzo duże różnice w konformacji występujące przy niewielkich zmianach struktury pierwszorzędowej. Można było również zauważyć postęp w eksperymentalnych metodach badań konformacji białek, poza — omawianymi już — metodami rentgenograficznymi. Woody przedstawił teorię dichroizmu kołowego helikalnych polipeptydów w dalekim ultrafioletcie (140—200nm). Yang i Chen opisali nowe podejście do ustalenia drugorzędowej struktury białek z danych dichroizmu kołowego. Nagy zastosował badania linearnego dichroizmu do badania polipeptydów i białek włókienkowych.

Badania mechanizmów działania chymotrypsyny i trypsyny było przedmiotem doniesień Fershta, Laskowskiego jr., Bosshardta, Maurera i kilku innych badaczy.

Około 20 komunikatów było poświęconych hemoglobinie. Donoszono o zjawiskach alosterycznej regulacji, badano kinetykę wiązania tlenu, optyczne właściwości globiny i jej fermentów wiążących hem. Kilka komunikatów dotyczyło wiązania jonów z hemoglobina i efektu Bohra. Przedstawiono wyniki badań patologicznych hemoglobin, hemoglobin niższych gatunków zwierząt oraz hemoglobin roślinnych.

Parę komunikatów dotyczyło właściwości szeregu proteaz roślinnych, inhibitorów proteolizy wydzielonych z materiału roślinnego i fitohemaglutynin.

Enzymem, którym zajmuje się wielu badaczy jest dehydrogenaza 3-fosfogliceraldehydu. Oprócz badań rentgenograficznych (Rossman) przedstawiono komunikaty o właściwościach tego enzymu otrzymywanego z różnych źródeł: erytrocytów, roślin (wymaga NADPH jako koenzymu), *Escherichia coli* — gdzie stwierdzono ciekawe efekty alosteryczne, a także z bakterii termofilnych. Szczegółowe badania kinetyki i struktury innych enzymów otrzymywanych z drobnoustrojów termofilnych były przedmiotem kilku doniesień. Struktura tych białek budzi zainteresowanie, chodzi bowiem o wyjaśnienie przyczyn ich dużej stabilności termicznej.

Duże zainteresowanie budzi ciągłe kinaza pirogronianowa. Doniesiono o zbadaniu pierwszorzędowej struktury tego enzymu z drożdży; badano jego alosteryczną regulację przez fenyloalaninę; zwrócono uwagę, że kinaza pirogronianowa z hepatoma ma



inne właściwości niż enzym pochodzący z macierzystej, normalnej wątroby. Wykazano istnienie dwóch form tego enzymu u *Streptococcus fecalis*.

Widać było, iż duży wkład pracy został włożony w badania anhidrazy węglanowej, fosfofruktokinazy i aminotransferazy asparaginianowej. Na uwagę zasługują też komunikaty dotyczące kinetyki karboksypeptydazy A, oraz badania nad hydrofobowym miejscem wiążącym w albuminie surowicy.

Ogólnie, obraz aktualnych badań w dziedzinie struktury i funkcji białek można — na podstawie referatów i doniesień kongresowych — scharakteryzować następująco: Rentgenograficzne badania dały nam solidne podstawy wiedzy o strukturze szeregu białek globularnych. W kilku przypadkach badania te wniosły wiele do poznania prawdopodobnych mechanizmów reakcji enzymatycznych. Wiele innych, prostszych metod można zweryfikować w oparciu o te dane. Arsenał środków, takich jak: metody NMR i EPR, spektroskopia, spektropolarymetria i wiele innych, pozwala nam na bazie zmian zachodzących w strukturach białkowych w związku z ich funkcjami biologicznymi. Badania kinetyczne enzymów przy użyciu różnorodnych substratów i inhibitorów, naturalnych i syntetycznych, umożliwiają wyciągnięcie wielu wniosków na temat mechanizmów aktywności biologicznej. Pozostaje jednak na tym polu jeszcze wiele do zrobienia.

#### **Polipeptydy o właściwościach hormonalnych, toksycznych i antybiotycznych — przedyskutowano w ramach specjalnego kolokwium**

Podobnie jak inne kolokwia i to składało się z pięciu wykładów i pewnej liczby doniesień, których w tym przypadku było 48. W wykładach omówiono następujące tematy: ulepszenie metody oznaczania struktury pierwszorzędowej polipeptydów; trójwymiarowa struktura insuliny; struktura i biologiczne działanie peptydów zawierających alfa, beta-nienasycone aminokwasy; toksyczne peptydy muchomora; molekularny mechanizm działania hormonów peptydowych. A oto tytuły niektórych doniesień: struktura i biosynteza insuliny w tkankach prymitywnych kregowców; oczyszczanie i właściwości czynnika podwzgórzowego regulującego wydzielanie hormonu wzrostowego z przysadki; izolowanie i charakterystyka polipeptydu z błony śluzowej mającego zdolność uwalniania insuliny, badania nad konformacją hormonu luteinizującego, wiązanie oksytocyny w tkance gruczołu mlekowego szczura itd.

#### **Immunochemia**

W czasie sympozjum wygłoszono 20 referatów przez zaproszonych, wybitnych badaczy z dziedziny immunochemii. Oprócz referatów wygłoszono lub przedstawiono w formie plakatowej 82 komunikaty, w tym 3 z Polski. Tematem sympozjum były zagadnienia struktury immunoglobulin, mechanizmu reakcji antygen-przeciwciało, różnicowania się przeciwciał, mechanizmu odpowiedzi immunologicznej, oddziaływania antygenów z komórkami oraz komórek immunologicznie kompetentnych między sobą.

Szczególnie interesujące okazały się wyniki badań struktury fragmentów Fab' z ludzkich immunoglobulin IgG, uzyskanych od pacjentów z objawami szpiczaka. Badania te prowadzone przez Popjaka i wsp. (USA) za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej, przy zdolności rozdzielczej 2,8Å wykazały, że struktura przestrzenna oraz pofałdowanie łańcuchów w obszarach globularnych  $V_L$  i  $C_L$  były podobne do obszarów  $V_H$  i  $C_H$ . Stwierdzono również duże podobieństwo strukturalne obszarów  $V_L$  i  $V_H$  do  $C_L$  i  $C_H$ . Porównanie wyników tych badań z wynikami oznaczeń sekwencji aminokwasowych wykazało, że w regionach odpowiadających miejscom wiążącym w przeciwciałach znajdują się obszary hydrofobowe zawierające reszty tryptofanu i tyrozyny.

Oznaczenia sekwencji aminokwasowych C-końcowych odcinków ludzkich łańcuchów ciężkich  $\alpha$  i  $\mu$ , przeprowadzone przez Kehoe i wsp. (USA), wykazały istnienie dużej homologii sekwencji. Wyniki te tłumaczą możliwość istnienia reakcji krzyżowych między łańcuchami  $\alpha$  i  $\mu$ . Ci sami badacze stwierdzili, że pewne sekwencje aminokwasowe powtarzają się we wszystkich obszarach  $C_H^2$  łańcuchów  $\gamma$  izolowanych z króliczych i ludzkich IgG. Fakt ten może się wiązać z aktywnością cytofilną immunoglobulin.

Jednym z najbardziej interesujących problemów w immunologii jest problem zmian konformacyjnych w drobinie przeciwciała przy oddziaływaniu z antygenem. Występowanie zmian konformacyjnych zachodzących we fragmencie Fab, w obszarze lub w pobliżu obszaru wiążącego, znajduje potwierdzenie w wynikach uzyskanych w wielu ośrodkach naukowych. Przekonywujące na to dowody przedstawiono w kilku komunikatach.

Froese i wsp. (Kanada) badali za pomocą pomiarów widm Ramana w świetle laserowym oddziaływania przeciwciała anti-DNP z haptenem dwunitrofenylowym (DNP), tłumacząc uzyskane wyniki zmianami konformacyjnymi w obszarze Fab. W podobny sposób tłumaczy się wyniki uzyskane przez Cathou i wsp. (USA) oraz Singera i wsp. (USA). Cathou i wsp. badali reakcję przeciwciała-hapten za pomocą pomiaru efektywności przenoszenia energii między chromoforem specyficznym przyłączonym do obszaru aktywnego w przeciwciele a chromoforem związanym z —SH grupą powstałą ze zredukowanego mostka —S—S— między łańcuchami ciężkimi. Wykazali oni, że obszary wiążące w przeciwciele znajdują się w odległości 81 Å od peptydu stykowego, praktycznie na końcu fragmentu Fab. Singer i wsp. badali oddziaływania przeciwciała-dwuwartościowy hapten za pomocą ultrawirowania. Zmiany konformacyjne w przeciwciele wykazał również Morawiecki i wsp. (Polska) badając reakcję antygen-przeciwciała za pomocą perturbacji rozpuszczalnikowych.

O możliwości występowania zmian konformacyjnych w obszarze fragmentu Fc w czasie reakcji antygen-przeciwciała brak jest dotychczas bezpośrednich dowodów eksperymentalnych. Pośredni dowód przedstawili Lisowski i wsp. (Polska), którzy badali oddziaływanie przeciwciała cytofilnych z makrofagami.

W ramach badań struktury glikoproteidów z krwinek ludzkich o aktywności M i N wyniki badań nad wyizolowanymi niskocząsteczkowymi glikopeptydami, wskazującymi aktywność N (Lisowska i wsp., Polska).

### Biochemia przekąźnictwa synaptycznego

W uwagach wstępnych Wdith Heilbronn (Szwecja), która przewodniczyła obradom, podkreśliła, że badania biochemiczne zjawisk zachodzących na synapsach są obecnie jednym z najbardziej pasjonujących zagadnień neurochemii. Mechanizm dotyczący magazynowania przekąźnika chemicznego (mediatora) w zakończeniach nerwowych oraz zjawiska uwalniania go do szczeliny synaptycznej są nadal niejasne. Również charakterystyka receptora wymaga dalszych badań. Tym zagadnieniom poświęcona była znaczna ilość referatów i doniesień kolokwialnych.

Wydaje się, że układ modelowy jakim są „sztuczne pęcherzyki synaptyczne” może w znacznym stopniu ułatwić wyjaśnienie procesu magazynowania a następnie wydzielania substancji przekąźnikowej (Karen Halle, Norwegia). „Sztuczne pęcherzyki synaptyczne” są to agregaty utworzone przez fosfolipidy oraz chromograninę A — białko charakterystyczne dla pęcherzyków synaptycznych pochodzących z zakończeń noradrenergicznych. Twory te zdolne są do wiązania znacznych ilości noradrenaliny oraz ATP.

Wyniki prac I. G. Morgana i wsp. (Francja) wskazują, że błony pęcherzyków synaptycznych różnią się składem białkowym i glikoproteidowym od plazmatycznych

blon synaptosomów (*synaptic plasma membrane*). Jednakże stwierdzili oni obecność białek i glikoproteidów charakterystycznych dla błon pęcherzyków synaptycznych również i we frakcji plazmatycznych błon synaptosomalnych. Autorzy sugerują, że dane te mogą świadczyć o fuzji tych dwóch typów błon w chwili uwalniania mediatora do szczeliny synaptycznej. Przypuszczenie to spotkało się z krytyką ze względu na możliwość zanieczyszczeń uzyskiwanych preparatów.

Izolacji i charakterystyce receptora cholinergicznego poświęcony był między innymi referat J. P. Changeux (Francja) oraz doniesienie E. Heilbronn i C. Mattsso (Szwecja) i J. Barrantesa (USA). Przy oczyszczaniu substancji receptorowej z organu elektrycznego niektórych ryb stosuje się solubilizację, a następnie chromatografię powinowactwa. Dyskusja dotyczyła głównie szczegółów metodycznych. Dużym osiągnięciem Changeux i wsp., którzy od kilku lat zajmują się tym zagadnieniem, jest całkowite oddzielenie receptora cholinergicznego od esterazy acetylocholinowej (AChE) enzymu rozkładającego mediator — acetylocholinę. Stwierdzili oni, że receptor cholinergiczny jest białkiem o budowie podjednostkowej. Jego skład aminokwasowy różni się od składu aminokwasowego AChE. Wydaje się więc, że hipotezę, w której utożsamiano miejsce receptorowe dla acetylocholin z centrum aktywnym AChE oraz poglądy, że miejsce receptorowe, aczkolwiek różne od centrum aktywnego AChE, znajduje się na tej samej cząsteczce białkowej należy odrzucić.

Pozostałe referaty i komunikaty dotyczyły przede wszystkim wpływu różnych substancji na procesy zachodzące na synapsach oraz własnościom enzymów związanych z syntezą i rozkładem mediatorów.

### Metody rozdzielania makromolekuł

W sekcji poświęconej metodyce rozdzielania substancji wielkocząsteczkowych przedstawiono 16 referatów sympozjalnych i ponad 90 komunikatów (w tym 2 z Polski).

W referatach sympozjalnych omówiono niektóre techniki rozdzielania, w których w ostatnich latach zaznaczył się szczególnie duży postęp. Porath przedstawił teoretyczne podstawy chromatografii powinowactwa, zwracając uwagę jaki wpływ wywierają stałe asocjacji pomiędzy składnikami ruchomymi i nieruchomymi układu na sposób rozdziału mieszanin. Wilček omówił zalety nowego typu nośników dla chromatografii powinowactwa. Jest to Sepharosa z którą związane są kowalencyjnie różne poliaminokwasy; do nich z kolei można łatwo przyłączyć specyficzne ligandy. Nośniki takie są bardziej trwałe i uniwersalne od stosowanych dotychczas.

Hjerten zwrócił uwagę, iż białka różnią się stopniem hydrofobowości swoich powierzchni. Wysoce hydrofobowe są na ogół białka błon komórkowych. Można wykorzystać tę cechę jako podstawę chromatograficznego rozdziału białek, eluując je z kolumn rozpuszczalnikami o zmieniającej się polarności.

Michaels oraz Hatęfi przedstawił możliwości rozdzielania makrocząsteczek za pomocą błon półprzepuszczalnych. W tej dziedzinie obserwuje się duży postęp dzięki wprowadzeniu błon o dużej przepuszczalności, a także o bardzo dużej powierzchni czynnej („*hollow fibers*”). Wielkości por są dokładnie określone; istnieją też możliwości dalszej regulacji przepuszczalności tych błon.

W referatach Waltera, Johanssona i Bowmana omawiano zagadnienia rozdziału makrocząsteczek pomiędzy dwie fazy będące roztworami polimerów. Istnieją liczne zastosowania i modyfikacje tej techniki. Zmieniając warunki eksperymentu (np. przez zmiany pH) można uzyskiwać rozdziały substancji nawet bardzo zbliżonych swoimi właściwościami.

Rilbe i Vesterberg przedstawili postępy w technikach ogniskowania izoelektrycznego. Wprowadzenie krótkich kolumn o dużych gradientach stężeń, lub stosowanie

żeli jako czynników stabilizujących spowodowało znaczne skrócenie czasu i wiele innych udogodnień w tej metodyce.

Zagadnieniom rozdzielania makrocząstek i fragmentów subkomórkowych za pomocą ultrawiwowania w gradientach gęstości poświęcono referaty Vinograda, de Duve oraz Wattiaux, zaś Springer i Schachman omówili technikę analitycznego ultrawiwowania różnicowego. Referat Tanforda łączył zagadnienia rozdzielania białek z zagadnieniami konformacji białek i oddziaływania czynników denaturujących.

Krótkie komunikaty zawierały doniesienia na temat rozdzielania i oczyszczania białek, kwasów nukleinowych, komórek i składników komórkowych, a także substancji niskocząsteczkowych o znaczeniu biologicznym. Niektóre komunikaty zawierały dane na temat nowych lub zmodyfikowanych technik, w innych pracach posługiwano się tradycyjnymi metodami. Technika, która znalazła bardzo szerokie zastosowanie jest chromatografia powinowactwa. Przy jej pomocy rozdzielono wiele enzymów, stosując związane substraty lub ich analogi, inhibitory bądź koenzymy; wydzielono receptory estradiolu z komórek macicy, rozdzielano kwasy nukleinowe i inne substancje.

Nadal szeroko stosowaną techniką jest ultrawiwowanie w gradientach gęstości. Coraz częściej stosuje się tę technikę do rozdzielania komórek, organeli komórkowych, błon cytoplazmatycznych itp. Do rozdzielania takich materiałów stosuje się także techniki podziału między dwie fazy wodno-polimerowe.

Bardzo przydatne są nadal techniki elektroforetyczne. Coraz lepsze wyniki rozdzielania na skalę preparatywną uzyskuje się z pomocą ciągłej elektroforezy. Z drugiej strony, miniaturyzacja metod elektroforezy i elektroogniskowania w żelach pozwala na rozdział bardzo małych ilości substancji. Sporym postępem w tej dziedzinie jest zastosowanie fotoelektrycznego urządzenia skanującego kolumny elektroforetyczne w ultrafioletcie. Pozwala to na śledzenie procesów migracji elektroforetycznej i znacznie ułatwia wyznaczanie parametrów badanych substancji. Inne ciekawe modyfikacje technik elektroforetycznych to: zastosowanie bardzo wysokich spadków napięcia w końcowej fazie elektroogniskowania, oraz zastosowanie pulsującego napięcia do elektroforezy.

*J. Barańska, T. Chojnacki, L. Działoszyński,  
E. Lisowska, J. Lisowski, A. Morawiecki,  
J. Skangiel-Kramska, A. B. Wojtczak, L.  
Wojtczak, W. Zagórski, Z. Zielińska, E. Zu-  
Wojtczak, W. Zagórski, Z. Zielińska,  
E. Zubrzycka*

## Międzynarodowe Sympozjum

na temat „Biochemiczne aspekty funkcji nerki”

Gdańsk 2—5.IX.1973 r.

Pierwsze Sympozjum na temat „Biochemicznych aspektów funkcji nerki” odbyło się przed trzema laty w Austrii. W obradach tego Sympozjum wzięło udział 92 osoby, w tym 40 uczestników z zagranicy, reprezentujących ośrodki naukowe Anglii, Austrii, Belgii, Bułgarii, Berlina Zachodniego, Czechosłowacji, Irlandii, Kanady, NRF, Szwajcarii i USA.

Obrady drugiego Sympozjum odbywały się w Ratuszu Staromiejskim w Gdańsku.

Otwarcia Sympozjum dokonał Stefan Angielski, Przewodniczący Komitetu Naukowo-Organizacyjnego Sympozjum. Wykład inauguracyjny pt. „Pośrednie i bezpośrednie wykorzystanie energii metabolicznej w transporcie kanalikowym” — wygłosił *Karl Ullrich* (Instytut Max-Plancka, NRF).

Program Sympozjum obejmowała następujące tematy;

- 1) Specyfika metabolizmu różnych części nefronu;
- 2) Funkcja i metabolizm nerki w kwasicy i alkalozie;
- 3) Wpływ inhibitorów i diuretyków na funkcję i metabolizm nerki;
- 4) Związek między metabolizmem i transportem sodu w nerce;
- 5) Hormonalna regulacja funkcji i metabolizmu nerki.

Wygłoszono pięć następujących referatów plenarnych:

— „Swoistość przemian w różnych częściach nefronu” (*U. Dubach*, Szwajcaria, *U. Schmidt*, NRF);

— „Regulacja przemian nerki przy zmianach równowagi kwasowozasadowej” (*D. C. Simpson*, USA);

— „Badania metaboliczne w doświadczalnej kwasicy kanalikowej” (*S. Angielski*, Polska);

— „Przemiana lipidów w nerce: związek z transportem sodu” (*M. Hohenegger*, Austria);

— „Nerka jako narząd wydzielniczy” (*F. Kokot*, Polska).

W czasie obrad wygłoszono 39 doniesień, w tym 10 z ośrodków polskich i 29 z ośrodków zagranicznych. Wszystkim wystąpieniom towarzyszyła ożywiona dyskusja, której czas nie był ograniczany.

Spotkanie towarzyskie uczestników Sympozjum odbyło się w Motelu we Wdzydzach Kiszewskich, dało ono możliwość do nawiązania osobistych kontaktów.

Wszyscy uczestnicy uznali Sympozjum za dobrą okazję do wymiany myśli i doświadczeń ludzi zajmujących się badaniem funkcji i metabolizmu nerki — problemu znajdującego się w centrum zainteresowań biochemików, biofizyków, fizjologów i klinicystów. Uznano za celowe organizowanie tego rodzaju spotkań w latach przyszłych. Następne Sympozjum odbędzie się w roku 1975 w Bazylei, organizatorem będzie *U. Dubach*. Sympozjum było sukcesem naukowym. Uczestnicy Sympozjum opuszczali Gdańsk pod wrażeniem piękna tego miasta i sprawności organizacyjnej całej imprezy.

*S. Angielski*



## KOMUNIKAT

### Uchwały Komisji Słownictwa Biochemicznego

#### Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

podjęte na posiedzeniu w dniu 11.IX.1973 w Białymstoku

1) Skróty nazw aminokwasów, cukrów, zasad purynowych i pirymidynowych należy wyprowadzać z nazw angielskich — zgodnie z zaleceniami Komisji Nomenklatury Biochemicznej IUPAC-IUB z 1965 r.

2) Należy dążyć do konsekwentnego stosowania liczebników łacińskich lub greckich w nazwach związków chemicznych (np. mono-, di-, tri-, tetra-). Dopuszcza się stosowanie liczebników polskich w pracach o charakterze przeglądowym i popularnym.

3) Zaleca się nazwę *heliks* (przymiotnik — *helikalny*) dla spirali przestrzennej.

4) Zaleca się potoczną nazwę kwas *sjałowy* (a nie *sjałinowy*) dla kwasu N-acetyloneuraminowego.

5) Zaleca się stosowanie nazwy kwas *foliowy*, anion — *folian*, nie kwas folowy i folan.

6) Zaleca się nazwę *izoenzym*, a nie *izozym*.

7) Dopuszczalna jest nazwa węgiel *chiralny* zamiast węgiel asymetryczny w związkach organicznych, należy jednak objaśnić znaczenie tej nazwy w każdym tekście.

8) Dopuszczalna jest nazwa *lokant* na określenie liczby oznaczającej pozycję podstawnika w nazwach związków chemicznych.

## SPIS TREŚCI

Tadeusz Szczepkowski 1916—1973, (W. Ostrowski) . . . . .	215
P. Węgleński — Genetyczna regulacja metabolizmu argininy u grzybów	219
A. Kaliński, T. Mężykowski, A. Jerzmanowski — Badania nad strukturą nukleohistonu . . . . .	243
M. M. Jeżewska — Mechanizm i rola oksydoreduktaz ksantynowych . . . . .	259
J. Śliwowski — Mechanizmy cyklizacji skwalenu do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych . . . . .	281
I. Z. Siemion — Spektroskopia Ramana w badaniach struktury białek . . . . .	303
J. Skierczyńska — Elektryczne właściwości błon komórkowych . . . . .	317
<b>Sprawozdania:</b>	
9-ty Międzynarodowy Kongres Biochemii, Sztokholm 1—7 lipiec 1973 . . . . .	333
Międzynarodowe Sympozjum n.t. „Biochemiczne aspekty funkcji nerki”, Gdańsk 2—5 wrzesień 1973 (S. Angielski) . . . . .	350
<b>Komunikat:</b>	
Komisji Słownictwa PTBioch. . . . .	352



# POSTĘPY BIOCHEMII

September 1974

## ARTICLES IN POLISH

Volume 20

Number 3

Tadeusz Szczepkowski (1916—1973)—Obituary notice ( <i>W. Ostrowski</i> ) . . . . .	215
P. Węgleński — Genetic Regulation of Arginine Metabolism in Fungi (Dept. Genet. University of Warsaw, Warsaw) . . . . .	219
A. Kaliński, T. Mężykowski, A. Jerzmanowski — Studies on Structure of Nucleohistone (Inst. Biochem. University of Warsaw, Warsaw, Inst. Hematol., Warsaw) . . . . .	243
M. M. Jeżewska — Mechanism of Action and Role of Xanthine Oxidoreductases (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warsaw) . . . . .	259
J. Śliwowski — Mechanisms of Squalene Cyclization to Tetra- and Pentacyclic Triterpenes (Inst. Biochem., University of Warsaw, Warsaw) . . . . .	281
I. Z. Siemion — Raman Spectroscopy in Investigation of Protein Structure (Inst. Chem., University of Wrocław, Wrocław) . . . . .	303
J. Skierczyńska — Electrical Characteristics of Cell Membranes (Inst. Phys., University of Lublin, Lublin) . . . . .	317
Meeting Reports:	
9 <sup>th</sup> International Congress of Biochemistry, Stockholm 1—7 July 1973 . . . . .	333
International Symposium of Biochemical Aspects of Kidney Functions ( <i>S. Angielski</i> ) . . . . .	350
Communication . . . . .	352



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 przedstawiioną 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. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 276, (1) np.

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

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autor(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią 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 użytym 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

Tadeusz Szczepkowski 1916—1973, (W. Ostrowski) . . . . .	215
P. Węgleński — Genetyczna regulacja metabolizmu argininy u grzybów . . . . .	219
A. Kaliński, T. Mężykowski, A. Jerzmanowski — Badania nad strukturą nukleohistonu . . . . .	243
M. M. Jeżewska — Mechanizm i rola oksydoreduktaz ksantynowych . . . . .	259
J. Śliwowski — Mechanizmy cyklizacji skwalenu do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych . . . . .	281
I. Z. Siemion — Spektroskopia Ramana w badaniach struktury białek . . . . .	303
J. Skierczyńska — Elektryczne właściwości błon komórkowych . . . . .	317
Sprawozdania:	
9-ty Międzynarodowy Kongres Biochemii, Sztokholm 1—7 lipiec 1973 . . . . .	333
Międzynarodowe Sympozjum n.t. „Biochemiczne aspekty funkcji nerki”, Gdańsk 2—5 wrzesień 1973 (S. Angielski) . . . . .	350
Komunikat:	
Komisji Słownictwa PTBioch. . . . .	352