

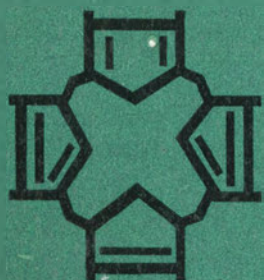
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

PSTBAH 24 (3)  
289-424 (1978)

1978

tom 24 nr 3



*Pw*

PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<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 „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów 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; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

**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, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim), oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

**Strona tytułowa** (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) 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 obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. 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. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. 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).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

*Dr. Wojciech Rode*

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1978 TOM 24 ZESZYT 3

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Prób 24(3)  
(289-424) (1978)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Zastępca: W. Ardelt (Warszawa)

Sekretarz: I. Szumiel (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Bagdasarian (Warszawa), M. Choraży (Gliwice), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), J. Gregorczyk (Szczecin), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Legocki (Poznań), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

## SEKRETARZ REDAKCJI

M. Balińska

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1978

Nakład 2.260 (2.160+100)

Oddano do składania 19.IV.78

Ark. wyd. 10,25, ark. druk. 8,5

Podpisano do druku w sierpniu 1978 r.

Pap. druk. sat. kl. III, 71 g, 70×100

Druk ukończono w sierpniu 1978 r.

Zam. nr 612/78 S-103

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

MARIA MAGDALENA JELEŃSKA \*)

## Glikozylacja kolagenu

### Glycosylation of Collagen

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Reszty cukrowe kolagenu
- III. Miejsce glikozylacji kolagenu w komórce
- IV. Enzymy biorące udział w glikozylacji
- V. Mechanizm glikozylacji kolagenu
- VI. Koncepcje dotyczące roli reszt cukrowych w kolagenie

#### Contents

- I. Introduction
- II. Sugar residues of collagen
- III. Localisation of glycosylation
- IV. Enzymes engaged in glycosylation
- V. Mechanism of collagen glycosylation
- VI. Suggestions concerning the role of sugar residues in collagen

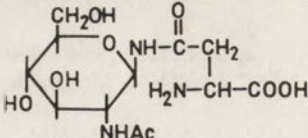
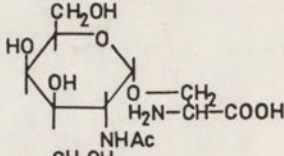
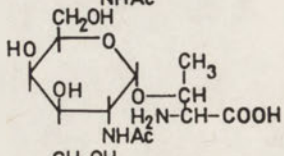
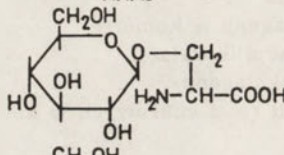
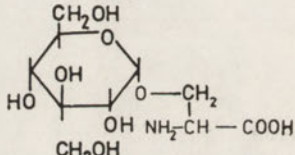
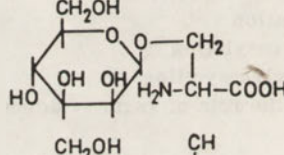
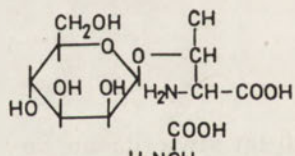
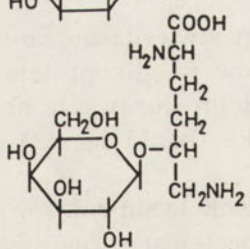
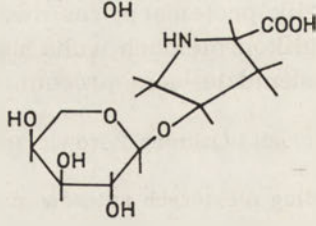
#### I. Wstęp

W ciągu ostatnich 10 lat stwierdzono, że większość białek występujących w organizmach ssaków to glikoproteidy. Należą do nich niektóre białka osocza, białka wydzielin śluzowych, hormony, enzymy, białka błony komórkowej oraz białka tkanki łącznej (kolagen i proteoglikany \*\*) substancji podstawowej).

W przyrodzie występuje około stu cukrów prostych, lecz tylko dziewięć z nich znaleziono w glikoproteidach, zaś dwa spośród nich w kolagenie. Zawartość cukrów w glikoproteidach waha się od ułamków procenta (niektóre kolageny) do osiemdziesięciu procent (substancje grupowe krwi).

\*) Dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, ul. Do-rodna 16, 03-195 Warszawa.

\*\*) Proteoglikany według niektórych autorów można zaliczyć do grupy glikoproteidów (1).

Wiązanie	Budowa	Występowanie
<u>N-glikozydowe</u> N-acetylglikozaaminylo- asparagina	 <p>The structure shows a glucose ring with a hydroxyl group at C2 and a hydroxymethyl group at C6. The C6 oxygen is linked to a phosphate group, which is further linked to a serine residue (H2N-CH(CH2-COOH)-COOH). The C2 nitrogen is acetylated (NHAc).</p>	bardzo częste, m.in.: białka osocza rybonu- kleaza, białka jaja
<u>O-glikozydowe</u> N-acetylgalaktozaaminylo- seryna	 <p>The structure shows a galactose ring with a hydroxyl group at C2 and a hydroxymethyl group at C6. The C6 oxygen is linked to a phosphate group, which is further linked to a serine residue (H2N-CH(CH2-COOH)-COOH). The C2 nitrogen is acetylated (NHAc).</p>	mucyny, substancje grupowe krwi, gliko- proteidy błon, immuno- globuliny, fetuina
lub		
- treonina	 <p>The structure is similar to the first one, but the serine residue has a methyl group (CH3) attached to its alpha carbon.</p>	
ksylozylo-seryna	 <p>The structure shows a xylose ring with a hydroxyl group at C2 and a hydroxymethyl group at C6. The C6 oxygen is linked to a phosphate group, which is further linked to a serine residue (H2N-CH(CH2-COOH)-COOH).</p>	proteoglikany
galaktozylo-seryna	 <p>The structure shows a galactose ring with a hydroxyl group at C2 and a hydroxymethyl group at C6. The C6 oxygen is linked to a phosphate group, which is further linked to a serine residue (H2N-CH(CH2-COOH)-COOH).</p>	kolagen naskórka glisty ludzkiej
mannozylo-seryna	 <p>The structure shows a mannose ring with a hydroxyl group at C2 and a hydroxymethyl group at C6. The C6 oxygen is linked to a phosphate group, which is further linked to a serine residue (H2N-CH(CH2-COOH)-COOH).</p>	inwertaza z drożdży, glukoamylaza z Aspergillus niger
mannozylo-treonina	 <p>The structure is similar to the previous one, but the serine residue has a methyl group (CH3) attached to its alpha carbon.</p>	kolagen naskórka glisty ludzkiej
galaktozylo-hydroksylizyna	 <p>The structure shows a galactose ring with a hydroxyl group at C2 and a hydroxymethyl group at C6. The C6 oxygen is linked to a lysine residue (H2N-CH(CH2-CH2-CH2-NH2)-COOH).</p>	kolagen kręgowców
arabinozylo-hydroksyprolina	 <p>The structure shows an arabinose ring with a hydroxyl group at C2 and a hydroxymethyl group at C6. The C6 oxygen is linked to a proline residue (a five-membered ring with an NH group and a COOH group).</p>	ściany komórkowe roślin

Z łańcuchem polipeptydowym glikoproteidu mogą być związane pojedyncze reszty cukrowe, dwucukry (mucyny, kolagen), jak również złożone reszty heteropolicukrowe (glikoproteidy osocza). Z dwudziestu aminokwasów występujących w białkach tylko pięć bierze udział w tworzeniu wiązań z cukrami. Trzy z nich często występują w białkach: L-asparagina, L-seryna i L-treonina, podczas gdy dwa pozostałe: 4-hydroksy-L-prolina i 5-hydroksy-L-lizyna, są bardzo rzadko spotykane, a jedynie w kolagenie występują w większych ilościach. Dokładnie poznano dwa typy wiązań chemicznych łączących cząsteczki cukru z łańcuchem peptydowym. Są to wiązania N-glikozydowe i O-glikozydowe. Występowanie tych wiązań w różnych glikoproteidach zestawiono w tabeli 1. Ostatnio doniesiono o istnieniu trzeciego typu wiązania glikozydowego. Z błony erytrocytów oraz z moczu wyizolowano glikopeptydy zawierające reszty cukrowe związane wiązaniem S-glikozydowym z resztą cysteiny (2, 3). Zarówno konfiguracja wiązania cukier-cysteina, jak i dokładne jego umiejscowienie w cząsteczce nie zostało dotychczas zbadane. Jak widać z tabeli 1, w kolagenie występuje tylko wiązanie O-glikozydowe.

## II. Reszty cukrowe kolagenu

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że główna komponenta tkanki łącznej — kolagen — występuje w kilku genetycznie różnych odmianach. Wyizolowano cztery typy kolagenu wykazujące znaczny stopień homologii sekwencji aminokwasów, charakterystyczny obraz szerokokątowej dyfrakcji promieniowania X i typową podatność na działanie kolagenaz tkankowych (4,5, 6, 7, 8). Różnią się one w istotny sposób zawartością cukrowców i niektórych aminokwasów (Tabela 2).

Ostatnio wyróżniono dodatkowo kilka innych typów kolagenu (32, 33, 34, 35, 36, 37) nie są one jednak wystarczająco scharakteryzowane. Biologiczna rola kolagenów poszczególnych typów nie została dotychczas dokładnie wyjaśniona. W wielu tkankach stwierdzono współwystępowanie kolagenów różnych typów (10, 11, 16, 19, 20, 24, 25, 26, 38, 39, 40), zaś zachwianie tych wzajemnych proporcji zaobserwowano w kilku jednostkach chorobowych (41, 42). Wiadomo, także, że niektóre kolageny różnią się zdolnością agregacji płytek krwi (43).

Dotychczas nie stwierdzono czy zawartość cukrowców kolagenu może być czynnikiem istotnym w patogenezie chorób tkanki łącznej.

Jak już wspomniano, kolagen zawiera dwa rzadko występujące w innych białkach hydroksyaminokwasy: hydroksylizynę (Hyl) i hydroksyprolinę. Z pierwszym z nich są związane reszty cukrowe zarówno w kolagenie kręgowców jak i bezkręgowców. Wyjątek stanowi kolagen jedwabnika *Nematus ribessi* pozbawiony cukrów mimo obecności dużej liczby reszt hydroksylizyny. W organizmie tym nie znaleziono jednak glikozylotransferaz dla których kolagen jest substratem (44). Interesujące jest, że

Tabela 2

## Główne typy kolagenu

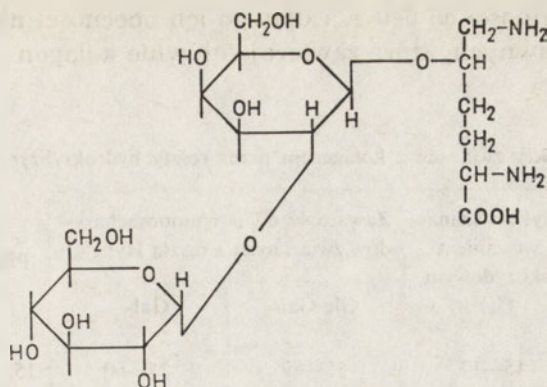
Typ kolagenu	Skład łańcuchów	Główne miejsce występowania	Zawartość cukrów (% wagowy) i niektórych aminokwasów* (liczba reszt/ /1000 reszt aminokwasowych)
I	$[\alpha^1(I)_2\alpha 2]$	skóra (9, 10, 11) ścięgna (9, 12) kości (9, 13) jelito (9) dentyna (14)	ok. 0,4% cukrów 5—7 reszt Hyl 90—102 reszt Hyp w tym 99% 4-Hyp; 1% 3-Hyp cysteiny brak
II	$[\alpha 1(II)]_3$	chrząstka (8, 15, 16, 17, 18, 19, 20)	4—5,5% cukrów 20—28 reszt Hyl 96—100 reszt Hyp w tym 99% 4-Hyp i 1% 3-Hyp cysteiny brak
III	$[\alpha 1(III)]_3$	skóra (21, 22, 23, 24, 25), jelito (9), ściany naczyń krwionośnych (9, 23, 26)	ok. 0,4% cukrów 5—7 reszt Hyl 118—125 reszt Hyp w tym 100% 4-Hyp 2—3 reszt Cys-SH
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$	blony podstawne (27, 28, 29, 30, 31)	10—12,5% cukrów 47—67 reszt Hyl 103—130 reszt Hyp w tym 75% 4-Hyp i 15% 3-Hyp 4—8 reszt Cys-SH

\* Zestawiono tylko te aminokwasy, których liczba jest najbardziej zróżnicowana w kolagenie poszczególnych typów.

hydroksyprolina zajmująca średnio co dziesiątą pozycję w łańcuchu polipeptydowym kolagenu, w białku tym nie tworzy wiązań glikozydowych. Wiązania hydroksyprolina-cukier znaleziono dotychczas tylko w ścianie naczyń roślin wyższych (45).

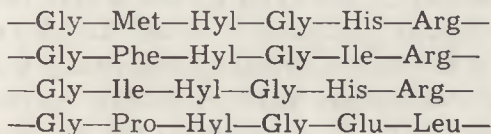
Reszty cukrowe związane z cząsteczką kolagenu, to glukoza i galaktoza. Po raz pierwszy wiązanie O-glikozydowe pomiędzy resztą galaktozy i hydroksylizyną zostało zidentyfikowane w kolagenie w roku 1966 przez Butlera i Cunnninghama (46). Nieco później Spiró (47) wyizolował z kolagenu pochodzącego z różnych tkanek, po jego uprzednim trawieniu kolagenazą bakteryjną i pronazą, glikopeptydy, w skład których wchodziła glukoza i galaktoza. We wszystkich badanych przez niego glikopeptydach stosunek galaktozy do glukozy był wyższy od jedności i w zależności od źródła kolagenu wynosił 1,4—3,9. Analiza wyizolowanych glikopeptydów wykazała, że zawierały one glukozo-galaktozę- i galaktozę — związane wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym z grupą hydroksylową hydroksylizyny natomiast glukoza połączona była z galaktozą wiązaniem  $\beta$ -1-2-0-glikozydowym (Ryc. 1).





Ryc. 1. Struktura O- $\alpha$ -D-glukopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-galaktopiranozylohydroksylizyny kolagenu (48).

Nie wszystkie reszty hydroksylizyny obecne w kolagenie biorą udział w wiązaniu glikozydowym. Wyizolowano dotychczas z różnych kolagenów kilka peptydów zawierających glikozylowane reszty hydroksylizyny (49, 50, 51, 52, 53). Przebadane peptydy mają cztery następujące sekwencje aminokwasów:



W czasie, gdy znane były tylko trzy pierwsze sekwencje uważano, że obecność argininy w czwartej pozycji od reszty lizyny jest niezbędna do glikozylacji reszt hydroksylizyny w łańcuchach polipeptydowych prokolagenu. Jednakże odkrycie czwartej sekwencji nie zawierającej argininy (49) podważyło słuszność tej hipotezy.

W tabeli 2 zestawiono zawartość cukrów w kolagenie poszczególnych typów. Najniższą zawartość cukrów (ok. 0,4%) stwierdzono w kolagenie typu I i III. W kolagenie chrząstki występuje parokrotnie wyższa liczba reszt cukrowych (4—5,5%), najwięcej ich zaś jest w kolagenie typu IV (10—12,5%). Różnice te wynikają z różnego stopnia glikozylacji reszt hydroksylizyny kolagenu. Stopień glikozylacji reszt hydroksylizyny oraz zawartość dwu i monocukrów w poszczególnych typach kolagenu zestawiono w tabeli 3:

Porównując liczbę wiązań glikozydowych w kolagenie poszczególnych typów można stwierdzić, że największa ich ilość występuje w kolagenie typu IV. Ponadto we wspomnianym kolagenie z hydroksylizyną związane są prawie wyłącznie dwucukry (glukoza-galaktoza), zaś w kolagenie pozostałych typów występuje duża zawartość monocukrów (galaktoza) związanych z resztami hydroksylizyny. Uważa się, że wysoka zawartość cukrów zakłóca proces powstawania włókien kolagenowych o regularnym

okresie powtarzalności co 640 Å i dlatego ich obecności nie stwierdza się w błonach podstawnych, które zawierają głównie kolagen typu IV (58).

Tabela 3

Cukry związane z kolagenem przez reszty hydroksylizyny

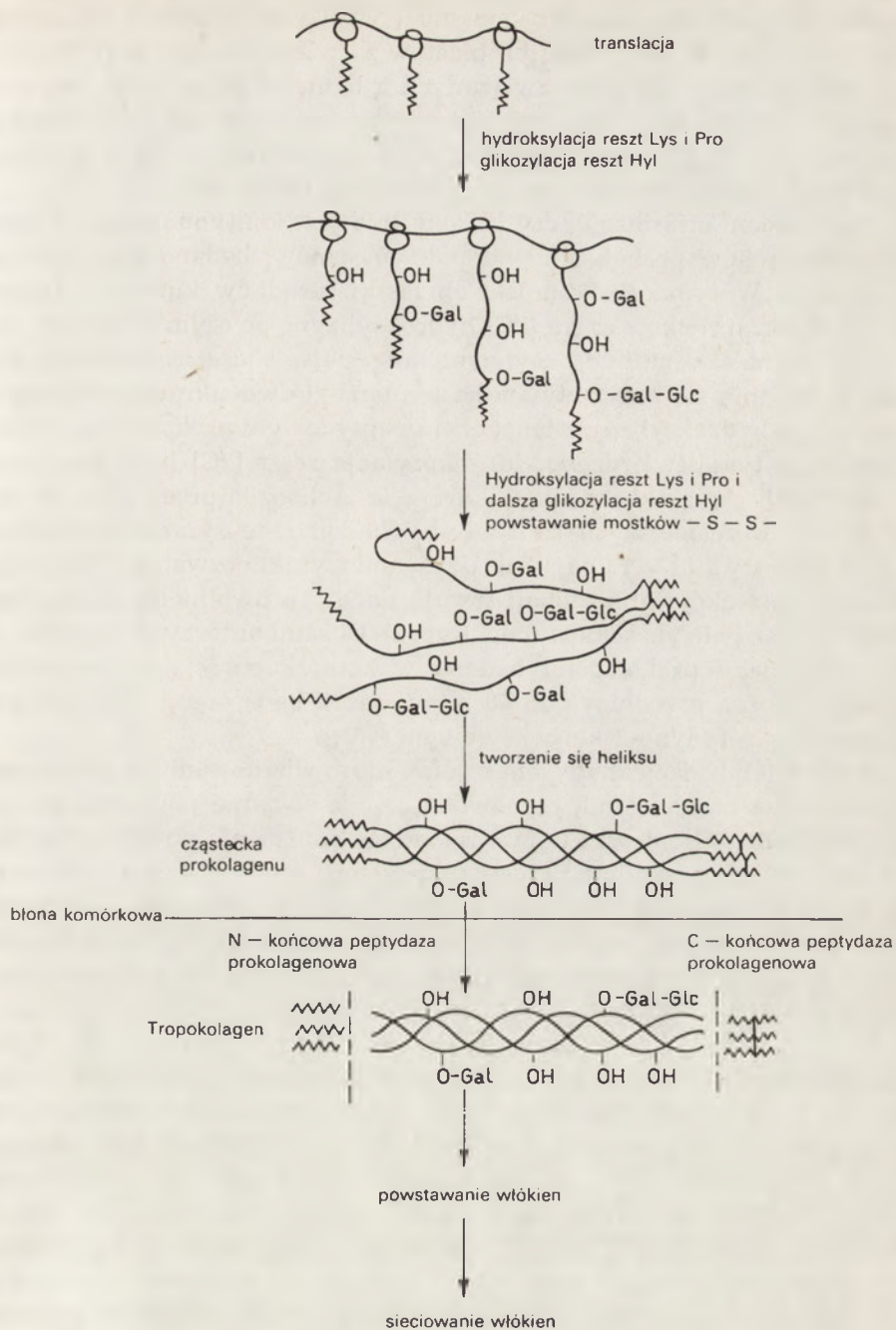
Typ kolagenu	Hyl związana wiązaniem glikozydowym (%)	Zawartość dwu- i monosacharydów związanych z resztą Hyl (%)		Piśmiennictwo
		Glc-Gal-	Gal-	
I	15—17	55—89	25—60	15, 47, 54
II	40—68	55—59	41—45	15, 16, 39
III	ok. 15	ok. 89	ok. 15	54a
IV	78—84	94—97	3—6	29, 31, 35 55, 56, 57

### III. Miejsce glikozylacji kolagenu w komórce

W piśmiennictwie polskim glikozylacja kolagenu została krótko omówiona — zgodnie z panującymi wówczas poglądami — przez Bańkowskiego i Gałasińskiego w artykule dotyczącym biosyntezy kolagenu (58a). W ostatnich latach poznano szereg dalszych faktów dotyczących glikozylacji tego białka, jednakże do tej pory proces ten nie został całkowicie wyjaśniony.

W czasie biosyntezy łańcuchów prokolagenu następuje ich modyfikacja, a mianowicie hydroksylacja niektórych reszt lizyny i proliny. Hydroksylacja oraz glikozylacja prokolagenu (omówione dokładnie poniżej) zostają zapoczątkowane na polirybosomach, a zakończone w momencie wytworzenia potrójnego heliksu cząsteczki prokolagenu. Powstanie tego heliksu jest zainicjowane przez wytworzenie mostków dwusiarczkowych spinających C-końcowe odcinki łańcuchów prokolagenu (12, 30, 59, 60, 61, 62). Zsyntetyzowane cząsteczki prokolagenu są wydzielane z komórki. W obszarze pozakomórkowym następuje odtrawienie skrajnych sekwencji aminokwasowych przez N- i C-peptydazy prokolagenu (63, 64). W wyniku tej reakcji powstają cząsteczki tropokolagenu agregujące do włókien kolagenowych, w których powstają następnie kowalencyjne wiązania poprzeczne (65, 66, 67). Kolejne etapy biosyntezy kolagenu przedstawiono na rycinie 2:

Pierwsza sugestia odnośnie miejsca glikozylacji prokolagenu w komórce pochodzi z końca lat 60-tych (68). Według autorów tej pracy glikozylacja tropokolagenu w obecności glikozylotransferaz występujących w błonach komórkowych następowała tuż przed jego wydzieleniem z komórki. Dopiero w parę lat później pojawiły się prace, których wyniki kazały od-



**Ryc. 2.** Hipotetyczny schemat biosyntezy kolagenu,  $\sim$  —N i —C końcowe odszczepialne fragmenty peptydowe. Grubą kreską zaznaczono mostki —S—S—.

rzucić powyższą koncepcję. Po podaniu [ $^{14}\text{C}$ ] lizyny do hodowli komórek ścięgien i chrząstek (69) oraz fibroblastów zarodków kurczęcia (70) znaleziono we frakcji rybosomów związanych z błonami wolną oraz związaną z galaktozą i glukozo-galaktozą [ $^{14}\text{C}$ ] hydroksylizynę. Wyniki te pozwalają przypuszczać, że glikozylacja prokolagenu rozpoczyna się na polirybosomach i tak właśnie została ona przedstawiona na rycinie 2.

Aby uzyskać informację, czy glikozylacja jest kontynuowana po odłączeniu łańcuchów prokolagenu od polirybosomów, badano czas trwania glikozylacji. W tym celu komórki chrząstki zarodków kurczęcia znakowano przez krótki okres czasu [ $^{14}\text{C}$ ] hydroksylizyną po czym do układu dodawano nieznakowaną hydroksylizynę (ang. *pulse-chase experiment*). Badano pojawienie się radioaktywności w mono- i dwucukrach związanych przez resztę hydroksylizyny z łańcuchem peptydowym prokolagenu. W doświadczeniu tym stwierdzono, że glikozylacja reszt [ $^{14}\text{C}$ ] hydroksylizyny w komórkach chrząstki zarodków kurczęcia zachodziła przez okres 20 minut (71). Z wcześniejszych badań było wiadomo, że synteza łańcuchów prokolagenu trwa 5—6 minut (72). Uzyskane wyniki pozwalają więc przypuszczać, że reakcje glikozylacji trwają nadal po uwolnieniu łańcuchów prokolagenu z polirybosomów (por. Ryc. 2). Ci sami autorzy stwierdzili, że czas glikozylacji prokolagenu badany w komórkach ścięgien zarodków kurczęcia można przedłużyć do 60 minut jeżeli będą one preinkubowane z kwasem L-azetydino-2-karboksylovym (73).

Związek ten będący analogiem proliny ulega wbudowaniu w jej miejsce do łańcuchów prokolagenu, co powoduje zahamowanie powstawania potrójnego heliksu. Ponieważ udowodniono, że opóźnienie powstawania potrójnego heliksu przedłuża proces glikozylacji, zaś czas trwania syntezy cząsteczki prokolagenu (74) jest bardzo zbliżony do czasu glikozylacji reszt hydroksylizyny, można przypuszczać, że glikozylacja prokolagenu zostaje zakończona w momencie powstania cząsteczki prokolagenu (por. Rys. 2).

Jak wspomniano poprzednio, zawartość hydroksylizyny i glikozylowanych reszt hydroksylizyny jest różna w kolagenie poszczególnych typów. Liczba reszt hydroksylizyny i glikozylowanych reszt hydroksylizyny jest znacznie wyższa w kolagenie typu II niż w kolagenie typu I, zaś najwyższa w kolagenie typu IV. Ostatnio stwierdzono, że czas powstawania cząsteczki prokolagenu typu I jest znacznie krótszy niż typu II, zaś typu II krótszy niż IV (30, 55, 74, 75, 76, 77). Być może różne zawartości hydroksylizyny i glikozylowanych reszt hydroksylizyny w kolagenie poszczególnych typów mają związek z różną szybkością syntezy cząsteczki prokolagenu.

#### IV. Enzymy biorące udział w glikozylacji

Wyizolowano dwa enzymy biorące udział w glikozylacji kolagenu (78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85). Pierwszy z nich to galaktozylotransferaza katalizująca przeniesienie reszty galaktozy związanej z urydynodwufosforem (UDP-galaktoza) na resztę hydroksylizyny kolagenu (E.C.2.4.1.50); drugi zaś enzym, glukozylotrasferaza, przenosi glukozę z UDP-glukozy na resztę O- $\beta$ -D-galaktozylohydroksylizyny kolagenu (E.C.2.4.1.66). Obydwa te enzymy występują głównie z szorstkim retikulum endoplazmatycznym (69). Wymagają one obecności jonów  $Mn^{++}$ , które mogą być częściowo zastąpione przez  $Mg^{++}$ ,  $Co^{++}$  i  $Ca^{++}$  (80, 83, 86, 87, 88).

Substratami galaktozylotransferazy mogą być kolagen i peptydy, w których reszty hydroksylizyny mają wolne grupy  $\epsilon$ -aminowe (84, 85). Ponieważ, jak to opisano poprzednio, kolejne glikozylacje zostają zakończone w momencie wytworzenia potrójnego heliksu, ostatnio stwierdzony fakt, że kolagen zdenaturowany jest znacznie lepszym substratem dla galaktozylotransferazy niż kolagen natywny (81, 86) jest łatwy do wytłumaczenia.

Galaktozylotransferazę izolowano z kilku źródeł tkanki łącznej (81, 82, 84, 85, 90). Najbardziej oczyszczony preparat tego enzymu (około 1000 razy) uzyskano z wyciągu zarodków kurczęcia (82).

Substratami glukozylotransferazy mogą być kolagen i peptydy pochodzenia kolagenowego zawierające galaktozylowane reszty hydroksylizyny, w których  $\epsilon$ -aminowe grupy są wolne (83, 91). Kolagen zdenaturowany podobnie jak dla galaktozylotransferazy również i dla glukozylotransferazy jest znacznie lepszym substratem niż kolagen natywny. Wskazuje na to zarówno wyższa liczba wbudowanych cząsteczek glukozy do zdenaturowanego kolagenu jak i istnienie zbieżności między krzywą denaturacji kolagenu a jego glikozylacją (91). Glikozylacja natywnego kolagenu, nieznaczna w temperaturze poniżej 37°C, gwałtownie wzrasta z podwyższeniem temperatury, a po przekroczeniu temperatury denaturacji utrzymuje się na stałym poziomie. Wyniki te potwierdzają wnioski z wcześniej przytoczonych danych wskazujących, że konformacja potrójnego heliksu zapobiega glikozylacji reszt galaktozy związanych z resztami hydroksylizyny prokolagenu.

Przez długi okres czasu nie udało się uzyskać wysokiego stopnia oczyszczenia glukozylotransferazy kolagenowej (79, 80, 83, 85, 91, 92). Dopiero zastosowanie chromatografii powinowactwa umożliwiło znaczny postęp w tej dziedzinie. Stosując kwas UDP-glukuronowy połączony za pośrednictwem odstępniaka z agarozą, oczyszczono glukozylotransferazę kolagenową z wyciągu zarodków kurczęcia około 3000 razy (78). Zastosowanie jako nośnika agarozy, do której przyłączono techniką aktywacji bromocyanem zdenaturowany kolagen, pozwoliło na oczyszczenie glukozylotransferazy z tego samego źródła około 5000 razy (82). Ostatnio M y l l y l ā

i wsp. (93) wyodrębnili z wyciągu zarodków kurczęcia jednorodny elektroforetycznie preparat glikozylotransferazy stosując kolejno obie chromatografie powinowactwa w połączeniu z konwencjonalną metodą oczyszczania przez wysalanie siarczanem amonu. Masę cząsteczkową wyizolowanego enzymu, który jest przypuszczalnie glikoproteidem, oceniono na 72 000. Ponadto wyniki analizy elektroforetycznej oczyszczonego preparatu enzymatycznego sugerują, że cząsteczka glikozylotransferazy jest zbudowana z jednego łańcucha polipeptydowego (93).

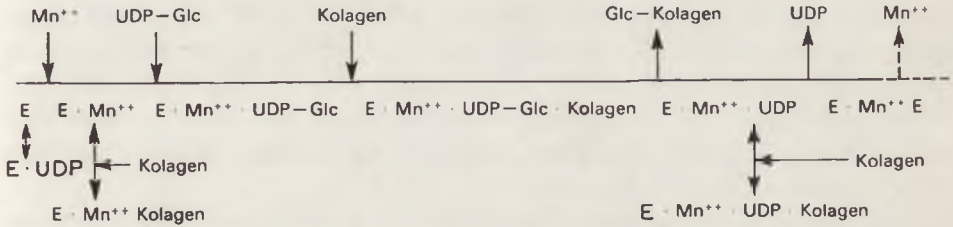
Posiadamy jak dotąd niewiele danych na temat aktywności glikozylotransferaz kolagenu w różnych okresach życia zwierzęcia. Wiadomo jednak, że wzajemne stosunki aktywności tych dwóch enzymów są różne w poszczególnych tkankach (85), a ponadto ulegają one zmianie z wiekiem zwierzęcia (85, 94, 94a). Krzywe spadku aktywności w zależności od wieku mogą przebiegać odmiennie w poszczególnych tkankach. W nerce szczura aktywność obu glikozylotransferaz wzrasta do 10 dnia po urodzeniu po czym stopniowo maleje (85). W wątrobie szczura aktywność obu enzymów również osiąga najwyższy poziom 10 dnia po urodzeniu, jednakże już po 20 dniach w przypadku galaktozylotransferazy i po 75 dniach w przypadku glikozylotransferazy aktywności te osiągają wartość minimalną, po czym obserwuje się ich stopniowy bardzo powolny wzrost (94a). Stwierdzono ostatnio, że aktywność glikozylotransferazy kolagenowej w skórze ludzkiej również zmienia się z wiekiem (94b). Aktywność tego enzymu w skórze płodu była około 6-krotnie wyższa, zaś średnia wartość w skórze noworodków około 3-krotnie wyższa niż w skórze dorosłych osobników.

## V. Mechanizm glikozylacji kolagenu

Dopiero w ostatnim roku pojawiły się pierwsze prace dotyczące mechanizmu glikozylacji. Fakt ten można wiązać z wyizolowaniem stosunkowo niedawno oczyszczonych preparatów enzymów katalizujących tę reakcję. Badania nad mechanizmem glikozylacji kolagenu prowadzono stosując oczyszczone 2500—5500 razy preparaty glikozylotransferazy izolowane z wyciągu zarodków kurczęcia (87). Na podstawie wyników badań szybkości początkowej i kinetyki hamowania reakcji enzymatycznych ustalono kolejność wiązania substratów z enzymem. Mechanizm ten przedstawiono na rycinie 3.

Jako pierwsze zostają związane z enzymem jony  $Mn^{++}$ , a następnie UDP-glukoza i kolagen. Odłączenie następuje w następującej kolejności: jako pierwszy uwalnia się kolagen z podstawioną resztą glukozy, a następnie ulega odłączeniu UDP. Jony manganu mogą pozostawać związane z enzymem i brać udział kolejno w kilku cyklach katalitycznych. Wykazano istnienie oddzielnych miejsc wiążących dla UDP-glukozy oraz jonów

$Mn^{++}$  i substratu kolagenowego. Ponadto stwierdzono, że substrat kolagenowy może również w odpowiednich warunkach tworzyć połączenie z kompleksem enzym —  $Mn^{++}$  i enzym- $Mn^{++}$ -UDP, zaś UDP może się bezpośrednio wiązać z wolnym enzymem (Ryc. 3), jednakże wytworzone kompleksy nie są aktywne (ang. *dead-end complexes*).



**Ryc. 3.** Mechanizm glikozylacji katalizowany przez glikozylotransferazę kolagenu (87). Linia przerywana oznacza, że  $Mn^{++}$  nie odłącza się od enzymu po każdym cyklu katalitycznym. Glc — glukoza, E — enzym, UDP — urydynodwufosforan.

Jak wyżej wspomniano, niektóre kationy dwuwartościowe mogą częściowo zastąpić jony  $Mn^{++}$  jako kofaktory glikozylotransferazy kolagenowej (p. IV). Autor omawianej wyżej pracy (87) nie stwierdził stymulacji włączania glukozy do kolagenu przez jony  $Co^{++}$ ,  $Mg^{++}$  i  $Ca^{++}$  w obecności  $Mn^{++}$ , co według niego wskazuje na istnienie jednego miejsca wiążącego metal. Przeprowadzone przez innych autorów badania kinetyki reakcji przenoszenia cukru wykazały natomiast, że galaktozylotransferaza z siary krowiej posiada przynajmniej dwa miejsca wiążące metal: jedno miejsce niezbędne do aktywacji enzymu, wiąże tylko jony  $Mn^{++}$ , zaś drugie, od którego zależy też przyłączenie UDP-galaktozy, wiąże jony  $Mn^{++}$ , które mogą być *in vitro* zastąpione jonami  $Ca^{++}$  (89).

Omówione prace dotyczyły glikozylotransferaz izolowanych z różnych źródeł, co może tłumaczyć pewne rozbieżności uzyskanych wyników. Należy przypuszczać, że w najbliższym okresie pojawią się dalsze doniesienia pozwalające na ustalenie dokładnego mechanizmu glikozylacji kolagenu.

Niewiele dotychczas wiadomo na temat regulacji procesu glikozylacji kolagenu. Istnieje sugestia, że lizofosfatydylocholina, która reguluje aktywność wielu enzymów, oddziałuje również na glikozylotransferazy kolagenu (94c). Wykazano bowiem stymulację aktywności glikozylotransferaz kolagenu w wyciągach z zarodków kurczęcia przez wspomniany fosfolipid. Ostatnio stwierdzono również wpływ kortyzolu na glikozylotransferazy kolagenu (94d). Badając biosyntezę kolagenu w komórkach ścięgien zarodków kurczęcia wykazano spadek aktywności galaktozylotransferazy i glikozylotransferazy kolagenu w obecności kortyzolu, czego wynikiem była obniżona liczba glikozylowanych reszt hydroksylizyny.

## VI. Koncepcje dotyczące roli reszt cukrowych w kolagenie

Rola, jaką odgrywają reszty cukrowe w glikoproteidach, jest ciągle przedmiotem badań. W roku 1966 Eylar stwierdził, że 97 spośród 112 białek pozakomórkowych zawiera jedną lub więcej reszt cukrowych (95). Na tej podstawie wysunął hipotezę, że komórka rozróżnia białko „znakowane” cukrem jako „nadające się” do transportu przez błonę komórkową. Nieco później znaleziono wrodzony defekt biosyntezy kolagenu, spowodowany niedoborem hydroksylazy lizyny prokolagenu; tę jednostkę chorobową nazwano zespołem Ehlersa-Danlosa typu IV (96). Okazało się wtedy, że prokolagen syntetyzowany przez tkanki takich chorých jest wydzielany z komórki mimo, że nie zawiera reszt cukrowych. Fakt ten obala hipotezę Eylara.

Rola cukrów w kolagenie nie została dotąd całkowicie wyjaśniona. W ostatnich latach bardzo popularna była koncepcja Jamiesona (97, 98), według której adhezja płytek do kolagenu, zapoczątkowująca tworzenie czopu hemostatycznego była wynikiem powstawania kompleksu enzym-substrat. Enzymem miała być glukozylotransferaza obecna na zewnętrznej powierzchni błony płytek krwi, przenosząca resztę glukozy na galaktozę związaną z hydroksylizyną. Uzyskano szereg danych na potwierdzenie tej koncepcji (99, 100, 101, 102, 103, 104, 105). W świetle ostatnich badań nad miejscem procesu glikozylacji kolagenu w komórce hipoteza Jamiesona wydaje się jednak wątpliwa. Przedstawiono bowiem dowody, że glukozylotransferaza płytkowa — podobnie jak glukozylotransferaza izolowana z kilku innych tkanek zwierzęcych — wymaga jako substratu kolagenu pozbawionego struktury heliksovej (106), zaś jak wiadomo adhezja płytek w miejscu uszkodzenia ściany naczyniowej przebiega na włóknach kolagenowych. Przeciwno tej koncepcji przemawiają również uzyskane ostatnio wyniki świadczące o tym, że obecność reszt cukrowych kolagenu jest istotna dla procesu tworzenia tych włókien, a nie jest istotna dla procesu agregacji płytek krwi (107).

Do tej pory nie wyjaśniono mechanizmu powstawania włókien kolagenowych. Jedną z istniejących koncepcji zakłada udział cukrów w tym procesie (52). Zgodnie z powyższą hipotezą reszty cukrowe kolagenu miałyby wpływać na prawidłowe ustawienie poszczególnych cząsteczek względem siebie. Wzajemne ustawienie byłoby spowodowane wpasowaniem reszt cukrowych w przerwy (ang. *hole regions*) pomiędzy końcem jednej, a początkiem drugiej cząsteczki tropokolagenu we włóknie. Fakt, że w zespole Ehlersa-Danlosa typu IV powstają włókna kolagenu o prawidłowym obrazie mikroskopowym (69, 108) podważa słuszność tej hipotezy.

Dotychczas pozostaje niewyjaśniona rola cukrów w tworzeniu się wiązań poprzecznych kolagenu. Ponieważ glukoza występuje w łańcuchu w bezpośrednim sąsiedztwie wiązania typu zasady Schiffa (109, 110,



111) uważa się, że ułatwia ona powstanie takiego wiązania w wyniku obniżenia wartości pK grupy  $\epsilon$ -aminowej hydroksylizyny (112). Postuluje się również, że obecność reszt cukrowych kolagenu wpływa na stabilizację oddziaływań między kolagenem a proteoglikanami. Powstają bowiem wiązania wodorowe między resztami cukrowymi kolagenu a białkiem proteoglikanów (113).

Obecny stan wiedzy na temat glikozylacji kolagenu można podsumować w następujący sposób. Ustalono, że proces glikozylacji rozpoczynający się na polirybosomach trwa także po uwolnieniu łańcuchów polipeptydowych i kończy się w momencie utworzenia potrójnego heliksu cząsteczki prokolagenu. W procesie tym biorą udział dwa enzymy: galaktozylotransferaza i glukozylotransferaza, z których jedynie ta ostatnia została otrzymana w stanie homogenym. Liczba reszt cukrowych związanych O-glikozydowo z resztami hydroksylizyny łańcuchów polipeptydowych jest różna w zależności od typu kolagenu wahając się od 0,4 do 12,5%. Rola reszt cukrowych w kolagenie jest ciągle przedmiotem spekulacji.

Artykuł nadszedł 30.8.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 6.3.1978.

#### Piśmiennictwo

1. Sharon N., (1975), w *Complex carbohydrates*, str. 65—83, Addison-Wesley Publ. Co., Reading, Massachusetts.
2. Lote C. J., Weiss J. B., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 81—85.
3. Weiss J. B., Lote C. J., (1971), *Nature New Biology*, **234**, 25—26.
4. Butler W. T., Miller E. J., Finch J. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 190—195.
5. Fietzek P. P., Rauterberg J., (1975), *FEBS Letters*, **49**, 365—368.
6. Fietzek P. P., Allmann H., Rauterberg J., Wachter E., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 84—86.
7. Miller E. J., Matukas V. J., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 1264—1268.
8. Miller E. J., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3030—3035.
9. Epstein E. H., Munderloh N. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9304—9312.
10. Fujii T., Kühn K., (1975), *Höppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1793—1801.
11. Shuttleworth C. A., Forrest L., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 391—395.
12. Uitto J., Lichtenstein J. R., Bauer E., (1974), *Biochemistry*, **15**, 4935—4942.
13. Klein R., Ziha J. M., (1976), *Calcif. Tissue Res.*, **20**, 217—227.
14. Volpin D., Veis A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1452—1456.
15. Herbage D., Bouillet J., Bernengo J. C., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 303—312.
16. Miller E. J., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1652—1658.
17. Miller E. J., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4903—4909.
18. Strawich E., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3905—3911.

19. Trelstad R. L., Kang A. H., Igarashi S., Gross J., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4993—4998.
20. Trelstad R. L., Kang A. H., Toole B. P., Gross J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **20**, 6469—6473.
21. Ansey J., Scott P. G., Veis A., Chyatte D., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 946—952.
22. Barnes M. J., Morton L. F., Bennet R. C., Bailey A. J., Sims T. J., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 263—266.
23. Chung E., Miller E. J., (1974), *Science*, **183**, 1200—1201.
24. Epstein E. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3225—3231.
25. Timpl R., Glanville R. W., Nowack H., Wiedemann H., Fietzek P. P., (1975), *Höppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1783—1792.
26. Trelstad R. L., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 717—725.
27. Ferwerda W., Meijer J. F. M., Eijnden D. H., Dijk W., (1974), *HöppeSeyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 976—984.
28. Gelman R. A., Blackwell J., Kefalides N. A., Tomichek E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 492—496.
29. Grant M. E., Kefalides N. A., Prockop D. J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3539—3544.
30. Grant M. E., Schofield D. J., Kefalides N. A., Prockop D. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7432—7437.
31. Grant M. E., Horwood R., Williams J. F., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 531—540.
32. Benya P. D., Padilla S. R., Ninni M. E., (1977), *Biochemistry*, **16**, 865—872.
33. Burgeson R. E., El Adi F. A., Kaitila I. I., Hollister D. W., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2579—2583.
34. Butler W. T., Finch J. E., Miller E. J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 639—643.
35. Kefalides N. A., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 226—234.
36. Narayan A. S., Page R. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5464—5471.
37. Newsome D. A., Linsenmayer T. F., Trelstad R. L., (1976), *J. Cell. Biol.*, **71**, 59—67.
38. Butler W. T., Birkedal-Hansen H., Beegle W. F., Taylor R. E., Chung E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8907—8912.
39. Seyer J. H., Brickley D. H., Glimcher M. J., (1974), *Calcif. Tiss. Res.*, **17**, 25—41.
40. Shuttleworth C. A., Forrest L., (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 147—149.
41. Pope F. M., Martin G. R., Lichtenstein J. R., Penttinen R., Gerson B., Rowe D. W., Mc Kusick V. A., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 1314—1316.
42. Seyer J. M., Hutcheson E. T., Kang A. H., (1977), *J. Clin. Investig.*, **59**, 241—248.
43. Hugues J., Herion F., Nusgens B., Lapiere C. M., (1976), *Thromb. Res.*, **9**, 223—231.
44. Spiro R. G., Lucas F., Rudall K. M., (1971), *Nature New Biology*, **231**, 54—55.
45. Lamport D. T. A., (1967), *Nature*, **216**, 1322—1324.
46. Butler W. T., Cunningham L. W., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 3882—3888.
47. Spiro R. G., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 602—612.
48. Spiro R. G., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4813—4823.

49. Aguilar J. H., Jackobs H. G., Butler W. T., Cunningham L. W., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5106—5113.
50. Butler W. T., (1969), *Biochemistry*, **9**, 44—49.
51. Butler W. T., Miller E. J., Finch J. E., (1976), *Biochemistry* **15**, 3000—3006.
52. Margan P. H., Jackobs H. G., Segrest J. P., Cunningham L. W., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5042—5048.
53. Spiro R. G., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1923—1932.
54. Schofield J. D., Freeman I. L., Jackson D. S., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 467—473.
- 54a. Rauterberg J., Allman H., Henkel W., Fietzek P. P., (1976), *Höppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1401—1407.
55. Clark Ch. C., Tomicsek E. A., Koszalka T. R., Minor R. R., Kefalides N. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5259—5267.
56. Kefalides N. A., Cameron J. D., Tomicsek E. A., Yanoff M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 730—733.
57. Spiro R. G., Fukushi S., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2049—2058.
58. Spiro R. G., (1972), w *Glycoproteins*, red. Gottschalk A., part B, str. 964—999, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam—London—New York.
- 58a. Bańkowski E., Gałasiński W., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 481—502.
59. Freedman R. B., Hawkins H. C., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 348—357.
60. Harwood R., Merry A. H., Woolley D. E., Grant M. E., Jackson D. S., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 405—418.
61. Hoffman H. P., Olsen B. R., Chen H. T., Prockop D. J., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **73**, 4304—4308.
62. Rosenbloom J., Endo R., Harsch M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2070—2076.
63. Merry A. H., Harwood R., Wooley D. E., Grant M. E., Jackson D. S., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 83—90.
64. Uitto J., Lichtenstein J. R., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 60—67.
65. Siegel R. C., Fu J. C. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5779—5785.
66. Siegel R. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5786—5792.
67. Siegel R. C., Byers P. H., (1976), *New Eng. J. Med.*, **294**, 556—557.
68. Hagopian A., Bosman H. B., Eylar E. H., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 387—396.
69. Harwood R., Grant M. E., Jackson D. S., (1975), *Biochem. J.*, **152**, 291—302.
70. Brownell A. G., Veis A., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 371—377.
71. Oikarinen A., Anttinen H., Kivirikko K. J., (1976), *Biochem. J.*, **156**, 545—551.
72. Vuust J., Piez K. A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6201—6207.
73. Oikarinen A., Anttinen H., Kivirikko K. J., (1976), *Biochem. J.*, **160**, 639—645.
74. Schofield J. D., Uitto J., Prockop D. J., (1974), *Biochemistry*, **13** 1801—1806.
75. Harwood R., Bhalla A. K., Grant M. E., Jackson D. S., (1975), *Biochem. J.*, **148**, 129—138.
76. Uitto J., Prockop D. J., (1974), *Biochemistry*, **13**, 4586—4591.
77. Williams J. F., Harwood R., Grant M. E., (1976), *Biochem. Biophys. Res., Commun.*, **70**, 200—206.

78. Anttinen H., Kivirikko K. J., (1976), *Biochem. Biophys. Acta*, **429**, 750—758.
79. Henkel W., Buddecke E., (1975), *Höppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie*, **356**, 921—928.
80. Myllylä R., Risteli L., Kivirikko K. J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 59—67.
81. Risteli L., Myllylä R., Kivirikko K. J., (1976), *Biochem., J.*, **155**, 145—153.
82. Risteli L., Myllylä R., Kivirikko K. J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **67**, 197—202.
83. Spiro R. G., Spiro M. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4899—4909.
84. Spiro M. J., Spiro R. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4910—4918.
85. Spiro R. G., Spiro M. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4919—4925.
86. Myllylä R., Risteli L., Kivirikko K. J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **52**, 401—410.
87. Myllylä R., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 225—231.
88. Tsapanakis A. D., Herries D. G., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 1102—1108.
89. Powell J. T., Brew K., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3645—3652.
90. Bosmann H. B., Eylar E. H., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 340—346.
91. Myllylä R., Risteli L., Kivirikko K. J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 517—521.
92. Bosmann H. B., Eylar E. H., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 89—94.
93. Myllylä R., Anttinen H., Risteli L., Kivirikko K. J., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **480**, 113—121.
94. Murai A., Miyahara T., Shiozawa S., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **404**, 345—348.
- 94a. Risteli J., Kivirikko K. J., (1976), *Biochem. J.*, **158**, 361—367.
- 94b. Anttinen H., Oikarinen A., Kivirikko K. J., (1977), *Clin. Chim. Acta*, **76**, 950—956.
- 94c. Anttinen H., (1976), *Biochem. J.*, **160**, 29—35.
95. Eylar E. H., (1965), *J. Theoret. Biol.*, **10**, 89—113.
96. Pinnell S. R., Krane S. M., Kenzora J., Glimcher M. J., (1972), *New Engl. J. Med.*, **286**, 1013—1020.
97. Jamieson G. A., Urban C. L., Barber A. J., (1970), *Intern. Soc. Thromb. Haemost.*, II Congress, Oslo 1970, Abstracts str. 120.
98. Jamieson G. A., Urban C. L., Barber A. J., (1971), *Nature New Biology*, **234**, 5—7.
99. Barber A. J., Jamieson G. A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **252**, 533—545.
100. Brass L. F., Bensusan H. B., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **444**, 43—52.
101. Bosmann H. B., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1118—1124.
102. Chesney C. H., Harper E., Colman R. W., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 2693—2695.
103. Chiang T. M., Beachey E. H., Kang A. H., (1977), *J. Clin. Invest.*, **59**, 405—411.
104. Harper E., Simons E. R., Chesney C. H., (1975), *Thromb. Res.*, **7**, 113—122.
105. Kang A. H., Beachey E. H., Katzman R. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1054—1059.
106. Menashi S., Harwood R., Grant M. E., (1976), *Nature*, **264**, 670—672.

107. Gordon R. K., Simons E. R., (1977), *Tromb. Haemost.*, **38**, 80.
108. Mechanic G., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 267—272.
109. Bailey A. J., Bazin S., Delunay A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 383—390.
110. Bailey A. J., Robins S. P., (1973), *Front. Matrix Biol.*, **1**, 130—156.
111. Eyre D., Glimcher M. J., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 663—671.
112. Bailey A. J., Robins S. P., Balian G., (1974), *Nature*, **251**, 105—109.
113. Nimni M. E., (1975), w *Dynamic of connective tissue macromolecules*, red. P. H. C. Burleigh i A. R. Poole, str. 51—76, North-Holland Publ. Company—Amsterdam, Oxford.

Redakcja Kwartalnika *Folia Histochemica et Cytochemica* oraz Komitet Cytobiologii przy II Wydziale PAN uprzejmie zawiadamiają o rozszerzeniu profilu czasopisma na prace doświadczalne z zakresu cytobiologii i biologii molekularnej komórki. Zapraszamy do nadsyłania oryginalnych prac z tego zakresu na adres Redakcji, Kraków 1, skr. poczt. 843. Informujemy, że treść poszczególnych zeszytów *Folia* jest indeksowana w *Current Contents, Life Sciences*.

ANDRZEJ GARDAS \*)

## Sfingoglikolipidy błony komórkowej

### Sphingoglycolipids of Cell Membrane

#### Spis treści

- I. Budowa chemiczna i właściwości glikolipidów
- II. Glikolipidy jako antygeny komórkowe
- II-1. Glikolipidy układu grupowego ABO z uwzględnieniem metod badania ich struktury
- II-2. Glikolipidy układu grupowego P
- II-3. Glikolipidy układu grupowego I
- II-4. Zmiany ekspresji antygenów grupowych podczas ontogenezy i procesów różnicowania się komórek
- III. Zmiany składu glikolipidowej błony komórkowej jako rezultat procesów nowotworowych i transformacji wirusami onkogennymi
- IV. Glikolipidy jako receptory niektórych toksyn bakteryjnych
- V. Receptory toksyny z *Ricinus communis*
- VI. Receptory glikoproteidowych hormonów przysadki

#### Contents

- I. Structure and properties of glycolipids
- II. Glycolipids as cell antigens
- II-1. ABO — blood-group active glycolipids and methods of investigation of their structure
- II-2. P — blood-group active glycolipids
- II-3. I — blood-group active glycolipids
- II-4. Changes in the expression of blood-group antigens during ontogenesis and cell differentiation
- III. Changes in glycolipid composition of cell membrane as a result of tumorigenesis and virus transformation
- IV. Glycolipid receptors for bacterial toxins
- V. Glycolipid receptors for *Ricinus communis* toxin
- VI. Glycolipid receptors for glycoprotein hormones

\*) Dr, Zakład Biochemii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Marymoncka 99, 01—813 Warszawa.

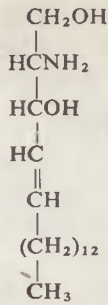
Wykaz stosowanych skrótów: Gal — galaktoza; Fuc — fukoza; NANA — kwas sialowy; GlcNAc — N-acetyloglucozaminy; GalNAc — N-acetylogalaktozaminy.

Najbardziej powszechnymi glikolipidami błony komórkowej są sfingoglikolipidy, ich część lipidową stanowi ceramid połączony z jedną lub więcej cząsteczką cukrów. Glikolipidy swą częścią lipidową są zakotwiczone w zewnętrznej warstwie fosfolipidowej błony komórkowej, część cukrowa zaś wystaje na zewnątrz komórki. Klasyczne glikolipidy opisywane w literaturze zawierają od jednego do dziesięciu cząsteczek cukrów w cząsteczce, są dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych a słabo rozpuszczalne w wodzie. Niedawno wyizolowano glikolipidy posiadające łańcuch oligosacharydowy o długości 20 do 40 cukrów. Zawartość glikolipidów w błonach komórkowych waha się w bardzo szerokich granicach od kilku do kilkudziesięciu procent całkowitej zawartości lipidów błony komórkowej. W glikolipidach glukoza jest cukrem połączonym bezpośrednio z grupą hydroksylową sfingozyny i jedyną cząsteczką glukozy w łańcuchu oligosacharydowym. Poza glukozą w glikolipidach występuje galaktoza, fukoza, N-acetyloglukozoamina, N-acetylogalaktozoamina i kwas sjałowy. Glikolipidy zawierające kwas sjałowy przyjęto nazywać gangliozydami, ponieważ zostały wyizolowane po raz pierwszy z mózgu, występują one jednak powszechnie we wszystkich dotychczas badanych komórkach zwierzęcych. Glikolipidy pełnią rolę antygenów komórkowych, służą jako receptory niektórych wirusów. W ostatnich latach stwierdzono bardzo duże zmiany w składzie glikolipidowym błony komórkowej w komórkach nowotworowych w różnych fazach cyklu podziałowego komórki, w trakcie różnicowania się komórek i podczas ontogenezy. Mamy też wiele danych wskazujących na udział glikolipidów w wiązaniu hormonów i niektórych toksyn przez komórkę.

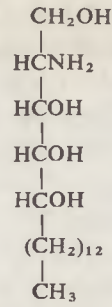
## I. Budowa chemiczna i właściwości glikolipidów

Podstawowym składnikiem sfingoglikolipidów jest sfingozyna (wzór I) lub fitosfingozyna (wzór II), do której dołączony jest poprzez grupę aminową kwas tłuszczowy, zaś poprzez jej grupę hydroksylową jedna lub więcej cząsteczka cukrów. Sfingozyna wyizolowana po raz pierwszy w 1884 roku z mózgu, której właściwą nazwą chemiczną jest 2-amino-4-oktadecen-1, 3-diol, nie występuje w formie wolnej. Długość łańcucha węglowego sfingozyn znajdujących w związkach naturalnych waha się od 16 do 21 atomów węgla (2, 3), różnią się one również ilością grup hydroksylowych i ilością podwójnych wiązań (4). Stereochemiczne położenie grupy aminowej i 3-hydroksylowej zostało ustalone jako erytro i potwierdzone drogą degradacji i syntezy (5). W tabeli 1 zestawiono najbardziej powszechnie występujące glikolipidy, wzór III podaje przykład budowy jednego z gangliozydów. Glikolipidy występują powszechnie w błonach komórek roślinnych i zwierzęcych i mogą stanowić połowę wszystkich lipidów błony komórkowej, jak to ma miejsce w komórkach





Wzór I. Sfingozyna



Wzór II. Fitosfingozyna

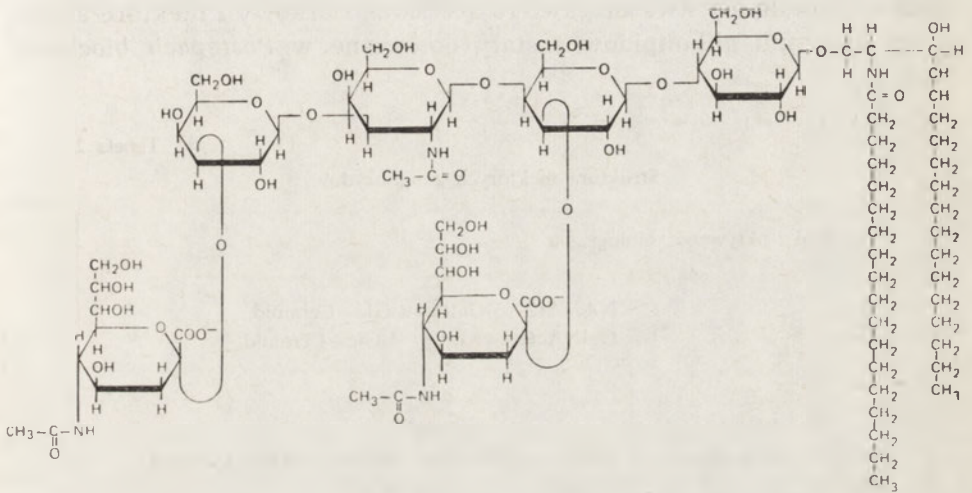
Wzór III. Gangliozyd G<sub>D1a</sub>

Tabela 1

Struktura niektórych glikolipidów

Nazwa	Struktura
Glukozyloceramid	Glc-Ceramid
Laktozyloceramid	Gal(1-4)Glc-Ceramid
Antygen grupowy P <sup>k</sup>	Gal(1-4)Gal(1-4)Glc-Ceramid
Globozyd, antygen P	GalNAc(1-3)Gal(1-4)Gal(1-4)Glc-Ceramid
Antygen P <sub>1</sub>	Gal(1-4)Gal(1-4)GlcNAc(1-3)Gal(1-4)Glc-Ceramid
Antygen H	Fuc(1-2)Gal(1-4)GlcNAc(1-3)Gal(1-4)Glc-Ceramid
Antygen A	Fuc(1-2)Gal(1-4)GlcNAc(1-3)Gal(1-4)Glc-Ceramid
	$  \begin{array}{c}  3 \\    \\  1 \\    \\  \text{GalNAc}  \end{array}  $
Antygen B	Fuc(1-2)Gal(1-4)GlcNAc(1-3)Gal(1-4)Glc-Ceramid
	$  \begin{array}{c}  3 \\    \\  1 \\    \\  \text{Gal}  \end{array}  $

nabłonka jelita cienkiego i komórkach kanalików nerkowych pierwszego rzędu (6, 7). Na ogół jednak glikolipidy stanowią kilka procent ogólnej ilości lipidów komórki. Część cukrowa glikolipidów determinuje właściwości biologiczne tych związków i dlatego przyjęta została jako podstawa do klasyfikacji. Wyróżniamy:

- glikolipidy obojętne
- glikolipidy kwaśne zawierające resztę kwasu sialowego i te przyjęto nazywać gangliozydami
- glikolipidy kwaśne zawierające resztę kwasu siarkowego lub fosforowego.

W artykule tym zostaną omówione tylko dwie pierwsze grupy glikolipidów. Glikolipidy kwaśne zawierające kwas siarkowy i niektóre aspekty metabolizmu glikolipidów zostały omówione w *Postęпах biochemii* (8, 9).

Tabela 2

## Struktura niektórych gangliozydów

Symbol i aktywność biologiczna	
$G_{M3}$	NANA(2—3)Gal(1—4)Glc—Ceramid
$G_{M2}$	GalNAc(1—4)Gal(1—4)Glc—Ceramid
	$\begin{array}{c} 3 \\   \\ 2 \\   \\ \text{NANA} \end{array}$
$G_{M1}$ , receptor toksyny cholery	Gal(1—4)GalNAc(1—4)Gal(1—4)Glc—Ceramid
	$\begin{array}{c} 3 \\   \\ 2 \\   \\ \text{NANA} \end{array}$
$G_{D1a}$	Gal(1—4)GalNAc(1—4)Gal(1—4)Glc—Ceramid
	$\begin{array}{c} 3 \qquad \qquad \qquad 3 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ 2 \qquad \qquad \qquad 2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{NANA} \qquad \qquad \text{NANA} \end{array}$
$G_{T1}$ , receptor toksyny tężcowej	Gal(1—4)GalNAc(1—4)Gal(1—4)Glc—Ceramid
	$\begin{array}{c} 3 \qquad \qquad \qquad 3 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ 2 \qquad \qquad \qquad 2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{NANA} \qquad \qquad \text{NANA(2—8)NANA} \end{array}$

Nazewnictwo glikolipidów jest dość zagmatwane; najczęściej używane są nazwy zwyczajowe nadawane przez ludzi, którzy wyizolowali i oznaczyli strukturę chemiczną danego glikolipidu. Często zatem ten sam glikolipid można spotkać w piśmiennictwie pod różnymi nazwami. Svennerholm (10) wprowadził symboliczne oznakowanie gangliozydów mózgu, opierające się na długości łańcucha oligosacharydowego, liczbie cząsteczek kwasu sialowego i miejsca jego dołączenia. Tak gangliozyd zawierający 4 cząsteczki cukrów obojętnych o następującej sekwencji:

gal-galNAc-gal-glc-ceramid oznaczył jako G<sub>1</sub>, gangliozyd o jeden cukier krótszy oznaczył G<sub>2</sub>, a o dwa cukry krótszy G<sub>3</sub>. Litery M, D, i T oznaczają liczbę dołączonych cząsteczek kwasu sialowego (mono, di i tri), małe zaś litery a i b pozycję dołączenia kwasu sialowego. Tabela 2 zestawia do tej pory wyizolowane gangliozydy mózgu.

Glikolipidy są związkami dobrze rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych i słabo rozpuszczalnymi w wodzie. Część lipidowa i część cukrowa wywierają przeciwny wpływ na polarność glikolipidu. Ceramid ma charakter silnie hydrofobowy, podczas gdy łańcuch oligosacharydowy jest hydrofilowy. Rozpuszczalność glikolipidów jest zatem w dużym stopniu zależna od długości łańcucha cukrowego i ostatnio wyizolowano glikolipidy dobrze rozpuszczalne w wodzie a wcale w rozpuszczalnikach organicznych. Posiadają one długi łańcuch oligosacharydowy od 20 do 40 cukrów w łańcuchu (11, 12, 13). Glikolipidy w roztworach wodnych tworzą wielkocząsteczkowe micelle, punkt krytyczny tworzenia miceli jest zależny od długości łańcucha cukrowego i waha się od 10<sup>-4</sup> M do 10<sup>-6</sup> M. Podwójne błony lipidowe zawierające glikolipidy wykazują większą oporność elektryczną i wyższe napięcie przebicia niż błony zbudowane tylko z fosfolipidów (14, 15).

Możliwość wymiany cholesterolu i fosfolipidów między błonami komórkowymi wykazano doświadczalnie (16, 17). Możliwość wymiany glikolipidów była słabiej badana i chociaż udowodniono, że może następować sorpcja glikolipidów z surowicy czy pożywki (11, 18), to jednak na bezpośrednią wymianę między komórkami brak danych. Glikolipidy mogą tworzyć trwałe kompleksy z białkami lub glikoproteidami i często takie kompleksy są opisywane jako „proteolipidy”. Z nowotworu Walkera wyizolowano proteolipid rozpuszczalny w mieszaninie chloroformu i metanolu a nierozpuszczalny w wodzie (19). Zawierał on 10% sfingozyny, 25% kwasów tłuszczowych, 40% cukrów i 10% aminokwasów. Kompleksy glikolipidów z białkami są często tak trwałe, że otrzymanie glikolipidów szczególnie o długim łańcuchu cukrowym jest niemożliwe bez użycia czynnika dezagregującego jak detergenty, butanol itp. (11).

## II. Glikolipidy jako antygeny komórkowe

Prawie wszystkie do tej pory poznane glikolipidy obojętne są antygenami krwinek ludzkich. Najprostsze glikolipidy zawierające jeden cukier jak glukozylceramid i galaktozylceramid nie są antygenami krwinki czerwonej; są one prekursorami bardziej złożonych glikolipidów. Mimo przyjętej konwencjonalnie nazwy antygeny grupowe krwinki czerwonej, występują one powszechnie także w innych komórkach organizmu (20, 21) i są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym (22, 23). Najwcześniej opisanym systemem antygenowym człowieka

jest tak zwany układ grupowy **ABO**. Landsteiner w 1900 roku (24) badając reakcję między krwinkami a surowicą pochodzącą od różnych dawców stwierdził, że surowice mogą aglutynować krwinki innego dawcy i na tej podstawie wyróżnił cztery grupy krwinek czerwonych **A**, **B**, **O** i **AB**. Od tego czasu opisano 14 niezależnych systemów grupowych krwi zawierających przeszło sto różnych antygenów (25, 26). Podział na grupy krwi wynika z nieobecności danego antygeny na krwinkach pewnej grupy ludzi w populacji i często łączy się z występowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko brakującemu antygenowi. Populacja nie posiadająca danego antygeny może być bardzo nieliczna i tak np. do tej pory opisano tylko kilku ludzi nie posiadających antygenów **MN** (27, 28), a brak antygeny **I** występuje z częstością 1 na 10 000 (29). Antygeny grupowe są na ogół trwałe w ciągu życia osobnika. Ulegają natomiast znacznym zmianom w trakcie rozwoju embrionalnego (30) i mogą podlegać daleko idącym zmianom w procesach patologicznych (31, 32), a szczególnie w procesach nowotworowych (33, 34). Antygeny grupowe ulegają również zmianom podczas różnicowania i starzenia się komórek (35) a nawet w różnych fazach podziału komórki (36, 37). Dane o chemicznej naturze antygenów krwinki czerwonej ograniczone są do układu **ABO**, **MN**, **P**, **Lewis** i **I** z których tylko antygeny **MN** nie są glikolipidami.

#### II-1. Glikolipidy układu grupowego **ABO** z uwzględnieniem metod badania ich struktury

Od wykrycia układu grupowego **ABO** minęło przeszło 70 lat lecz dopiero w ostatnich latach poznaliśmy ich naturę chemiczną. Oprócz glikolipidowych antygenów **ABO** znajdujących na powierzchni komórek, w płynach wydzielniczych ustroju znaleziono glikoproteidy wykazujące aktywność grupową (38). Badania w laboratoriach **Morgana**, **Watkins** i **Kabata** (25, 39, 40) aktywnych grupowo glikoproteidów doprowadziły do ustalenia immunologicznie czynnych struktur odpowiedzialnych za aktywność grupową **ABO**. Wykazano, że za aktywność immunologiczną odpowiedzialne są zakończenia łańcucha oligosacharydowego i pierwszorzędne znaczenie ma ostatni cukier w łańcuchu. Cukrem determinującym aktywność grupową **A** jest *N*-acetylogalaktozamina połączona wiązaniem  $\alpha$ -glikozydowym z przedostatnią galaktozą w położeniu 3. Determinantą immunologiczną grupy **B** jest galaktoza połączona  $\alpha$ -glikozydowym wiązaniem z przedostatnią galaktozą w położeniu 3. W obydwu antygenach przedostatnia galaktoza jest dodatkowo podstawiona *L*-fukozą w położeniu 2. Odszczepienie fukozy obniża aktywność grupową **A** i **B**, nie likwiduje jej jednak całkowicie (41). Determinantę grupy **O** przyjęto nazywać antygenem **H**; jest on biologicznym prekursorem antygenów **A** i **B**. Za aktywność immunologiczną grupy **O** odpowiada *L*-fukoza dołączona do przedostatniej galaktozy w położeniu 2, wiązaniem  $\alpha$ -glikozydo-

wym. W tabeli 1 zestawiono niektóre glikolipidy o aktywności grupowej **A**, **B** i **H**. Bezpośrednimi produktami genów **A**, **B** i **H** są odpowiednie transferazy a ich substratami są pochodne cukrów, GDP-fukoza, UDP-galaktoza i UDP-N-acetylo-galaktozamina. Bardziej dokładne omówienie genetyki i serologii substancji grupowych czytelnik może znaleźć w artykule W. M. Watkins (42).

Klasyczne prace nad antygenami układu **ABO**, które do dzisiaj stanowią podstawę immunochemii były prowadzone na stosunkowo łatwo dostępnym materiale glikoproteidowym pochodzącym z wydzielin cyst jajnikowych lub przewodu pokarmowego. Izolacja antygenów komórkowych **ABO** mimo wielu prób, nastroczała ogromne trudności. Już jednak w 1924 roku Landsteiner i Scheer (43) wykazywali lipidowy charakter antygenów **ABO**, ale dopiero niedawno udało się ustalić ich glikolipidową naturę (44, 45). Kościelak i wsp. (46) wyizolowali i oznaczyli strukturę dwóch glikolipidów o aktywności **H** i jeden glikolipid o aktywności **B**. Glikolipidy o takiej samej strukturze wyizolowane zostały równocześnie w pracowni Hakomoriego (47). Dotychczas opisane glikolipidy zawierające od 5 do 10 reszt cukrowych w łańcuchu oligosacharydowym, są stosunkowo dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Zostały wyizolowane drogą ekstrakcji bądź to etanolem, bądź mieszaniną chloroformu i metanolu (46, 48, 49) i oczyszczone drogą chromatografii na żelu krzemionkowym.

W ostatnich latach w szeregu laboratoriach stwierdzono występowanie materiału aktywnego grupowo, nie rozpuszczalnego w rozpuszczalnikach organicznych a dobrze rozpuszczalnego w wodzie (50—53). Na podstawie jego rozpuszczalności przyjęto, że materiał ten jest glikoproteidem. W 1973 roku opublikowano metodę oczyszczania tej substancji (11). W trakcie oczyszczania tego materiału stwierdzono, że aktywność grupowa znajduje się praktycznie w każdej frakcji białkowej rozdzielanej na kolumnach. Dopiero wprowadzenie butanolu jako czynnika dezagregującego pozwoliło na oczyszczenie substancji aktywnej. Wskazuje to na silną tendencję badanych antygenów do tworzenia trwałych kompleksów z białkami bądź glikoproteidami błony erytrocytów. Oczyszczona substancja zawierała 90% cukrów, 7% aminokwasów, 2% sfingozyny i 2% kwasów tłuszczowych. Na podstawie składu chemicznego nie było można określić chemicznej natury tego związku.

W 1974 roku opublikowano (54) kilka danych pośrednio wskazujących na glikolipidową naturę badanej substancji. Koncepcja ta spotkała się jednak z pewnym sceptyzmem, gdyż zakładała występowanie w badanym materiale glikolipidów o bardzo długim łańcuchu cukrowym dochodzącym do 50 cukrów. Związków takich do tej pory nie znano. D 1976 roku opisano metodę dalszego oczyszczania tej substancji i potwierdzono w pełni hipotezę o jej glikolipidowym charakterze (12). Stwierdzono, że około 70% materiału rozpuszcza się w układzie zawierającym chloroform, me-

tanol i wodę w stosunku 1:2:1. Materiał rozpuszczalny nie zawierał aminokwasów, a zawartość w nim sfingozyny i kwasów tłuszczowych nie uległa zmianie nawet po kilkugdzinnej ekstrakcji w aparacie do ekstrakcji ciągłej rozpuszczalnikami organicznymi. Ponadto, po trawieniu glikozydazami z badanej substancji powstawały krótkie glikolipidy jak glukozyloceramid i laktozyloceramid. Otrzymany preparat poddano acetylacji i tak przygotowany materiał można było oczyścić poprzez chromatografię cienkowarstwową na żelu krzemionkowym. Zawierał on cztery różne glikolipidy, wszystkie wykazywały wysoką aktywność grupową (12). Skład jednego z nich podaje tabela 3.

Tabela 3

Skład glikolipidu grupowego H

Składnik	Zawartość %	Stosunek molo- wy do sfingozyny
Glukoza	4,3	1,1
Fukoza	7,0	1,96
Glukozaamina	35,0	8,95
Galaktoza	40,5	10,30
Kwasy tłuszczowe	6,7	—
Sfingozyna	6,55	1,00

Glikolipid ten stanowi 60% wyjściowej mieszaniny glikolipidów. Na przykładzie badania struktury chemicznej tego glikolipidu można zilustrować strategię i metodykę postępowania w ustalaniu budowy złożonych polisacharydów. Klasyczną metodą ustalania sekwencji łańcucha oligosacharydowego jest utlenianie nadjodanem (55—57). Polega ona na utlenianiu sąsiednich grup hydroksylowych, redukcji powstałego aldehydu i odszczepieniu odpowiedniego alkoholu poprzez łagodną hydrolizę kwaśną. Podczas hydrolizy np. w 0,5 N HCL w temperaturze pokojowej przez kilka godzin wiązanie glikozydowe nie ulega hydrolizie. Metodę tę przyjęło się nazywać degradacją Smitha (55). Inną metodą pomocną przy ustalaniu miejsca wiązania glikozydowego jest metylacja grup hydroksylowych badanego związku, a następnie hydroliza wiązań glikozydowych i analiza otrzymanych pochodnych metylowych cukrów (57, 58). Tabela 4 przedstawia uzyskane pochodne metylowe z badanego glikolipidu, pozwala ona na wyciągnięcie następujących wniosków: cukrem kończącym łańcuch oligosacharydowy jest fukoza gdyż tylko ona ulega permetylacji, łańcuch cukrowy jest rozgałęziony, na co wskazuje występowanie 2,4-dwumetylo galaktozy. Oczywiście cukrem, na którym występuje rozgałęzienie jest galaktoza podstawiona w pozycji 3 i 6. Wszystkie cząsteczki N-acetyloglukosoaminy badanego glikolipidu są podstawione w pozycji 4. Cząsteczka glukozy dołączona do sfingozyny nie ulega utlenianiu nadjoda-

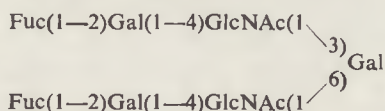
Tabela 4

Metylowe pochodne cukrów znalezione w glikolipidzie grupowym H

Pochodna metylowa	znaleziona w:			
	natywnym glikolipidzie	po odszczepieniu fukozy	po degradacji Smithsa	
			pierwszy cykl	drugi cykl
Metylo-2,3,4-trój-0-metylofukozyd	++	-	-	-
Metylo-2,3,6-trój-0-metyloglukozyd	+	+	+	+
Metylo-2,3,4,6-tetra-0-metylogalaktozyd	-	+	-	+
Metylo-2,4,6-trój-0-metylogalaktozyd	+++	+++	+++	+++
Metylo-3,4,6-trój-0-metylogalaktozyd	++	-	-	-
Metylo-2,4-dwu-0-metylogalaktozyd	+	+	+	-
3,4,6-trój-0-metyloglukozoamina	-	-	+	-
3,6-dwu-0-metyloglukozoamina	+++	+++	+++	+++

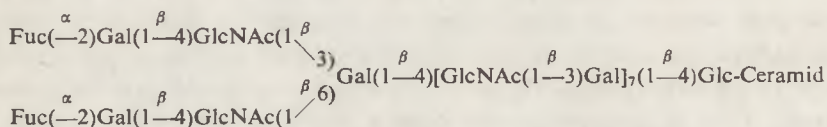
nem w roztworach wodnych glikolipidów, chociaż posiada dwie sąsiadujące grupy hydroksylowe.

Końcowa fukoza ulega łatwo odszczepieniu w drodze łagodnej hydrolyzy kwaśnej, np. 0,1 M kwas trójchlorooctowy w temperaturze 100° przez 1 godzinę (59). Po odszczepieniu końcowej fukozy, analiza metylowych pochodnych pozwala na dalsze wnioski. Następnym cukrem w łańcuchu jest galaktoza, na co wskazuje pojawienie się permetylowej pochodnej galaktozy (2,3,4,6-metylo-galaktozy) i równoczesny zanik 3,4,6-trój-metylo galaktozy. Gdy glikolipid po odszczepieniu fukozy został poddany degradacji Smithsa, stwierdzono ubytek galaktozy w ilości dwóch moli na mol sfingozyny, zanik permetylowanej pochodnej galaktozy i pojawienie się 3,4,6-metyloglukozoaminy, (jest to permetylowana pochodna glukozoaminy). Świadczy to, że galaktoza ulegająca utlenianiu nadjordanem była połączona z N-acetyloglukozoaminą w położeniu 4. Ponowne powtórzenie degradacji Smithsa prowadzi do ubytku N-acetyloglukozoaminy w ilości dwóch moli na mol sfingozyny, zaniku permetylowanej pochodnej N-acetyloglukozoaminy, zaniku 2,4-metylogalaktozy i pojawienia się ponownie permetylowanej pochodnej galaktozy. Świadczy, to, że trzeci z kolei cukier w łańcuchu oligosacharydowym jakim jest N-acetyloglukozoamina jest dołączona w pozycji 3 i pozycji 6 do galaktozy, a rozgałęzienie łańcucha występowało na czwartym cukrze, to jest galaktozie. Z podanych wyników można było zaproponować następującą budowę końcowego odcinka łańcucha cukrowego złożonego z 7 cukrów, wzór IV.



Wzór IV. Końcowy odcinek łańcucha cukrowego glikolipidu H.

Po dwóch kolejnych degradacjach Smithsa otrzymano glikolipid składający się z siedmiu cząsteczek galaktozy podstawionej w pozycji 3, siedmiu cząsteczek N-acetyloglukozoaminy podstawionej w pozycji 4, jednej końcowej cząsteczki galaktozy i jednej cząsteczki glukozy na jedną cząsteczkę sfingozyny. Przy równym stosunku galaktozy do N-acetyloglukozoaminy w glikolipidzie otrzymanym po dwóch degradacjach Smithsa powstaje pytanie czy istnieje struktura w której dwie lub więcej N-acetyloglukozoamin jest połączonych do siebie wzajemnie lub być może istnieje struktura w której galaktoza i N-acetyloglukozoamina połączona jest naprzemiennie. Odszczepienie grup N-acetylowych z N-acetyloglukozoaminy powoduje odsłonięcie grupy aminowej która w warunkach hydrolizy kwaśnej chroni sąsiednie wiązanie glikozydowe, w efekcie uzyskuje się nie pojedyncze cukry lecz oligosacharydy (59). Za pomocą tej metody otrzymano z badanego glikolipidu dwa oligosacharydy,  $\beta$ -glukozaminylo-(1-3)-galaktozę i  $\beta$ -glukozaminylo-(1-6)-galaktozę. Nie stwierdzono natomiast nawet śladów chitobiozy, która była by obecna w przypadku występowania dwóch sąsiadujących glukozamin w łańcuchu oligosacharydowym. Z otrzymanych wyników można było podać następującą pełną strukturę badanego glikolipidu, wzór V. Anomerię wiązań glikozydowych oznaczono przy pomocy trawienia odpowiednimi glikozydazami (12).



Wzór V. Struktura glikolipidu grupowego H.

K o ś c i e l a k i współpracownicy (13) pracując na tym samym materiale z erytrocytów ludzkich, potwierdzili w nim występowanie kilku glikolipidów o długim rozgałęzionym łańcuchu oligosacharydowym. Autorzy ci badając metylowe pochodne cukrów w otrzymanych glikolipidach stwierdzili wysoką zawartość 2,4-dwu-metylo-galaktozy w stosunku do zawartości sfingozyny lub glukozy. Stosunek ten wynosił od 2,5 do 8,4. Ilość 2,4-dwu-metylo-galaktozy w stosunku do ilości sfingozyny świadczy o liczbie rozgałęzień łańcucha oligosacharydowego i na tej podstawie autorzy ci sugerują strukturę badanych glikolipidów z wieloma rozgałęzieniami łańcucha oligosacharydowego.

Zaproponowana struktura jest niezgodna z danymi autora (12) ponieważ liczba cząsteczek galaktozy, która ulega utlenieniu nadjodaniem w substancji grupowej H lub liczba cząsteczek galaktozy plus liczba cząsteczek N-acetylogalaktozoaminy ulegających utlenianiu nadjodaniem w substancji grupowej A powinna być większa niż liczba rozgałęzień. Przy 3 lub 8 rozgałęzieniach łańcucha oligosacharydowego utlenianiu nadjodaniem powinno ulegać co najmniej 3 lub (odpowiednio) 9 cząsteczek cukrów w stosunku do zawartości sfingozyny.



Taki ubytek cukrów po utlenianiu nadjodanem w stosunku do zawartości sfingozyny nie został stwierdzony (12) ani w glikolipidzie, którego strukturę omówiono uprzednio, ani we frakcji rozpuszczalnej w układzie rozpuszczalników chloroform/metanol/woda (1/2/1), która zawiera trzy różne glikolipidy.

Materiał wykazujący aktywność grupową **H** stwierdzono również we frakcji nie rozpuszczalnej w układzie rozpuszczalników chloroform/metanol/woda (1/2/1) (12). Być może glikolipidy o strukturze zaproponowanej przez Kościelaka i współpracowników (13) występują w tej właśnie frakcji.

## II-2. Glikolipidy układu grupowego **P**\*)

Układ grupowy **P** odkryty przez Landsteinerja i Levina (60) w 1924 roku długo opierał się poznaniu jego struktury chemicznej. Dopiero stwierdzenie, że materiał otrzymany z cyst owiec zawiera substancję o aktywności **P<sub>1</sub>**, przyspieszyło poznanie natury chemicznej antygenów **P** (61, 62). W 1962 roku Morgan i Watkins (63) podali wstępną charakterystykę antygeny **P<sub>1</sub>**, a w jakiś czas później w tym samym laboratorium ustalono pełną strukturę antygeny **P<sub>1</sub>** (64, 65, 65a). W 1971 roku Marcus stwierdził występowanie aktywności **P<sub>1</sub>** we frakcji glikolipidowej erytrocytów a w kilka lat później wyizolował i oznaczył strukturę glikolipidu o aktywności **P<sub>1</sub>** (67, 68). Jest to pentaheksozyloceramid posiadający jako cukier końcowy galaktozę, połączoną wiązaniem glikozydowym w położeniu 4 subterminalnej galaktozy. Badając aktywność grupową **P** od dawna znanych glikolipidów występujących powszechnie w komórkach ssaków z surowicami anty-**P**, Marcus niespodziewanie stwierdził ich aktywność immunologiczną. I tak globozyd posiada aktywność **P**, a trójheksozyloceramid aktywność **P<sup>k</sup>** (67).

Antygen **P<sup>k</sup>** występuje u znakomitej większości ludzi, lecz jego obecność w błonach erytrocytów jest zamaskowana. Można ją łatwo stwierdzić w innych komórkach organizmu np. fibroblastach (69, 70). Tylko u bardzo nielicznej grupy ludzi stwierdzono brak antygenów **P** i **P<sup>k</sup>** i ich budowę fenotypową oznaczono jako p małe, fenotyp ten występuje z częstością 5,8 na milion (71, 72). W krwinkach tych ludzi stwierdzono brak głównych glikolipidów erytrocytów ludzkich to jest globozydu i trójheksozyloceramidu, natomiast znaczny wzrost ilości laktozyloceramidu oraz glikolipidów zawierających kwas siałowy (73, 74). Odszczepienie kwasu siałowego od wyizolowanych gangliozydów z erytrocytów p małe nie powoduje pojawiania się aktywności z grupy **P** (75). Wskazuje to, że fenotyp

\*) Antygeny grupowe **P** zostały również omówione w artykule H. Miller-Podraza, J. Kościelak (1975), *Acta Haematol. Pol.* 6, 299—307.

p małe jest wynikiem braku odpowiednich transferaz a nie zablokowaniem grup aktywnych kwasem sialowym. Budowę antygenów z grupy P zestawiono w tabeli 1.

### II-3. Glikolipidy układu grupowego I

Wykrycie przez Wienera i wsp. (76) w 1956 roku nowego antygenu grupowego I dało początek ogromnej literaturze nagromadzonej na jego temat. Antygen ten występuje u dużej większości dorosłych ludzi, tylko 1 na 10 000 ludzi wykazuje brak tego antygeny. Antygen I występuje dość powszechnie u naczelnych małp i stwierdzono jego obecność u wielu zwierząt (77). Zainteresowanie tym antygenem wzrosło szczególnie gdy stwierdzono, że przeciwciała anti-I pojawiają się w przypadkach chorób nowotworowych układu krwiotwórczego i nabytą anemią hemolityczną (78—81). Antygen ten pojawia się dopiero po urodzeniu i krwinki noworodka wykazują brak antygeny I lub jest on obecny w bardzo nieznacznych ilościach (82). Najczęściej występującymi przeciwciałami anti-I są przeciwciała typu auto, to znaczy takie, które mogą reagować z krwinkami tego samego osobnika. Do takiej reakcji najczęściej nie dochodzi *in vivo*, gdyż są to tak zwane „zimne przeciwciała” to znaczy reagują w temperaturze poniżej 20°. Są to monoklonalne przeciwciała typu IgM (83). Naturalne przeciwciała anti-I występują rzadko i mają słabe miano. Nagromadzone piśmiennictwo wykazuje ogromną heterogenność przeciwciał anti-I, i można powiedzieć, że nie ma dwóch przeciwciał anti-I reagujących tak samo z różnymi krwinkami czerwonymi (84—86). Wskazuje to na mozaikową budowę chemiczną antygeny I, to znaczy, że różne przeciwciała reagują z różną częścią złożonej struktury antygeny I (82).

Było szereg prób wyizolowania antygeny I z krwinek czerwonych, zauważono, że odsialowany glikoproteid MN posiada zdolność reakcji z niektórymi przeciwciałami anti-I (87). Laboratorium Kabała opublikowało szereg prac nad antygenem I (88—90) i podało strukturę oligosacharydu aktywnego z jednym z przeciwciał anti-I (90). Z innymi przeciwciałami wyizolowany oligosacharyd nie reagował. Gardas i Kosiela (91) stwierdzili, że wyizolowany przez nich materiał glikolipidowy posiada obok aktywności grupowej ABO również aktywność I. Fakt ten jest o tyle interesujący, że glikolipidy o krótkim łańcuchu oligosacharydowym i wykazujące aktywność grupową ABO nie posiadają nawet śladu aktywności I (92). Wyizolowanie jednorodnego glikolipidu z rozgałęzionym łańcuchem cukrowym pozwoliło na pełną charakterystykę tego antygeny (92). Było to możliwe z kilku powodów, po pierwsze znano pełną strukturę aktywnego glikolipidu oraz zastosowano do badań cały szereg przeciwciał anti-I. Badano aktywność grupową I w miarę odszczepiania kolejnych cukrów od łańcucha oligosacharydowego. Stwierdzono, że

reakcja z przeciwciałami anty-I typu auto zostaje utrzymana pomimo odszczepienia końcowej fukozy i przedostatniej galaktozy. Zanika natomiast całkowicie po odszczepieniu trzeciego z kolei cukru w łańcuchu jakim jest N-acetyloglukozoamina. Należy podkreślić, że po odszczepieniu N-acetyloglukozoaminy następuje zniszczenie rozgałęzienia łańcucha oligosacharydowego. Praca ta wykazała, że niektóre przeciwciała anty-I reagują z wewnątrz rozgałęzioną strukturą łańcucha oligosacharydowego, a rodzaj końcowego cukru nie ma większego wpływu na reakcję antygen przeciwciała. Ustalenie pełnej budowy antygeny **I** pozwoliło na zaproponowanie nowej klasyfikacji przeciwciał anty-I opartej na reakcji tych przeciwciał z określoną strukturą chemiczną (92). Potwierdza to w pełni teorię mozaikowej budowy antygeny **I**; jest on fenotypowym rezultatem współdziałania szeregu genów, z których niezbędnym do wystąpienia struktury **I** jest gen kodujący transferazę syntetyzującą rozgałęzienie łańcucha oligosacharydowego.

#### II-4. Zmiany ekspresji antygenów grupowych podczas ontogenezy i procesów różnicowania się komórek

Antygeny **ABO** można wykryć już w 5 mm zarodku ludzkim (w piątym tygodniu życia płodowego) w komórkach pochodzenia nabłonkowego. Antygeny te osiągają największe natężenie u zarodka 35 mm by w dalszym rozwoju zanikać. Zanik ekspresji antygenów łączy się z rozwojem morfologicznym i rozpoczęciem funkcjonowania danego organu, jak na przykład wydzielanie mucyn przez układ trawienny, pobieranie jodu przez komórki tarczycy lub wydzielanie ACTH przez przysadkę (30). Antygeny komórek pochodzenia śródbłonkowego (*endotelium*) zostają utrzymane na ogół w ciągu całego życia, nie znaczy to jednak, że nie ulegają zmianom ilościowym w trakcie rozwoju embrionalnego jak i w ciągu pierwszych miesięcy życia noworodka (30).

Nabłonek podlega ciągłej odnowie, a jego komórki ulegają różnicowaniu, przemieszczaniu a następnie obumieraniu i złuszczeniu. Komórki nowotworowe pochodzenia nabłonkowego można hodować *in vitro* i jedną z linii komórkowych są komórki Hela. K h u n s i wsp. (35, 94, 95) stwierdzili, że komórki HeLa można rozdzielić na dwie populacje jedną posiadającą antygen H i drugą, w której tego antygeny brak. Komórki  $H^+$  dzieląc się dają tylko komórki  $H^+$  i ulegają degeneracji. Komórki populacji  $H^-$  w trakcie podziału dają komórki  $H^+$  i  $H^-$ . Wydaje się zatem, że komórki  $H^-$  są komórkami pierwotnymi i podlegają różnicowaniu w warunkach hodowli komórkowej. W przypadku komórek HeLa antygen **H** jest wygodnym markerem procesu różnicowania, natomiast biologiczne znaczenie syntezy antygeny **H** wymaga dalszych badań.

Zmiany ekspresji antygenów komórkowych wykazano w cyklu podziałowym komórki (36, 37). Komórki HeLa wykazują maksymalną ekspresję antygenu H-2 w trakcie mitozy (96, 97). Komórki białaczki mysiej i komórki P815Y w czasie podziału syntetyzują antygen grupowy B, który ulega degradacji w fazie spoczynkowej G<sub>0</sub> (36). Podobno stwierdzono zmiany dla antygeny A w komórkach królika RK13 (37). Biologiczne znaczenie tych zmian jest trudne do interpretacji, być może są one wynikiem blokowania czynnej biologicznie struktury receptorów komórki poprzez dołączenie końcowego cukru.

### III. Zmiany składu glikolipidowej błony komórkowej w procesach nowotworowych i transformacji wirusami onkogennymi

Badania ostatnich lat wykazały daleko idące zmiany metabolizmu glikolipidów w komórkach nowotworowych. Jeszcze wtedy gdy nie znano natury chemicznej antygenów grupowych, stwierdzono zanik aktywności grupowej A i B w nowotworach żołądka (98). H a k o m o r i i wsp. (99) zaobserwowali nagromadzenie się dużych ilości glikolipidu Le w adenokarcinomach nawet u ludzi o fenotypie Le<sup>b</sup>. Opisano znaczny wzrost zawartości antygeny I przy równoczesnym zaniku antygenów ABO w nowotworach jelita grubego (81). Zmiany te występowały zarówno w nowotworze pierwotnym jak i w przerzutach. Zmiany ekspresji antygenów komórkowych w procesach nowotworowych można uznać jako uproszczenie budowy antygenowej komórki i jej powrót do stanu embrionalnego.

Na początku lat siedemdziesiątych podjęto systematyczne badania składu glikolipidowego i metabolizmu glikolipidów w komórkach transformowanych wirusami onkogennymi w hodowli. Ten układ doświadczalny pozwala na dokładne śledzenie zachodzących zmian po transformacji onkogennej w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Wykazano, że fibroblasty chomika NIL2 po transformacji wirusami SV40 zmieniają drastycznie skład glikolipidowy (100, 101). I tak znacznej redukcji ulegają glikolipidy o długim łańcuchu oligosacharydowym, przyrasta zaś ilość glukozyloceramidu i laktozyloceramidu (100—103). Podobnym zmianom ulega skład gangliozydów (104, 105, 106). Stwierdzono korelację pomiędzy zawartością glikolipidów i gangliozydów w hybrydach komórek nowotworowych a ich zdolnością do tworzenia nowotworów (107). Komórki posiadające słabą zdolność tworzenia nowotworów zawierały stosunkowo dużą ilość „długich” glikolipidów, podczas gdy komórki o dużej potencji nowotworzenia nie zawierały wcale lub bardzo mało złożonych glikolipidów.

W 1973 roku Critchley i Macpherson zaobserwowali podobne zmiany w składzie glikolipidowym fibroblastów chomika NIL2 w czasie cyklu podziałowego komórki (102). Zauważyli oni, że zawartość

pentaheksocyloceramidu i tetraheksocyloceramidu wzrasta kilkakrotnie w fazie spoczynkowej komórki  $G_0$ , natomiast maleje w fazie S by osiągnąć minimum w trakcie mitozy i następnie znowu wzrasta w trakcie przechodzenia komórki w fazę  $G_1$ . Sugerują oni, że różnice w składzie glikolipidowym komórek nowotworowych i prawidłowych mogą wynikać z faktu, że komórki nowotworowe dzielą się stale i nigdy nie znajdują się w fazie spoczynkowej  $G_0$ .

Logicznym wnioskiem z opisanych prac było dodanie glikolipidów do komórek nowotworowych w hodowli, a znając zdolność inkorporacji glikolipidów w błonę komórkową można było w konsekwencji oczekiwać zmian w morfologii komórek, w typie wzrostu itp. Oczekiwano od takiego eksperymentu przywrócenia komórce nowotworowej przynajmniej pewnych cech komórki prawidłowej. Doświadczenia takie wykonano w kilku laboratoriach, po dodaniu glikolipidów do pożywki następowała ich szybka inkorporacja w błonę komórkową obserwowano także zwolnienie szybkości wzrostu i częściowe przywrócenie inhibicji kontaktowej (108—111). Najbardziej efektywnymi glikolipidami były mono-, dwu-, trój- i tetraheksocyloceramidy. Wydaje się, że uzyskany efekt był raczej nieswoisty, ponieważ glikolipidy, których ilość wzrasta po transformacji wirusowej, dodane do pożywki hamują pojawienie się zmian fenotypowych typowych dla komórek nowotworowych. Być może obserwowany efekt spowodowany był usztywniającym wpływem glikolipidów na strukturę błon biologicznych (112, 113). Z ogromnego materiału faktycznego o zmianach glikolipidów w cyklu komórkowym i procesach nowotworowych (99—106, 113—118) wynika, że biorą one udział w ważnych dla komórki procesach. Dokładne określenie ich roli w tych procesach jest jednak nieznane.

#### IV. Glikolipidy jako receptory niektórych toksyn bakteryjnych

Stwierdzenie reakcji pomiędzy gangliozydami i toksynami bakteryjnymi takimi jak toksyna cholery i toksyna tężca (119, 120) spowodowało znaczne nimi zainteresowanie. Toksyna cholery zbudowana jest z jednej podjednostki A i pięciu podjednostek B (121, 122). Podjednostka B jest odpowiedzialna za wiązanie się toksyny z receptorem komórkowym, a podjednostka A lub tylko jej część za aktywację cyklazy adenylowej (123). Van Heyningen wykazał, że gangliozydy mózgu wiążą toksynę i mogą blokować jej działanie biologiczne (124). Niezależnie prowadzone prace w kilku laboratoriach wykazały, że związkiem odpowiedzialnym za wiązanie toksyny z błoną komórkową jest gangliozyd  $G_{M1}$  (125—128). W działaniu toksyny można wyróżnić dwa etapy: wiązanie z błoną komórkową i następnie po pewnym ściśle określonym czasie aktywacja cyklazy adenylowej (128). Prawdopodobnie poprzez aktywację cyklazy adenylowej toksyna cholery powoduje szereg zmian w różnych komórkach i tak zwią-

sza lipolizę w komórkach tłuszczowych (129), hamuje syntezę DNA w fibroblastach (130, 132), hamuje syntezę sterydów w komórkach nadnerczy (132) i stymuluje sekrecję wody i elektrolitów w jelitach. Wykazano, że reaktywność toksyny jest wprost proporcjonalna do zawartości gangliozydu  $G_{MI}$  w szeregu komórkach różnych gatunków zwierząt (133, 134). W laboratorium *Bradley'ego* wyselekcjonowano linię komórkową nie zawierającą gangliozydu  $G_{MI}$  i nie wrażliwą na toksynę cholery (135). Komórki te inkorporowały dodany do hodowli gangliozyd i wtedy stawały się wrażliwe na działanie toksyny. Już po inkorporacji  $1,7 \times 10^8$  cząsteczek gangliozydu przez jedną komórkę dało się zauważyć działanie toksyny a maksymalny efekt następował po inkorporacji  $10^5$  cząsteczek gangliozydu (136). Gangliozyd  $G_{MI}$  indukuje zmiany konformacyjne w cząsteczce toksyny, których nie wywołują inne gangliozydy (136).

Istnieje szereg danych wskazujących na udział gangliozydów w wiązaniu toksyny tęcza przez komórki nerwowe (127, 137). Najbardziej aktywnym związkiem reagującym z toksyną są gangliozydy  $G_{Dib}$  i  $G_{Tl}$  (patrz wzór III). Toksyna tęcowa podobnie jak toksyna cholery zbudowana jest z dwóch podjednostek, stymuluje cyklazę adenylową i gangliozydy wywołują zmiany konformacyjne (119, 138, 139).

## V. Receptory toksyny z *Ricinus communis*

Toksyna otrzymana z nasion rącznika (*Ricinus communis*) jest silnym inhibitorem biosyntezy białka. Jest to białko o masie cząsteczkowej 64 000, zbudowane z dwóch podjednostek (140, 141). W ilości 0,1  $\mu\text{g/ml}$  powoduje całkowite zahamowanie biosyntezy białka w systemie bezkomórkowym po kilku minutach (142). Działanie toksyny jest katalityczne i inaktywuje ona około 1500 rybozomów na minutę a stała Michaelisa tej reakcji wynosi  $10^{-8}$  M (143). W działaniu toksyny na komórkę można wyróżnić trzy etapy, wiązanie z błoną komórkową, transport do wnętrza komórki i inhibicję biosyntezy białka.

W ostatnich latach wyizolowano szereg mutantów fibroblastów opornych na działanie tej toksyny (144). Komórki takie wiążą toksynę słabo i mogą żyć przy 100 krotnie większym jej stężeniu niż komórki dzikie. Toksyna często w piśmiennictwie nosi nazwę rycyny, w odróżnieniu od innego białka znajduwanego w nasionach rącznika o podobnych właściwościach w reakcji z polisacharydami, jednak o znacznie mniejszej toksyczności i masie cząsteczkowej 120 000.

W 1976 roku stwierdzono, że wyizolowane z erytrocytów ludzkich glikolipidy o długim łańcuchu oligosacharydowym wiążą toksynę i są inkorporowane w błonę komórkową (92, 145). Inkorporacja reagującego z toksyną glikolipidu do mutantów opornych na rycynę powoduje wzrost wiązania znakowanej jodem toksyny z błoną komórkową. Wiązanie tok-

syny jest praktycznie takie samo jak przez komórki dzikie. Niewrażliwe na toksynę mutanty fibroblastów po inkorporacji glikolipidu stają się wrażliwe (145). Inkorporacja 0,2  $\mu\text{g}$  przez  $10^6$  komórek opornych na toksynę uwrażliwia je tak, że po dodaniu toksyny następuje zahamowanie biosyntezy białka w 50%. Odszczepienie terminalnej galaktozy od glikolipidu powoduje jego całkowitą inaktywację jako receptora toksyny. Inkorporacja w błonę komórkową glikolipidów o krótkim łańcuchu oligosacharydowym reagujących z toksyną w warunkach *in vitro* nie powoduje jednak uwrażliwienia komórek opornych na toksynę. Wydaje się, że obserwowany efekt jest specyficzny dla „długich” glikolipidów. Tetraheksozyloceramid, trójkheksozyloceramid i laktozyloceramid nie dają podobnego efektu.

Doświadczenia te wykazują, że glikolipid wyizolowany z erytrocytów ludzkich może funkcjonować jako receptor toksyny w komórkach chomika, oraz, że inkorporacja glikolipidu nie jest zwykłą absorpcją lecz funkcjonalną integracją z innymi składnikami błony komórkowej.

## VI. Receptory glikoproteidowych hormonów przysadki

Prace ostatnich 10 lat prowadzone nad budową glikoproteidowych hormonów przysadki takich, jak hormon tyreotropowy (TSH), hormon luteinizujący (LH), hormon stymulujący dojrzewanie pęczyków Graafa (FSH) i choriogonadotropina (CG), wykazały duże podobieństwo w ich strukturze pierwszorzędowej (146—149). Zbudowane są one z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , a w łagodnych warunkach można otrzymać hybrydy zbudowane z podjednostek pochodzących od różnych hormonów (150—152). Tak na przykład można otrzymać hybrydy zbudowane z podjednostek  $\beta$  hormonu tyreotropowego i podjednostek  $\alpha$  hormonu stymulującego pęczyki Graafa lub podjednostek  $\alpha$  hormonu luteinizującego. Tak otrzymane hybrydy zachowują praktycznie całą aktywność biologiczną tego hormonu, z którego otrzymano podjednostkę  $\beta$ . Zupełnie niedawno zwrócono uwagę na pewne podobieństwa w budowie tych hormonów i toksyny cholery (143, 153, 154). Zauważono ponadto, że hormony te mogą reagować z gangliozydami (155, 156). Podobnie jak toksyny cholery hormony te łączą się z błoną komórkową komórek docelowych i ich działanie przejawia się w aktywacji cykazy adenylowej (157, 158). Receptorem hormonu mógł by być odpowiedni gangliozyd lub oligosacharyd o identycznej strukturze któregoś z glikoproteidów błony komórkowej. Ostatnio wiele prac poświęcono badaniu receptorów hormonu tyreotropowego i wykazano, że gangliozydy  $G_{D1b}$  i  $G_{T1}$  są inhibitorami wiązania hormonu tyreotropowego przez komórki tarczycy (156—160). Wiązanie gangliozydu do hormonu indukuje zmiany konformacyjne hormonu.

Z przedstawionych prac wynika, że za specyficzne wiązanie hormonu

przez komórkę odpowiada podjednostka  $\beta$ . Podjednostka ta łączy się z receptorem tkankowym, prawdopodobnie receptorem tym jest gangliozyd. Podjednostka  $\alpha$  odpowiada za stymulację cykazy adenylowej i jest podobna w wszystkich omawianych hormonach. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że receptorami glikoproteidowych hormonów przysadki są gangliozydy. Jeśli tak to w tkankach docelowych hormonu musiały by występować gangliozydy typowe dla danej tkanki. Jest mało prawdopodobne, by za swoiste wiązanie hormonu tyreotropowego przez komórki tarczycy były odpowiedzialne gangliozydy mózgu. Stwierdzenie inhibicji wiązania hormonu przez gangliozydy mózgu może wynikać z podobieństwa budowy tych gangliozydów z natywnym receptorem tkankowym. Niedawno Mullin i wsp. (156) wyizolowali z tarczycy wołowej gangliozyd posiadający znacznie większą aktywność w reakcji z hormonem tyreotropowym niż gangliozydy mózgu. Stanowi on około 0,015% ogólnej zawartości gangliozydów tarczycy. Wydaje się, że związek ten spełnia postulat swoistości tkankowej i prawdopodobnie jest receptorem hormonu. Wydaje się, że konieczna jest izolacja gangliozydów z poszczególnych tkanek docelowych hormonów glikoproteidowych, ich pełna charakterystyka chemiczna i wykazanie specyficzności tkankowej, zanim przyjmemy, że reakcja hormon — glikolipid *in vitro* jest powtórzeniem reakcji zachodzącej *in vivo*.

Artykuł nadszedł 21.1.1978; po rewizji autorskiej otrzymano 23.3.1978.

## Piśmiennictwo

1. Tudichum J. L. W., (1884), A treatise on the chemical composition of the brain, Bailliere, Tindal and Cox, London.
2. Karrsson K. A., (1964), *Acta Chem. Scand.*, **18**, 2395—2401.
3. Klenk E., Huang T. C., (1968), *Z. Physiol. Chem.*, **349**, 451—459.
4. Kiss J., (1969), *Adv. Carbohydrate Chem.*, **24**, 381—433.
5. Grob C. A., (1957), *Record Chem. Prog.*, **18**, 55—65.
6. Forstner G. G., Wherret J. R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 446—459.
7. Sactor B., (1977) w *Mammalian Cell Membranes*, red. Jamieson J. A., Robinson D. M., t. 4, str. 221—254, Butterworths, London.
8. Slomiany B. L., Slomiany A., Badurski J., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 319—336.
9. Czartoryska B., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 3—35.
10. Svennerholm L., (1963), *J. Neurochem.*, **10**, 613—623.
11. Gardas A., Kościelak J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **32**, 137—183.
12. Gardas A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **68**, 177—183.
13. Kościelak J., Miller-Podraza H., Krauze R., Piasek A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 9—18.
14. Clowes A. W., Cherry R. J., Chapman D. J., (1972), *J. Mol. Biol.*, **67**, 49—57.
15. Abrahamson S., Pascher J., Larsson K., Karlson K. A., (1972), *Chem. Phys. Lipids*, **8**, 152—179.



16. Zilversmith D. B., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3943—3948.
17. Kamp H., Wirtz K. W. A., (1974), *Methods in Enzymology*, red. Fleischer S., Packer L., t. 32, str. 140—146, Academic Press, New York.
18. Marcus D. M., Cass L., (1969), *Science*, **164**, 3943—3948.
19. Skipski V., (1973), *Tumor Lipids*, red. Wood R., str. 225—245, American Oil Chemistry Society Press, Champaign Ill.
20. Wiener A. S., (1943), *Blood groups and transfusion*, T. Springfield, New York.
21. Davidson I., Stejskal R., (1972), *Haematologia*, **6**, 177—184.
22. Joysey V. C., (1959), *Brit. Med. Bull.*, **15**, 158—164.
23. Springer G. P., (1956), *J. Immunol.*, **76**, 399—407.
24. Landsteiner K., (1960), *Zbl. Bakt.*, **27**, 357—362.
25. Watkins W. M., (1966), *Science*, **152**, 172—181.
26. Race R. R., Sanger R., (1975), *Blood groups in man*, wyd. 5, Blackwell Scientific Publications, London.
27. Tanher M. J. A., Jenkins R. E., Anstee D., Clamp J. R., (1976), *Biochem. J.*, **155**, 701—703.
28. Ghamberg C. G., Myllyla G., Leikola J., Pirkola A., Nordling S., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6108—6116.
29. Wiener A. S., Unger L. J., Cohen L., Feldman J., (1956), *Ann. Intern. Med.* **44**, 221—240.
30. Szulman A. E., (1965), *J. Histochem. Cytochem.*, **13**, 752—754.
31. Coombs R. R. A., Bedford D., Rouillard L. M., (1956), *Lancet*, **11**, 307—322.
32. Szulman A. E., (1966), *Ann. Rev. Med.*, **17**, 307—322.
33. Davidshon I., (1972), *Am. J. Clin. Pathol.*, **57**, 715—730.
34. Davidshon I., Ni Louisa Y., Stejskal R., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1244—1250.
35. Pann Ch., Kuhns W. J., (1976), *Exp. Cell Res.*, **98**, 73—78.
36. Thomas D. B., (1971), *Nature*, **233**, 317—321.
37. Franks D., Dawson A., (1966), *Exp. Cell Res.*, **42**, 543—550.
38. Morgan W. T. J., van Heyningen R., (1944), *Brit. J. Exp. Pathol.*, **25**, 5—15.
39. Morgan W. T. J., (1960), *Proc. Roy. Soc. B.*, **151**, 308—347.
40. Kabat E. A., (1956), *The blood group substances*, Academic Press, New York.
41. Painter T. J., Watkins W. M., Morgan W. T. J., (1963), *Nature*, **199**, 282—283.
42. Watkins W. M., (1974), *The red blood cell*, t. 1, str. 293—360, wyd. 2, Academic Press, New York.
43. Landsteiner K., vander Scheer J., (1925), *J. Exp. Med.*, **42**, 123—130.
44. Kościelak J., (1963), *Biochem. Biophys. Acta*, **78**, 313—328.
45. Hakomori S., Strycharz G. D., (1968), *Biochemistry*, **7**, 1279—1283.
46. Kościelak J., Piasek A., Górniak H., Gardas A., Gregor A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 214—225.
47. Stellner K., Watanabe K., Hakomori S., (1973), *Biochemistry*, **12**, 656—661.
48. Kościelak J., (1967), *Methods in Immunology and Immunochemistry*, red. Williams C. A., Chase M. W., t. 1, str. 81—87, Academic Press, New York.
49. Hakomori S., Siddiqui B., (1974), *Methods In Enzymology*, red. Fleishers. Packer S., t. 32, str. 345—367, Academic Press, New York.
50. Zahler P., (1968), *Vox Sang.*, **15**, 81—101.
51. Liotta J., Quiniliani M., Buzzonetti E., Giuliarni E., (1972), *Vox Sang.*, **22**, 171—182.
52. Fakuda M., Osawa T., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5100—5105.

53. Gardas A., Kościelak J., (1971), *Vox Sang.*, **20**, 137—149.
54. Gardas A., Kościelak J., (1974), *FEBS Letters*, **42**, 101—104.
55. Smith L., Unrau A. M., (1959), *Chem. Ind.*, str. 881.
56. Bobitt J. M., (1956), *Adv. Carbohydrate Chem.*, **11**, 1—46.
57. Marshall R. D., Neuberger A., (1972), *Glycoproteins: their composition structure and function*, red. Gottschalk A., wyd. 2, t. 1, str. 323—372, Elsevier, Amsterdam.
58. Boveng H. C., Lindberg L., (1960), *Adv. Carbohydrate Chem.*, **15**, 53—75.
59. Marschall R. D., Neuberger A., (1972), *Glycoproteins: their composition structure and function*, red. Gottschalk A., wyd. 2, t. 1, str. 224—295, Elsevier, Amsterdam.
60. Landsteiner K., Levine P., (1927), *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, **24**, 941—942.
61. Cameron G. L., Staveley J. M., (1957), *Nature*, **179**, 147—158.
62. Watkins W. M., Morgan W. T. J., (1962), *Proc. 9th Congr. Int. Soc. Blood Transf.*, Mexico, str. 225—229, Karger, Basel.
63. Morgan W. T. J., Watkins W. M., (1962), *Proc. 9th Congr. int. Soc. Blood Transf. Mexico*, str. 225—229, Karger, Basel.
64. Cory T., Yates A. D., Donald A. S. R., Watkins W. M., Morgan W. M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 1289—1296.
65. Yates A. D., Morgan W. T. J., Watkins W. M., (1976), *FEBS Letters*, **60**, 281—285.
- 65a. Watkins W. M., Morgan W. T. J., (1976), *J. Immunogenetics*, **3**, 15—27.
66. Marcus D. M., (1971), *Ttransfusion*, **11**, 16—18.
67. Naiki M., Marcus D. M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1005—1111.
68. Naiki M., Fong J., Ledeen R., Marcus M. D., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4831—4837.
69. Fellous M., Garbal A., Tessier C., Frezal J., Duset J., Salmon C., (1972), *Bull. Eur. Soc. Hum. Genet.*, str. 16.
70. Fellous M., Garbal A., Tessier C., Frezal J., Duset J., Salmon C., (1974), *Vox Sang.*, **26**, 518—536.
71. Cedergran B., (1973), *Hereditas*, **73**, 27—30.
72. Race R. R., Sanger R., (1975), *Blood groups in man*, wyd. 6, str. 139—171, Blackwell Scientific Pub., London.
73. Marcus D. M., Naiki M., Kundu S. K., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3263—3267.
74. Kościelak J., Miller-Podraza H., Krause R., Cedergran B., (1976), *FEBS Letters*, **66**, 250—253.
75. Gardas A., Watkins W. M., dane nieopublikowane.
76. Wiener A. S., Unger L. J., Cohen L., Feldman J., (1956), *Ann. Inter. Med.*, **44**, 221—240.
77. Wiener A. S., Moor-Jankowski J., Gordon I. B., Davies J., (1965), *Am. J. Phys. Anthrop.*, **23**, 389—396.
78. Dacie J. V., (1962), *The haemolytic anemias, congenital and acquired*, wyd. 2, Churchill J. A., London.
79. Cooper A. G., Hoffbrand A. V., Worledge S. M., (1968), *Brit. J. Haemat.*, **15**, 381—387.
80. McGinnies M. H., Schmidt P. J., Carbone P. P., (1964), *Nature*, **202**, 606.
81. Feizi T., Turberville C., Westwood J. M., (1975), *Lancet*, **1**, 391—393.

82. Race R. R., Sanger R., (1975), Blood groups in man, wyd. 6, str. 447—462, Blackwell Scientific Publication, London.
83. Harboe M., (1971), *Vox Sang.*, **20**, 289—305.
84. Marsch W. L., Nichols M., Allen F. H., (1975), *Vox Sang.*, **18**, 149—154.
85. Doinel C., Ropas C., Salmon C., (1975), *Vox Sang.*, **28**, 371—375.
86. Jackson V. A., Issit P. D., Francis B. J., Garris M. L., Sanders C. W., (1968), *Vox Sang.*, **15**, 152—153.
87. Dzierzkowa-Borodej W., Seyfried H., Lisowska E., (1970), *Life Sci.*, **9**, 111—112.
88. Feizi T., Kabat E. A., Vicari G., Andersson B., Marsch W. L., (1971), *J. Immunol.*, **106**, 1247—1258.
89. Feizi T., Kabat E. A., (1972), *J. Exp. Med.*, **135**, 1247—1258.
90. Feizi T., Kabat E. A., (1974), *J. Immunol.*, **112**, 145—150.
91. Gardas A., Kościelak J., (1974), *Vox Sang.*, **26**, 227—237.
92. Gardas A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **68**, 185—191.
93. Watanabe K., Laine A., Hakomori S., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2725—2733.
94. Kuhns W. J., Pann Ch., (1973), *Am. J. Pathol.*, **73**, 789—806.
95. Kuhns W. J., Pann Ch., Bromson S., (1972), *Am. J. Pathol.*, **69**, 389—406.
96. Cikes M. J., (1970), *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**, 979—988.
97. Cikes M. J., Friberg S., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 566—569.
98. Masamune H., Kawasaki H., Abe S., Cyama K., Yamaguchi T., (1959), *Tohoku J. Exp. Med.*, **68**, 81—91.
99. Hakomori S., Kościelak J., Bloch H., Jeanloz R. W., (1967), *J. Immunol.*, **198**, 81—91.
100. Robins P. W., Macpherson I., (1971), *Nature*, **229**, 569—570.
101. Hakomori S., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1741—1747.
102. Critchley D. R., Macpherson I., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **246**, 145—159.
103. Nigam V. N., Lallier R., Brailovsky C., (1973), *J. Cell Biol.*, **58**, 307—316.
104. Mora P. T., Brady R. O., Bradley R. H., McFarland V. M., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 1290—1296.
105. Brady R. O., Mora P. T., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 308—309.
106. Hakomori S., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **417**, 55—89.
107. Itaya K., Hakomori S., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1568—1571.
108. Lain R. A., Hakomori S., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1039—1045.
109. Keenan T. W., Franke W. W., Wiegandt H., (1974), *Z. Physiol. Chem.*, **355**, 1543—1548.
110. Keenan T. W., Schmid E., Franke W. W., Wiegandt H., (1975), *Exp. Cell Res.*, **92**, 259—270.
111. Brailovsky C., Trudel M., Lallier R., Nigam V. N., (1973), *J. Cell Biol.*, **57**, 124—132.
112. Shipley A., (1973), w *Biological Membranes*, red. Chapman D., Wallach D. F., t. 2, str. 1—86, Academic Press, London.
113. Oldfield E., Chapman D., (1972), *FEBS Letters*, **21**, 303—306.
114. Siddiqui B., Hakomori S., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 254—261.
115. Yogeswaran G., Sheinin R., Wherret J., Murray R. K., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5146—5158.
116. Siddiqui B., Hakomori S., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 2930—2937.

117. Hildebrand J., Stryckmans P., Vanouhd J., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, **260**, 272—278.
118. Seifert H., Uhlenbruck G., (1965), *Naturwissenschaft*, **52**, 190—191.
119. Helting T. B., Zwisler O., Wiegand H., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 194—198.
120. van Heiningen W. E., (1974), *Science*, **183**, 656—658.
121. Cuatrecasas P., Parikh J., Hollenberg M. D., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4253—4264.
122. Holmgren M. D., Lönnroth J., (1975), *J. Gen. Microb.*, **84**, 49—55.
123. Benett V., O'Keefe E., Cuatrecasas P., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 30—37.
124. van Heiningen W. E., (1974), *Nature*, **249**, 415—417.
125. Hollmgren J., Lönnroth J., Svennerholm L., (1973), *Infec. Immun.*, **8**, 208—214.
126. King A., van Heiningen W. E., (1973), *J. Infec. Dis.*, **127**, 639—647.
127. Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3558—3567.
128. Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3547—3557.
129. Greenough W. B., Pierce N. P., Vaughan M., (1970), *J. Infec. Dis.*, **121**, 111—113.
130. Hollenberg M. D., Cuatrecasas P., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2964—2968.
131. Hollenberg M. D., Fishman P. M., Benett V., Cuatrecasas P., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4224—4228.
132. Donta S. M., King M., Sloper K., (1973), *Nature New Biology*, **243**, 246—247.
133. Hollmgren J., Lönnroth J. E., Mansson J. E., Svennerholm L., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2520—2529.
134. O'Keefe E., Cuatrecasas P., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2500—2504.
135. Moss J., Fishman P. M., Manganiello V. C., Vaughan M., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1034—1037.
136. Moss J., Osborne J. C., Fishman P. M., Brewer H. B., Vaughan M., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 74—78.
137. van Heiningen W. E., (1973), *J. Gen. Microb.*, **31**, 375—387.
139. Kohn L. D., (1977), *Ann. Rev. Med.*, **28**, 1—12.
140. Nicolson G. L., Blaustein M., Etzler M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 196—204.
141. Refsnes K., Olsnes S., Pihl A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3557—3562.
142. Nicolson G. L., Lacorbier M., Hunter T. B., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 144—155.
143. Olsnes S., Fernandez C., Lacorbier M., Hunter T. B., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **60**, 281—288.
144. Meager A., Unglitchnukit A., Hughes R. C., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 113—124.
145. Hughes R. C., Gardas A., (1976), *Nature*, **264**, 63—66.
146. Tager H. T., Steiner D. F., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 509—538.
147. Belisario R., Carlsen R. B., Bahl O. P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6796—6809.
148. Liu W. K., Nahm H. S., Sweeney C. M., Holcomb G. H., Ward D. N., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4365—4368.
149. Morgan F. J., Birken S., Canfield R. E., (1973), *Mol. Cell Biochem.*, **2**, 97—99.
150. Liao T. H., Pierce J. G., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3275—3281.

151. Pierce J. G., Bahl O. P., Cornel J. B., Swaminathan N., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2321—2324.
152. Reichert L. H., (1972), *Endocrinology*, **90**, 1119—1122.
153. Kurosky A., Markel D. E., Peterson J. W., Fitch W. M., (1977), *Science*, **195**, 299—301.
154. Mullin B. R., Fishman P. H., Lee G., Aloj S. M., Ledley R. J., Winand L. D., Kohn L. D., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 842—846.
155. Ledley L. D., Mullin B. R., Lee G., Aloj S. M., Fishman P. H., Hunt L. I., Dayhoff M. D., Kohn L. D., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 852—853.
156. Mullin B. R., Pacuszka T., Lee G., Kohn L. D., Brady R. O., Fishman P. H., (1978), *Science*, **199**, 77—81.
157. Robinson G. A., Buther R. W., Sutherland E. W., (1971), *Cyclic AMP*, Academic Press.
158. Hardman J. G., Robinson G. A., Sutherland E. W., (1971), *Ann. Rev. Physiol.*, **33**, 311—336.
159. Meldolesi M. F., Fishman P. H., Aloj S. M., Kohn L. D., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 4060—4064.
160. Lee G., Grolman E. P., Aloj S. M., Kohn L. D., Winand R. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 139—146.



KRYSTYNA BYTNIEWSKA \*)

## Karboksylaza/oksygenaza rybulozodwufosforanu

### Ribulose-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Właściwości fizyko-chemiczne karboksylazy/oksygenazy RuDP
- III. Właściwości enzymatyczne
- III-1. Karboksylaza RuDP
- III-2. Oksygenaza RuDP
- IV. Budowa karboksylazy/oksygenazy RuDP
- V. Miejsca syntezy karboksylazy/oksygenazy RuDP
- V-1. Mała podjednostka
- V-2. Duża podjednostka
- V-3. Schematy syntezy
- VI. Występowanie karboksylazy/oksygenazy w materiale roślinnym
- VII. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Physico-chemical properties of RuDP carboxylase/oxygenase
- III. Enzymatic properties
- III-1. RuDP carboxylase
- III-2. RuDP oxygenase
- IV. Structure of RuDP carboxylase/oxygenase
- V. Sites of synthesis of RuDP carboxylase/oxygenase
- V-1. Small subunit
- V-2. Large subunit
- V-3. Schemes of synthesis
- VI. Occurrence of carboxylase/oxygenase in plant materials
- VII. Final remarks

---

\*) Dr, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

Wykaz stosowanych skrótów: RuDP — rybulozo-1,5-dwufosforan; karboksylaza/oksygenaza RuDP — karboksylaza/oksygenaza rybulozo-dwufosforanu; 3-PGA — 3-fosfoglicerynian; P-glikolan — fosfoglikolan; PEP — fosfoenolopirogronian; karboksylaza PEP — karboksylaza fosfoenolopirogronianu.

## I. Wstęp

Białka zawarte w liściach są przedmiotem bardzo wnikliwych badań. Jednym z najdokładniej poznanych białek liści jest enzym karboksylaza/ /oksygenaza rybulozo-dwufosforanu (EC. 4.1.1.39, karboksylaza 3-fosfo-D-glicerynianu, dimeryzująca) (1—7). Enzym ten bierze udział zarówno w karboksylacji jak i w utlenianiu rybulozo-1,5-dwufosforanu (RuDP). Karboksylacja RuDP zachodzi podczas fotosyntezy, utlenianie ma miejsce w procesie fotooddychania roślin. Fizyko-chemiczne właściwości karboksylazy/oksygenazy RuDP poznano wcześniej niż właściwości enzymatyczne i przypisywano je białku, które określano pierwotnie jako frakcja I białka (ang. *Fraction I Protein*).

Trzydzieści lat temu, nazwę „frakcja I białka” odnoszono do łatwo rozpuszczalnego białka, które można było wyekstrahować w dużych ilościach z liści szpinaku. Na podstawie ówczesnie stosowanych metod elektroforetycznych białko to opisywano jako homogenne (1). Niespełna 4 lata później wykazano na podstawie analizy sedymentacyjnej, że białko zawarte w homogenatach liści szpinaku nie jest jednorodne, połowę ogólnej ilości białek stanowiło białko, które charakteryzowało się bardzo wysoką masą cząsteczkową i znacznym stopniem homogenności. Od tej pory, nazwę: frakcja I białka zaczęto stosować jedynie do określenia tego wysoko cząsteczkowego białka (7). Białko o podobnej charakterystyce wykryto również w homogenatach liści roślin innych gatunków. Następnie stwierdzono, że frakcja I białka występuje w chloroplastach liści (8, 9).

Wyizolowanie karboksylazy rybulozo-1,5-dwufosforanu (2—4) oraz stwierdzenie, że występuje ona tylko w chloroplastach liści (10) a także określenie jej właściwości fizyko-chemicznych (7) pozwoliło na wniosek, że polipeptyd określany uprzednio jako frakcja I białka jest w rzeczywistości karboksylazą RuDP (7).

Na początku lat 70-tych wykazano, że karboksylaza RuDP uczestniczy nie tylko w karboksylacji rybulozo-1,5-dwufosforanu, lecz także w procesie utleniania RuDP (5, 6, 11). Obecnie, po przeprowadzeniu wnikliwych badań utożsamia się białko określane uprzednio jako frakcja I białka z karboksylazą/oksygenazą RuDP. Niektórzy autorzy stosują nadal historyczną nazwę, frakcja I białka.

## II. Właściwości fizyko-chemiczne karboksylazy/oksygenazy RuDP

Po zhomogenizowaniu liści, dokładnym rozbiciu ścian i organelli komórkowych, do roztworów buforowych o pH powyżej 6,5 przechodzi znaczna ilość łatwo rozpuszczalnego białka (7). Analiza sedymentacyjna takiego homogenatu umożliwiła wyróżnienie w nim kilku rodzajów białek. Około 10% stanowiły szybko sedymentujące białka rybosomów cytoplazmy (80 S) i chloroplastów (70 S), 40% obejmowała forma białka 4—6 S. Frak-



cja I białka stanowiła aż 50% łatwo rozpuszczalnych białek liści (7). Zastosowanie takich technik jak frakcjonowania za pomocą siarczanu amonu, chromatografia na kolumnach DEAE celulozy, sączenie molekularne przez Sephadex i ultrawierowanie, umożliwiło wyodrębnienie frakcji I białka w postaci jednorodnego składnika charakteryzującego się stałą wartością sedymentacji około 18 S. Wartość stałej sedymentacji karboksylazy/oksygenazy RuDP izolowanej z chloroplastów liści różnych roślin różniła się nieco i wynosiła w przypadku koniczyny 16,2 S, buraka 18,3 S, kapusty 17,0 S owsa 18,2 S (7), oraz tytoniu 18,1 S, szpinaku 18,2 S (12). Niewielkie odchylenia od wartości średniej wskazują, że w stanie uwodnionym opisywane białko jest prawie sferyczną cząsteczką.

Karboksylaza/oksygenaza RuDP jest białkiem o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej. Masa cząsteczkowa tego enzymu izolowanego z liści buraka i owsa wynosi 570 000 (13, 14), z liści kapusty 510 000 (15), z liści tytoniu 525 000 (7).

Wstępne analizy frakcji I białka wykazały, że zawiera ona nie tylko aminokwasy, lecz także węglowodany (13, 16), lipidy (13) i składniki mineralne (13), nie stwierdzono natomiast obecności kwasów nukleinowych (17). Badania składu chemicznego krystalicznej karboksylazy/oksygenazy RuDP wykluczyły obecność w niej węglowodanów (18) oraz nukleotydu flawinowego (19). Stwierdzono, że karboksylaza/oksygenaza RuDP wyizolowana z liści szpinaku zawiera 0,11—0,14 gramoatomu miedzi w 1 cząsteczce (6), krystaliczny enzym otrzymany z liści tytoniu zawiera około 0,2 gramoatomu Cu w cząsteczce (19).

Obecnie istnieje szereg metod za pomocą których można otrzymać czystą karboksylazę RuDP (13, 20—25). Do ekstrakcji tego białka używa się najczęściej buforu Tris-HCl pH 7,4—7,8 zawierającego NaCl, MgCl<sub>2</sub>, EDTA, merkaptoetanol. Karboksylaza RuDP należy do nielicznych białek liści, które udało się uzyskać w postaci krystalicznej (21, 22, 26—28). Enzym ekstrahowany z *Nicotiana tabacum* (tytoń szlachetny) krystalizuje łatwiej niż karboksylaza RuDP ekstrahowana z roślin innych gatunków *Nicotiana* (22, 28). Pojedynczy kryształ karboksylazy z *N. tabacum* posiada 14 wierzchołków i 12 równoległobocznych ścian (21, 26). Ściany kryształów są ustawione pod kątem 60°. Ponadto powierzchnie ścian posiadają kąty ostre wynoszące 70,32° i kąty rozwarte 109,68°.

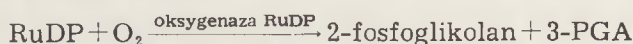
Krystaliczna forma frakcji I białka z *Nicotiana tabacum* charakteryzuje się aktywnością karboksylazy/oksygenazy RuDP (19, 27, 29, 30). Właściwa aktywność nie ulega zmianie podczas 12-dniowego przechowywania kryształów w temperaturze pokojowej. Natomiast przetrzymywanie kryształów w łaźni lodowej przez 24—48 godzin powoduje utratę około 50—70% aktywności karboksylazy/oksygenazy RuDP. Dwudziestominutowa inkubacja kryształów w temperaturze 50°C może prowadzić do powrotu cząsteczki enzymu do konformacji warunkującej aktywność enzymatyczną.

### III. Właściwości enzymatyczne

Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-dwufosforanu (EC. 4.1.1.39) uczestniczy zarówno w procesie fotosyntezy jak i fotooddychania roślin. W fotosyntezie, w pierwszych etapach przyswajania CO<sub>2</sub>, enzym ten działa jako karboksylaza i katalizuje powstawanie 2 cząsteczek 3-fosfoglicerynianu (3-PGA) z rybulozo-1,5-dwufosforanu (RuDP) i CO<sub>2</sub> (2—4).



W procesie fotooddychania enzym ten działa jako oksygenaza RuDP. W jej obecności następuje przyłączenie tlenu do RuDP i powstanie 2-fosfoglikolanu i 3-PGA (5, 6, 11).



Tlen i dwutlenek węgla pełnią rolę inhibitora i substratu w reakcji karboksylacji oraz odwrotnie, substratu i inhibitora w reakcji utleniania RuDP. CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> współzawodniczą zapewne o to samo lub sąsiednie aktywne miejsce karboksylazy/oksygenazy RuDP (31, 32).

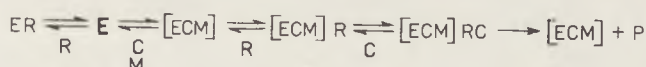
#### III-1. Karboksylaza RuDP

Substratami karboksylazy RuDP są RuDP i CO<sub>2</sub> (33, 34). Wykazano, że HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> nie jest substratem karboksylazy (33). W reakcji enzymatycznej uczestniczą jony magnezu (34), fosforany cukrów prostych (29, 35). W warunkach *in vitro* szybkość reakcji enzymatycznej zależy od kolejności dodawania substratu i karboksylazy (36). Jeżeli enzym początkowo inkubuje się z CO<sub>2</sub> i Mg<sup>+2</sup> a RuDP wprowadza się do mieszaniny inkubacyjnej później, to 3-PGA powstaje bardzo szybko. Jeżeli uprzednio nie inkubować enzymu z CO<sub>2</sub> i Mg<sup>+2</sup>, reakcja zostaje zainicjowana z pewnym opóźnieniem (33, 35, 37—39). Te obserwacje wskazują, że CO<sub>2</sub> i Mg<sup>+2</sup> aktywują karboksylazę RuDP. Ponadto w obecności CO<sub>2</sub> i Mg<sup>+2</sup> enzym znajduje się w aktywnej stabilnej formie (40). Aktywacja enzymu zależy od stężenia CO<sub>2</sub> i Mg<sup>+2</sup> oraz od pH (33).

Wartość stałej Michaelisa K<sub>m</sub> (RuDP) waha się w granicach 1,0—3,0 × 10<sup>-4</sup> M (2, 12, 15, 37). Określenie powinowactwa karboksylazy RuDP do drugiego substratu, tj. CO<sub>2</sub> nastęrczało wiele trudności, autorzy podawali różne wartości K<sub>m</sub> (CO<sub>2</sub>) (11, 37, 41—44). Różne wartości stałej Michaelisa wskazywały na zmianę właściwości karboksylazy przed ekstrakcją i po ekstrakcji (45). Wartość K<sub>m</sub> (CO<sub>2</sub>) zależy bowiem od warunków doświadczenia (*in vivo* i *in vitro*), od obiektu badań, od stężenia CO<sub>2</sub> i Mg<sup>+2</sup> oraz obecności fosforanów cukrów prostych (33, 39, 40, 46). Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach wykazały, że karboksylaza może występować w dwu formach, które różnią się powinowactwem do CO<sub>2</sub> (40, 45, 46). Przypuszcza się, że karboksylaza RuDP wy-

stępuje w roślinie jednocześnie w formie aktywnej i nieaktywnej (47), lub, że występuje ona w jednej lub drugiej formie (40, 46). W ekstraktach liści szpinaku wykryto karboksylazę RuDP o wysokiej wartości  $K_m$  ( $\text{CO}_2$ ) wynoszącej ponad  $200 \mu\text{M}$   $\text{CO}_2$  oraz karboksylazę RuDP, która charakteryzowała się niską wartością  $K_m$  ( $\text{CO}_2$ ), tj. około  $20 \mu\text{M}$  (46). Drugą formę karboksylazy otrzymywano, jeśli enzym ekstrahowano w obecności jonów magnezu i takiego stężenia  $\text{CO}_2$  jak w powietrzu atmosferycznym. Właściwości karboksylazy o niskiej  $K_m$  ( $\text{CO}_2$ ) są podobne do właściwości karboksylazy RuDP funkcjonującej *in vivo*, jest ona stabilna w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Wydaje się, że karboksylaza o niskiej  $K_m$  ( $\text{CO}_2$ ) jest jedyną czynną formą tego enzymu. Enzym o wysokiej  $K_m$  ( $\text{CO}_2$ ) może przejść w obecności  $\text{CO}_2$  i  $\text{Mg}^{+2}$  w aktywną formę (46). Karboksylazę o niskiej  $K_m$  ( $\text{CO}_2$ ) można wyekstrahować według metody podanej przez Lorimera i wsp. w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  i przy pH 8,2 (39).

Ostatnio opracowano schemat aktywacji i reakcji katalizowanej przez karboksylazę RuDP (34). W procesie aktywacji karboksylazy biorą udział kolejno: cząsteczka  $\text{CO}_2$  i jony magnezu (33, 34). Przyłączanie  $\text{CO}_2$  do cząsteczki enzymu jest procesem powolnym w porównaniu z przyłączeniem  $\text{Mg}^{+2}$ . W procesie aktywacji enzymu powstają kompleksy enzymu z  $\text{CO}_2$  i enzymu —  $\text{CO}_2$  z  $\text{Mg}^{+2}$ . Laing i Christeller (34) sugerują, że RuDP może wiązać się zarówno z aktywnym jak i nieaktywnym enzymem obniżając w ten sposób szybkość zmian jednej formy enzymu w drugą. Jony magnezu są konieczne do aktywacji cząsteczki enzymu, lecz same nie uczestniczą w reakcji enzymatycznej.  $\text{CO}_2$  aktywuje cząsteczkę karboksylazy RuDP oraz bierze udział w samej karboksylacji. Enzym ma prawdopodobnie dwa miejsca wiązania  $\text{CO}_2$ . Jedna cząsteczka  $\text{CO}_2$  przyłącza się do karboksylazy przed związaniem enzymu z RuDP, a druga po przyłączeniu tego substratu. Aktywacja enzymu i karboksylacja RuDP przebiegają według następującego schematu (34)

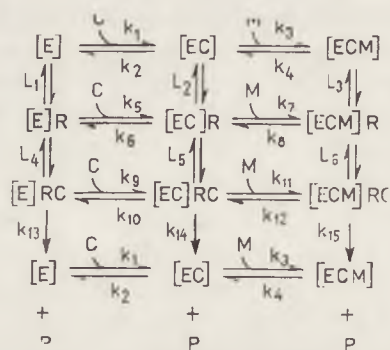


**Ryc. 1.** Schemat aktywacji i reakcji katalizowanej przez karboksylazę RuDP (34). (E — nieaktywny enzym, ECM — kompleks enzymu z  $\text{CO}_2$  i  $\text{Mg}^{+2}$ , C —  $\text{CO}_2$ , M —  $\text{Mg}^{+2}$ , R — RuDP, P — 3-PGA).

Laing i Christeller (34) proponują następujący dokładny schemat aktywacji i reakcji katalizowanej przez karboksylazę rybulozodwufosforanu:

Etapy reakcji oznaczone za pomocą stałych  $k_i$  (dla  $i = 1-15$ ) przebiegają według zasad klasycznej kinetyki enzymatycznej. Etapy oznaczone stałymi  $L_i$  (dla  $i = 1-6$ ) osiągają bardzo szybko stan równowagi. Jak wynika z przytoczonego schematu, nieaktywny enzym może także łączyć się z RuDP dając kompleks: enzym—RuDP, który nie jest jednak aktywowa-

ny przez  $\text{CO}_2$  i  $\text{Mg}^{+2}$ . Autorzy zakładają, że szybkość reakcji  $k_5$ ,  $k_9$ ,  $k_{13}$ ,  $k_{14}$  wynosi prawdopodobnie zero, można więc przypuszczać, że reakcje te nie zachodzą w rzeczywistości.



**Ryc. 2.** Aktywacja karboksylazy i reakcja katalizowana przez karboksylazę RuDP (34). (E, ECM, M, C, R, P — jak na ryc. 1,  $k_{1-15}$  — etapy reakcji, które przebiegają według klasycznej kinetyki enzymatycznej,  $L_{1-6}$  — etapy reakcji, które osiągną bardzo szybko stan równowagi).

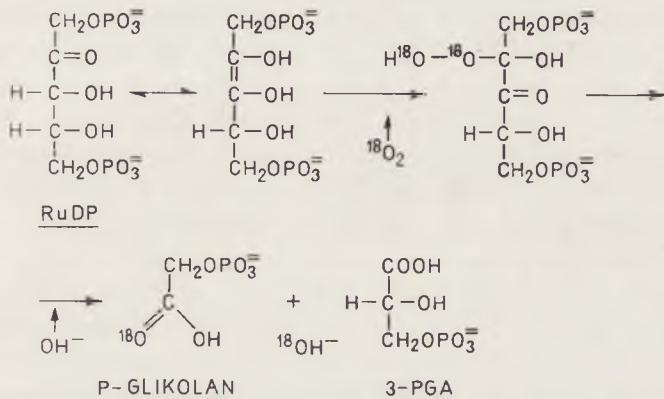
### III-2. Oksygenaza RuDP

Jak już wspomniano, karboksylazie RuDP (frakcji I białka) przypisuje się obecnie także właściwości oksygenazy RuDP. Omawiany enzym uczestniczy bowiem w utlenianiu rybulozo-dwufosforanu w procesie fotooddechania roślin (5,6). Zaobserwowano, że w obecności karboksylazy RuDP następuje przyłączanie tlenu do rybulozo-1,5-dwufosforanu (11). Oczyszczone preparaty karboksylazy RuDP otrzymane z liści soi i szpinaku powodowały aktywne przyłączanie tlenu do RuDP i powstawanie 3-fosfoglicerynianu oraz 2-fosfoglikolanu (5, 6). Wyniki dalszych badań potwierdziły, że karboksylaza RuDP otrzymana z roślin wyższych (6, 31, 32, 47, 48), z glonów (49), oraz z bakterii fotosyntetyzujących (50, 51) pełni rolę zarówno karboksylazy jak i oksygenazy.

Oksygenazowa aktywność karboksylazy RuDP zależy od stężenia  $\text{CO}_2$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  oraz od wartości pH (5, 39, 46, 52). Preinkubacja oksygenazy RuDP z  $\text{CO}_2$  i  $\text{Mg}^{+2}$  jest konieczna dla całkowitej aktywacji enzymu (52). Powoduje ona tworzenie się kompleksu enzym- $\text{CO}_2$ - $\text{Mg}^{+2}$ . Analogicznie, jak w przypadku karboksylazy RuDP (33), usunięcie kofaktorów ze środowiska powoduje inaktywację oksygenazy RuDP (52). Ponieważ  $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$  wzajemnie oddziałują konkurencyjnie na aktywne centrum enzymu, aktywowanie oksygenazy przez  $\text{CO}_2$  i  $\text{Mg}^{+2}$  wskazują, że cząsteczka  $\text{CO}_2$  aktywująca oksygenazę i cząsteczka  $\text{CO}_2$ , która bierze udział w karboksylacji, to nie te same cząsteczki. Obydwie funkcje enzymu (karboksylacja i utlenianie) są ściśle ze sobą związane (52). Wykazano, że jedynie cząsteczka karboksylazy RuDP o niskiej  $K_m$  ( $\text{CO}_2$ ) ma *in vivo* właściwości oksygenazy RuDP (46). Fosforany cukrów prostych (29),  $\text{HCO}_3^-$  (53), KCN

(6, 53), kwas glicydowy, jodoacetoamid (20) hamują oksygenazową aktywność karboksylazy RuDP. Prawdopodobnie, inaktywacyjne działanie KCN polega na powstaniu z KCN i RuDP pośredniego związku, hydroksynitrylu (53). Wartości stałej Michaelisa  $K_m$  (RuDP),  $K_m$  ( $Mg^{+2}$ ) i  $K_m$  ( $O_2$ ) wynoszą odpowiednio: 22  $\mu M$ , 0,5 mM (53), 0,22 mM (46).

Przebieg reakcji katalizowanej przez oksygenazę RuDP w warunkach *in vitro* i prawdopodobnie również *in vivo*, można przedstawić następująco:



Ryc. 3. Reakcja katalizowana przez oksygenazę RuDP (6).

Do grupy karboksylowej fosfoglikolanu włącza się tylko jeden atom cząsteczki tlenu. Według niektórych autorów (20) początkowo następuje przekształcenie cząsteczki  $O_2$  w anionowy rodnik nadtlenkowy ( $O_2^{\cdot -}$ ), po czym ulega utlenieniu grupa sulfhydrylowa znajdująca się w aktywnym centrum cząsteczki enzymu. Inkubacja karboksylazy/oksygenazy RuDP z substancjami inaktywującymi grupy  $SH^-$  (kwasem glicydowym, jodoacetoamidem) powoduje zahamowanie 82% właściwej aktywności.

#### IV. Budowa karboksylazy/oksygenazy RuDP

Traktując karboksylazę RuDP roztworami o alkalicznym odczynie pH, mocznikiem, kwasem octowym, siarczanem dodecyłu sodu wykazano, że białko to może dysocjować na mniejsze fragmenty charakteryzujące się stałą sedymentacji około 3 S (13, 54, 55). Stwierdzono, że cząsteczka karboksylazy składa się z dużych i małych podjednostek. Masa cząsteczkowa dużej podjednostki białka izolowanego z liści buraka, szpinaku, tytoniu wynosi 52 000—55 800 (12, 55, 56). Masa cząsteczkowa małej podjednostki karboksylazy otrzymanej z liści buraka, szpinaku, fasoli i bobu wynosi 12 000—16 000 (55—57). Mała podjednostka izolowana w środowisku alkalicznym posiada masę cząsteczkową 22 000—24 500 (12, 57). Niektórzy

autorzy przypuszczają, że anormalnie wysoka masa cząsteczkowa tego białka w środowisku alkalicznym jest spowodowana dimeryzacją małej podjednostki (57). Jednak według innych (58), pomiar lepkości właściwej małej podjednostki (w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 12,0) wskazuje na możliwość występowania tego białka w postaci asymetrycznej i monomerycznej również w środowisku alkalicznym.

Analiza składu aminokwasowego wykazała znaczne różnice między zawartością poszczególnych aminokwasów w dużych i małych podjednostkach (7, 59). Bardziej interesujące wydaje się jednak porównanie zawartości aminokwasów w podjednostkach białka izolowanego z liścia różnych gatunków (szpinaku, tytoniu, buraka). Skład aminokwasowy dużych podjednostek jest bardzo podobny. Wyraźne różnice obserwuje się natomiast w składzie aminokwasowym małych podjednostek (7). W związku z tym przypuszcza się (7), że różne właściwości fizyko-chemiczne karboksylazy RuDP izolowanej z roślin gatunków odległych od siebie pod względem filogenetycznym, mogą wynikać głównie z odmiennego składu aminokwasowego i różnej budowy pierwszorzędowej małych podjednostek. Badając karboksylazę RuDP izolowaną z roślin pokrewnych gatunków wykazano, że duże podjednostki są zbudowane z reszt ponad 200 aminokwasów, a małe z około 100 (59). Mapy peptydowe małych podjednostek charakteryzują się dużą zmiennością. Natomiast odpowiadające sobie peptydy dużych podjednostek nieznacznie różnią się masą cząsteczkową oraz zawartością tyrozyny.

Na podstawie chromatografii peptydów oraz oznaczenia masy cząsteczkowej podjednostek stwierdzono, że karboksylaza RuDP z liści szpinaku i tytoniu składa się z 8 dużych i 6—8 małych podjednostek (12, 56). Stosunek zawartości białka w dużych podjednostkach do zawartości białka w małych podjednostkach karboksylazy wynosi w przypadku tytoniu 71,8:28,2 a w przypadku szpinaku 73,3:27,7 (12).

Jedynie duże podjednostki karboksylazy/oksygenazy RuDP charakteryzują się aktywnością enzymatyczną (60, 61).

## V. Miejsca syntezy karboksylazy/oksygenazy RuDP

Otrzymane dotychczas dane wskazują, że cistrony kodujące obydwie podjednostki karboksylazy/oksygenazy RuDP występują w różnych miejscach komórki. Jedną podjednostkę (małą) koduje DNA jądrowy, drugą (dużą) DNA chloroplastów (12, 62—67). Badanie miejsca syntezy małej i dużej podjednostki wymagało otrzymania szeregu odpowiednich międzygatunkowych hybrydów, porównania pierwszorzędowej budowy podjednostek oraz stosowania specyficznych inhibitorów syntezy białka. Eksperymenty genetyczne, w wyniku których następowało przekazywa-

nie charakterystycznych cech zakodowanych w DNA jądrowym lub w DNA chloroplastów, połączono z odpowiednimi badaniami biochemicznymi.

#### V-1. Mała podjednostka

Pylek *Nicotiana tabacum* zawierający kwas dezoksyrybonukleinowy jądrowy przenoszono na komórki jajowe roślin innych gatunków *Nicotiana* (*N. glutinosa*, *N. glauca*). Otrzymywano hybrydy typu F<sub>1</sub> (12, 62). Małą podjednostkę karboksylazy RuDP izolowano z *N. tabacum*, *N. glutinosa*, *N. glauca* oraz z odpowiednich hybrydów i poddawano trawieniu za pomocą chymotrypsyny i trypsyny. Produkty rozdzielano chromatograficznie i porównywano mapy peptydowe małych podjednostek. Pierwszorzędowa budowa małych podjednostek karboksylazy otrzymywanych z mieszańców *N. tabacum* × *N. glutinosa* i *N. tabacum* × *N. glauca* zawierała cechy charakterystyczne dla pierwszorzędowej budowy małej podjednostki z *N. tabacum*. Po wykorzystaniu tych cech jako wskaźników fenotypowych udowodniono, że właściwości małej podjednostki karboksylazy były przekazywane za pośrednictwem DNA jądrowego. Dziedziczą się one zgodnie z prawami Mendla (62).

#### V-2. Duża podjednostka

Pierwszorzędowa budowa dużych podjednostek karboksylazy RuDP izolowanych z roślin różnych rodzajów (12) a także z roślin różnych gatunków tego samego rodzaju (59) jest bardzo podobna. Eksperymenty genetyczne jakimi posługiwano się podczas badania sposobu dziedziczenia właściwości małej podjednostki były niewystarczające do wyjaśnienia sposobu dziedziczenia właściwości dużej podjednostki. Właściwości dużej podjednostki nie podlegały bowiem dziedziczeniu według schematu mendelowskiego. Sugerowano więc, że duża podjednostka karboksylazy RuDP jest kodowana przez DNA pozajądrowy (59). Badania genetyczne, które doprowadziły do potwierdzenia tej hipotezy polegały na krzyżowaniu *N. tabacum* z *N. gossei* a następnie na porównywaniu pierwszorzędowej budowy dużych podjednostek karboksylazy wyodrębnionych z liści roślin obydwu gatunków *Nicotiana* i ich mieszańców (63). Do doświadczeń wybrano rośliny takich gatunków *Nicotiana*, które różnią się rozmieszczeniem geograficznym. Przypuszczano bowiem, że pierwszorzędowa budowa dużych podjednostek karboksylazy izolowanych z takich roślin może charakteryzować się odmiennymi właściwościami.

*N. gossei* jest gatunkiem autochtonicznym w Australii, a *N. tabacum* na terenach poza tym kontynentem. Jeden z peptydów, które otrzymywano w wyniku enzymatycznej hydrolizy dużej podjednostki karboksylazy izolowanej z *N. gossei* nie występował w hydrolizatach dużych podjednostek karboksylazy otrzymywanych z liści roślin innych gatunków

*Nicotiana*. Okazało się, że pierwszorzędowa budowa dużej podjednostki izolowanej z hybrydów *N. tabacum* × *N. glauca* charakteryzowała się obecnością tego peptydu, jeżeli podczas krzyżowania stosowano komórki jajowe *N. glauca*. Jeżeli natomiast gameta żeńska pochodziła z *N. tabacum*, a męska z *N. glauca*, duża podjednostka karboksylazy otrzymywana z mieszańców tych gatunków nie zawierała peptydu charakterystycznego dla dużej podjednostki karboksylazy RuDP z *N. glauca*. Wnioskowano więc, że informacja genetyczna o tym peptydzie, a więc także o całej dużej podjednostce karboksylazy RuDP jest zakodowana w DNA pozajądrowym.

Wiadomo, że chloroplasty są w pewnym stopniu autonomiczne pod względem genetycznym (68). W komórkach roślin potomnych poza genomem, który powstał z genomu gamety męskiej i żeńskiej są także geny chloroplastów, geny pozajądrowe, wniesione przez gametę żeńską. Mieszańce otrzymywane po skrzyżowaniu gamety żeńskiej *N. glauca* i gamety męskiej *N. tabacum* posiadały DNA chloroplastów zawartych w cytoplazmie gamety żeńskiej *N. glauca*. Wykazano więc, że informacja genetyczna o dużej podjednostce karboksylazy RuDP jest zakodowana w DNA chloroplastów i jest przenoszona cytoplazmatycznie (28, 63).

Wyniki badań genetycznych potwierdzono za pomocą innych metod (64, 67). Ponieważ rybosomy chloroplastów mogą stanowić 50% wszystkich rybosomów w komórce sądzono, że muszą one odgrywać istotną rolę w procesie syntezy białka. W doświadczeniach *in vitro*, znakowane aminokwasy były włączane do białek chloroplastów wyizolowanych uprzednio z siewek grochu (*Pisum sativum*) (64). Po rozbiciu chloroplastów i wykonaniu elektroforezy rozpuszczalnych białek wykazano, że znakowane aminokwasy występują w polipeptydzie, który następnie zidentyfikowano jako dużą podjednostkę karboksylazy RuDP. Także etioplasty izolowane z siewek grochu hodowanych w ciemności mają zdolność do syntezy białka. Głównym produktem tej syntezy jest duża podjednostka RuDP (69).

Stosując specyficzne inhibitory syntezy białka wykazano, że mała podjednostka karboksylazy RuDP powstaje w układach rybosomów cytoplazmatycznych (67). Eksperymenty immunologiczne zastosowane do badania miejsca syntezy karboksylazy RuDP potwierdziły istniejący pogląd, że mała podjednostka tego enzymu syntetyzuje się w układach rybosomów cytoplazmatycznych, a duża podjednostka w układach rybosomów chloroplastów (23).

### V-3. Schematy syntezy

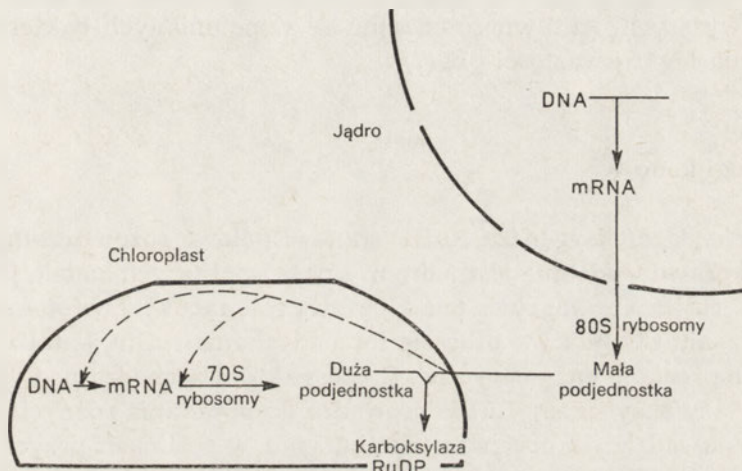
Jeden z pierwszych schematów syntezy karboksylazy/oksygenazy RuDP został zaproponowany w 1972 roku przez Kawashimę i Wildmana (62). Przyjmując, że DNA chloroplastów koduje, a mRNA przenosi informację genetyczną o dużej podjednostce (62) uznano, że jej synteza za-



chodzą na rybosomach 70 S. Sądzono, że synteza małej podjednostki może się odbywać w układach rybosomalnych chloroplastów lub w układach rybosomalnych cytoplazmy.

Blair i Ellis (64) stanęli na stanowisku, że synteza dużej podjednostki karboksylazy RuDP zachodzi na rybosomach 70 S. Jednocześnie zakładali oni, że mała podjednostka syntetyzuje się poza chloroplastami, a mianowicie na rybosomach 80 S. Dopiero całkowicie uformowana mała podjednostka jest przenoszona do chloroplastów.

Bardziej rozszerzony schemat syntezy omawianego białka przedstawił Ellis w roku 1975 (66, 70).



Ryc. 4. Schemat syntezy karboksylazy RuDP (66).

Uważa on, że mała podjednostka kontroluje syntezę dużej podjednostki. Autor wskazuje także prawdopodobne miejsca tej interwencji (linia przerywana na rycinie 4).

## VI. Występowanie karboksylazy/oksygenazy RuDP w materiale roślinnym

Karboksylaza/oksygenaza RuDP występuje w tkankach wszystkich roślin, które zawierają chlorofil *a* i w niektórych roślinach nie mających tego barwnika (7). Karboksylaza występuje w chloroplastach roślin typu  $C_3$  oraz w chloroplastach izolowanych z komórek pochwy okołowiązkowej roślin typu  $C_4$  (71)\*. Chloroplasty otrzymane z mezofilu roślin typu  $C_4$  nie zawierają karboksylazy RuDP. Brak jej powoduje, że stosunek zawartości

\*) Porównaj artykuły: S. Maleszewski (1974), *Post. Biochem.*, 20, 379—401; Z. Kaniuga (1976), *Post. Biochem.*, 22, 245—305.

białka rozpuszczalnego do zawartości chlorofilu jest około 3-krotnie niższy w chloroplastach roślin  $C_4$  niż w chloroplastach roślin  $C_3$ . W cytoplazmie komórek mezofilu roślin  $C_4$  wykryto inny enzym uczestniczący w procesie wiązania  $CO_2$  w fotosyntezie, karboksylazę fosfoenolopirogronianu (karboksylaza PEP, EC 4.1.1.31) (71—73).

Rośliny niższe, takie jak zielenice, sinice, purpurowe bakterie siarkowe zawierające bakteriochlorofil charakteryzują się aktywnością karboksylazy RuDP, która odznacza się takimi samymi parametrami fizykochemicznymi jak karboksylaza RuDP z roślin wyższych (7). W zielonych bakteriach siarkowych i purpurowych bakteriach niesiarkowych występuje karboksylaza RuDP o niższej masie cząsteczkowej niż karboksylaza z roślin wyższych. Aktywność enzymu ze wspomnianych bakterii zależy od stężenia  $Mg^{+2}$  i wartości pH (7).

## VII. Uwagi końcowe

Karboksylaza/oksygenaza RuDP stanowi połowę rozpuszczalnych białek liści i prawdopodobnie jest jednym z najpospolitszych białek, jakie występują w roślinach. Odgrywa ona kluczową rolę zarówno w fotosyntetycznym wiązaniu  $CO_2$  jak i w procesie fotooddychania roślin, katalizuje więc dwie różne reakcje enzymatyczne. Procesy, które zachodzą pod wpływem karboksylazy/oksygenazy RuDP prowadzą do powstania różnych produktów. Można sądzić, że obecność tego enzymu w roślinach przyczynia się do zachowania równowagi między fotosyntezą i fotooddychaniem.

*Artykuł nadszedł 14.5.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 13.3.1978.*

## PIŚMIENNICTWO

1. Wildman S. G., Bonner J., (1947), *Arch. Biochem.*, **14**, 381—392.
2. Weissbach A., Horecker B. L., Hurwitz J., (1956), *J. Biol. Chem.*, **218**, 795—810.
3. Jacoby B. W., Brummond D. O., Ochoa S., (1956), *J. Biol. Chem.*, **218**, 811—822.
4. Racker E., (1957), *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 300—310.
5. Andrews T. J., Lorimer G. H., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry*, **12**, 11—18.
6. Lorimer G. H., Andrews T. J., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry*, **12**, 18—23.
7. Kawashima N., Wildman S. G., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 325—358.
8. Lyttleton J. W., T'so P. O. P., (1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, **73**, 120—126.
9. Heber U., (1963), *Planta* (Berl.), **59**, 600—616.
10. Park R. B., Pon N. G., (1961), *J. Mol. Biol.*, **3**, 1—10.
11. Ogren W. L., Bowes G., (1971), *Nature* (London), **230**, 159—160.

12. Kawashima N., Wildman S. G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 749—760.
13. Ridley S. M., Thornber J. P., Bailey J. L., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 62—79.
14. Steer M. W., Gunning B. E. S., Graham T. A., Carr D. J., (1968), *Planta* (Berl.), **79**, 254—267.
15. Kieras F. J., Haselkorn R., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 1264—1270.
16. Akazawa T., Sato K., Sugiyama N., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 114—119.
17. Eggman L., Singer S. J., Wildman S. G., (1953), *J. Biol. Chem.*, **205**, 969—983.
18. Sakano K., Partridge J. E., Shannon L. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **329**, 339—341.
19. Chollet R., Anderson L. L., Hovsepian L. C., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 97—107.
20. Wildner G., Henkel J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 268—275.
21. Kawashima N., Wildman S. G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 240—249.
22. Chan P. H., Sakano K., Singh S., Wildman S. G., (1972), *Science*, **176**, 1145—1146.
23. Gooding L. R., Roy H., Jagendorf A. T., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 324—335.
24. Shomer-Ilan A., Waisel Y., (1975), *Plant Physiol.*, **34**, 90—96.
25. Kawashima N., Tanabe Y., Iwai S., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 70—77.
26. Kawashima N., Wildman S. G., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1463—1468.
27. Kawashima N., Singh S., Wildman S. G., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 664—668.
28. Sakano K., Kung D. S., Wildman S. G., (1974), *Plant Cell Physiol.*, **15**, 611—617.
29. Chollet R., Anderson L. L., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 344—351.
30. Singh S., Wildman S. G., (1974), *Plant Cell Physiol.*, **15**, 373—379.
31. Laing W. A., Ogren W. L., Hageman R. H., (1974), *Plant Physiol.*, **54**, 678—685.
32. Badger M. R., Andrews T. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 204—210.
33. Lorimer G. H., Badger M. R., Andrews T. J., (1976), *Biochem.* **15**, 529—536.
34. Laing W. A., Christeller J. T., (1976), *Biochem. J.*, **159**, 563—570.
35. Chu D. K., Bassham J. A., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 373—379.
36. Pon N. G., Rabin B. R., Calvin M., (1963), *Biochem. Z.*, **338**, 7—19.
37. Paulsen J. M., Lange D. M., (1966), *Biochemistry*, **5**, 2350—2357.
38. Andrews T. J., Hatch M. D., (1971), *Phytochemistry*, **10**, 9—15.
39. Lorimer G. H., Badger M. R., Andrews T. J., (1977), *Anal. Biochem.*, **78**, 66—75.
40. Laing W. A., Ogren W. L., Hageman R. H., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2269—2275.
41. Jensen R. G., Bassham J. A., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **56**, 1095—1101.
42. Jensen R. G., Francki R. I. B., Zaitlan M., (1971), *Plant Physiol.*, **48**, 9—13.
43. Goldsworthy A. W., (1968), *Nature* (London), **217**, 62.

44. Bowes G., Ogren W. L., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2171—2176.
45. Bahr J. T., Jensen R. G., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 39—44.
46. Andrews T. J., Badger M. R., Lorimer G. H., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 93—103.
47. Bahr J. T., Jensen R. G., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 408—413.
48. Osmond C. B., Akazawa T., Beevers H., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 226—230.
49. Lord J. M., Brown R. H., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 360—364.
50. Ryan F. J., Jolly S. O., Tolbert N. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1233—1241.
51. McFadden B. A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 312—317.
52. Badger M. R., Lorimer G. H., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 723—729.
53. Marsho T. V., Kung S. D., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 341—346.
54. Haselkorn R., Fernández-Morán H., Kieraz F. J., Bruggen E. F. J., (1965), *Science*, **150**, 1598—1601.
55. Moon K. E., Thompson E. O. P., (1969), *Aust. J. Biol. Sci.*, **22**, 463—470.
56. Rutner A. C., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 923—929.
57. Haslett B. G., Yarwood A., Evans I. M., Boulter D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 122—132.
58. Roy H., Alvares O., Mader L., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 914—919.
59. Kawashima N., Kwok S. Y., Wildman S. G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 578—586.
60. Takabe T., Akazawa T., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1173—1179.
61. Nishimura M., Akazawa T., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2277—2281.
62. Kawashima N., Wildman S. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 42—49.
63. Chan P. H., Wildman S. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 677—680.
64. Blair G. E., Ellis R. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 223—234.
65. Kung S. D., Sakano K., Wildman S. G., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 138—147.
66. Ellis R. J., (1975), *Phytochemistry*, **14**, 89—93.
67. Roy H., Patterson R., Jagendorf A. T., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 64—73.
68. Strzałka K., Więckowski S., (1974), *Post. Biol. Kom.*, **1**, 193—219.
69. Siddell S. G., Ellis R. J., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 675—685.
70. Ellis R. J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **463**, 185—215.
71. Huber S. C., Hall T. C., Edwards G. E., (1976), *Plant Physiol.*, **57**, 730—733.
72. Black C. C. Jr., (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 253—286.
73. Uedan K., Sugiyama T., (1976), *Plant Physiol.*, **57**, 900—906.

GRAŻYNA MUSZYŃSKA \*)

## Modyfikacje cząsteczek białkowych jako narzędzie w badaniu struktury i funkcji białek

### Modification in Protein Molecules as a Tool for Examination of the Structure and Function of Proteins

#### Spis treści

- I. Badanie pierwszorzędowej struktury białek**
- I-1. Selektywna, nieenzymatyczna degradacja białek**
- I-1.1. Rozszczępienie łańcucha peptydowego w efekcie modyfikacji reszty metionylowej przez bromocyjan**
- I-1.2. Rozszczępienie wiązań peptydowych przez N-bromoimid kwasu bursztynowego**
- I-2. Modyfikacje zmieniające podatność białek na hydrolizę**
- I-2.1. Nowe miejsca w łańcuchu polipeptydowym wrażliwe na działanie proteaz**
- I-2.2. Modyfikacje ograniczające zasięg enzymatycznej i chemicznej degradacji białek**
- I-3. Zastosowanie unieruchomionych peptydaz do degradacji białek**
- II. Badanie konformacji i funkcji białek**
- II-1. Modyfikacje cząsteczki białka zmieniające jej właściwości optyczne**
- II-2. Modyfikacje reszt aminokwasowych w centrum aktywnym enzymów**
- II-2.1. Zastosowanie metod immunologicznych do lokalizacji zmodyfikowanych grup**
- II-2.2. „Mutacje” chemiczne i enzymatyczne pojedynczych aminokwasów funkcyjnych**
- II-3. Unieruchamianie enzymów oligomerycznych na nierozpuszczalnym podłożu**
- II-4. Modyfikacje chemiczne enzymu zależne od obecności substratu**

#### Contents

- I. Examination of the primary structure of proteins**
- I-1. Selective non-enzymic cleavage of proteins**
- I-1.1. Cleavage of the polipeptide chain after modification of its methionyl residue with cyanogen bromide**
- I-1.2. Cleavage of the peptide bonds by N-bromosuccinimide**
- I-2. Modifications which change the susceptibility of proteins to hydrolysis**
- I-2.1. New sites in proteins, susceptible to enzymic cleavage of the polipeptide chain**
- I-2.2. Modifications which lead to diminution of enzymic and chemical degradation of proteins**
- I-3. Application of immobilized proteinases to degradation of proteins**
- II. Examination of conformation and function of proteins**

\*) Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

- II-1. Modifications in protein molecule which change its optical properties**
- II-2. Modification of amino acids in the active sites of enzymes**
- II-2.1. Application of the immunological methods to localization of the modified groups**
- II-2.2. Chemical and enzymatic „mutation” of a single functional amino acid**
- II-3. Immobilization of oligomeric enzymes on the solid matrix**
- II-4. Substrate dependent modifications of enzyme molecules**

Wykaz stosowanych skrótów: NBS — N-bromoimid kwasu bursztynowego; CNBr — bromocyjan; HNBB — bromek 2-hydroksy-5-nitrobenzylu; DAA — dwuazowa pochodna kwasu arsanilowego; DHT — dwuazo-1-H-tetrazol; DNP — dwunitrofenol; EDTA — sól sodowa kwasu etyleno-dwuaminoczerwonoctowego; TNM — czteronitrometan.

Jednym z zasadniczych problemów biologii molekularnej jest badanie zależności aktywności enzymatycznej białek od ich struktury (1, 2). W badaniu tego zagadnienia stosuje się takie modyfikacje struktury białek, które prowadzą do zmiany ich aktywności enzymatycznej. Selektywne modyfikacje chemiczne, zmieniające pojedyncze reszty aminokwasowe okazały się przydatne do identyfikacji grup funkcyjnych enzymów. Porównanie właściwości natywnego i zmodyfikowanego enzymu może wyjaśnić udział poszczególnych reaktywnych ugrupowań w katalizie enzymatycznej. Metody chemicznej modyfikacji grup czynnych enzymów przedstawiono uprzednio w *Postęпах Biochemii* (3). Znaczenie modyfikacji chemicznych nie ogranicza się do zastosowania ich w badaniu centrum aktywnego enzymów. Modyfikacje białek znalazły również zastosowanie w badaniu pierwszorzędowej struktury enzymów do selektywnego rozszczepienia łańcuchów polipeptydowych. Niektóre modyfikacje chemiczne wywołują zmiany właściwości optycznych białek. Zostało to wykorzystane w badaniach zmian konformacji enzymów. Z kolei, unieruchamianie enzymów na nierozpuszczalnym podłożu lub też wiązanie ich z przeciwciałami stwarza nowe możliwości metodyczne w badaniu mechanizmu katalizy enzymatycznej.

## **I. Badanie pierwszorzędowej struktury białek**

### **I-1. Selektywna, nieenzymatyczna degradacja białek**

Poznanie sekwencji aminokwasów w białku ułatwia określenie jego drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury oraz umożliwia lokalizację grup funkcyjnych. Dzięki wykorzystaniu oryginalnej metody Edmana (4) do automatycznego oznaczania kolejności aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych (5) poznano I-rzędową budowę wielu białek. Znaczny rozwój techniki nie rozwiązał jednakże wszystkich problemów i w dalszym ciągu określenie pierwszorzędowej struktury białek należy do najbardziej pracochłonnych kierunków badań.

Wiele trudności sprawia otrzymanie peptydów o pożądanej wielkości, bowiem nie zawsze jest możliwe rozszczepienie wiązań peptydowych w określonych miejscach łańcucha. Dotyczy to przede wszystkim białek globularnych, w których część łańcucha polipeptydowego zwana rdzeniem (*core*) jest ukryta w głębi cząsteczki i nie ulega działaniu proteaz o wąskiej swoistości wobec rozszczepianych wiązań, takich jak trypsyna (E.C. 3.4.21.4) i chymotrypsyna (E.C. 3.4.21.1). Ponadto, enzymy te przestają działać zgodnie ze swoją swoistością, jeżeli hydrolizowane białko zawiera ponad 100 aminokwasów w cząsteczce. Proteazy o szerokiej swoistości — pepsyna (E.C. 3.4.23.1), papaina (E.C. 3.4.22.2) i elastaza trzustkowa I (E.C. 3.4.21.11) znalazły jedynie ograniczone zastosowanie do hydrolizy białek (6), ponieważ rozszczepiają białka na zbyt krótkie fragmenty, co utrudnia określenie kolejności poszczególnych fragmentów w łańcuchu polipeptydowym.

Do degradacji białek zastosowano związki chemiczne, które mogą specyficznym modyfikować i selektywnie rozszczepiać łańcuchy polipeptydowe. Związki te działają wybiórczo a hydroliza wiązania peptydowego zachodzić może w takich miejscach, które nie podlegają działaniu enzymów proteolitycznych.

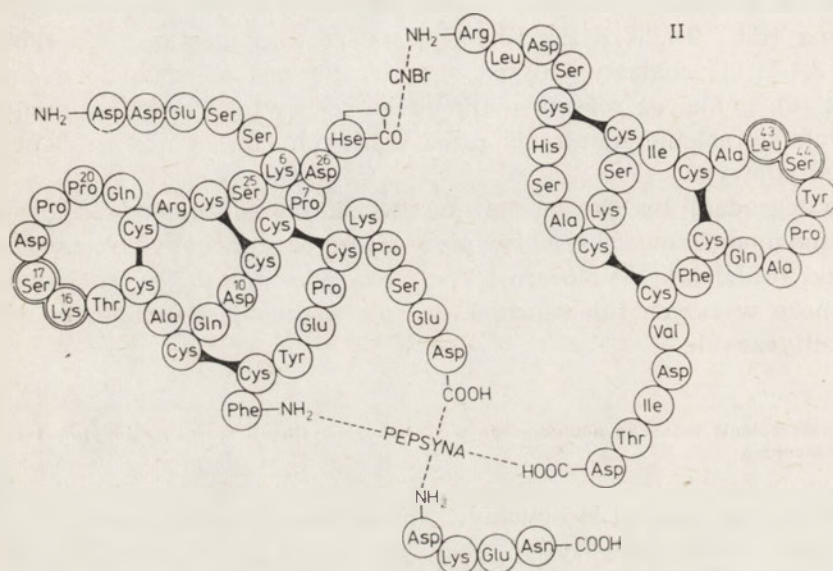
#### 1-1.1. Rozszczepienie łańcucha peptydowego w efekcie modyfikacji reszty metionylowej przez bromocyjan

Jedną z najczęściej stosowanych metod jest fragmentacja białek bromocyjanem (CNBr) selektywnie reagującym z resztami metioniny. W wyniku reakcji tworzą się pierścieniowe pochodne tego aminokwasu, czego konsekwencją jest pęknięcie łańcucha peptydowego. Reakcję przeprowadza się w silnie kwaśnym środowisku (0,1 N HCl lub 70% kwas mrówkowy) (7), a więc w warunkach, w których aminowe i inne zasadowe grupy białek występują w formie uprotonowanej, co ochrania je przed działaniem bromocyjanu (8). Ponadto, w środowisku o odczynie kwaśnym białko występuje w formie niepofałdowanej, efektem czego jest udostępnienie wszystkich grup metionylowych działaniu odczynnika.

Po raz pierwszy bromocyjan zastosowano do fragmentacji rybonukleazy (E.C. 2.7.7.16) (9), a następnie w wielu innych białkach (10, 11). Po działaniu bromocyjanem *Neurath* i wsp. (12) otrzymali 4 fragmenty z karboksypeptydazy A (E.C. 3.4.2.1), co znacznie ułatwiło oznaczanie sekwencji aminokwasów tego enzymu i izolowanie fragmentu zawierającego centrum aktywne (13, 14).

Szczególnie owocne okazało się zastosowanie bromocyjanu w badaniu struktury sojowego inhibitora enzymów proteolitycznych. Inhibitor sojowy (inhibitor Bowmana-Birka) jest polipeptydem składającym się z 71 aminokwasów. Jego strukturę trzeciorzędową usztywnia 7 wiązań dwusiarczkowych (11). Zwartość struktury inhibitora jest podstawą jego

trwałości w wysokich temperaturach, a także przy pH o niskich wartościach. Inhibitor Bowmana-Birka jest oporny na działanie enzymów proteolitycznych. Jednak po reakcji bromocyjanu z resztą metionylową przy Met 27, następcze trawienie pepsyną prowadzi do rozbicia inhibitora na dwa fragmenty, które po rozdzieleniu wykazują niezależnie zdolność hamowania. Fragment I hamował aktywność trypsyny, natomiast fragment II — chymotrypsyny (Ryc. 1).



**Ryc. 1.** Rozszczępienie cząsteczki sojowego inhibitora Bowmana-Birka bromocyjanem i pepsyną (11)

Powstałe fragmenty wykazywały różną specyficzność wobec proteaz, fragment I hamował aktywność trypsyny, fragment II — chymotrypsyny. Reszty aminokwasowe zaznaczone podwójną linią są grupami funkcyjnymi inhibitora.

Rozdzielenie inhibitora Bowmana-Birka na dwa funkcyjnie odrębne fragmenty bezpośrednio wskazuje, że jest on inhibitorem „dwugłowym” (*double headed*). Każdy człon inhibitora wykazuje niezależną zdolność hamowania wobec różnych enzymów proteolitycznych (11). Miejszem wiążącym trypsynę jest sekwencja Lys 16-Ser 17, a miejscem wiążącym chymotrypsynę sekwencja Leu 43-Ser 44. Obydwa fragmenty inhibitora sojowego cechuje podobna struktura pierwszorzędowa wokół centrum aktywnego i takie samo rozmieszczenie mostków dwusiarczkowych. To niezwykle duże podobieństwo przestrzenne obszarów hamujących aktywność trypsyny i aktywność chymotrypsyny świadczy, że o specyficzności inhibitora sojowego decydują pojedyncze reszty bezpośrednio wiążące inhibitor z enzymem. Jest to lizyna 16 lub leucyna 43.

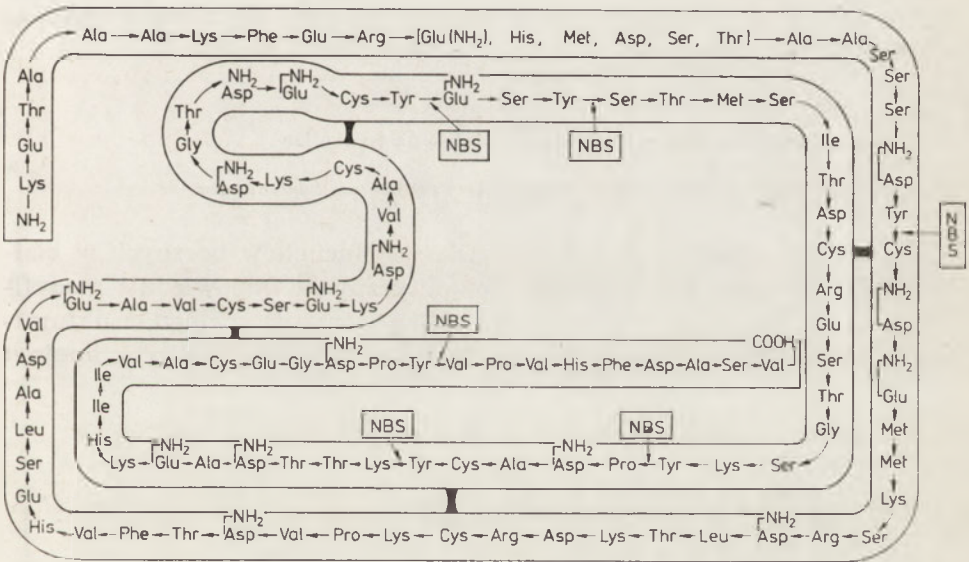
Zastosowanie bromocyjanu ułatwiło także oznaczanie sekwencji ami-



nokwasów niektórych peptydów otrzymanych z ureazy (E.C. 3.5.1.5)\*. Działanie bromocyjanem było również pierwszym etapem częściowej degradacji cząsteczki albuminy z osocza ludzkiego (15, 16).

I-1.2. Rozszczępienie wiązań peptydowych przez N-bromoimid kwasu bursztynowego

Drugim związkiem często stosowanym do hydrolizy wiązań peptydowych jest N-bromoimid kwasu bursztynowego (NBS). NBS preferencyjnie rozszczępia wiązania między tryptofanem a dowolnym aminokwasem (Trp-X), a także hydrolizuje w ograniczonym zakresie wiązania Tyr-X (17—19). Rozszczępienie wiązań His-X jest także możliwe, ale może ono nastąpić dopiero po wcześniejszej hydrolizie wiązań Trp-X i Tyr-X. Wiązania tworzone przez grupę karboksylową aminokwasów aromatycznych są podatne na działanie NBS w temperaturze pokojowej, natomiast utlenienie imidazolowego pierścienia histydyny prowadzące do hydrolizy wiązania peptydowego następuje dopiero w wyższych temperaturach (7). Rozszczępienie wiązań peptydowych prowadzi się w środowisku kwaśnym (pH 4) przy 3 do 6 krotnym nadmiarze NBS (20).



Ryc. 2. Położenie w strukturze rybonukleazy wiązań hydrolizowanych przez N-bromoimid kwasu bursztynowego (NBS) (6)

Innym przykładem działania NBS jest rozszczępienie sześciu wiązań po Tyr-X w rybonukleazie (6) (Ryc. 2). NBS najefektywniej hydrolizuje wiązanie Tyr — Ser, podczas gdy tylko w stopniu minimalnym rozszczępia wiązanie Tyr-Cys. Przekształcenie w cząsteczce rybonukleazy, cysteiny w jej pochodną karboksymetylową znacznie zwiększyło efektywność hyd-

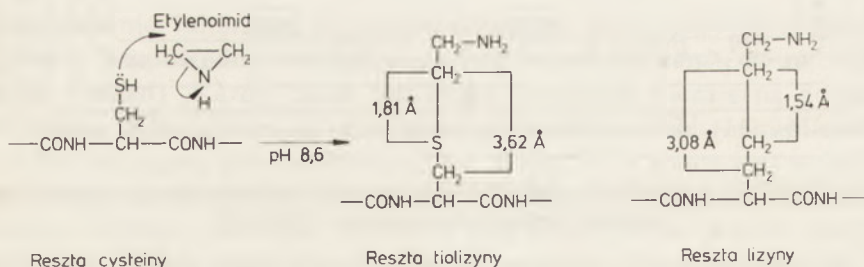
rolizy wiązania Tyr-Cys (6). Wynika z tego, że chemiczne przekształcenie reszt sąsiadujących zwiększa wydajność rozszczepienia poszczególnych wiązań tyrozylowych rybonukleazy przez NBS.

Do porównania budowy cytochromów różnego pochodzenia zastosowano technikę jednoczesnej hydrolizy bromocyjanem i N-bromoimidem kwasu bursztynowego (21). Występowanie sekwencji Trp-Gly wykazano w cytochromach serca człowieka, wołu i tuńczyka, natomiast sekwencje Trp-Yys w cytochromie z serca konia. Sekwencje Met-Glu i Met-Ileu występowały we wszystkich badanych cytochromach c. W cytochromie z serca człowieka występuje tylko jedna reszta tryptofanylowa (22), zajmująca 59-tą pozycję w łańcuchu polipeptydowym. Występuje ona też w tej pozycji we wszystkich dotychczas zbadanych cytochromach (23, 24). Identyfikacja aminokwasów sąsiadujących z tryptofanem 59 stanowi użyteczne kryterium wykrywania podobieństw lub różnic strukturalnych w cytochromach. Badania dwudziestu pięciu cytochromów otrzymanych ze zwierząt i roślin różnych gatunków, wykazały identyczność dużych odcinków sekwencji aminokwasowej oraz dowiodły, że cytochromy pochodzące z organizmów zaliczanych do blisko spokrewnionych gatunków cechują się tą samą lub bardzo zbliżoną sekwencją aminokwasów. Większa liczba zmian w strukturze pierwszorzędowej oznacza większy dystans ewolucyjny badanych organizmów (23, 25).

## I-2. Modyfikacje zmieniające podatność białek na hydrolizę

### I-2.1. Nowe miejsca w łańcuchu polipeptydowym wrażliwe na działanie proteaz

W niektórych przypadkach modyfikacja łańcuchów bocznych w białkach ułatwia działanie enzymów proteolitycznych. Odpowiednia modyfikacja seryny i cysteiny prowadzić może do utworzenia analogu strukturalnego lizyny. Dzięki temu trypsyna może hydrolizować białko w miejscu

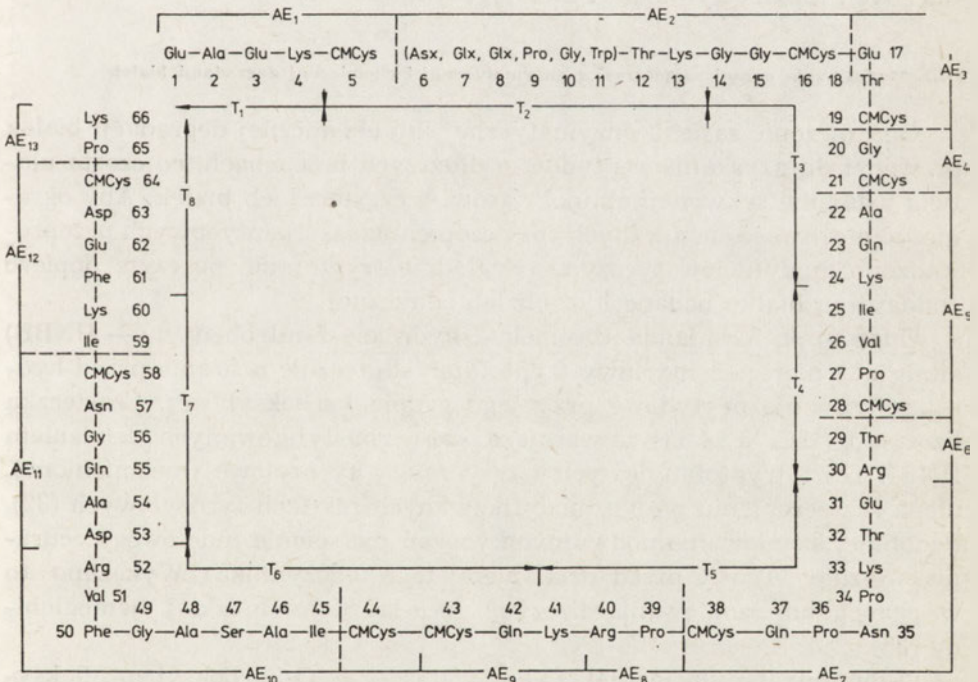


**Ryc. 3.** Schemat przekształcenia cysteiny w lizynę (7)

powstałego analogu. Na przykład zastosowanie aminoetylacji łańcucha  $\beta$ -insuliny etylenoimidem prowadzi do przekształcenia cysteiny w lizynę (26) (Ryc. 3). Porównując właściwości strukturalne lizyny i lizyny

można zauważyć, że zmiana grupy metylowej lizyny na atom siarki tiolizyny nie zmienia w sposób istotny struktury przestrzennej aminokwasu. Wartości promienia Van der Waalsa atomu siarki i grupy metylenowej są zbliżone, a łańcuch boczny tiolizyny jest tylko o 0,54 Å dłuższy od łańcucha bocznego lizyny. Podobieństwo strukturalne tiolizyny i lizyny powoduje, że wiązanie po tiolizynie jest również hydrolizowane przez trypsynę.

Aminoetylację cysteiny zastosowano do oznaczenia struktury pierwszorzędowej inhibitora trypsyny z glisty dżdżownicowatej (*Ascaris lumbricoides*) (27). Inhibitor niezmodyfikowany, po utlenieniu kwasem nadmanganowym ulegał rozszczepieniu przez trypsynę na osiem fragmentów T<sub>1</sub>-T<sub>8</sub> (Ryc. 4). W kolejnym eksperymencie aminowe grupy lizyny acetylowano bezwodnikiem kwasu octowego, co uniemożliwiało w tych miejscach działanie trypsyny. Acetylowany inhibitor redukowano merkaptoetanolom a powstałe grupy SH cysteiny aminoetylowano etylenoiminą (27). Alkilacja cysteiny do tiolizyny prowadziła do pojawienia się w białku nowego miejsca wrażliwego na działanie trypsyny; mogła ona hydrolizować zmodyfikowany inhibitor zarówno w miejscu alkilacji, jak i po niezmienionej reszcie argynylowej. W wyniku hydrolizy otrzymano 13 peptydów AE<sub>1</sub>-AE<sub>13</sub>. Celem ustalenia kolejności otrzymanych fragmentów po-



Ryc. 4. Zmiana podatności inhibitora trypsyny z glisty dżdżownicowatej na hydrolizę trypsyną (27)

Odcinki T<sub>1</sub>-T<sub>8</sub> otrzymano w wyniku hydrolizy utlenionego inhibitora trypsyną, odcinki AE<sub>1</sub>-AE<sub>13</sub> otrzymano po hydrolizie trypsyną aminoetylowanej pochodnej inhibitora. Linia przerywaną zaznaczono nowe miejsca podatne na hydrolizę trypsyną.

równano wspólne sekwencje nakładających się peptydów (otrzymanych w obu opisanych postępowaniach). Strukturę pierwszorzędowną inhibitora trypsyny ustalono dzięki porównaniu wspólnych sekwencji. Wyniki ilustruje rycina 4.

Udział grup hydroksylowych w aktywności biologicznej wielu białek stwarza konieczność badania sekwencji wokół reszt serylowych. Jednakże, żaden ze znanych enzymów proteolitycznych nie hydrolizuje selektywnie wiązania peptydowego przy reszcie serylowej. W 1969 r. Patchornik i wsp. (28) przekształcili serynę w tiolizynę w peptydach. Przemiana reszty serylowej w tiolizylową obejmuje kilka reakcji pośrednich. Pierwszym etapem jest tosyłacja seryny chlorkiem *p*-toluenosulfonowym prowadząca do powstania 0-tosylo-L-seryny (7). Następnie w wyniku reakcji tosylopochothanej z cysteaminą powstaje tiolizyna (28, 29). (Przekształcenie seryny w inny aminokwas — dehydroalaninę — znalazło również zastosowanie w badaniach centrum aktywnego enzymów, porównaj Rozdz. II-2.2).

Modyfikacje chemiczne innych aminokwasów, na przykład tyrozyny mogą również ułatwić hydrolizę wiązań przez specyficzne enzymy proteolityczne. Tak właśnie chymotrypsyna efektywnie hydrolizuje wiązanie peptydowe przy nitrotyrozinie (30) mimo znacznych różnic fizykochemicznych między tyrozyną i nitrotyrozyną (20, 31).

#### 1-2.2. Modyfikacje ograniczające zasięg enzymatycznej i chemicznej degradacji białek

Ograniczenie zasięgu enzymatycznej lub chemicznej degradacji białek prowadzi do uzyskania peptydów o dłuższych łańcuchach, co często ułatwia ustalenie sekwencji aminokwasów w cząsteczkach białek. Aby ograniczyć możliwość chemicznych rozszczepień wiązań peptydowych przeprowadzono modyfikację tyrozyny, względnie tryptofanu, po czym dopiero poddawano białko badane hydrolizie chemicznej.

Odczynnik Koshlanda (bromek 2-hydroksy-5-nitrobenzylu — HNBB) alkilujący pierścień indolowy tryptofanu, skutecznie ochrania przed hydrolizą wiązanie peptydowe przy jego grupie karboksylowej. Cząsteczka lizozymu (E.C. 3.2.1.17) zawierająca sześć zmodyfikowanych działaniem HNBB reszt tryptofanowych i trzy reszty tyrozylowe (niezmienione), ulega rozszczepieniu po niezmodyfikowanych resztach tyrozylowych (32). Podobnie, ozonowanie podwójnych wiązań pierścienia indolowego ochrania wiązanie Trp-X przed działaniem tego odczynnika. Wykazano to w przypadku ozonowania lizozymu i  $\alpha$ -łańcucha ludzkiej hemoglobiny (33).

O-dwunitrofenylacja (34), O-acetylacja oraz O-karboksybenzoiłoksyłacja (35) powodują modyfikację reszt tyrozylowych. W wyniku tych modyfikacji NBS nie rozszczepia wiązań Tyr-X, natomiast podatność wiązań Trp-X pozostaje bez zmiany (7).

Modyfikacje chemiczne ograniczać mogą również hydrolizę enzyma-

tyczną białek. Trypsyna, jeden z najbardziej swoistych enzymów proteolitycznych, rozszczepia łańcuch polipeptydowy jedynie po argininie i lizynie. Grupa  $\epsilon$ -aminowa lizyny jest niezwykle reaktywnym nukleofilem, łatwo ulegającym, zwłaszcza przy pH 8—10, odwracalnym i nieodwracalnym modyfikacjom. Z tego powodu większość metod chemicznego ograniczenia proteolizy polega na modyfikacji tej grupy, co w efekcie ogranicza hydrolityczne działanie trypsyny do wiązań po argininie (7, 36). Karbamoilacja  $\epsilon$ -aminowych grup lizyny cyjanianem potasu prowadzi do powstania homocytruliny (37). Karbamoilacja inhibitora trypsyny z siary krów (CTI) powodowała modyfikację lizyny 18 w aktywnym centrum inhibitora (Rozdz. II-2.2). Okazało się, że trypsyna nie rozszczepia wiązania w którym grupa karbonylowa pochodzi ze zmodyfikowanej lizyny (38). Muszyński i Kleczkowski (39) stwierdzili, że 30% grup  $\epsilon$ -aminowych lizyny w arginazie (E.C. 3.5.3.1) z wątroby wołu, ulegało przekształceniu w homocytrulinę w wyniku karbamoilacji cyjanianem. Po trawieniu tak zmodyfikowanego enzymu trypsyną uzyskano niższą (w porównaniu z trawieniem natywnej arginazy) liczbę peptydów.

Przekształcenie lizyny w homoargininę O-metyloizomocznikiem ogranicza również działanie trypsyny (40). W merkuropapainie siedem z ośmiu występujących reszt lizylowych ulega modyfikacji O-metyloizomocznikiem, czego konsekwencją jest zmniejszona podatność tego białka na trawienie trypsyną (41). Podobnie w guanidynowanej  $\alpha$ -laktoalbuminie, trypsyna nie hydrolizuje wiązania peptydowego homoarginina-X (42). Trypsyna hydrolizuje jednak wiązanie homoarginina-alanina w guanidynowanym inhibitorze enzymów proteolitycznych z siary krów, lecz szybkość hydrolizy tego wiązania jest znacznie mniejsza niż wiązania Arg-Ala (38).

Podstawienie dodatnio naładowanych grup aminowych bezwodnikiem kwasu bursztynowego powoduje powstanie w ich miejscu grup ujemnych, co daje w efekcie zmianę ładunku netto o dwie jednostki ( $+1 \rightarrow -1$ ). Tak duże zmiany w oddziaływaniach elektrostatycznych mogą mieć istotne konsekwencje strukturalne i funkcjonalne (20). W zmodyfikowanej adrenokortykotropinie (ACTH) trypsyna nie atakuje wiązań między sukcyloowaną lizyną a dowolnymi resztami, a rozszczepieniu ulegają jedynie wiązania Arg-X (43).

Acetylacja bezwodnikiem kwasu octowego zobojętnia dodatni ładunek grup aminowych ( $+1 \rightarrow 0$ ), co również uniemożliwia działanie trypsyny w miejscu występowania zmodyfikowanej lizyny (42).

Selektywna modyfikacja grup guanidynowych argininy 2,3-butano-dionem (44, 45, 46) oraz 1,2-cykloheksanodionem (47) uniemożliwia działanie trypsyny w miejscach występowania zmodyfikowanego aminokwasu.

Zastosowanie modyfikacji prowadzących do zmiany podatności wiązań na hydrolizujące działanie proteaz pozwoliło na badanie sekwencji

aminokwasów ciężkiego i lekkiego łańcucha immunoglobulin (48). Zablokowanie dodatnich ugrupowań lizyny — bezwodnikiem kwasu bursztynowego i argininy — 1,2-cykloheksanodionem uniemożliwiało działanie trypsyny w tych miejscach. W wyniku redukcji dwutiotreiolem mostków dwusiarczkowych, a następnie aminoetylacji tych grup, uzyskano dodatkowe miejsca podatne na trawienie trypsyną. Otrzymano więc możliwość rozszczepienia cząsteczki immunoglobuliny przy resztach tworzących mostki dwusiarczkowe. Slobin i Singer (48) charakteryzując wyodrębniony w ten sposób lekki i ciężki łańcuch immunoglobuliny sugerowali wspólne pochodzenie ewolucyjne obu polipeptydów.

### I-3. Zastosowanie unieruchomionych peptydaz do degradacji białek

Enzymy proteolityczne związane z nierozpuszczalnym podłożem wykorzystano do badania pierwszorzędowej budowy białek. Mogą one być używane wielokrotnie i łatwo można je usunąć z mieszaniny inkubacyjnej, unikając w ten sposób zanieczyszczenia produktów końcowych. Najczęściej stosowanymi nośnikami są: aktywowana chemicznie agaroz lub usieciowany dekstran typu Sephadex. Wiązanie białko — nośnik ma charakter kowalencyjny; przy czym najczęściej z nośnikiem wiążą się wolne grupy aminowe enzymu. Unieruchomione pochodne endopeptydaz, takich jak trypsyna i papaina, z dużą wydajnością hydrolizują niskocząsteczkowe i wysokocząsteczkowe substraty (49).

Szeroka specyficzność substratowa karboksypeptydazy Y (E.C. 3.4.12.1) czyni tę egzopeptydazę przydatną do oznaczania C-końcowych sekwencji aminokwasowych (50). Wykazano (51), że karboksypeptydaza Y unieruchomiona na heksametylenodwuamino agarozie (Sepharose Cl-4B, Pharmacia) efektywnie hydrolizuje modelowe peptydy składające się z kilkunastu aminokwasów.

## II. Badanie konformacji i funkcji białek

W badaniu zależności między strukturą białek a ich funkcją enzymatyczną istotną rolę odgrywają określone modyfikacje strukturalne. Najbardziej przydatne są selektywne modyfikacje chemiczne, które bezpośrednio wpływają na funkcję enzymatyczną.

### II-1. Modyfikacje cząsteczki białka zmieniające jej właściwości optyczne

Zmiany konformacyjne białka enzymatycznego wywołane przez substrat lub inne składniki reakcji enzymatycznej można badać przez wprowadzenie do cząsteczki enzymu grup optycznie czynnych, lub grup na-

bywających aktywność optyczną po połączeniu z białkiem. Grupy takie są wrażliwe na zmiany konformacyjne w otaczającym je obszarze cząsteczki danego białka (ang. *environmentally sensitive groups*) nazywane są dlatego niekiedy grupami sprawozdawczymi (ang. *reporter groups*). Zmianom konformacji cząsteczek enzymu towarzyszą zmiany otoczenia wbudowanych grup sprawozdawczych, co można obserwować spektralnie. W wyniku takich zmian następuje zmiana widma absorpcyjnego badanego białka (52). Najbardziej przydatne jako grupy sprawozdawcze są aromatyczne azo-pochodne wykazujące silne pasmo pochłaniania w obszarze światła widzialnego. Zagadnienia te przedstawiono bardziej wyczerpująco w artykule dotyczącym spektrochemicznych badań konformacji enzymów (53).

## II-2. Modyfikacje reszt aminokwasowych w centrum aktywnym enzymów

Jedną z metod badania centrum aktywnego enzymów jest modyfikowanie grup czynnych enzymu, a następnie ustalanie zależności między liczbą zmodyfikowanych reszt aminokwasowych, a aktywnością katalityczną (3). W dalszych etapach badań konieczna jest lokalizacja zmodyfikowanych reszt w pierwszorzędowej strukturze enzymu.

### II-2.1. Zastosowanie metod immunologicznych do lokalizacji zmodyfikowanych grup

Największą trudność w lokalizacji miejsca modyfikacji w cząsteczce enzymu sprawia izolowanie peptydu, zawierającego resztę zmodyfikowaną, spośród produktów degradacji badanego enzymu. Powszechnie stosowane konwencjonalne metody rozdzielania peptydów są pracochłonne i mało wydajne.

Bardzo użyteczną okazała się zaproponowana w 1970 roku przez Givola i wsp. (54) immunologiczna metoda izolowania zmodyfikowanych peptydów z mieszaniny produktów degradacji znakowanych specyficznymi białkami. Wykorzystano do tego celu specyficzne przeciwciała. Zmodyfikowane chemicznie białko posiada odmienne od niezmodyfikowanego właściwości antygenowe, co stwarza możliwości zastosowania przeciwciał do izolowania peptydów zawierających tę grupę (55). Surowice odpornościowe, otrzymane przez immunizację zwierząt za pomocą zmodyfikowanych białek, praktycznie nie reagują z białkami natywnymi, natomiast oddziałują z wszystkimi białkami zmodyfikowanymi działaniem tego samego odczynnika. W metodach immunologicznych zastosowano białka modyfikowane dwuazową pochodną kwasu arsanilowego (DAA), dwuazo-1-H-tetrazolem (DHT), dwunitrofenolem (DNP) oraz białka sprzężone z nitrotyrozyną. Zmodyfikowane białka służyły jako antygeny i wywoływały silne reakcje odpornościowe (Tabela). Powstałe przeciwko tym antygenom przeciwciała izolowano z osocza krwi immu-

nizowanych zwierząt. Początkowo do oczyszczania przeciwciał stosowano tak zwane immunosorbenty. Immunosorbent stanowił połączenie haptenu prostego \*) związanego bezpośrednio lub poprzez białko z agarozą. Immunosorbent selektywnie wiązał specyficzne przeciwciała (13, 56, 57, 58), które eluowano 0,1 M kwasem octowym (56, 57, 58) lub 1 M amoniakiem (13). W tych warunkach występowała jednak częściowa inaktywacja przeciwciał. Dlatego więc, ostatecznie oczyszczano przeciwciała frakcjonując białka siarczanem amonu, a następnie stosując wymiennicze jonowe (30). Przeciwciała unieruchamiano na aktywowanej bromocyjanem agarozie. W celu lokalizacji miejsca modyfikacji badane białko poddawano działaniu enzymów proteolitycznych. Z mieszaniny otrzymanych peptydów izolowano zmodyfikowane fragmenty łańcucha polipeptydowego na kolumnie z unieruchomionymi przeciwciałami (Ryc. 5). Ponad 95% zmodyfikowanych peptydów wiązało się efektywnie z przeciwciałami. Kolumn z przeciwciałami używać można wielokrotnie bez dużych strat w ich aktywności (30, 58).

Tabela

Wiązanie zmodyfikowanych peptydów z przeciwciałami\*)

Lp.	Antygen (haptenu-białko)	Źródło pochodzenia zmodyfikowanych peptydów**)	Miejsce modyfikacji w enzymie	Piśmiennictwo
1	DNP-albumina	DNP-rybonukleaza	Lys 41	56
2	DAA-albumina	DAA-karboksypeptydaza A	Tyr 19, 248, 277	56
3	DNP-albumina	DNP-lizozym***)	Tyr 23	57
4	DAA-ovoalbumina	DAA-karboksypeptydaza A	Tyr 248	13
5	Nitrotyrozyloalbumina	Nitro-lizozym	Tyr 20, 23	58
6	Nitrotyrozyloalbumina	Nitro-karboksypeptydaza A	preferencyjnie Tyr 248, w mniejszym stopniu 169>277>240	30
7	DHT-albumina	DHT-karboksypeptydaza A	Tyr 248	59

\*) Przeciwciała otrzymano z surowicy krwi zwierząt uprzednio immunizowanych zmodyfikowanym białkiem. Po oczyszczeniu specyficznych przeciwciał unieruchomiono je na nierozpuszczalnym nośniku.

\*\*\*) Zmodyfikowane peptydy otrzymywano po proteolitycznej hydrolizie enzymów.

\*\*\*) Lizozym poddawano kolejno nitrowaniu, redukcji nitro-pochodnej do amino-pochodnej i dwinitrofenylacji, co prowadziło do powstania reszty DNP-NH<sub>2</sub> tyrozylowej.

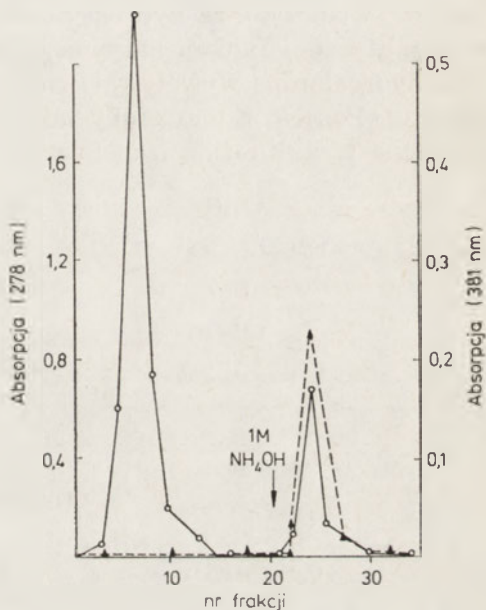
\*) Haptenu zwane są antygenami reszkowymi lub antygenami niekompletnymi. Haptenu proste są to niskocząsteczkowe związki chemiczne, które po połączeniu z białkiem nabywają zdolność pobudzania organizmu do wytwarzania przeciwciał, a zatem stają się pełnowartościowymi antygenami (przyp. autora).



Wykorzystanie związanych przeciwciał jako narzędzia do izolowania zmodyfikowanych peptydów okazało się też użyteczne w badaniach sekwencji aminokwasowej enzymów. Lokalizacja miejsca modyfikacji umożliwia bliższą charakterystykę grup dostępnych modyfikacji i w konsekwencji pozwala na identyfikację grup funkcyjnych. Na uwagę zasługuje fakt, że grupy występujące w centrach aktywnych enzymów, na przykład tyrozyna 248 w karboksypeptydazie A, lizyna 41 w rybonukleazie, ulegają szczególnie łatwo modyfikacjom (Tabela). Problem reaktywności grup funkcyjnych enzymów omówiono w następnym artykule.

**Ryc. 5.** Izolowanie peptydów nitrotyrozylowych z hydrolizatu zmodyfikowanej karboksypeptydazy A, przy użyciu chromatografii powinowactwa. Przeciwciała przeciwko nitrotyrozynie unieruchomione były na agarozie (Sephacrose 4-B) (30).

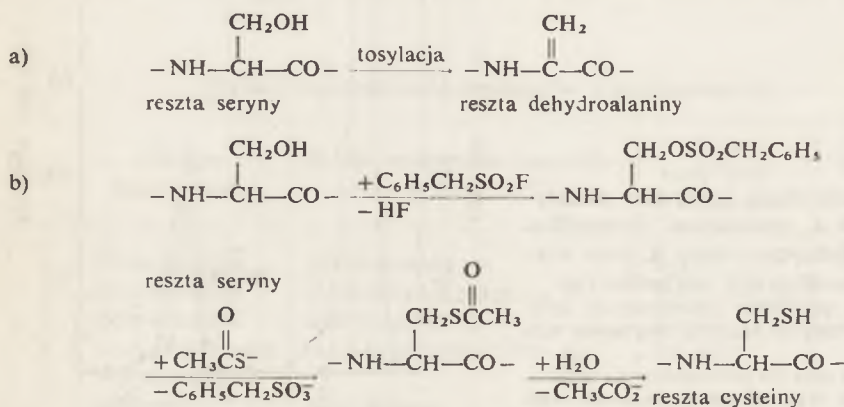
○ absorpcja przy 278 nm (oznaczenie białka),  
 △ absorpcja przy 381 nm (oznaczenie reszt nitrotyrozylowych).



W ostatnich latach metody immunologiczne znalazły zastosowanie w następujących badaniach: struktury determinantów antygenowych (60, 61, 62), centrum aktywnego przeciwciał (63, 64, 65), miejsc wiązania przeciwciał na powierzchni enzymu (66) oraz w badaniach ogólnej konformacji białek (67, 68, 69, 70, 71). Unieruchomione przeciwciała zastosowano także do oczyszczania enzymów. Daddona i Kelley (72) otrzymali frakcję  $\gamma$ -globulin specyficznych dla handlowego preparatu deaminazy adeninowej (E.C. 3.5.4.4) z jelit cielęcia. Przeciwciała te wiązały deaminazę adeninową z erytrocytów ludzkich. Po rozbiciu kompleksu przeciwciał-enzym otrzymano jednorodną 800 000 razy oczyszczoną deaminazę adeninową z 35% wyjściową aktywnością enzymu. W podobny sposób, na kolumnie z unieruchomionym immunosorbentem, oczyszczono około 2 000-krotnie  $\alpha$ -mannozydazę (E.C. 3.2.1.24) (73).

## II-2.2. „Mutacje” chemiczne i enzymatyczne pojedynczych aminokwasów funkcyjnych

Zmiana pojedynczej grupy lub zamiana jednego aminokwasu na inny jest jedną z najbardziej skutecznych metod wyjaśniania roli poszczególnych grup w katalizie enzymatycznej. Przekształcenia pojedynczej reszty aminokwasowej w cząsteczce białka można dokonać chemicznie, zaś zamianę reszt — enzymatycznie. Strumeyer, White i Koshland (74) działając chlorkiem *p*-toluenosulfonowym a następnie wodorotlenkiem sodowym przekształcili serynę w centrum aktywnym chymotrypsyny w dehydroalaninę (Ryc. 6a). Tak zmodyfikowana chymotrypsyna nazywana anhydrochymotrypsyną nie wykazywała aktywności enzymatycznej, co świadczyło, że hydroksylowa grupa seryny odgrywa istotną rolę w katalitycznej funkcji natywnego enzymu (74). Przekształcenie seryny w dehydroalaninę wywoływało znaczne zmiany właściwości chemicznych enzymu. Podjęto zatem próby takiego modyfikowania reszty seryny, by była ona strukturalnie i chemicznie podobna do natywnej seryny (75).



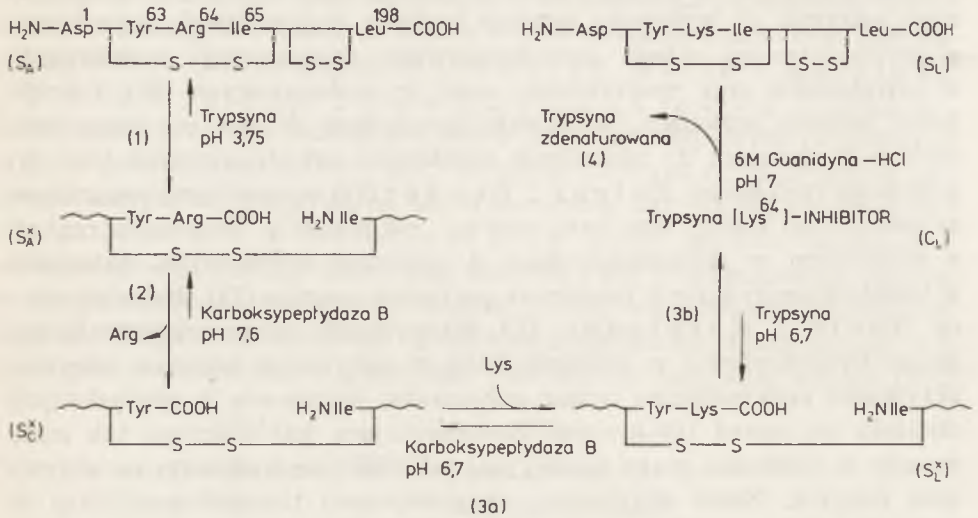
Ryc. 6. „Chemiczne mutacje” chymotrypsyny poprzez przekształcenie seryny w dehydroalaninę (a) oraz przekształcenie seryny w centrum aktywnym subtiloptydazy A w cysteinę (b) (74, 78)

Podobną chemicznie i przestrzennie do grupy hydroksylowej seryny jest grupa tiolowa cysteiny. Promienie Van der Waalsa w przypadku tlenu wynoszą 1,40 Å i w przypadku siarki 1,85 Å (76), a więc zmiana OH na SH może wywołać niewielkie tylko zmiany wielkości grupy funkcyjnej (o około 0,4 Å). Ponadto grupa SH jest bardziej reaktywna niż grupa OH, jako nukleofil inicjujący reakcję. Metodę przekształcenia seryny w cysteinę zastosowano do badania subtiloptydazy A (E.C. 3.4.4.16), ponieważ enzym ten nie zawiera wiązań dwusiarczkowych, które w warunkach reakcji mogą ulec hydrolizie do grup sulfydrylowych (75). Ponadto enzym ten posiada serynę w centrum aktywnym, którą można blokować dwuizopropylodifluorofosforanem (77). W wyniku reakcji grupy hydroksylowej natywnej subtiloptydazy A z fluorkiem fenylometanosulfonylu, a następn-

nie tiooctanu (Ryc. 6b) powstaje grupa SH (78). W przeciwieństwie do natywnej subtilopeptydazy A, nowopowstały tioenzym jest hamowany przez pCMB, lecz nie jest hamowany przez dwuizopropylodifluorofosforan (79). Zmiana grupy OH na SH nie wywołuje zmiany właściwości fizykochemicznych enzymu, co wykazano poprzez badania sedimentacji, ruchliwości elektroforetycznej, składu aminokwasowego, fluorescencji, pochłaniania w ultrafiolecie oraz reaktywności reszt tryptofanowych (80). Początkowe badania wykazały, że tiosubtilopeptydaza A jest enzymatycznie czynna w stosunku do niektórych substratów nitrofenylowych (78). Na podstawie tych badań *P o l g a r i B e n d e r* (79) wyrazili przypuszczenie, że mechanizm reakcji obu form enzymu jest podobny. W wyniku reakcji z substratem w subtilopeptydazie A powstaje acyloenzym, natomiast w tiosubtilopeptydazie A tioestrowa pochodna enzymu (79). Jednakże prace *N e e t a i K o s h l a n d a* (75, 80) wykazały, że po przekształceniu grupy hydroksylowej w sulfhydrylową w aktywnym centrum enzymu, aktywność enzymatyczna wobec substratów estrowych i peptydowych obniżała się ponad 100-krotnie. Zastanawiające jest dlaczego tak małe zmiany w wielkości grupy funkcyjnej tak znacznie wpływają na aktywność enzymu. Zanik aktywności enzymatycznej tiosubtilopeptydazy A wskazuje na niezwykłą wrażliwość reszt katalitycznie czynnych na nieznaczne nawet zmiany struktury. Prawdopodobnie zmiana grupy OH na SH zakłóca strukturę centrum aktywnego ze względu na wielkość grupy SH i jej większą zdolność do polaryzacji (81).

*N e e t i K o s h l a n d* (75) nazwali zmianę pojedynczej reszty aminokwasowej „mutacją chemiczną” i porównując efekty tej „mutacji” z mutacją genetyczną uważają, że każda zmiana w katalitycznie czynnej grupie nieuchronnie musi prowadzić do zaniku funkcji biologicznych. Dalsze badania nie dostarczyły jednak poparcia eksperymentalnego tej hipotezy. W 1969 r. *S e a l o c k i L a s k o w s k i* (82) przeprowadzili „enzymatyczną mutację” inhibitora trypsyny z nasion soi, to jest enzymatycznie zamienili, warunkującą jego właściwości hamujące, argininę 64 na lizynę. W zamianie tej zastosowano trypsynę i karboksypeptydazę B o niskich stężeniach (E.C. 3.4.2.2) do hydrolizy określonych wiązań peptydowych, a do wtórnej syntezy wiązań peptydowych te enzymy w znacznie wyższych stężeniach (Ryc. 7). Zmodyfikowany inhibitor mimo, że wykazywał nieco zmienione właściwości kinetyczne, zachował pełną zdolność hamowania (82). W sojowym inhibitorze trypsyny zatem, zarówno lizyna jak i arginina, mogą odpowiadać za stechiometryczne łączenie jego z trypsyną i hamowanie jej aktywności. Do modyfikacji inhibitora trypsyny z siary krów zastosowano karbamoilację lizyny, co prowadziło do jej zmiany w homocytrulinę, oraz guanidynację powodującą przekształcenie lizyny w homoargininę (38, 83). Karbamoilacja pojedynczej reszty Lys 18 w inhibitorze powodowała prawie całkowity zanik aktywności antytrypsynowej, co pozwoliło wnioskować, że Lys 18 występuje w obsza-

rze cząsteczki inhibitora istotnym dla jego funkcji. Natomiast przekształcenie lizyny 18 w homoargininę nie wywoływało wyraźnych zmian zdolności hamowania. Wynika stąd, że zamiana istotnej dla funkcji inhibitora



**Ryc. 7.** Kolejność reakcji zastosowanych w „enzymatycznej mutacji” inhibitora trypsyny z nasion soi (82)

- $S_A$  — natywny inhibitor z wiązaniem Arg 64 — Ileu 65  
 $S_A^A$  — inhibitor z rozszczepionym wiązaniem pomiędzy Arg 64 i Ileu 65  
 $S_A^{A'}$  — inhibitor bez Arg 64  
 $S_A^{A''}$  — inhibitor z rozszczepionym wiązaniem pomiędzy Lys 64 a Ileu 65  
 $C_L$  — kompleks trypsyny z inhibitorem zawierającym Lys 64  
 $S_C$  — modyfikowany inhibitor z wiązaniem Lys 64 — Ileu 65

reszty arginylowej w lizylogą i odwrotnie: reszty lizylogowej na analog argininy, nie wpływa istotnie na jego reakcję z trypsyną.

### II-3. Unieruchamianie enzymów oligomerycznych na nierozpuszczalnym podłożu

Do zrozumienia funkcji katalitycznej enzymów oligomerycznych konieczne jest badanie aktywności i konformacji izolowanych podjednostek i ich wzajemnych interakcji. Nie jest to łatwe ze względu na naturalną tendencję podjednostek do asocjacji. Wiązanie podjednostek z nierozpuszczalnym podłożem pozwala na ich przestrzenne odizolowanie i uniemożliwia reasocjację. Porównanie właściwości pojedynczych podjednostek i oligomeru pozwala ocenić znaczenie interakcji podjednostek w reakcji enzymatycznej.

W wielu przypadkach regulatorowe właściwości enzymów allosterycznych mogą zanikać po ich dysocjacji na podjednostki, bez utraty aktywności enzymatycznej a czasami nawet z jej wzrostem (84).

W cząsteczce fruktosodwufosfatazy (E.C. 3.1.3.11) — enzymu tetramerycznego — występują cztery miejsca wiązania substratu oraz dodatkowe

cztery miejsca wiązania niewspółzawodniczego inhibitora, którym jest AMP. Po związaniu z nośnikiem (Sepharose) enzym zachowywał ponad 70% aktywności katalitycznej, lecz stawał się znacznie mniej wrażliwy na hamujące działanie AMP. Unieruchomiony dimer fruktozodwufosfatazy zachowuje aktywność katalityczną, lecz staje się całkowicie niewrażliwy na działanie AMP (85). Wydaje się, że do utrzymania prawidłowej konformacji miejsca wiążącego inhibitor konieczna jest interakcja między czterema podjednostkami tego enzymu.

Różnorodność miejsc wiążących substrat w oligomerach enzymów nasuwa pytanie, czy każda podjednostka jest aktywna katalitycznie. Pojedyncze podjednostki aldolazy fruktozofosforanowej z mięśni królika (E.C. 4.1.2.13) połączone z nierozpuszczalną matrycą zachowywały aktywność enzymatyczną, lecz wykazywały znacznie większą podatność na denaturację. Po dodaniu nadmiaru izolowanych podjednostek następowała re-naturacja tetramerycznej struktury enzymu (86, 87).

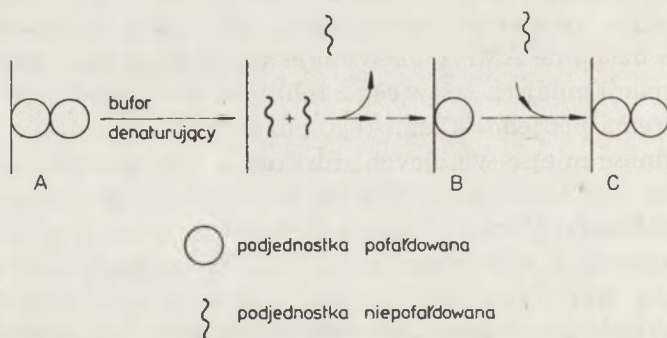
Podobne wyniki uzyskano badając kinazę kreatynową (E.C. 2.7.3.2) z mięśni szkieletowych królika (88). Enzym ten składa się z dwu podobnych (jeżeli nie identycznych) podjednostek o masie cząsteczkowej 41 000, posiadających reaktywne grupy tiolowe (88). Kinazę unieruchomioną na agarozie traktowano związkami denaturującymi. Bufor denaturujący (zawierający 12,5 M dwutiotreitol i 6 M chlorowoderek guanidyny) powodował dysocjację enzymu na podjednostki i ich rozfałdowanie. Po usunięciu chlorowodoru guanidyny unieruchomione podjednostki odzyskiwały natywną konformację (Ryc. 8B) i aktywność enzymatyczną<sup>\*)</sup>. Dodanie nadmiaru izolowanych podjednostek przywracało formę dimeru (Ryc. 8C).

Octan — silny aktywator zarówno natywnej jak i unieruchomionej kinazy kreatynowej, nie wpływał na aktywność unieruchomionego monomeru enzymu (90). Pozwala to wnioskować, że octan nie działa bezpośrednio na katalityczne miejsce poszczególnych podjednostek, lecz działa na dimer enzymu wywołując zmiany jego konformacji.

Dehydrogenazę mleczanową (LDH) (E.C. 1.1.1.27) z mięśni królika wiązano z agarozą (Sepharose 4-B) poprzez grupy aminowe (91). Po dysocjacji enzymu, unieruchomione pojedyncze (identyczne) podjednostki nie wykazywały aktywności. Nieaktywne były również podjednostki dehydrogenazy związane z agarozą poprzez grupy sulfhydrylowe. W oświadczeniach reaktywacja wymagała odtworzenia tetramerycznej struktury enzymu (91), czyli utworzenie katalitycznie czynnej formy tego enzymu wymaga współdziałania między podjednostkami.

<sup>\*)</sup> Obserwacja ta wydaje się być szczególnie interesująca w powiązaniu z faktem, że inny pokrewny funkcjonalnie enzym — kinaza argininowa (E.C. 2.7.3.3) występuje u wielu gatunków w formie monomerycznej. Morrison (89) wykazał duże podobieństwo między kinazą kreatynową a argininową. Ciężar cząsteczkowy monomerów obu enzymów wynosi 40 000, a sekwencja aminokwasowa wokół reaktywnej grupy tiolowej jest identyczna.

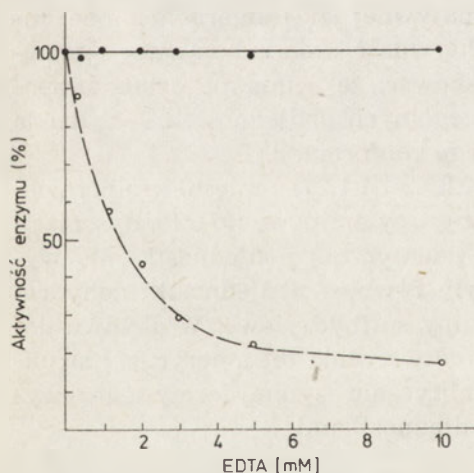
Unieruchomienie na nierozpuszczalnym podłożu może zwiększać stabilność enzymów. Hirsch-Kolb i Greenberg (92, 93) wykazali, że arginaza z wątroby szczura jest tetramerem wiążącym cztery atomy



**Ryc. 8.** Schemat unieruchomionych pochodnych kinazy kreatynowej (88)

Pochodna A — enzym unieruchomiony na nierozpuszczalnym podłożu; pochodna B — podjednostka enzymu po odnowieniu natywnej struktury; pochodna C — dimer enzymu unieruchomionego, powstały po połączeniu pochodnej B z izolowanymi podjednostkami.

manganu. Dwa atomy  $Mn^{+2}$  są mocno związane z enzymem, zaś dwa następne, łatwo oddysocjują w wyniku czego enzym traci około 50% aktywności enzymatycznej. Związek chelatujący — EDTA, jest więc inhibitorem arginazy (92, 93). Unieruchomienie arginazy na aktywowanej bromocyjanem agarozie (Sephacrose 4-B) chroni enzym przed hamującym działaniem EDTA (Ryc. 9).



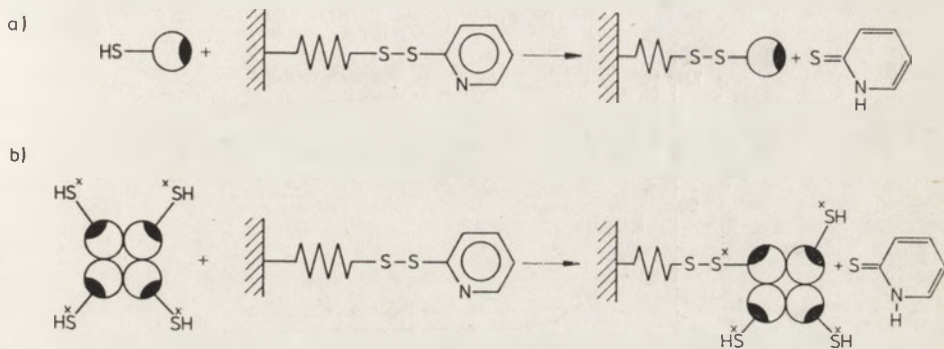
**Ryc. 9.** Zależne od EDTA aktywności arginazy natywnej i unieruchomionej na agarozie (94)

● — unieruchomiony enzym,  
○ — natywny enzym.

W przeciwieństwie do arginazy natywnej, enzym związany z agarozą jest także odporny na działanie podwyższonej temperatury (1 godz. w  $60^{\circ}C$ ) nawet bez dodatku jonów manganowych (94). Wynika z tego, że unieruchomienie arginazy w znacznym stopniu uniezależnia strukturę i funk-

cję enzymu od obecności jonów manganawych. Prawdopodobnie unieruchomienie enzymu stabilizuje konieczne do utrzymania aktywności przestrzenne ułożenie podjednostek usztywniając konformację miejsca katalitycznego enzymu (94).

Enzymy zawierające grupy tiolowe można odwracalnie unieruchamiać poprzez wiązanie z zawierającymi mostek S-S pochodnymi agarozy. Rycina 10 przedstawia tworzenie takich połączeń. W enzymach złożonych z podjednostek zawierających funkcyjne grupy sulfydrylowe tylko część grup SH łączy się z tiolową pochodną agarozy (95).



**Ryc. 10.** Unieruchamianie enzymów poprzez wymianę tiol-dwusiarczek (95). ○ — oznacza enzym lub jego podjednostkę, czarnym kolorem zaznaczono obszar funkcyjny enzymu

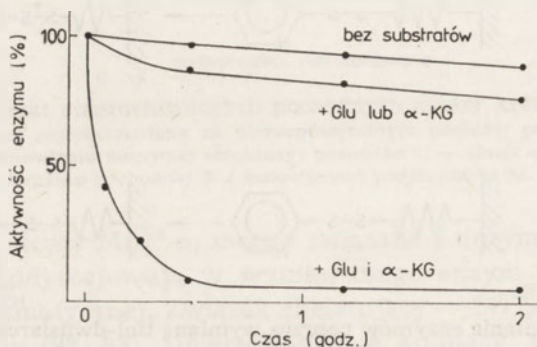
a) unieruchomienie enzymu zawierającego niefunkcyjne grupy sulfydrylowe,  
 b) unieruchomienie podjednostki enzymatycznej zawierającej istotną katalitycznie grupę sulfydrylową.

Ureaza składa się z 4—8 podjednostek, w których łącznie występuje osiem tiolowych grup funkcyjnych (96). Enzym ten odwracalnie unieruchomiony poprzez wiązanie dwusiarczkowe z tiolową pochodną agarozy cechuje się wysoką aktywnością właściwą (97). Wybiórcze wiązanie enzymu poprzez grupy tiolowe pozwala na równoczesne około 10-krotne oczyszczenie handlowego preparatu. Carlsson (98) uważa, że funkcyjne grupy tiolowe ureazy posiadają zwiększoną reaktywność chemiczną i preferencyjnie reagują z nośnikiem. Kowalencyjne wiązanie ureazy z matrycą jest odwracalne i enzym można wymywać z nośnika za pomocą niskocząsteczkowych odczynników tiolowych, na przykład dwutiotreitolu (98). Unieruchamianie białek poprzez wymianę tiol—dwusiarczek może być użyteczne w śledzeniu struktury i funkcji enzymów, które składają się z podjednostek związanych niekowalencyjnie.

**II-4. Modyfikacje chemiczne enzymu zależne od obecności substratu**

Reaktywność chemiczna niektórych reszt aminokwasowych w cząsteczce enzymu rośnie niekiedy znacznie we wczesnych etapach katalizy. Zjawisko takie, wywołane kontaktem enzymu z substratem nazwano syn-

katalizą (99). Wyniki początkowych badań przeprowadzone na cytoplazmatycznej aminotransferazie asparaginianowej (E.C. 2.6.1.1) z serca świni sugerowały, że modyfikacje synkatalityczne zachodzą wyłącznie w obecności kompletu substratów. Nitrowanie bowiem czteronitrometanem tego enzymu w obecności jednego z dwu substratów (lub w obecności strukturalnego analogu substratu) nie powoduje zmian w aktywności enzymu (Ryc. 11). Natomiast w obecności obydwu substratów, czteronitrometan powoduje szybką inaktywację aminotransferazy asparaginianowej. Dalsze badania wykazały, że modyfikowane były przede wszystkim reszty sulfhydrylowe enzymu (101).



**Ryc. 11.** Zależność inaktywacji aminotransferazy asparaginianowej przez czteronitrometan (TNM) od obecności substratów (100)

Enzym inkubowano z TNM w obecności L-glutaminianu (Glu) i  $\alpha$ -ketoglutaranu ( $\alpha$ -KG), w obecności Glu lub  $\alpha$ -KG oraz bez Glu i bez  $\alpha$ -KG.

Brichmeier i Christen (102) badając synkatalityczną modyfikację aminotransferazy przez bromopirogronian zasugerowali, że inaktywacja enzymu jest wynikiem alkilacji cysteiny (zlokalizowanej w pozycji 390 w łańcuchu polipeptydowym aminotransferazy) w pierwszych etapach transaminacji \*).

Podczas synkatalitycznej modyfikacji, bromopirogronian odgrywa podwójną rolę — może spełniać rolę substratu i jednocześnie może być odczynnikiem modyfikującym (alkilującym). Bromopirogronian działając jako substrat, tworzy — wraz z substratem aminokwasowym — kowalencyjne kompleksy pośrednie z enzymem. W jednym z tych kompleksów pośrednich, reszta cysteiny 390 staje się bardziej podatna na modyfikację, skutkiem czego jest alkilowana przez bromopirogronian. W przypadku tej modyfikacji aminotransferaza asparaginianowa ulega szybkiej inaktywacji przez bromopirogronian, w obecności tylko aminokwasowego substratu (glutaminianu), gdyż pirogronian zastępuje w reakcji kwas  $\alpha$ -ketoglutarowy.

\*) Transaminacja katalizowana przez aminotransferazę obejmuje reakcje pośrednie przekształcające wyjściową pirydoksalową formę enzymu w formę pirydoksaminiową.



Podczas badania mechanizmu działania aldolaz, transaldolaz i transketolaz, Christen (103) wprowadził pojęcie parakatalitycznej reakcji enzymatycznej i parakatalitycznej modyfikacji enzymów. Parakatalityczne modyfikacje występują w końcowych etapach katalizy enzymatycznej i polegają na utlenieniu karboanionowej formy przejściowej kompleksu enzym—substrat. Modyfikację parakatalityczną zaobserwowano: w aldolazie fruktozo-dwufosforanowej z mięśni królika i z drożdży, w transaldolazie (E.C. 2.2.1.2) i w transketolazie (E.C. 2.2.1.1) (104). Modyfikacji parakatalitycznej towarzyszy szybka inaktywacja enzymu. Charakterystycznym jest, że modyfikacja parakatalityczna następuje w obecności specyficznego substratu i nie jest wywoływana przez żaden analog substratu (105). W przeciwieństwie do znanych obecnie modyfikacji jest to reakcja całkowicie zależna od naturalnego substratu określonego enzymu. Jednakże modyfikacja parakatalityczna nie musi być specyficzna wobec czynnika modyfikującego. Czynnikiem modyfikującym może być wiele związków o właściwościach utleniających, na przykład żelazicyjanek, 2,6-dwuchlorofenolindofenol, porfiryne, czteronitrometan i nadtlenek wodoru. Właściwości inaktywowanych (poprzez utlenienie) enzymów wskazują, że modyfikacja kompleksu enzym-substrat jest kowalencyjna i nieodwracalna (103). Przypuszczalnie, modyfikacja uniemożliwia rozpad utlenionego kompleksu blokując powstanie wolnego enzymu i produktu reakcji.

Zarówno synkatalityczne jak i parakatalityczne modyfikacje enzymu zależą od obecności substratu. Reaktywność pewnych grup enzymu wzrasta nie tylko podczas tworzenia adsorpcyjnego kompleksu enzym-substrat, lecz również podczas następnych etapów tzw. fazy kowalencyjnej (to jest w tym etapie reakcji, gdzie wiązanie kowalencyjne jest wytwarzane lub rozrywane). Podczas modyfikacji synkatalitycznej tworzenie kompleksu enzym-substrat wzmaga reaktywność niektórych grup w bocznych łańcuchach aminokwasowych. Modyfikacja parakatalityczna całkowicie zależy od obecności specyficznego substratu i niespecyficznego od czynnika modyfikującego posiadającego właściwości utleniające. W przypadku tej modyfikacji zakłada się utlenienie (zaktywowanego w kompleksie z enzymem) substratu. W efekcie synkatalitycznym natomiast zmiana konformacji enzymu podczas katalizy enzymatycznej umożliwia modyfikację określonych reszt aminokwasowych w enzymie (105).

Opisane zjawiska (synkatalizy i parakatalizy) świadczą o tym, jak duże zmiany mogą zachodzić w orientacji grup funkcyjnych podczas katalizy. Obecność substratu umożliwia modyfikację określonych grup funkcyjnych w enzymie (synkataliza) lub kompleksu enzym-substrat (parakataliza). Możliwość występowania tych zjawisk należy wziąć pod uwagę w badaniach, w których substrat używany jest do ochrony centrum

aktywnego przeciwko modyfikacji. W zależnych od substratu modyfikacjach enzymu, substrat nie ochrania, lecz indukuje podatność na modyfikacje grup funkcyjnych enzymu.

### Uwagi końcowe

Nieustannie gromadzące się informacje dotyczące metod badania budowy i funkcji białek spowodowały podjęcie w niniejszym artykule próby usystematyzowania wybranych zagadnień. Modyfikacje chemiczne odgrywają istotną rolę zarówno w badaniu sekwencji aminokwasów w białkach jak i w badaniu ich struktur przestrzennych. Modyfikacje są pierwszym etapem badań, prowadzącym do określenia rodzaju, ilości i lokalizacji reaktywnych reszt aminokwasowych biorących udział w funkcji katalitycznej enzymów. Mogą one być użyteczne w poznawaniu i porównywaniu budowy poszczególnych enzymów pochodzących z systematycznie odległych gatunków. Rozwój metod badawczych, takich jak unieruchamianie białek na nierozpuszczalnym podłożu oraz zastosowanie metod immunologicznych, umożliwi bardziej wnikliwą analizę zależności między strukturą i funkcją białek.

*Artykuł nadszedł 20.4.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 22.3.1978.*

### PIŚMIENICTWO

1. Shaw E., (1970), *Physiol. Rev.*, **50**, 244—296.
2. Baranowski T., (1970), *Post. Biochem.* **16**, 319—345.
3. Palamarczyk G., Rytka J., (1970), *Post. Biochem.* **16**, 231—247.
4. Edman P., (1950), *Acta Chem. Scand.* **4**, 277—283.
5. Niall H. D., (1970), w *Methods in Enzymology*, red. Hirs C. H. W., Timasheff S. N., t. 27, str. 942—1010, Academic Press, New York, London.
6. Witkop B., (1961), w *Advances in Protein Chemistry*, red. Anfinsen C. B. jr., Anson M. L., Bailey K., Edsall J. T., t. 16, str. 221—321, Academic Press, New York, London.
7. Spande T. F., Witkop B., Degani Y., Patchornik A., (1970), w *Advances in Protein Chemistry*, red. Anfinsen C. B. jr., Edsall J. T., Richards F. M., t. 24, str. 97—260, Academic Press, New York, London.
8. Schreiber J., Witkop B., (1964), *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2441—2445.
9. Gross E., Witkop B., (1962), *J. Biol. Chem.* **237**, 1856—1860.
10. Gross E., (1967), w *Methods in Enzymology*, red. Hirs C. H. W., t. 11, str. 238—255, Academic Press, New York, London.
11. Ikenaka T., Odani S., Koide T., (1974), w *Bayer Symposium V Proteinase Inhibitors*, red. Springer-Verlag, str. 325—343.
12. Nomoto M., Srinivasan N. G., Bradshaw R. A., Wade R. D., Neurath H., (1969), *Biochemistry* **8**, 2755—2762.
13. Johansen J. T., Livingston D. M., Vallee B. L., (1972), *Biochemistry* **11**, 2584—2588.

14. Muszyńska G., Riordan J. F., (1973), *Fed. Proc.* **32**, Abstr. 1371, str. 446.
15. Mamiya G., Masakuni M., Matsuyama S., Mori T., Sekita K., (1976), *Abstr. Int. Congr. Biochem.* 10<sup>th</sup> IUB, Hamburg, str. 218.
16. Meloun B., Moravek L., Kostka V., (1976), *Abstr. Int. Congr. Biochem.* 10<sup>th</sup> IUB, Hamburg, str. 219.
17. Patchornik A., Lawson W. B., Witkop B., (1958), *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4748—4749.
18. Ramachandran J. K., Witkop B., (1967), w *Methods in Enzymology*, red. Hirs C. H. W., t. 11, str. 283—299, Academic Press, New York, London.
19. Shaltiel S., Patchornik A., (1963), *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2799—2806.
20. Means G. E., Feeney R. E., (1971), *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day Inc., San Francisco, Cambridge London, Amsterdam.
21. Chu R. C. L., Yasunobu K. T., (1964), *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 148—149.
22. Matsubara H., Smith E. L., (1963), *J. Biol. Chem.* **238**, 2732—2753.
23. Smith E. L., (1968), *Harvey Lectures*, red. Zinder N. D., Billingham R. E., Khorana H. G., Berson S. A., Yalow R. S., Pincus G., Edsall J. T., Smith E. L., Corn J. W., Sperry R. W., t. 62, str. 231—256, Academic Press, New York, London.
24. Stevens F. C., Glazer A. N., Smith E. L., (1967), *J. Biol. Chem.* **242**, 2764—2779.
25. Smith E. L., (1970), w *The Enzymes*, 3 wyd., red. Boyer P. D., t. 1, str. 267—339, Academic Press, New York, London.
26. Raftery M. A., Cole R. D., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**, 467—472.
27. Fraefel W., Acher R., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 615—617.
28. Patchornik A., Wilchek M., Zioudrou C., (1969), *Israel J. Chem.* **7**, 559—565.
29. Zioudrou C., Wilchek M., Sokolovsky M., Patchornik A., (1964), *Israel J. Chem.* **2**, 326—328.
30. Muszyńska G., Riordan J. F., (1976), *Biochemistry* **15**, 46—51.
31. Riordan J. F., Muszyńska G., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 447—451.
32. Wilchek M., Witkop B., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 296—300.
33. Previero A., Coletti-Previero M. A., Axelrud-Cavadore Cl., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 434—438.
34. Ressel Ch., du Vigneaud V., (1954), *J. Biol. Chem.* **211**, 809—814.
35. Shaltiel S., Patchornik A., (1963), *Israel J. Chem.* **1**, 187—190.
36. Anfinsen C. B., Redfield R. R., (1956), *Adv. Prot. Chem.* **11**, 1—100.
37. Stark G. R., (1972), w *Methods in Enzymology*, red. Hirsh C. H. W., Timasheff S. N., t. 25, część B, str. 579—584, Academic Press, New York, London.
38. Čechová D., Muszyńska G., (1970), *FEBS Letters* **8**, 84—86.
39. Muszyńska G., Kleczkowski K., (1971), *Abstr. FEBS Meeting 7<sup>th</sup>*, Varna, abstr. 172, str. 108.
40. Habeeb A. F. S. A., (1972), w *Methods in Enzymology*, red. Hirs C. H. W., Timasheff S. N., t. 25B, str. 558—566, Academic Press New York, London.
41. Shields G. S., Hill R. L., (1959), *J. Biol. Chem.* **234**, 1747—1753.
42. Weil L., Telka M., (1957), *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 473—474.
43. Li C. H., Bertsch L., (1960), *J. Biol. Chem.* **235**, 2638—2641.
44. Yankeelov J. A. jr., Kochert M., Page J., Westphal A., (1966), *Fed. Proc.* **25**, abstr. 2269, str. 590.
45. Yankeelov J. A. jr., (1972), w *Methods in Enzymology*, red. Hirs C. H. W., Timasheff S. N., t. 25, część B, str. 566—579, Academic Press, New York, London.

46. Vallee B. L., Riordan J. F., (1968), *Brookhaven Symp. Biol.* **21**, 91—119.
47. Toi K., Bynum E., Norris E., Itano H. A., (1967), *J. Biol. Chem.* **242**, 1036—1043.
48. Slobin L. I., Singer S. J., (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 1777—1786.
49. Axén R., Ernback S., (1971), *Eur. J. Biochem.* **18**, 351—360.
50. Martin B., Svendsen I., Ottesen M., (1977), Abstr. FEBS Meeting 11<sup>th</sup>, Copenhagen, abstr. A 6—1, 859.
51. Liberatore F. A., McIsaak J. E. jr., Royer G. P., (1976), *FEBS Letters* **68**, 45—48.
52. Kirtley M. E., Koshland D. E. jr., (1972), w *Methods in Enzymology*, red. Hirs C. H. W., Timasheff S. N., t. 26, str. 578—601, Academic Press, New York, London.
53. Muszyńska G., w *Monografiach Biochemicznych PWN*, tom 38, „Elementy enzymologii” — praca zbiorowa, red. Witwicki J., Ardelt W., w druku.
54. Givol D., Weinstein Y., Gorecki M., Wilchek M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 825—830.
55. Pressman D., Grossberg A. L., (1968), w *The Structural Basis of Antibody Specificity*, red. Benjamin W. A., New York, London.
56. Wilchek M., Boccini V., Becker M., Givol D., (1971), *Biochemistry* **10**, 2828—2834.
57. Bustin M., Givol D., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 459—467.
58. Helman M., Givol D., (1971), *Biochem. J.* **125**, 971—974.
59. Cueni L., (1974), *Fed. Proc.* **33**, abstr. 1725, str. 1529.
60. Schlossman S. F., Yaron A., Ben-Efraim S., Sober H. A., (1965), *Biochemistry* **4**, 1638—1645.
61. Schlossman S. F., Ben-Efraim S., Yaron A., Sober H. A., (1966), *J. Exp. Med.* **123**, 1083—1095.
62. Benacerraf B., Green I., Paul W. E., (1967), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **32**, 56a.
63. Sage H. J., Deutsch G. F., Fasman G. D., Levin L., (1964), *Immunochemistry* **1**, 133—142.
64. Givol D., Sela M., (1964), *Biochemistry* **3**, 444—451.
65. Kabat E. A., (1957), *J. Cell. Comp. Physiol. suppl.* **1**, **50**, 79—102.
66. Cowie D. B., informacja prywatna.
67. Furie B., Schechter A. N., Sachs D. H., Anfinsen Ch. B., (1974), *Biochemistry* **13**, 1561—1566.
68. Furie B., Schechter A. N., Sachs D. G., Anfinsen Ch. B., (1975), *J. Mol. Biol.* **92**, 497—506.
69. Sachs D. H., Schechter A. N., Eastlake A., Anfinsen Ch. B., (1972), *Biochemistry* **11**, 4268—4273.
70. Sachs D. H., Schechter A. N., Eastlake A., Anfinsen Ch. B., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 3790—3794.
71. Schechter A. N., (1976), Abstr. Congr. Biochem. 10<sup>th</sup> IUB, Hamburg, str. 141.
72. Daddona P. E., Kelley W. N., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 110—115.
73. Paul E., (1976), *FEBS Letters* **72**, 39—42.
74. Strumeyer D. H., White W. N., Koshland D. E. jr., (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **50**, 931—935.
75. Neet K. E., Koshland D. E. jr., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **56**, 1606—1611.
76. Pauling L., (1960), *Nature of Chemical Bonds*, Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
77. Sanger F., Shaw D. C., (1960), *Nature* **187**, 872—873.
78. Polgar L., Bender M. L., (1966), *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3153—3154.

79. Polgar L., Bender M. L., (1967), *Biochemistry* 6, 610—620.
80. Neet K. E., Nanci A., Koshland D. E. jr., (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 6392—6401.
81. Polgar L., Bender M. L., (1969), *Biochemistry* 8, 136—141.
82. Sealock R. W., Laskowski M. jr., (1969), *Biochemistry* 8, 3703—3710.
83. Muszyńska G., Čechová D., (1970), *FEBS Letters* 8, 274—276.
84. Mond J., Wyman J., Changeux J. P., (1965), *J. Mol. Biol.* 12, 88—118.
85. Grazi E., Margi E., Taraniello S., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1321—1325.
86. Chan W. W-C., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1198—1204.
87. Chan W. W-C., Kaiser C., Salvo J. M., Lawford G. R., (1974), *J. Mol. Biol.* 87, 847—852.
88. Bickerstaff G. F., Price N. C., (1976), *FEBS Letters* 64, 319—322.
89. Morrison J. F., (1973), w *The Enzymes*, 3 wyd., red. Boyer P. D., t. 3, str. 457—486, Academic Press, New York, London.
90. Bickerstaff G. F., Price N. C., (1976), *Biochemical Society Transactions*, t. 4, 565<sup>th</sup> Meeting, Stirling, str. 1061—1063.
91. Chan W. W-C., Mosbach K., (1976), *Biochemistry* 15, 4215—4222.
92. Hirsch-Kolb H., Heine J. P., Kolb H. J., Greenberg D. M., (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 6123—6129.
93. Hirsch-Kolb H., Kolb H. J., Greenberg D. M., (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 395—401.
94. Muszyńska G., (1976), *Protides of Biological Fluids*, 23<sup>rd</sup> Colloquium 1975, red Peeters H., str. 633—637, Pergamon Press,
95. Carlsson J., (1976), *Protides of Biological Fluids*, 23<sup>rd</sup> Colloquium 1975, red. Peeters H., str. 537—540, Pergamon Press.
96. Gorin G., Chin C. C., (1965), *Biochim. Biophys. Acta* 99, 418—426.
97. Carlsson J., Axén R., Brocklehurst K., Crook E. M., (1974), *Eur. J. Biochem.* 44, 189—194.
98. Carlsson J., (1974), *Acta Universitatis Uppsalensis*, Abstr. of Uppsala Dissertations from Faculty of Science 300, Uppsala.
99. Vallee B. L., Riordan J. F., (1969), *Ann. Rev. Biochem.* 38, 733—794.
100. Christen P., Riordan J. F., (1970), *Biochemistry* 9, 3025—3034.
101. Brichmeier W., Wilson K. J., Christen P., (1973), *J. Biol. Chem.* 248, 1751—1759.
102. Brichmeier W., Christen P., (1974), *J. Biol. Chem.* 249, 6311—6315.
103. Christen P., w *Methods in Enzymology*, (w druku).
104. Healy M. J., Christen P., (1972), *J. Am. Chem. Soc.* 94, 7911—7916.
105. Christen P., Cogoli-Greuter M., Healy M. J., Lubini D., (1976), *Eur. J. Biochem.* 63, 223—231.



JACEK TWARDOWSKI \*)

## **Badania białek metodami spektroskopii ramanowskiej i absorpcyjnej w zakresie podczerwieni**

### **The Protein Studying by Raman and Infrared Spectroscopy**

#### *Spis treści*

- I. Wstęp**
- II. Kierunki badań prowadzonych za pomocą spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podczerwieni i ramanowskiej**
- III. Spektroskopia absorpcyjna w zakresie średniej podczerwieni (MIR)**
- IV. Spektroskopia w zakresie dalekiej podczerwieni (FIR)**
- V. Spektroskopia ramanowska**
- VI. Rezonansowa spektroskopia ramanowska**

#### *Contents*

- I. Introduction**
- II. The directions of the infrared and Raman studies**
- III. The middle infrared spectroscopy (MIR)**
- IV. The far infrared spectroscopy (FIR)**
- V. The Raman spectroscopy**
- VI. The resonance Raman spectroscopy**

### **I. Wstęp**

Coraz częstsze zastosowanie metod fizycznych do badań białek (1, 2) umożliwił znaczny postęp w wyjaśnianiu procesów biochemicznych i biofizycznych na poziomie molekularnym, które decydują o funkcjonowaniu układów biologicznych.

W roku 1955 Sanger (3) ustalił sekwencję aminokwasów w cząsteczce insuliny. Od tego czasu poznano wiele struktur pierwszorzędowych białek, a intensywne badania struktury białek za pomocą metod rentgenograficznych, umożliwiły przebadanie do chwili obecnej struktur trzeciorzędowych 58 białek (4, 5). Zestawienie tych białek podano w tabeli 1.

\*) Dr, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Krupnicza 50, 30—060 Kraków.

Wykaz stosowanych skrótów: MIR — zakres średniej podczerwieni; FIR — zakres dalekiej podczerwieni; RR — rezonansowy efekt Ramana; kR — kilo rentgen.

Tabela 1

Wykaz białek o znanej strukturze krystalograficznej (5)

Białko	pochodzenie	autor i rok zbadania
<i>I. Enzymy:</i>		
1. kwaśna proteinaza	<i>E. parasitica</i>	Jenkins i in., 1976
2. kinaza adenylowa	mięśnie świni	Schulz i in., 1973
3. dehydrogenaza alkoholowa	wątroba konia	Branden, 1973, Eklund, 1974
4. anhidraza węglanowa C	człowiek	Liljas i in., 1972
5. anhidraza węglanowa B	człowiek	Kannan i in., 1975
6. karboksypeptydaza A	wół	Lipscomb i in., 1970
7. karboksypeptydaza B	wół	Schmid i Herriott 1975
8. $\alpha$ -chymotrypsyna	wół	Blow, Segal i in., 1971
9. chymotrypsinogen	wół	Freer i in., 1970
10. elastaza	świnia	Shotton i in., 1971
11. dehydrogenaza gliceroalde- hydowo -3-fosforanowa	<i>B. Stereother- mophilus</i>	Buehner i in., 1974
12. heksokinaza	drożdże	Fletterick i in., 1975
13. dehydrogenaza mleczanowa	rekin M4	Adams i in., 1973
14. lizozym	jajo kurze	Imoto i in., 1972
15. dehydrogenaza jabczanowa	świnia	Hill i in., 1972
16. nukleaza	gronkowiec złocisty	Cotton i in., 1971
17. papaina	roślina papaja	Drenth i in., 1971
18. pepsyna	świnia	Andreeva i in., 1976
19. kinaza fosfogliceranu	koń	Blake i Evans, 1974
20. mutaza fosfogliceranu	drożdże	Campbell i in., 1974
21. fosfolipaza A <sub>2</sub>	świnia	Drenth i in., 1976
22. proteaza S/GPB	<i>S. griseus</i>	Delbaere i in., 1975
23. rodanaza	wątroba wołu	Smit i in., 1973
24. rybonukleaza A	wół	Kartha i in., 1967
25. rybonukleaza S	wół	Richards i Wy- coff, 1971
26. subtilizyna BPN'	<i>B. amylolique- faciens</i>	Wright i in., 1969
27. subtilizyna Novo	<i>B. subtilis</i>	Drenth i in., 1971
28. dysmutaza supertlenkowa	wół	Richardson i in., 1975
29. termolizyna	<i>B. termoproteo- lyticus</i>	Colman i in., 1972
30. izomeraza-triosofosforanu	kurczak	Banner i in., 1975
31. trypsyna	wół	Stroud i in., 1974
32. trypsyna — inhibitor	trzustka wołu	Deisenhofer i in., 1973
33. kompleks trypsyna -trypsyna- -inhibitor	wół	Ruhlmann i in., 1973



Tabela 1 c.d.

Białko	pochodzenie	autor i rok zbadania
34. trypsyna-Soybean trypsyna (kompleks)	świnia	Sweet i in., 1974
35. syntetaza t-RNA tyrozyny		Blow i in., 1975
<i>II. Globiny:</i>		
36. hemoglobina	krew konia	Perutz i in., 1968
37. mioglobina	wieloryb	Wytson, 1969
<i>III. Systemy redukujące:</i>		
38. cytochrom b <sub>5</sub>	wątroba cielęca	Mathews i in., 1971
39. cytochrom c	koń	Dickerson i in., 1971
40. cytochrom c <sub>2</sub>	<i>R. rubrum</i>	Salemme i in., 1973
41. ferodoksyna	<i>P. aerogenes</i>	Adman i in., 1973
42. flavodoksyna	<i>D. vulgaris</i>	Andersen i in., 1972, Watenpaugh, 1972
43. białko "high potential iron"		Carter i in., 1972
44. rubredoksyna	<i>C. pasteurianum</i>	Watenpaugh i in., 1973
45. tioredoksyna S <sub>2</sub>	<i>E. coli</i>	Holmgren i in., 1975
<i>IV. Hormony:</i>		
46. glukagon	świnia	Sasaki, Blundell, 1975
47. insulina	świnia	Blundell, 1972
<i>V. Immunoglobuliny:</i>		
48. fragment Bence'a-Jonesa Au	człowiek	Fehlhammer i in., 1975
49. fragment Bence'a-Jonesa Rhe	człowiek	Wang i in., 1973
50. białko Bence'a-Jonesa Mcg	człowiek	Shiffer i in., 1973
51. białko Bence'a-Jonesa REJ	człowiek	Epp i in., 1974
52. fragment Fab	człowiek	Poljal i in., 1973
53. fragment McPC603	mysz	Segal i in., 1974
54. fragment F <sub>c</sub>	człowiek	Deisenhofer i in., 1976
<i>VI. Inne:</i>		
55. białko bakteriochlorofilu	<i>C. limicola</i>	Fenna i Matthe-wa, 1976
56. konkanawalina A	fasola	Jack i in., 1971
57. miogen	karp	Kretsinger i Nockolds, 1973
58. prealbumina		Blake i in., 1974

Metody spektroskopowe stosuje się jako uzupełnienie wiadomości uzyskanych techniką dyfrakcji promieni X. Metody spektroskopowe i dyfrakcji promieni rentgenowskich są przydatne do obserwacji zmian struktury i mechanizmów zachodzących w białkach. Jedną z technik dobrze nadających się do badań zmian strukturalnych, które przebiegają w białkach jest spektroskopia w zakresie podczerwieni.

Od kilku lat w spektroskopii w zakresie podczerwieni stosuje się transformację fourierowską do analizy widm absorpcyjnych, a w spektroskopii ramanowskiej stosuje się silne źródła światła monochromatycznego — lasery, co znacznie rozszerza stosowalność tych metod do badań problemów biochemicznych i bifizycznych. Badania białek za pomocą klasycznych spektrofotometrów absorpcyjnych w zakresie podczerwieni ograniczały się głównie do określania struktury drugorzędowej białek.

## **II. Kierunki badań prowadzonych za pomocą spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podczerwieni i ramanowskiej**

Z pośród wielu technik spektroskopowych do badań białek ze względu na rodzaje aparatury i metody, używa się spektroskopii:

- a) absorpcyjnej w zakresie średniej podczerwieni (MIR) od 600 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ ,
- b) oraz w zakresie dalekiej podczerwieni (FIR) od około 10  $\text{cm}^{-1}$  do 600  $\text{cm}^{-1}$ ,
- c) ramanowskiej w zakresie przesunięć częstotliwości od około 10  $\text{cm}^{-1}$  do 4000  $\text{cm}^{-1}$ ,
- d) oraz rezonansowego efektu Ramana w tym samym zakresie przesunięć częstotliwości.

Informacje uzyskane za pomocą tych metod dotyczą składu aminokwasowego i konformacji białek w różnych środowiskach. Z obecności pewnych pasm w widmie białka, charakterystycznych dla określonych aminokwasów można wnioskować o ich obecności w białku. Badania położenia pasm w zakresie podczerwieni i ich wzajemnych natężeń dają ponadto możliwości określania konformacji białka, a nawet lokalnej orientacji poszczególnych aminokwasów w łańcuchu peptydowym. Położenia pasm w widmie są opisywane jednostką „ $\text{cm}^{-1}$ ” będącą liczbą falową — wielkością będącą odwrotnością długości fali wyrażonej w cm. W pomiarach spektroskopowych przyjęto powszechnie wielkość tą nazywać częstotliwością.

Zmiana struktury natywnych białek oraz ich denaturacja następuje pod wpływem działania promieniowania elektromagnetycznego, zmiany wartości pH roztworu, temperatury, dodania detergentów lub innych substancji chemicznych.

Połączenie zmian struktury białek enzymatycznych, obserwowanych metodami spektroskopowymi, z ich zmianami aktywności enzymatycznej dostarcza wielu cennych informacji o wpływie struktury białka na jego centrum aktywne. Za pomocą metod spektroskopowych można analizować wpływ inhibitorów lub aktywatorów na strukturę białek enzymatycznych i ich centrów aktywnych. Badanie metodami spektroskopowymi układów złożonych z kilku oddziałującymi ze sobą białkami lub innymi

molekułami takimi jak lipidy, polipeptydy, kwasy nukleinowe, itp., może dać informacje dotyczące specyfiki oddziaływań w układach biologicznych zbliżonych do sytuacji *in vivo*. Próby przeprowadzania takich eksperymentów są już podejmowane.

Badania zamrożonych w danym stanie fizjologicznym, za pomocą ciekłego azotu, fragmentów błon biologicznych wraz ze znajdującymi się w nich białkami (2) wykazują zależność między tym stanem a uśrednioną konformacją białek.

### III. Spektroskopia absorpcyjna w zakresie średniej podczerwieni (MIR)

Analiza pasm absorpcyjnych występujących w zakresie średniej podczerwieni, pochodzących od drgań atomów tworzących wiązania peptydowe, umożliwia określenie drugorzędowej struktury białka. Częstotliwości drgań odpowiadające różnym grupom i atomom jednostki peptydowej, zwanych drganiami amidowymi, przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Częstotliwości drgań amidowych (w  $\text{cm}^{-1}$ )

Oznaczenie drgania	Częstotliwość w $\text{cm}^{-1}$	Pochodzenie drgania (6)
amid A	3300	N-H rozciągające (stretching)
amid B	3100	+ podwojona częstotliwość
amid I	1690—1610	amid II w rezonansie Fermiego
amid II	1560—1520	C=O rozciągające 80%, C-N rozciągające 10%, N-H zginające ( <i>bending</i> ) 10%
amid III	1310—1220	C-N rozciągające 40%, N-H zginające 60%
amid IV	ok. 625	C=O rozciągające 10%, C-N rozciągające 30%, N-H zginające 30%, O=C-N zginające 10%, inne 10%
amid V	740—700	O=C-N zginające 40%, inne 60%
amid VI	700—570	N-H zginające poza płaszczyznę ( <i>bending out of plane</i> )
amid VII	370—200	C=O zginające poza płaszczyznę C-N skręcające ( <i>twisting</i> )

Drgania typu amid I i amid III, które posiadają zwykle dość dużą intensywność w widmie absorpcyjnym są szczególnie przydatne do tej analizy. Za ich pomocą można określić procentową zawartość struktury helikalnej, struktury  $\beta$  i struktury nieuporządkowanej w białku. Można także określić zmiany tych struktur pod wpływem działania czynników fizycznych i chemicznych na białko.

W tabeli 3 podano przykładowo położenia pasm w obszarze amidu I, wraz z zaznaczonym typem struktury drugorzędowej (7, 8, 9, 10, 11).

Tabela 3

Częstotliwości pasm w obszarze amidu I pochodzących od drgań jednostki peptydowej dla różnych struktur drugorzędowych w  $\text{cm}^{-1}$

Związek	struktura heliks	amid I struktura	struktura nieuporządkowana	piśmiennictwo
poli-L-lizyna w $\text{D}_2\text{O}$ w $\text{H}_2\text{O}$ cienki film	1635	1680, 1611 1690, 1616 1693, 1625	1645	8
kwas poli-L-glutaminowy w $\text{D}_2\text{O}$ cienki film	1640 1652		1643 1657	8
$\beta$ -laktoglobulina w $\text{D}_2\text{O}$ w $\text{H}_2\text{O}$ cienki film	1649	1632 1632 1632	1643 1656	8
mioglobina w $\text{D}_2\text{O}$ w $\text{H}_2\text{O}$ cienki film	1650 1652 1652			8
$\alpha_s$ -kazeina w $\text{D}_2\text{O}$ w $\text{H}_2\text{O}$			1643 1656	8
poli-glicyna I cienki film zdenaturowana cienki film		1685, 1636 1680, 1629		9
białka fibrynarne, włókna	1651	1632	1662	10
rybonukleaza w pD 4,8 albumina w pD 2,0 lizozym $\beta$ -laktoglobulina B $\alpha_s$ -kazeina w pH 9,0	1648 1650 1656	1685, 1640 1632 1643, 1615		11

Drgania typu amid II nie są dogodne do określania struktury drugorzędowej białka, gdyż nie dają one w tym obszarze częstotliwości charakterystycznych pasm związanych z jedną z tych struktur (7). Pasma

amidu II stosowano do określania drugorzędowej struktury poliaminokwasów.

Badania spektroskopowe wodnych roztworów białek dostarczają informacji o naturalnym wpływie tego środowiska na natywną strukturę białek. Z uwagi na silną absorpcję cząsteczek  $H_2O$  w obszarze amid I (drżanie molekuł wody typu  $\nu_2$  przy częstotliwości około  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) pomiary widm roztworów białek, w tym zakresie, przeprowadza się metodą analizy różnicowej widm za pomocą komputera. Aby ominąć duże niedokładności wynikające z takiej analizy, jako rozpuszczalnik stosuje się ciężką wodę, dla której analogiczne pasmo jest przesunięte do  $1215\text{ cm}^{-1}$ .

Natywna struktura białka jest zwykle związana ze środowiskiem wodnym. W widmie absorpcyjnym cząsteczki  $H_2O$  posiadają pasma o dużej intensywności przy następujących częstotliwościach:  $3490$  i  $3280\text{ cm}^{-1}$  — drżania typu  $\nu_s$  — O-H rozciągające (*stretching*);  $1645\text{ cm}^{-1}$  — drżania typu  $\nu_2$  — H-O-H zginające (*bending*). Częstotliwość ostatniego typu drgań pokrywa się z częstotliwością silnego pasma amid I.

Drgania molekuł  $D_2O$  posiadają pasma absorpcyjne przy:  $2540\text{ cm}^{-1}$  i  $2450\text{ cm}^{-1}$  — drżania typu  $\nu_s$  — O-D rozciągające;  $1215\text{ cm}^{-1}$  — drżanie typu  $\nu_2$  — D-O-D zginające. Przesunięcie w tym przypadku pasma typu  $\nu_2$  do  $1215\text{ cm}^{-1}$  umożliwi obserwację pasm amid I białek.

Zastosowanie ciężkiej wody powoduje jednak zmiany struktury białka. Wymiana atomów H na atomy D, podczas deuteracji, powoduje przesunięcie maksimów pasm amid I o kilka  $\text{cm}^{-1}$ . Efekt ten daje także silne pasmo amid II leżące przy  $1450\text{ cm}^{-1}$  (7, 8).

Struktura białka w ciężkiej wodzie jest silniej stabilizowana przez oddziaływania hydrofobowe niż w wodzie zwykłej (12). Wymiana atomów wodoru na atomy deuteru powoduje wydłużenie wiązań typu N-D-O o  $0,025$ — $0,029\text{ \AA}$  w stosunku do wiązań typu N-H-O, np. w poli- $\gamma$ -benzylo-L-asparaginie lub poli- $\beta$ -benzylo-L-glutaminianie (13). W wyniku tych zmian pozycje indywidualnych atomów mogą się zmieniać, a z tym związana jest zmiana energii oddziaływań międzyatomowych.

Zdeuterowane wiązania są bardziej stabilne niż wodorowe. Deuteracja stabilizuje najsilniej strukturę heliksu (14, 15, 16).

Blout ze współpracownikami (17) obserwowali wymianę OH  $\rightarrow$  OD wraz ze zmianami w amidzie II i stwierdzili, że po 48 godzinach wymiana ta zachodzi całkowicie. Podobnie deuterowano (7) mioglobinę i  $\beta$ -laktoglobulinę. Po około 48 godzinach w temperaturze  $25^\circ$  zaobserwowano, że pasmo amid II znika gwałtownie, co wiązało się z całkowitą deuteracją.

Drugorzędową strukturę poliaminokwasów i białek badało wielu autorów. Między innymi badano (8) roztwory poli-L-lizyny, poli-kwasu-L-glutaminowego,  $\beta$ -laktoglobuliny, mioglobiny i  $\alpha$ -kazeiny w  $H_2O$  i w  $D_2O$ . Timasheff ze współpracownikami (18) przebadali widma w zakresie podczerwieni wielu deuterowanych białek globularnych w obszarze pasm amid I.

Przygotowując pomiary absorpcyjne w zakresie podczerwieni, należy zwrócić uwagę na usunięcie pasma pochodzącego od powstałych, podczas deuteracji cząsteczek HOD, nakładającego się na inne drgania amidowe. Usunięcie cząsteczek HOD z badanego roztworu można przeprowadzić za pomocą dializy roztworu białka w  $D_2O$ , lub przez liofilizację tego roztworu i ponowne rozpuszczenie zdeuterowanego białka w  $D_2O$ .

Badania T a b b a i K o e n i g a (1974 rok) przesunięć pasm amidu II po rozpuszczeniu białek w  $H_2O$  wykazały wzrost położenia maksimum pasma dla: hemoglobiny o  $6\text{ cm}^{-1}$ , dla albuminy o  $8\text{ cm}^{-1}$ , dla rybonukleazy o  $10\text{ cm}^{-1}$ , dla  $\beta$ -laktoglobuliny o  $13\text{ cm}^{-1}$ , oraz dla  $\alpha$ -kazeiny o  $13\text{ cm}^{-1}$ , w stosunku do widm białek nieuwodnionych.

Obserwowano również powiększenie się szerokości połówkowej pasma amidu I tych białek dla cienkich filmów w stosunku do roztworów, np. w przypadku  $\alpha$ -kazeiny z  $58\text{ cm}^{-1}$  do  $59\text{ cm}^{-1}$ , a w przypadku rybonukleazy od  $58\text{ cm}^{-1}$  do  $66\text{ cm}^{-1}$ . Autorzy ci uważają, że pasmo amidu I może leżeć w przypadku struktury heliks w zakresie od częstotliwości  $1652\text{ cm}^{-1}$  do  $1656\text{ cm}^{-1}$ , w przypadku struktury  $\beta$  około  $1632\text{ cm}^{-1}$ , w przypadku struktury nieuporządkowanej około  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Jednocześnie pasmo amidu III w przypadku występowania struktury heliks jest słabe, a w przypadku struktury  $\beta$  lub struktury nieuporządkowanej jest silne.

Związek między konformacją i procesami relaksacji w zależności od zawartości wody w stałej próbce soli sodowej kwasu poli-L-glutaminowego  $(\text{Glu-Na}^+)_n$  badał S h i r a i s h i ze współpracownikami (19). Podczas dodawania wody, do wartości 46%, 66% i 84% wilgotności względnej nieorientowanego filmu tej soli, obserwowano przejście struktury  $\beta$  w strukturę heliks. Wniosek ten oparto na obserwowanym przesunięciu częstotliwości pasma amid V z  $675\text{ cm}^{-1}$  dla struktury  $\beta$  przy 46% wilgotności względnej do częstotliwości  $605\text{ cm}^{-1}$  dla struktury helikalnej tej soli przy wilgotności względnej równej 84%.

Badania pasm amidu V w przypadku  $\gamma$ -metylo-L-glutaminianu (20) i lizozymu (21) wykazały, że strukturę heliks cechuje pasmo amid V leżące przy częstotliwości  $600\text{ cm}^{-1}$ , w przypadku struktury  $\beta$  —  $650\text{ cm}^{-1}$ , a w przypadku struktury nieuporządkowanej przy częstotliwości  $690\text{ cm}^{-1}$ .

Wpływ organicznych rozpuszczalników takich jak alkohole, aceton, pirydyna i inne na konformację mioglobiny, apomioglobiny, hemoglobiny, lizosomu i rybonukleazy badali J a c o b s o n i K r u g g e r (22). Na skutek oddziaływania białek z tymi rozpuszczalnikami zostaje zniszczona struktura natywna tych białek, w wyniku czego odsłaniają się hydrofobowe reszty aminokwasowe leżące wewnątrz globuli. Stopień denaturacji zależy od rodzaju stosowanego rozpuszczalnika organicznego i jego stężenia.

Badania zmian drugorzędowej struktury prowadzono także napromieniowując roztwory białka promieniami rentgena (23). Obserwowano zanik pasma amid I w 10% roztworze albuminy surowicy ludzkiej pod

wpływem dawki promieniowania rzędu kilkuset kR. Wzrost stężenia białka w roztworze obniżał jego podatność na tą denaturację. Białko w stanie suchym było około 10-krotnie odporniejsze na denaturację niż 10% roztwór wodny białka.

Analizę komputerową kształtu pasm absorpcyjnych białek globularnych przeprowadził R ü e g g ze współpracownikami (24). Taka obróbka danych pozwoliła autorom pracy określić z dobrą dokładnością procentową zawartość różnych typów struktury w tych białkach. Otrzymano także dobrą zgodność z wynikami uzyskanymi metodą dichroizmu kołowego i dyfrakcji promieni X. Autorzy podają także wzór, za pomocą którego można oszacować zawartość struktury  $\beta$  w dowolnym białku na podstawie intensywności integralnej pasma amid I występującego przy około  $1630 \text{ cm}^{-1}$ .

$$\alpha_{\nu} = \frac{A_{\nu}}{c \cdot d \cdot x_{\beta}} [1 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \quad (1)$$

gdzie

$\alpha_{\nu}$  — absorpcja,

$A_{\nu}$  — absorbancja — integralny współczynnik absorpcji,

$c$  — stężenie białka w roztworze [g],

$d$  — grubość warstwy [cm],

$x_{\beta}$  — zawartość struktury  $\beta$ . Wielkość ta zmienia się od 0 do 1.

Po podstawieniu do tego wzoru wartości  $x_{\beta}$  równej odpowiednio: 0,44; 0,34; 0,16 dla rybonukleazy,  $\alpha$ -chymotrypsyny i lizosomu, uzyskano wartości na absorpcję  $\alpha_{\nu}$ : 4,53; 4,22 i 5,51  $\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Otrzymane wielkości są zgodne z wielkościami uzyskanymi innymi technikami, co zdaniem autorów stwierdza poprawność wzoru 1, umożliwiającego wyliczyć zawartość struktury  $\beta$  w białkach globularnych o niepoznanej jeszcze strukturze.

Od czasów, gdy Pauling i Corey w 1951 roku zaproponowali model struktury helikalnej polipeptydów, ukazało się szereg prac, które coraz dokładniej analizują możliwość występowania struktur helikalnych o innych parametrach niż ta struktura.

Chirgadz i in. (25) badali metodą spektroskopii w zakresie podczerwieni wewnątrz molekularne zaburzenia struktury helikalnej kwasu poliglutaminowego, bromowodorku polilizyny, poli- $\gamma$ -benzyloglutaminianu i fibroiny jedwabiu. Duże szerokości połówkowe pasma amid A, amid I i amid III tych polipeptydów autorzy wiążą z termodynamiczną niestabilnością struktury helikalnej. Podają także 2 modele, które tłumaczą te fakty poprzez regularne i nieregularne zmiany kątów wewnętrznej rotacji głównego łańcucha polipeptydowego. Modyfikując strukturę polipeptydów, udało się zmierzyć między innymi zmiany szerokości połówkowych kwasu poliglutaminowego (struktura heliks) dla pasm amid A, amid I oraz amid II odpowiednio: w stanie stabilnej konformacji (roztwór)  $62 \text{ cm}^{-1}$ ,  $16,5 \text{ cm}^{-1}$  i  $16 \text{ cm}^{-1}$ , w stanie metastabilnym (cienki film)  $88 \text{ cm}^{-1}$ ,

30  $\text{cm}^{-1}$  i 33  $\text{cm}^{-1}$ , oraz w stanie kłęбка (cienki film) 140  $\text{cm}^{-1}$ , 42  $\text{cm}^{-1}$  i 48  $\text{cm}^{-1}$ .

Badania fluktuacji konformacji helikalnej są obecnie dość aktualnymi zagadnieniami podobnie jak dla innych struktur. Teoretycznie fluktuacje struktury alfa heliks były analizowane przez G o i G o (26).

Obok dotychczas wymienionych konformacji, białka mogą przybierać strukturę typu statystycznego kłęбка. Pasma amid I dla tej konformacji leży zwykle przy częstotliwości 1650  $\text{cm}^{-1}$  (C h i r g a d e).

Do określenia drugorzędowej struktury białek mogą być wykorzystane również widma polaryzacyjne w zakresie podczerwieni (10, 27, 28). Zgodność uzyskanych tą metodą wyników z innymi metodami wskazuje na jej dobrą przydatność do badań konformacji białek.

#### IV. Spektroskopia w zakresie dalekiej podczerwieni (FIR)

W tym zakresie częstotliwości zarówno woda zwykła, naturalne środowisko dla białek jak i woda ciężka, posiada szerokie pasma przy częstotliwościach 900  $\text{cm}^{-1}$ , 300  $\text{cm}^{-1}$  i około 200  $\text{cm}^{-1}$ . Przy słabych natężeniach źródła promieniowania w tym zakresie, wykonanie pomiaru dla wodnego roztworu białka staje się bardzo trudne. Z tego powodu pomiary widm w tym zakresie częstotliwości w przypadku białek wykonuje się dla cienkich filmów, lub zawiesin w pastach nujolu, wazeliny, czy też białek wprasowanych w parafinę. Z uwagi na niskoenergetyczny charakter drgań białek w tym zakresie częstotliwości, należy zachować ostrożność w sposobie przygotowywania próbek, gdyż na wynik pomiaru nakłada się często silne rozproszenie promieniowania w zawiesinie, lub może się zmieniać labilna struktura cząsteczki na skutek oddziaływania z ośrodkiem zawieszającym. Tło pochodzące od rozpraszania, o natężeniu eksponencjalnie rosnącym ze wzrostem energii promieniowania, można zwykle wyeliminować przez numeryczne odjęcie zadanej krzywej tła.

Obszar dalekiej podczerwieni był wykorzystany do badań struktury drugorzędowej poliaminokwasów (29, 30, 31). Badano również przejście konformacyjne od struktury  $\beta$  do struktury helikalnej pod wpływem działania kwasu dwu-chlorooctowego (31).

Z badań tych wynika, że struktura helikalna charakteryzuje się pasmami absorpcyjnymi leżącymi przy częstotliwościach około 100, 150, 380 i 480  $\text{cm}^{-1}$ , a struktura  $\beta$  pasmami leżącymi przy częstotliwościach około 250 i 440  $\text{cm}^{-1}$ . Dla białek, z uwagi na złożony charakter niskoenergetycznych oddziaływań, pasma te mogą być przesunięte względem analogicznych pasm w poliaminokwasach.

Przeprowadzone przez kilku autorów obliczenia drgań (modów) występujących dla polimerów o strukturze helikalnej lub strukturze  $\beta$  dały



wyniki zgodne z wartościami tych częstotliwości wyznaczonymi eksperymentalnie (32).

Peticolas (32) przeprowadził obliczenia dla nisko częstotliwościowych drgań wibracyjnych poliaminokwasów występujących w formie helikalnej w oparciu o uproszczony model oscylacyjny.

Shotts i in. (29) przeprowadzili badania  $\gamma$ -benzylo-L-glutaminianu (BLG), glicyny, alaniny, leucyny i proliny w zakresie od  $300\text{ cm}^{-1}$  do około  $10\text{ cm}^{-1}$  w temperaturze 4,2 K. Widma aminokwasów w niskich temperaturach przedstawił Fairheller i in. (34). W niskiej temperaturze autorzy otrzymali szereg wąskich linii absorpcyjnych, które silnie poszerzają się w wyższych temperaturach. Dla przykładu, dla BLG w 4,2 K widmo posiada około 60 linii absorpcyjnych dla częstotliwości poniżej  $300\text{ cm}^{-1}$  mimo, że ilość drgań normalnych dla izolowanego monomeru BLG wynosi  $3n-3 = 84$ , leżących w zakresie częstotliwości od 0 do  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Te drgania są związane z oddziaływaniami sieci krystalicznej. Linie te znikają, gdy aminokwasy zostaną rozpuszczone w  $\text{H}_2\text{O}$ . Autorzy nie obserwowali linii absorpcyjnych występujących np. w stałej próbce proliny, czy w jej wodnym roztworze. Obserwowali natomiast dla tego roztworu szerokie pasmo absorpcyjne w temperaturze 300 K, ciągnące się przez cały zakres częstotliwości.

Badania oligomerów, dla liczby podjednostek  $n$  od 2 do 6, poli L-alaniny poniżej  $100\text{ cm}^{-1}$ , oraz od  $100\text{ cm}^{-1}$  do  $320\text{ cm}^{-1}$  w 4,2 K i 300 K są interpretowane (29) pod kątem określenia struktury drugorzędowej. Oligomery L-alaniny w postaci stałej nie przybierają formy helikalnej dla liczby podjednostek od  $n = 2$  do  $n = 6$ .

Na podstawie badań ramanowskich stwierdzono, że oligomery od  $n = 3$  do  $n = 6$  przyjmują strukturę  $\beta$ . Obserwowane pasma absorpcyjne poli-L-alaniny są interpretowane jako pasma pochodzące od struktury  $\beta$  przy częstotliwościach od  $250\text{--}440\text{ cm}^{-1}$ , podczas gdy pasma przy częstotliwościach 90, 120,  $370\text{ cm}^{-1}$  pochodzą od struktury helikalnej. Podobne obserwacje dla innych aminokwasów zostały zebrane w tabeli 4.

Inne prace Itoha i współpracowników (31) dotyczyły badań sekwencji aminokwasowych o strukturze helikalnej. Działając kwasem dwu-chlorooctowym na kopolimery L-feniloalaniny, L-alaniny i L-leucyny wywoływali oni przejście od struktury  $\beta$  do struktury helikalnej i obserwowali zmianę widma w zakresie dalekiej podczerwieni. Stwierdzono zanikanie pasm związanych ze strukturą  $\beta$ , a pojawianie się pasm charakterystycznych dla struktury helikalnej.

Badania prowadzone dla aminokwasów w obszarze dalekiej podczerwieni umożliwiają interpretację widm wielu białek. Badania kilku białek globularnych przeprowadził Buntempo i in (35). Szeroka absorpcja tych białek globularnych była obserwowana w zakresie częstotliwości od  $40\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ , prawdopodobnie z powodu kilkudziesięcioprocentowej zawartości wody, związanej w tych białkach. W badaniach tych nie

Tabela 4

Położenia pasm pochodzących od drugorzędowej struktury dla aminokwasów w zakresie dalekiej podczerwieni w  $\text{cm}^{-1}$

Aminokwasy	Struktura drugorzędowa		Piśmienictwo
	helikalna	struktura	
poli-L-alanina	90, 120, 370	250, 440	29
poli-L-alanina poli-glicyna I (L-alanina-glicyna-glicyna) <sub>n</sub> strukturze „cross” (L-walina-glicyna-glicyna) <sub>n</sub> (L-walina-glicyna) <sub>n</sub>		250, 330, 559 268, 316, 559 260 <sup>a</sup> , 325 <sup>a</sup> , 427 <sup>b</sup>  267, 328, 447, 543, 623 250, 270, 362, 418, 539 <sup>c</sup>	30
(alanina-alanina-glicyna) <sub>n</sub> D-alanina L-alanina  L-walina D-leucyna  L-fenylalanina	420, 478 375—371 523—527  409—415, 541 394—396, 467—472 481—484	613 <sup>d</sup>    440—446   501—502	31
mioglobina (77% struktura heliksu)	100, 150, 380		36
izoenzymy kwaśnej fosfatazy	362		37

a — drgania deformacyjne głównego łańcucha oraz  $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$  zginające,

b — drgania zginające  $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ ,

c — drgania  $\text{C}'=\text{O}$  zginające w płaszczyźnie,

d — drgania  $\text{C}'=\text{O}$  zginające poza płaszczyznę oraz drganie zginające N-H poza płaszczyznę.

udało się zaobserwować pasm absorpcyjnych związanych z drugorzędową strukturą białek. Podobne widma dla mioglobiny, kazeiny i albuminy w temperaturze 4,2 K wykonał Shotts i inni (29).

Chirgadze i inni (36) przeprowadzili badania mioglobiny z wiewoloryba w zakresie częstotliwości od  $10 \text{ cm}^{-1}$  do  $600 \text{ cm}^{-1}$ , zarówno w stanie natywnym jak i zdenaturowanym przez zmianę pH i ogrzewanie. Pomiarzy wykonano dla zawiesiny białka w wazelinie. Porównanie widm natywnego i zdenaturowanego białka, oraz w oparciu o uprzednie badanie sekwencji aminokwasowych, podano interpretację pasm pochodzących od struktury helikalnej mioglobiny. W stanie natywnym to białko posiada 77% aminokwasów tworzących strukturę helikalną, a pozostałe 23% aminokwasów nie wykazuje uporządkowanej struktury. Po denaturacji zawartości helikalnej struktury zmalała do 15—20%. Strukturze helikalnej przypisano pasma przy częstotliwościach ok. 100, 150 i  $380 \text{ cm}^{-1}$ , które znikają po denaturacji. Pozostałe pasma przy częstotliwościach ok. 324,

420, 470  $\text{cm}^{-1}$  zostały zinterpretowane jako drgania grup bocznych łańcucha białkowego. Pasma w zakresie częstotliwości od 400  $\text{cm}^{-1}$  do 500  $\text{cm}^{-1}$  związane zostały z drganiami grupy  $\text{C}=\text{O}$  (deformacyjne poza płaszczyzną) oraz zginającymi drganiami łańcuchów bocznych typu  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-C}_\gamma$ . Znikanie tych pasm pod wpływem denaturacji wiązało się z powstaniem skłębionej formy aminokwasowych łańcuchów bocznych. Przy niepełnej denaturacji łańcuchy boczne zachowują swoją konformację. Stwierdzenie to ma charakter jakościowy, gdyż trudno jest przeprowadzić ilościowe określenie natężeń pasm w tych eksperymentach. Powstawanie molekularnych agregatów podczas denaturacji białek dodatkowo zniekształca ich widma.

Dalsze badania w tym zakresie częstotliwości dostarczą informacji o niskoenergetycznych oddziaływaniach występujących w białkach i uzupełnią dane o strukturze białek.

Podobne prace dla izoenzymów kwaśnej fosfatazy z wątroby szczura są w trakcie przygotowywania (37). Wynika z nich, między innymi, że oba izoenzymy posiadają pasmo absorpcyjne leżące przy częstotliwości 362  $\text{cm}^{-1}$ , które jest związane z helikalną strukturą tych białek i które znika po denaturacji.

## V. Spektroskopia ramanowska

Laserowa spektroskopia ramanowska jest techniką, która wraz ze spektroskopią absorpcyjną w zakresie podczerwieni uzupełnia naszą znajomość struktury i dynamiki białek (38). O ile spektroskopia absorpcyjna w zakresie podczerwieni jest czuła na zmiany momentów dipolowych drgających atomów, to spektroskopia ramanowska daje możliwość rejestracji drgań atomowych poprzez zmiany ich polaryzowalności. Intensywność rozpraszania ramanowskiego zależy od zmiany wartości polaryzowalności molekularnej  $\alpha$ , pochodzącej od drgań wibracyjnych, daną

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 \cdot Q \quad (2)$$

wzorem 2, gdzie  $\alpha_0$  jest polaryzowalnością molekularną w pozycji równowagi,  $\frac{d\alpha}{dQ}$  określa zmianę polaryzowalności  $\alpha_0$  względem współrzędnej normalnej  $Q$  drgającego atomu. Intensywność rozproszonego promieniowania ramanowskiego jest wprost proporcjonalna do kwadratu pochodnej polaryzowalności względem odpowiedniej współrzędnej normalnej danego oscylatora.

Pomiary widm ramanowskich białek narzucają na tę technikę szereg warunków technicznych, które muszą być spełnione aby otrzymać widmo

bardzo często labilnych białek. Stosowanie wiązek światła monochromatycznego o dużych mocach powoduje silne ogrzewanie się próbki co może spowodować denaturację białka. Zapobiec temu można chłodząc próbkę za pomocą kontaktu z chłodzonym uchwytem, lub przez użycie termostatu stabilizującego temperaturę. Innym efektem zniekształcającym wynik pomiaru jest fluorescencja. Pasma fluoroscencyjne leży zazwyczaj w obszarze  $\pm 50,0$  nm od długości fali promienia laserowego wyciszającego zazwyczaj 488,0 nm lub 514,5 nm. Usuwamy ją przez staranne oczyszczenie próbek, odwirowywanie i odgazowywanie roztworów, lub przez zwiększanie długości fali promieniowania wzbudzającego np. z linii 488,0 nm do 647,1 nm. Czasem jednak fluorescencja nie ulega zmianie po takiej procedurze. W takich przypadkach stosuje się eliminację krzywej tła fluorescencyjnego za pomocą komputera. Tło pochodzące od wody, w wodnych roztworach białek, obniża się przez zwiększenie stężenia białka lub polipeptydu do 5 lub nawet 15% (2).

Widma Ramana roztworów wodnych białek, oprócz pasm pochodzących od drgań białek, posiadają pasma od drgań cząsteczek wody: dla  $H_2O$  mod  $\nu_s$  występuje przy częstotliwości  $3439\text{ cm}^{-1}$  (oraz słabo przy  $3300$ ,  $3600$  i  $3500\text{ cm}^{-1}$ ), a dla  $D_2O$  przy  $2532\text{ cm}^{-1}$  (oraz przy  $2400$  i  $2600\text{ cm}^{-1}$ ). Mod  $\nu_2$  dla  $H_2O$  znajduje się przy częstotliwości  $1640\text{ cm}^{-1}$ , a dla  $D_2O$  przy  $1208\text{ cm}^{-1}$ . Maksima tych pasm są przesunięte w stosunku do analogicznych pasm występujących w widmach absorpcyjnych w zakresie podczerwieni.

W widmach ramanowskich obserwuje się drgania amidowe za pomocą których, podobnie jak w przypadku absorpcji w zakresie podczerwieni, można określić drugorzędową strukturę białka. Położenie tych pasm dla białek i polipeptydów jest podobne w obu technikach.

Pezolet i in. (39) na podstawie porównania intensywności drgań amid III dla kilku białek przy częstotliwości około  $1240\text{ cm}^{-1}$  z intensywnością drgań typu zginającego grup metylowych przy częstotliwości  $1450\text{ cm}^{-1}$  i znajomości składu procentowego struktury  $\beta$ , zaproponowali sposób na określenie tej struktury w dowolnym białku z dokładnością  $\pm 10\%$ .

Poza określaniem drugorzędowej struktury białek widma ramanowskie można stosować do analizy lokalnych konformacji łańcucha białkowego np. w miejscu występowania mostków siarczkowych. Drganie rozciągające wiązań  $-C-S-$  i  $-S-S-$  charakteryzują się dużą intensywnością w widmie Ramana. Lord i in. (40) zastosowali te pasma do analizy konformacji mostków siarczkowych. Opierając się na analizie związków modelowych oszacowali oni kąt dwuścienny mostków siarczkowych występujących w lizozymie na około  $114^\circ$  oraz w rybonukleazie na  $104^\circ$ . Podobne badania przeprowadzono dla  $\alpha$ -chymotrypsyny, gdzie linia  $\nu_{s-s}$  występuje przy około  $511\text{ cm}^{-1}$  (41),  $\beta$ -laktoglobuliny (42) i insuliny (43).

Badania te zostały dokładniej przeanalizowane przez Van Warta

i in. (44) dla przypadku związków modelowych oraz S u g e t a (45), B o y d a (46) i B r u n n e r a i in. (47) dla białek.

Silne pasma pochodzące od różnych konformacji mostków siarczkowych obserwowano dla izoenzymów kwaśnej fosfatazy przy częstotliwości 515  $\text{cm}^{-1}$ , 525  $\text{cm}^{-1}$ , 545  $\text{cm}^{-1}$  i 555  $\text{cm}^{-1}$ . Również te same pasma badano dla natywnej i denaturowanej arylosulfatazy B (48, 49). Na skutek silnej denaturacji i hydrolizy pasma te przesunęły się do różnych częstotliwości leżących w okolicach 490  $\text{cm}^{-1}$ .

Termiczne zdenaturowanie lizozymu w 76°C powoduje zanik linii  $\nu_{s-s}$  (47).

Ciekawą pracę dotyczącą badań niskoczęstotliwościowych drgań w widmie Ramana dla związków modelowych, posiadających mostek siarczkowy opublikował V a n W a r t i in. (50).

Analiza pasm pochodzących od drgań mostków siarczkowych może być zastosowana do ilościowego określania tych grup w białkach (51), co innymi metodami nie jest proste do wykonania.

Drgania aminokwasów aromatycznych można łatwo odróżnić od drgań innych aminokwasów w białku. Linie pochodzące od tryptofanu obserwuje się przy 570, 757, 881, 1011, 1356, 1417 i 1552  $\text{cm}^{-1}$ , podczas gdy fenyloalanina posiada linie ramanowskie przy 622, 1005, 1053  $\text{cm}^{-1}$ . Histydyna posiada linie przy 623, 985, 1204 i 1265  $\text{cm}^{-1}$ . Dane literaturowe (52, 53) dostarczają sposobów na określanie lokalnego ułożenia tych grup w białku, głównie pod kątem ukierunkowania tych aminokwasów w stosunku do „hydrofobowego wnętrza” globuli, lub w stosunku do jej hydrofilowej otoczki w której aminokwasy te oddziałują z cząsteczkami wody.

Badając kobraminę A i B z jadu kobry (52, 54) zmierzono stosunek wzajemnych intensywności pasm reszty tyrozynowej przy częstotliwości 644, 828 i 853  $\text{cm}^{-1}$ . Stosunek ten był równy odpowiednio 0,5; 1,0; 0,5 i autorzy przypisują go tyrozynie, która jest skierowana do hydrofobowego wnętrza globuli. W przypadku gdy reszta tyrozynowa jest otoczona cząsteczkami wody np. w peptydzie glicylotyrozyny, stosunek ten wynosi 0,7; 1,0; 1,4. Linia ramanowska przy 828  $\text{cm}^{-1}$  posiada w tym przypadku intensywność oznaczoną jako 1,0.

S p i k e r i in. (55) badali widmo ramanowskie w zakresie od 700  $\text{cm}^{-1}$  do 1500  $\text{cm}^{-1}$  dla różnych stanów kompleksu woda—fosfolipidy. W tym zakresie przesunąć częstotliwości obserwowano drgania typu C-C rozciągające. Badania tego typu są bardzo przydatne do dalszego rozwoju badań oddziaływań białek z błonami biologicznymi. Badania ramanowskie w zakresie odpowiadającym drganiom rozciągającym C-C dają możliwość określenia zawartości form typu *trans* lub *gauche*, powodującej skłębienie się łańcucha węglowodorowego.

Analogiczne badania za pomocą spektroskopii ramanowskiej przeprowadził L i s ze współpracownikami (56) używając do określenia struktury lipidu obszaru drgań typu C-H rozciągających, leżących w zakresie

od 2800—3100  $\text{cm}^{-1}$ . Dzięki tym badaniom określono wpływ cytochromu c i oksydazy cytochromu c na błonę lipidową. Podobne badania przeprowadzono dla fibrynogeny i albuminy, oraz L-leucyny, L-izoleucyny, L-tryptofanu, itp. (57).

G a u z e l i in. (58) opublikowali widma lizozymu w niskoczęstotliwościowym zakresie przesunięć częstotliwości od około 10 do 200  $\text{cm}^{-1}$ . Widma krystalicznej próbki i roztworu wodnego nie wykazały ostrych pasm ramanowskich. Obserwowano pasma przy 25, 75, 115 i 160  $\text{cm}^{-1}$ . Pierwsze z nich jest przez autorów interpretowane jako międzymolekularny mod wibracyjny, który znika dla enzymu w roztworze. Ponadto autorzy przypisują pasmu przy 75  $\text{cm}^{-1}$  drganie łańcucha białkowego (torsyjne), pochodzące od struktury helikalnej, a słabe drganie przy 160  $\text{cm}^{-1}$  przypisują drganiu zginającemu łańcucha białkowego posiadającego strukturę  $\beta$ .

C h e n i in. (59) użyli techniki ramanowskiej do badania wpływu denaturacji termicznej na strukturę rybonukleazy A. Podczas wzrostu temperatury obserwowali oni obniżanie częstotliwości modu  $\nu_{s-s}$  z 516  $\text{cm}^{-1}$  w temperaturze 32°C do 507  $\text{cm}^{-1}$  w temperaturze 70°C. Ponadto obserwowano wzrost szerokości połówkowej tego pasma. Wzrost stosunku natężeń linii tyrozynowych przy 854 i 830  $\text{cm}^{-1}$ .  $\frac{I(854)}{I(830)}$  świadczy o rozwinięciu struktury tego białka.

Badaniom drugorzędowej struktury białek za pomocą spektroskopii ramanowskiej poświęcono wiele prac (28, 60, 61), niektóre z tych prac (61) zawierają również informacje o wynikach badań techniką ramanowską kwasów nukleinowych i polinukleotydów.

## VI. Rezonansowa spektroskopia ramanowska

Białka zawierające grupy prostetyczne, lub połączone z cząsteczkami aktywatorów lub inhibitorów, posiadających pasma absorpcyjne w zakresie promieniowania elektromagnetycznego użytego do wzbudzenia próbki wymagają zastosowania innej techniki pomiaru niż w normalnym efekcie Ramana. Intensywność rozproszenia Ramana wzrasta w tym przypadku o kilka rzędów i jest ona proporcjonalna do kwadratu pochodnej polaryzowalności molekuly. Elementy tensora polaryzowalności są dane równaniem Kramersa-Heisenberga-Diraca (61), przedstawionym we wzorze 3,

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_e \left[ \frac{(M_j)_{me}(M_i)_{en}}{\nu_e - \nu_0 + i\Gamma_e} + \frac{(M_i)_{me}(M_j)_{en}}{\nu_e + \nu_s + i\Gamma_e} \right]$$

gdzie m, n, e oznaczają odpowiednie stany: początkowy, końcowy i wzbudzony molekuly. Sumowanie prowadzone jest po wszystkich stanach. Wielkości  $(M_j)_{me}$  oraz  $(M_i)_{en}$  są momentami przejścia elektrycznego dipola

wzdłuż kierunku „j” oraz „i”, między odpowiednimi stanami energetycznymi. Częstotliwość przejścia ze stanu „m” do „e” oznaczona jest przez wielkości „ $\nu_e$ ”, „ $\nu_o$ ” oraz „ $\nu_s$ ”, które są częstotliwościami promieniowania padającego, rezonansowego i rozproszonego.

W przypadku rezonansu, gdy  $\nu_e = \nu_o$ , pierwszy element wyrażenia 3 staje się bardzo duży dla odpowiednich przejść elektronowych. Wówczas zasadniczą rolę odgrywa człon tłumiący „ $i\Gamma_e$ ”, który jest miarą szerokości pasma dla przejścia elektronowego. Wielkość „ $\Gamma_e$ ” jest stałą tłumienia.

Zastosowanie techniki rezonansowego efektu Ramana wymaga dopasowania częstotliwości promieniowania wzbudzającego do częstotliwości przejścia elektronowego i do stosowania małych stężeń białek w roztworze, rzędu 0,1 mM. W tych warunkach nie obserwuje się w widmie Ramana pasm pochodzących od białka, lecz od barwnika z nim związanego. Taka technika umożliwia obserwację zmian widma emisyjnego pochodzącego od barwnika związanego z białkiem, poddanego działaniu różnych czynników fizycznych i chemicznych.

Po raz pierwszy technikę rezonansowego efektu Ramana zastosowano do badania hemoglobiny (63, 64) i cytochromu c (65, 66) w 1972 roku.

Przeglądową pracę poświęconą badaniom białek hemowych wraz z bogato cytowaną literaturą opublikował Spiro (67). Widma rezonansowe Ramana (RR) silnie zależały od sposobu przeprowadzenia doświadczenia, od stężenia roztworu i długości fali wzbudzającej. Inne badania dotyczące wpływu ligandów na różne cytochromy c przeprowadził Kitagawa (68).

Badania nad tymi białkami umożliwiły opisanie wiązania tlenu w układzie żelazo-pierścień porfirynowy. Atom tlenu po odwracalnym związaniu się z żelazem powoduje zmianę częstotliwości drgań atomów =C-N pochodzących z grup pirolowych i grup C-H w widmie rezonansowego efektu Ramana.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że widma RR cytochromu c i hemoglobiny wykazują niezwykle własności polaryzacyjne. Kilka silnych pasm wykazuje odwrotną polaryzowalność. Stosunek depolaryzacji  $\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$  w tym przypadku dąży do nieskończoności. Teoretycznie ten efekt był dyskutowany przez Spiro i Streckasa (66, 69).

Technika rezonansowego efektu Ramana została użyta m.in. przez Carey'a i in. (70) do badania wiązania molekuł metyloranżu z białkiem albuminy surowicy wołowej.

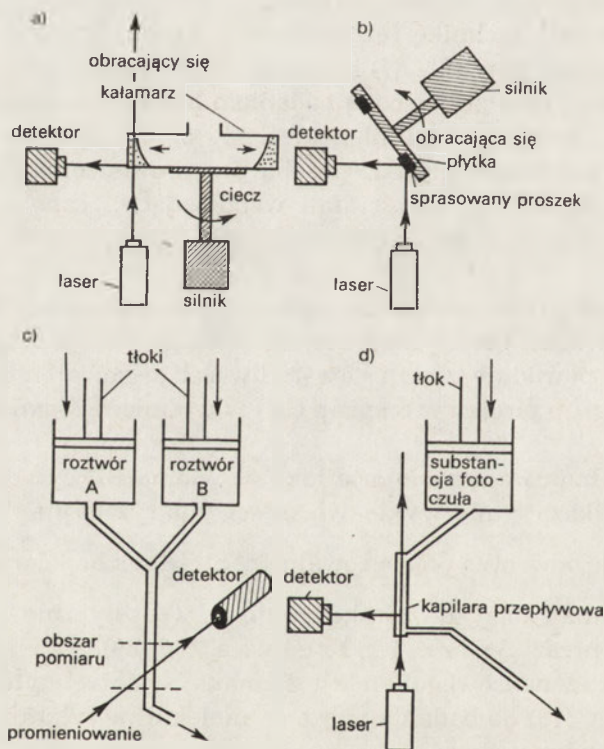
Kilka ciekawych prac zastosowania rezonansowego efektu Ramana do badań chlorofilu a i b w roztworze (71), jego „fotosyntetycznej” struktury w niskich temperaturach (72) i badania własności centrum aktywnego opublikował Lutz i in. (73).

Carey i in. (74, 75) wykorzystali ten efekt do badania zmian struktury substratu w centrum aktywnym chymotrypsyny. Ta ciekawa praca

wykazuje możliwość śledzenia kinetyki reakcji enzymatycznej z uwzględnieniem zmian strukturalnych centrum aktywnego enzymu i struktury substratu, rozpadającego się podczas reakcji na produkty.

Należy przypuszczać, że technika rezonansowego efektu Ramana w zastosowaniu do badań biologicznych, obok innych technik spektroskopowych w zakresie podczerwieni, w znacznym stopniu przyczyni się do badania oddziaływań białek z innymi cząsteczkami, występującymi *in vivo*.

Labilność badanych roztworów białek w spektroskopii ramanowskiej narzuca specjalne wymagania techniczne na przeprowadzane eksperymenty. Aby uniknąć efektów grzania stosuje się tak zwane „wirujące kałamarze”, których zasada jest przedstawiona na rycinie 1 a (76). Obracający się w „kałamarzu” roztwór białka, zostaje „przyklejony” do ścianki naczynia na skutek działania siły odśrodkowej, co zapobiega przegrzewaniu się próbki i jej denaturacji.



**Ryc. 1.** Schematy przystawek do specjalnych technik używanych w badaniach ramanowskich białek. Opis w tekście.

W analogiczny sposób unika się grzania próbek stałych, na wirujących płytkach, co przedstawiono na rycinie 1 b. Im większa jest prędkość wirowania tych substancji, tym grzanie promienia laserowego jest mniejsze.



Jednocześnie stosunek sygnału do szumów pomiarowych wzrasta około 10 razy dzięki zastosowaniu tej techniki.

Zastosowanie techniki ramanowskiej, lub absorpcyjnej w zakresie podczerwieni, do badania reakcji enzymatycznych uzyskuje się za pomocą systemu dwu naczyń połączonych, w których znajduje się: enzym A oraz substrat B, co przedstawia rycina 1 c. Przepływające ciecze pod ciśnieniem łączą się w punkcie C, gdzie następuje mieszanie się tych roztworów i zaczyna zachodzić reakcja enzymatyczna. Dobierając odpowiednio szybkość przepływu roztworów A i B można śledzić kolejne stadia reakcji. Podobny efekt można uzyskać obniżając temperaturę tych cieczy, ale technika ta nie jest tak samo skuteczna, jak regulacja prędkości przepływu obu tych cieczy. Wadą techniki przepływowej jest konieczność posiadania dużej ilości wysoko podczyszczzonego enzymu w roztworze wodnym.

W technice rezonansowego efektu Ramana lub w przypadkach gdy pomiar Ramana jest wykorzystany do badań substancji fotoczułych, wykorzystuje się technikę szybkiego przepływu (*rapid flow*). Polega ona na tak szybkim przepływie badanego roztworu w miejscu wzbudzenia i pomiaru, by niekorzystny efekt (np. fotolizy, fotosyntezy, itp.) nie wpływał na wynik pomiaru, co przedstawiono schematycznie na rycinie 1 d. Technika tego typu została zastosowana między innymi do badań rodopsyny i izorodopsyny (77, 78).

Możliwość śledzenia własności molekularnych wchodzących w skład żywego organizmu, różnymi technikami spektroskopowymi, stawia te metody na czele współczesnych technik mających ważne znaczenie w rozwoju współczesnej biologii (2, 79, 80).

Praca została wykonana w ramach problemu resortowego R-III-14 koordynowanego przez Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

Artykuł nadszedł 1.10.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 13.3.1978.

## PIŚMIENNICTWO

1. Materiały Szkoły Biologii Molekularnej U. J., Zawoja, (1977), Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego, w druku.
2. Wallach D. F. H., Winzler R. J., (1974), *Envolving Strategies and Tacticts in Membrane Research*, Springer-Verlag, New York, str. 140—189.
3. Sanger F., (1955), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 23—33.
4. Argos P., Schwarz J., Schwarz J., (1976), *Biochem. Biophys. Acta*, **439**, 261—273.
5. Blundel T. L., Johnson L. N., (1976), *Protein Crystallography*, Academic Press, New York, London, San Francisco, str. 518—540.
6. Miyazawa T., (1967), *Biological Macromol.*, Series 1, red. Fashman G. D., New York. Dekker, str. 69.
7. Timasheff S. N., Susi H., (1966), *J. Biol. Chem.* **241**, 249—253.
8. Susi H., Timasheff S. N., Stevens L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5460—5466.

9. Pimentei G. C., Mc Clellan A. L., (1960), *The Hydrogen Bond*, Freeman W. H. Co., San Francisco.
10. Krim S., (1962), *J. Mol. Biol.*, **4**, 528—534.
11. Timasheff S. N., Susi H., Stevens L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5407—5411.
12. Nemethy G., Scheraga H. A., (1964), *J. Chem.*, **41**, 680.
13. Tomita K., Rich A., De Loze C., Blout E. R., (1962), *J. Mol. Biol.*, **4**, 83—95.
14. Calvin M., Hermans J. Jr., Scheraga H. A., (1959), *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5048.
15. Kreschek G. C., Schneider H., Scheraga H. A., (1965), *J. Phys. Chem.*, **69**, 3132—3139.
16. Kauzmann W., (1959), *Advan. Protein Chem.*, **14**, 1—5.
17. Blout E. R., De Loze C., Asadourian A. J., (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1895—1899.
18. Timasheff S. N., Susi H., Stevens L., (1967), *Biochem. Biophys. Acta*, **242**, 5467—5473.
19. Shiraishi H., Hiltner A., Baer E., (1976), *Biopolymers*, **15**, 1955—1965.
20. Miyazawa T., Hasuda J., Fukushima K. J., (1962), *J. Polymer Sci.*, **62**, 562.
21. Fukushima F., Miyazawa T., (1964), Ann. Meeting of the Chem. Soc. of Japan, Tokyo.
22. Jacobson A. L., Krugger P. J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 247—283.
23. Pavlovskaya T. E., Kharchenko L. J., Slobodskaya V. P., (1975), *Studia Biophys.*, **53**, 87—88.
24. Rüegg M., Metzger V., Susi H., (1965), *Biopolymers*, **14**, 1465—1471.
25. Chirgadze Yu. N., Braznikov E. Y., Nevskaya N. A., (1976), *J. Mol. Biol.*, **102**, 781—792.
26. Go M., Go N., (1976), *Biopolymers*, **15**, 1119—1127.
27. Rippon W. B., Koenig J. L., Walton A. G., (1971), *J. Agrie. Food Chem.*, **19**, 692.
28. Walton A. G., Blackwall J., (1973), *Biopolymers*, Academic Press, New York, str. 168—227.
29. Shotts W. J., Sievers A. J., (1974), *Biopolymers*, **13**, 2593—2614.
30. Itoh K., Katabuchi H., (1972), *Biopolymers*, **11**, 1593—1605.
31. Itoh K., Shimanoushi T., (1973), *Biopolymers*, **12**, 921—929.
32. Itoh K., Shimanoushi T., (1970), *Biopolymers*, **9**, 383.
33. Peticols W. L., Douley M. W., (1966), *Nature*, **212**, 400—401.
34. Fearheller W. R., Miller J. T. Jr., (1971), *Appl. Spectrosc.*, **25**, 175—181.
35. Buotempo W., Careri G., Fesella P., Ferraro A., (1971), *Biopolymers*, **10**, 2377.
36. Chirgadze Yu. N., Ovsepyan A. M., (1973), *Biopolymers*, **12**, 637—645.
37. Twardowski J., wyniki nieopublikowane.
38. Siemion J. Z., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 303—316.
39. Pezolet M., Pigeon-Gosselin M., Coulombo L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **453**, 502—512.
40. Lord R. C., Yu N. T., (1970), *J. Mol. Biol.*, **50**, 504—524.
41. Lord R. C., Yu N. T., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 203—213
42. Bellocq A. M., Lord R. C., Mendelshon R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 280—287.
43. Yu N. T., Lin C. S., Culver J., O'Shea C., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 1—6.

44. Van Wart H. E., Levis A., Scheraga H. A., Saeva F. D., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2619—2623.
45. Sugeta H., Go A., Miyazawa T., (1973), *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, **46**, 3407—3411.
46. Boyd D. B., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8799—8804.
47. Brunner H., Sussner H., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **271**, 16—22.
48. Twardowski J., (1978), *Biopolymers*, **17**, 181—190.
49. Twardowski J., Dejewaska A., w przygotowaniu.
50. Van Wart H. E., Cardinaux F., Scheraga H. A., (1976), *J. Phys. Chem.*, **80**, 625—630.
51. Simons L., Bergstrom G., Blomfelt G., Forses S., Stenback H., Wansen G., (1972), *Comment. Phys. Mathematicae*, **42**, 125—207.
52. Yu N. T., Jo B. H., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 5033—5037.
53. Yu N. T., Jo B. H., Liu C. S., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **4**, 7572—7575.
54. Yu N. T., Jo B. H., O'Shea D. C., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 71—76.
55. Spiker R. C., Levin J. W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 560—575.
56. Lis L. J., Goheen S. C., Kauffman J. W., Shivier D. F., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **443**, 331—338.
57. Lis L. J., Kauffman J. W., Shivier D. F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 513—522.
58. Ganzel L., Kailmann F., Martin T. P., Winterling G., Yacoby Y., Frohlich H., Makinen M. W., (1976), *Biopolymers*, **15**, 219—225.
59. Chen M. C., Lord R. C., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1889—1897.
60. Shepherd J. W., (1976), *Biochem. J.*, **155**, 543—548.
61. Peticolas W. L., (1975), *Biochimie*, **57**, 417—428.
62. Van Vleck J. H., (1929), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **15**, 754.
63. Strekas T. C., Spiro T. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 830—833.
64. Brunner H., Mayer A., Sussner H., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 153—156.
65. Strekas T. C., Spiro T. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 188—192.
66. Spiro T. G., Strekas T. C., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2622—2626.
67. Spiro T. G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 169—189.
68. Kitagawa T., Kyogoku Y., Izuka T., Ikeda-Saito M., Yamana T., (1975), *J. Biochem.*, **78**, 719—728.
69. Spiro T. G., praca nieopublikowana.
70. Carey P. R., Schneider H., Bernstein H. J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **47**, 588—595.
71. Lutz M., (1974), *J. Raman Spectr.*, **2**, 497—516.
72. Lutz M., (1975), *Laser in Phys. Chem. Biophys.*, Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam, 451—463.
73. Lutz M., Kleo J., Reiss-Husson F., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **69**, 3, 711—717.
74. Carey P. R., Carriere R. G., Lynn K. R., Schneider H., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2387—2393.
75. Carey P. R., Schneider H., (1976), *J. Mol. Biol.*, **102**, 679—693.
76. Kiefar W., Bernstein H. J., (1971), *Appl. Spectr.*, **25**, 609.
77. Mathies R., Oseroff A. R., Stryer L., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1—5.
78. Callender R. H., Doukas A., Crouch R., Nakanishi K., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1621—1629.
79. Wróbel D., (1976), *Zagadnienia biofizyki współczesnej*, t. 1.
80. Gaber B. P., (1977), *Biological applications of laser Raman spectroscopy*, American Laboratory, March, 15—24.



## SPRAWOZDANIE

### II Szkoła Biologii Molekularnej

Sellin na wyspie Rugii, NRD, 26—30 listopad 1977

Akademia Nauk i Towarzystwo Biochemiczne NRD zorganizowało Drugą Szkołę Biologii Molekularnej pod tytułem: „Mutagenesis — Virus — Cancer”. Związek tych tematów jest oczywisty: przyjmuje się, że transformacja nowotworowa komórek może zachodzić w wyniku mutacji, bądź w wyniku działania wirusa onkogennego. Zostały wygłoszone 22 wykłady, w większości przez kolegów z NRD, z Instytutów Akademii Nauk: Biologii Molekularnej i Onkologii (Berlin-Buch), Genetyki (Gatersleben) i Mikrobiologii (Jena). Z zaproszonych wykładowców, dwu pochodziło z Belgii (Uniwersytet Brukselski), dwu z Czechosłowacji (Instytuty Akademii Nauk — Wirusologii w Bratysławie i Genetyki Molekularnej w Pradze) i jeden z Polski (Uniwersytet Gdański). Temat mojego wykładu brzmiał „Bacteriophage lambda gene expression in the prophage and plasmid states”. Szkoła zgromadziła 115 uczestników, którzy brali żywy udział w dyskusji wywiązującej się po każdym z wykładów.

Pierwsza Szkoła Biologii Molekularnej odbyła się w maju 1976 r. w Rheinhardtsbrunn w Turyngii; jej tytuł brzmiał „Molecular basis of differentiation”. Organizatorzy planują następną „Szkołę” na rok 1979, (prawdopodobnie pod tytułem: „Gene transfer”) z jeszcze większym niż w bieżącym roku udziałem zaproszonych gości z zagranicy. Koledzy z NRD przywiązują dużą wagę do tej formy kształcenia młodych pracowników nauki, ze względu na niezwykle małą liczbę stażowych wyjazdów zagranicę. Wydaje się, że podobna „Szkoła” mogłaby być z pożytkiem zorganizowana w Polsce, zwłaszcza, że u nas wyjazdy stażowe zagranicę dotyczą praktycznie tylko pracowników po doktoracie, a więc w wieku 30—40 lat.

*K. Taylor*



## RECENZJE

### W. Ferdinand, *The Enzyme Molecule*

1976, John Wiley and Sons, London, New York, Sydney, Toronto, XVI+289 stron.

Jest to zwięzły i nowocześnie ujęty podręcznik enzymologii, pomyślany przez autora — wykładowcę enzymologii w Department of Biochemistry Uniwersytetu w Sheffield — w zasadzie jako podręcznik akademicki.

Dwa pierwsze rozdziały książki stanowią wprowadzenie w enzymologię. Rozdział 1 — Enzym w komórce, uzasadnia ogólnobiologiczną konieczność działania enzymów w układach żywych jako biokatalizatorów i regulatorów homeostazy komórek, krótko też podkreśla praktyczne zastosowanie badań enzymatycznych w takich dziedzinach jak diagnostyka medyczna, chemioterapia, różnicowanie tkanek i rozwój organizmów, a także przemysł. Rozdział 2 — Bioenergetyka i kinetyka, daje podstawy termodynamiczne przebiegu reakcji enzymatycznych, zwracając uwagę na subtelną równowagę i ogromną labilność układów enzymatycznych. Rozważania kinetyczne służą do wyprowadzenia hipotezy Michaelisa i Menten, a następnie Briggsa i Haldane'a. Krótko omówione są tu też pomiary aktywności oraz zmian ilościowych enzymów.

Rozdział 3 omawia budowę białek jako podstawę ich funkcji katalitycznej, podkreślając rolę różnego typu wiązań w kształtowaniu trzeciorzędowej struktury białek na możliwie najniższym poziomie energii swobodnej oraz zwracając szczególną uwagę na rolę wiązań hydrofobowych w tworzeniu struktur czwartorzędowych.

Rozdział 4 zajmuje się powiązaniem funkcji enzymu z strukturą. Szczegółowo omawiane są centra wiążące ligandy wraz z metodami analizy tworzenia kompleksu białko-ligand (spektrofotometryczne, potencjometryczne, równowagi dializacyjnej). Teoretycznie wyprowadzona jest metoda Scatcharda oznaczania liczby centrów ligandowych o identycznej i różnej wartości stałych dysocjacji powstałego kompleksu. Z metod oznaczania specyficzności miejsc ligandowych autor omawia chemiczną modyfikację białka enzymatycznego i chemiczną modyfikację ligandów („*affinity labelling*”). W dalszym ciągu omówiono hipotezę Koshlanda Jr., o wzbudzonym dopasowaniu („*induced fit*”), rozróżnienie centrów aktywnych i allosterycznych oraz specyficzność działania enzymów. W tym też rozdziale omówione są — bardzo krótko — proenzymy, izoenzymy oraz zagadnienia aktywacji, inaktywacji i inhibicji enzymów. Rozważania na temat katalizy enzymatycznej dotyczą kompleksu aktywnego i energii aktywacji. W pierwszym przypadku szczególnie obszernie omówiono układy enzym-substrat, dla których udaje się stworzyć analogowe układy trwałe w stanie kompleksu; analog substratu tworzącego taki kompleks musi być oczywiście silnym inhibitorem kompetycyjnym. Rozważania te doprowadzają do skonstruowania złożonego diagramu przebiegu reakcji katalizowanej enzymatycznie w porównaniu do prostego przebiegu reakcji niekatalizowanej wymagającej kilkakrotnie większej liczby wolnej energii aktywacji. Uwypuklona została ta zasadnicza rola czynników wpływających na obniżenie energii aktywacji reakcji enzymatycznych. Te rozważania teoretyczne zilustrowano szczegółowo przykładem działania rybonukleazy A.

Rozdziały 5 i 6 zajmują się kinetyką reakcji enzymatycznych. Pierwszy z nich analizuje kinetykę pojedynczych (niezależnych) centrów. Szczegółowo omawia kinetykę reakcji jednosubstratowych, rozważając rolę wszystkich czynników mogących mieć wpływ na przebieg i szybkość reakcji (stężenie enzymu i produktu oraz zależność Haldane'a, izomeryzacja kompleksu, izomeryzacja enzymu, inhibitory i aktywatory, działania kompetycyjne, częściowo kompetycyjne, niekompetycyjne i mieszane, pH, temperatura, siła jonowa i stała dielektryczna roztworu). W dalszym ciągu w tym samym rozdziale omówiono obszernie reakcje dwusubstratowe: o dowolnej kolejności (przypadkowe), rozgałęzione (random) wraz z regułami strukturalnymi Wonga i Hanesa (1), zilustrowanymi prostym przykładem reakcji rozgałęzionej zaproponowanym przez Ingrahama i Makowera (2) oraz nieuporządkowane, nierozgałęzione, sekwencyjne i niesekwencyjne (typu *ping-pong*) wraz z schematami Clelanda (3) oraz metodą Dalziela (4) graficznego wyznaczania typu reakcji i rozważaniami nad inhibicją różnymi produktami kolejnych etapów reakcji.

Rozdziały 7 i 8 poświęcono roli enzymów w kontroli metabolizmu. Rozdział 7 zajmuje się kontrolą metabolizmu komórkowego poprzez regulację aktywności enzymów („*fine control of enzyme activity*”). Po krótkim omówieniu regulacji szybkości reakcji (wyrażonej jako przepływ metabolitów, „*flux*”) przez proste sprzężenia zwrotne, autor wskazuje na bardzo ograniczone możliwości tego typu działania i ogromne uproszczenie całego zagadnienia przez sprowadzenie go do tak prostego modelu. Stawia więc przed czytelnikami pytania poszerzające zagadnienie: czy każdy etap toru metabolicznego może być miejscem regulacji i jakim warunkom musi odpowiadać enzym regulujący jakiś odcinek metabolizmu. Na drodze stosunkowo prostego rozumowania i rachunku wykazuje, że enzymy będące regulatorami ciągów muszą działać w warunkach dalekich od stanu równowagi, a więc *in vivo* nieodwracalnie oraz przy znacznym nadmiarze substratu. Na podstawie tych na wpół empirycznych wniosków przedstawia następnie z pewnymi skrótami (w szczególności w wywodzie matematycznym) teorię Kacsera i Burnsa (5) regulacji toru metabolicznego przez sprzężone działanie szeregu enzymów i substratów. W dalszym ciągu wskazuje na konieczność działania w takich układach mechanizmów włączających, zapłonowych („*switch mechanisms*”), którymi są enzymy allosteryczne o sigmoidalnej krzywej szybkości reakcji, bardzo czułe na działanie aktywatorów i inhibitorów. Krótki rozdział 8 poświęcono kontroli metabolizmu przez regulację stężenia — a więc biosyntezy enzymów. Autor omawia tu teorię operonu Jacoba i Monoda, a także zastanawia się pobieżnie nad czynnikami kontrolującymi degradację enzymów i „*turnover*” białek.

Dwa dodatki do właściwego tekstu omawiają nazewnictwo i klasyfikację enzymów oraz metody oczyszczania białek.

Książkę napisano w sposób jasny nie pozbawiony humoru i przystępny, chwilami niemal „łopatologicznie”, nie tracąc przy tym charakteru naukowego. Niektóre jej rozdziały są mocno nasycone wywodami matematycznymi, czego w nowoczesnej enzymologii, w szczególności w rozważaniach kinetycznych czy przy wyprowadzaniu teorii nie da się uniknąć. Wielką jej zaletą jest wyjątkowość — chyba po raz pierwszy w podręczniku akademickim — poza omówieniem najprostszego sposobu regulacji reakcji sprzężeniem zwrotnym, wprowadzenie teorii Kacsera i Burnsa, rozszerzającej w sposób zasadniczy pojęcia o mechanizmach regulacji metabolizmu na poziomie komórkowym. Uważny czytelnik znajdzie też w tekście sporo wskazówek technicznych przydatnych w pracy laboratoryjnej.

Obok niezaprzeczalnych zalet książka w niedostatecznym chyba stopniu porusza pewne sprawy, których miejsce powinno być właśnie w tego typu podręczniku. Bardzo mało mówi na temat izoenzymów, ograniczając się jedynie do modelu LDH. Nie wyjaśniono zupełnie różnicy w mechanizmie działania koenzymów i grup prostetycznych. Omówienie proenzymów, nota bene bardzo pobieżne, zyskałoby ogromnie przez zilustrowanie go klasycznym modelem trypsynogen — trypsyna. Przy omawianiu regu-



lacji, któremu autor poświęcił aż dwa rozdziały, należałoby chyba przynajmniej wspomnieć o dwóch podstawowych i nadrzędnych układach regulujących całość metabolizmu komórkowego, mianowicie układzie nukleotydów adenylowych (ADP/ATP) i nikotynamidowych (NAD)/(NADP/H) i powiązaniu ich z bezpośrednią regulacją enzymatyczną. Jako jedyny enzym regulujący układ ADP/ATP wymieniono kinazę adenilanową. W tym miejscu należałoby chyba również wspomnieć o koncepcji Atkinsona „ładunku energetycznego układu adenilanowego” („*energy charge of the adenylate system*”), oraz o jego współdziałaniu z mechanizmem regulacji na drodze sprzężeń zwrotnych (6), a także postulowaną koniecznością łączenia badania działania regulatora reakcji enzymatycznej z zmianami „ładunku energetycznego” (7). Wskazane byłoby również rozróżnienie prostych reakcji odwracalnych typu  $A \rightleftharpoons B$  od reakcji „mikrocyclicznych”, w których reakcja w kierunku odwrotnym biegnie inną drogą (A-B). Niesłusznym jest chyba podanie jako przykładu oznaczania fumarazy (str. 37) bez wyjaśnienia mechanizmu tej reakcji (8), którym również należałoby zilustrować omawianie diagramu aktywacji (Ryc. 39 str. 123). Brak też przynajmniej uwagi, że teoria operonu słusza dla *Procarvota* nie tłumaczy zadawalająco regulacji procesów u *Eucaryota*. Zapewne jedną z przyczyn tych braków była szczupłość podręcznika, wydaje się jednak, że przy tak obszernym i szczegółowym potraktowaniu niektórych problemów również i wymienione zagadnienia powinny być choć w krótkiej formie poruszone, a przynajmniej zasygnalizowane. Wreszcie piśmiennictwo w części zasadniczej podręcznika zrzadka tylko dociąga do roku 1973.

Pomimo tych usterek uważam książkę W. Ferdinanda za bardzo dobry podręcznik akademicki — w całości dla studentów specjalizacji biologii molekularnej, a w dużych partiach także dla innych specjalizacji biologii. Uważam, że wobec braku aktualnego w naszej literaturze zwięzłego i dostatecznie nowoczesnego podręcznika enzymologii należałoby dążyć do jak najszybszego przetłumaczenia go na język polski.

## PIŚMIENNICTWO

1. Wong J. T., C. S., Hanes, (1962), *Can. J. Bioch. Physiol.*, **40**, 763.
2. Ingraham L. L., B. Makower, (1954), *J. Phys. Chem.*, **58**, 266.
3. Cleland W. W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 173, 188.
4. Dalziel K., 1957, *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706.
5. Kacser H., J. A. Burns, (1973), In „Rate Control of Biological Processes”, Symp. Soc. Exper. Biol., (D. D. Davies ed.), 27—65, Cambridge Univ. Press.
6. Atkinson D. A., (1968), *Biochemistry*, **7**, 4030.
7. Shen L. C., L. Fall, G. M. Walton, D. E. Atkinson, (1968), *Biochemistry*, **7**, 4041.
8. Massey V., (1953), *Biochem. J.*, **53**, 72.

R. W. Schramm

## Animal, Plant and Microbial Toxins

red. A. Ohsaka, K. Hayashi, Y. Sawal, Tom 1 — *Biochemistry*, 1976, Plenum Press, New York, London, stron XXVI+555, cena 59,40 \$.

Toksyny zawsze były przedmiotem dużego zainteresowania choć nie zawsze z tych samych przyczyn. Niegdyś zajmowali się nimi kapłani kultów prymitywnych i czarownicy — bo działały silnie, groźnie i tajemniczo. Później przyciągnęły uwagę ludzi,

szukających skutecznych dróg ratowania ofiar pokąsania przez jadowite zwierzęta czy usiłujących wykorzystać właściwości toksyn dla innych celów medycznych. Po erze czystej empirii toksyny stały się atrakcyjnym (jeżeli jest to w odniesieniu do nich właściwe słowo) przedmiotem badań w rozmaitych dyscyplinach biologii, a zwłaszcza w biochemii, neurochemii, cytologii oraz w medycynie i farmacji. Coraz więcej biologów się nimi interesuje, gdyż wybiórczość interakcji toksyn z elementami subkomórkowymi czyni z nich niezwykle użyteczne narzędzie badawcze przy molekularnym podejściu do zagadnień biologicznych.

Nie wszystkie aspekty działania i struktury toksyn są poruszane w recenzowanej książce, nie jest ona bowiem ani monografią ani podręcznikiem ale zbiorem materiałów z sympozjum, które odbyło się w Tokyo pod egidą Międzynarodowego Towarzystwa Toksynologii. Zamieszczono w niej 50 prac doświadczalnych (ale ani jednej przeglądowej), z których 29 dotyczy toksyn zwierzęcych, 17 — bakteryjnych i 4 — roślinnych. Szczegółowe ich omawianie w recenzji mogłoby wydawać się niecelowe, bo Sympozjum odbyło się w roku 1974, książka zaś ukazała się w roku 1976 a do recenzji przysłano ją jeszcze w rok później. Jednakże „toksynologia” jest w Polsce tak mało popularna, że chyba warto skorzystać z okazji by zwrócić uwagę na jej interdyscyplinarny charakter i na szerokie możliwości, jakie w eksperymencie biochemicznym daje wysoka swoistość białek izolowanych z wielu jądów (jak lepiej jest określać surowy materiał o własnościach toksycznych).

Świadectwem stopnia zaawansowania badań nad toksynami jest to, że w całej książce nie ma właściwie ani jednej pracy, w której przedmiotem badania byłoby nieoczyszczone jady. Stosując rozmaite metody izolacji wyodrębniano z nich do eksperymentu toksyny działające na układ nerwowy (neurotoksyny), toksyny mające właściwości hemo- czy w ogóle cytolityczne, a także — wywołujące martwicę tkanek, krzepnięcie krwi, krwotoki, hemaglutynację, podrażnienie skóry. Toksyny te identyfikowano jako białka proste, glikoproteidy, mucyny, a były wśród nich i związki drobnocząsteczkowe jak aminy farmakologicznie czynne, związki fenolowe i związki wielopierścieniowe powierzchniowo czynne. Wykazywały one funkcje biochemiczne — były enzymami nukleolitycznymi, mono- i dwufosfoesterazami, ADP-azą, inhibitorami i aktywatorami proteaz. Najbardziej jednak interesujące były te toksyny, których działanie można było jednoznacznie przypisać ich funkcji biochemicznej — a więc neurotoksyny silnie wiążące się z receptorem cholinergicznym, fosfolipazy uszkadzające strukturę lipidową błony komórkowej, proteazy aktywujące w drodze ograniczonej proteolizy czynniki układu krzepnięcia krwi. Sprawy te nie będą jednak tutaj omówione szczegółowo, bo przecież od Sympozjum w Tokio upłynęły już przeszło trzy lata i czytelnik je bez większego trudu znajdzie w wielu artykułach przeglądowych, jeżeli nie w monografiach.

Warto jednak zwrócić, nieco przekornie, uwagę na kilka prac, częściowo mających charakter wstępny, a poruszających problemy które nie stały się w międzyczasie przedmiotem zamierzonych na szerszą skalę badań. Dokonany wybór jest z konieczności subiektywny i oparty o optymistyczne założenie, że jedyną przyczyną braku kontynuacji tych prac w ciągu ostatnich trzech lat była przemożna presja „mody” w badaniach naukowych, a nie — niepowodzenia w weryfikacji wcześniejszych wyników.

Badania nad neurotoksynami w znacznej części dotyczyły  $\alpha$ -neurotoksyn tj. toksyn reagujących z receptorem cholinergicznym w błonach post-synaptycznych — ich struktury pierwszorzędowej, rozmieszczenia grup kationowych tworzących wiązania (solne?) z receptorem, a więc tematów niejako klasycznych. Pojawiło się jednak również zainteresowanie innymi neurotoksynami. W jądzie dasznika modrego (*Bungarus coeruleus*, znany z literatury przygotowawczej „krait” indyjski, dostarczyciel szeroko stosowanej w badaniach  $\alpha$ -neurotoksyny — bungarotoksyny) znaleziono toksynę działającą na synapsy cholinergiczne, ale na ich błonę pre-synaptyczną a nie — post-sy-

naptyczną. Badania nad jej strukturą są już w toku, a — bez względu na to czy okaże się ona użyteczna leczniczo czy też pozwoli na lepsze poznanie struktury molekularnej błony pre-synaptycznej (a może — znajdującego się tuż za błoną aparatu wydzielniczego komórki nerwowej) — napewno warto śledzić dalsze losy tej pracy. W jadzie zaś kobry wykryto neurotoksynę, działającą na złącza neuromuskularne stawonogów, a więc zwierząt u których nie mają one charakteru cholinergicznego; toksyna ta wydaje się mieć aktywność fosfolipazową. Nasuwa się więc tutaj pytanie, czy neurotoksyna ta nie okaże się ewolucyjnie spokrewniona zarówno z fosfolipazami jadów wężowych jak i z  $\alpha$ -neurotoksynami, np. czy ewolucja neurotoksyn nie prowadziła od pierwotnej fosfolipazy, lizującej błonę komórkową, do czynników reagujących bardziej swoiście z wybranymi elementami jej struktury. Może jest to pochojna spekulacja, ale należy pamiętać, że z  $\alpha$ -neurotoksyn wężowych wykształciły się hormony polipeptydowe zwierząt wyższych jak sekretyna i glukagon. Studia więc porównawcze nad strukturą tych białek mają szansę rzucić światło na szlaki ewolucji układu hormonalnego i na zrozumienie jakie cechy molekuly hormonu są odpowiedzialne za jego funkcje regulacyjne.

Wiele również do myślenia dają prace nad naturalnymi czynnikami antytoksycznymi. W surowicy *Vipera palestinae* (bliska lecz groźniejsza krewna naszej pocziwej żmii zygzakowatej, *Vipera berus*) wykryto białko neutralizujące neurotoksyny żmij homologicznych a także — grzechotnika i kobry. Miało ono ciężar cząsteczkowy 56 000, niewątpliwie więc nie było antytoksyczną immunoglobuliną. Czym więc mogło ono być — analogiem receptora cholinergicznego, krążącym we krwi? swoistą proteazą? — nie wiadomo, ale implikacje poznawcze i praktyczne tego odkrycia są raczej oczywiste. Nb. odporność na toksyny wężowe ichneumona (kiplingowskiego Rikki-Tikki-Tavi) w ogóle nie ma charakteru humoralnego. Jeżeli zdamy sobie sprawę z tego, że z różnych źródeł naturalnych można mieć toksyny wybiórczo reagujące z błoną presynaptyczną, albo z błoną postsynaptyczną (i to o różnym powinowactwie), albo z innymi elementami synaps, a także czynniki antytoksyczne nie-odpornościowe, to jasnym będzie, że niewielka jak dotąd część możliwości eksperymentalnych w tym zakresie została wykorzystana w molekularnej neurofizjologii. Jeszcze bardziej smętne refleksje budzą prace nad neurotoksynami bakteryjnymi, przedstawione na omawianym Sympozjum. Kilka z nich opisywało wydajne i eleganckie metody czyszczenia toksyn z różnych drobnoustrojów i badania nad ich strukturą. Nie zajmowano się jednak mechanizmem ich działania, tak jakby przeoczono, że są one o tyle bardziej interesujące od neurotoksyn wężowych, że wykazują — jak toksyna tężcowa i botulinowa — powinowactwo do ośrodkowego układu nerwowego. Czyżby i tu zaważyło to, co eufenistycznie nazywa się „modą”, a co sprawia, że tak wiele ośrodków woli działać w odwodzie i cieniu ośrodków przodujących niż ryzykować podejmowanie oryginalnych tematów.

Fosfolipazy są w wielu jadach czynnikiem odpowiedzialnym za nekrozę tkanek, ale ciągle stanowią jeszcze dosyć zagadkową grupę enzymów. Przykładem tu może być praca nad fosfolipazą A z czarnej mamby (*Dendroaspis polylepsis*, najgroźniejszy może jadowity wąż afrykański, jeden z nielicznych który atakuje człowieka bez prowokacji). Fosfolipaza ta słabo działa na komórki krwi człowieka, podobna więc jest do fosfolipazy A z jadu kobry ale wyraźnie różni się od fosfolipazy A z jadu węża morskiego (*Enhydrina schistosa*), która na krwinki ludzkie działa bardzo energicznie. Takie zróżnicowanie fosfolipaz o formalnie identycznej swoistości substratowej jest zresztą dobrze znane z badań nad toksynami bakteryjnymi i na ogół przypisuje się je asymetrii rozmieszczenia fosfolipidów w błonach komórkowych. Jedna zaś z prac zamieszczonych w recenzowanej książce wskazuje, że o dostępności substratu w błonie może również decydować jego maskowanie przez inne, niepodatne na daną fosfolipazę, lipidy. Można mieć nadzieję, że dalszy rozwój tych badań pozwoli z fosfolipaz

uczynić dogodnie narzędzie do badania struktury błon komórkowych i fluktuacji w obrębie ich składników, a nie tylko empirycznie stosowany odczynnik, jak dotąd.

Badania nad proteazami o ograniczonym działaniu depolimeryzującym są w książce reprezentowane bardzo skromnie. Przyczyną tego bez wątpienia jest fakt, że stały się one w latach ostatnich przedmiotem nieomal wyłącznego zainteresowania ośrodków zajmujących się krzepnięciem krwi — bo ich trombinopodobne, antykoagulacyjne i tromboplastynowe własności znalazły szerokie zastosowanie w badaniach, diagnostyce i terapii szlak krwotocznych. Jedna praca warta jest mimo to wzmianki. Z niebezpiecznego węża taiwańskiego, *Trimeresurus flavoviridis*, wyizolowano toksynę powodującą krwotok, ale nie wywołującą uprzedniego obrzęku ani lizy komórkowej. Toksyna ta jest białkiem o ciężarze cząsteczkowym 104 000 i słabej (w stosunku do kazeiny jako substratu) aktywności proteolitycznej. Zdjęcia elektronomikroskopowe wskazują, że pod wpływem tej toksyny erythrocyty przenikają ruchem ameboidalnym przez złącza między komórkami endotelialnymi, gdyż uszczelniająca naczynia błona podstawna ulega zniszczeniu. Jeżeli wynik ten zostanie potwierdzony, to dostępne stanie się nieocenione narzędzie do badania struktury i funkcji układu mikrokrążenia.

Celem recenzji w ogóle, a zwłaszcza takiej jak ta — o charakterze eseju — nie jest omawianie wszystkich czy nawet najważniejszych prac zawartych w danej publikacji. Kilka z nich jednak warto chyba wymienić. Szereg toksyn, zarówno zwierzęcych jak roślinnych wykazuje pewną selektywność w działaniu na komórki nowotworowe, lizując je preferencjalnie w stosunku do komórek normalnych. Jest to, oczywiście, pożądanym bodziec dla empirii farmakologicznej i w wielu pracach przedstawiono, niezbyt zresztą przekonujące, wyniki uzyskane na takich wyeksplorowanych komórkach jak L1210, mięsak Yoshida, szczurze raki wysiękowe itd. W przypadku roślinnych toksyn abryny i rycyny (stosowanych w formie krystalicznej) stwierdzono, że obok efektu cytolitycznego pojawia się również pobudzenie nieswoistych odczynów odpornościowych, a więc zjawisko budzące ostatnio duże zainteresowanie onkologów. U niektórych ryb z gatunku płastug (ale na szczęście nie u naszej poczciwej flądry) w skórze występuje gwałtownie działająca mucynowa toksyna hemolityczna, a w organizmie tejże ryby stwierdza się obecność czynnika anty-hemolitycznego, skutecznie przeciwdziałającego hemolitycznym składnikom jadów węży, skorpionów i pszczoł. Otwiera to ciekawe możliwości terapeutyczne, nie ograniczone tylko do leczenia skutków ukąszenia. Z sinic oceanicznych w okolicy Okinawy wyizolowano toksynę kontaktową, odpowiedzialną za ostre zapalenia skóry u pływaków, swego czasu przypisywane przeciekowi gazów bojowych z magazynów wojskowych. A w tekście można znaleźć wiele innych ciekawostek.

Czy recenzowana książka może być zarekomendowana czytelnikowi? Odpowiedź na to pytanie, obowiązkowe w recenzji, nie jest łatwa, nawet jeżeli się pominie fakt, że jest ona dosyć przestarzała. Jeżeli toksynologia nie jest przedmiotem zainteresowania w danym laboratorium biochemicznym, to zapewne lepiej byłoby zakupić jedną ze współczesnych monografii z tej dziedziny. W braku zaś takiej możliwości, warto ją mieć na półce w bibliotece, zarówno dlatego, że biochemik znajdzie w niej opis szeregu ogólnie użytecznych metod jak i ze względu na to, że jej lektura może nasuwać wiele nieoczekiwanych a być może owocnych skojarzeń.

K. Zakrzewski

## Advances in General and Cellular Pharmacology

red. T. Narahashi i C. P. Bianchi, t. 1, 1976, Plenum Press, New York, London, 325 stron, cena 29,40 \$.

Znajomość mechanizmu działania leków na poziomie komórkowym, subkomórkowym lub molekularnym posiada istotne znaczenie nie tylko dla zrozumienia mechanizmu ich wpływu na cały żywy organizm, ale również dla badania aktywności biologicznej nowych związków chemicznych o potencjalnym działaniu leczniczym. Oceniana książka omawia nowe koncepcje i techniki badawcze wielu dyscyplin naukowych, pozwalające na poznanie na poziomie komórkowym mechanizmu działania leków. Jako pierwszy tom wydawnictwa seryjnego, składa się z 5 części, zawierających oryginalne wyniki autorów na tle aktualnego stanu naszej wiedzy na ten temat.

Rozdział pierwszy poświęcony jest mechanizmom automatyzmu serca. Modyfikacja tego automatyzmu przy użyciu różnych czynników chemicznych i fizycznych jest związana ze zmianą napięcia prądów czynnościowych spowodowaną kinetycznymi własnościami jonów i ich wpływem na metabolizm i przepuszczalność błon biologicznych. Szeroki zasięg możliwości oddziaływania na automatyzm serca i antyarytmiczną aktywność na poziomie jonowym, pozwala na podstawie prostych badań laboratoryjnych sugerować możliwość stosowania badanych związków w klinice. Ponadto badania takie pozwalają na wysuwanie sugestii dotyczących związków między stwierdzonymi w klinice zaburzeniami rytmu serca, a zaburzeniami obserwowanymi w różnych typach komórek serca, między zmianami obserwowanymi na sercu in toto i izolowanym, między zmianami u zwierząt doświadczalnych i u ludzi oraz między zmianami w sercu normalnym i niedokrwionym. Dokładne określenie omawianego zachowania jonów może przyczynić się do poznania mechanizmu molekularnych podstaw automatyzmu serca, co z kolei ułatwi określenie optymalnych własności potencjalnych leków wpływających na automatyzm serca.

W rozdziale drugim omówiono działanie alkaloidów mawkowca i ich antagonistów na cholinergiczną transmisję w jelicie świnki morskiej. Jakkolwiek przeciwbólowe efekty morfiny i związków pokrewnych wiążą się ściśle z ich wpływem na swoiste receptory opiatowe, w omawianym rozdziale wykazano wyraźną zależność między działaniem przeciwbólowym (u myszy i ludzi) oraz wpływem hamującym kurczliwość jelita świnki morskiej wywołaną jego drażnieniem prądem elektrycznym. Na tym prostym modelu doświadczalnym wykazano wyraźne działanie przeciwne leków przeciwbólowych i ich antagonistów oraz udział w mechanizmie tego działania różnych prostaglandyn.

W rozdziale trzecim omówiono mechanizm działania leków nasercowych w ontogenezie. Badania przeprowadzone z użyciem hodowli tkanek serca otrzymanych z zarodków kurzych, w różnym okresie embrionalnego rozwoju, wykazały, że transmisja cholinergiczna rozwija się już w 12 dniu inkubacji, a adrenergiczne dopiero w 21 dniu. Pozwala to, między innymi, na badania wpływu różnych leków na naturalnie odnerwionym sercu. Posługując się tym modelem wykazano, że może być on użyty do badania mechanizmu działania, szczególnie leków wywierających wpływ na automatyzm serca.

Rozdział czwarty obejmuje matematyczną analizę zależności dawka-efekt. Na podstawie danych doświadczalnych omówiono różne modele badań zależności dawka-efekt, ze szczególnym uwzględnieniem modeli kinetycznych i wyboru najodpowiedniejszego z nich do badań doświadczalnych i statystycznej oceny działania leków.

Rozdział piąty zawiera najnowsze dane dotyczące wpływu wybranych leków na transmisję w zwojach wegetatywnych na poziomie komórkowym. Omówiono w nim

mechanizm pre- i postsynaptycznego działania naturalnych neuromediatorów, a także wpływ kofeiny, jonów wapnia, baru i strontu na neurotransmisję w zwojach.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana książka, stanowi wysoce pozytywne przedstawienie współczesnego stanu wiedzy na temat omawianych w książce zagadnień. Sądzę, że powinna ona znaleźć się w podręcznej bibliotece nie tylko farmakologów, ale również przedstawicieli innych dyscyplin zajmujących się działaniem biologicznym endo- i egzogennych związków chemicznych na poziomie komórkowym.

*Z. Kleinrok*

### **The Science of Life: Contributions of Biology to Human Welfare**

red. **K. D. Fisher, A. U. Nixon, 1977, Plenum Press, New York, stron 358, cena 9,00 \$.**

Książka ta rozpoczyna serię monografii, w których będą publikowane materiały z sympozjów i konferencji organizowanych pod auspicjami FASEB (Federation of American Society for Experimental Biology). Materiały zebrane w tym tomie były już publikowane w Federation Proceedings w 1972 r. Niemniej jednak ponowne ich wydanie drukiem w odrębnej publikacji jest zdaniem wydawców oraz autora słowa wstępnego — Senatora Listera Hilla — bardzo celowe, gdyż udostępnia, stojące na bardzo dobrym poziomie opracowania zagadnień, których znajomość jest niezbędna dla biologów, lekarzy, studentów i nauczycieli. Co więcej, materiały te stanowią pełne podsumowanie, osiągniętego w minionym czterdziestoleciu, postępu wiedzy w naukach biologicznych w odniesieniu do poznania człowieka i jego związków z otaczającym środowiskiem.

Wybitni specjaliści z szeregu dyscyplin biologicznych i medycznych są autorami dziewięciu rozdziałów dotyczących podstaw biomedycyny (J. W. Colbert jr), medycyny klinicznej (G. E. Burch), nauk dentystycznych (J. F. Volher), żywności (E. M. Mrak), biologii populacyjnej (F. B. Bang), zagrożenia środowiska (J. J. Hanlon), biologii i wykorzystania mórz (C. B. Idyll) oraz bogactw naturalnych (F. Sargent II). Na końcu każdego rozdziału czytelnik znajduje odnośniki do literatury uzupełniającej przedmiotu, na końcu zaś książki mały słownik podstawowych terminów biochemicznych i medycznych oraz indeks rzeczowy. Zagadnienia omawiane w poszczególnych rozdziałach ujęte są w przejrzysty i interesujący sposób, opatrzone szeregiem schematów i ciekawych zestawień statystycznych. Książka ta daje obraz praktycznego zastosowania w życiu wyników badań biologicznych i wskazuje na konieczność ich kontynuacji. Dzięki temu, między innymi, stanowi ona również interesującą lekturę także dla osób nie będących bezpośrednio zaangażowanych w badaniach biologicznych.

*B. Grzelakowska-Sztabert*

### **Advances in Neurochemistry**

red.: **B. E. Agranoff i M. H. Aprison, tom 2, 1977, Plenum Press, New York, 346 stron, cena 39 \$.**

W kolejnym tomie „Advances in Neurochemistry” przedstawiono następujące zagadnienia: I) Fenyloketonuria — mechanizmy biochemiczne (Seymour Kaufman), II) Tryptofan w ośrodkowym układzie nerwowym — regulacja i znaczenie (S. N. Young

i T. L. Sourkes), III) Substancja P i przekaźnik pobudzenia czuciowego (Masanori Otsuka), IV) Biochemia snu (Manfred L. Karnovsky i Peter Reich), V) Odpowiedź czuciowa bakterii (Daniel E. Koshland, Jr).

Pierwszy artykuł jest wyczerpującym przeglądem badań nad mechanizmami biochemicznymi fenylloketonurii. Oparto go na ponad 370 pozycjach piśmiennictwa. W rozdziale poświęconym tryptofanowi w ośrodkowym układzie nerwowym Young i Sourkes przedyskutowali źródła oraz przemianę tryptofanu w mózgu. Liczne tabele porównawcze oraz bogata bibliografia podnoszą wartość tego opracowania monograficznego. Zarówno artykuł poświęcony fenylloketonurii jak i tryptofanowi zainteresują szczególnie wszystkich zajmujących się biochemią kliniczną.

W Rozdziale III Otsuka podał przekonujące dowody na to, że decapeptyd, tzw. substancja P, spełnia kryteria stawiane transmitterem. Jest ona przekaźnikiem pobudzenia czuciowego w istocie szarej grzbietowej części rdzenia kręgowego.

Najbardziej dyskusyjnym, ale jednocześnie najciekawszym artykułem przedstawionym w tym tomie, jest rozdział poświęcony biochemii snu. Karnovsky i Reich w sposób krytyczny omówili wyniki badań dotyczące zmian biochemicznych występujących w czasie snu. Podkreślają ogrom trudności piętrzący się przed badaczami tego problemu. Pierwszorzędne znaczenie ma: znalezienie takiego modelu doświadczalnego, w którym ograniczony byłby wpływ ubocznych, niespecyficznych czynników, a także dobór odpowiedniego materiału kontrolnego.

Zamieszczenie w „Advances in Neurochemistry” rozdziału poświęconego zachowaniu się bakterii w odpowiedzi na zmianę środowiska może budzić pewne zaskoczenie czytelnika. Koshland Jr. wskazuje jednak na pewne podobieństwa pomiędzy bardziej złożonymi wzorcami zachowania się zwierząt wyższych a chemotaksją bakterii. Wskazuje na możliwość potraktowania reakcji bakterii jako układu modelowego. Jest to niestereotypowe podejście do zagadnienia „odpowiedzi organizmu” na informację dostarczoną z otaczającego środowiska.

Zamysłem wydawców serii „Advances in Neurochemistry” było, by przedstawione artykuły dawały zarówno informację ogólną jak i bardziej szczegółową, tak aby służyły zarówno neurochemikom o wąskiej specjalizacji jak i biochemikom, których zainteresowania dopiero od niedawna skierowały się na procesy zachodzące w mózgu. Wydaje się, że jak dotąd cel ten osiągnięto.

*J. Skangiel-Kramska*

## **Hypothalamic Peptide Hormones and Pituitary Regulation**

**red. J. C. Porter, 87 tom wydawnictwa „Advances in Experimental Medicine and Biology”, 1977, Plenum Press, New York, London, 366 stron, cena 39 \$.**

Tom „Hormony peptydowe podwzgórza i czynność regulacyjna przysadki” zawiera materiały Konferencji zorganizowanej przez Sekcję Badań Biologii Rozrodu Narodowych Instytutów Zdrowia (N.I.H.) w Wilson Hall koło Bethesdy w końcu 1976 r. W okresie od 1963 r. była to trzecia konferencja poświęcona hormonom podwzgórza. Na pierwszej przedstawiono podstawy anatomiczne i fizjologiczne, niezbędne do badań nad powiązaniem roli podwzgórza i przysadki, na drugiej w Tucson, 1969 r. omawiano głównie metodykę ilościowych oznaczeń peptydów podwzgórza za pomocą testów biologicznych i znacznie bardziej czułych testów radio-immunologicznych. Zadaniem ostatniej Konferencji było zreferowanie aktualnego stanu wiedzy o właściwościach trzech biologicznie czynnych peptydów podwzgórza o poznanej już budowie

chemicznej, wpływających na czynność przedniego płata przysadki: LHRH — czynnik uwalniający hormon luteinizujący, TRH — czynnik uwalniający tyotropinę i somatostatyna, hamująca uwalnianie hormonu wzrostu. Inne peptydy podwzgórza omawiano znacznie mniej szczegółowo. Na marginesie należy zaznaczyć, że na Konferencji zaproponowano stosować termin „czynnik uwalniający” (*releasing factor*) zamiennie z „hormonem”, skrót zaś „R” ma być równoznaczny z „H”.

Jak wiadomo Nagrodę Nobla w zakresie medycyny i fizjologii przyznano w r. 1977 Roger Guillemin i Andrew V. Schally za prace z dziedziny neuroendokrynologii, która była tematyką omawianej Konferencji i której uczestnikami byli obaj wymienieni uczeni. Jednocześnie otrzymała nagrodę Rosalyn Yalow, która wraz ze zmarłym w r. 1972 S. Bernsonem opracowała technikę testów radioimmunologicznych. Tematyka więc omawianej książki jest nie tylko bardzo aktualna, o ogromnym znaczeniu zarówno teoretycznym jak i klinicznym, lecz zyskała ona również najwyższą ocenę naukową.

Całość materiałów przedstawiono w postaci 16 referatów ilustrowanych przejrzystymi schematami i tabelami oraz zawierającymi wyczerpujące piśmiennictwo. Pomimo, że tematyka jest zwarta, bo dotyczy w zasadzie tylko trzech peptydów podwzgórza o znanej i prostej budowie, podawanej już w nowoczesnych podręcznikach biochemii, to jednak można wśród referatów wyróżnić trzy następujące grupy: 1) Ilościowo najbardziej pokaźna grupa prac o charakterze ogólnobioologicznym. Zaliczyć tu można następujące: Endokrynologia neuronu i pochodzenie neuronalne komórek — R. Guillemin. Transport aksooplazmy w nerwach obwodowych i w układzie podwzgórze-przysadka — S. Ochs. Subkomórkowe rozmieszczenie peptydów podwzgórza — A. Barnea, Ch. Oliver i J. C. Potter. Badania nad rozmieszczeniem peptydów biologicznie czynnych w mózgu — M. J. Brownstein. Biosynteza peptydów podwzgórza — J. F. McKelvy. Komórka nerwowa jako jednostka sekrecyjna — R. A. Gorski. 2) Prace nad mechanizmem uwalniania hormonów przedniego płata przysadki. Wydzielanie LHRH — J. D. Neil i wsp. Kontrola podwzgórza w wydzielaniu hormonu stymulującego uwalniania hormonu melanotropowego i adrenokortykotropowego — M. Saffran. Wydzielanie hormonów podwzgórza *in vivo* i *in vitro* — J. C. Porter i wsp. Mechanizm działania LHRH i TRH i modulacja działania poprzez hormony peryferyczne — F. Labrie i wsp. 3) Prace których wyniki poza znaczeniem teoretycznym są bezpośrednio powiązane z terapią: Czynniki podwzgórza hamujące i stymulujące wydzielanie prolaktyny — A. Arimura i A. V. Schally. Rola TRH u człowieka — A. G. Frantz. Stosowanie somatostatyny w badaniach homeostazy węglowodanowej u człowieka — J. E. Gerich. Rola LHRH w kontroli cyklu menstruacyjnego — S. S. C. Yen i wsp. Farmakologia TRF, LRF i somatostatyny — W. Vale i wsp.

Jak wiadomo peptydy biologicznie czynne występują w podwzgórzu w ilościach tak małych, że dla wyizolowania kilku mg czystego hormonu trzeba było zużyć setki tysięcy świń lub owiec. Dlatego też dokładne poznanie budowy peptydów podwzgórza ma pierwszorzędne znaczenie nie tylko teoretyczne, lecz i praktyczne: umożliwia bowiem ich syntezę, a nawet taką modyfikację cząsteczki hormonu, że uzyskuje się analogi o znacznie potężniejszej i przedłużonej aktywności biologicznej w porównaniu z hormonem rodzimym. Można również otrzymać substancje o działaniu antagonistycznym. Substancje te mogą być następnie wykorzystane dla celów terapeutycznych przy całym szeregu schorzeń, a jak się wydaje w przyszłości może znajdą również zastosowanie jako środki antykoncepcyjne.

Trudno chyba przecenić wartość teoretyczną badań nad biologicznie czynnymi peptydami podwzgórza, jeśli wziąć np. pod uwagę, że Schally i Vale na podstawie dokładnej znajomości budowy LHRH mogą wysunąć przypuszczenie, które reszty aminokwasowe w peptydzie są odpowiedzialne za aktywność biologiczną, a które za zdolność do wiązania z receptorem. Na podkreślenie zasługuje fakt, że omawiane peptydy podwzgórza bynajmniej nie są wytwarzane wyłącznie w tej strukturze. Po



całkowitej deaferentacji podwzgórza poziom TRH w innych strukturach mózgu (np. pnia mózgu, korze mózgowej) nie ulega zmianie. Szybkość syntezy krótkich peptydów podwzgórza jest bardzo mała, porządku wielkości 0,01—1,0 pmol na 1 min na mózg szczura. Dlatego też wszystkie badania, mające na celu wyjaśnienie mechanizmów wydzielania tych hormonów wymagają niezwykle czułych metod, czystych odczynników i znakowanych prekursorów o bardzo dużej aktywności specyficznej.

Nie sposób w krótkiej recenzji przedstawić nawet pobieżnie całej omawianej tematyki. Wartość omawianej książki nie polega tylko na zestawieniu ogromnego materiału faktycznego, będącego skarbnicą wiedzy dla neuroendokrynologów. Wydaje się, że znacznie bardziej ważnym jest wskazanie czytelnikowi jakie są dalsze perspektywy badań i jak wiele dotychczas utartych poglądów ulegnie być może daleko idącym zmianom. Dla przykładu możnaby tu podać że Guillemin proponuje nową rozszerzoną definicję hormonu. Hormonem byłaby każda substancja którą komórka wydziela i która działa na inną komórkę, znajdującą się w pobliżu lub daleko, niezależnie od tego czy substancja ta przenoszona jest przez krew, czy przez aksoplazmę, czy też poprzez przestrzeń pozakomórkową lub szczelinę synaptyczną. W myśl takiej definicji do hormonów należałoby zaliczyć neurotransmitery, choć jednej z ważnych cech mediatorów tj. zwrotnego pobierania nie udało się dotychczas wykryć wśród peptydów podwzgórza. Dalszą konsekwencją byłoby wprowadzenie nowej klasyfikacji neuronów sekrecyjnych (R. A. Gorski): 1) Neuron „klasyczny” — powiązany z następnym poprzez synapsy i wykorzystujący wydzielaną przez siebie substancję jako neurotransmitter. 2) Neuron „przetwornikowy” (neuroendocrine transducer) — przekształca informację nerwową w sekrecyjną, hormon zaś wydzielany jest do krwioobiegu, i wreszcie 3) Integrujący neuron sekrecyjny (Neuroendocrine neuron integrator) o rozgałęzionych aksonach, łączący właściwości dwóch uprzednio wymienionych. W świetle takiej klasyfikacji prawo Dale'a, dotychczas nieobalane, musiałoby wg Gorskiego ulec modyfikacji.

W książce nie zamieszczono dyskusji, również podsumowanie, jak zaznacza sam autor, A. R. Gorski, nosi raczej charakter dodatkowego referatu, tym nie mniej większość artykułów napisana jest, jak mi się wydaje, w sposób bardzo stymulujący każdego biologa.

*S. Niemierko*

## **Tissue Hypoxia and Ischemia**

red. M. Reivich, R. Coburn, S. Lahiri i B. Chance

**Tom 78 Advances in Experimental Medicine and Biology, 1977, Plenum Press, New York, London, 347 stron, cena 45 \$.**

Tom zawiera materiały sympozjum zorganizowanego przez Uniwersytet Pensylwanii (sierpień, 1976), w którym wzięli udział także badacze z niektórych ośrodków europejskich. Tematyka sympozjum poświęcona była fizjologicznym i biochemicznym problemem niedotlenienia tkanek. Znalazły się w niej bardzo obszernie potraktowane zagadnienia:

- Biochemia fizjologicznych receptorów tlenu
- Mechanizmy działania receptorów tlenu w tkankach
- Wpływ hipoksji i ischemii na hemodynamikę i metabolizm mózgu

W materiałach zamieszczono poza pracami oryginalnymi także prace o charakterze monograficznym m.in. Siesjö i wsp., Estabrook i Werringloer; niektórym z nich towarzyszy szeroki komentarz lub dyskusja.

W pierwszej sesji omówiono teoretyczne problemy związane z istnieniem receptorów tlenu, głównie pod kątem poszukiwań ich molekularnego podłoża w tkance i wewnątrz komórki. Z tego punktu widzenia scharakteryzowano enzymy mikrosomalne i mitochondrialne wielu tkanek oraz białka hemowe.

W drugiej sesji znalazły się prace dotyczące bioelektrycznej aktywności chemo-receptorów na modelowym przykładzie pojedynczego neuronu mięczaka (*Aplysia*), a także prace podejmujące próby wyjaśnienia mechanizmu skurczu mięśni gładkich naczyń ssaków pod wpływem wzrostu  $pO_2$ . Dość szczegółowo przedyskutowano rolę ATP,  $Ca^{+2}$  i prostaglandyn w mechanizmach regulacji tego procesu i poddano krytycznej analizie adenozynową hipotezę regulacji krążenia krwi w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym w hipoksji (Haddy). Oddzielną sesję poświęcono mechanizmowi działania chemoreceptorów kłębka szyjnego w powiązaniu z rolą katecholamin i cyklicznego AMP.

Dla neurochemika najciekawsze zagadnienia omówiono w sesji poświęconej metabolicznemu podłożu uszkodzeń tkanki nerwowej w hipoksji. Zwrócono uwagę na odmienny charakter zaburzeń biochemicznych w każdym ze stosowanych modeli niedotlenienia. Podkreślono brak zależności między stopniem tych zaburzeń a głębokością nieodwracalnego uszkodzenia komórek mózgu, zwłaszcza w modelach pełnego i częściowego niedokrwienia. Przedstawiono kilka interesujących hipotez tłumaczących to zjawisko m.in. biorąc pod uwagę spadek pH w trakcie niedotlenienia i wzrost metabolizmu we wczesnych okresach po niedotlenieniu (Siesjö i wsp., Duffy i Levy). W tematyce tej sesji znalazły się także bardziej szczegółowe zagadnienia, takie jak zmiany tkankowego  $pO_2$ , równowagi jonowej i stanu redox w wybranych modelach niedotlenienia, czy wpływ ischemii kory mózgu na inne części ośrodkowego układu nerwowego w odniesieniu do poziomu cyklicznych nukleotydów: GMP i AMP.

Aspekt kliniczny hipoksji podjęto tylko w jednym doniesieniu, w którym opisano wpływ wzrostu  $pCO_2$  na hemodynamikę krążenia mózgowego u pacjentów z chorobami naczyń (Reivich i wsp.). Porównano tu materiał kliniczny z doświadczalnie wywołanym zatorom mózgowym u małp.

W sumie materiały stanowią cenną pozycję, atrakcyjną pod wieloma względami dla specjalistów interesujących się niedotlenieniem: fizjologów, biochemików, lekarzy. Zamieszczone tu doniesienia stanowią często dorobek kilkuletniej pracy renomowanych ośrodków europejskich i amerykańskich. Wartość tej monografii podnosi również fakt, że jest ona jedną z nielicznych prób oceny wpływu niedotlenienia na różnych poziomach organizacji ustroju.

H. Książak

## Comparative Endocrinology of Prolactin

red. H. D. Dellmann, J. A. Johnson, D. M. Klachko, 1977, Plenum Press, London, New York, 249 stron, cena 27 \$.

Monografia zawiera 11 referatów wygłoszonych na Sympozjum w sierpniu 1975 r. na Uniwersytecie Missouri. Referaty oparto na własnych pracach autorów prowadzących od dłuższego czasu badania nad sekrecją, strukturą chemiczną oraz rolą fizjologiczną prolaktyny u ssaków i niższych kręgowców.

W pierwszym referacie C. W. Turner, długoletni badacz i inicjator badań nad sekrecją i rolą prolaktyny w procesie rozwoju gruczołu mlecznego i laktacji, przedstawił historyczny rozwój badań nad prolaktyną. Omówił on większość zagadnień

związanych z produkcją i fizjologią hormonu a więc np. powiązanie sekrecji hormonu z hormonami gonadowymi (estradiolem i progesteronem), synergizm działania prolaktyny z hormonami nadnerczy i somatotropiny na mammogenezę i laktogenezę oraz problem oznaczania aktywności biologicznej hormonu. Badanie tych zagadnień rozpoczęte zostało właśnie w laboratorium kierowanym przez C. W. Turnera.

U. J. Lewis przedstawił obecny stan wiedzy o strukturze chemicznej prolaktyny zwierząt kilku gatunków oraz o pokrewieństwie immunologicznym prolaktyn ssaków i niższych kręgowców. Zagadnienia te mają duże znaczenie w badaniach fizjologicznych.

Niezmiernie ciekawy jest referat M. G. Farquhar pt.: „*Secretion and Crinophagy in prolactin cells*”. Omówiła ona zjawiska tworzenia się granul prolaktyny, ich wydalenie z komórki oraz degradację na poziomie molekularnym. Poruszyła również etapy tworzenia się granul w których hormon staje się immunoreaktywny.

Regulację sekrecji hormonu — podstawowe zagadnienie z punktu widzenia fizjologicznego — przedstawili J. Meites w referacie pt.: „*Control of prolactin secretion*” oraz A. G. Franz w referacie „*Assay on regulation of prolactin in humans*”. Jak wiadomo, rola podwzgórza w hamowaniu i stymulacji sekrecji hormonu przez przysadkę ssaków nadal znajduje się w sferze hipotez. Nadal bardzo mało jest danych na temat podwzgórzowego czynnika hamującego sekrecję (PIF) jak i stymulującego sekrecję (PrRF). Meites omawia te zagadnienia na podstawie nowych danych o udziale środków farmakologicznych wpływających na sekrecję prolaktyny oraz rolę w tym procesie podwzgórzowego hormonu uwalniającego tyreotropinę (TRH).

Po referacie J. Meitesa — rozwinęła się ciekawa dyskusja na temat regulacji sekrecji prolaktyny u ptaków i niższych kręgowców (płazów, gadów). Wiadomo było, że u tych zwierząt ośrodkowy układ nerwowy stymuluje sekrecję hormonu przez przysadkę. Z dyskusji tej wynika, że najprawdopodobniej działanie stymulujące należy przypisać TRH. Rolę hormonu w procesie mammogenezy i laktogenezy u człowieka i innych ssaków omówił L. J. Jacobs. Rolę tę autor omawia na poziomie zjawisk molekularnych; przedstawia działanie hormonu na receptory komórek gruczołu mlecznego i efekt tego działania poprzez cyklazę adenylową i kinazy białkowe.

Spośród rozlicznych funkcji prolaktyny w procesach metabolicznych szeroko omówiono jej rolę w regulacji przemiany tłuszczów (A. H. Meier, *Role of prolactin in liporegulation*).

Wprawdzie omawiana monografia nie przedstawia pełnej listy funkcji prolaktyny w organizmach zwierzęcych, nie porusza bowiem jej udziału w procesie wzrostu, owulacji i rozrodu ssaków i niższych kręgowców, wpływu na zachowanie się w okresie macierzyństwa, wędrówce ptaków lub zmianie okrywy u gadów — omawia jednak najważniejsze zagadnienia z zakresu budowy, sekrecji i funkcji hormonu, nie jest przeciążona nadmiarem danych lecz sięga do ich istoty i to jest dużą zaletą omawianej publikacji.

E. Domański

## „Elastin and elastic tissue”

red. L. B. Sandberg, W. R. Gray i C. Franzblau, tom 79 serii „*Advances of Experimental Medicine and Biology*”, (1977) Plenum Press, New York/London, 782 strony, cena 71,40 \$.

Elastyna jest jednym z najbardziej stabilnych chemicznie białek zwierzęcych. Stanowi główny element strukturalny sprężystej tkanki łącznej nadając jej cha-

rakterystyczne właściwości mechaniczne. Występuje w większych ilościach w wiązadłach, skórze, ścianach naczyń i tkance płucnej. Białko to zostało odkryte w 1840 roku, ale dopiero w ostatnich latach odnotowano istotny postęp w badaniu jego struktury i funkcji.

Na recenzowaną książkę składają się materiały pierwszej międzynarodowej konferencji na temat elastyny i tkanki elastycznej, zorganizowanej w Alta (Utah, USA) w sierpniu 1976 roku. Redaktorzy tej pozycji i jednocześnie organizatorzy konferencji, pracują sami nad strukturą elastyny i obok S. M. Partridge'a, który był również uczestnikiem spotkania, odnotowali w tej dziedzinie największe osiągnięcia.

W siedmiu rozdziałach książki przedstawiono prace autorów różnej specjalności dotyczące:

- morfologii elastyny i tkanki elastycznej,
- szybkości obrotu tego białka w tkance oraz elastolizy,
- chemicznej budowy elastyny,
- jej biosyntezy i metabolizmu,
- właściwości fizykochemicznych elastyny,
- molekularnych modeli struktury i funkcji tego białka.

Jeden z rozdziałów (V), który wyłamuje się nieco z logicznego układu materiału, poświęcono tkance płuc.

Biochemika zainteresują przede wszystkim molekularne podstawy sprężystości elastyny. Podkreśla się zarówno niezwykle skład aminokwasowy tego białka (powyżej 95% reszt niepolarnych) jak i występowanie mocnych kowalencyjnych wiązań międzyłańcuchowych powstających w wyniku oksydatywnej przemiany reszt lizyloowych w łańcuchach rozpuszczalnego prekursora — tropoelastyny. W dojrzałej elastynie wiązania te występują co około 75 reszt aminokwasowych, w obszarach bogatych w alaninę. Nie ma zgodności poglądów co do tego czy na poziomie molekularnym elastyna jest białkiem fibrylarnym czy globularnym. Nie wiadomo również dokładnie, w jakim stopniu zdolność włókna elastyny do powrotu do pierwotnej długości po zwolnieniu siły naprężającej, jest wynikiem bezpośrednich interakcji łańcuchów polipeptydowych, a w jakim — oddziaływań między łańcuchami a cząsteczkami wody (właściwości sprężyste występują jedynie w stanie uwodnienia). Zwolennicy modelu struktury przestrzennej elastyny w postaci trójwymiarowej siatki nieregularnie przebiegających łańcuchów, uznają to zjawisko za efekt czysto entropowy. Twórcy modeli struktury bardziej uporządkowanej uważają najczęściej, że podstawą sprężystości są oddziaływania hydrofobowe faworyzujące określony typ konformacji.

Interesujących danych dostarcza także rozdział dotyczący katabolizmu elastyny, w którym wiele uwagi poświęcono serynowo-histydynowym proteazom niektórych komórek i tkanek, zdolnym do degradacji tego białka i zbliżonych do elastaz trzustkowych.

Książkę wydano techniką małej poligrafii w kilka miesięcy po zamknięciu konferencji. Każdy z rozdziałów został poprzedzony zwięzłym wstępem i zakończony rzeczowo zredagowanym sprawozdaniem z dyskusji plenarnych. Ułatwia to znacznie korzystanie z obszernego ładunku aktualnych informacji jaki niesie ta interesująca i pożyteczna publikacja.

W. Ardel

## Intercellular Communication

red. W. C. De Mello, 1977, Plenum Press, New York, 255 stron, cena 30 \$

W ostatnich latach zwrócono uwagę na różnorodne połączenia między komórkami. Niektóre z nich znane są jeszcze tylko od strony morfologicznej, innym można już przypisać określone funkcje. Do tych ostatnich należą złącza szczelinowe (*gap junctions* — *nexus*) zwane także połączeniami elektrycznymi. Recenzowana książka poświęcona jest złączom szczelinowym. Składa się z 9 artykułów przeglądowych opracowanych przez różnych autorów, w których omawiane są występowanie i rola tych złączy w organizmach dorosłych w warunkach fizjologicznych i patologicznych, *in vivo* i *in vitro* oraz w rozwoju zarodkowym. W rozdziale 1 (*Gap junctions in development*) E. B. Griep i J. P. Revel zestawiają dotychczasowe wyniki badań nad złączami szczelinowymi, ich ultrastrukturą, budową chemiczną, przepuszczalnością i rolą, charakterem substancji przekazywanych i przewodnictwem elektrycznym. Szczególną uwagę zwrócili autorzy na rozwój i przemiany złączy w czasie rozwoju zarodkowego i różnicowania się komórek nerwowych oraz na ich rolę w regulacji wzrostu.

L. Weiss i J. P. Harlos w rozdziale 2 (*Cell contact and their implication in cell communication*) po przedstawieniu teoretycznych rozważań nad siłami działającymi na przyciąganie i odpychanie się powierzchni sąsiadujących komórek, referują wyniki badań doświadczalnych nad heterogennym rozmieszczeniem ładunków elektrycznych na powierzchni komórki. Na przykładzie mikrokosmków o dużej krzywiznie i dużym ładunku ujemnym na powierzchni, przeprowadzają teoretyczne rozważania możliwości jego kontaktu z płaską powierzchnią komórki. Zajmują się również rolą makromolekuł powierzchniowych w tworzeniu połączeń elektrostatycznych między oddalonymi od siebie komórkami oraz powiązaniem między ładunkami elektrycznymi powierzchni komórek a tworzeniem się połączeń o niskim oporze i dynamiką tych połączeń. Na końcu rozdziału podkreślają brak połączeń elektrycznych między komórkami nowotworowymi.

Jednolitość połączeń międzykomórkowych w świecie zwierzęcym jest tematem rozdziału 3 (*Junctional permeability and its consequences*). Autorzy — J. D. Pitts i M. E. Finbow — głównie na podstawie swych własnych badań przeprowadzonych na ponad 30 rodzajach komórek wykazują identyczność tworzących się między nimi złączy szczelinowych *in vivo* i *in vitro*. Przez złącza te oprócz impulsów elektrycznych przechodzą nieorganiczne jony i niskocząsteczkowe substancje. Szczególną uwagę zwracają na transport nukleotydów, aminokwasów, ufosforowanych cukrów, fosforanów cholinowych i niektórych barwników oraz na ilościową stronę tego transportu. Rozdział zakończony jest wnioskami o znaczeniu biologicznym złączy szczelinowych w koordynowaniu i regulowaniu aktywności komórek, wzrostu, cykli komórkowych i rozwoju zarodkowego.

Rozdział 4 (*Intercellular communication in heart muscle*) poświęcony jest połączeniom międzykomórkowym w mięśniu sercowym. Napisany jest przez redaktora książki V. C. De Mello. Na wstępie wymienia on wszystkie typy połączeń międzykomórkowych i ich rozwój w sercu. Rozważa następnie czy synchronizacja pulsacji komórek mięśnia sercowego zależy od połączeń międzykomórkowych podkreślając, że mięsień sercowy składa się z pojedynczych odrębnych komórek mięśniowych. Udowadnia na podstawie badań eksperymentalnych, że dla rozchodzenia się podniecia (impulsu) w sercu konieczna jest obecność połączeń międzykomórkowych o niskim oporze elektrycznym, a jedynie złącza szczelinowe we wstawkach mogą spełniać wszystkie wymagane warunki. Dyskutuje wpływ obecności śródkomórkowej jonów

Ca oraz Na dla przepuszczalności złączy szczelinowych i przewodzenia w mięśniu sercowym.

A. L. Politoff w rozdziale 5 (*Protein semiconduction: an alternative explanation of electrical coupling*) przedstawia własną hipotezę półprzewodnictwa białek w odniesieniu do transportu przez połączenia elektryczne, opartą na wynikach badania przepuszczalności połączeń elektrycznych w nerwach brzusznych kałamarnicy. Równocześnie przeprowadza krytyczną ocenę ogólnie przyjętej hipotezy o istnieniu kanałów hydrofilnych w złączach szczelinowych.

Rozdział 6 (*Intercellular communication and cancer*), napisany przez R. Azarnia i W. J. Larsen, poświęcony jest omówieniu roli złączy szczelinowych w regulacji wzrostu. Autorzy podkreślają, że proces ten może być związany z przechodzeniem cAMP przez złącza, zwracają również uwagę na rolę cyklicznej adenilowej i błonowych receptorów hormonów w transporcie substancji przez złącza szczelinowe w niektórych docelowych komórkach dla hormonów białkowych. Wiąże to z wciąganiem do środka (*internalization*) i tworzeniem się pierścieniowatych złączy szczelinowych w tych komórkach. Omawiają wreszcie zagadnienie występowania i braku połączeń między komórkami nowotworowymi uważając, że genetycznie uwarunkowany brak złączy szczelinowych, i na skutek tego niemożliwość przechodzenia czynnika regulującego wzrost między komórkami, jest przyczyną nowotworzenia.

W rozdziale 7 (*Cell interactions in neuroblastoma*) J. Harris i W. G. Hopkins omawiają połączenia między komórkami neuroblastoma. Na początku rozdziału podają opis i charakterystykę różnych linii tego typu komórek. Zajmują się następnie głównie wynikami badań nad neuroblastoma C 1300 hodowanymi *in vitro* wraz z komórkami mięśniowymi. Komórki neuroblastoma przyczepiają się do komórek mięśniowych zakończeniami podobnymi do synaps, które indukują w komórkach mięśniowych lokalne zmiany powierzchni i nagromadzenie się receptorów acetylocholinu. Połączenia te nawet w obecności acetylocholinu i transferazy acetylocholinowej nie wywołują odpowiedzi w komórkach mięśniowych.

Roli połączeń międzykomórkowych w odpowiedzi immunologicznej poświęcony jest rozdział 8 (*Cell communication in the immune response*) G. M. Oliveira-Castro i G. A. Dos Reis'a. Po przedstawieniu obecnych poglądów na pochodzenie i rolę limfocytów T i B, makrofagów, współdziałania limfocyt—makrofag, autorzy omawiają własne badania nad kontaktami między limfocytami. Po stymulacji limfocytów (he-mofitoaglutyniną) tworzą się między nimi złącza szczelinowe, autorzy szeroko dyskutują znaczenie tych połączeń dla powstawania odpowiedzi immunologicznej.

Ostatni rozdział 9 (*Intercellular communication in the early embryo*) napisany został przez R. D. Powers i J. T. Tupper. Omawiane są tu połączenia elektryczne między komórkami we wczesnych etapach rozwoju zarodków ryb kostnoszkieletowych, ptaków, płazów i ssaków. W konkluzji autorzy stwierdzają, że dotychczasowe nasze wiadomości i wyniki badań nie dają jasnego obrazu rozmieszczenia połączeń a zwłaszcza ich funkcji i jak dotąd nie można ich powiązać w logiczny obraz z procesami morfogenetycznymi.

Wszystkie rozdziały są bogato ilustrowane elektronogramami, wykresami, rysunkami i schematami. Na końcu każdego podana jest obszerna bibliografia. We wszystkich artykułach opisano szeroko metody badań złączy szczelinowych, stąd pewne powtórzenia zwłaszcza odnośnie metod elektrofizjologicznych i badań przy pomocy barwników fluorescencyjnych.

Książka w całości jest interesującą pozycją przedstawiającą aktualny stan wiadomości na temat połączeń elektrycznych, skorzystać z niej mogą wiele wszyscy zajmujący się zagadnieniami biologii komórki.

Z. Osuchowska

## Intracellular Protein Catabolism

Red. V. Turek i N. Marks, tom 2, 1977, Plenum Press, New York and London, stron 368, \$ 42.00.

Książka zawiera referaty wygłoszone na II Międzynarodowym Sympozjum „Intracellular Protein Catabolism” 26—30 maja 1975 r. w Lublanie.

Degradacja białka i jej regulacja jest zagadnieniem stosunkowo mało zbadanym i mało znanym w porównaniu z syntezą białka i innymi działaniami biochemii. Mimo, że poszczególne proteazy zostały dość dobrze oczyszczone i zbadano ich działanie na substraty *in vitro*, ciągle bardzo mało wiemy o ich roli w katabolizmie białek w żywym organizmie. To zagadnienie jest w ostatnich latach intensywnie badane, a przedstawiona książka prezentuje obecny stan wiedzy w tej dziedzinie w referatach napisanych przez kilkudziesięciu najlepszych specjalistów.

Mimo, że w pracy badano bardzo różny materiał, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, problemy często pokrywają się, a wnioski wyciągnięte przez różnych autorów są podobne lub uzupełniają się wzajemnie. Tematyka referatów obraca się wokół kilku kluczowych problemów. Podstawowym z nich jest zagadnienie mechanizmu regulacji rozkładu białek i jakkolwiek dalekie jest ono od pełnego wyjaśnienia, to wnioski poszczególnych autorów można następująco uporządkować: 1. Większe znaczenie dla regulacji proteolizy ma podatność białek niż specyficzność proteaz. 2. Okres półtrwania jakiegoś białka *in vivo* daje się najczęściej skorelować z podatnością na proteolizę *in vitro*. 3. Podatniejsze na proteolizę są białka o wielkiej cząsteczce niż o małej i o kwaśnym punkcie izoelektrycznym niż o zasadowym. 4. Zasadnicze znaczenie dla podatności na proteolizę ma stan konformacyjny białka (wynikający z obecności kofaktora, inhibitora, aktywatora, dysocjacji na podjednostki itp). 5. Zwiększa podatność na proteolizę taki stan konformacyjny białka, przy którym następuje odsłonięcie miejsc hydrofobowych, co sprzyja łączeniu się z błonami lizosomów lub samoagregacji (w obu przypadkach degradacja następowałaby w lizosomach); miejsca hydrofobowe mogą być również podatniejsze na bezpośrednie działanie proteaz. 6. Sprzyja proteolizie denaturacja, lub jakkolwiek zmiana struktury, jak skrócenie łańcucha peptydowego albo zamiana aminokwasu na jego analog. W tych przypadkach proteoliza staje się znacznie szybsza i praktycznie niekontrolowana przez komórkę.

Następnym zagadnieniem, którym zajmowało się wielu autorów było miejsce i droga na jakiej białka są degradowane. Coraz większe znaczenie dla katabolizmu białka w stanie fizjologicznym komórki mają — jak się uważa — proteazy pozalizosomalne obecne w cytoplazmie, aktywne w środowisku o pH neutralnym; nie kwestionowana natomiast jest rola lizosomów w procesach patologicznych.

Jednym z procesów niejasnych i kontrowersyjnych, zasygnalizowanym w wielu referatach jest zapotrzebowanie na energię w czasie degradacji białka, przy czym nikt nie znalazł dotąd proteazy związanej z wysokoenergetycznym kofaktorem. W przypadku proteaz lizosomalnych energia jest potrzebna na utrzymanie kwaśnego pH w lizosomach. W niektórych przypadkach stwierdzono współzależność proteolizy od syntezy białka — była to najczęściej proteoliza wywołana jakimiś czynnikami.

Tematem wielu referatów była aktywność proteaz w przebiegu procesów patologicznych, jak np. w mięśniach w czasie ich zaniku, w tkankach nowotworowych; proteoliza w komórkach tkanki łącznej i pozakomórkowa proteoliza kollagenu, a także aktywacja i unieczynnianie biologicznie czynnych peptydów przez proteazy. Wyodrębniono przy tym rolę niektórych proteaz i inhibitorów istotnych w procesach patologicznych. Opisano również nowe nieznanne dotąd enzymy proteolityczne i inhibitory.

Mimo, że niewiele problemów poruszonych w tej książce można uważać za wyjaśnione, a niektóre z nich zostały zaledwie zasygnalizowane, to z uwagi na ważność zagadnień degradacji białek, jak również ze względu na różnorodność organizmów i tkanek na których wykonano prace, książkę tę należy uważać za bardzo potrzebną i można polecić ją każdemu biochemikowi.

A. Jakubiec-Puka

## Chemical Signals in Vertebrates

red. D. Müller-Schwarze i M. M. Mozell 1977, Plenum Press, New York, London, stron X+610, cena 54.00 \$.

W obecnych czasach powstawania nowych, interdyscyplinarnych dziedzin w naukach przyrodniczych, wyrosła nowa specjalność łącząca zainteresowania szczególnie wielu różnorodnych nauk. Jest nią nauka o porozumiewaniu się zwierząt, obejmująca wszakże również bezsłowne porozumienie się ludzi. Część jej problematyki, semiochemia (od gr. *semeion* — znak) zajmuje się badaniem substancji chemicznych niosących komunikaty między organizmami żywymi (Law i Regnier, 1971). W uzupełnieniu tematyki sygnałów mechanicznych i elektromagnetycznych odbieranych dzięki percepcji słuchowej i wzrokowej — dotyczy ona spraw biochemicznego kanału informacji, jak to określają cybernetycy. Te zagadnienia łączą zainteresowania humanistów — psychologów i semiologów — oraz przyrodników. Z tych ostatnich wymienić należy przede wszystkim etologów, zajmujących się biologiczną analizą zachowania się, ekologów, fizjologów i biochemików.

Omawiany tom powstał w rezultacie spotkania 140 specjalistów z różnych dziedzin na sympozjum pt. „Chemiczne sygnały u kręgowców”, które odbyło się w dniach 6—9 czerwca 1976 r. w Saratoga Springs, N. Y., w Stanach Zjednoczonych Ameryki Pn. Było to pierwsze sympozjum o tej tematyce, dotyczące kręgowców, zorganizowane po wielu podobnych, poświęconych zagadnieniu feromonów owadów. Badania tych bezkręgowców poważnie bowiem wyprzedziły pod tym względem prace nad kręgowcami i w końcu 1976 r. w porównaniu z setkami zidentyfikowanych pod względem chemicznym związków czynnych wytwarzanych przez owady, zdołano scharakteryzować tylko sześć feromonów ssaków.

Książka składa się z 32 rozdziałów przedstawionych w ośmiu częściach o następujących tytułach: (I) źródła dla sygnałów chemicznych, (II) chemizm, (III) zachowanie się: przeglądy, (IV) zachowanie się: badania laboratoryjne, (V) ekologia, (VI) test biologiczny, (VII) odbiór sygnałów chemicznych i (VIII) procesy ośrodkowe. Sympozjum — i w efekcie jego materiały naukowe składające się na recenzowany tom — nie ograniczyły się więc do samego uzupełniania luk w znajomości feromonów kręgowców. Około dziesięciu rozdziałów, stanowiących blisko trzecią część książki poświęcono zagadnieniom ogólnym. Także tematyka rozdziałów szczegółowych jest bardzo wszechstronna. Sympozjum stało się bowiem forum dyskusji nad nowo wyłoniłymi problemami, tak ważnymi, jak 1) problem potrzeby rewizji definicji feromonów — a może nawet porzucenia tego terminu z powodu różnic między systemami łączności chemicznej owadów i kręgowców, jak 2) sprawa wpływu uczenia się zwierząt na porozumiewanie się chemiczne, czy 3) rola pokarmu w powstawaniu feromonów. Zwrócono przy tym uwagę na 4) zależność porozumiewania się chemicznego od wielosensorycznego kontekstu, w którym musi się ono odbywać. Starano się wreszcie 5) wyświetlić sprawę feromonów wieloskładnikowych. Są tu więc dwa



rozdziały metodyczne. Jeden jest wprawdzie rozdział o tematyce czysto biochemicznej: „Własności związków używanych jako sygnały chemiczne” (6 stron). Jego elementarny poziom adresuje go przy tym raczej do biologów niż do biochemików. Tych ostatnich mogą jednak bardziej zainteresować inne rozdziały, o mniej ogólnej treści — np. dotyczące złożonego zachowania się ssaków i terenowych testów biochemicznych, o złożoności chemicznego systemu porozumiewania się ssaków, czy rozdział rozpatrujący chemiczne atraktanty z gruczołu napletkowego szczura.

Książka ujmuje problematykę w aspektach ogólnobiologicznych. Oprócz więc sprawy zarówno chemicznych, jak i cybernetycznych mechanizmów łączności chemicznej znajdziemy tu zagadnienie jej wyznaczników ekologicznych, jak i rozważania nad przystosowawczym znaczeniem tej łączności. Pojawia się również podejście ewolucyjne. Wiele miejsca poświęcono omówieniu problematyki łączności chemicznej w odniesieniu do konkretnych sytuacji społecznych, w których zachodzi. Jest zatem mowa o roli feromonów w wyzwaniu i hamowaniu tzw. zachowania się agonistycznego (tj. związanego z walką) w obrębie gatunku. W tym kontekście poruszono oczywiście zagadnienie terytorializmu — wraz z przykładami znakowania granic terytorium śladami chemicznymi. Przy okazji ataku drapieżców na ryby omówiona jest znów sprawa tzw. substancji alarmowych. Szeroko potraktowano rolę woni w indywidualnym rozpoznawaniu się osobników, przy rozpoznawaniu się współplemieńców, a także osobników o określonej randze w hierarchii społecznej. Osobną i szczególnie ważną dziedzinę zagadnień porozumiewania się chemicznego — tak jak u zwierząt z wielu innych grup — stanowi sprawa wzajemnego rozpoznawania się partnerów seksualnych u kręgowców oraz oceny ich stanu fizjologicznego. Jest też rozdział o tematyce stosowanej.

Jak to zwykle bywa z książkami opracowywanymi zespołowo, tę również cechują dobre i złe strony. Jest w dużej mierze sprawą czytelnika, czy w jego odczuciu korzyści kompensują braki. Z jednej strony mamy przecież tu zbiór artykułów omawiających jedne zagadnienia szerzej, podczas gdy inne zostały — czasem dość przypadkowo — zaniedbane lub wręcz pominięte. Z drugiej znów strony taka książka odznacza się korzystną cechą, jaką daje opracowanie przez zespół specjalistów. Jest nią aktualność podanych faktów i interpretacji, dziś napewno nieosiągalna dla jednego autora. Ilustracją dysproporcji rozłożenia akcentów może być choćby to, że przy 21 rozdziałach dotyczących ssaków — szczurowi, chomikowi złocistemu, psu, naczelnym i zwierzętom domowym poświęcono tylko po jednym rozdziale, człowiekowi dwa, gryzoniom trzy; resztę stanowią rozdziały ogólne. Na tym tle gady i płazy mają jeden rozdział, podobnie ryby. Oczywiście w pewnej mierze odzwierciedla to rolę chemicznego porozumiewania się u kręgowców z tych grup, jeszcze bardziej zaś świadczy o stopniu zainteresowania samych badaczy. Ptakom na przykład poświęcono zbyt mało uwagi, bo tylko 29 wierszy tekstu, choć wiadomo, że przedstawiciele tej gromady kręgowców mają dobrze rozwinięty węch. Niemniej jednak cytaty odpowiedzialnych badań, w tym również biochemicznych, dotyczą dziesiątków gatunków zwierząt, a spośród samych ssaków — prócz wymienionych już gatunków — więcej uwagi poświęcono kilkunastu innym (jak śwince morskiej, nornicy, królikowi, dzikowi, jeleniom, reniferowi, owcy, antylopie widłorogiej, manguście, cywecie, kotu, hienom, psu, wilkowi, kojotowi, lisowi, marmozecie, czy rezusowi — że wymienimy te tylko przykłady w celu zorientowania czytelnika). Nierzadko zresztą na kartach tej książki pojawiają się owady — jako element odniesienia dla wielu wywodów. (Czytelnikowi, który poszukiwałby mniej wrywkowo potraktowanego tematu, można by zaproponować sięgnięcie po harmonijnie ujęty wstęp do całości tej problematyki, w postaci książki H. H. Shoreya pt. „Animal Communication by Pheromones”; Academic Press, New York, 1976, str. 167, której recenzja pojawiła się w *Behavioural Processes*, 2, 1977 No. 2, str. 204—205).

Całość książki uzupełnia szczegółowy indeks przedmiotowy i nazw zwierząt w niej omawianych. Nie jest on wprawdzie wolny od przeoczeń. Pod hasłem *Merriones unguiculatus* czytelnik znajduje odsyłacz do mongolskiego gerbila; jednakże tego hasła — z oczekiwanymi stronami, na których jest omawiany — już nie ma. Jedynie na końcu przedmowy możemy znaleźć nazwisko osób odpowiedzialnych za ten stan rzeczy.

J. A. Chmurzyński

## T. D. Luckey, B. Venugopal, *Metal Toxicity in Mammals*

Tom 1 — *Physiologic Basis and chemical Basis for the Metal Toxicity, 1977, Plenum Press, New York, stron 238, cena 33 \$.*

Książka pomyślana została jako wprowadzenie do szczegółowej toksykologii metali, przedstawionej w drugim tomie (*Chemical Toxicity of Metals and Metalloids*), z którym niestety recenzent nie miał możliwości się zapoznać.

Omawiany niżej pierwszy tom jest dziełem stosunkowo związłym obejmującym następujące główne tematy: (1) Wprowadzenie, które oprócz ogólnych zagadnień biologicznych (metale niezbędne i stymulujące, zastosowania farmakologiczne, toksykologia) obejmuje również omówienie technik analitycznych; (2) Wchłanianie (enteralne, inhalacyjne, dermalne) i wprowadzanie do ustroju metali; (3) Detoksykacja, wydalanie i homeostaza; (4) Toksykologiczne znaczenie właściwości fizykochemicznych metali; (5) Karcinogenność i teratogenność; (6) Podsumowanie i przegląd danych o toksyczności metali. Bibliografia obejmuje ponad 400 pozycji.

Nie jest to typowy podręcznik toksykologii metali, który możnaby zalecić jako wprowadzenie dla specjalizujących się w tym zagadnieniu. Specyficzny punkt widzenia autorów na tę dziedzinę wynika z dwóch źródeł: (a) Podręcznik powstał w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Columbia, Missouri i z cytowanych źródeł nie wynika, aby autorzy sami zajmowali się praktycznymi aspektami toksyczności metali u ludzi, (b) Podręcznik powstał z prac prowadzonych dla potrzeb NASA w przewidywaniu użycia metali w wieloskładnikowych odżywkach. Specyficzny kąt widzenia autorów, jak również ich osobiste doświadczenia spowodowały, że rozłożenie akcentów w tej pracy niezbyt dobrze pokrywa się dziedzinami, wzbudzającymi szczególnie duże zainteresowanie toksykologów, zajmujących się praktycznymi aspektami toksykologii metali. Metale, uważane za poważny problem cywilizacyjny z uwagi na skażenie środowiska (ołów, kadm, rtęć) nie zostały w pracy szczególnie wypunktowane: autorzy odsyłają tu Czytelnika do innych wyspecjalizowanych monografii. Tradycyjne problemy toksyczności metali, którym poświęcona jest przeważająca liczba doniesień naukowych, zostały omówione w sposób przeglądowy na 30 stronach rozdziału VI. Tyleż miejsca zajmuje rozdział V, poświęcony karcinogennym i teratogennym właściwościom metali, które z natury rzeczy w praktycznej toksykologii metali odgrywają nieporównanie mniejszą rolę. Pewne zaskoczenie wzbudza fakt, że można było napisać książkę o toksyczności metali, nie powołując się w ogóle na prace specjalistów tej miary co Teisinger, Kehoe, Zielhuis, Chisolm (ołów), Friberg, Nordberg, Parizek (kadm), Goldwater, Clarkson (rtęć), Evans, Porter (miedź), Vallee, Kagi (metalotioneina) itd.

Z uwagi na specyficzny punkt widzenia autorów na toksykologię metali książka ta może być wartościowa przede wszystkim dla specjalistów, którzy znajdą w niej uzupełniające informacje do już ugruntowanego sposobu patrzenia na tę dziedzinę.

Szczególnie dobrze są w książce opracowane zagadnienia, leżące w profilu osobistych zainteresowań autorów, dotyczące dróg wchłaniania metali, a szczególnie drogi jelitowej. Zagadnienia detoksykacji potraktowano bardzo ogólnikowo, bez cytowania źródeł — i niezbyt ściśle (dla przykładu, zdolność indukcji metalotioneiny przypisano również ołowiowi; proces indukcji tego białka przez rtęć zlokalizowano w wątrobie, zamiast w nerce). Interesująca jest próba powiązania właściwości biologicznych metali z ich budową elektronową i lokalizacją w układzie okresowym, a także ich zdolnością do tworzenia kompleksów. Mniej udana natomiast wydaje mi się próba przełożenia tych teoretycznych przesłanek na język biologiczny (interakcje metal—białko i metal—kwasy nukleinowe). Pod tymi hasłami znajdzie Czytelnik głównie informacje uzyskane *in vitro*, które w toksykologii są rozpatrywane jako podłoże reakcji możliwych, jednakże nie zawsze sprawdzających się w badaniach *in vivo*. Ta rozbieżność punktów widzenia jest o tyle istotna, że w ostatnich latach nagromadziło się już nieco informacji o interakcjach metali z makrocząsteczkami układów biologicznych *in vivo*.

Interesująco przedstawiono w pracy ogólny pogląd na właściwości karcinogenne i teratogenne metali. Odpowiednio spreparowane tabele układu okresowego ułatwiają szyką orientację w możliwej roli różnych metali w odniesieniu do powyższych efektów. Na uwagę zasługuje też silnie w pracy eksponowany względny charakter pojęć „pierwiastków niezbędnych” i „pierwiastków toksycznych”. W przekonywujący sposób przedstawiono pogląd, zgodnie z którym zarówno niedobór jak i nadmiar określonych pierwiastków może wywoływać ujemne skutki biologiczne.

Na uwagę zasługuje przedstawiona w tej pracy po raz pierwszy propozycja przyjęcia jednostek toksyczności wprost proporcjonalnych do siły toksycznego działania związku (stosowany dotychczas system dawek, np.  $DL_{50}$ , względnie stężeń toksycznych jest skorelowany z siłą toksycznego działania w sposób odwrotnie proporcjonalny). Autorzy proponują układ analogiczny do jednostek pH: przyjmując za T toksyczność ostrą wyrażoną w molach/kg, wykładnikiem siły toksycznego działania ma być:  $pT = -\log T$ . W tym układzie toksyczność wyraża się wartościami pT od ponad 1 (dla NaCl) do ponad 15 (botulinol D).

J. K. Piotrowski

## George R. Pettit, *Biosynthetic Products for Cancer Chemotherapy*,

tom 1, 1977, Plenum Press, New York, London, stron XII+215, cena 23,40 \$.

Według słów własnych autora zadaniem książki jest możliwie wszechstronne przedstawienie zagadnień związanych z problemem raka i zastosowaniem związków naturalnych w chemoterapii nowotworów. Autor ufa, że książka pozwoli chemikom i biologom docenić możliwość leczenia raka, lekarzom zaś powie jakie drogi myślowe i doświadczalne prowadzą do odkrywania coraz to nowych naturalnych substancji o działaniu przeciwnowotworowym. Całość składać się ma z dwu tomów, z których pierwszy wprowadza czytelnika w sposób równie syntetyczny, jak uproszczony w podstawy wiedzy o biologii nowotworów, o chorobach nowotworowych i ich terapii (o czym niżej); tom drugi zaś ma przynieść tabelaryczne zebranie wszystkich znanych (do kwietnia 1976 roku) substancji naturalnych o działaniu przeciwnowotworowym i cytostatycznym. Autor wyraża nadzieję, że wysiłek zebrania danych o chemii i biologii naturalnych czynników przeciwnowotworowych okaże się poży-

teczny dla przedstawicieli wielu dyscyplin i wspomóże postęp w znajdowaniu dalszych bardziej skutecznych chemioterapeutyków.

Trudno jednak podzielać optymizm autora nie znając drugiego tomu książki. Wystarczy bowiem przejrzeć spis rozdziałów tomu pierwszego oraz niezbyt bogatą jego treść by pogłębiło się wrażenie nadmiernej skłonności autora do upraszczania zagadnień. Widać to już z tytułu książki „Biosyntetyczne produkty dla chemioterapii”, potwierdza zaś proste wyliczenie: spośród 215 numerowanych stron tomu: 92 stanowi treść, 6 stron tabele, 81 stron wzory 155 omawianych związków, 15 stron piśmiennictwo (444 pozycje), 13 stron indeks rzeczowy a 8 stron gubi się w tak zwanych „wakatach”.

Bardzo estetyczne wydanie książki, piękny papier, duża czcionka o ładnym kroju i duża czytelność wzorów podnoszą wartość dydaktyczną książki. Zbyt ogólnikowa dla naukowców, może przydać się niespecjalistom do wstępnej orientacji w dziedzinie chemoterapii nowotworów a, być może, przyda się również studentom medycyny i młodym lekarzom jako kompendium pomocne przed egzaminem z tego przedmiotu.

Z. Zielińska

## Marine Natural Products Chemistry,

z serii Marine Sciences, 1977, Plenum Press, New York, stron 433, cena 51 \$.

Nakładem Plenum Press (N. York, London) w serii NATO IV „Marine Science” ukazała się książka pt. „Marine Natural Products Chemistry” — Chemia produktów naturalnych pochodzenia morskiego.

Książka jest zbiorem referatów prezentowanych na konferencji pt. „Produkty naturalne pochodzenia morskiego” organizowanej przez NATO w październiku 1976 r. w Jersey w W. Brytanii. Całość książki obejmuje 34 referaty.

Są to zarówno referaty przedstawiające wyniki prac o charakterze podstawowym jak i referaty dające przegląd ważniejszych zagadnień. Intencją sympozjum było stworzenie platformy do dialogu pomiędzy chemikami organiczami, którzy studiują związki powstające podczas przemian metabolicznych organizmów morskich a biologami, ekologami i farmakologami, którzy badają wpływ tych związków na organizmy.

Kolejność referatów zamieszczonych w książce pozwala na podzielenie ich na następujące grupy: terpenoidy i steroidy niektórych organizmów morskich (koralowce, mięczaki, gąbki), sterole pochodzenia morskiego i ich metabolizm, chemia alg i innych wodorostów morskich, związki toksyczne niektórych organizmów morskich, chemia innych morskich produktów naturalnych i ich zastosowanie.

Na uwagę w grupie referatów dotyczących terpenoidów i steroidów zasługuje praca G. Cimino pt. „Przegląd seskwiterpenoidów gąbek morskich”, w organizmach tych bowiem występuje największa różnorodność seskwiterpenoidów w świecie zwierzęcym. Ogółem do chwili obecnej z gąbek morskich wyizolowano i zidentyfikowano prawie 50 seskwiterpenoidów. Autor dokonuje przeglądu tych związków dzieląc je na trzy grupy: seskwiterpenoidy furanowe, hydrochinonowe i izonitrylowe. Rola i znaczenie seskwiterpenoidów w metabolizmie gąbek nie są jednak jeszcze poznane.

Sterole i ich metabolizm w organizmach morskich są przedmiotem badań wielu naukowców. Wiedza o tych związkach i ich przemianach wzrosła bardzo w ostatnich latach niemniej jednak biosynteza steroli w organizmach morskich jest nadal nie w pełni wyjaśniona. Dotyczy to również tzw. steroli niekonwencjonalnych C<sub>26</sub>, C<sub>30</sub> oraz C<sub>27</sub> i C<sub>29</sub> z łańcuchami bocznymi. Budowie tych związków, ich pochodnym, iden-

tyfikacji oraz występowaniu, poświęcony jest artykuł L. Minale i G. Sodano pt. „Niekonwencjonalne sterole pochodzenia morskiego”.

Sporą liczbę prac poświęcono algom i innym wodorostom morskim. Przeprowadzone badania dotyczyły barwników, związków frakcji lipidowej (bromosferol), aminokwasów, syntezy mono i dwuterpenów, fenoli i innych. Omówiono struktury wielu związków, ich identyfikację przemiany oraz systematykę (karotenoidy).

Masowy rozwój niektórych toksycznych organizmów planktonowych w rejonie północnego Atlantyku i Pacyfiku — stanowiący istotny problem ekonomiczny i zdrowotny — spowodował, że szereg referatów poświęcono produkowanym głównie przez wiciowce niektórych rodzajów biotoksynom, ich izolacji i charakterystyce, oraz związkom biologicznie czynnym występującym w gąbkach i wodorostach morskich. Autorzy referatów zwracają uwagę na trudności metodyczne bowiem badane biotoksyny stanowią najczęściej mieszaninę kilku związków chemicznych.

Ekstrakty wodorostów morskich znajdują praktyczne zastosowanie w rolnictwie i ogrodnictwie powodując między innymi zwiększenie odporności roślin na niskie temperatury, grzybice oraz zmniejszenie strat podczas składowania owoców. E. Blumden oraz K. Brain i inni próbują wyjaśnić niektóre przyczyny tego zjawiska.

Z innych referatów na uwagę zasługują również prace J. P. Ferezon i innych dotyczące lipidów biologicznie aktywnych, P. M. Bebbingtona, E. Morgana i C. Poola: „Wykrycie i identyfikacja hormonu powodującego linienie pąkli czy też, M. Auberta i innych o współzależnościach bakterii i fitoplanktonu w środowisku morskim.

Książka „Marine Natural products chemistry” jest starannie i przejrzysto wydana. Rysunki, wykresy i schematy zamieszczone w tekście są czytelne i w niezbędnej ilości. Cytowana literatura obejmuje przede wszystkim najnowsze pozycje z lat siedemdziesiątych i stanowić może pomoc w rozszerzeniu wiedzy o omawianych zagadnieniach.

Istotnym mankamentem omawianej książki jest brak materiałów z przebiegu dyskusji jaka niewątpliwie toczyła się w czasie sympozjum. Znajomość jej pozwoliłaby na konfrontację niektórych wyników oraz poznanie kierunków prac badawczych prowadzonych w różnych ośrodkach.

W sumie jednak książka „Chemia produktów naturalnych pochodzenia morskiego” stanowi cenne i bogate źródło wiedzy o wielu związkach chemicznych występujących w postaci metabolitów niższych organizmów morskich.

*Z. Karnicki*

### **„Encyklopedia of the Alkaloids”. Vol. 3, 1977, Plenum Press**

§ 59.40.

Tom III serii monograficznej „Encyklopedia of the Alkaloids” jest kontynuacją książki, która ma informować zainteresowanych związkami naturalnymi lekarzy, biologów, chemików i in. o aktualnie wyodrębnionych alkaloidach oraz o nowych wynikach badań dotyczących już wcześniej poznanych związków z tej grupy.

Jak zaznacza sam autor, alkaloidy są jedną z bardzo ważnych grup związków naturalnych nie tylko ze względu na ich złożone struktury, ale także ze względu na ich działanie fizjologiczne i duże zastosowanie w medycynie. Informacja o tych związkach jest rozrzucona w bardzo wielu różnych czasopismach i dlatego autor podjął się zebrania i opublikowania tych związków w postaci encyklopedii.

Książka omawia alkaloidy (około 3000) uszeregowane w porządku alfabetycznym. Dwa pierwsze tomy I (A—H), Tom II (J—Z) podają alkaloidy poznane do roku 1975.

Tom III zawiera opisy alkaloidów wyodrębnionych i opublikowanych do końca 1976 roku oraz indeks wzorów sumarycznych. W tomie tym znajdują się także opisy

alkaloidów wcześniej wyodrębnionych, które nie znalazły się w tomie I i II. Alkaloidy mają podane: wzór sumaryczny, wzór strukturalny, roślinę z której został wyodrębniony i krótko opisane właściwości fizyczne i chemiczne; nieraz podana jest metoda wyodrębniania czy rozdzielania.

Patrząc na recenzowaną encyklopedię oczami osoby bezpośrednio zainteresowanej tą grupą związków odczuwa się pewien niedosyt danych a także pomyłki w nazwach lub podawanie nieprawidłowych wzorów alkaloidów np. wzór tiobinufarydyny. Odnośniki do literatury nie zawsze oddają właściwy stan rzeczy np. alkaloidy Nuphar str. 158 T. III (—) deoxynufarydyna — podany jest odnośnik do jednej z ostatnich prac, ale brak odnośnika do prac wcześniejszych np. japońskich. Brak skorowidzu roślin utrudnia szukanie alkaloidów występujących w tej samej roślinie szczególnie dla biologów i farmakologów.

Ogólnie jednak ze względu na to, że książka zawiera usystematyzowany ogromny materiał dotyczący alkaloidów, „Encyclopedia of the Alkaloids” jest bardzo przydatną pozycją literaturową i na pewno będzie pożyteczna dla biologów, chemików, medyków i farmaceutów.

*J. T. Wróbel*

### **Immunology for the Practicing Physicians**

red. **J. R. Schmidtke, R. M. Ferguson, 1977, Plenum Press, New York, stron 160, cena 23,40 \$.**

Książka stanowi zwięzłe przedstawienie obecnej wiedzy na temat podstawowych zagadnień immunologii i immunopatologii zarówno dla lekarza klinicysty, jak i specjalisty z zakresu diagnostyki laboratoryjnej.

Poszczególne rozdziały zostały napisane przez badaczy tej miary co Unanue (Rozpoznanie antygeny przez limfocyty), Katz (Kontrola genetyczna odpowiedzi immunologicznej), Gershon i Metzler (Regulacja immunologiczna przez komórki T), Cochrane (Choroba kompleksów immunologicznych) oraz Dixon (Rola przewlekłego zakażenia wirusowego w chorobach immunologicznych). Poza tym omówiono w opracowaniu takie zagadnienia jak: współczesne koncepcje immunologii, immunologie transplantacyjną, immunologię nowotworową i immunoterapię, niedobory immunologiczne a nowotwory, oraz nadzór immunologiczny nad nowotworem.

Książka zawiera szereg interesujących zestawień i schematów, jest napisana bardzo przejrzyście i przystępnie. Dostarcza nowoczesnych informacji na temat podstawowych zjawisk immunologicznych z jakimi można się zetknąć w praktyce klinicznej.

Opracowanie umożliwi lekarzowi i biochemikowi zaznajomienie się ze złożoną nomenklaturą przedmiotu i lepsze śledzenie coraz bardziej skomplikowanych artykułów, jakie pojawiają się w literaturze na ten temat.

*K. Madaliński*

### **The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood,**

red. **F. A. Loewus i V. C. Runeckles 11 tom wydawnictwa „Recent Advances in Phytochemistry”, 1977, Plenum Press, New York, London, stron 527, cena 59,40 \$.**

Wydany pod redakcją F. A. Loewusa i V. C. Runecklesa jedenasty tom z serii „Recent advances in phytochemistry” oparty jest na materiałach XVI Zjazdu Towarzystwa Fitochemicznego Ameryki Północnej, który odbył się w sierpniu 1976 r.

Materiały w wersji książkowej ujęto w 11 rozdziałów, stanowiących odrębne opracowania monograficzne, przygotowane przez kompetentnych specjalistów, reprezentujących znane placówki naukowe z Australii, Japonii, Kanady, RFN i USA.

Forma opracowań jest zwięzła i komunikatywna, bogato ilustrowana wykresami i fotografiami zaczerpniętymi z reprezentatywnego w danej dziedzinie piśmiennictwa światowego. Przeważają źródła amerykańskie i japońskie, mniej liczne są pozycje europejskie, między innymi uwzględniono w niektórych rozdziałach także dorobek pracowni polskich.

Na początku każdego rozdziału umieszczone są główne tezy, rozwinięte następnie w jego treści. Na zakończenie rozdziału autor daje krytyczną konkluzję, zawierającą obiektywne podsumowanie i ocenę aktualnego stanu wiedzy w omawianej dziedzinie. Po każdym rozdziale oddzielny spis literatury obejmujący 50—300 pozycji.

Rozdział I poświęcony jest omówieniu ultrastruktury drewna w powiązaniu z dystrybucją głównych jego składników chemicznych. Kilkadziesiąt doskonałych mikrofotografii, wykonanych przy użyciu nowoczesnych technik mikroskopii elektronicznej ułatwia czytelnikowi zorientowanie się we współczesnych, często dyskusyjnych poglądach na temat submikroskopowej budowy drewna.

Autorzy następnych rozdziałów omawiają struktury molekularne oraz procesy biosyntezy głównych składników chemicznych występujących w drewnie, tj. polisacharydów, glikoproteidów, ligniny i lipidów.

Szczególnie interesujące i obszerne są rozdziały poświęcone biosyntezie ligniny oraz polimerów lipidowych typu kutyny i suberyny. Uwzględniono tu wyniki nowszych prac, które rzuciły ostatnio nowe światło na enzymologię procesów biosyntezy tych polimerów.

Drugą część książki stanowią rozdziały poświęcone wtórnym przemianom drewna. W rozdziale VII omówiono chemiczne i morfologiczne podłoża zmian zachodzących w drewnie podczas ontogenetycznego rozwoju drzewa. Rozdział ten zainteresuje zarówno chemików jak i technologów zajmujących się drewnem jako surowcem. Podobny charakter posiada rozdział XI, poświęcony chemii i technologii produktów drewnopochodnych.

Odrębny charakter posiadają rozdziały VIII i IX, których tematem są procesy biodegradacji głównego składnika polisacharydowego (celuloza) oraz polifenolowego (lignina) drewna pod wpływem mikroorganizmów.

Rozdział X przedstawia naturalne mechanizmy obronne, uruchamiane przez rośliny w odpowiedzi na atak patogennych czynników z zewnątrz, np. owadów.

Na wyróżnienie zasługują rozdziały omawiające procesy biodegradacyjne, w których znajdzie czytelnik szersze tło ogólnoenzymologiczne jednego z ciekawszych problemów współczesnej biochemii a mianowicie kwestię mechanizmu oddziaływania enzymów na makromolekuły substratów nierozpuszczalnych w wodzie. Główne zagadnienia w zakresie biodegradacji drewna relacjonują wybitni znawcy w tej dziedzinie a mianowicie E. T. Reese (celuloliza) oraz T. K. Kirk (biodegradacja i utylizacja ligniny). Oryginalne, syntetyczne ujęcie biochemicznych i mikrobiologicznych aspektów biodegradacji tych polimerów roślinnych nadaje tym rozdziałom walory cennej monografii.

Książkę polecić można wszystkim, których interesują postępy wiedzy w zakresie substruktury drewna oraz właściwości chemicznych i przemian biochemicznych jego głównych składników.

*J. Trojanowski*

## Mass Spectrometry in Drug Metabolism

red. A. Frigerio i E. A. Ghisalberti, 1977, Plenum Press, New York, stron 237, cena 51 \$.

Monografia „Spektrometria masowa w metabolizmie leków” stanowi zbiór wybranych prac, prezentowanych na Międzynarodowym Sympozjum w roku 1976 w Mediolanie, poświęconym zastosowaniu spektrometrii masowej w badaniach metabolizmu leków.

Prace mają charakter oryginalnych komunikatów naukowych lub referatów pogładowych, obejmujących wybrane zagadnienia z dziedziny metabolizmu leków różnych grup, diagnostyki leków (ustalenie rodzaju leku w wypadkach przedawkowania, wykrywanie narkotyków, identyfikacja leków i ich metabolitów, pochodzących z odchodów ludzkich w ściekach, identyfikacja pestycydów w krwi itp.) oraz zastosowania nowych technik w spektrometrii masowej (CIMS, GC—CIMS, HPLC—CIMS, GC—MS—SIM, HPLC—MS—SIM, FDMS, zastosowanie komputerów itp.) dla badań biochemicznych.

Przegląd referowanych prac prowadzi do wniosku, że spektrometria masowa w badaniach metabolizmu leków osiągnęła rangę metody unikalnej. Powody są następujące: metabolity leków są niezwykle reaktywne, występują w bardzo małych ilościach i różnią się między sobą zwykle jakąś jedną grupą chemiczną; klasyczna analiza jest w tych warunkach niezwykle trudna, często wręcz niemożliwa. Spektrometria masowa stwarza możliwość ustalania struktur chemicznych w mieszaninach, określania ilościowego składu związków, a w kosekwencji stanowi znakomitą technikę badania zarówno dróg detoksykacji metabolitów leków, jak i dróg, prowadzących do metabolicznej aktywacji leków macierzystych poprzez chemicznie reaktywne, hepatoksyczne związki przejściowe. Przykładem mogą służyć badania metabolizmu leku pyrazofuryny u pacjentów chorych na raka, które pozwoliły na określenie właściwej dozy leku — pierwszy zanotowany sukces w tej dziedzinie. Równie ważne są unikalne badania techniką MS—izotopy metabolizujących gwałtownie substancji endogennych: aminokwasów, cukrów, tłuszczu u ludzi zdrowych i chorych. Metoda ma znaczenie diagnostyczne w klinicznej gastroenterologii i pozwala ustalić aspekty patogenetyczne oraz rezultat działania określonych leków. Uderzający w referowanych pracach jest postęp w udoskonalaniu techniki i metod badawczych przy stosowaniu spektrometrii masowej. Dość wspomnieć GL—CIMS (*chemical ionization mass spectrometry*). Zastosowanie jonizacji chemicznej daje stosunkowo proste spektry masowe, co idealnie rozwiązuje problem analizy mieszanin (wykorzystano m.in. do analizy metabolizmu antybiotyków makrolidowych). Ogromne możliwości przy zastosowaniu CIMS daje selektywne stosowanie różnych gazów nośnych do jonizacji, różniących się powinowactwem protonowym (aktywnością Broensteda) w stosunku do badanych substancji. Stwarza to m.in. możliwość wykrywania specyficznych grup zasadowych w cząsteczkach o nieznannej strukturze (np. amoniak, protonując selektywnie aminy tworzy produkty addycji  $M+NHR$  z aldehydami, ketonami, estrami; tlenek azotu stosuje się dla rozróżnienia alkoholi I, II i III-rzędowych itd.). Ponieważ GC może spowodować degradację niektórych nietrwałych metabolitów, idealną technikę stanowi połączenie HPLC (*high pressure liquid chromatography*) i CIMS.

Zwraca uwagę stosowanie nowych reagentów w technice MS. Stwierdzono np., że etery boranowe, zabezpieczające grupy fenolowe, są bardziej selektywne niż etery silylowe i wykazują specyficzne własności w MS, użyteczne w badaniach materiałów biologicznych. Analizę tego typu materiałów prowadzi się zwykle techniką GC—FID (*flame ionization detection*) lub MF (*mass fragmentation*).

Wartość metody MS podnosi wzbogacenie jej techniką komputerową.

Omówienie wszystkich, zawartych w monografii zagadnień, wykracza poza ra-



my recenzji. Niezbędne jest podkreślenie, że książka stanowi znakomite źródło informacji o metabolizmie leków należących do różnych grup, uzyskanych metodami spektrometrii masowej. MS jest przy tym najbardziej uniwersalną metodą, odznaczającą się wysoką czułością i selektywnością. Imponujący rozwój nowych technik MS stosowanych w badaniach biologicznych został omówiony w sposób krytyczny. Referowane prace mają charakter naukowy. Nowe techniki (CIMS, SIM) w wielu przypadkach stosowano wyłącznie do badań substancji modelowych. Wykorzystanie ich w praktyce wymaga dalszych badań, które pozwolą zweryfikować ich rzeczywiste znaczenie.

Monografia uwzględni również negatywne wyniki badawcze i wskazuje na sposoby pokonania trudności, np. poprzez stosowanie specjalnych technik.

Monografia efektywnie integruje literaturę, obejmującą metody i techniki badawcze MS w badaniach strukturalnych związków biologicznie czynnych, prowadzonych przez biochemików, chemików organicznych i medycznych pracowników naukowo-badawczych. Cytowana literatura stanowi pełne, najświeższe źródło wiedzy z tej dziedziny. Monografia jest szczególnie cenna dla wszystkich badaczy, interesujących się biochemią, farmakologią, toksykologią oraz analizą strukturalną i metodami fizyko-chemicznymi.

A. Banaszek

## **P. Singh, Artificial Diets for Insects, Nites and Spiders**

1977, Plenum Press, New York, Washington, London, 594 strony, cena 90.00 \$.

Ekonomiczne, zarówno pożyteczne jak i negatywne znaczenie owadów i pajęczaków powoduje, że są one przedmiotem badań wielu laboratoriów biochemicznych, morfologicznych, fizjologicznych i genetycznych. Wzmoczone zainteresowanie badaczy powoduje potrzebę nowoczesnych hodowli laboratoryjnych owadów i pajęczaków. Do niedawna poważnym czynnikiem utrudniającym używanie ich w pracach badawczych była konieczność stosowania w ich hodowli pokarmu naturalnego. W ostatnim dwudziestolecu dzięki coraz powszechniejszemu stosowaniu diet sztucznych wspomniane trudności zostały w znacznym stopniu zredukowane. Stosowanie sztucznych diet jest na ogół korzystniejsze w hodowli owadów i pajęczaków niż stosowanie ich naturalnego pożywienia. Hodowle są tańsze i łatwiejsze do prowadzenia szczególnie w hodowlach masowych; możliwe jest prowadzenie hodowli aksenicznych, na ściśle określonej diecie; możliwa jest również hodowla owadów i pajęczaków naturalnie w danym kraju nie występujących.

Entomolodzy i pracownicy naukowcy, dla których materiałem badawczym są zwierzęta należące do wymienionych gromad, otrzymali unikalną pozycję bibliograficzną. Jest nią omawiana książka. Opracowanie obejmuje przepisy przygotowania z powszechnie dostępnych produktów żywnościowych, witamin i soli nieorganicznych sztucznych lub półsztucznych diet dla owadów przeszło 720 gatunków i pajęczaków prawie 30 gatunków, przy czym podano również przepisy przygotowania kilku alternatywnych diet. Cenną zaletą opracowania jest podanie warunków prowadzenia hodowli przy stosowaniu odpowiedniej diety oraz opisanie przebiegu cyklu życiowego zwierząt hodowanych na danej diecie. Bogata bibliografia umożliwi zainteresowanemu czytelnikowi dotarcie do oryginalnych prac stanowiących podstawę omawianego opracowania.

A. B. Dutkowski

## SPIS TREŚCI

M. M. Jeleńska — Glikozylacja kolagenu . . . . .	291
A. Gardas — Sfingoglikolipidy błony komórkowej . . . . .	309
K. Bytniewska — Karboksylaza/oksygenaza rybulozodwufosforanu . . . . .	333
G. Muszyńska — Modyfikacje cząsteczek białkowych jako narzędzie w badaniu struktury i funkcji białek . . . . .	347
J. Twardowski — Badania białek metodami spektroskopii ramanowskiej i absorpcyjnej w zakresie podczerwieni . . . . .	373
Sprawozdanie — II Szkoła Biologii Molekularnej, NRD, 26—30 listopada 1977 (K. Taylor) . . . . .	395
Recenzje . . . . .	397
Komunikat . . . . .	308

## POSTĘPY BIOCHEMII

September 1978

### ARTICLES IN POLISH

Volume 24

Number 3

M. M. Jeleńska — Glycosylation of Collagen (Inst. Nuclear Res., Dept. Radiobiol. and Health Protection, Warszawa) . . . . .	291
A. Gardas — Sphingoglycolipids of Cell Membrane (Dept. Biochem., Med. Center of Postgraduate Education, Warszawa) . . . . .	309
K. Bytniewska — Ribulose-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Dept. Plant Physiol., Inst. Physiol. and Cytobiol. University of Łódź, Łódź) . . . . .	333
G. Muszyńska — Modification in Protein Molecules as a Tool for Examination of the Structure and Function of Proteins (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	347
J. Twardowski — The Protein Studing by Raman and Infrared Spectroscopy (Inst. Zool., Jagiellonian University, Kraków) . . . . .	373
Meeting Report . . . . .	395
Book reviews . . . . .	397
Communication . . . . .	308

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

**Piśmiennictwo:** w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje 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 autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, 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*, redd. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58; Academic Press, London

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

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk winny jasno opisywać ich treść zaznaczając, 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: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny 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.

Ze względu na wewnętrzną spoistość artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonych do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

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

## SPIS TREŚCI

M. M. Jeleńska — Glikozylacja kolagenu	291
A. Gardas — Sfingoglikolipidy błony komórkowej	309
K. Bytniewska — Karboksylaza/oksygenaza rybulozodwufosforanu	333
G. Muszyńska — Modyfikacje cząsteczek białkowych jako narzędzie w badaniu struktury i funkcji białek	347
J. Twardowski — Badania białek metodami spektroskopii ramanowskiej i absorpcyjnej w zakresie podczerwieni	373
Sprawozdanie — II Szkoła Biologii Molekularnej, NRD, 26—30 listopada 1977 (K. Taylor)	395
Recenzje	397
Komunikat	308