

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 26(1)
(1-136) (1980)

1980

tom 26 nr 1
PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu jedynie piśmiennictwo z ostatniego roku lub dwu lat. Kwartalnik publikuje także krótkie noty informujące o nowych i ważniejszych osiągnięciach biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych 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 zgłosić 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 okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, 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 ółówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ółówkiem 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.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1980 TOM 26 ZESZYT 1

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 26(1)
1-136 (1980)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Zastępca: W. Ardelt (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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1979

Nakład 2.330

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

Pap. druk. sat. kl. IV, 70 g, 70×100

Zam. nr 1480/79

Oddano do składania 1.XII.79

Podpisano do druku w maju 1980 r.

Druk ukończono w maju 1980 r.

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

MARIA KOPEĆ *)

Białka krzepnięcia krwi „zależne od witaminy K”

Vitamin K dependent blood clotting proteins

Spis treści

- I. Układ krzepnięcia krwi**
- II. Czynniki krzepnięcia zależne od witaminy K**
 - II-1. Protrombina**
 - II-2. Anomalia protrombiny w niedoborze witaminy K**
 - II-3. Posttranslacyjna karboksylacja kwasu glutaminowego**
 - II-4. Rola witaminy K**
 - II-5. Trombina**
 - II-6. Inne czynniki krzepnięcia zależne od witaminy K**
 - II-7. Aktywacja czynników „zależnych od witaminy K” na powierzchni fosfolipidów — znaczenie fizjopatologiczne**
- III. Białka C i S**
- IV. Białka „zależne od witaminy K” kości i innych tkanek**

Contents

- I. Blood coagulation system**
- II. Vitamin K dependent coagulation factors**
 - II-1. Prothrombin**
 - II-2. Anomaly of prothrombin in vitamin K deficiency**
 - II-3. Posttranslational carboxylation of glutamic acid**
 - II-4. Role of vitamin K**
 - II-5. Thrombin**
 - II-6. Other vitamin K dependent coagulation factors**
 - II-7. Activation of vitamin K dependent factors on phospholipid surface — physiological significance**
- III. Proteins C and S**
- IV. Vitamin K dependent proteins of bones and other tissues**

*) Prof. dr med., Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa.

I. Układ krzepnięcia krwi

Badania nad krzepnięciem krwi przez wiele lat uchodziły i nadal w przekonaniu wielu biochemików uchodzą za dziedzinę szczególną i uprawianą przez zamknięty krąg specjalistów. Główną metodą stosowaną było oznaczenie czasu krzepnięcia samego osocza ludzi chorych lub w mieszaninach z osoczem zdrowych, surowicą i różnymi ich frakcjami, z jadami żmij oraz z lipidami i lipoproteinami z różnych źródeł. W 1964 r. Międzynarodowy Komitet Czynników Krzepnięcia Krwi uznał, że istnieją przekonujące dowody na istnienie czynników krzepnięcia zestawionych w Tabeli 1.

Tabela 1

Nomenklatura czynników krzepnięcia krwi

Symbol	Nazwa potoczna
Czynnik I	Fibrynogen
Czynnik II	Protrombina
Czynnik III	Tromboplastyna tkankowa
Czynnik IV	Jony wapnia
Czynnik V	Proakceleryna
Czynnik VII	Prokonwertyna
Czynnik VIII	Czynnik antyhemofilowy
Czynnik IX	Czynnik Christmasy
Czynnik X	Czynnik Stuarta
Czynnik XI	Plasma <i>thromboplastin antecedent</i> (PTA)
Czynnik XII	Czynnik Hagemana
Czynnik XIII	Czynnik stabilizujący fibrynę, transglutaminaza osoczowa

Białka uczestniczące w krzepnięciu lecz nie włączone formalnie do listy czynników krzepnięcia:

Kalikreinogen — czynnik Fletchera

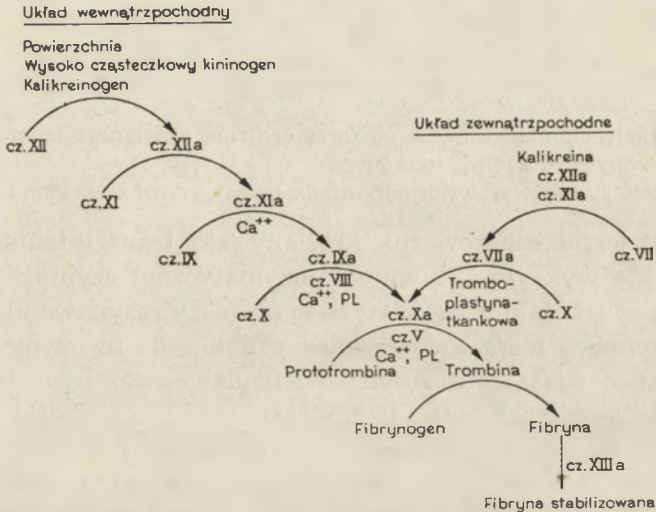
Wielkocząsteczkowy kininogen osoczowy — czynnik Fitzgeralda, Williamsa, Flaujac

Do tego czasu jednak bardzo nieliczne czynniki krzepnięcia wyizolowano w stanie wysokiego oczyszczenia i scharakteryzowano. Dowodem koronnym odrębności poszczególnych czynników krzepnięcia osoczowego były wrodzone, dziedzicznie przekazywane ich niedobory. Do listy tej nie dopisano żadnego dalszego czynnika choć wykryto, że co najmniej dwa inne białka osocza są niezbędne dla szybkiej i wydajnej aktywacji czynnika Hagemana, która jest mechanizmem zapłonowym łańcuchowej reakcji krzepnięcia bez udziału czynnika tkankowego czyli w tzw. układzie wewnątrzpochodnym.

Białka te okazały się identyczne z kalikreinogenem i wysokocząsteczkowym kininogenem a więc składnikami osoczowego układu kininotwór-

czego. Postęp w tym zakresie omówiono w pracach przeglądowych ogłoszonych niedawno w krajowych czasopismach (1, 2).

W ostatnich latach poznano strukturę i funkcję większości czynników krzepnięcia. Badania nad układem krzepnięcia krwi przeszły z poziomu śledzenia zjawisk w układach nieoczyszczonych na poziom molekularny.



Schemat 1. Krzepnięcie krwi w układzie wewnątrz i zewnątrzpochodnym

Pierwszą reakcją scharakteryzowaną w tych kategoriach było wykrzepianie fibrynogenu przez trombinę. Od K o w a r z y k a (3), B e i l l e y a i w s p. (4) oraz L o r a n d a (5) pochodzą najwcześniejsze dowody, że jest to reakcja ograniczonej proteolizy, która polega na odszczepieniu od dimerycznej cząsteczki fibrynogenu składającej się z 3 par łańcuchów ($A\alpha_2$, $B\beta_2$, γ_2) 2 par drobnych peptydów nazwanych fibrynopeptydami A i B. Zbadano kinetykę tej reakcji i ustalono strukturę pierwszorzędową peptydów odszczepianych od fibrynogenu wielu odległych od siebie gatunków. Wykazano dużą zmienność ewolucyjną większości sekwencji z wyjątkiem niektórych reszt warunkujących specyficzność dla działania trombiny (6, 7).

Stwierdzono, że trombina jest proteazą serynową przyłączającą dwuizopropylodifluorofosforan do swego centrum aktywnego. Wykazuje ona dużą homologię sekwencji w obszarze centrum aktywnego wobec innych proteaz serynowych nie tylko ssaków, lecz również tak odległych gatunkowo, jak np. kokonaza *Anthaera polyphemus* lub trypsyny rozgwiazd i krewetek (8).

Z biegiem czasu wykryto, że większość osoczowych czynników krzepnięcia jest zymogenami, które ulegają kolejno przekształceniu w aktywne proteazy serynowe na drodze ograniczonej proteolizy. Enzymem o innej naturze jest tylko czynnik XIII tzw. czynnik stabilizujący fibrynę. Katalizując przeniesienie grupy γ -aminowej glutaminy w pozycję ϵ -aminowej

grupy lizyny z równoczesnym uwolnieniem amoniaku, wprowadza on do fibryny kowalencyjne międzylańcuchowe wiązania krzyżowe. Dlatego też

	180					185					190					
Kokonaza <i>A. polyphemus</i>	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Gln	Asn	Ala	Gly	Arg
Trypsyna wofu	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys	Ser	Gly	Lys
Trypsyna owcy	Asn	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys	Ser	Gly	Lys
Trypsyna świni	Asn	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys	Asn	Gly	Gln
Trypsyna ryby dwudysznej	Asn	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys	Asn	Gly	Gln
Proteaza <i>streptomyces griseus</i>	Asp	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Met	Phe	Arg	Lys	Asp	Asn
Trombina wofu	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	Ser	Pro
Trypsyna rozgwiezdz		Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys			
Trypsyna krewetek	Asp	Ser	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Cys	Cys	Ser	Asn

Ryc. 1. Sekwencja aminokwasów w obszarze centrum aktywnego trombiny i proteaz serynowych zwierząt różnych gatunków.

Numeracja reszt aminokwasowych odpowiada trypsygenowi wołowemu

czynnik XIII jest dziś przeważnie kreślany jako transglutaminaza osoczowa (9, 10). Nie wykryto aktywności enzymatycznej czynników V i VIII, które pełnią rolę kofaktorów. Wszystkie proteazy serynowe układu krzepnięcia i fibrynolizy mają specyficzność podobną do trypsyny. Rozrywają one w białkach wiązania arginyłowe i lizyłowe oraz hydrolizują syntetyczne estry i amidy argininy i lizyny (11).

Na uwagę zasługują dwie różnice funkcjonalne pomiędzy proteazami krzepnięcia a trypsyną i innymi endopeptydazami trzustkowymi. Po pierwsze proteazy krzepnięcia mają bardzo wąską specyficzność, np. trombina hydrolizuje tylko 4 spośród około 150 wiązań arginyłowych w cząsteczce fibrynogenu, a aktywny czynnik X tylko 2 spośród 45 wiązań arginyłowych protrombiny (6, 12).

Po drugie większość proteaz krzepnięcia w fazie rozpuszczalnej działa z bardzo małą szybkością na specyficzne substraty białkowe. Reakcje proteolitycznej aktywacji osoczowych czynników krzepnięcia przebiegają z dużą szybkością po adsorbpcji enzymu i substratu, a w większości przypadków także kofaktora, na odpowiedniej powierzchni. W procesie aktywacji czynnika XII taką naturalną powierzchnią jest kolagen, a czynnika VII lipoproteina tkankowa, której obecność wykryto w błonach większości komórek (13). W warunkach fizjologicznych aktywacja czynników IX, X i protrombiny przebiega szybko w kompleksach z fosfolipidami powierzchni płytek (14, 15). Stają się one dostępne dla osoczowych czynników krzepnięcia po zadziałaniu na płytki takich czynników jak trombina, ADP, kolagen, tromboksany, endotoksyny lub kompleksy immunologiczne. Fosfolipidy błon płytki określa się nieraz jako czynnik tromboplastyczny płytek PF3.

II. Czynniki krzepnięcia zależne od witaminy K

Synteza czterech spośród zymogenów krzepnięcia zachodzi w wątrobie i wymaga obecności witaminy K. Są to protrombina i czynniki VII, IX

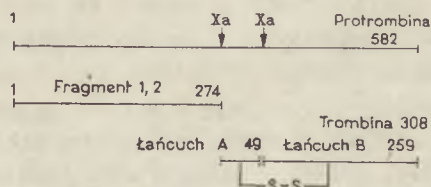
i X. Obniżenie ich aktywności wywołane doustnym podawaniem antykoagulantów, antagonistów witaminy K lub spowodowane upośledzeniem wchłaniania witaminy K a także ciężkimi uszkodzeniami wątroby stanowi najczęstsze podłoże nabytych skaz krwotocznych u człowieka.

II-1. Protrombina

Spośród tych czterech czynników „zależnych od witaminy K” najdokładniej zbadano protrombinę wołu. Dotychczas uzyskane dane wskazują na bardzo duże podobieństwo jej struktury i przemian z protrombiną ludzką (16, 17, 18, 19, 20). Protrombina wołu jest glikoproteidem zawierającym 8—10% cukrów o ciężarze cząsteczkowym około 70 000. Składa się ona z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o ustalonej w pełni sekwencji 582 reszt aminokwasowych. Stwierdzono, że trzy łańcuchy cukrowcowe protrombiny złożone z cukrów obojętnych, glukozaminy, kwasu sjałowego i śladowych ilości galaktoaminy przyłączone są do asparagin w pozycjach 77, 101 i 376. W łańcuchu protrombiny występuje 12 mostków dwusiarczkowych, których pozycje zostały zlokalizowane (17, 18).

Aktywacja protrombiny. Fizjologicznym enzymem przekształcającym protrombinę w trombinę jest aktywny czynnik X, czyli Xa. Po inkubacji oczyszczonych preparatów protrombiny z czynnikiem Xa otrzymano 3 wielocząsteczkowe produkty, a mianowicie — pochodzący z N-końcowego odcinka macierzystej cząsteczki tzw. fragment 1, zawierający sekwencję 1—156, kolejny fragment 2 (sekwencja 157—274) oraz trombinę złożoną z dwóch łańcuchów: lekkiego A zawierającego 49 aminokwasów (275—324) i łańcucha ciężkiego B, w skład którego wchodzi 256 reszt aminokwasowych. Łańcuchy te są ze sobą połączone mostkiem dwusiarczkowym. Aktywne centrum serynowe znajduje się w łańcuchu B trombiny (16, 17, 18).

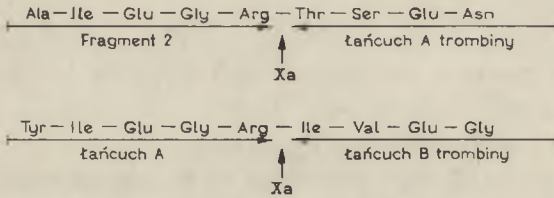
Jeśli jednak przeprowadzono aktywację protrombiny w obecności niskich stężeń dwuizopropylfosforanu hamujących działanie trombiny lecz niewystarczających dla inaktywacji czynnika Xa to okazało się, że czynnik ten dokonuje tylko dwóch cięć w łańcuchu protrombiny. Rozrywa on mianowicie wiązanie pomiędzy Arg 274 i Tre 275, odszczepiając od N-koń-



Ryc. 2. Aktywacja protrombiny wołu przez aktywny czynnik Xa

ca fragment stanowiący prawie połowę całej cząsteczki macierzystej; rozszczepia także pozostałą część zawierającą całą sekwencję trombiny na

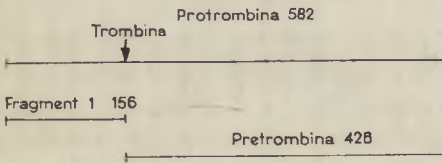
dwa łańcuchy, dzięki rozerwaniu wiązania Arg 323—Ile324 (17, 21a, 22). Rycina 3 pokazuje, że sekwencja trzech kolejnych aminokwasów poprzedzająca oba wiązania hydrolizowane przez czynnik Xa jest identyczna (16, 17, 18). Swoistość działania trombiny wydaje się być także determi-



Ryc. 3. Sekwencje w okolicy wiązań zrywanych w protrombinie przez czynnik Xa

nowana przez krótkie sekwencje wyprzedzające hydrolizowane wiązania w fibrynogenie. Obserwacje te stały się podstawą dla syntezy substratów chromogennych użytecznych w badaniu proteaz serynowych krzepnięcia i fibrynolizy. Substratami tymi są krótkie peptydy z C-końcówką argininą lub lizyną, do których przyłączona jest p-nitroanilina. Pomiar adsorpcji uwalnianej p-nitroaniliny w czasie inkubacji próbki badanej z substratem pozwala oznaczać aktywność enzymu. Substrat dla badania aktywności czynnika Xa produkowany przez f-mę Kabi ma budowę Ile-Glu-Gly-Arg-pNa. Substraty tego typu opracowano także dla trombiny, plazminy, kalikreiny osoczowej, urokinazy (23, 24).

Sprawdzono następnie, że miejscem swoistego ataku trombiny jest wiązanie pomiędzy Arg 156 i Ser 157. W wyniku jego rozerwania odszczepiany zostaje N-końcowy fragment 1 i powstaje intermediat 1 zwany też pretrombiną (16, 17, 18, 25). Fragmenty 1 i 2 wykazują dużą wzajemną

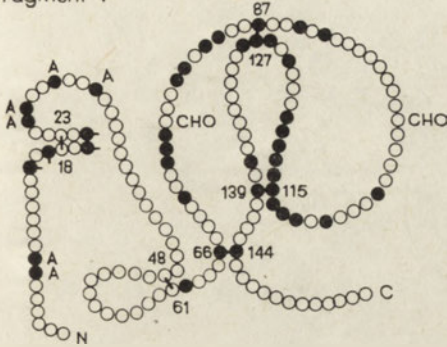


Ryc. 4. Trawienie protrombiny przez trombinę

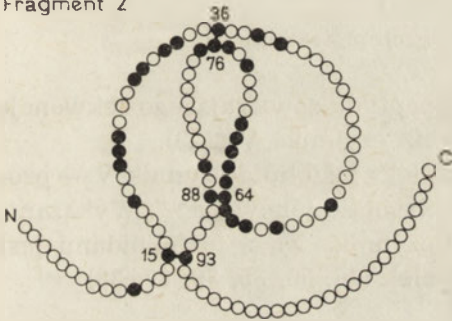
homologię. Oba zawierają odcinki złożone z 83 reszt, w których występują 31 identyczne aminokwasy w tym identyczny nonapeptyd. W każdym z tych 83-aminokwasowych obszarów obu fragmentów występują mostki dwusiarczkowe, które zczepiają łańcuchy polipeptydowe w podwójne pętle nazywane obrazowo „Kringle” co oznacza precel szwedzki (17, 18). Obserwacje te są interpretowane jako przekonywujący dowód, że fragment 1 i 2 powstały w następstwie duplikacji genu. Interesujące z punktu widzenia ewolucji białek krzepnięcia i fibrynolizy i ich pochodzenia od wspólnego prekursora jest stwierdzenie podobnych „Kringle” w N-końcowym obszarze plazminogenu (26).

Przemiana protrombiny w trombinę pod wpływem czynnika Xa przebiega w roztworze z bardzo małą szybkością. Szybkość tę zwiększa obecność jonów Ca^{++} około 40-krotnie, obecność jonów Ca^{++} wraz z fosfolipidami przed 100-krotnie. Najczęściej do badań *in vitro* używa się mieszaniny fosfolipidów ekstrahowanych z mózgu. Dziesiątki tysięcy razy szybsza

Fragment 1



Fragment 2



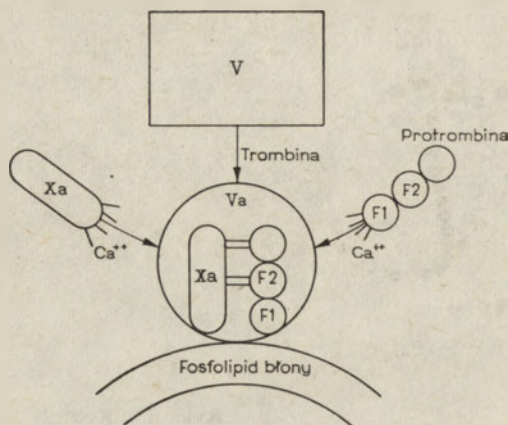
Ryc. 5. „Kringle” — pętle utworzone przez wiązania dwusiarczkowe we fragmentach 1 i 2 protrombiny.

Kółka odpowiadają resztom aminokwasowym. Kółka czarne przedstawiają reszty identyczne fragmentu 1 i fragmentu 2 zawierających pętle (kringle) sprzężone wiązaniami S—S. Liczby określają pozycje reszt cystynowych tworzących mostki S—S; CHO — umiejscowienie cukrowca; litera A — reszty kwasu karboksylglutaminowego (17, 18)

jest generacja trombiny gdy reakcja przebiega w kompleksie fosfolipidy-protrombina-czynnik Xa i czynnik V (14, 16, 27, 28, 29, 30, 31a). Ten ostatni czynnik, jak już wspomniano, ma funkcję kofaktora. Upřednie zadziałanie trombiny na czynnik V jest warunkiem jego wiązania z protrombiną i czynnikiem Xa (16, 32, 33). Uważa się, że w kompleksie z czynnikiem V i fosfolipidem protrombina i czynnik Xa przybierają optymalną konformację dostosowującą substrat i enzym do bardzo szybkiego przebiegu reakcji (16, 30). Warto chyba przytoczyć obliczenie Jacksona (34), który podaje, że w fizjologicznym kompleksie w ciągu 1 min powstaje taka ilość trombiny, która pojawiałaby się po 1—2 tygodniowym działaniu samego czynnika Xa na protrombinę.

Badania zmierzające do ustalenia jakie obszary cząsteczki protrombiny są odpowiedzialne za wiązanie z fosfolipidami wykazały, że jest to fragment 1, a więc ten N-końcowy odcinek, który odszczepia trombina. Protrombina pozbawiona fragmentu 1, czyli pretrombina, jest z tą samą szybkością przekształcana w trombinę przez czynnik Xa w obecności i nieobec-

ności fosfolipidu a izolowany fragment 1 znosi zdolność fosfolipidów do przyłączenia protrombiny i zwiększania szybkości jej aktywacji. Natomiast we fragmencie 2 protrombiny obecne jest miejsce wiązania czynnika Va. Pozbawiona fragmentu 1, 2 protrombina może niekowalecyjnie



Ryc. 6. Schemat kompleksu fizjologicznej aktywacji protrombiny

przyłączać fragment 2 lub 1, 2. Dodanie peptydu zawierającego sekwencję fragmentu 2 przywraca aktywacyjny efekt czynnika Va (25).

Aby mógł powstać fizjologiczny kompleks fosfolipid-czynnik V — protrombina — czynnik Xa konieczna jest obecność jonów Ca⁺⁺. Wykazano, że warunkiem wiązania protrombiny i czynnika Xa z fosfolipidami jest uprzednie przyłączenie Ca⁺⁺ do tych białek (16, 30, 35, 36, 37, 38).

II-2. Anomalia protrombiny w niedoborze witaminy K

Szczególnie interesujących informacji dotyczących wiązania Ca⁺⁺ przez protrombinę dostarczyły badania własności i struktury tego białka u zwierząt otrzymujących doustnie antykoagulanty pochodne dwukumarolu najczęściej warfarynę. Okazało się, że zarówno u zwierząt jak i ludzi, którym podawano tego typu antagonisty witaminy K, można w osoczu metodami immunologicznymi wykrywać prawidłową lub bliską normy ilość protrombiny, mimo nawet bardzo znacznego spadku jej aktywności (39, 40, 41, 42, 43). Świadczyło to o syntezie białka anomalnego. Podobnie zachowywały się po podawaniu warfaryny inne czynniki krzepnięcia „zależne od witaminy K” a więc czynnik VII, IX i X. Mimo braku aktywności były one wykrywane metodami immunologicznymi (44, 45, 46). Na propozycję grupy Hemkera (40, 44) przyjęto nazywać białka syntetyzowane w stanie niedoboru witaminy K — PIVKA (protein induced by vitamin K absence). Anomalna protrombina otrzymała symbol PIVKA II

a czynniki VII, IX i X syntetyzowane w nieobecności witaminy K PIVKA VII, IX i X. Prędko wykryto trzy właściwości PIVKA odróżniające je od ich normalnych analogów, a mianowicie PIVKA nie są zdolne do wiązania Ca^{++} , nie adsorbują się na wodorotlenku glinu i siarczanie baru a w roztworach buforowych zawierających jony wapnia, wykazują w immunoelektroforezie krzyżowej większą ruchliwość anodową niż ich prawidłowe odpowiedniki (44, 45, 47, 48, 49, 50). Jeśli chodzi o protrombinę wyizolowaną z osocza ludzi oraz krów traktowanych pochodnymi dwukumarolu to zawiera ona niewątpliwie sekwencję i centrum aktywne trombiny. Taka PIVKA-protrombina może być aktywowana bowiem do trombiny przez koagulazę gronkowcową (51) i enzymy z jadów niektórych węży takich jak *Echis carinatus* (52), *Oxyuranus scutellatus scutellatus* lub *Dispholidus typus* (53). Koagulaza gronkowcowa nazywana potocznie stafilokoagulazą nie powoduje ograniczonej proteolizy ani prawidłowej protrombiny ani PIVKA II. Natomiast z obydwoma tworzy stechiometryczny trwały kompleks w stosunku 1 : 1. Zachodzą przy tym zmiany konformacyjne odsłaniające centrum aktywne (54). Powstający enzym tzw. stafylotrombina różni się jednak od fizjologicznej trombiny nie tylko strukturą, lecz także szeregiem innych właściwości. Jest na przykład niewrażliwa na swoiste inhibitory trombiny — antytrombinę III, heparynę i hirudynę (54, 55). Enzym z jadu *E. carinatus* jest proteazą aktywującą protrombinę na drodze ograniczonej proteolizy przebiegającej jednak odmiennie niż pod wpływem czynnika Xa (56, 57).

Stwierdzono, że podanie witaminy K_1 szczurom, które otrzymały warfarynę w dawkach powodujących prawie zupełne zniknięcie fizjologicznie aktywującej się protrombiny wywołuje już w ciągu jednej godziny normalizację jej zawartości (58, 59, 60, 61). Co więcej wykazano, że cykloheksomid w dawkach hamujących syntezę białek nie wpływa prawie wcale na ten szybki wzrost stężenia protrombiny. Wreszcie doświadczenia w których szczurom traktowano warfarynę podano cykloheksomid i aminokwasy znakowane ^{14}C a następnie witaminę K_1 wykazały, że szybki wzrost aktywności protrombiny w osoczu pod wpływem witaminy K nie jest wynikiem syntezy białka *de novo*. Pojawiająca się w dużym stężeniu protrombina zawierała bowiem tylko śladowe ilości ^{14}C (61, 62). Hipoteza, że witamina K powoduje jakąś posttranslacyjną modyfikację prekursora normalnej protrombiny została potwierdzona przez doświadczenia w których badano mikrosomy wątroby szczurów otrzymujących warfarynę. Przyjęto, że prekursor protrombiny w mikrosomach podobnie jak PIVKA osoczowe, powinien ulegać aktywacji do trombiny pod wpływem enzymu z jadu *E. carinatus*. W preparatach mikrosomów oznaczano zatem zawartość prekursora aktywując go enzymem z *E. carinatus* i protrombinę normalną dającą się aktywować czynnikiem Xa w obecności jonów Ca^{++} , czynnika V i fosfolipidów. I rzeczywiście w preparatach mikrosomów szczurów fraktowanych warfaryną stwierdzono

Tabela 2

Wpływ cykloheksimidu na inkorporację [¹⁴C]aminokwasów do protrombiny po podaniu witaminy K szczurom z jej niedoborem (61)

Podano	Protrombina w osoczu jednostki/ml	¹⁴ C Dpm*) w protrombinie	¹⁴ C Dpm
			w protrombinie jedm. protrombiny
Witamina K	134	124	1,7
Cykloheksimid + Witamina K	87	4	0,1

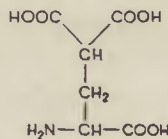
Szczurom z niedoborem witaminy K podano cykloheksimid (5mg/kg) 20 i 50 min. później podano aminokwasy, znakowane ¹⁴C. W 10 min. po 1-szej dawce [¹⁴C]aminokwasów podano witaminę K. Z krwi pobranej w 1 godz. po witaminie K adsorbowano protrombinę na BaSO₄. W paśmie protrombiny po rozdziale elektroforetycznym oznaczono radioaktywność (61, 62).

*) Liczba rozpadów na minutę

bardzo dużą zawartość prekursora i znikomą protrombiny. Natomiast podanie witaminy K₁ spowodowało już w ciągu 10 min odwrócenie ich wzajemnego stosunku (61). Odosobniony jest pogląd, że mikrosomy wątroby szczurów traktowanych pochodnymi dikumarolu mają upośledzoną zdolność syntezy łańcucha polipeptydowego protrombiny (63).

Fakt, że niedobór witaminy K lub jej antagoniści hamują posttranslacyjną modyfikację prekursorów protrombiny i innych zależnych od witaminy K czynników krzepnięcia jest dziś ogólnie zaaprobowany. Natomiast natura tej modyfikacji jest wciąż przedmiotem kontrowersyjnych doniesień.

Z jednego laboratorium pochodzą wyniki wskazujące na upośledzone włączanie glikozoaminy, a w następstwie defektywną strukturę komponenty cukrowcowej protrombiny szczurów otrzymujących pochodne dikumarolu. Witamina K przywracała inkorporację [³H]-glukozoaminy do protrombiny szczurów traktowanych warfaryną (64, 65). Znacznie więcej zwolenników ma jednak pogląd, że różnicą pomiędzy protrombiną prawidłową i syntetyzowaną w nieobecności witaminy K, która warunkuje zachowanie wobec fizjologicznego kompleksu aktywującego, polega na

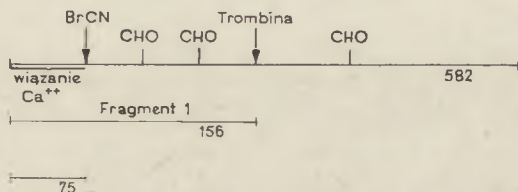


Ryc. 7. Wzór kwasu γ-karboxyglutaminowego (Gla)

nieobecności w PIVKA-protrombinie reszt kwasu glutaminowego zawierającego dodatkową grupę karboksylową przy węglu γ. Do wykrycia tej niezwyklej reszty aminokwasowej doprowadziły następujące spostrzeżenia. Jak już wspomniano PIVKA wykazują w obecności jonów Ca⁺⁺

większą ruchliwość anodową niż ich prawidłowe odpowiedniki w krzyżowej immunoelektroforezie (44, 45).

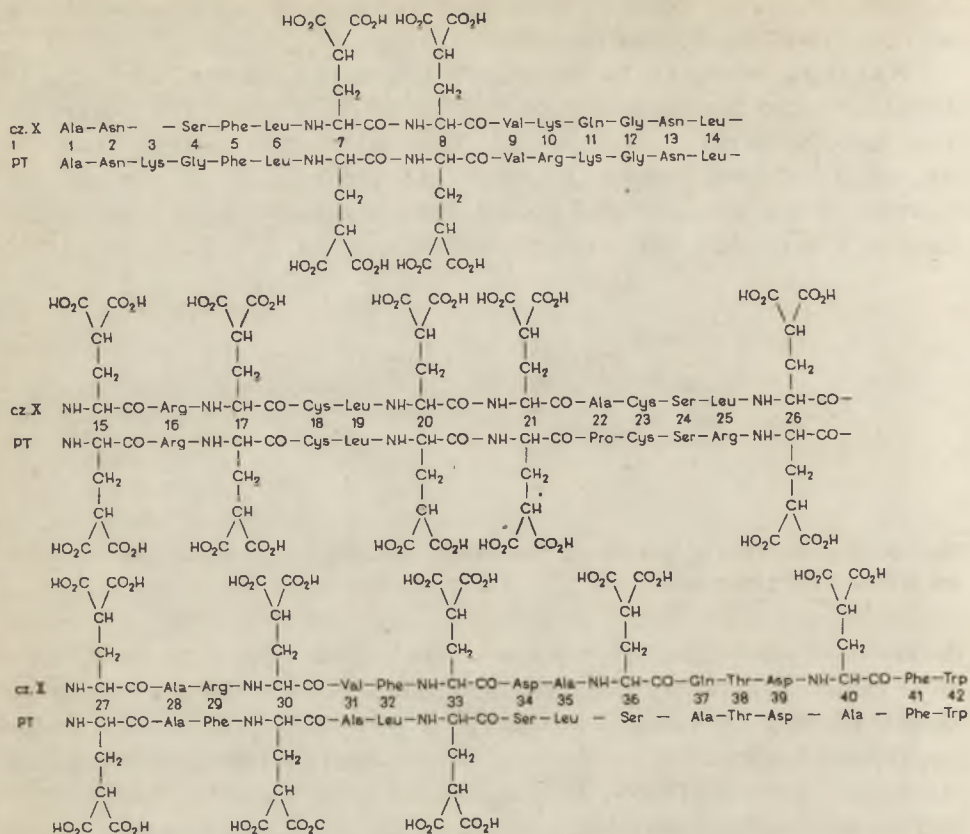
Wykazano następnie, że N-końcowy fragment 1 odszczepiany od protrombiny przez trombinę zawiera tylko 1 resztę metioniny w pozycji 75 tak, że cyjanobrom rozszczepia ten fragment na dwa peptydy. Okazało się, że N-końcowy peptyd złożony z 75 aminokwasów nie zawierający cukrowców ma ten sam skład aminokwasowy niezależnie od tego czy pochodził z normalnej czy PIVKA protrombiny (47, 49). Metodą elektro-



Ryc. 8. Odszczepienie N-końcowego 75-aminokwasowego fragmentu wiążącego Ca^{++} od protrombiny przez bromocyjan

forezy i izoelektrycznego ogniskowania stwierdzono jednak, że ów 75-aminokwasowy N-końcowy fragment protrombiny — PIVKA ma niższy ładunek ujemny niż odpowiedni peptyd z normalnej protrombiny. Mapy peptydowe fragmentów z normalnej i anomalnej protrombiny różniły się plamami trzech peptydów. Dalsze badania tych trzech peptydów przy użyciu spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego i spektrometrii masowej pozwoliły na wykrycie kwasu γ -karboksylo-glutaminowego (Gla) w peptydach pochodzących z fragmentu normalnej protrombiny (49, 66, 67, 68, 69, 70). Wykazano następnie, że w N-końcowym fragmencie (1—75) normalnej protrombiny występuje 10 reszt Gla i ustalono ich pozycje (17, 18, 71). W analogicznym fragmencie protrombiny syntetyzowanej w nieobecności witaminy K te same pozycje zajmuje zwykły kwas glutaminowy (68, 69, 70, 71). Według większości autorów reszty Gla w normalnej protrombinie są jedyną strukturą, której powstanie warunkuje obecność witaminy K w czasie syntezy białek od tej witaminy zależnych. W 42 aminokwasowym N-końcowym fragmencie czynnika X stwierdzono obecność 12 reszt Gla. Pierwsze 10 zajmuje identyczne pozycje w sekwencji czynnika X i protrombiny. W pozycji 7 i 8 oraz 20 i 21 występują te reszty parami (71).

Obecność reszt Gla okazała się determinować w decydujący sposób zdolność cząsteczki protrombiny i czynnika X do przyłączania jonów Ca^{++} . Wykazano, że 1 mol normalnej protrombiny lub pochodzącego z niej fragmentu 1 ma zdolność wiązania 10—14 moli Ca^{++} , a mol czynnika X około 20 moli Ca^{++} . W każdym z tych białek znaleziono 4 miejsca o wysokim powinowactwie do Ca i dodatnią kooperację w czasie wiąża-

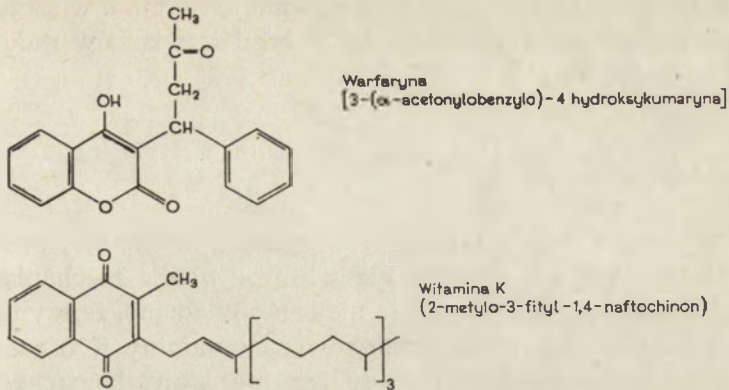


Ryc. 9. Sekwencje fragmentów N-końcowych (1—42) protrombiny (PT) i czynnika X wołu (71)

nia pierwszych 3—5 atomów tego metalu. Efekt kooperacji wymaga natywnej struktury i znika po denaturacji lub zerwaniu mostków S—S (37, 72).

II-3. Posttranslacyjna karboksylacja kwasu glutaminowego

Fakt, że zależna od witaminy K, posttranslacyjna karboksylacja reszt kwasu glutaminowego jest końcowym etapem biosyntezy cząsteczki protrombiny potwierdzono ostatecznie po uzyskaniu z wątroby szczurów z niedoborem witaminy K bezkomórkowego układu syntezy białka wrażliwego na witaminę K i jej antagonistów (73, 74, 75). Układ taki izolowano również z wątroby wołowej (76). Stanowił go nadsącz po odwirowaniu mitochondriów z homogenatu wątroby lub izolowane mikrosomy z dodatkiem frakcji rozpuszczalnej. Składnikiem aktywnym w tej frakcji, który może ją zastępować okazał się NADH (NADPH).



Ryc. 10. Witamina K₁ i najczęściej stosowany jej antagonistą warfaryna

Komórkowy układ syntezy białka z wątroby szczura z niedoborem witaminy K w obecności tlenu i donora grup ^{14}COO odpowiadał na dodatnie witaminy K syntezą białek znakowanych. Hamowało ją działanie antagonistów witaminy K. Szybkość reakcji była znacznie większa gdy donora grup karboksylowych stanowił $^{14}\text{CO}_2$ niż $^{14}\text{HCO}_3$ (75). Około 90% radioaktywności odnajdowano w karboksylowych grupach kwasu glutaminowego białek rybosomalnych. Puromycyna odłączała od rybosomów około 25% [^{14}C]-kwasu glutaminowego. Świadczyło to o karboksylacji reszt kwasu glutaminowego w tworzącym się łańcuchu polipeptydowym. Związane z strukturalnymi białkami rybosomów pozostawało 75% [^{14}C]-kwasu glutaminowego (75).

Podobnie jak w doświadczeniach *in vivo* również w układzie bezkomórkowym *in vitro* cykloheksomid w stężeniach hamujących inkorporację aminokwasów, nie hamował syntezy radioaktywnej protrombiny. W wyizolowanej protrombinie i odszczepionym od niej fragmencie 1 odnaleziono [^{14}C]-kwas glutaminowy (74, 76, 77).

Wykazano, że karboksylację katalizuje system enzymatyczny złożony z reduktazy witaminy K, karboksylazy i prekursora białkowego będącego akceptorem grup karboksylowych (75, 77, 78, 80, 81). System ten jest związany z retikulum endoplazmatycznym i nie ulega ekstrakcji przez bufory o wysokiej sile jonowej lub detergenty w niskim stężeniu. Rozpuszczalne preparaty systemu karboksylującego otrzymano przez ekstrakcję detergentami w wysokich stężeniach (79, 81, 82).

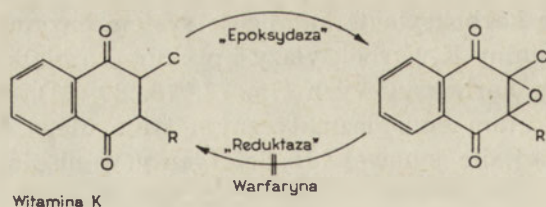
Reduktazę NAD^+ (NADP^+) zależną zastępować było można działaniem ditiotreitolu. Związki blokujące grupy SH hamują aktywność systemu karboksylującego. W badaniach porównawczych nad enzymatycznym systemem karboksylującym związanym z błonami komórkowymi i w postaci rozpuszczalnej stwierdzono ich znaczne podobieństwa, lecz nie ma

pełnej zgodności co do wymagań katalizowanej reakcji, a w szczególności, co do wpływu układu dostarczającego energii i związków redukujących (75, 76, 77, 78, 79, 80, 81).

II-4. Rola witaminy K

O ile krytyczna rola witaminy K w syntezie normalnej protrombiny oraz czynników VII, IX i X jest niewątpliwa, o tyle mechanizmy działania tego kofaktora pozostają wciąż niejasne. Wiadomo, że czynna w procesie karboksylacji jest forma zredukowana witaminy K oraz, że układ pierścieniowy naftochinonu i obecność, lecz nie natura łańcucha bocznego przy węglu 3, determinują aktywność biologiczną witaminy K. Analogi niespełniające tych warunków są nieaktywne (75). Wśród rozważanych mechanizmów działania witaminy K jako kofaktora karboksylacji, dwa wydają się najbardziej prawdopodobne. Jeden to przenoszenie grupy COO a drugi aktywacja protonu w pozycji γ kwasu glutaminowego, receptora grupy karboksylowej. Rzeczywiste znaczenie bądź względny udział tych dwóch reakcji pozostaje tymczasem nierozstrzygnięte (16, 75).

Zgodne są natomiast wyniki wskazujące na tworzenie 2,3-epoksydowych pochodnych witaminy K jako etapu niezbędnego dla jej udziału w karboksylacji kwasu glutaminowego w prekursorze protrombiny. Stwierdzono tą samą lokalizację subkomórkową w szorstkim retikulum endoplazmatycznym „epoksydazy” i karboksylazy zależnej od witaminy K. Obie te aktywności ulegały ściśle tym samym zmianom w czasie oczyszczania, pod wpływem różnych warunków doświadczalnych i inhibitorów oraz wykazywały te same wymagania (83, 84, 85, 86). Podłoże molekularne ścisłej zależności epoksydacji witaminy K i karboksylacji zachodzącej przy jej udziale pozostaje jednak do wyjaśnienia. Działanie antagonistów witaminy K polega prawdopodobnie na hamowaniu przejścia jej epoksydowych pochodnych w czynną formę zredukowaną (87).



Ryc. 11. Prawdopodobny mechanizm działania warfaryny

W warunkach *in vitro* znacznie efektywniejszym inhibitorem karboksylacji kwasu glutaminowego niż warfaryna okazał się bezpośredni antagonist witaminy K 2-chloro-3-fityl-1,4-naftochinon. Wysunięto przypuszczenie, że nierozpuszczalna w wodzie witamina K₁, wiąże się prawdo-

podobnie z apolarnym obszarem enzymatycznego systemu karboksylującego. Dobrze rozpuszczalna w wodzie warfaryna ma zatem zapewne mniejsze szanse kompetycji z witaminą K o miejsce wiążące enzym niż 2-chloro-3-fityl-1,4-naftochinon (8, 88).

Dokonanie w ostatnich latach syntezy drobnocząsteczkowego substratu Phe—Leu—Glu—Glu—Leu karboksylazy zależnej od witaminy K (89) przyczyni się być może, do postępu w poznaniu mechanizmów karboksylacji kwasu glutaminowego oraz działania kofaktorów i inhibitorów tej reakcji.

II-5. Trombina

W wyniku aktywacji protrombiny powstaje trombina wysoce specyficzna proteaza serynowa (11, 90). Wśród białek osoczonego układu krzepnięcia substratami trombiny są ulegający pod jej wpływem wykrzepianiu fibrynogen oraz czynnik V, VII, VIII i protrombina. W niezdenaturowanym fibrynogenu, jak zaznaczono poprzednio, trombina zrywa tylko 2 pary wiązań Arg—Gly i odszczepia 2 pary drobnych peptydów. Po denaturacji fibrynogenu i redukcji mostków S—S dostępne dla trombiny staje się jeszcze jedno wiązanie Arg—Val w łańcuchach A α poprzedzone przez sekwencję Gly—Pro—Arg występującą bezpośrednio po fibrynopeptydzie A. Trombina aktywuje czynnik VII rozszczepiając w nim 1 wiązanie Arg—Ile oraz czynnik XIII katalizując rozerwanie wiązania Arg—Gly. Nie ustalono natury wiązań atakowanych przez trombinę w czynnikach VIII i V. Czynniki V, VII i VIII po przejściowej aktywacji po dłuższym działaniu trombiny ulegają unieczynnieniu. Przemawia to za zdolnością trombiny do rozkładu w każdym z tych białek wiązania nie tylko jednego typu. Wykazano, że oprócz białek osocza substratami naturalnymi trombiny są sekretyna, cholecystokina, chymotrypsynogen, gonadotropina łożyskowa, lizozym białka kurzego. We wszystkich tych substratach trombina katalizuje hydrolizę swoistą jednego lub nielicznych wiązań arginylowych. Trombina ma też aktywność esterazową i amidolityczną wobec syntetycznych substratów, takich jak ester etylowy beoiloargininy, ester metylowy tosylargininy oraz paranitroanilidy BZ—Phe—Ala—Val—Arg, Tos—Gly—Pro—Arg oraz HDPhe—Pip—Arg. (23, 24).

Aktywność trombiny ulega hamowaniu przez nieswoiste inhibitory osocze proteaz takie jak α_2 -makroglobulina i α_1 -antytrypsyna. Do niedawna za specyficzny inhibitor trombiny uważano t.zw. antytrombinę III, białko tworzące kompleks stechiometryczny z trombiną w stosunku 1:1. Obecność heparyny kilkusetkrotnie zwiększa szybkość tworzenia tego kompleksu i inaktywacji trombiny. Sądzono, że również, hirudyna białko wytwarzane przez gruczoły ślinowe pijawek, hamuje wybiórczo tylko trombinę. Okazało się jednak, że ostatnie dwa inhibitory reagują również

z innymi czynnikami krzepnięcia. Aktywność trombiny jest wrażliwa na działanie typowych inhibitorów proteaz serynowych, a mianowicie na DFP, PMSF, paranitrophenyl — p-guanidynobenzoesan (NPBG) fenylalanyl-analy-arginyl-chlorometyl-keton oraz benzamidynę (11, 90).

II-6. Inne czynniki krzepnięcia zależne od witaminy K

Jak już wspomniano prócz protrombiny inne, zależne od witaminy K, czynniki krzepnięcia osoczkowego są również zymogenami proteaz serynowych syntetyzowanymi w wątrobie. Ulegają one posttranslacyjnej karboksylacji na drodze tych samych mechanizmów co protrombina.

Ostatnimi czasy poznano strukturę czynników IX i X (11). Trudności w badaniu sekwencji czynnika VII wynikają ze znikomego stężenia tego białka w osoczu a w związku z tym z bardzo ograniczonych możliwości uzyskania dostatecznych jego ilości. Rycina 12 przedstawia sekwencje N-końcowych odcinków zymogenów i czynnych enzymów oraz okolicy centrum aktywnego protrombiny oraz czynników IX i X (91). Jak widać białka te wykazują bardzo dużą homologię struktury pierwszorzędowej.

Wszystkie zależne od witaminy K białka osocza wołu i człowieka mają około 10 reszt Glu w cząsteczce (92). We wszystkich dotąd zbadanych biał-

N-końcowe sekwencje proenzymów¹⁾

Protrombina	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Leu	Glu	Glu	Glu	—	Val	Arg	Lys	Gly	Asn	Leu
cz IX	Tyr	Asn	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Glu	Phe	Val	Arg	—	Gly	Asn	Leu
cz X	Ala	Asn	Ser	—	Phe	Leu	Glu	Glu	Glu	—	Val	Lys	Gln	Gly	Asn	Leu

N-końcowe sekwencje łańcuchów ciężkich aktywowanych enzymów

Protrombina	Ile	Val	Glu	Gly	Gln	Asp	Ala	Glu	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Trp	Gln
cz IXa	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Glu	Arg	Gly	Glu	Phe	Pro	Trp	Gln
cz Xa	Ile	Val	Gly	Gly	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln

Sekwencje w obszarze centrum aktywnego

Trombina	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Gly	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	SER	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys
cz IXa	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	His	—	Glu	Gly	Gly	Lys	—	—	Asp	SER	Cys	Gln	Gly	Asp	SER	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Glx
cz Xa	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Asp	—	Thr	Gln	Pro	Glu	—	—	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	SER	Gly	Gly	Pro	His	Val	Thr	Arg

¹⁾ Glu — kwas karboksylglutaminowy
SER — seryna centrum aktywnego

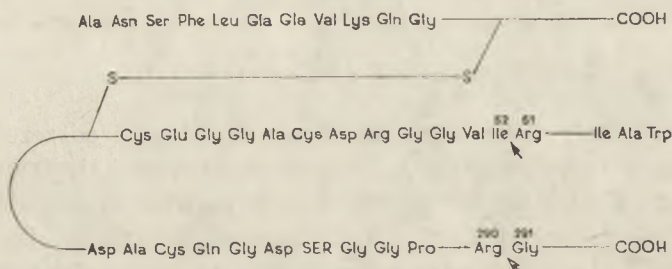
Ryc. 12. Homologie sekwencji protrombiny oraz czynników IX i X wołu (91)

kach osoczkowych karboksylowane reszty kwasu glutaminowego mają bardzo podobne rozmieszczenie. Są one zgrupowane w N-końcowych odcinkach łańcucha polipeptydowego zymogenów i występują parami zajmując najczęściej pozycje 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30 i 33. Ryc. 9 ilustruje rozmieszczenia Glu w N-końcowych odcinkach protrombiny i czynnika X. Jak widać jest ono prawie identyczne (71).

Wydaje się, że zależne od witaminy K białka osocza stanowią znakomite poparcie dla teorii różnicowania się białek pochodzących od wspólnego prekursora w toku ewolucji.

Czynnik X (11, 91, 93) Dziedzicznie autosomalnie przekazywany niedobór lub anomalia czynnika X Stuarta jest podłożem wrodzonej skazy

krwotocznej występującej u kobiet i mężczyzn. Wołowy czynnik X jest glikoproteidem o ciężarze cząsteczkowym 55 000 złożonym z 2 łańcuchów o całkowicie poznanej sekwencji. Lżejszy łańcuch ma ciężar cząsteczkowy 16 500. W cięższym (39 300) zlokalizowane są 2 łańcuchy cukrowcowe przyłączone do Asn-35 i Thr-300. Ludzki czynnik X ma nieco wyższy ciężar cząsteczkowy 58 900 i dłuższy o 15—20 reszt łańcuch ciężki.



Ryc. 13. Schemat struktury czynnika X i jego aktywacji (91)

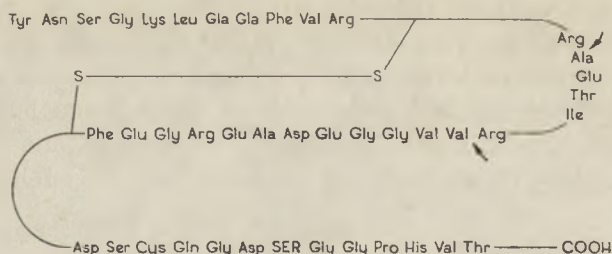
Przejęcie wołowego czynnika X w aktywną proteazę serynową polega na zerwaniu wiązania Arg 51—Ile 52 w łańcuchu ciężkim. Reakcja ta fizjologicznie zachodzić może w 2 układach. W łańcuchu wewnątrzpochoдного krzepnięcia (patrz Schemat 1) czynnik X jest aktywowany w kompleksie czynnik IXa, czynnik VIIIa, Ca^{++} , fosfolipid. W układzie zewnątrzpochoдного aktywacji krzepnięcia czynnik VIIa w obecności tromboplastyny tkankowej zrywa wiązanie Arg 51—Ile 52 w czynniku X. Ponadto trypsyna i proteaza izolowana z jadu *Vipera Russellii* aktywuje czynnik X dokonując tego samego cięcia w jego ciężkim łańcuchu. Aktywatory czynnika X mogą z mniejszą szybkością rozrywać w nim drugie wiązanie Arg 290—Gly 291 odszczepiając od cięższego łańcucha C-końcowy peptyd o ciężarze cząsteczkowym 2700. Reakcja ta nie jest warunkiem aktywacji czynnika X.

Naturalnymi substratami białkowymi proteolitycznej aktywności czynnika Xa są protrombina oraz czynniki VII, V i IX, a inhibitorami antytrombina III, inhibitor sojowy trypsyny, DFP, PMSF i NPBG.

Czynnik IX (11, 91, 94) Wrodzony niedobór czynnika IX Christmаса określa się nazwą hemofii B. Podobnie jak klasyczna hemofilia A, cecha ta jest dziedzicznie przekazywana w sposób sprzężony z płcią.

Otrzymano wysoko oczyszczone preparaty czynnika IX z osocza wołu i człowieka. Czynnik ten składa się z pojedynczego łańcucha. Sekwencja wołowego czynnika IX o ciężarze cząsteczkowym 55 000 jest prawie całkowicie ustalona. Ludzki czynnik IX wykazuje bardzo bliskie podobieństwo i ma ciężar cząsteczkowy 57 000.

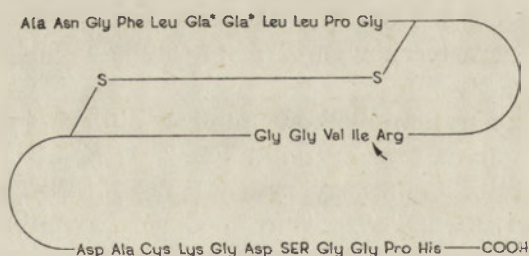
Fizjologiczna aktywacja czynnika IX przez czynnik XIa w obecności Ca^{++} polega na rozerwaniu dwóch wiązań arginylowych. Jego skutkiem jest powstanie 2 łańcuchów lżejszego o ciężarze cząsteczkowym 16 600



Ryc. 14. Schemat struktury czynnika IX i jego aktywacji (91)

i cięższego (27 000) połączonych mostkiem S—S oraz odszczepienie tzw. peptydu aktywacyjnego. Czynniki IX może być również aktywowany przez enzym z jadu *Vipera Russellini* oraz z małą szybkością przez czynnik Xa w kompleksie z jonami Ca^{++} i fosfolipidem. Krytyczne dla aktywacji czynnika IX do IXa jest zerwanie wiązania Arg—Val. Tylko tego cięcia dokonuje enzym z jadu *Vipera Russellini*. Naturalnym substratem czynnika IXa jest czynnik X. Czynniki IXa jest podobnie jak trombina, hamowany przez antytrombinę III, heparynę i hirudynę.

Czynnik VII (11, 91, 95) Jak już wspomniano postępowanie w badaniach nad czynnikiem VII jest wolniejsze z powodu trudności w uzyskaniu dostatecznych ilości wysoko oczyszczonych preparatów. Wołowy czynnik VII jest glikoproteiną o ciężarze cząsteczkowym 45 500 złożonym z jednego łańcucha polipeptydowego i 13% cukrowców. Aktywacja czynnika VII polega na rozerwaniu wiązania Arg—Ile i powstaniu cząsteczki składającej się z dwóch łańcuchów (18 000 i 27 000) połączonych mostkiem dwusiarczkowym.

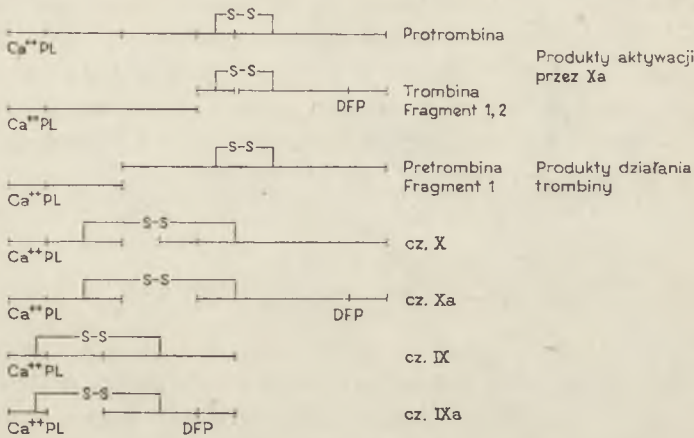


Ryc. 15. Schemat struktury czynnika VII i jego aktywacji (91)

Zdolność aktywacji czynnika VII ma szereg proteaz krzepnięcia a mianowicie trombina oraz czynniki Xa, XIIa, XIa a także kalikreina. Reakcja z czynnikiem Xa po przejściowej aktywacji powodują unieczynnienie czynnika VIIa.

Substratem naturalnym czynnika VIIa jest czynnik X (patrz Schemat 1). Czynniki VII nie jest wrażliwy na żaden z osoczowych inhibitorów proteaz.

II-7. Aktywacja czynników zależnych od witaminy K na powierzchni fosfolipidów — znaczenie fizjopatologiczne



Ryc. 16. Uproszczone schematy struktury protrombiny, czynników X, IX i produktów ich aktywacji (17)

Na rycinie 16 zestawiono maksymalnie uproszczone schematy części protrombiny oraz czynników X i IX, aktywnych enzymów z nich powstających i pretrombiny, produktu działania trombiny na protrombinę (17). Zaznaczono jedynie długość łańcuchów polipeptydowych, centrum aktywne i N-kończową lokalizację miejsc wiążących Ca⁺⁺ a za ich pośrednictwem fosfolipidów. Analogiczne własności mają N-końcowe obszary czynnika VII oraz dalej omówionych osoczowych białek C i S (patrz str. 22). Stwierdzono, że najtrwalsze kompleksy z fosfolipidami tworzy protrombina, czynnik X i białko S, pośrednie powinowactwo do fosfolipidów ma czynnik IX a najniższe czynnik VII i białko C (96).

Uderzająca jest różnica w następstwach aktywacji czynników X i IX z jednej strony a protrombiny z drugiej. Aktywne czynniki Xa i IXa zawierają nienaruszony obszar N-końcowy i tak jak ich zymogeny, mogą pozostawać przyłączone do kompleksu z fosfolipidem i kofaktorem. Jest to warunek ich szybkiego działania w łańcuchowej reakcji krzepnięcia a ponadto usuwa to aktywne czynniki z poza zasięgu wpływu inhibitorów osoczowych (17, 18, 34).

Zupełnie odmiennie skutki ma aktywacja protrombiny oraz jej trawienie przez powstającą trombinę. N-końcowy fragment 1, 2 lub 1 ulega odszczepieniu lecz pozostaje związany z fosfolipidem a trombina lub pretrombina zostaje uwolniona do fazy płynnej otaczającego środowiska. Trombina jest wówczas dostępna dla działania inhibitorów osoczowych, a pretrombina w fazie płynnej może być tylko ze znikomą szybkością przekształcana przez czynnik Xa w trombinę. Jest to jeden z przykładów ujemnego sprzężenia zwrotnego ograniczającego następstwa aktywacji

krzepnięcia zarówno wewnątrz jak zewnątrz pochodnym układzie, dzięki hamującemu swe własne powstawanie działaniu trombiny (17, 18). Fakt, że aktywacja większości enzymów krzepnięcia przebiega ze znaczną szybkością na powierzchniach kolagenu lub lipoprotein bądź fosfolipidów błon komórkowych jest interpretowany jako zjawisko lokalizujące i ograniczające krzepnięcie krwi do miejsca uszkodzenia układu naczyniowego. Opisano podobne mechanizmy lokalizujące i ograniczające fibrylizację. Związane są one ze specyficznym powinowactwem i adsorbacją plazminy, plazminogenu i jego aktywatorów do fibryny (97, 98).

III. Białka C i S

W ostatnich latach wykryto, że oprócz protrombiny i czynnika VII, IX i X w osoczu występują dwa inne białka zależne od witaminy K, zawierające reszty Gla. Oba te białka izolowano zarówno z wołowego jak ludzkiego osocza i częściowo scharakteryzowano (92, 99, 100, 101, 102, 103). Nadano im nazwy białko C i białko S. Są one oba glikoproteinami. Białko C ma ciężar cząsteczkowy 57 000, zawiera 15% cukrowców i składa się z 2 łańcuchów polipeptydowych (21 000 i 35 000). W skład białka S wchodzi 1 łańcuch polipeptydowy o ciężarze cząsteczkowym 64 200 i około 7% cukrowców.

Białko C i S wykazują analogię z zależnymi od witaminy K osoczymi czynnikami krzepnięcia co do liczby reszt Gla bliskiej 10-ciu, ich lokalizacji w N-końcowym obszarze cząsteczki i występowaniu par tego niezwykłego aminokwasu (92).

Stwierdzono dużą homologię struktury pierwszorzędowej białka C i czynników VII, IX, X w odcinku N-końcowym. Podobnie jak czynniki

Tabela 3

Zawartość reszt kwasu γ -karboksylglutaminowego w białkach osocza zależnych od witaminy K (wg. D i S c i p i o) ¹⁰³⁾

	Liczba reszt Gla w cząsteczce	Ciężar molekularny
Protrombina wołu	10,0	71,600
Protrombina ludzka	10,1	72,000
Czynnik X wołu	12,3	55,100
Czynnik X ludzki	11,6	58,900
Czynnik IX wołu	12,2	55,400
Czynnik IX ludzki	12,4	57,100
Czynnik VII wołu	9,4	45,500
Białko C wołu	10,8	57,000
Białko C ludzkie	10,4	57,000
Białko S wołu	10,0	64,200
Białko S ludzkie	10,3	69,000

Protrombina	Ala	Asn	Lys	Gly	Phe	Leu	Glu (CO ₂)	Glu (CO ₂)	—	Val	Arg	Lys	Gly	Asn	Leu
czynnik IX	Tyr	Asn	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu (CO ₂)	Glu (CO ₂)	—	Val	Arg	—	Gly	Asn	Leu
czynnik X	Ala	Asn	Ser	—	Phe	Leu	Glu (CO ₂)	Glu (CO ₂)	—	Val	Lys	Gln	Gly	Asn	Leu
białko C	Ala	Asn	Ser	—	Phe	Leu	Glu (CO ₂)	Glu (CO ₂)	—	Leu	Arg	Pro	Gly	Asn	Val
czynnik VII	Ala	Asx	—	Gly	Phe	Leu	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Ryc. 17. Homologia N-końcowych obszarów białka C i innych białek osoczowych „zależnych” od witaminy K

krzepnięcia białko C jest zymogenem, który może być aktywowany do proteazy serynowej przez trypsynę lub enzym z jadu *Vipera Russellii*. Aktywacja polega na zerwaniu wiązania Arg 14—Ile 15 w łańcuchu ciężkim białka C. W przeciwieństwie do czynników II, VII, IX i X białko C hamuje krzepnięcie osocza. Mechanizm antykoagulacyjnego działania białka C nie jest wyjaśniony. Rozważano możliwość kompetycji o fosfolipidy, proteolityczną degradację czynników krzepnięcia oraz identyczność białka C z uprzednio opisanym inhibitorem wewnątrzpochodnego układu krzepnięcia (104, 105).

Białko S wykazuje nie tylko wspomniane już podobieństwa strukturalne do zymogenów proteaz osoczowych zależnych od witaminy K, lecz tak, jak one, absorbuje się na siarczanie baru i tworzy kompleksy z fosfolipidami w obecności jonów Ca⁺⁺. Nasuwa to przypuszczenie, że białko S zapewne też pełni jakąś niewykrytą jeszcze funkcję biologiczną.

IV. Białka „zależne od witaminy K” kości i innych tkanek

Stwierdzenie, że obecność Gla jest warunkiem wiązania Ca⁺⁺ przez wiele białek osocza było punktem wyjścia poszukiwań w tkankach wapniejących białek modyfikowanych posttranslacyjnie przez zależną od witaminy K karboksylazę. Poszukiwania te doprowadziły do wykrycia w kościach osteokalcyny, białka o ciężarze cząsteczkowym 6500 zawierającego 4 reszty Gla (105a, 106, 107). Wykazano, że w mikrosomach kości obecny jest system karboksylujący reszty kwasu glutaminowego wymagający witaminy K, hamowany przez jej antagonistów (109, 110).

Osteokalcyna stanowi około 1% całkowitych i 20% niekolagenowych białek kości, należy więc do białek najobficiej występujących w organicznej matrycy kostnej. Na 1 kg kości człowieka przypada około 15 g osteokalcyny. Znalaziono ścisłą współzależność zawartości kolagenu i osteokalcyny w kościach. Wykryto obecność reszty hydroksyproliny w cząsteczce osteokalcyny wołu (108). Wysunięto więc przypuszczenie, że to niskocząsteczkowe białko pochodzi z cząsteczki prokolagenu. Osteokalcyna wykazuje wybiórcze i duże powinowactwo do hydroksyapatytu i hamuje jego wytrącanie z roztworów fosforanu wapnia. Na tej podstawie postulowana jest rola regulacyjna osteokalcyny w mineralizacji kości. Warfaryna zarówno *in vivo* jak i w układach *in vitro* hamuje karboksylację kwasu

glutaminowego w białkach kości (110, 111). Opisane anomalie kostne u płodów zwierząt otrzymujących antagonistów witaminy K i u dzieci urodzonych przez kobiety leczone warfaryną w pierwszym trymestrze ciąży świadczyć mogą o istotnym znaczeniu prawidłowej osteokalcyny zawierającej Gla dla rozwoju kośćca (110, 112, 113).

Białka zawierające Gla lub układ enzymatyczny zależny od witaminy K karboksylujący reszty kwasu glutaminowego wykryto poza tym w wapniących tkankach miękkich (114), kamieniach nerkowych (115), mięszu nerki (116), w śledzionie, łożysku (117, 118) w mikrosomach mózgu szczura oraz ludzkich fibroblastów (119). Wydaje się więc, że zależna od witaminy K, posttranslacyjna karboksylacja kwasu glutaminowego w białkach może być zjawiskiem występującym znacznie powszechniej niż to poprzednio przypuszczano, mającym ogólne znaczenie w regulacji metabolizmu, transportu i odkładania się wapnia.

Zaakceptowano do druku 14.9.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Kleniewski J., (1979), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **32**, 15—34.
2. Ratajczak T., Szewczyk Z., (1978), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **32**, 291—309.
3. Kowarzyk H., (1952), *Nature*, **169**, 614—615.
4. Beiley K., Bettelheim F. R., Lorand L., Middelbrook W. R., (1951), *Nature*, **167**, 233—234.
5. Lorand L., (1952), *Biochem. J.*, **52**, 200—203.
6. Blomback B., (1967), w: *Blood Clotting Enzymology*. Red. W. H. Seegers, str. 143—215, Academic Press, New York, London.
7. Blomback B., (1970), *Symp. Zool. Soc. Lond.*, **27**, 167—187.
8. Low J. H., Dunn P. E., Kramer K. J., (1977), *Advances in Enzymology* **45**, 389—425.
9. Finlayson J. S., (1974), *Semin. Thromb. Hemostasis*, **1**, 33—62.
10. Doolittle R. F., (1973), *Adv. Protein Chem.*, **27**, 1—109.
11. Davie E. W., Fujikawa K., Kurachi K., Kisiel W., (1979), *Advances in Enzymology*, **48**, 277—318.
12. Stenn K. S., Blout E. R., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4502—4515.
13. Zeldis S. M., Nemerson Y., Pitlick F. A., (1979), *Science*, **175**, 766—768.
14. Zwaal R. F. A., (1978), *Bioch. Biophys. Acta*, **515**, 163—205.
15. Esmon C. T., Suttie J. W., Jackson C. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4095—4099.
16. Suttie J. W., Jackson C. M., (1977), *Physiological Reviews*, **57**, 1—70.
17. Magnusson S., Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Clays H., (1975), w: „Prothrombin and Related Coagulation Factors”, red. H. C. Hemker and J. J. Veltkamp, str. 25—46, Leiden University Press. Boerhaave Series No 10.
18. Magnusson S., Petersen T. E., Sottrup-Jensen L. i in., (1975), w: „Proteins and Biological Control”, red. R. Reich, D. B. Rifkin, E. Shaw, str. 123—149, Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
19. Butkowski R. J., Elion J., Downing M. R., Mann K. G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4942—4957.
20. Walz D. A., Hewett-Emmett D., Seegers W. H., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**, 1969—1972.

- 20a. Esmon C. T., Owen W. G., Jackson C. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 606—611.
21. Owen W. G., Esmon C. T., Jackson C. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 594—605.
22. Kisiel W., Hanahan D. J., (1974), *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 570—577.
23. Witt I., (1977), *New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates*. De Gruyter, Berlin, New York.
24. Scully M. F., Kakkar V. V., (1979), *Chromogenic peptide substrates. Chemistry and Clinical Usage*. Churchill Livingstone Edinburgh, London, New York.
25. Jackson C. M., Esmon C. T., Gitel S. N. i in., (1975), w: „Prothrombin and Related Coagulation Factors”, red. H. C. Hemker, J. J. Velkamp, str. 59—88, Leiden University Press. Boerhaave Series 10.
26. Magnusson S., Petersen T. E., Sottrup-Jensen L., Dudek-Wojciechowska G., Cleys H., (1976), w: „Proteolysis and Physiological Regulations”, str. 203—238, red. D. W. Riblons K. Brew., Academic Press New York.
27. Esnouf M. P., Jobin F., (1965), *Thrombos Diathes. Haemorrh. Suppl.* **17**, 103—110.
28. Gitel S. N., Owen W. G., Esmon T., Jackson C. M., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1344—1348.
29. Mann K. G., (1975), *Prothrombin and Related Coagulation Factors*, red. H. C. Hemker J. J. Velkamp, str. 47—58, Leiden University Press. Boerhaave Series 10.
30. Nelstuen G. L., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 2621—2625.
31. Nelstuen G. L., Kisiel W., di Scipio R. G., (1978), *Biochemistry* **17**, 2134—2138.
- 31a. Papahadjapoulos D., Hougie C., Hanahan D. J., (1964), *Biochemistry* **3**, 264—270.
32. Esmon C. T., Owen W. G., Duiguid D. L., Jackson C. M., (1973), *Bioch. Biophys. Acta*, **310**, 289—294.
33. Freeman J. P., Guillin M. C., Bezeaud A., Jackson C. M., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 675.
34. Jackson C. M., (1978), *Brit. J. Haematol.*, **39**, 1—8.
35. Babaj S. P., Butkowski R. J., Mann K. G., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2150—2156.
36. Benson B. J., Hanahan D. J., (1975), *Biochemistry* **14**, 3265—3277.
37. Henriksen R. A., Jackson C. M., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 149—159.
38. Nelstuen G. L., Suttie J. W., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4961—4964.
39. Hemker H. C., Veltkamp J. J., Hensen A., Loeliger E. A., (1969), *Nature* **200**, 589—590.
40. Hemker H. C., Muller A. D., Loeliger E. A., (1970), *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* **23**, 633—637.
41. Brozovic M., Gurd L. J., (1973), *Brit. J. Haematol.*, **24**, 579—588.
42. Ganrot P. D., Nihlen J. E., (1968), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **22**, 23—28.
43. Hemker H. C., Muller A. D., (1970), *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **23**, 363—637.
44. Hemker H. C., Reekers P. P. M., (1974), *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, Suppl. **57**, 83—85.
45. Lindhout M. J., Kop-Klaassen B. H. M., (1975), *Prothrombin and*

- Related Coagulation Factors, red. H. C. Hemker i J. J. Velkamp, str. 274—288, Leiden University Press. Boerhaave Series Nr. 10.
46. Denson K. W., (1971), *Brit. J. Haematol.*, **20**, 643—648.
 47. Stenflo J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8167—8175.
 48. Stenflo J., Ganrot P. O., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8160—66.
 49. Stenflo J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6325—6332.
 50. Lindhout M. J., Kop-Klaassen B. H. M., Hemker H. C., (1978), *Bioch. Biophys. Acta*, **533**, 327—341.
 51. Menache D., Guillin M. C., Boyer C., Cesbron N., (1975), Prothrombin and Related Coagulation Factors, red. H. C. Hemker i J. J. Velkamp, str. 159—166, Leiden University Press. Boerhaave Series Nr. 10.
 52. Morita T., Iwanaga S., (1978), *J. Biochem.*, Tokyo, **83**, 559—570.
 53. Guillin M. C., Bezeaud A., Menache D., (1978), *Bioch. Biophys. Acta*, **537**, 160—168.
 54. Bas B. M., Muller A. O., Hemker H. C., (1975), *Bioch. Biophys. Acta*, **379**, 164—171.
 55. Zajdel M., Węgrzynowicz Z., Jeljaszewicz J., Pulverver G., (1973), *Staphylococci and Staphylococcal Infection*. Polish Medical Publishers, str. 361—375.
 56. Franza R. B. Jr., Aronson D. L., Finlayson J. S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7057—7068.
 57. Morita T., Iwanaga S., Suzuki T., (1976), *J. Biol. Chem.*, Tokyo, **79**, 1089—1108.
 58. Bell R. G., Matschiner J. T., (1969), *Arch. Biochem.*, **135**, 152—159.
 59. Hill R. B., Gaetani S., Paoluci A. M. J., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3930—3939.
 60. Suttie J. W., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **141**, 571—578.
 61. Suttie J. W., (1975, Prothrombin and Related Coagulation Factors, str. 135—151, red. H. C. Hemker i J. J. Velkamp. Leiden University Press. Boerhaaven Series Nr. 10.
 62. Shah D. V., Suttie J. W., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1653—1657.
 63. Olson R. E., (1964), *Science*, **145**, 926—928.
 64. Pereira M., Couri D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 348—355.
 65. Meeks R. G., Couri D., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **544**, 634—637.
 66. Stenflo J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5527—5536.
 67. Stenflo J., (1975), Prothrombin and Related Coagulation Factors. red. H. C. Hemker i J. J. Velkamp, str. 152—158, Leiden University Press. Boerhaave Series Nr. 10.
 68. Stenflo J., Ferlund P., Egan W., Roebstorff P., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2730—2733.
 69. Nelsestuen G. L., Suttie J. W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3366—3370.
 70. Nelsestuen G. L., Zytkowicz T. H., Howard J. B., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6347—6350.
 71. Thogersen H. C., Petersen T. E., Sottrup-Jensen L., (1978), *Biochem. J.*, **175**, 613—627.
 72. Lindhout M. J., Hemker H. C., (1978), *Bioch. Biophys. Acta*, **533**, 318—326.
 73. Shah D. J., Suttie J. W., (1974), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1397—1402.
 74. Esmon C. T., Sadowski J. A., Suttie J. W., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4744—4748.

75. Olson R. E., Houser R. M., Searcey M. T., (1978), *Fed. Proc.*, **97**, 2610—2614.
76. Vermeer C., Soute B. A. M., Hemker H. C., (1978) *Bioch. Biophys. Acta*, **523**, 494—505.
77. Suttie J. W., Esmon C. T., Sadowski J. A., (1975), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 151—155.
78. Friedman P. A., Shia M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 7057—7068.
79. Girardot J. M., Mack D. O., Floyd R. A., Johnson B. C., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 655—662.
80. Sadowski J. A., Esmon C. T., Suttie J. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2770—2775.
81. Esmon C. T., Suttie J. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6238—6243.
82. Mack D. O., Suen E. T., Girardot J. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3269—3276.
83. Willingham A. K., Matshchiner J. T., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 435—441.
84. Sadowski J. A., Schnoes H. K., Suttie J. W., (1977), *Biochemistry* **16**, 3856—3863.
85. Suttie J. W., Larson A. E., Canfield L. M., Carlisle T. L., (1978), *Fed. Proc.* **37**, 2605—2609.
86. Bell R. G., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 2599—2614.
87. Whitlon D. S., Sadowski J. A., Suttie J. W., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1371—1377.
88. Stenflo J., (1978), *Advances in Enzymology*, **46**, 1—31.
89. Suttie J. W., Hageman J. M., Lehrman S. R., Rich D. H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5827—5830.
90. Lundblad R. L., Kingdon H. S., Mann K. G., (1976), *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan. Academic Press, New York, San Francisco, London, **45**, 156—176.
91. Davie E. W., Fujikawa K., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 799—829.
92. Di Scipio R. G., Davie E. W., (1979), *Biochemistry* **18**, 899—904.
93. Fujikawa K., Davie E. W., (1975), *Methods in Enzymology*, red. Colowick i N. O. Kaplan. Academic Press, New York, San Francisco, London, **45**, 89—107.
94. Fujikawa K., Davie E., (1975), *Ibid.* **45**, 74—83.
95. Radcliffe R., Nemerson Y., (1975), *Ibid.* **45**, 49—56.
96. Nelsestuen G. L., Kisiel W., Di Scipio R. G., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2134—2138.
97. Wiman B., Collen D., (1978), *Nature*, **272**, 549—550.
98. Wiman B., Lijnen H. R., Collen D., (1979), *Biochem. Biophys. Acta*, **579**, 142—154.
99. Stenflo J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 355—363.
100. Kisiel W., Ericsson L. H., Davie E. W., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4893—4900.
101. Esmon C. T., Stenflo J., Suttie J. W., Jackson C. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3052—3056.
102. Kisiel W., Canfield W. M., Ericsson L. H., Davie E. W., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5824—5830.
103. Di Scipio R. G., Hermodson M. A., Yates S. G., Davie E. W., (1977), *Biochemistry*, **16**, 698—706.
104. Marciniak E., (1970), *Science*, **170**, 452—453.
105. Seegers W. H., Novoa E., Henry R. L., Hassauna H., (1976),

Thrombos. Res., **8**, 543—548.

- 105a. Hauschka P. K., Lian J. B., Gallop P. M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3925—3929.
106. Hauschka P. V., Reid M. L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9063—9068.
107. Lian J. B., Friedman P. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6623—6626.
108. Price P. A., Poser J. W., Raman N., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3374—3375.
109. Lian J., Friedman P. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6623—6626.
110. Lian J. B., Hauschka P. V., Gallop P. M., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 2615—2620.
111. Nishimoto S. K., Price P. A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 437—441.
112. Pettifor J., Benson R., (1975), *J. Pediatr.*, **86**, 459—462.
113. Warkany J., (1975), *Am. J. Dis. Child.*, **129**, 287—288.
114. Lian J. B., Sinner M., Glimcher M. J., Gallop P. M., (1976), *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 349—355.
115. Lian J. B., Prien E. L., Jr., Glimcher M. J., Gallop P. M., (1977), *J. Clin. Invest.*, **59**, 1151—1157.
116. Hauschka P. V., Friedman P. A., Praveso H. P., Gallop P. M., (1976), *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1207—1213.
117. Tuan R. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1356—1364.
118. Friedman P. A., Hauschka P. V., Shia M. A., Wallace J. K., (1979), *Bioch. Biophys. Acta*, **589**, 261—265.
119. Van Burskirk J. J., Kirsch W. M., (1978), *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 1033—1038.

IRENA STIASNA *) , JOLANTA GRABOWSKA-HIBNER *)
BOGDAN SZUKALSKI **)

Metabolizm alkoholu etylowego w wątrobie

Metabolism of Ethanol in the Liver

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Metabolizm etanolu w cytoplazmie
- III. Udział retikulum endoplazmatycznego w utlenianiu etanolu
 - III-1. Peroksydacyjna aktywność katalazy
 - III-2. Dehydrogenaza aldehydowa
- IV. Adaptacyjne zmiany w hepatocytach
 - IV-1. Jakościowe i ilościowe zmiany mikrosomalnych fosfolipidów
 - IV-2. Indukcja swoistego cytochromu P-450 przez przewlekle podawany etanol
- V. Rola mitochondriów w metabolizmie etanolu
 - V-1. Wpływ etanolu na biosyntezę białka w mitochondriach
 - V-2. Aktywność układów transportujących równoważniki redukcyjne
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Metabolism of ethanol in the cytoplasm
- III. Participation of endoplasmatic reticulum in oxidation of ethanol

*) Mgr, Zespół Dydaktyczny Biochemii II Wydziału Lekarskiego A.M. w Warszawie.

**) Prof. dr hab., Zakład Biochemii Instytutu Psychoneurologicznego i Zespół Dydaktyczny Biochemii II Wydziału Lekarskiego A.M., 02-957 Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9

Wykaz stosowanych skrótów: ADH — dehydrogenaza alkoholowa; NAD^+ i NADH_2 — dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy i jego postać zredukowana; NADP^+ i NADPH — fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego i jego forma zredukowana; FAD — dwunukleotyd flawinoadeninowy; MEOS (Microsomal Ethanol Oxidizing System) — Mikrosomalny Układ Utleniania Etanolu; CCCP — karbonylocyjanek m — chlorofenylohydrazonu.

III-1. Peroxidative activity of catalase**III-2. Acetaldehyde dehydrogenase****IV. Adaptational changes in hepatocytes****IV-1. Qualitative and quantitative changes of microsomal phospholipids****IV-2. Induction of specific cytochrom P-450 by chronic exposure to ethanol****V. Role of mitochondria in metabolism of ethanol****V-1. Effect of ethanol on mitochondrial protein biosynthesis****V-2. Activity of Reducing Transporting Systems****VI. Concluding remarks****I. Wstęp**

Alkohol etylowy, obok heroiny, kokainy i marihuany jest najbardziej znanym środkiem zmieniającym nastrój. Efekty jego działania na ośrodkowy układ nerwowy, zarówno przyjemne jak i przykre, są dobrze znane, mniej natomiast wiadomo o nim jako o silnej truciznie metabolicznej. Nadużywanie etanolu oprócz głębokich zmian morfologicznych i czynnościowych wątroby, wywołuje również zaburzenia wielu procesów metabolicznych, które mogą doprowadzić do inwalidztwa i śmierci.

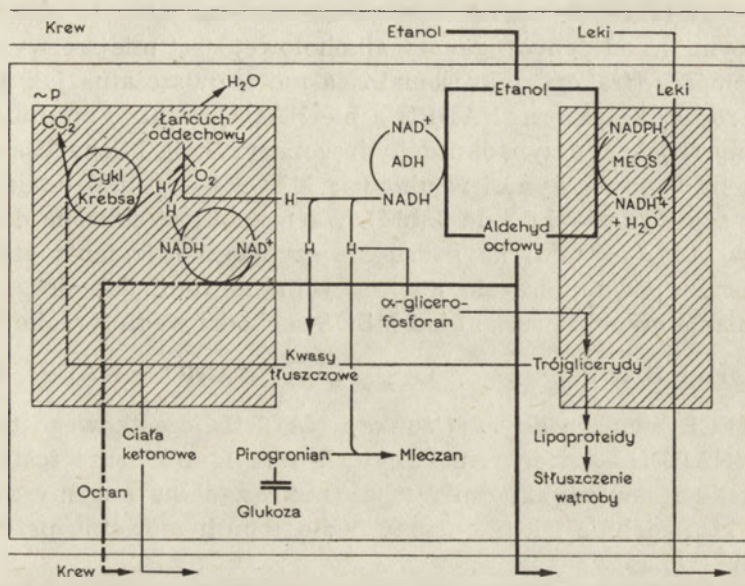
Artykuł stanowi prezentację aktualnych poglądów na ten temat oraz omówienie biochemicznych uwarunkowań zjawiska adaptacji ustroju do długotrwałej podaży etanolu.

II. Metabolizm etanolu w cytoplazmie

Alkohol etylowy ulega w wątrobie intensywnemu metabolizmowi, którego produktami pośrednimi są aldehyd i kwas octowy, a produktami ostatecznymi dwutlenek węgla i woda. Tylko nieznaczna część etanolu, nie przekraczająca 10%, opuszcza ustrój w postaci niezmodyfikowanej przez nerki i płuca (1).

Etap utleniania alkoholu etylowego do aldehydu octowego katalizuje dehydrogenaza alkoholowa (ADH) (oksydoreduktaza alkohol: NAD^+ E.C. 1.1.1.1.), charakteryzująca się małą swoistością: utlenia ona zarówno alkohole alifatyczne jak i cykliczne, w tym również związki sterydowe (2). Miejscem występowania dehydrogenazy jest cytoplazma komórek wątroby. Z etanolu powstaje tam aldehyd octowy, który może ulec w mitochondriach dalszemu utlenieniu do octanu lub opuścić wątrobę w formie nieutlenionej. W katalizowanym przez dehydrogenazę procesie utleniania alkoholu etylowego powstaje NADH, który gromadzi się w cytoplazmie, ograniczając szybkość nie tylko utleniania etanolu, ale także innych reakcji o charakterze oksydoredukcyjnym zachodzących w cytoplazmie (2). Usuwanie NADH z cytoplazmy utrudnia nieprzepuszczalność błon mitochondrialnych dla nukleotydów, których transport odbywa się dzięki

tw. układom wahadłowym, przenoszącym równoważniki redukcyjne do mitochondriów (3). Tak więc intensywność przebiegu oksydacyjnej degradacji etanolu zależy od sprawności układów transportujących oraz zdolności mitochondriów do utleniania równoważników redukcyjnych.



Ryc. 1. Drogi utleniania alkoholu etylowego i jego wpływ na niektóre procesy metaboliczne w komórkach wątroby.

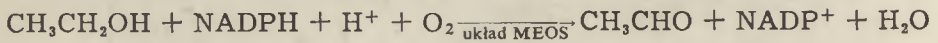
Wzrost poziomu NADH, towarzyszący utlenianiu etanolu przez dehydrogenazę alkoholową, wywołuje naruszenie stanu równowagi oksydo-redukcyjnej w cytoplazmie hepatocytów i zahamowanie niektórych przemian metabolicznych (Ryc. 1). Np. proces glukoneogenezy z aminokwasów ulega zahamowaniu na etapie pirogronianu, który w warunkach podwyższonego stężenia NADH redukuje się do mlecza. Jest to jedna z najważniejszych konsekwencji intoksykacji alkoholowej, prowadzi bowiem do stanu głębokiej hipoglikemii oraz wzrostu stężenia mlecza w krwi (2). Innym skutkiem zwiększonego poziomu NADH jest nasilenie syntezy α-glicerofosforanu i kwasów tłuszczowych, które w postaci trójglicerydów gromadzą się w hepatocytach, wywołując stłuszczenie wątroby.

Do wzrostu stężenia tłuszczów w wątrobie przyczynia się ponadto upośledzenie utleniania kwasów tłuszczowych w hepatocytach, gdyż mitochondrialne układy oksydoredukcyjne uczestniczą przede wszystkim w utlenianiu równoważników redukcyjnych a dopiero w następnej kolejności — kwasów tłuszczowych (2).

III. Udział retikulum endoplazmatycznego w utlenianiu etanolu

Oprócz dehydrogenazy alkoholowej w utlenianiu alkoholu bierze również udział układ enzymatyczny związany z siateczką śródplazmatyczną, który można badać zarówno *in vivo* jak i w układach izolowanych *in vitro* po wyłączeniu przez pirazol aktywności dehydrogenazy. Charakterystycznymi cechami mikrosomalnego układu utleniania etanolu (MEOS) odróżniającymi go od dehydrogenazy alkoholowej, jest miejsce występowania w komórce (frakcja mikrosomalna a nie rozpuszczalna jak dehydrogenaza), rodzaj kofaktora (NADPH a nie NAD^+), a także optimum pH — ok. 7, a nie 9 jak w przypadku dehydrogenazy. Stała Michaelisa etanolu, wyznaczona *in vitro* wynosi w układzie MEOS 8—10 mM (stała zaś dehydrogenazy wynosi od 0,5 do 2 mM). Wartość ta jest zbliżona do wyznaczonej *in vivo* (8,8 mM) na podstawie szybkości utleniania etanolu po jednoczesnym podaniu pirazolu, a więc wyeliminowaniu dehydrogenazy (4).

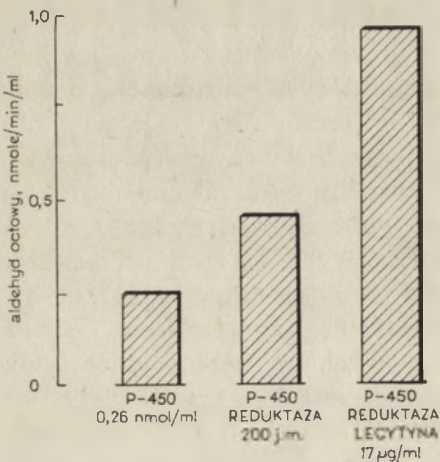
Utlenianie etanolu przez układ MEOS zachodzi według reakcji:



Układ MEOS wymaga do swej funkcji NADPH_2 , cząstkowego tlenu, reduktazy NADPH — cytochrom c, cytochromu P—450 oraz fosfolipidów, a więc takich samych składników jak mikrosomalne enzymy metabolizujące leki. Podobnie jak te enzymy podlega on hamowaniu przez tlenek węgla (5).

Układ MEOS charakteryzuje się dość małą swoistością substratową: metabolizuje bowiem również metanol i alkohole alifatyczne o dłuższym łańcuchu, ale z szybkością zmniejszającą się w miarę wzrostu długości łańcucha alkoholu (6).

Z wyizolowanych składników mikrosomalnych udało się odtworzyć układ MEOS. Najwyższą aktywność w stosunku do etanolu wykazywał

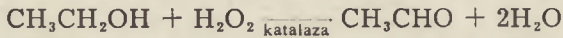


Ryc. 2. Aktywność rekonstruowanego układu utleniającego etanol. (wg 4, 7)

zrekonstruowany układ MEOS zawierający reduktazę NADPH — cytochrom c, cytochrom P-450 oraz lecytynę, a także układ regenerujący NADPH (NADP⁺, izocytrynian i dehydrogenaza izocytrynianowa). Wykazał on również zdolność utleniania niektórych leków (Rys. 2) (7).

III-1. Peroksydacyjna aktywność katalazy

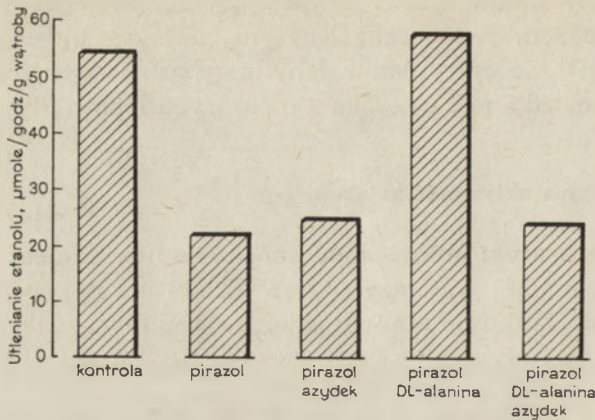
Podczas preparatyki mikrosomów mogą one ulec zanieczyszczeniu śladami peroksysomalnej katalazy, która dzięki swojej peroksydacyjnej aktywności w stosunku do etanolu utlenia go w myśl reakcji:



Utlenianie etanolu zależne od układu MEOS i od katalazy można różnić albo stosując aminotriazol, inhibitor, który całkowicie hamuje katalazę a tylko nieznacznie wpływa na enzymy mikrosomalne (8, 9), albo stosując jako materiał doświadczalny zmutowany szczep myszy o termolabilnej katalazie. Temperatura 37°C eliminuje w mikrosomach pochodzących z takiego szczepu udział katalazy w utlenianiu etanolu (10). Natomiast zrekonstruowany układ MEOS jest całkowicie nieaktywny, jeśli układ regenerujący NADPH zastąpić układem regenerującym nadtlenuk wodoru np. mikrosomalną oksydazą NADPH₂, która wytwarza H₂O₂. W takich warunkach utlenianie etanolu zachodzi pod wpływem katalazy. Powstający w mikrosomach nadtlenuk wodoru ogranicza wprawdzie utlenianie etanolu zależne od układu MEOS (11), jednakże z uwagi na niewielką szybkość powstawania H₂O₂ (1,5—1,7 nmoli/min/mg białka) jego wpływ na katalizowaną przez układ mikrosomalny przemianę etanolu w aldehyd octowy jest znikomy (11, 12).

Szybkość niezależnego od dehydrogenazy alkoholowej utleniania etanolu nie zmienia się znacząco po dodaniu do środowiska inkubacyjnego jej inhibitora (tj. pirazolu) oraz inhibitora katalazy (tj. azydku sodu). Spostrzeżenia te świadczące o niewielkiej roli katalazy w utlenianiu etanolu potwierdzono w doświadczeniach ze skrawkami wątroby i izolowanymi komórkami (13). Aby wykazać, że azydek sodu rzeczywiście wnika do hepatocytów i całkowicie blokuje katalazę, dodawano do środowiska inkubacyjnego DL-alaninę, substrat peroksysomalnej oksydazy D-aminokwasów, która katalizuje reakcję utleniania D-alaniny z utworzeniem H₂O₂. Wzrost szybkości utleniania etanolu przez katalazę i H₂O₂ towarzyszył stymulacji wytwarzania H₂O₂ w układzie wolnym od azydku sodu, natomiast w próbie z inhibitorem szybkość utleniania etanolu nie ulegała zmianie (Ryc. 3).

Badano również metabolizm etanolu w skrawkach wątroby szczurów ze zwierząt otrzymujących inhibitor katalazy — aminotriazol. W godzinę po iniekcji tego związku aktywność katalazy w homogenacie wątroby stanowiła już tylko 3% wartości kontrolnej, jednakże szybkość utleniania



Ryc. 3. Wpływ pirazolu, azydku sodu oraz DL-alaniny na utlenianie etanolu w skrawkach wątroby szczura (wg 4, 6)

etanolu była taka sama, jak w próbkach kontrolnych (6). Tak więc aminotriazol nie wpływał na intensywność utleniania etanolu niewrażliwego na pirazol. Dodanie DL-alaniny silnie pobudzało utlenianie etanolu w kontroli, a nie pobudzało go w skrawkach wątroby zwierząt, które otrzymały aminotriazol. Wskazuje to, że aktywność katalazy ulega zahamowaniu, co potwierdza sugestię o znikomym jej udziale w utlenianiu etanolu. Zgadza się to z wynikami doświadczeń w układzie *in vivo* (14—16), *in vitro* ze skrawkami wątroby (14) oraz z wątrobą perfundowaną (9). Szybkość wytwarzania H_2O_2 w hepatocytach jest zbyt mała $3,6 \mu\text{mole/godz/g}$ wątroby, aby pokryć zapotrzebowanie na ten związek w reakcji peroksydacji etanolu przez katalazę (17).

III-2. Dehydrogenaza aldehydowa

Punktem wyjścia rozważań nad wpływem etanolu na aktywność dehydrogenazy aldehydowej było stwierdzenie, że po jednakowej dawce etanolu stężenie aldehydu octowego we krwi alkoholików jest wyższe niż we krwi pijących alkohol sporadycznie (18, 19). Wzrost ten możnaby wyjaśnić niejednakową wrażliwością na etanol dehydrogenazy aldehydowej, odpowiedzialnej za utlenianie i usuwanie aldehydu octowego. Badania zwierząt otrzymujących etanol nie dały dotąd jednoznacznej odpowiedzi: jedni badacze donosili o wzroście aktywności dehydrogenazy aldehydowej pod wpływem alkoholu etylowego (20), podczas gdy inni nie odnotowali wpływu etanolu na aktywność enzymu (21—23).

W wątrobie szczura wykazano obecność przynajmniej dwóch dehydrogenaz aldehydowych różniących się miejscem występowania w komórce i wartością K_m aldehydu octowego (24). Enzym o niskiej wartości K_m występuje w matrix mitochondriów, podczas gdy enzym o wysokiej wartości znajduje się w ich błonie zewnętrznej oraz we frakcji mikrosomal-

nej (24). Z cytosolu komórek wątroby wyizolowano ponadto dwie zależne od NAD^+ dehydrogenazy aldehydowe o różnym powinowactwie do aldehydu octowego (25).

Badano wpływ podawania etanolu na aktywność dehydrogenaz w różnych frakcjach subkomórkowych, stosując jako substrat aldehyd propionowy w dwóch stężeniach (0,068 i 13,6 mM), wystarczających do wysycenia enzymów o wysokim i niskim powinowactwie wobec tego substratu. Wpływ etanolu podawanego szczurom przez 60 dni zależał od badanej frakcji i stężenia substratu. Aktywność dehydrogenazy aldehydowej o niskim powinowactwie wobec aldehydu propionowego, izolowanej z błon mitochondrialnych, wzrastała o 60%, podczas gdy aktywność enzymu o niskim powinowactwie pochodzącego z frakcji mikrosomalnej ulegała obniżeniu o 50%. Stwierdzono również zmniejszenie o 58% aktywności enzymu o wysokim powinowactwie do aldehydu propionowego pochodzącego z matrix mitochondrialnej (26).

Trudno jednoznacznie ocenić wpływ długotrwałego podawania etanolu na rozmieszczenie i aktywność dehydrogenazy aldehydowej w wątrobie. Zaobserwowana przynajmniej w połowie badanych przypadków indukcja enzymu z błony mitochondrialnej przez etanol (26), chroni prawdopodobnie błonę przed szkodliwym wpływem aldehydu octowego (20). Jest ona prawdopodobnie uwarunkowana genetycznie podobnie jak indukcja enzymu cytosolowego przez fenobarbital (27, 28). Przy czym stwierdzono różnice aktywności dehydrogenazy aldehydowej w wątrobach myszy i szczurów różnych szczepów (29). Długotrwałe przyjmowanie etanolu wywołuje indukcję mitochondrialnych a hamowanie mikrosomalnych enzymów o niskim powinowactwie do aldehydu octowego. Dehydrogenazy o wyższym powinowactwie wobec substratu, występujące w matrix mitochondrialnej ulegają hamowaniu przez etanol. Ilość aldehydu octowego metabolizowana przez różne dehydrogenazy aldehydowe może być niewielka. Fizjologiczna rola poszczególnych enzymów nie jest znana.

IV. Adaptacyjne zmiany w hepatocytach

Długotrwałe podawanie szczurom alkoholu etylowego wywołuje wzrost szybkości jego przemiany (30—32). Nie znamy dotychczas mechanizmu warunkującego tę metaboliczną adaptację.

W wątrobie szczurów otrzymujących etanol w przewlekłym eksperymencie obserwuje się zarówno zmiany patologiczne, jak i adaptacyjne (33) tj.: proliferację gładkiego retikulum endoplazmatycznego (34) (podobnie jak w wątrobie ludzkiej (35)) oraz wzrost zawartości białek i fosfolipidów w mikrosomach gładkich (36).

Ilość i aktywność oksydazy o funkcji mieszanej (37), cytochromu P-450 (38), reduktazy NADPH_2 — cytochrom c (39) oraz zawartości fosfolipidów (36) wzrasta w wyniku przewlekłego działania alkoholu. Długotrwałe

przyjmowanie etanolu zwiększa aktywność wielu enzymów metabolizujących leki, przyspieszając tym samym biotransformację niektórych leków i skracając odpowiednio czas ich działania (40, 41). Jednakże mechanizmy leżące u podstaw wpływu etanolu na biotransformację leków oraz na własny metabolizm nie są znane.

IV-1. Jakościowe i ilościowe zmiany mikrosomalnych fosfolipidów

Przewlekłe podawanie etanolu stanowiącego 36% wartości kalorycznej diety z dietą bogatą w lipidy (36) powoduje wzrost zawartości cytochromu P-450, mikrosomalnych fosfolipidów a także reduktazy NADPH — cytochrom c (42).

Skład mikrosomalnych fosfolipidów różnił się znacznie w zależności od tego czy podawano sam etanol czy wraz z dietą wysokotłuszczową. Dominującym składnikiem mikrosomalnych fosfolipidów jest fosfatydylocholina stanowiąca około 60% całej frakcji. Fosfatydylocholina stanowi około 20%, a fosfoinozytol i lizofosfatydylocholina — około 10%. Sfingomielina, fosfatydyloseryna i kwas fosfatydowy występują w mniejszych ilościach. Po długotrwałym podawaniu etanolu poziom fosfatydylocholine wzrasta około 25% a sfingomieliny — spada ponad 20%, natomiast zawartość fosfatydyloetanolaminy nie ulega istotnym zmianom.

Skład kwasów tłuszczowych fosfatydylocholine badano za pomocą chromatografii gazowej (42). W kontroli nasycone kwasy tłuszczowe, głównie kwas stearynowy, stanowiły ponad 50% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w fosfatydylocholinie. Pośród kwasów nasyconych, kwas arachidonowy występował w ilości dwukrotnie większej niż kwasy oleinowy i linolenowy łącznie. Po długotrwałym przyjmowaniu alkoholu znacznemu obniżeniu ulega ilość kwasów nasyconych, głównie kwasu palmitynowego. Jednocześnie o 4% wzrastała ogólna ilość kwasów nienasyconych przy czym ilość kwasu oleinowego wzrastała o 28%, linolenowego o 18%, natomiast ilość kwasu arachidonowego ulegała znacznemu obniżeniu. Badano również skład kwasów tłuszczowych w drugim ważnym mikrosomalnym fosfolipidzie — fosfatydyloetanolaminie. Nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe występowały w tych samych stosunkach i składzie jak w fosfatydylocholinie.

Wpływ etanolu na skład fosfolipidów badano w doświadczeniach (42), w których etanol (36% całkowitej wartości kalorycznej diety) podawano z dietą o niskiej zawartości tłuszczów (zaledwie 2% wartości kalorycznej diety).

Przewlekłe podawanie etanolu wraz z dietą niskotłuszczową nie wywołuje w mikrosomalnych fosfolipidach zmian ilościowych, lecz jedynie niewielkie zmiany jakościowe, wyrażające się różnym składem komponenty kwasowej (42, 43).

IV 2. Indukcja swoistego cytochromu P-450 przez przewlekle podawany etanol

Czynność mikrosomalnego układu oksydazy o funkcji mieszanej wymaga obecności trzech składników: cytochromu P-450, reduktazy NADPH₂-cytochrom c oraz fosfolipidów (33). Długotrwała podaż fenobarbitalu i metylocholantrenu indukuje powstanie odmian cytochromów P-450 o różnej swoistości substratowej (44). Badanie siateczki endoplazmatycznej wykazało, że hemoproteina indukowana przez długotrwałą podaż etanolu ma widmo podobne do widma hemoprotein indukowanych przez fenobarbital (38).

Opisano indukcję — przez etanol — odmiany cytochromu P-450 wykazującej powinowactwo do cyjanków (45, 46). W mikrosomach szczurów otrzymujących etanol O-dealkilacja etoksykumaryny ulega silniejszemu hamowaniu przez tetrahydrofuran niż w mikrosomach szczurów otrzymujących fenobarbital lub benzopiren (47). Zaobserwowano również, że etanol jest silniejszym induktorem mikrosomalnego enzymu hydroksylującego anilinę niż fenobarbital czy metylocholantren, a tetrahydrofuran silniej hamuje zjawisko indukcji w mikrosomach szczurów otrzymujących etanol niż metylocholantren czy fenobarbital.

Silniejsze wiązanie się tetrahydrofuranu z mikrosomami pochodzącymi od zwierząt po etanolu niż po fenobarbitalu, metylocholantrenie i kontrolnych sugeruje obecność specyficznego cytochromu P-450 indukowanego przez etanol.

Charakterystyka spektralna częściowo oczyszczonych cytochromów P-450, pochodzących z różnych źródeł, potwierdziła powstawanie pod wpływem długotrwałego podawania etanolu odmiany cytochromu P-450 różniącej się od cytochromów indukowanych przez metylocholantren czy fenobarbital (42).

Badano również cytochromy P-450 z różnych źródeł pod względem aktywności katalitycznej w obecności trzech substratów: benzofetaminy, benzopirenu i aniliny (42). Cytochrom P-450 indukowany podaniem etanolu wykazywał najwyższą aktywność w hydroksylacji aniliny, indukowany przez fenobarbital w N-demetylacji benzofetaminy, a indukowany metylocholantrinem w hydroksylacji benzopirenu. Natomiast cytochrom P-450 izolowany z wątroby zwierząt otrzymujących dietę kontrolną wykazuje niską aktywność wobec tych substratów. Ponieważ we wszystkich doświadczeniach ilość reduktazy NADPH₂ — cytochrom c oraz fosfolipidów była jednakowa, wyniki świadczyły o różnej specyficzności substratowej badanych hemoprotein.

Powstawanie katalitycznie i spektralnie różnej formy cytochromu P-450 pod wpływem przewlekłego przyjmowania etanolu może stanowić punkt wyjścia dla wyjaśnienia metabolizmu biologicznego oddziaływania alkoholu etylowego.

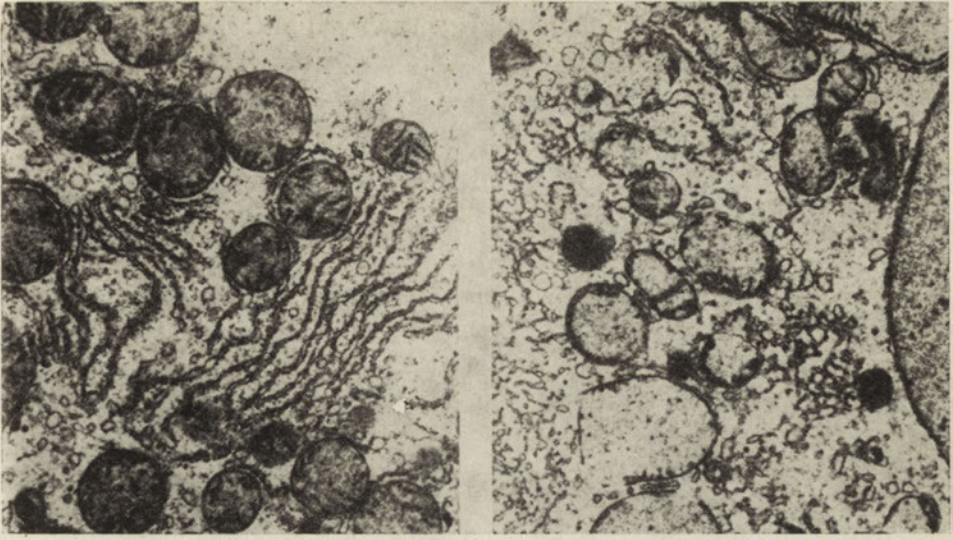
V. Rola mitochondriów w metabolizmie etanolu

Zastosowanie etanolu jako izokalorycznego substytutu węglowodanów w pełnowartościowej diecie prowadzi do zaburzenia ultrastruktury mitochondriów polegającej na obrzmieniu i zniekształceniu tych organeli oraz zmianie układu grzebieni śródmitochondrialnych (33) (Ryc. 4). Biochemicznym wskaźnikiem uszkodzenia błon mitochondrialnych jest aktywność ATP-azy zależnej od Mg^{2+} , która wzrasta w wątrobie narażonej na ostry lub przewlekły wpływ etanolu (48, 49). Okres regeneracji wątroby, tj. okres zanikania uszkodzeń w mitochondriach, trwa 5 dni po odstawieniu alkoholu, przy czym aktywność enzymu wraca do normy wcześniej niż zmiany morfologiczne są jeszcze widoczne (50). Należy jednak odnotować również doniesienia o braku zmian aktywności ATP-azy pod wpływem etanolu (51, 52, 53). Dopiero ostatnio Hosein i wsp. (54) posługując się graficzną metodą Arrheniusa potwierdzili ostatecznie korelację pomiędzy uszkodzeniem błony mitochondrialnej, spowodowanym długotrwałym wpływem etanolu, a zmianami kinetyki ATP-azy aktywowanej Mg^{2+} . Wydaje się jednak, że wpływ alkoholu nie dotyczy wyłącznie tego enzymu, ale większości enzymów występujących w błonach mitochondrialnych.

V-1. Wpływ etanolu na biosyntezę białka w mitochondriach

Morfologiczne zmiany błon mitochondrialnych, widoczne na obrazie mikroskopowym (Ryc. 4) mogą być wynikiem zmienionej syntezy białka, zarówno mitochondrialnej jak i cytoplazmatycznej pod wpływem długotrwałego oddziaływania alkoholu. Niektórzy autorzy sugerują, że obserwowane zmiany są wynikiem uszkodzenia procesu biogenezy błon mitochondrialnych. Mitochondrialna synteza białka różni się od syntezy w cytoplazmie i jest odpowiedzialna za powstanie ok. 10% mitochondrialnych enzymów oraz innych białkowych składników błon mitochondrialnych. Wbudowanie białek do błony mitochondrialnej zachodzi w tym samym czasie, co wbudowanie składników lipidowych, tak więc szybkość inkorporacji znakowanych aminokwasów może służyć do oceny procesu biogenezy błony mitochondrialnej (55).

Okres, w którym zachodzi połowiczna przemiana białek mitochondrialnych, oszacowany na podstawie wprowadzenia znakowanej argininy, wynosi ok. 6,8 dni. Interesujące było określenie, czy pod wpływem alkoholu szybkość syntezy białka w mitochondriach ulega zmianie, a także czy ewentualna zmiana wpływa na całkowitą przemianę białek mitochondrialnych. Okres półtrwania mitochondriów wątroby zwierząt otrzymujących alkohol ulega skróceniu do 4 dni, jest więc ok. 2 dni krótszy niż mitochondriów kontrolnych. W ciągu 4 tygodni (przeciętny okres



Ryc. 4. Zmiany w mikrostrukturze komórki wątroby szczura wywołane alkoholem etylowym.

Z lewej obraz kontrolny — widoczne prawidłowe mitochondria i szorstkie retikulum endoplazmatyczne. Z prawej — obraz hepatocytu ze zmianami poalkoholowymi; widoczne jest zniszczenie struktury mitochondriów i proliferacja gładkiego retikulum endoplazmatycznego.

podawania alkoholu zwierzętom doświadczalnym) w mitochondriach zwierząt kontrolnych pozostaje tylko 4% oryginalnego białka mitochondrialnego, podczas gdy w mitochondriach zwierząt otrzymujących etanol („etanolowych”) — mniej niż 1% (55).

Inkorporacja znakowanej leucyny do białek mitochondrialnych *in vitro* obniża się znacznie w mitochondriach „etanolowych”. Ponadto elektroforeza białek z mitochondriów uprzednio inkubowanych ze znakowanym aminokwasem wskazuje na ogólne obniżenie syntezy białka w mitochondriach (55). Nie jest znany etap mitochondrialnej syntezy białka, na który działa etanol. Synteza białka w mitochondriach dostarcza kilkanaście ważnych enzymów związanych z błonami mitochondrialnymi, w tym oksydazę cytochromową, ATP-azę wrażliwą na oligomycynę oraz cytochrom b, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Aktywność kilku enzymów z wewnętrznej błony mitochondrialnej ulega obniżeniu pod wpływem długotrwałego działania etanolu (55), np. aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, cytochromów a i a₁ oraz cytochromu b.

Etanol może wpływać także na wiele enzymów mitochondrialnych, takich jak polimeraza DNA, polimeraza RNA i enzymy łańcucha oddechowego. Zahamowanie wewnątrzmitochondrialnej inkorporacji leucyny może być wynikiem skrócenia okresu półtrwania białek mitochondrialnych w mitochondriach „etanolowych”. Może to prowadzić do obniżenia

liczby nienaruszonych i funkcjonalnie sprawnych mitochondriów wątroby u zwierząt otrzymujących przewlekle etanol. Nieodwracalne uszkodzenie wątroby człowieka i zwierząt z rzędu naczelnych następuje w wyniku około rocznego okresu spożywania etanolu (56).

V-2. Aktywność układów transportujących równoważniki redukcyjne

Jak wiemy, enzymem odpowiedzialnym za metabolizm etanolu w cytoplazmie jest dehydrogenaza alkoholowa, a jednym z produktów utleniania etanolu — NADH_2 . Nagromadzenie zredukowanej formy tego nukleotydu w cytoplazmie doprowadza do opisanych poprzednio poważnych zaburzeń metabolicznych. Procesy zachodzące w cytoplazmie nie są na tyle wydajne, aby zapobiec nagromadzeniu się zredukowanych związków powstających podczas utleniania etanolu.

Nieuszkodzona błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla nukleotydów pirydynowych. Cytoplazmatyczne NADH może zostać utlenione w mitochondriach tylko dzięki specjalnym układom wahadłowo transportującym redukcyjne równoważniki do mitochondriów. Są to układy: glicerolowy, jabłczanowo-asparaginianowy oraz układ transportujący równoważniki za pośrednictwem kwasów tłuszczowych.

W świetle doniesień o stymulacji procesu utleniania alkoholu przez długotrwałe jego przyjmowanie, zrozumiałe staje się znaczenie układów transportujących jako czynników, które ograniczają szybkość reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholową. W związku z tym wyłania się interesujący problem, czy etanol może indukować systemy transportujące.

Badanie korelacji między długotrwałym podawaniem alkoholu a szybkością jego utleniania było przedmiotem doświadczeń z zastosowaniem inhibitorów utleniania mitochondrialnego w hepatocytach z wątroby szczurów otrzymujących przewlekle etanol. Inhibitory transportu elektronów w łańcuchu oddechowym powodują nagromadzenie zredukowanych nukleotydów w mitochondriach, co prowadzi do zahamowania układów transportujących równoważniki redukcyjne. Inhibitory te obniżają szybkość utleniania etanolu zarówno w grupie komórek kontrolnych, jak i w hepatocytach zwierząt otrzymujących etanol (57). Zastosowanie inhibitorów transportu elektronów w łańcuchu oddechowym miało na celu spreycyzowanie drogi przepływu równoważników redukujących z cytoplazmy do mitochondriów — tzn. określenia roli i znaczenia poszczególnych wahadeł w całkowitym transporcie wodoru. I tak, antymycyna, która hamuje wszystkie trzy układy transportujące wahadłowo obniżała szybkość utleniania etanolu o 70—80% zarówno w grupie komórek kontrolnych jak i w hepatocytach doświadczalnych. Natomiast rotenon, wpływający tylko na układ jabłczan—asparaginian oraz częściowo na układ transportujący

równoważniki za pośrednictwem kwasów tłuszczowych, obniżał szybkość utleniania etanolu mniej niż o 50% (57).

Nieco inaczej przedstawiają się wyniki badania *in vitro* frakcji mitochondrialnej z dodaniem egzogennych substratów układów transportujących w celu rekonstrukcji badanego układu. Wahadłowo transportujący układ glicerolowy może być hamowany przez cyjanek do wartości początkowej, ale hamować go może również rotenon, który obniża aktywność układu do 50%. Hamujący wpływ rotenonu na układ glicerolowy sugeruje, że w utlenianiu redukcyjnych równoważników z cytoplazmy, oprócz dehydrogenazy glicerofosforanowej związanej z FAD, bierze udział również dehydrogenaza związana z NAD⁺ (58).

Diametralnie różny wpływ na wahadłowo transportujący układ glicerolowy wywiera tyroksyna. Z badań szczurów otrzymujących tyroksynę wynika, że hormon ten podwyższa kilkakrotnie aktywność dehydrogenazy glicerofosforanowej, przy czym zmianom aktywności enzymu towarzyszy wzrost aktywności układu glicerolowego: tyroksyna stymuluje około 7-krotnie aktywność dehydrogenaz i prawie 2-krotnie aktywność układu glicerolowego. Tłumaczy to, dlaczego u zwierząt otrzymujących tyroksynę nie dochodzi w wyniku metabolizmu etanolu do wzrostu stosunku mleczan/pirogronian, chociaż aktywacja układu jest znacznie słabsza niż samego enzymu. Wyniki te dowodzą, że aktywność dehydrogenazy glicerofosforanowej nie stanowi momentu ograniczającego aktywność całego układu. Również penetracja α -glicerofosforanu do mitochondriów nie ogranicza transportu równoważników redukcyjnych z cytoplazmy. Wydaje się, że przyczyną nasilenia transportu po podaniu tyroksyny jest wzrost przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym, czyli nasilenie reoksydacji nukleotydów (58).

Układ jabłczan-asparaginian podlega również hamowaniu przez związki rozprzegające fosforylację oksydacyjną, np. karbonylocyjanek m-chlorofenylohydrazonu (CCCP), a także przez oligomycynę, co dowodzi, że dla sprawnego działania układu niezbędne jest dostarczenie energii (58).

W hepatocytach szczurów otrzymujących przewlekle etanol jego utlenianie zachodzi o 50% szybciej niż w hepatocytach kontrolnych zarówno w doświadczeniach z zastosowaniem inhibitorów jak i bez nich. Inhibitory te nie wpływają więc na adaptacyjny wzrost szybkości utleniania (57).

Oligomycyna powoduje zmniejszenie szybkości utleniania etanolu (o około 50%) w obu typach komórek z tym, że szybkość ta — podobnie jak w przypadku antymycyny i rotenonu — jest większa w hepatocytach zwierząt pozostających pod długotrwałym wpływem alkoholu. Natomiast cyjanek hamujący utlenianie mitochondrialne i utlenianie mikrosomalnego cytochromu P-450 (30) — powoduje znaczne obniżenie szybkości utleniania etanolu. W obecności cyjanku hepatocyty izolowane z wątroby szczurów otrzymujących przewlekle etanol nie wykazywały, w porówna-

niu z kontrolą, wzrostu szybkości jego przemiany, a więc zablokowania cytochromu P-450 — składnika układu MEOS — znosi adaptacyjne przyspieszenie utleniania etanolu. Świadczy to o znacznej roli układu MEOS w mechanizmie adaptacyjnym.

W obecności inhibitorów aminotransferazy asparaginianowej — siarczanu hydrazyny i aminooctanu — oraz inhibitorów transportu glutamianu, jabłczanu i α -ketoglutaranu, szybkość utleniania etanolu zmniejsza się o połowę zarówno w grupie zwierząt kontrolnych jak i otrzymujących etanol. Długotrwałe działanie etanolu nie zmienia więc wrażliwości systemów transportujących na te inhibitory, chociaż mechanizmy adaptacyjne sprawiają, że szybkość utleniania etanolu jest większa (59).

ADP powstający w reakcji katalizowanej przez ATP-azę — Na^+ , K^+ — zależną może stymulować procesy mitochondrialnego utleniania, a więc tym samym utlenianie etanolu. Oubaina — inhibitor Na^+/K^+ -ATP-azy (60) — hamuje utlenianie etanolu w tym samym stopniu w hepatocytach zaadaptowanych do utleniania etanolu co i w kontrolnych, jednakże nie zapobiega adaptacyjnemu wzrostowi szybkości utleniania etanolu.

Trzeci układ transportujący równoważniki redukcyjne do mitochondriów — układ transportujący za pośrednictwem kwasów tłuszczowych — ulega trzykrotnie silniejszej aktywacji przez dodanie do mieszaniny inkubacyjnej kwasów tłuszczowych (palmitynianu i oleinianu); aktywność wzrasta dodatkowo po dodaniu cytrynianu lub karnityny (od 5 do 6 razy). Aktywność układu ulega obniżeniu do 20—30% — jak w omówionych wyżej układach transportujących — pod wpływem inhibitorów transportu elektronów, czynników rozprzegających i inhibitorów ATP-azy (58) zarówno w grupie zwierząt kontrolnych jak i otrzymujących etanol.

W doświadczeniach *in vitro* z rekonstruowanymi układami transportującymi równoważniki redukcyjne wykazano, że kombinacja dwóch dowolnych układów wywołuje wzrost utleniania etanolu, będący w przybliżeniu sumą aktywności układów pojedynczych. Jednakże dodanie zrekonstruowanego trzeciego układu nie powoduje już wzrostu utleniania alkoholu. Czynnikiem ograniczającym transport równoważników redukcyjnych do mitochondriów jest intensywność utleniania wszystkich możliwych substratów przy udziale dehydrogenaz związanych z NAD^+ w warunkach stanu trzeciego mitochondriów. Intensywność tych reakcji oksydacyjnych jest jednak od dwu do trzech razy wyższa od maksymalnego nasilenia utleniania etanolu. Etanol, ulega utlenianiu w skrawkach wątroby oraz w izolowanych komórkach tego narządu z maksymalną szybkością — $0,75 \mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ wątroby. Podczas utleniania 1 mola etanolu powstają 2 mole NADH (pierwszy z udziałem dehydrogenazy alkoholowej, drugi — przy udziale dehydrogenazy aldehydu octowego). Tak więc w warunkach maksymalnego nasilenia metabolizmu etanolu transport równoważników redukcyjnych jest rzędu $1,5 \mu\text{mola NADH}/\text{min}/\text{g}$ wątroby. Porównanie wyliczeń teoretycznych intensywności transportu

z wynikami doświadczeń — 1,3 $\mu\text{mola NADH}/\text{min}/\text{g}$ wątroby — prowadzi do wniosku, iż transport ten w rzeczywistości przebiega z mniejszą intensywnością (58). Ponadto stwierdzono, że istotną rolę w odciążeniu wahadeł odgrywa dehydrogenaza aldehydu octowego (61, 62). 80% całkowitej aktywności dehydrogenazy aldehydowej stwierdzono we frakcji mitochondrialnej — a więc aldehyd ulega utlenieniu przede wszystkim w mitochondriach i proces ten nie wymaga układów transportujących równoważniki redukcyjne. Intensywność transportu wodoru podczas utleniania etanolu obniża się więc do około 0,75 $\mu\text{mola NADH}/\text{min}/\text{g}$ wątroby. Przy równoczesnym utlenianiu etanolu przez układ MEOS, które stanowi 20% całkowitego metabolizmu etanolu, ilość transportującego wodoru ulega dodatkowemu obniżeniu i teoretycznie wystarczyłoby tylko jeden układ transportujący. Ponieważ wszystkie trzy układy w jednakowym stopniu uczestniczą w transporcie, reoksydacja NADH w mitochondriach nie ogranicza metabolizmu etanolu, jak również nie stanowi mechanizmu adaptacyjnego. Miejszem ograniczającym nie jest również ADH, gdyż doświadczenia z 24 różnymi stężeniami enzymu nie wykazały znaczących zmian w poziomie utleniania etanolu (58).

VI. Uwagi końcowe

Pod wpływem długotrwałego działania etanolu wykształcają się w wątrobie specjalne mechanizmy adaptacyjne, dzięki którym metabolizm alkoholu przebiega sprawnie. W ustroju niezaadaptowanym główną drogą utleniania etanolu jest reakcja katalizowana przez dehydrogenazę alkoholową. Podczas długotrwałego przyjmowania etanolu w hepatocytach zachodzi proliferacja gładkiego retikulum endoplazmatycznego i aktywacja procesu utleniania etanolu zależnego od enzymów mikrosomalnych. Pod wpływem długotrwałej podaży etanolu powstaje specyficzny cytochrom P-450 o odmiennej charakterystyce spektralnej. Cytochrom ten jest bardziej aktywny w metabolizmie niektórych związków egzogennych, np. aniliny, niż cytochromy indukowane przez długotrwałą podaż innych związków, np. metylocholantrenu czy fenobarbitalu. Innym dowodem udziału cytochromu P-450 w adaptacyjnym nasileniu utleniania etanolu jest działanie cyjanku, który blokując cytochrom P-450 znosi równocześnie utlenianie etanolu przez układ MEOS zwiększone długotrwałym działaniem alkoholu. Na rolę układu MEOS w adaptacyjnym wzroście szybkości utleniania etanolu wskazuje również zwiększone pobieranie tlenu przez mikrosomy podczas utleniania etanolu w organizmach stale narażonych na ten związek. Dehydrogenaza alkoholowa nie wpływa na adaptacyjny wzrost utleniania etanolu, a niekiedy jej aktywność pod wpływem etanolu ulega nawet obniżeniu.

Wzrost szybkości utleniania etanolu nie zależy od układów wahadło-

wych — transportujących do mitochondriów równoważniki redukcyjne. Przeciwnie — długotrwale podawany etanol zmniejsza ilość normalnie funkcjonujących mitochondriów i narusza biogenezę błony mitochondrialnej.

Zaakceptowano do druku 16.8.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Lieber C. S., (1970), *Gastroenterology*, **59**, 930—987.
2. Lieber C. S., (1976), *Scientific Amm.*, **234**, 25—33.
3. Lehninger A. L., (1951), *J. Biol. Chem.*, **190**, 345—359.
4. Teschke R., Matzuzaki S., Ohnishi K. D., DeCarli L. M., Lieber C. S., (1977), *Alcoholism: Clin Exp. Res.*, **1**, 7—15.
5. Teschke R., Hasumura Y., Lieber C. S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7397—7402.
6. Teschke R., Hasumura Y., Lieber C. S., (1976), *Arch. Biochem.*, **172**, 635—643.
7. Ohnishi K., Lieber C. S., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 706.
8. Khana J. M., Kalant H., Lin G., (1970), *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2493—2499.
9. Papenberg J., von Wartburg J. P., Aebi H., (1970), *Enzym. Biol. Clin.*, **11**, 237—250.
10. Teschke R., Hasumura Y., Lieber C. S., (1975), *Molec. Pharmacol.*, **11**, 841.
11. Thurman R. G., Ley H. G., Scholz R., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 420—430.
12. Boeveris A., Oshino N., Change B., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 617—630.
13. Matzuzaki S., Lieber C. S., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 707—714.
14. Smith M. E., (1961), *J. Pharmacol.*, **134**, 233—242.
15. Roach M. K., Khan M., Knapp M., Reese W. N., (1972), *Quart. J. Stud. Alcohol.*, **33**, 751—762.
16. Feytmans E., Leighton F., (1973), *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 349—360.
17. Lieber C. S., DeCarli L. M., (1972), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **181**, 279—287.
18. Truitt J. E. B., (1971) w *Biological Aspects of Alcohol*, red. Roach M. K., McIssac W. M., Creaven P. J., 212—232, University of Texas Press.
19. Korsten M. A., Matsuzaki S., Feinman L., Lieber C. S., (1975), *New. Eng. J. Med.*, **292**, 386—389.
20. Horton A. A., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **253**, 514—517.
21. Tottmar S. O. C., Kiessling K. H., Forsling M., (1974), *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **35**, 270—276.
22. Redmond G., Cohen G., (1971), *Science*, **117**, 387—389.
23. Raskin N. H., Sokoloff L., (1972), *Nature*, **236**, 138—140.
24. Horton A. A. Barret M. C., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 426—436.
25. Shum J. G., Blair A. H., (1972), *Can J. Biochem.*, **50**, 741—748.
26. Greenfield N. J., Pietruszko R., Lin G., Lester D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 627—632.
27. Deitrich R. A., (1971), *Science*, **173**, 334—336.
28. Deitrich R. A., Collins A. C., Erwin V. G., (1972), **247**, 7232—7236.
29. Sheppard J. R., Albersheim P., McClearn G. E., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2876—2882.

30. Lieber C. S., DeCarli L. M., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2505—2512.
31. Tobon F., Mozey E. J., (1971), *Lab. Clin. Med.*, **77**, 110—121.
32. Videla L., Israel Y., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 275—281.
33. Lieber C. S., Teschke R., Hasumura Y., DeCarli L. M., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 2060—2074.
34. Iseri O. A., Lieber C. S., Gottlieb L. S., (1966), *Am. J. Pathol.*, **48**, 535—555.
35. Lane B. P., Lieber C. S., (1966), *Am. J. Pathol.*, **49**, 593—603.
36. Ishii H., Joly J. G., Lieber C. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 411—420.
37. Lu A. Y., Strobel H. W., Coon M. J., (1970), *Mol. Pharmacol.*, **6**, 213—220.
38. Rubin E., Lieber C. S., Alvares A. P., Levin W., Kuntzman R., (1971), *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 229—231.
39. Joly J-G., Ishii H., Teschke R., Hasumura Y., Lieber C. S., (1973), *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 1532—1535.
40. Khana J. M., Kalant H., Yee Y., Chung S., Siemens A. J., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 329—335.
41. Kalant H., Khana J. M., Lin G. Y., Chung S., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 337—342.
42. Joly J-G., Villeneuve J-P., Mavier P., H'etu C., (1977), w *Alcohol and Liver*, red. Fisher M. M., Rankin J. G., 101—118, Plenum Press New York and London.
43. Joly J-G, H'etu C., (1975), *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1475—1480.
44. Levin W., Lu A. Y., Ryan D., West S., Kuntzman R., Conney A. H., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 543—553.
45. Joly J-G., Ishii H., Lieber C. S., (1972), *Gastroenterology*, **62**, 174.
46. Comai K., Gaylor R. J. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4947—4955.
47. Ullrich V., Weber P., Wollenberg P., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 808—813.
48. Israel M., Kuriyama K., (1971), *Life Sci.*, **10**, 591—599.
49. Walker J. E. C., Gordon E. R., (1970), *Biochem. J.*, **119**, 511—516.
50. Gordon E. R., Lough J., (1972), *Lab. Invest.*, **25**, 154—162.
51. Videla L., Berustein J., Israel Y., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 507—514.
52. Cederbaum A. J., Lieber C. S., Rubin E., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 560—569.
53. Gordon E. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8271—8280.
54. Hosein E. A., Hofmann I., Linder E., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 64—72.
55. Hofman I., Hosein E. A., (1978), *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 457—463.
56. Lieber C. S., DeCarli L. M., (1975), *Adv. Exp. Med. Biol.*, **59**, 379—385.
57. Cederbaum A., Dicker E., Lieber C. S., (1978), *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 7—15.
58. Cederbaum A., Lieber C. S., Toth A., Beattie D. S., Rubin E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4977—4986.
59. Smith T. W., (1973), *Pharmacol. Rev.*, **25**, 219—228.
60. Williamson J. R., Ohkawa K., Meijer A. J., (1974), w *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*, red. Thurman R. G., Yonetani T., Williamson J. R., Change B., 365—382, Academic Press, N. York.
61. Meijer A. J., van Woerkom G. M., Williamson J. R., Tager J. M., (1975), *Biochem. J.*, **150**, 205—209.
62. Williamson J. R., Meijer A. J., Ohkawa K., (1974), w *Regulation of Hepatic Metabolism*, red. Lundquist F., Tygstrup N., 457—479, Academic Press, N. York.

63. Ylikahri R. M., Mäenpää R. H., (1968), *Acta Chem. Scand.*, **22**, 1707—1709.
64. Israel Y., Videla L., Bernstein J., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 2052—2059.
65. Bernstein J., Videla L., Israel Y., (1974), *Ann. Acad. Sci.*, **242**, 560—572.
66. Bernstein J., Videla L., Israel Y., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 515—522.
67. Gordon E. R., (1977), *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, **1**, 21—25.

EWA TURSKA *

Enzymatyczna i chemiczna charakterystyka mitochondrialnej błony zewnętrznej

Enzymatic and Chemical Characteristics of the Outer Membrane of Mitochondria

Spis treści

- I. Właściwości morfologiczne
- II. Właściwości fizyczne
- III. Skład chemiczny
 - III-1. Białka
 - III-2. Fosfolipidy
 - III-3. Cytoplazmatyczny RNA związany z mitochondrialną błoną zewnętrzną
- IV. Skład enzymatyczny mitochondrialnej błony zewnętrznej

Contents

- I. Morphological properties
- II. Physical properties
- III. Chemical contents
 - III-1. Proteins
 - III-2. Phospholipids
 - III-3. Cytoplasmic RNA bound to the outer mitochondrial membrane
- IV. Enzymatic contents of the outer mitochondrial membrane

Opracowane w ostatnich dziesięciu latach liczne metody frakcjonowania mitochondriów (1—3) przyczyniły się do postępu badań nad funkcją i strukturą obu błon mitochondrialnych, a także pozwoliły na ustalenie składu substancji znajdujących się w przestrzeni międzybłonowej i matriksu.

Niniejszy przegląd stanowi próbę scharakteryzowania mitochondrialnej błony zewnętrznej. Błona ta jest przykładem struktury submitochondrialnej, której rola nie jest jeszcze dokładnie poznana, pomimo dość licznych danych odnośnie jej właściwości fizycznych, chemicznych i enzymatycznych. Zwłaszcza zróżnicowany skład enzymatyczny tej błony może sugerować, że ma ona duże znaczenie w metabolizmie mitochondriów i całej komórki.

* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, Lindleya 6, 90—131 Łódź

I. Właściwości morfologiczne mitochondrialnej błony zewnętrznej

Błona zewnętrzna jest gładka, grubość jej wynosi 50 Å — 70 Å. Obserwacje w mikroskopie elektronowym negatywowo barwionych preparatów mitochondrialnej błony zewnętrznej wątroby szczura i wołu wykazały istnienie wgłębień o średnicy około 60 Å. Również na powierzchni błony zewnętrznej mitochondriów roślin i *Neurospora crassa* występują podobne wgłębienia, o średnicy około 30 Å. Stosując promienie rentgenowskie potwierdzono występowanie tych wgłębień w błonie zewnętrznej mitochondriów ziemniaka i fasoli (4). Sugeruje się, że wgłębienia te mogą reprezentować pory na powierzchni błony (5). Z ich występowaniem wiąże się duża przepuszczalność błony zewnętrznej.

Na wewnętrznej powierzchni błony zewnętrznej mitochondriów wątroby szczura wykazano obszary o większej gęstości elektronowej. Są to „miejsca kontaktowe”, dzięki którym istnieje możliwość połączenia między błonami mitochondrialnymi (6, 7). Za obecnością takich miejsc przemawiałby fakt, że fragmenty błony zewnętrznej utworzone po działaniu digitoniną przyczepiają się do błony wewnętrznej (8). W obrębie miejsc kontaktowych prawdopodobnie znajdują się specyficzne białka, ulegające trawieniu proteinazą (9). Na jeden mitochondrion przypada około 150 miejsc kontaktowych. Rozkład ich w błonie zewnętrznej jest przypadkowy. Butow i wsp. wykazali, że do błony zewnętrznej w pobliżu miejsc kontaktowych przyczepione są rybosomy cytoplazmatyczne, na których odbywa się translacja polipeptydów przeznaczonych dla mitochondriów (cytowane za Hackenbrockiem i Millerem (poz. 7)). Prawdopodobnie w miejscu kontaktu błony zewnętrznej z błoną wewnętrzną zachodzi tworzenie białek błonowych z polipeptydów syntetyzowanych na rybosomach cytoplazmatycznych i mitochondrialnych.

Zależnie od metody subfrakcjonowania mitochondriów uzyskuje się różnej wielkości pęcherzyki pochodzące z błony zewnętrznej. I tak, pęcherzyki otrzymane przy użyciu detergentów mają średnicę około 90 Å (1), podczas gdy przy zastosowaniu ultradźwięków (sekundowe czasy sonifikacji) wielkość ich może się wahać od 600 Å do 4000 Å (10).

Ciężar właściwy mitochondrialnej błony zewnętrznej organizmów wyższych wynosi 1,094—1,122 g/cm³ (11), drożdży — 1,084 g/cm³ (12) i *Neurospora crassa* — 1,07—1,10 g/cm³ (13).

II. Właściwości fizyczne

Obie błony mitochondrialne różnią się znacznie między sobą właściwościami fizycznymi, a zwłaszcza przepuszczalnością i wrażliwością na zmiany ciśnienia osmotycznego.

Błona wewnętrzna posiada bardzo ograniczoną przepuszczalność. Mogą

przez nią przechodzić cząsteczki niezjonizowane o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 100—150. Transport przez błonę wewnętrzną większości naładowanych cząsteczek odbywa się przy udziale nośników. Istnieją specyficzne układy przenośnikowe, dzięki którym jest możliwy transport do wnętrza mitochondriów ważnych metabolitów, np. nukleotydów adeninowych czy acylo-CoA (14, 15).

W odróżnieniu od błony wewnętrznej, błona zewnętrzna ma charakter błony półprzepuszczalnej. Przechodzą przez nią wszystkie związki o masie cząsteczkowej poniżej 5000 daltonów (16—19) i selektywność ta znalazła zastosowanie w badaniach stopnia uszkodzenia tej błony. Przykładem może być wykorzystanie pomiaru szybkości utleniania zewnętrznie dodanego zredukowanego cytochromu c (19, 20), którego masa cząsteczkowa wynosi około 12 000.

Z uwagi na fakt, że błona zewnętrzna jest nieprzepuszczalna dla związków o dużej masie cząsteczkowej, powstaje problem, w jaki sposób przedostają się do wnętrza mitochondrionu białka mitochondrialne, których synteza odbywa się na rybosomach cytoplazmatycznych. Do chwili obecnej nie wyjaśniono, jaki jest mechanizm transportu tych białek przez błonę zewnętrzną. Istnieją sugestie, że zewnętrzna błona mitochondrialna może posiadać receptory niektórych białek jak np. syntetazy kwasu δ -aminolewulinowego, dzięki którym enzym ten przechodzi z cytosolu do mitochondriów (21).

Błony mitochondrialne zachowują się bardzo odmiennie przy zmianach ciśnienia osmotycznego. Mitochondria umieszczone w roztworze hipotonicznym ulegają pęcznieniu i podczas tego procesu błona zewnętrzna, charakteryzująca się dużą sztywnością (22) ulega rozerwaniu. Zjawisko to wykorzystał *Parsons* i wsp. (2) do oddzielenia frakcji błony wewnętrznej od błony zewnętrznej. Natomiast elastyczna błona wewnętrzna nie ulega zniszczeniu ani w czasie pęcznienia, ani podczas skurczu mitochondriów, wywołanego zwiększeniem ciśnienia osmotycznego. *Lehninger* (23) i *Ohnishi* (24) sugerowali, że różnice w zachowaniu się obu błon mitochondrialnych mogą być spowodowane obecnością białka kurczliwego w błonie wewnętrznej. Hipoteza ta nie została jednak potwierdzona w dalszych badaniach.

Mitochondrialna błona zewnętrzna jest bardziej wrażliwa niż błona wewnętrzna na działanie digitoniny. Błona zewnętrzna mitochondriów wątroby szczura ulega uszkodzeniu przy 0,12 mg digitoniny/mg białka, podczas gdy błona wewnętrzna dopiero przy ilości 0,2—0,4 mg digitoniny/mg białka (1). Związane to jest z różną ilością cholesterolu w obu błonach. Mitochondria serca i brunatnej tkanki tłuszczowej są bardziej odporne na działanie digitoniny. Ich błona zewnętrzna ulega rozerwaniu przy znacznie wyższych ilościach digitoniny (25—27).

Jodowanie mitochondriów powoduje rozerwanie błony zewnętrznej i to już przy użyciu 0,2 nmola J/mg białka, podczas gdy błona wewnętrz-

na ulega dopiero uszkodzeniu przy zastosowaniu 1 nmola J/mg białka. Jodowanie mitochondriów powoduje peroksydację lipidowych składników błon i prowadzi do pęcznienia mitochondriów (28).

Usunięcie acetonem aż 90% mitochondrialnych fosfolipidów powoduje całkowite zniszczenie błony zewnętrznej bez zniszczenia podstawowej struktury błony wewnętrznej (29).

III. Skład chemiczny mitochondrialnej błony zewnętrznej

Oznaczanie składu chemicznego subfrakcji mitochondrialnych może być dodatkowym kryterium, obok morfologicznego i enzymatycznego, do odróżnienia preparatów obu błon. Białka i fosfolipidy są głównymi, pod względem ilościowym, składnikami błon mitochondrialnych, ale ich wzajemne proporcje są odmienne w obu błonach.

III-1. Białka

Błona zewnętrzna reprezentuje od 4 do 10% całkowitego białka mitochondrialnego (1, 10, 30, 31). Huber i Morrison (30) znakowali mitochondrialne białka wątroby szczura ^{125}J i rozdzielali polipeptydy w żelu poliakryloamidowym. Stwierdzili oni, że około 70% znakowanych białek błony zewnętrznej, otrzymanej metodą digitoninową, posiadało masę cząsteczkową około 14 000 daltonów.

Hayashi i Capaldi (32) wykazali w błonie zewnętrznej mitochondriów serca wołu obecność 14 polipeptydów, o masach cząsteczkowych od 12 000 do 220 000. Białka o dużej masie cząsteczkowej stanowiły tylko 15% wszystkich białek. Rozdziały w żelu poliakryloamidowym wykazały, że ponad 50% stanowią polipeptydy o masach cząsteczkowych 27 000, 34 000 i 46 000 z wyraźną przewagą polipeptydu o masie cząsteczkowej 34 000.

Melnick i wsp. (33) analizując za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym białka poszczególnych frakcji mitochondrialnych wątroby szczura, nie stwierdzili w błonie zewnętrznej białek o wysokiej masie cząsteczkowej. Autorzy ci zaobserwowali cztery pasma w obszarze 10 000—71 000 daltonów; 22% stanowiło białko o masie cząsteczkowej około 30 000 daltonów.

Profile elektroforetyczne w żelu poliakryloamidowym białek błony zewnętrznej mitochondriów roślin wykazują, że 20 do 50% stanowią białka o masie cząsteczkowej 30 000 i 50 000 (4). Błona zewnętrzna mitochondriów *Neurospora crassa* zawiera również jako główny składnik białkowy polipeptyd o masie cząsteczkowej 30 000 (4, 34). Istnieje możliwość, że białko o masie cząsteczkowej około 30 000, które znaleziono we wszyst-

kich preparatach zewnętrznej błony mitochondrialnej stanowi wspólną strukturalną podjednostkę w płaszczyźnie błony zewnętrznej.

W obu błonach mitochondrialnych stwierdzono obecność glikoproteidów (33, 35, 36). Melnick i wsp. (33) wykazali w preparacie błony zewnętrznej mitochondriów wątroby szczura obecność glikoproteidu o masie cząsteczkowej 93 000. Jeżeli preparat błony zewnętrznej poddano działaniu neuraminidazy, to zaobserwowano znaczny spadek w zawartości kwasu sjałowego, wchodzącego w skład tego glikoproteidu. Podobne dane otrzymali również Bosman i wsp. (37). W błonie zewnętrznej znajduje się 4—5 razy więcej kwasu sjałowego niż w błonie wewnętrznej (37, 38). Izolowane glikoproteidy zawierają 2—3 moli Ca^{+2} /mol, co wskazuje, że mogą one odgrywać ważną rolę w interakcji Ca^{+2} z mitochondriami (39).

Stwierdzono, że również z błoną zewnętrzną mitochondriów roślin związana jest duża ilość kwasu uronowego — około 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka błony, co znacznie przewyższa zawartość węglowodanów w błonie zewnętrznej mitochondriów wątroby szczura. Sugerowano, że kwas uronowy odgrywa w roślinach ważną rolę strukturalną, przyczyniając się do mechanicznej wytrzymałości błony zewnętrznej (4).

W preparatach błony zewnętrznej mitochondriów wątroby szczura oraz serca i nerki wołu stwierdzono obecność białka zawierającego żelazo i siarkę (40—42). Funkcja tego białka nie jest jeszcze dokładnie znana. Sugerowano możliwość, że istnieje funkcjonalna zależność pomiędzy tym białkiem a aktywnością reduktazy NADH — cytochrom c niewrażliwej na rotenon (43). Nasuwa się również myśl o możliwości powiązania tego białka z aktywnością monoaminoooksydazy, ponieważ w oczyszczonym preparacie enzymu wykryto Fe^{+2} i mitochondria izolowane z wątroby szczurów będących na diecie ubogiej w Fe^{+2} wykazywały zmniejszoną aktywność tego enzymu (44).

III-2. Fosfolipidy

Skład ilościowy i jakościowy fosfolipidów zewnętrznej błony w porównaniu z błoną wewnętrzną jest odmienny. Błona zewnętrzna wykazuje duże podobieństwo do błon retikulum endoplazmatycznego tak pod względem zawartości fosfolipidów jak i składu kwasów tłuszczowych. Błona zewnętrzna w porównaniu do błony wewnętrznej zawiera 5—6 razy więcej cholesterolu i 2—3 razy więcej fosfolipidów (Tabela 1).

Głównymi fosfolipidami preparatów błon mitochondrialnych otrzymanych z mitochondriów zwierzęcych są fosfatydyloetanolamina i fosfatydylocholina, które stanowią 70—80% wszystkich fosfolipidów. W błonie zewnętrznej występuje jeszcze około 10—15% fosfatydyloinozytolu, a nie ma kardiolipiny, która jest charakterystyczna dla błony wewnętrznej.

Tabela 1

Zawartość lipidów i cholesterolu w mitochondriach, błonach mitochondrialnych i mikrosomach serca świni (31).

	mg lipidów/ mg białka	μmole P lipidowego/mg białka	μmole cholesterolu/mg białka	cholesterol/P lipidowy
Mitochondria	0,30	0,26	0,012	0,042
Błona zewnętrzna	0,85	0,66	0,026	0,068
Błona wewnętrzna	0,48	0,40	0,0047	0,011
Mikrosomy	0,41	0,36	0,048	0,107

Niewielka ilość sfingomieliny obecna w mitochondriach serca świni i wątroby szczura wydaje się być zlokalizowana w błonie zewnętrznej. Nieznaczne ilości kardiolipiny wykrywane natomiast w preparatach błon zewnętrznych prawdopodobnie spowodowane są obecnością fragmentów błony wewnętrznej (Tabela 2).

Ilościowy i jakościowy skład lipidowy preparatów błon zewnętrznych uzyskanych z mitochondriów roślinnych jest bardzo podobny do preparatów otrzymanych z mitochondriów zwierzęcych (4, 45). Również skład

Tabela 2

Procentowy skład fosfolipidów błon mitochondriów wątroby szczura, świnki morskiej i serca świni (31, 38, 45).

	Błona zewnętrzna			Błona wewnętrzna		
	serce świni (31)	wątroba świnki morskiej (45)	wątroba szczura (38)	serce świni (31)	wątroba świnki morskiej (45)	wątroba szczura (38)
Fosfatydylocholina	56,3	55,2	49,4	26,5	44,5	39,2
Fosfatydyloetanola- mina	28,0	25,3	34,9	37,9	27,7	39,9
Kardiolipina	0,4	3,2	4,2	25,4	21,5	15,4
Fosfatydyloglicerol	—	2,5	—	—	2,2	—
Fosfatydyloinozytol	9,3	13,5	9,2	3,4	4,2	3,6
Sfingomielina	4,5	—	4,4	0,5	—	0,8
Lizofosfatydylocho- lina	1,3	—	1,8	0,6	—	0,6

lipidowy mitochondriów nawet organizmów tak odległych filogenetycznie jak *Neurospora crassa* i ssaki jest podobny. Badania składu fosfolipidowego mitochondrialnej błony zewnętrznej *Neurospora crassa* (13) wykazały, że zawiera ona 41% białka i 59% lipidów. Jej głównymi składnikami są fosfolipidy i ergosterol, który jest odpowiednikiem cholesterolu występującego w mitochondriach roślinnych i zwierzęcych. Ponadto w błonie zewnętrznej występuje barwnik — neurosporaksantyna.

Fosfolipidy błony zewnętrznej i błony wewnętrznej zarówno mitochondriów tkanek zwierzęcych jak i roślin wykazują dość znaczne różnice w składzie kwasów tłuszczowych. I tak fosfolipidy błony zewnętrznej są głównie nasycone, w odróżnieniu od błony wewnętrznej, które zawierają znacznie więcej kwasów wielonienasyconych (4, 31, 38, 45).

Różnice w zawartości kwasów tłuszczowych i w stopniu nasycenia mogą w pewnym stopniu tłumaczyć różnice w mechanicznych własnościach obu błon mitochondrialnych. Plastyczność błony wewnętrznej, która rozciąga się stosunkowo łatwo, zarówno biernie jak i aktywnie oraz kurczy się, łączy się ze znaczną zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych. Natomiast „sztywność” błony zewnętrznej, dobrze widoczna w mikroskopie elektronowym, może być spowodowana bardziej nasyconym charakterem fosfolipidów.

III-3. Cytoplazmatyczny RNA związany z błoną zewnętrzną

Ciągłość pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a mitochondrialną błoną zewnętrzną obserwowano w komórkach wątroby szczura, łodygi cebuli i *Tetrahymena* (45). Postulowano, że ciągłość ta odgrywa kluczową rolę w transporcie białek do wnętrza mitochondriów.

Keyhani (46) wykazała w komórkach drożdży *Rhodotorula rubra* związane z mitochondrialną błoną zewnętrzną 80 S rybosomy cytoplazmatyczne. Różnią się one od rybosomów wewnątrzmitochondrialnych zarówno pod względem morfologicznym jak i wrażliwością na antybiotyki. Połączenie tych rybosomów z mitochondrialną błoną zewnętrzną jest znacznie słabsze niż rybosomów przyczepionych do szorstkich błon retikulum endoplazmatycznego. Białka mitochondrialne, które są transportowane do wnętrza mitochondrionu, są przypuszczalnie syntetyzowane również na rybosomach cytoplazmatycznych związanych z mitochondrialną błoną zewnętrzną.

Również Kellems i wsp. (47—50) badali 80 S rybosomy cytoplazmatyczne, które dość mocno związane są z oczyszczonymi preparatami mitochondriów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Izolowane mitochondria inkorporują znakowane aminokwasy i włączanie ich jest w 80% hamowane przez cykloheksimid, inhibitor cytoplazmatycznej syntezy białka.

O połączeniu cytoplazmatycznych rybosomów z błoną zewnętrzną mitochondriów drożdży donosił również Watson (51).

Brak jest danych wykazujących bezpośredni kontakt cytoplazmatycznych rybosomów z mitochondrialną błoną zewnętrzną u wyższych organizmów, co nie wyklucza możliwości, że u eukariontów również może istnieć połączenie cytoplazmatycznych rybosomów z mitochondrialną błoną zewnętrzną.

IV. Skład enzymatyczny mitochondrialnej błony zewnętrznej

Enzymy, których aktywność stwierdzono w błonie zewnętrznej, reprezentują heterogenną grupę z funkcjonalnego punktu widzenia, a ich rola w mitochondriach jest często nieznaną. Skład enzymatyczny wykazuje pewne podobieństwo z enzymami występującymi w błonach retikulum endoplazmatycznego i na tej podstawie sugerowano, że obie te struktury mogą mieć wspólne pochodzenie (52). W tabeli 3 przedstawiono enzymatyczny skład mitochondrialnej błony zewnętrznej.

Analizując informacje zawarte w tabeli 3 można stwierdzić, że w błonie zewnętrznej znajdują się enzymy związane z syntezą i rozpadem fosfolipidów (70—73), enzymy oksydoredukcyjne (1, 3, 9, 10, 12, 18, 32, 53—65), kinazy (74, 79—82) i ATPazy (76—80). W błonie zewnętrznej odbywa się synteza kwasu fosfatydowego i lizofosfatydowego z glicerofosforanu oraz przekształcanie lizofosfolipidów do odpowiednich fosfolipidów. Natomiast w mitochondriach brak jest układów enzymatycznych syntetyzujących de novo główne składniki fosfolipidowe obu błon mitochondrialnych, tzn. fosfatydylocholinę i fosfatydyloetanolaminę.

W błonie zewnętrznej znajduje się fosfolipaza A₂, która różni się od fosfolipazy obecnej w mikrosomach. Enzym ten hydrolizuje fosfatydylocholinę i fosfatydyloetanolaminę, nie działa natomiast na kardiolinę, która jest charakterystycznym składnikiem błony wewnętrznej. Fosfolipaza A₂ występuje również w błonie wewnętrznej, ale jej aktywność specyficzna jest około 4 razy niższa od aktywności enzymu błony zewnętrznej (73).

Śród enzymów oksydoredukcyjnych w błonie zewnętrznej występują: cytochrom b_s, reduktazy: NADH — cytochrom c, NADH — cytochrom b_s, monoaminooksydaza i hydroksylaza kinureny. Reduktaza NADH — cytochrom c w przeciwieństwie do układu enzymatycznego przenoszącego elektrony ze zredukowanego NADH na cytochrom c w błonie wewnętrznej, nie jest hamowana przez inhibitory łańcucha oddechowego takie jak rotenon, amytal i antymycyna A. W retikulum endoplazmatycznym występują podobne układy enzymatyczne reduktaz, które biorą udział w procesach hydroksylacji. Natomiast rola enzymów

Tabela 3

Enzymatyczny skład mitochondrialnej błony zewnętrznej

Nazwa enzymu	Badany materiał	Piśmiennictwo
Reduktaza NADH — cytochrom c niewrażliwa na rotenon, amytal, Antymycynę A (Dehydrogenaza NADH) EC 1.6.99.3. poprzednio EC 1.6.2.1.	wątroba szczura serce szczura serce wołu drożdże rzępa ziemniak fasola	1, 3, 10, 53, 54 9 32 12 55 56 57
Reduktaza cytochromu b ₅ EC 1.6.2.2.	wątroba szczura nerka szczura	9, 10, 18, 58 59
Cytochrom b ₅₅₈	rzępa ziemniak	60 56
Cytochrom b ₅₅₅	fasola	61
Monoaminooksydaza EC 1.4.3.4.	wątroba szczura serce szczura serce wołu	1, 53, 62, 63 9 51
Hydroksylaza kinureninowa EC 1.14.13.9.	wątroba szczura nerka szczura drożdże	1, 59, 64, 65 59 12
Syntetaza acylo-CoA EC 6.2.1.3.	wątroba szczura serce szczura brunatna tkanka tłuszczowa świnki morskiej	66, 67, 68 9 69
Acylotransferaza glicerofosforanowa EC 2.3.1.15.	wątroba szczura	70, 71, 72
Acylotransferaza lizofosfatydowa EC 2.3.1.51.	wątroba szczura	70, 71, 72
Acylotransferaza lizolecytynowa EC 2.3.1.23.	wątroba szczura	73
Cholinfosfotransferaza EC 2.7.8.2.	wątroba szczura	70
Fosfataza fosfatydylowa EC 3.1.3.4.	wątroba szczura	70
Fosfolipaza A ₂ EC 3.1.1.4.	wątroba szczura drożdże	73 73
Kinaza dwufosfonukleozydowa EC 2.7.4.6.	wątroba szczura	74

c.d. Tabeli 3

Nazwa enzymu	Badany materiał	Piśmiennictwo
Dehydrogenaza ksylitolowa (Reduktaza ksylulozowa) EC 1.1.1.10	wątroba świnki morskiej	75
ATPaza zależna od dwuwęglanu	wątroba szczura wątroba żaby	76 76
ATPaza stymulowana przez Mg^{+2} nieczuła na oligomycynę	serce szczura kora nerki szczura śledziona szczu- ra	77 78, 79 78, 80
Heksokinaza EC 2.7.1.1.	mózg szczura serce świni	79, 80 81, 82

oksydoredukcyjnych mitochondrialnej błony zewnętrznej jest dotychczas niewyjaśniona. Występowanie reduktazy NADH — cytochrom c niewrażliwej na rotenon w błonie zewnętrznej uniemożliwia interakcję tego enzymu z wewnątrzmitochondrialnym cytochromem c (10) i wyklucza udział tego enzymu w procesach utleniania i redukcji, przebiegających w błonie wewnętrznej.

K u y l e n s t i e r n a i wsp. (58) wykazali, że w porównaniu do mikrosomalnej, reduktaza NADH — cytochrom c z błony zewnętrznej jest bardziej wrażliwa na inaktywację przez tripsynę.

Obecność cytochromu b_5 stwierdzono w wątrobie i nerce szczura (9, 10, 18, 58, 59). Można go usunąć z błony zewnętrznej działaniem tripsyny lub detergentami (30). Rola cytochromu b_5 w błonie zewnętrznej nie została dokładnie poznana. Uważano, że jest on składnikiem reduktazy NADH — cytochrom c niewrażliwej na rotenon lub że współdziała z nią w redukowaniu cytochromu c (83). M a y e r i wsp. (59) sugerowali, że bierze on udział w hydroksylacji kinureny, ale zostało to wykluczone przez N i s i m o t o i wsp. (83). Pomimo podobnych własności katalitycznych, oba cytochromy b_5 (mikrosomalny i z błony zewnętrznej) wykazują różnice w strukturze oraz własnościach immunologicznych (84).

Rola hydroksylazy kinureny w błonie zewnętrznej jest niewyjaśniona. Inne hydroksylazy posiadające koenzym NADP są związane z retikulum endoplazmatycznym. B a n d l o w (12) sugerował, że enzym ten występuje tylko w błonie zewnętrznej mitochondriów drożdży, ale inni autorzy wykazali jego aktywność również w mitochondriach wątroby i nerki szczura (1, 59, 64). Nie stwierdzono aktywności hydroksylazy kinureny w mitochondriach serca wołu (32). Wykazano dla mito-

chondriów drożdży (85), że aktywność tego enzymu zależy od poziomu wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych. Obserwowano znaczny wzrost aktywności hydroksylazy kinureniny u drożdży hodowanych w medium z dodatkiem kwasu linolenowego. Wykazano również wzrost aktywności w przypadku hodowania drożdży w obecności ergosterolu (86).

Monoaminooksydaza jest szeroko rozpowszechniona w wielu tkankach, ale nie stwierdzono jej aktywności w mitochondriach drożdży. Jest to enzym peryferyczny, niezbyt silnie związany z błoną. W odróżnieniu od hydroksylazy kinureniny i reduktazy NADH — cytochrom c niewrażliwej na rotenon, aktywność monoaminooksydazy nie zmienia się w czasie usuwania lipidów z preparatu błony zewnętrznej (86).

Pomimo, że monoaminooksydaza bardzo często przyjmowana jest za marker błony zewnętrznej, problem lokalizacji tego enzymu w mitochondriach był sprawą sporną przez dość długi okres czasu. Można było wyróżnić dwa poglądy: jeden reprezentowany m.in. przez Greena i wsp. (87), którzy uważali, że enzym ten jest zlokalizowany w błonie wewnętrznej i drugi — reprezentowany przez Greenawalta, Schnaitmana i Sottocase (1, 10, 63), według których monoaminooksydaza jest zlokalizowana w błonie zewnętrznej. Pomimo tego, że Addink i wsp. (25) potwierdzili występowanie tego enzymu w błonie zewnętrznej problem pozostał nadal dyskusyjny z uwagi na stosowane różne metody oznaczania aktywności tego enzymu i różne metody subfrakcjonowania mitochondriów.

W ostatnim okresie pojawiły się znowu prace dotyczące wewnątrzmitochondrialnej lokalizacji monoaminooksydazy (88—91). Opierając się na pracach sugerujących podwójną lokalizację monoaminooksydazy Dugal (90) podjął próbę ekstrakcji tego enzymu z mitochondriów wątroby szczura kwasem dezoksycholowym i wykazał, że duża część aktywności ekstrahuje się jeszcze dezoksycholanem, po dwóch inkubacjach mitochondriów z digitoniną. Uzyskane wyniki można interpretować następująco: a) enzym występuje w obu błonach mitochondrialnych i w czasie działania digitoniny uwalnia się tylko enzym związany z błoną zewnętrzną, a pod działaniem dezoksycholenu enzym z błony wewnętrznej, b) monoaminooksydaza obecna jest jedynie w błonie zewnętrznej, a nieregularne rozłożenie lipidów w błonie powoduje, że pewna część tego enzymu ekstrahuje się dopiero dezoksycholanem.

Analizując otrzymane wyniki (88, 90, 91) można przypuszczać, że część aktywności monoaminooksydazy jest specyficznie związana z błoną wewnętrzną. Zakładając, że lokalizacja reduktazy NADH — cytochrom c niewrażliwej na rotenon i monoaminooksydazy w mitochondriach jest identyczna, należałoby się spodziewać, że rozkład aktywności tych enzymów będzie bardzo podobny, niezależnie od stopnia oczyszczania błony zewnętrznej. Natomiast w uzyskiwanych różnymi metodami preparatach błony zewnętrznej zawsze stwierdzano wyższy % aktywności reduktazy

NADH — cytochrom c niewrażliwej na rotenon niż monoaminoooksydazy. Obserwowano ponadto dwa szczyty aktywności monoaminoooksydazy: jeden w preparacie błony zewnętrznej, a drugi w preparacie błony wewnętrznej, pokrywający się ze szczytem aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (91).

W preparatach błony zewnętrznej wykazano aktywność kinazy dwufosfonukleozydowej (1, 74) biorącej udział w fosforylacji ADP. Enzym ten występuje również w przestrzeni międzybłonowej (74).

Arsensis i wsp. (75) stwierdzili aktywność dehydrogenazy ksylitolowej z koenzymem NAD w błonie zewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej mitochondriów świnki morskiej. Natomiast w błonie wewnętrznej lub matriks występuje dehydrogenaza ksylitolowa z koenzymem NADP. Oba enzymy mogą spełniać rolę pośredników w transporcie równoważników redukcyjnych pomiędzy zewnątrz- a wewnątrzmitochondrialnym NADP.

Wykazano również w błonie zewnętrznej mitochondriów szczura i żaby (75) istnienie bardzo aktywnej ATPazy zależnej od HCO_3^- . Enzym ten nie wymaga jonów Na^+ i nie jest hamowany przez jony Ca^{+2} , nie jest więc typem ATPazy zależnej od Na^+ i K^+ . Inna ATPaza występująca w błonie zewnętrznej, stymulowana przez jony Mg^{+2} i Ca^{+2} , odgrywa rolę w regulowaniu wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia dwuwartościowych jonów (92).

Nie udało się do tej pory wyjaśnić roli wielu enzymów zlokalizowanych w błonie zewnętrznej. Różnorodność reakcji zachodzących w tej części mitochondrionu pozwala przypuszczać, że błona zewnętrzna nie stanowi tylko półprzepuszczalnej bariery, ale odbywa się w niej szereg procesów metabolicznych.

Zaakceptowano do druku 30.8.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Schnaitman C., Greenawalt J. W., (1968), *J. Cell Biol.*, **38**, 158—175.
2. Parsons D. F., Williams G. R., (1967), *Methods in Enzymology*, **10**, 443—448.
3. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A., (1967), *Methods in Enzymology*, **10**, 448—463.
4. Mannella C. A., Bonner W. D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **413**, 226—233.
5. Stoeckenius W., (1970), w *Membranes of mitochondria and chloroplasts*, red. E. Racker, str. 53—90, Van Norstrand Reinhold Company, New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne.
6. Decker G. L., Greenawalt J. W., (1977), *J. Ultrastructure Res.*, **59**, 44—56.
7. Hackenbrock C. R., Miller K. J., (1975), *J. Cell Biol.*, **65**, 615—630.
8. Matlib M. A., O'Brien P. J., (1975), *Arch. Biochem., Biophys.*, **167**, 193—202.
9. Scholte H. R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **330**, 283—293.

10. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A., (1967), *J. Cell. Biol.*, **32**, 415—438.
11. Ernster L., Kuylenstierna B., (1969), w *Mitochondria structure and function*, red. L. Ernster, Z. Drahota, str. 5—31, Academic Press.
12. Bandlow W., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **282**, 105—122.
13. Hallermayer G., Neupert W., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 279—288.
14. Wojtczak L., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 209—223.
15. Duszyński J., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 275—293.
16. Pfaff E., Klingenberg M., Ritt E., Vogell W., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 222.
17. Wojtczak L., Sottocasa G. L., (1972), *J. Membrane Biol.*, **7**, 313—324.
18. Wojtczak L., (1974), *Rev. Roum. Physiol.*, **11**, 173—185.
19. Wojtczak L., Załuska H., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 64—72.
20. Wojtczak L., Załuska H., Wroniszewska A., Wojtczak A. B., (1972), *Acta Bioch. Pol.*, **19**, 227—234.
21. Ohashi A., Sinohara H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 76—82.
22. Włodawer P., Parsons D. F., Williams G. R., Wojtczak L., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 34—47.
23. Lehninger A. L., (1962), *Physiol. Rev.*, **42**, 467.
24. Ohnishi T., (1962), *J. Biochem.*, **51**, 380.
25. Addink A. D. F., Boer P., Wakabayashi T., Green D. E., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **29**, 45—59.
26. Scholte H. R., Weijers P. J., Wit-Peeters E. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 764—773.
27. Załuska H., Brabcová J., Wroniszewska A., Zborowski J., Drahota Z., Wojtczak L., (1975), *Exptl. Cell Res.*, **91**, 63—72.
28. Huber C. T., Edwards H. H., Morrison M., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **168**, 463—472.
29. Fleischer S., Fleischer B., Stoeckenius W., (1967), *J. Cell Biol.*, **32**, 193.
30. Huber C. T., Morrison M., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4274—4282.
31. Comte J., Maisterrena B., Gautheron D. C., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 271—284.
32. Hayashi H., Capaldi R. A., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **282**, 166—173.
33. Melnick R. L., Tinberg H. M., Maguire J., Packer L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 230—241.
34. Neupert W., Ludwig G. D., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 523—532.
35. Sottocasa G. L., Sandri G., Panfili E., de Bernard B., (1971), *FEBS Letters*, **17**, 100—105.
36. Sottocasa G. L., Sandri G., Panfili E., de Bernard B., Gazzotti P., Vasington F. D., Carafoli E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 808—813.
37. Bosman H. B., Myers M. W., Dehend D., Ball R., Case K. R., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 147—160.
38. Colbeau A., Nachbaur J., Vignais P. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 462—492.
39. Carafoli E., (1975), *Mol. Cell. Biochem.*, **8**, 133—140.
40. Bäckeström D., Hoffström I., Gustafsson I., Ehrenberg A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 596—602.
41. Albracht S. P. J., Heidrich H. G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **376**, 231—236.

42. Heidrich H. G., Albracht S. P. J., Bäckström D., (1978), *FEBS Letters*, **95**, 314—318.
43. Bäckström D., Lorusso M., Anderson K., Ehrenberg A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **502**, 276—288.
44. Oreländ L., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 410—421.
45. Moreau F., Dupont J., Lance C., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 294—304.
46. Keyhani E., (1973), *J. Cell Biol.*, **58**, 480—484.
47. Kellems R. E., Butow R. A., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8043—8050.
48. Kellems R. E., Butow R. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3304—3310.
49. Kellems R. E., Allison V. F., Butow R. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3297—3303.
50. Kellems R. E. (1975), *J. Cell Biol.*, **65**, 1—14.
51. Watson K., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 721—726.
52. Frey-Wyssling A., (1967), *Aust. J. Sci.*, **29**, 458.
53. Beattie D. S., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 901—907.
54. Lévy M., Toury R., André J., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 599—613.
55. Day D. A., Wiskich J. T., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 117—123.
56. Van der Plas L. H. W., Jobse P. A., Verleur J. D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 1—12.
57. Douce R., Mannella C. A., Bonner W. D., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 105—116.
58. Kuylenstierna B., Nicholls D. G., Hovmöller S., Ernster L., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 419—426.
59. Mayer G., Ullrich V., Staudinger H., (1968), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 459—464.
60. Day D. A., Wiskich J. T., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 117—123.
61. Douce R., Mannella C. A., Bonner W. D., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **292**, 105—116.
62. Brdiczka D., Pette D., Brunner G., Miller F., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 294—304.
63. Schnaitman G., Erwin V. G., Greenawalt J. W., (1967), *J. Cell Biol.*, **32**, 719—735.
64. Okamoto H., Yamamoto S., Nozaki M., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 309—314.
65. Nisimōto Y., Takeuchi F., Shibata Y., (1975), *J. Biochem.*, **78**, 573—581.
66. Yates B. W., Garland P. B., (1967), *Biochem. J.*, **102**, 40 p.
67. Norum K. R., Farstad M., Bremer J., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 797—804.
68. Garland P. B., Haddock B. A., Yates D. W., (1969), w *Mitochondria structure and function*, red. L. Ernster, Z. Drahotá, str. 111—126, Academic Press.
69. Pedersen J. I., Slinde E., Grynne B., Aas M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 191—203.
70. Stoffel W., Schiefer H. G., (1968), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 1017—1026.
71. Sarzała M. G., van Golde L. M. G., de Kruyff B., van Deenen L. L. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 106—119.
72. Zborowski J., Wojtczak L., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 73—84.
73. Vignais P. M., Nachbaur J., Vignais P. V., Andre J., (1969), w *Mitochondria structure and function*, str. 43—58, red. L. Ernster, Z. Drahotá, Academic Press.
74. Schnaitman C. A., Pedersen P. L., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 428—433.

75. Arsensis C., Manitis T., Touster O., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 4396—4399.
76. Grisolia S., Mendelson J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 968—973.
77. Vijayakumar E. K., Weidmann M. J., (1976), *Biochem. J.*, **160**, 383—393.
78. Vijayakumar E. K., Weidmann M. J., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 355—365.
79. Felgner P. L., Wilson J. B., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 282—294.
80. Kropp E. S., Wilson J. E., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 74—79.
81. Font B., Vial C., Gautheron D. C., (1975), *FEBS Letters*, **56**, 24—29.
82. Maisterrena B., Comte J., Gautheron D., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **367**, 115—126.
83. Nisimoto Y., Takeuchi F., Shibata Y., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 1257—1266.
84. Fukushima K., Sato R., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 161—173.
85. Janki R. M., Aithal H. N., Mc Murray W. C., Tustanoff E. R., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 1078—1085.
86. Aithal H. N., Janki R. M., Gushulk B. D., Tustanoff E. R., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 1—11.
87. Green D. E., Allmann D. W., Harris R. A., Tan W. C., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 368—378.
88. Turska E., Turski W., (1975), *Enzyme*, **19**, 140—148.
89. Yoo B. Y., Orelan L., (1976), *Histochemistry*, **46**, 131—137.
90. Dugal B. S., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **480**, 56—69.
91. Turska E., Turski W., (1978), *Enzyme*, **23**, 98—103.
92. Vijayakumar E. K., Weidemann M. J., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 355—365.

KOMUNIKAT

IV Konwersatorium z cyklu „Struktura biopolimerów” nt: „Nowe metody analityczne i usprawnienia pracy automatycznych analizatorów aminokwasów”, którego organizatorami są Akademia Rolnicza w Poznaniu i Środowiskowe Laboratorium Metod Pomiarowych Biologii Molekularnej Instytutu Genetyki Roślin PAN (adres: mgr Piotr Mendelewski, ul. Strzeszyńska 30/36, 60-479 Poznań) oraz Sekcja Analizy Biopolimerów PAN, odbędzie się w dniach 25 i 26 września 1980 roku w Poznaniu. Cały rok pod wskazanym adresem czynny jest punkt informacji naukowej i organizacyjnej dotyczącej automatycznych analizatorów aminokwasów.

Przewodniczący Sekcji Analizy
Biopolimerów

(Doc. dr hab. Kornel Nowak)

JAN SZOPA *, HANNA JAŃSKA **,
WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN ***

Białka destabilizujące DNA **DNA — Helix Destabilizing Proteins**

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Metody izolacji**
- III. Właściwości i funkcja białek destabilizujących DNA**
- IV. Białka destabilizujące DNA prokariotów**
- V. Białka destabilizujące DNA eukariotów**
- VI. Zasadowy inhibitor Kunitza jako model białka stabilizującego i destabilizującego strukturę DNA**
- VII. Podsumowanie**

Contents

- I. Introduction**
- II. Methods of isolation**
- III. Properties and function of DNA — helix destabilizing proteins**
- IV. DNA — helix destabilizing proteins of Procaryota**
- V. DNA — helix destabilizing proteins of Eucaryota**
- VI. Basic pancreatic trypsin inhibitor of Kunitz as a model of proteins stabilizing and destabilizing DNA structure**
- VII. Summary**

I. Wstęp

Zarówno replikacja jak i transkrypcja DNA wymagają współdziałania z matrycą białek, pośród których szczególne znaczenie mają polimerazy, a także czynników niebiałkowych, takich jak np. odpowiednie stężenie

* Dr hab., ** mgr, *** prof. dr.; Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, Tamka 2, 50-137 Wrocław.

Wykaz stosowanych skrótów: EDTA — etylenodwuaminoczeroctan; BPTI — inhibitor trypsyny typu Kunitza; HDP — białka destabilizujące; SDS — sól sodowa siarczanu dodecyłu; T_m — temperatura topnienia kwasu nukleinowego; UP — białko rozkręcające (destabilizujące).

soli. Aktywność polimeraz w znacznej mierze zależy od obecności białek określanych jako białka wiążące, rozkręcające (UP), lub destabilizujące strukturę DNA, w skrócie HDP (*helix destabilizing protein*). Białka te po raz pierwszy znaleziono w mikroorganizmach a później również w tkankach eukariontów. Przypuszcza się, że podczas replikacji zapobiegają one nieswoistemu wewnątrzcząsteczkowemu tworzeniu się par między zasadami w jednoniciowych regionach.

II. Metody izolacji

Pośród najczęściej stosowanych metod izolacji białek destabilizujących DNA dominuje metoda Alberta i wsp. (1) z zastosowaniem chromatografii powinowactwa. Według większości stosowanych metod materiał biologiczny ekstrahuje się buforem Tris — HCl, pH 7, w obecności merkaptetanolu, EDTA i glicerolu oraz NaCl w stężeniach od 0,05 do 2 M (2—9). Uzyskany materiał poddaje się ultrawirowaniu, chromatografii kolumnowej na celulozie lub agarozie ze związanym dwuniciowym a następnie jednoniciowym DNA (3). Białka balastowe adsorbujące się na jednoniciowym DNA wymywa się siarczanem dekstranu a białka destabilizujące DNA gradientem NaCl. Z równym powodzeniem można stosować chromatografię na wymiennicach jonowych typu P-celulozy, CM-celulozy lub DEAE-celulozy (10, 11).

Wtedy, gdy białka destabilizujące DNA występują w formie związanej z chromatyną z reguły zawodzi chromatografia powinowactwa. Usytuowanie w komórce rzutuje na wybór metody ich izolowania. Typowym przykładem może być białko destabilizujące DNA regenerującej wątroby szczura. Białko to tak silnie wiąże się z DNA, że nie oddysocjowuje pod wpływem fenolu i SDS, aby je izolować trzeba było uciec się do metod enzymatycznych. Dopiero po strawieniu DNA nukleazami, uwolnione białko wytrącano acetonem (12).

W większości źródeł otrzymuje się znikome ilości białek destabilizujących DNA, od 1 do 2 mg z kilograma tkanki. Ciężar cząsteczkowy tych białek wynosi od 6.500 (12) do 33.000 (9), a nawet 180.000 (13), a ich punkt izoelektryczny znajduje się w szerokim przedziale pH od 5 do 9,6 (10, 11). Białka destabilizujące DNA zawierają dużo reszt aminokwasów aromatycznych. Jak dotychczas ustalono tylko sekwencję aminokwasów białka genu 5 faga M 13 (14) i faga fd (15).

III. Właściwości i funkcja białek destabilizujących DNA

Od dawna zdawano sobie sprawę, że proces replikacji i transkrypcji powinna poprzedzać destabilizacja DNA czyli pojawianie się odcinków lokalnie zdenaturowanych. Po raz pierwszy Alberts i Frey (16)

wydzielili białka destabilizujące DNA z komórek *E. coli* zainfekowanych fagiem T4. Białko to denaturowało DNA w warunkach fizjologicznych. Opisane przez nich białko jest produktem genu 32 i syntetyzuje się przed replikacją fagowego DNA. Dzięki badaniom genetycznym okazało się, że białko to jest niezbędne nie tylko do replikacji, ale również do rekombinacji fagowego DNA (17).

Później wykazano w *E. coli* obecność białek destabilizujących uczestniczących w replikacji bakteryjnego DNA (18). Wydzielono białka rozkręcające kolejno z faga T7 (19), prostego eukarionta — *Ustilago maydis* (20), grasicy cielecej (21), regenerującej wątroby szczura (22), wątroby szczura (6), komórek nowotworowych myszy (7), cytoplazmy komórek wątroby szczura (10), fibroblastów ludzkich i mysich (22) i wątroby sarny (11). Stężenie białek rozkręcających DNA w dzielących się komórkach, jak i kooperatywny charakter ich wiązania się z DNA wskazują, że w komórce nie pełnią one roli katalitycznej lecz uczestniczą w tworzeniu takich struktur DNA, które umożliwiają przesuwanie się układu replikacyjnego (polimerazy DNA) po jednoniciowej matrycy (20, 23).

Białka destabilizujące DNA prokariotów jak i eukariotów pomimo pewnych różnic są w zasadzie do siebie podobne. W celu bliższego określenia podobieństw i różnic omówimy je kolejno.

IV. Białka destabilizujące DNA prokariotów

Białka silnie wiążące się z DNA izolowano z bakterii nie infekowanych (18, 24) i infekowanych fagami (16, 19, 25). Przyjmuje się, że białka destabilizujące prokariotów wiążąc się z jednoniciowymi fragmentami DNA zapobiegają jego renaturacji i tym samym obniżają temperaturę denaturacji DNA. Brak dowodów na wiązanie się ich z dwuspiralnym DNA. Jednoniciowy DNA tworząc kompleks z białkiem destabilizującym występuje w formie rozciągniętej i w pełni hyperchromowej (26). Niektóre białka destabilizujące DNA swoiście wpływają na katalizowaną przez polimerazy syntezę DNA. W układzie homologicznym białko destabilizujące genu 32 faga T4 wiąże się z indukowaną fagową polimerazą DNA (27), a białko destabilizujące *E. coli* stymuluje aktywność tylko jednej homologicznej polimerazy, tj. polimerazy DNA II (18). W układach heterologicznych takich jak białko destabilizujące DNA genu 32 faga T4 i polimerazy DNA z *E. coli*, lub białko destabilizujące DNA z *E. coli* i homologicznej polimerazy DNA I i III nie tylko nie obserwuje się aktywacji enzymu, ale wprost przeciwnie, nawet jego hamowanie (4). Zatem białko destabilizujące DNA *E. coli* wykazuje wysoką swoistość w stymulacji aktywności polimerazy DNA II. Ponadto białko to hamuje aktywność homologicznej polimerazy RNA wtedy gdy transkrybowany jest jednoniciowy DNA i nie wpływa na transkrypcję natywnego DNA. Ciężar

cząsteczkowy białka destabilizującego DNA z *E. coli* oznaczony elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym z SDS wynosi 20.000 (4, 5), podczas gdy w analizie sedymentacyjnej aż 90.000 (± 10.000). Na tej podstawie zakłada się, że białko to może występować jako tetramer zbudowany z 4 podjednostek (4). Białko destabilizujące wiąże się z DNA kooperatywnie. Na jeden jego tetramer przypada 30 do 36 nukleotydów (5). W badaniach *in vitro* zarówno monomery jak i ich agregaty okazały się aktywne. Nie wiadomo jednak, która z tych form stymuluje *in vivo* aktywności polimerazy DNA II. Białko destabilizujące DNA w obecności polimerazy DNA II 50-krotnie zwiększa szybkość syntezy łańcucha polinukleotydogo. Jak wspomniano białko destabilizujące DNA *E. coli* hamuje aktywność polimerazy DNA III. Aktywność polimerazy DNA I, badana *in vitro*, w zależności od warunków może być hamowana lub wyraźnie stymulowana. Nie wiadomo, czy stymulacja polimerazy DNA I ma znaczenie fizjologiczne.

Białko destabilizujące DNA wpływa nie tylko na aktywność polimerazy DNA II ale również na wielkość syntetyzowanych produktów. W obecności tego białka syntetyzują się fragmenty zbudowane co najmniej z 5 tys. nukleotydów, podczas gdy w jego nieobecności powstają fragmenty złożone z 50 do 100 nukleotydów (28). Ponadto w badaniach *in vitro* okazało się, że białko destabilizujące DNA *E. coli* bierze udział w przekształcaniu jednoniciowego, kołowego DNA faga M-13, G-4 i Φ LX 174 w dwuniciową formę replikacyjną, RF II, w obecności enzymów izolowanych z *E. coli* — polimerazy DNA III, a w przypadku M-13 również RNA polimerazy (29—31). Niestety dotychczas nie udało się ustalić, czy białko destabilizujące *E. coli* uczestniczy w genetycznej rekombinacji jak to ma miejsce w przypadku białka destabilizującego DNA genu faga T4.

Białko genu 32 posiada jeszcze jedną interesującą właściwość, a mianowicie stymuluje reasocjację DNA (16). Efekt ten wynika przypuszczalnie z topienia w niskich temperaturach helikalnych, wewnątrzcząsteczkowych fragmentów. Początkowo efektu tego nie zaobserwowano badając białko destabilizujące DNA *E. coli* (18). W 1977 r. Christiansen i Baldwin (5) wykazali, że białko destabilizujące *E. coli* wiążąc się kooperatywnie z jednoniciowym DNA w specyficznych warunkach może stymulować tworzenie się z komplementarnych łańcuchów podwójnej spirali DNA. Warunki te znacznie odbiegają od tych w których Alberts i Frey (16) wykazali wpływ białka destabilizującego genu 32 faga T4 na reasocjację DNA. Białko destabilizujące DNA *E. coli* w pH 5,5 w obecności 10 mM Mg^{2+} 300-krotnie przyspiesza reasocjację DNA. Powyżej pH 6 reasocjacja drastycznie zwalnia się i zanika w pH 7. Wprowadzenie jonów Ca^{2+} w miejsce Mg^{2+} poszerza przedział pH do pH 6,4, lecz reasocjacja w pH 7 nadal pozostaje znikoma. W obecności Na^+ lub K^+ nie

obserwuje się reasocjacji. W pH 7 reasocjacja okazała się zależną od poliamin: w obecności 2 mM spermidyny wzrasta 5.000 razy w szerokim przedziale pH.

Mechanizmu katalizy nie badano szczegółowo, odnotowano jednak cztery podstawowe cechy tego procesu: reasocjacja DNA przebiega zgodnie z kinetyką reakcji drugiego rzędu, wymagany jest nadmiar białka destabilizującego DNA, skuteczność reasocjacji rośnie wraz z długością łańcucha DNA, wpływ jonów i pH przemawia za udziałem w procesie reasocjacji obok białek destabilizujących jeszcze innych czynników koniecznych do topienia wewnątrzcząsteczkowych spiralnych fragmentów w jednołańcuchowym DNA. Porównano (5) przebieg reasocjacji w obecności białka destabilizującego DNA i reakcji niekatalizowanej tzn. takiej, w której reasocjację wywoływano wprowadzając jony Na^+ (1 M Na^+ , 70°C, pH 7). Ustalono, że dla szybkości obu reakcji największe znaczenie ma zubożenie reszt fosforanowych DNA, obie reakcje są drugorzędowe, w optymalnych warunkach szybkość ich jest proporcjonalna do połowy długości łańcucha DNA. Reasocjacja „niekatalityczna” przebiega znacznie szybciej niż reasocjacja w obecności białek destabilizujących DNA.

Bardzo interesującym białkiem jest białko destabilizujące genu 5 bakteriofaga M-13, które reguluje tempo syntezy jednoniciowego DNA z dwuniciowej formy replikacyjnej (32). Inną jego funkcją jest ochrona jednoniciowego DNA przed atakiem nukleaz. W zakażonej komórce *E. coli* fagowy DNA tworzy z białkiem destabilizującym genu 5 kompleks o zwartej strukturze pałeczki. Białko destabilizujące DNA genu 5 wskutek silnego i kooperatywnego wiązania się z jednoniciowym DNA rozwija podwójny heliks DNA, obniżając T_m różnych dwuspiralnych DNA o około 40°C (25). Ciężar cząsteczkowy tego białka wynosi 9.700. W roztworze występuje głównie w formie dimeru (33, 34). Wykazano identyczność sekwencji aminokwasowej białka destabilizującego DNA genu 5 faga M-13 (14) z białkiem faga fd (15). Widma CD wskazują na uczestnictwo reszt tyrozyny w interakcji białka destabilizującego z DNA (35, 36). Stosując selektywną modyfikację reszt tyrozyny wykazano (36), że wtedy gdy białko destabilizujące DNA genu 5 tworzy kompleks z kwasem nukleinowym to z pięciu reszt tyrozyny trzy znajdujące się na powierzchni oddziałują warstwowo lub tworzą wiązania wodorowe z zasadami azotowymi. Przypuszcza się, że reszty lizyny również uczestniczą w interakcji tych polimerów przez tworzenie wiązań elektrostatycznych z grupami fosforanowymi kwasów nukleinowych (36). Monomer białka układa się wzdłuż długiej osi DNA pokrywając 4 nukleotydy (33). Mechanizm rozwijania i natura kooperatywnego wiązania białka destabilizującego genu 5 nie zostały jeszcze wyjaśnione. Nadal nie wiadomo, czy białko wiąże się z dwuniciowym DNA i następnie rozluźnia wiązania wodorowe komple-

mentarnych par nukleotydów, czy też przejściowe otwierające się fragmenty dwuniciowego DNA wiążą białko, które uniemożliwia ich reasocjację. Nieco światła na te zagadnienia rzucają badania Garsse na i wsp. (3). Badaniom techniką NMR poddano kompleksy białka destabilizującego genu 5 z komplementarnym tetranukleotydem o sekwencji d(pC—G—C—G), który w temperaturze pokojowej tworzy fragment podwójnej spirali. Sekwencję DNA o długości czterech nukleotydów wybrano dlatego, że taki właśnie fragment jest maskowany przez monomer białka. Taki dwuspiralny fragment wiążąc białko destabilizujące DNA topi się już w temperaturze 0°C. Garsse i wsp. (3) wysunęli hipotezę, że szybkość otwierania i zamykania podwójnej spirali DNA warunkuje jej rozwijanie tylko wtedy, gdy białko destabilizujące wychwytuje fragmenty jednoniciowe. Na poparcie hipotezy autorzy (3) przytaczają wcześniejsze obserwacje (25, 37) wskazujące, że w niskich temperaturach (ca. 4°C) białko destabilizujące DNA genu 5 nie wiąże się z dwuspiralnym DNA. Opisano też podobne zjawisko badając białko destabilizujące DNA genu 32 faga T4 (38). Ponadto zaobserwowano, że białko destabilizujące genu 32 nie obniża T_m wielu naturalnie występujących DNA. W świetle powyższej hipotezy należałoby założyć, że w obu przypadkach otwieranie się podwójnej spirali DNA nie wystarcza dla związania białek destabilizujących z odsłaniającymi się jednoniciowymi fragmentami DNA. Gralla i Crothers (39) wyliczyli prawdopodobieństwo otwierania się par zasad we fragmentach dwuspiralnych RNA. W temperaturze 25°C (w 1 M NaCl) w zależności od typu par zasad i ich otoczenia wartości te znajdują się pomiędzy 10^{-8} do 10^{-5} . Prawdopodobieństwo otwarcia się dwóch lub więcej par zasad jest jeszcze mniejsze. Ich wartość prawdopodobieństwa wynosi 10^{-10} w przypadkach trzech kolejnych par A—U zawartych pomiędzy parami G—C. Podobne wartości uzyskano badając DNA (40). Tak więc, poniżej T_m dysocjacja par zasad w długiej, podwójnej spirali DNA może nie wystarczać do związania białek destabilizujących z odsłaniającymi się jednoniciowymi fragmentami DNA co przemawia za hipotezą Garsse na i wsp. (3).

Obniżanie T_m DNA przez białka destabilizujące DNA zależy nie tylko od fluktuacji struktury DNA ale również od szybkości z jaką białko wiąże się z jednoniciowymi fragmentami. Pod tym względem interesujące są różnice pomiędzy białkiem genu 5 a białkiem genu 32. Białko genu 5 obniża T_m DNA *Clostridium perfringens* o około 40°C (25) podczas gdy białko genu 32 w ogóle nie zmienia T_m tego DNA (38). Zjawiska te znajdują uzasadnienie w kinetyce wiązania się obu białek z DNA. Garsse na i wsp. (3) na podstawie analizy kinetyki wiązania wykazali niższą wartość stałej asocjacji DNA z białkiem genu 32 w porównaniu z układem DNA — białko genu 5. Dotychczas nie wyjaśniono, czy różnica ta wynika z różnego sposobu interakcji DNA z białkami, czy też większej tendencji białka genu 32 do agregacji.

V. Białka destabilizujące DNA eukariontów

Wcześniej wspomniano, że białka destabilizujące DNA izolowano również z organizmów wyższych. W 1976 r. Herrick i Alberts (9) uzyskali z grasicy cielęcej trzy frakcje białkowe. W tym jedna (UP-1) o ciężarze cząsteczkowym 24.000 jest białkiem obojętnym (pI 7) i rozpada się na 4 do 5 subfrakcji podczas izoelektrycznego fokusowania. Z pozostałych dwóch frakcji o masach cząsteczkowych 33.000, jedna jest białkiem zasadowym, różnym od histonów, a druga białkiem kwaśnym. Kompleksy tych białek z DNA dysocjują w obecności NaCl, co wskazuje na ich elektrostatyczne wiązanie się z DNA. Na podstawie wirowania różnicowego homogenatów komórkowych sugeruje się, że białka te *in vivo* nie asocjują z chromatyną. Obecność białek destabilizujących DNA w cytoplazmie może być spowodowana rozbiciem komórek, lub też występowaniem w cytosolu pewnej puli białek destabilizujących DNA tylko w określonym stadium rozwoju komórki (np. podczas S-fazy). Wątpliwości odnośnie występowania białek destabilizujących wyłącznie w cytoplazmie znajdują analogię w zachowaniu się polimeraz DNA, które w pewnym okresie na pewno występują w jądrze, lecz również znajdują się we frakcji niechromatynowej z której je się izoluje (41). Białka o czynności rozkręcającej izolowano również z komórek mysich (komórki 3T3 i I-10) i z komórek małpich (komórki CV-1) (9). Na tej podstawie sądzi się, że białka destabilizujące DNA występują w wielu, być może wszystkich, komórkach ssaków.

Jedno z białek rozkręcających UP-1 i białko kwaśne grasicy cielęcej denaturują różne dwuspiralne kwasy nukleinowe, takie jak poli d(AT), poli r(AU), DNA *Clostridium perfringens*, DNA SV40, a także mają wysokie powinowactwo do RNA (42). Z tych badań wynika, że białka destabilizujące wybiórczo wiążą się z jednoniciowym DNA i nie wykazują swoistości wobec sekwencji nukleotydowej kwasów nukleinowych. Zaobserwowano wprawdzie, że białko UP-1 denaturuje DNA *Clostridium perfringens* mniej efektywnie niż poli d(AT), co w pewnej mierze przemawia za zależnością jego wiązania od sekwencji zasad. Należy jednak wziąć także pod uwagę, że poli d(AT) ma mniejszy ciężar cząsteczkowy niż DNA *Clostridium perfringens* a końcowe odcinki mogą łatwiej denaturować niż fragmenty wewnątrzcząsteczkowe dając w konsekwencji większą destabilizację preparatu o krótszych łańcuchach. Dymishits i Fet (12) również podkreślają brak swoistości w oddziaływaniu DNA z białkiem destabilizującym o masie cząsteczkowej 6500, izolowanym z chromatyny regenerującej wątroby szczura. Białko to w tym samym stopniu denaturuje DNA grasicy cielęcej jak i faga T 7. Należy rozważyć dwie możliwości pośredniczenia białka w denaturacji DNA: białko albo wychwytuje jednoniciowe fragmenty DNA i utrzymuje je w formie rozciągniętej, albo wiąże się z formą dwuspiralną denaturując ją do postaci

jednoniciowej (42). Pierwszą możliwość można wykluczyć porównując stałą fluktuacji DNA z szybkością jego denaturacji. Niska stała fluktuacji przemawia za drugą możliwością (42). Słabe, ale wymierne, powinowactwo białka UP-1 do natywnego DNA stanowi dodatkowy argument przemawiający za drugą ewentualnością.

W kolejnej pracy Herrick i wsp. (44) podają, że białko UP-1 i białko kwaśne z grasicy w ilościach wystarczających do maskowania odpowiednich fragmentów jednoniciowego DNA wyraźnie wzmaga aktywność homologicznej α -polimerazy, natomiast wyższe stężenia tych białek hamują enzymatyczną syntezę DNA.

Białka destabilizujące DNA o podobnych właściwościach z właściwościami grasiczego białka kwaśnego wyizolowano z komórek raka Ehrlicha myszy (7). Ciężar cząsteczkowy tego białka oszacowano na 30—35.000. Białko to, w przeciwieństwie do białek destabilizujących DNA, nie agreguje. Wyliczono, że białko pokrywa 6 do 10 nukleotydów DNA czyli analogiczny fragment do wyliczonego w przypadku białek rozkręcających prokariotów. Inną z właściwości białek rozkręcających mikroorganizmów jest ich kooperatywność w wiązaniu się z DNA. Przeprowadzenie analizy sedymentacyjnej wykazało, że kompleksy DNA-białko destabilizujące z myszy przy stosunku białko do DNA mniejszym od nasycenia dają jeden szczyt co przemawia za brakiem kooperatywności w wiązaniu tych polimerów (7). Należy dodać, że kompleksy białka genu 5 faga fd z DNA dają w analizie sedymentacyjnej podobne wyniki (37). Dopiero na podstawie danych z mikroskopu elektronowego udało się ustalić kooperatywność interakcji DNA z białkiem genu 5 (25). Stąd wniosek o braku kooperatywności interakcji białek destabilizujących DNA organizmów wyższych z DNA może być przedwczesnym.

W 1977 r. D u g u e t i wsp. (6) uzyskali z wątroby szczura homogenną frakcję białkową o czynności rozkręcającej DNA. Białko to okazało się tetramerem o masie podjednostkowej 25.000. Również i to białko oprócz czynności rozkręcającej DNA stymuluje homologiczne polimerazy DNA. Aktywację polimeraz autorzy (6) tłumaczą na dwa sposoby. Pierwsza hipoteza zakłada, że białko ułatwia przesuwanie się polimerazy wzdłuż łańcucha DNA. Hipoteza ta opiera się na oznaczeniu wymaganego do optymalnej stymulacji polimerazy stosunku białka destabilizującego do DNA. Stosunek ten jest mniejszy od wyliczonego potrzebnego do całkowitego pokrycia jednoniciowych fragmentów DNA lub całkowitego rozwinięcia matrycy przez białko. Druga hipoteza zakłada, że białko destabilizujące DNA tworzy dwuskładnikowy kompleks z polimerazą typu białko—białko, lub trójskładnikowy z DNA (34). Zakładając słuszność drugiej hipotezy należałoby oczekiwać swoistej interakcji białka destabilizującego z homologiczną polimerazą. Jednakże zarówno białka destabilizujące prokariotów (27, 46) jak i eukariotów (20, 45) wiążą się z homologicznymi polimerazami raczej słabo. W kontekście tej obserwacji inte-

resującym jest, że białko destabilizujące grasicy (44) oraz komórek nowotworowych myszy (7) stymulują tylko homologiczne α polimerazy a nie wpływają na polimerazy β . Natomiast białko destabilizujące z wątroby szczura zależnie od stosunku białka do DNA stymuluje obie polimerazy (6). Ponadto wykazano, że fosforylacja białek destabilizujących DNA komórek nowotworowych myszy zdecydowanie obniża stymulację aktywności polimerazy i nie wpływa na jego wiązanie się z jednoniciowym DNA. W świetle tych faktów pierwsza hipoteza nabiera większego znaczenia, gdyż zakłada, że stymulacja aktywności polimeraz jest konsekwencją oddziaływania białka na strukturę DNA.

Na szczególną uwagę zasługuje białko rozkręcające P8 izolowane z fibroblastów ludzkich i mysich (22). Białko cechują analogiczne właściwości jak białek omówionych poprzednio. Po ustaleniu jego występowania w cytoplazmie (22, 47) powstało pytanie, czy oprócz wykazanej *in vitro*, interakcji białka P8 z DNA, ma ono jeszcze inną biologiczną funkcję. Wykazano, (8) że białko P8 jest enzymem szlaku glikolitycznego, a mianowicie dehydrogenazą 3-fosfoglicerualdehydową. Należy ostrożnie podchodzić do generalnie przyjętego założenia, że białka wykazujące powinowactwo do DNA uczestniczą również w metabolizmie kwasów nukleinowych i kontroli ekspresji genu. Wydaje się raczej mało prawdopodobnym, aby interakcja DNA ze wspomnianą dehydrogenazą miała znaczenie fizjologiczne pomimo, że glikoliza jest intensywniejsza w tkankach nowotworowych lub w komórkach transformowanych *in vitro* wirusami onkogennymi (48—50).

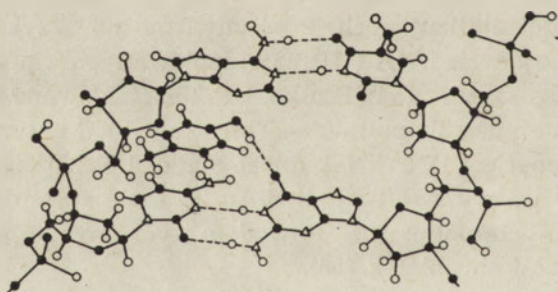
Zapewne wiele jeszcze niespodzianek kryją w sobie białka określane mianem białek destabilizujących. Porównywano na przykład właściwości białek destabilizujących DNA (UP 25K) izolowanych z normalnej i regenerującej wątroby szczura (54). Białko, UP 25K, izolowane z regenerującej wątroby szczura obniża T_m poli d(A—T) o około 40°C i stymuluje homologiczne α i β polimerazy DNA. Natomiast białko UP 25K izolowane z normalnej wątroby podwyższa T_m poli d(A—T) i nie stymuluje aktywności obu homologicznych polimeraz. Powodem tych różnic może być inny stopień fosforylacji obu białek (55).

W 1978 r. wyizolowano białko destabilizujące DNA z wątroby sarny (11). Białko to o właściwościach podobnych do właściwości białek już omówionych okazało się glikoproteina.

VI. Zasadowy inhibitor trypsyny typu Kunitza jako model białka stabilizującego i destabilizującego spiralę DNA

Skąpe i fragmentaryczne dane na temat oddziaływania DNA z białkami rozwijającymi nie pozwalają jeszcze na przedstawienie mechanizmu

tego procesu. Stąd też usiłuje się korzystać z modeli dobrze już opracowanych i przez analogię wyjaśnić proces rozwijania DNA przy udziale naturalnie występujących białek rozkręcających. W 1974 r. wykazano, że inhibitor trypsyny typu Kunitza (BPTI) stabilizuje dwuniciowy DNA, natomiast po acetylacji reszt lizyny wykazuje czynność destabilizującą (51). Można zatem używać go jako białka modelowego w badaniach mechanizmu stabilizacji i destabilizacji struktury DNA. Aby wyjaśnić efekt destabilizujący acetylowanego inhibitora trypsyny uzyskano pochodne tego białka różniące się zasadowością, liczbą niemodyfikowanych reszt aromatycznych oraz konformacją. Na podstawie analizy właściwości fizykochemicznych kompleksów DNA z uzyskanymi pochodnymi wysunięto wniosek, że reszty aminokwasów zasadowych i aromatycznych ściśle współdziałają w interakcji BPTI z DNA zarówno w procesie stabilizacji jak i destabilizacji podwójnej spirali DNA. Wnikliwe badania właściwości tych kompleksów pozwoliły na skonstruowanie modelu stabilizacji i destabilizacji kwasów nukleinowych przez badane białko (52, 53). Zasadniczymi elementami w tych procesach jest interkalacja reszt tyrozyny oraz neutralizacja grup fosforanowych przez reszty zasadowe. Proces interkalacji może przebiegać po dwóch drogach albo poprzez rozkręcanie fragmentu spirali DNA albo poprzez wygięcie rdzenia fosfocukrowego. Przy symetrycznym rozłożeniu ładunków dodatnich na cząsteczce białka interkalacja zachodzi na drodze rozkręcenia fragmentu DNA dając efekt stabilizacji (Ryc. 1). Natomiast przy niesymetrycznym rozłożeniu tych

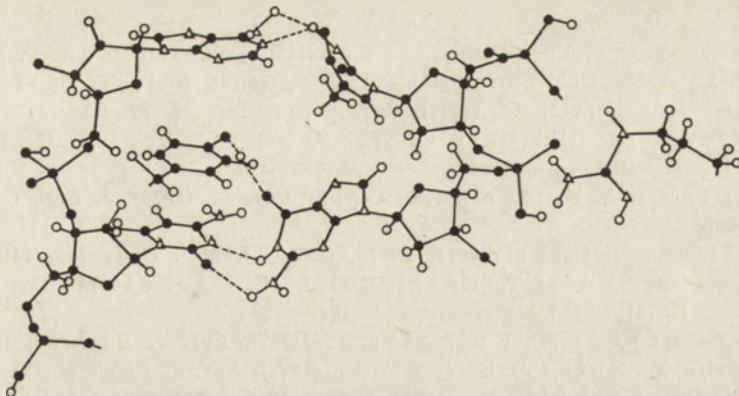


Ryc. 1: Model fragmentu DNA z wbudowaną po stronie lewej tyroziną pomiędzy zasadą purynową i pirymidynową.

○ — atomy wodoru, ● — atomy tlenu, fosforu, węgla, △ — atomy azotu, --- — wiązania wodorowe

ładunków interkalacja przebiega z wygięciem rdzenia fosfocukrowego (Ryc. 2) prowadząc do destabilizacji tego fragmentu kwasu nukleinowego

Naturalnie występujące białka rozkręcające zawierają podobnie jak przedstawiony model (BPTI) zarówno aminokwasy aromatyczne jak i zasadowe. Nadto wielokrotnie wykazano interkalację reszt tyrozyny białek



Rys. 2: Model fragmentu DNA z wbudowaną po stronie lewej tyrozyną i przyłączoną po stronie prawej resztą guanidynową argininy.

○ — atomy wodoru, ● — atomy tlenu, fosforu, węgla, △ — atomy azotu, - - - — wiązania wodorowe

destabilizujących pomiędzy zasady azotowe oraz udział w tym procesie reszt aminokwasów zasadowych, jednak bez próby interpretacji tych danych i kojarzenia ich z mechanizmem destabilizacji podwójnego heliksu DNA.

VII. Podsumowanie

Z wielu mikroorganizmów, jak i z tkanek wielu organizmów eukariotycznych wyizolowano białka silnie wiążące się z DNA jednoniciowym. Zwraca uwagę podobieństwo następujących ich właściwości:

- wszystkie białka specyficznie wiążą się z jednoniciowym DNA;
- wiązanie ich z DNA jest wrażliwe na działanie siły jonowej i stąd sugestia, że połączenie między tymi polimerami jest typu jonowego;
- białka te utrzymują DNA w sztywnej, rozciągniętej formie, a kompleksy ich z DNA wykazują prawie całkowitą hyperchromię co wskazuje na brak oddziaływań warstwowych między zasadami azotowymi;
- bardzo niskie powinowactwo do dwuniciowego DNA i powyższe właściwości wskazują, że białka destabilizujące mają zdolność denaturowania DNA;
- wreszcie wszystkie dotychczas poznane białka destabilizujące stymulują aktywność homologicznych polimeraz DNA.

Obok podobieństw istnieją dwie zasadnicze różnice pomiędzy białkami prokariotów i eukariotów. Białka eukariotów nie stymulują reasocjacji DNA a w ich oddziaływaniu z DNA brak kooperatywności.

PIŚMIENNICTWO

1. Alberts B. M., Amodio F. J., Jenkins M., Gutman E. D., Per-
ris P. L., (1966), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 289—300.
2. Spassky A., Buc H. C., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 79—90.
3. Garszen G. J., Hilbers C. W., Schoenmakers J. G. G., van
Boom J. H., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 453—463.
4. Molineux I. J., Friedman S., Gefter M. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**,
6090—6098.
5. Christiansen C., Baldwin R. L., (1977), *J. Mol. Biol.*, **115**, 441—454.
6. Duguet M., Soussi T., Rossignol J. M., Mechali M., De Recon-
do A. M., (1977), *FEBS Letters*, **79**, 160—164.
7. Otto B., Baynes M., Knippers R., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 17—24.
8. Perucho M., Salas J., Salas M. L., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 557—562.
9. Herrick G., Alberts B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2124—2132.
10. Seifart K. H., Juhasz P. P., Benecke B. J., (1973), *Eur. J. Biochem.*,
33, 181—191.
11. Szopa J., Jańska H., (1979), *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, **90**, 390—404.
12. Dymshits G. M., Fet V. Va., (1977), *Moliek. Biol.*, **11**, 531—536.
13. Abdel-Monem M., Chanal M. CH., Hoffman-Berling H., (1977),
Eur. J. Biochem., **79**, 33—38.
14. Cuyppers T., Van der Ouderaa F. J., de Jong W. W., (1974), *Biochem.*
Biophys. Res. Commun., **59**, 557—564.
15. Nakashima Y., Dunker A. K., Marvin D. A., Konigsberg W., (1974),
FEBS Letters, **40**, 290—292.
16. Alberts B. M., Frey L., (1970), *Nature*, **227**, 1313—1318.
17. Sinha N. K., Snustad D. P., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**, 267—271.
18. Sigal N., Delius H., Kornberg T., Gefter M. L., Alberts B. M.,
(1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3537—3541.
19. Reuben R. C., Gefter M. L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1846—
1850.
20. Banks G. R., Spanos A., (1975), *J. Mol. Biol.*, **93**, 63—67.
21. Herrick G., Alberts B., (1973), *Fed. Proc.*, **2**, 497.
22. Tsai R. L., Green H., (1973), *J. Mol. Biol.*, **73**, 307—316.
23. Gefter M. L., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 45—78.
24. Weiner J. H., Bertsch L. L., Kornberg A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**,
1972—1980.
25. Alberts B., Frey L., Delius H., (1972), *J. Mol. Biol.*, **68**, 139—152.
26. Delius H., Mantell N. J., Alberts B., (1972), *J. Mol. Biol.*, **67**, 341—350.
27. Huberman J. A., Kornberg A., Alberts B., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**,
39—52.
28. Gefter M. L., Molineux I. J., Kornberg T., Khorana H. G., (1972),
J. Biol. Chem., **247**, 3321—3326.
29. Geider K., Kornberg A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3999—4005.
30. Zechel K., Bouché J. P., Kornberg A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**,
4684—4689.
31. Eisenberg S., Scott J. F., Kornberg A., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*
USA, **73**, 3151—3155.
32. Denhardt D. T. (1975), *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **4**, 161—223.
33. Pretoius H. T., Klein M., Day L. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9262—
9269.
34. Cavalieri S. J., Neet K. E., Goldthwait D. A., (1976), *J. Mol. Biol.*,
102, 697—711.

35. Day L. A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 5329—5339.
36. Anderson R. A., Nakashima Y., Coleman J. E., (1975), *Biochemistry*, **14**, 907—917.
37. Oey J. L., Knippers R., (1972), *J. Mol. Biol.*, **68**, 125—138.
38. Jensen Z. D. E., Kelly R. C., von Hippel P. H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7215—7228.
39. Gralla J., Crothers D. M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 301—319.
40. Lukashin A. V., Vologotskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D., Lyubchenko Y. L., (1976), *J. Mol. Biol.*, **108**, 665—682.
41. Yoneda M., Bollum F. J., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 3385—3391.
42. Herrick G., Alberts B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2133—2141.
43. Wang J. C., Davidson N., (1968), *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.*, **33**, 409—415.
44. Herrick G., Delius H., Alberts B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2142—2146.
45. Yarranton G. T., Moore P. D., Spanos A., (1976), *Mol. Gen. Genet.*, **145**, 215—218.
46. Molineux J. J., Gefter M. L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3858—3862.
47. Melero J. A., Salas J., Salas M. L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **437**, 462—476.
48. Harris J. I., Waters M., (1976), w *The Enzymes*, t. 13, str. 1—49, Academic Press, New York.
49. Warburg O., (1956), *Science (Wash. D. C.)*, **123**, 309—314.
50. Broadfoot M., Walker P., Paul J., Macpherson I., Stoker M., (1964), *Nature (Lond.)*, **204**, 79.
51. Szopa J., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 151—157.
52. Szopa J., (1979), *Acta Univ. Wratisl.*, nr 440.
53. Szopa J., (1978), Abstracts 12th FEBS Meet., nr 3628.
54. Bonne C., Duguet M., de Recondo A. M., (1978), Abstracts 12th FEBS Meet., nr 0617.
55. Bonne C., (1978), doniesienie prywatne.

JAN FRONK *

Struktura nukleosomu

Structure of Nucleosome

Spis treści

- I. Podjednostkowa budowa chromatyny
- II. Wielkość i skład nukleosomów
 - II-1. Rdzeń nukleosomu
- III. Struktura rdzenia nukleosomu
 - III-1. Kształt i wymiary rdzenia nukleosomu
 - III-2. Układ histonów w rdzeniu nukleosomu
 - III-2.1. Struktura kompleksu histonów w 2 M roztworze NaCl
 - III-2.2. Oddziaływania między histonami w rdzeniu nukleosomu
 - III-2.3. Centralna rola tetrameru histonów (H3·H4)₂
 - III-3. Struktura i układ DNA w rdzeniu nukleosomu
 - III-3.1. Odkształcenie DNA w rdzeniu nukleosomu
 - III-3.2. Sposób degradacji DNA rdzenia nukleosomu pod wpływem nukleaz
 - III-4. Symetria rdzenia nukleosomu
 - III-5. Oddziaływanie DNA z histonami w nukleosomie
 - III-5.1. Udział odcinków N-końcowych histonów w oddziaływanach z DNA
 - III-5.2. Rozmieszczenie poszczególnych histonów wzdłuż cząsteczki DNA nukleosomu
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Subunit structure of chromatin
- II. Size and composition of nucleosomes
 - II-1. The nucleosome core
- III. Structure of the nucleosome core
 - III-1. Shape and dimensions of the nucleosome core particle
 - III-2. Arrangement of histones in the nucleosome core
 - III-2.1. Structure of the histone complex in 2 M NaCl

* Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.

Stosowane skróty: NMR — jądrowy rezonans magnetyczny.

III-2.2. Histone-histone interactions in the nucleosome core

III-2.3. Central role of the histone tetramer (H3·H4)₂

III-3. Structure and arrangement of DNA in the nucleosome core

III-3.1. Deformation of DNA in the nucleosome core

III-3.2. Pattern of nucleolytic degradation of the nucleosome core DNA

III-4. Symmetry of the nucleosome core particle

III-5. DNA-histone interactions in the nucleosome

III-5.1. Role of N-terminal segments of histones in the interactions with DNA

III-5.2. Arrangement of the individual histones along the DNA molecule of the nucleosome

IV. Concluding remarks

I. Podjednostkowa budowa chromatyny

W jądrach komórek eukariotycznych DNA występuje jako składnik kompleksu nukleoproteinowego zwanego chromatyną. W skład chromatyny, prócz DNA, wchodzi RNA, histony i białka niehistonowe.

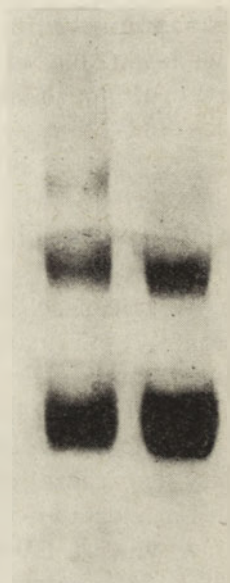
Histony (1) są zasadowymi białkami o masie cząsteczkowej od około 10.000 do około 22.000, nie wykazującymi właściwości enzymatycznych. Ilość histonów w chromatynie jest stała i równa w przybliżeniu ilości DNA. Histony H2A, H2B, H3, H4 występują w ilościach równomolowych; histon H1 występuje w ilości dwukrotnie mniejszej. Histony H2A, H2B, H3, H4 pochodzące z różnych organizmów mają bardzo podobne właściwości. Znajomość sekwencji aminokwasów niektórych histonów pochodzących z różnych źródeł pozwala stwierdzić niezwykle małą zmienność ewolucyjną tych białek. Histon H4 grochu różni się od histonu H4 bydła domowego tylko dwoma (na 102) aminokwasami. Histony H3 tych organizmów różnią się między sobą czterema (na 135) aminokwasami (2). Te dwa histony są najmniej zmiennymi ewolucyjnie spośród scharakteryzowanych pod tym względem białek. Histony H2A i H2B wykazują nieco większą zmienność, porównywalną ze zmiennością np. cytochromów (3). Histon H1 nie jest konserwatywny ewolucyjnie, co więcej, wiele jego typów występuje nawet w jednym organizmie.

Stać ilość i stałe wzajemne proporcje, stabilność metaboliczna, mała zmienność ewolucyjna i brak właściwości enzymatycznych histonów pozwalały sądzić, że uczestniczą one głównie w organizowaniu struktury chromatyny.

Fundamentalna rola chromatyny jako nośnika informacji genetycznej organizmów eukariotycznych stanowiła silny bodziec do podjęcia badań zmierzających do wyjaśnienia jej budowy.

Badania rentgenograficzne chromatyny sugerowały regularność jej budowy, przy czym elementami koniecznymi i wystarczającymi do uzyskania charakterystycznego obrazu dyfrakcyjnego były DNA i histony H2A, H2B, H3, H4 (4—6). Regularny charakter struktury chromatyny potwierdziła opublikowana w 1973 roku praca Hewisha i Bur-

goyne'a dotycząca działania endogennej nukleazy na chromatynę jąder komórkowych wątroby szczura (7). Pod wpływem nukleazy DNA chromatyny ulega specyficznej degradacji, tworząc klasę odcinków, będących całkowitymi wielokrotnościami odcinka najmniejszego (Ryc. 1).



Ryc. 1. Zdjęcie elektroforegramu fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia chromatyny *Physarum polycephalum* nukleazą z *Micrococcus*.

Wiocznе pasma o malejącej ruchliwości zawierają odcinki DNA odpowiadające mono-, di-, tri- i tetranukleosomom. Barwienie *Stains-all*. Wykonano w Zakładzie Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Regularność budowy chromatyny potwierdziły wykonane przez O l i n s i O l i n s a w 1974 roku zdjęcia z mikroskopu elektronowego, przedstawiające preparaty chromatyny w postaci regularnie rozmieszczonych, kulistych struktur o średnicy około 70 Å, połączonych cienką (ok. 15 Å) „nitką” (8). Na podstawie tych prac, a także własnych badań dotyczących rozmieszczenia histonów w chromatynie (6), Roger K o r n b e r g przedstawił w 1974 roku model podjednostkowej budowy chromatyny (9). Według tego modelu osiem cząsteczek histonów (po dwie cząsteczki H2A, H2B, H3, H4) tworzy globularny rdzeń białkowy, dokoła którego owinięty jest odcinek DNA zawierający około 200 par nukleotydów. Jedna cząsteczka histonu H1 związana jest z podjednostką w niestabilny sposób. W takim układzie stosunek ilości histonów do DNA wynosi w przybliżeniu 1 : 1, a więc tyle, co w całej chromatynie. Centralną rolę w rdzeniu białkowym pełnią histony H3 i H4. Ten postulat wynika z silnego związania tych histonów z DNA w chromatynie (10, 11), ich wyjątkowej stałości ewolucyjnej i zdolności do tworzenia tetrameru (H3·H4)₂, o bardzo małej stałej dysocjacji (6, 12, 13). Taka podjednostka, kształtem zbliżona do kuli o średnicy 100 Å, stanowi podstawowy element strukturalny chromatyny, a układy podjednostek ułożonych liniowo mogą tworzyć struktury wyższych rzędów.

Przedstawiony model, którego zasadnicze założenia okazały się w pełni słuszne, stanowił etap przełomowy w dziedzinie badania struktury chro-

matyny. Obecnie dla określenia podjednostki chromatyny używa się najczęściej zaproponowanej przez Oudeta i wsp. nazwy nukleosom (14).

Stosując trawienie nukleazą z *Micrococcus* (EC 3.1.4.7) oraz obserwację w mikroskopie elektronowym wykazano budowę podjednostkową chromatyny wszystkich badanych organizmów — pierwotniaków (15, 16), szkarłupni (17, 18), śluzowców (19—21), grzybów (22—25), roślin (26—28), owadów (29), zwierząt wyższych (30—32). Przy użyciu obu tych metod stwierdzono, że także chromosomy metafazalne zbudowane są z nukleosomów (33—35).

II. Wielkość i skład nukleosomów

W zależności od stosowanych metod przygotowania i utrwalania preparatów chromatyny, średnica nukleosomów zmierzona przy użyciu mikroskopii elektronowej wynosiła od 60 do 140 Å, najczęściej około 100—120 Å (8, 14, 20, 36—41). Zastosowanie obserwacji w ciemnym polu pozwoliło na wykazanie, że nukleosom nie jest, jak przypuszczano, kulisty, lecz raczej dyskowaty, o średnicy 130 Å i grubości 50 Å (41).

Na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym minichromosomów wirusa SV 40 wyliczono, że w jednym nukleosomie o średnicy 122—126 Å zawarte jest 194—200 par nukleotydów DNA (42). Analiza wielkości odcinków DNA powstających w wyniku działania nukleazy na chromatynę pozwala na dokładniejsze określenie ilości DNA zawartego w nukleosomie. Zwykle wielkość odcinka DNA związanego z nukleosomem wynosi, tak jak to proponował Kornberg, około 195—200 par nukleotydów (31), jednakże istnieją znaczne odstępstwa od tej wartości. Najmniejszą zawartość DNA z dotychczas określonych ma nukleosom *Aspergillus nidulans* — 154 pary nukleotydów (22), największą — nukleosom ze spermy jeżowca *Arbacia punctulata* — 260 par nukleotydów (18). Pewne różnice w zawartości DNA wykazują nukleosomy pochodzące z różnych tkanek organizmu (18, 31, 43, 44) lub z tej samej tkanki w różnych etapach jej rozwoju (44). Nawet w obrębie jednego włókna chromatyny wykrywa się niewielką heterogenność wielkości odcinków DNA nukleosomów (45—47).

Niektóre obserwacje sugerowały związek między aktywnością podziałową komórek a wielkością odcinków DNA nukleosomów (31). Komórki rzadko lub wcale nie dzielące się mają zwykle dłuższe odcinki DNA w nukleosomach, niż komórki o krótkim cyklu życiowym. Przy przejściu z fazy wzrostu logarytmicznej do stacjonarnej hodowli pierwotniaków wielkość DNA nukleosomów *Paramecium aurelia* rośnie od 153 do 178 par nukleotydów, a nukleosomów *Tetrahymena pyriformis* od 207 do 230 par nukleotydów (16). Szybko dzielące się komórki szpiku i embrionalne komórki wątroby szczura mają krótsze odcinki DNA w nukleosomach,

niż komórki wątroby dorosłych osobników (31). Jednakże odmienny charakter mają zmiany wielkości DNA nukleosomów w trakcie różnicowania *Physarum polycephalum* (nukleosomy aktywnie dzielącego się plazmodium zawierają około 181 par nukleotydów DNA, a znacznie rzadziej dzielącej się ameby około 176 par nukleotydów DNA) (48), w trakcie rozwoju embrionalnego tkanki nerwowej szczura (neurony embrionalne zawierają w nukleosomach około 215 par nukleotydów DNA, neurony dojrzałych szczurów około 179 par nukleotydów DNA) (44). Tak więc jednoznaczne powiązanie wielkości DNA nukleosomów z aktywnością podziałową komórki nie wydaje się możliwe.

Różnice wielkości odcinków DNA nukleosomów zapewne nie wynikają z różnic między histonami H2A, H2B, H3, H4 różnych organizmów. Rekonstrukcja nukleohistonów przy użyciu histonów H2A, H2B, H3, H4 prowadzi do powstania nukleosomów o jednakowej zawartości DNA bez względu na pochodzenie histonów (49).

W niektórych przypadkach możliwa jest korelacja wielkości odcinków DNA nukleosomów z zawartością aminokwasów zasadowych w histonie H1 (16, 22, 23, 50). Im więcej reszt aminokwasów zasadowych zawiera H1, tym dłuższy odcinek DNA związany jest z nukleosomem.

Liczne dane potwierdzają założenie Kornberga, że wszystkie nukleosomy zawierają oktamer histonów $(H2A \cdot H2B \cdot H3 \cdot H4)_2$. Zastosowanie metod immunologicznych pozwoliło na wykazanie, że wszystkie nukleosomy zawierają histony H2B, H3 i H4 (51). Analiza składu histonów w otrzymanych w wyniku trawienia chromatyny nukleazą z *Micrococcus* frakcjach mono-, di-, tri- i tetranukleosomów dowodzi, że w każdej frakcji ilości histonów H2A, H2B, H3, H4 są równomolowe i odpowiadają zawartości dwu cząsteczek każdego z nich w jednym nukleosomie (52). Sprzęganie histonów w wyizolowanych nukleosomach prowadzi do powstania homogenego kompleksu o masie cząsteczkowej odpowiadającej oktamerowi (53, 54). Jeżeli prowadzi się rekonstrukcję nukleohistonów zmieniając w mieszaninie stężenie tylko jednego z histonów H2A, H2B, H3, H4, to liczba powstających nukleosomów, wykrywanych przy użyciu mikroskopu elektronowego, jest wprost proporcjonalna do ilości tego histonu, którego stężenie molowe jest najniższe (55). Dowodzi to, że wszystkie cztery histony są niezbędne do utworzenia nukleosomu.

W skład nukleosomów, oprócz DNA i histonów, wchodzi także białka niehistonowe (39, 56—58) i RNA (59). Zawartość białek niehistonowych wynosi średnio 25—66% (60, 61) w stosunku do ilości histonów, przy czym można wyróżnić frakcję nukleosomów niemal wolnych od białek niehistonowych i frakcję, w której białek niehistonowych jest 2—6 razy więcej, niż histonów (59). Również zawartość RNA nie jest we wszystkich nukleosomach jednego organizmu jednakowa. Około 10% nukleosomów zawiera 30—70% RNA w stosunku do DNA (59). W pozostałych nukleosomach zawartość RNA jest znikoma.

II-1. Rdzeń nukleosomu

Zastosowanie nukleazy z *Micrococcus* pozwala na wyróżnienie w DNA nukleosomu dwu obszarów (62—66). Działanie nukleazy na wyizolowane nukleosomy prowadzi początkowo do degradacji końców cząsteczki DNA nukleosomu z jednoczesnym uwolnieniem histonu H1 i części białek nie-histonowych. Obszar DNA łatwo ulegający degradacji, którego długość w nukleosomach różnych organizmów może wynosić od około 10 do 120 par nukleotydów, nazwano łącznikiem. Bezpośredni związek H1 z DNA łącznikowym wykazano badając nukleoproteinowe fragmenty powstające w wyniku degradacji nukleosomu nukleazą (57, 67), badając podatność na trawienie chromatyny pozbawionej H1 (68), analizując skład histonów frakcji mono-, di-, tri- i tetranukleosomów (52).

W momencie, gdy w wyniku działania nukleazy długość odcinka DNA nukleosomu ulegnie zmniejszeniu do 140 par nukleotydów następuje bardzo wyraźnie zahamowanie procesu hydrolizy DNA (66, 69—71). W efekcie powstają nukleoproteinowe kompleksy złożone z oktameru histonów i odcinka 140 par nukleotydów DNA, nazwane rdzeniem nukleosomu (69). Wykazano obecność rdzenia w nukleosomach wszystkich badanych organizmów (15, 22, 23, 31, 32).

DNA rdzenia nie jest jednak całkowicie niepodatny na działanie nukleaz. Długie działanie nukleazy z *Micrococcus* prowadzi do ograniczonej degradacji rdzenia, przy czym powstaje kilka odcinków DNA o długości 40—120 par nukleotydów (30, 57, 61, 71—75). Powstałe produkty są całkowicie odporne na działanie nukleaz. Zależnie od warunków, w jakich prowadzi się trawienie, DNA niepodatny na działanie nukleaz (tzw. *limit digest*) stanowi od 30 do 50% całości DNA chromatyny (18, 20, 33, 61, 71, 76—78).

Na ogół w badaniach struktury nukleosomów, w szczególności przy zastowaniu metod fizycznych, używano preparatów wyizolowanych nukleosomów, otrzymanych w wyniku trawienia chromatyny nukleazą i frakcjonowania powstałych produktów metodą sączenia molekularnego lub wirowania w gradiencie gęstości roztworu sacharozy (38, 67, 69, 79—81). Preparaty takie są silnie heterogenne. Poszczególne nukleosomy różnią się składem białek niehistonowych, zawartością RNA oraz wielkością odcinków DNA. Utrudnia to interpretację wyników doświadczeń, a wyznaczane wielkości są tylko średnimi parametrów trudnej do scharakteryzowania populacji. Znaczne różnice wielkości i składu białkowego nukleosomów różnych organizmów ograniczają możliwość uogólniania uzyskiwanych danych.

W związku z tymi trudnościami do badania struktury nukleosomu coraz częściej używa się preparatów rdzeni nukleosomowych, jako że różnice między poszczególnymi rdzeniami jednego organizmu sprowadzają się tylko do różnic w sekwencjach nukleotydów DNA i stopniu mody-

fikacji histonów. Jednakowe wielkości odcinków DNA i podobieństwo histonów w rdzeniach nukleosomowych różnych organizmów pozwalają przypuszczać, że dane uzyskane w badaniu rdzeni z dowolnego organizmu będą w dużym stopniu uniwersalne.

Opracowano kilka metod pozwalających na otrzymanie dużych ilości homogennych preparatów rdzeni nukleosomowych. Zawierają one wyłącznie histony H2A, H2B, H3, H4 w równomolowych ilościach oraz odcinki DNA o długości 140 par nukleotydów (38, 66, 69, 82); o stopniu jednorodności tych preparatów świadczy ich zdolność do tworzenia regularnych kryształów (83, 84).

Znakomity przegląd wcześniejszych prac dotyczących podjednostkowej budowy chromatyny i struktury nukleosomu dał Kornberg (85).

III. Struktura rdzenia nukleosomu

III-1. Kształt i wymiary rdzenia nukleosomu

Obserwacje rdzenia nukleosomu przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazują, że ma on wymiary walca o średnicy 110 Å i średniej wysokości około 55 Å (83, 84). Powierzchnie podstaw walca nie są dokładnie równoległe, lecz lekko nachylone, przez co kształt rdzenia jest klinowaty. Kąt nachylenia podstaw zależy od wzajemnych oddziaływań między rdzeniami i może wynosić od 5° do 16°, co dowodzi pewnej plastyczności struktury (84). Analiza rentgenograficzna kryształów rdzeni nukleosomowych również wykazuje takie same wymiary, przy czym silnie zaznaczona jest płaszczyzna symetrii prostopadła do wysokości rdzenia (83).

Wielkości hydrodynamiczne rdzenia — współczynnik sedymentacji $s_{20,w}^0$ wynoszący około 11,0—11,4 S (38, 86—89) i współczynnik dyfuzji $D_{20,w}^0$ równy $3,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (38, 89) odpowiadają silnie uwodnionej cząstce o promieniu maksymalnym około 55 Å i kształcie odbiegającym od kuli. Precyzyjna analiza wartości $s_{20,w}^0$ i $D_{20,w}^0$ rdzenia nukleosomowego wykazała, że struktura rdzenia nie jest stała i zależy od siły jonowej roztworu (90).

III-2. Układ histonów w rdzeniu nukleosomu

Stosując analizę dyfrakcyjną roztworów rdzeni nukleosomowych wykazano, że całkowita objętość nieuwodnionego rdzenia nukleosomu wynosi około 223 nm³ (91), pozycję centralną zajmuje hydrofobowy rdzeń histonowy otoczony silnie uwodnioną warstwą zawierającą DNA i fragmenty cząsteczek histonów (83, 91—96); środki symetrii rdzenia białkowego i warstwy zewnętrznej pokrywają się (97). Rdzeń histonowy ma około

40 Å wysokości i 64—74 Å średnicy, 132—137 nm³ objętości i zawiera około 75% cząsteczek histonów (94, 97). Pozostałe fragmenty cząsteczek histonów wraz z odcinkiem 140 par nukleotydów DNA tworzą silnie uwodnioną (ok. 75% stanowi woda) warstwę zewnętrzną o promieniu wewnętrznym około 32 Å i zewnętrznym około 54 Å (97). Zewnętrzne ułożenie DNA, postulowane już przez Kornberga, potwierdzone jest także przez możliwość rozdysocjowania rdzenia, w którym histony zostały ze sobą powiązane kowalencyjnie, na składnik białkowy i wolny DNA w 3 M roztworze NaCl (98). Wyklucza to otaczanie DNA przez cząsteczki histonów.

III-2.1. Struktura kompleksu histonów w 2 M roztworze NaCl

Badanie oktameru histonów, będącego podstawą struktury rdzenia nukleosomu, prowadzi się najczęściej stosując jako układ modelowy kompleks histonów w 2 M roztworze NaCl. Kompleks taki jest bardzo podobny do układu natywnego w rdzeniu nukleosomowym pod względem wzajemnego ułożenia histonów (53, 99), charakterystycznej, ograniczonej, podatności na działanie proteaz (88, 99), widm w podczerwieni (101, 102), dichroizmu kołowego (100), NMR (103), obrazu dyfrakcji neutronów (94). Zapewne 2 M roztwór NaCl osłabia elektrostatyczne oddziaływania odpychające między histonami, podobnie jak ujemnie naładowane grupy fosforanowe DNA w nukleosomie, umożliwiając tworzenie specyficznych kompleksów.

Charakter kompleksu histonów w 2 M roztworze NaCl nie jest jednoznacznie ustalony. Początkowo twierdzono, że jest to tetramer (H2A·H2B·H3·H4) (99, 104, 105), jednakże nowsze badania wykazują, że kompleks ten jest oktamerem (53, 54, 106). Analiza kompleksów powstających w 2 M roztworze NaCl przy różnych stężeniach histonów wykazała, że tetramer i oktamer współistnieją w stanie dynamicznej równowagi, przy stałej dysocjacji oktameru na dwa tetramery wynoszącej 1,47 g/l (107). Przy stężeniu histonów 0,25 g/l tetramer stanowi 91% układu, przy stężeniu 15 g/l — 27%. Wykorzystując znajomość współczynnika sedymentacji oktameru histonów (4, 77 S) wykazano, że oktamer, podobnie jak rdzeń nukleosomu, nie jest kulisty, lecz elipsoidalny (106).

Na podstawie badania widma NMR kompleksu histonów w 2 M roztworze NaCl wnioskowano o występowaniu w takim kompleksie silnie zwartej, hydrofobowej, bogatej w strukturę α części globularnej, oraz wolnych, pozbawionych struktury regularnej „ogonków” (103, 108, 109). Część globularna zbudowana jest z rejonów centralnych i C-końcowych cząsteczek histonów, stanowiących około 70—75% długości cząsteczek, natomiast „ogonki” utworzone są przez silnie polarne rejony N-końców cząsteczek, gdzie skupione jest około 50% reszt aminokwasów zasadowych histonów (103, 110). K o r b e r g zakwestionował (85) wartość prac

prowadzących do takiego wniosku, twierdząc, że obecność niewielkiej nawet liczby zdenaturowanych cząsteczek histonów w badanym preparacie może prowadzić do uzyskania wyników niezgodnych z rzeczywistą strukturą kompleksu. Wydaje się jednak, że mamy wystarczająco dużo danych pozwalających na poparcie kwestionowanego przez Kornberga modelu, według którego oktamer histonów składa się ze zwartej części centralnej i swobodnych „ogonków”. I tak stała sedymentacji kompleksu w 2 M roztworze NaCl jest zbyt mała w stosunku do masy, gdyby przyjąć, że kompleks jest globularny. Obecność „ogonków” zaś zwiększałaby współczynnik tarcia, prowadząc tym samym do zmniejszenia współczynnika sedymentacji (108). Dalej, w rdzeniu nukleosomu tylko około 75% masy histonów znajduje się w centralnym, hydrofobowym rdzeniu białkowym, reszta natomiast leży wraz z DNA w warstwie zewnętrznej. Działanie trypsyny na rdzeń nukleosomu lub kompleks histonów w 2 M roztworze NaCl powoduje specyficzne odtrawienie odcinków N-końcowych, stanowiących około 30% masy histonów (88, 99, 110—113), przy zachowaniu pozostałych fragmentów w postaci nienaruszonego kompleksu, zdolnego do oddziaływań z DNA (110). Widmo NMR takiego kompleksu, powstałego po odtrawieniu odcinków N-końcowych, nie wykazuje obecności swobodnych, pozbawionych regularnej struktury, fragmentów cząsteczek (109). Acetylacja histonów w chromatynie *in vivo* zachodzi wyłącznie w rejonach N-końców (114), co potwierdza ich stosunkowo dużą dostępność. Proponowana struktura rdzenia histonowego tłumaczy wiele właściwości nukleosomu, natomiast nie przedstawiono do tej pory żadnych faktów z nią niezgodnych.

III-2.2. Oddziaływania między histonami w rdzeniu nukleosomu

Wewnętrzna organizacja białkowego rdzenia nukleosomu nie została dotychczas wyjaśniona. Wydaje się, że konieczność wzajemnego precyzyjnego dopasowania struktury trzyczłonowej poszczególnych cząsteczek histonów, umożliwiającego tworzenie zwartego kompleksu, jest zasadniczą przyczyną małej zmienności ewolucyjnej histonów.

Badanie połączeń powstających między cząsteczkami histonów w wyniku działania związków sprzęgających pozwala na określenie wzajemnego ułożenia histonów w nukleosomie. Stosując taką metodę stwierdzono z całą pewnością, że histony H3 i H4, H2A i H2B, H2B i H4 znajdują się w nukleosomie w bezpośrednim kontakcie (53, 54, 99, 115—121). Większość doświadczeń wykazywała także oddziaływania histonów H2A i H4 i dwu cząsteczek histonów H3 (53, 54, 115); niekiedy wykrywano też sąsiedztwa innych par histonów (115, 121, 123). Sprzęganie histonów w chromatynie w 6 M roztworze mocznika, gdy globularna struktura nukleosomów ulega całkowitemu zniszczeniu, pozwoliło na stwierdzenie, że histony H3 nie leżą obok siebie wzdłuż cząsteczki DNA (122).

Zbadanie kompleksu histonów powstającego w wyniku działania promieni nadfioletowych i tetranitrometanu na chromatynę pozwoliło na stwierdzenie, że cząsteczka histonu H2B może jednocześnie tworzyć w rejonie C-końca połączenie z rejonem C-końca H4 i w rejonie N-końca z histonem H2A (124).

Histony, których oddziaływania w nukleosomie wykrywa się niezależnie od stosowanej metody sprzęgania, w stanie wolnym w roztworach o fizjologicznym pH i sile jonowej tworzą ze sobą stabilne kompleksy; są to: tetramer $(H3 \cdot H4)_2$ (6, 12, 13, 126, 127), dimer $H2A \cdot H2B$ (126—128), dimer $H2B \cdot H4$ (126—129). Wydaje się to stanowić dodatkowy argument potwierdzający ich oddziaływania w nukleosomie. Bliskość histonów H2A i H2B w nukleosomie wykazano także badając fragmenty subnukleosomowe powstałe w wyniku długotrwałego działania nukleazy z *Micrococcus* (130). Jeden z fragmentów zawierał odcinek 35—40 par nukleotydów DNA związanych z histonami H2A i H2B.

Badania widma NMR kompleksów powstających pomiędzy fragmentami cząsteczek H3 i H4 pozwala na przypuszczenie, że rejonami, które biorą udział w oddziaływaniach, są obszary środkowy i C-końca H4 (reszty aminokwasowe od 38 do 102) i rejon środkowy H3 (reszty aminokwasowe od 42 do 120) (131). Badanie wpływu utlenienia grup tiolowych reszt cysteiny w histonie H3 z grasicy cielęcina na tworzenie kompleksu z histonem H4 wykazuje, że rejon Cys 110 w H3 oddziałuje z histonem H4 (132). Możliwość tworzenia normalnego nukleosomu przez dimery histonu H3 kury wykazuje, że rejony Cys 96 dwu cząsteczek H3 znajdują się w nukleosomie w bezpośrednim kontakcie (133).

III-2.3. Centralna rola tetramery histonów $(H3 \cdot H4)_2$

Postulowana już przez Kornberga centralna rola tetramery histonów H3 i H4 w organizacji nukleosomu zyskała bardzo przekonujące potwierdzenie w eksperymentach nad rekonstrukcją nukleosomów. W eksperymentach tych miesza się w dobranych stosunkach histony i DNA w 2 M roztworze NaCl i przez stopniowe obniżanie siły jonowej doprowadza się do utworzenia kompleksów nukleoproteinowych. Kompleksy takie, tworzone z DNA i równomolowych ilości histonów H2A, H2B, H3, H4 są nieodróżnialne metodami fizyko-chemicznymi od natywnych nukleosomów (14, 134—138). Przeprowadzenie rekonstrukcji przy użyciu tylko histonów H3 i H4 również prowadzi do utworzenia specyficznych struktur podobnych do rdzeni nukleosomowych pod względem kształtu i wielkości (55, 139—141), widma dyfrakcji promieni X (6, 142, 143), podatności na działanie nukleaz i proteaz (134, 135), zdolności do indukowania naprężeń w kolistych cząsteczkach DNA (55, 140, 144). Żadnej z tych cech nie wykazują kompleksy nukleohistonowe nie zawierające jedno-

częściej obu histonów H3 i H4 (134, 135). Rola histonów H2A i H2B polega zapewne na dodatkowej stabilizacji układu przez wypełnianie luk między tetramerem $(H3 \cdot H4)_2$, stanowiącym zrąb rdzenia (134), a DNA. Potwierdza to doświadczenie, w którym do rekonstruowanego kompleksu DNA z H3 i H4 dodano w roztworze o niskiej sile jonowej parę histonów H2A i H2B, uzyskując strukturę identyczną, jak natywny nukleohiston (144). Przeprowadzenie takiego eksperymentu w odwrotnej kolejności nie doprowadziło do utworzenia specyficznych kompleksów nukleoproteinowych.

W trakcie rekonstrukcji przy użyciu czterech rodzajów histonów z DNA wiążą się najpierw histony H3 i H4, a dopiero dalsze obniżenie siły jonowej poniżej 0,85 M NaCl prowadzi do związania histonów H2A i H2B (145).

Niewątpliwie proces rekonstrukcji, przebiegający w roztworze o niefizjologicznym stężeniu soli, może być różny od procesu prowadzącego do powstania nukleosomów w warunkach natywnych. W świetle ostatnich badań wydaje się prawdopodobne, że cały oktamer histonów wiąże się z kwaśnym białkiem pełniącym funkcję organizatora i nośnika białkowego rdzenia nukleosomu i dopiero w takiej postaci łączy z DNA (146, 147). Jednakże najnowsze badania W o r c e l l a i wsp. nad procesem replikacji chromatyny (205) wydają się świadczyć, że także *in vivo* histony H3 i H4 łączą się z DNA wcześniej, niż pozostałe.

III-3. Struktura i układ DNA w rdzeniu nukleosomu

Sposób ułożenia cząsteczki DNA na białkowym rdzeniu nukleosomu nie jest w pełni poznany. Analiza wyników dyfrakcji neutronów i promieni X, a szczególnie zastosowanie różnych nukleaz, pozwalają na ustalenie niektórych parametrów charakteryzujących DNA nukleosomu.

Widmo ramanowskie nukleosomów wykazuje, że struktura DNA w nukleosomie nie różni się od konformacji B (102, 148). Na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym (149) i analizy dyfrakcyjnej rdzeni nukleosomowych (83, 91, 93—95) wnioskowano, że cząsteczka 140 par nukleotydów DNA tworzy dokoła rdzenia białkowego około 1,7 zwoju o skoku około 28 Å, zawierającego 80 par nukleotydów na zwój (83, 91).

Należy podkreślić, że regularność rozmieszczenia DNA w rdzeniu nukleosomu nie jest udowodniona. Analizując dane mikroskopii elektronowej i dyfrakcji neutronów B r a m skonstruował model budowy rdzenia nukleosomu (150), w którym droga DNA nie jest regularna, lecz składa się z fragmentów dwu spiral o przeciwnych skrętnościach. Jedna ze spiral ma promień 30 Å i skok 30 Å, druga ma promień 65 Å i skok 120 Å. Przy takim przebiegu wypadkowa liczba skrętów wyższego rzędu DNA w rdze-

niu wynosiłaby około $-0,8$. Analiza superspiralizacji* zamkniętych, kołystych cząsteczek DNA SV 40 pod wpływem tworzenia nukleosomów wykazała, że odkształcenie DNA w obrębie jednego nukleosomu jest równoważne około $1-1,25$ skrętu lewoskrętnej spirali (40, 152). Gdyby założyć, że przebieg DNA nukleosomu jest regularny, to utworzenie nukleosomu powinno wprowadzić odkształcenie równoważne $1,7-2,5$ skrętu lewoskrętnej spirali (wartość ta zależałaby od tego, czy obszar DNA łącznikowego jest, czy nie jest, ściśle związany z rdzeniem białkowym). Próbę wytłumaczenia rozbieżności między spodziewaną a faktyczną liczbą skrętów wyższego rzędu w DNA nukleosomu podjął *Levitt* (153). Wyliczył on, że wolny DNA ma około 10,6 par nukleotydów na skręt podwójnego heliksu, podczas gdy przy tworzeniu nukleosomu następuje zmniejszenie skoku DNA do 10 par nukleotydów na skręt podwójnego heliksu. Takie zmiany znoszą częściowo efekt zwijania DNA wokół białkowego rdzenia nukleosomu i wypadkowa deformacja cząsteczki DNA jest równoważna 1,4 lub nawet mniejszej liczbie skrętów lewoskrętnej spirali na jeden utworzony nukleosom. Jednakże najnowsza praca *Luttera* (206) zdaje się wskazywać, że DNA w rdzeniu nukleosomu ma około 10,4 par nukleotydów na skręt podwójnego heliksu, co podważa prawidłowość rozważań *Levitta* (153).

III-3.1. Odkształcenia DNA w rdzeniu nukleosomu

Dwuniciowy DNA jest cząsteczką stosunkowo sztywną, toteż ułożenie jej na powierzchni o małym promieniu krzywizny nie jest procesem energetycznie uprzywilejowanym (wyliczona zmiana energii swobodnej wynosi $13-44$ kcal/mol nukleosomu (153, 154)). Tworzące się naprężenia deformują regularną strukturę podwójnego heliksu. Postulowane są dwa zasadniczo różne modele odkształcenia DNA w nukleosomie.

Modele pierwszej grupy (153, 155) zakładają łagodne, równomierne wygięcie całej cząsteczki DNA bez zerwania oddziaływań typu „*stacking*” między sąsiednimi zasadami.

Elementem wspólnym modeli drugiego typu jest ograniczenie deformacji do regularnie rozmieszczonych, silnych odkształceń („*kink*”), poza którymi struktura cząsteczki DNA jest identyczna, jak w roztworze. Zaburzenia takie prowadzą do zerwania oddziaływań typu „*stacking*” i ostrego załamania osi cząsteczki. *Sobell* i wsp. (156) postulują występowanie takiej deformacji co 10 par nukleotydów. Kąt załamania osi cząsteczki wynosi około 40° , silnym zmianom w stosunku do struktury B ulega konformacja dezoksyrybozy oraz wiązania glikozydowego i fosfo-

*) Przejrzyste omówienie topologicznych aspektów tworzenia nukleosomu daje *Crick* (151).

diestrowego. Zaletą tego modelu, opartego na analizie kompleksów związków interkalujących z dinukleotydam, jest jego zgodność z obserwowanym w DNA nukleosomu rozmieszczeniem obszarów podatnych na działanie nukleaz.

Model C r i c k a i K l u g a (157) zakłada wyłącznie deformację wiązania C4'—C5' dezoksyrybozy, prowadzącą do załamania osi DNA o 98° . Autorzy proponują występowanie takiej deformacji co 20 par nukleotydów.

Rozstrzygnięcie na korzyść lub przeciwko któremuś z tych modeli tylko na podstawie rozważań teoretycznych nie jest możliwe, bowiem pod względem energetycznym i strukturalnym wszystkie wydają się prawdopodobne. Jednakże analiza stanu DNA w rdzeniu nukleosomu za pomocą pomiaru NMR pozwala uznać niektóre modele za nieprawdopodobne. Sporządzenie widma NMR [^{31}P] umożliwia określenie konformacji wiązania fosfodiestrowego z dokładnością nie mniejszą niż 1° (158). Z przeprowadzonych w ten sposób badań wynika jednoznacznie, że konformacja wszystkich wiązań fosfodiestrowych w DNA rdzenia nukleosomu jest nieodróżnialna od konformacji w DNA w stanie wolnym (101, 159). Takie wyniki wykluczają model podany przez S o b e ł l a i wsp. (156). Także przedstawione dotychczas modele ciągłej deformacji cząsteczki DNA (153, 155) są niezgodne z doświadczalnie wyznaczonymi parametrami struktury DNA nukleosomu, postulują bowiem zmiany wartości wielu kątów pomiędzy kierunkami wiązań szkieletu cukrowofosforanowego, w tym także wiązania fosfodiestrowego. Ponieważ omawiane tu prace teoretyczne (153, 155) i doświadczalne (101, 159) dotyczące struktury DNA w rdzeniu nukleosomu opublikowano niemal jednocześnie, autorzy żadnej z nich nie mogli ustosunkować się do pozostałych.

III-3.2. Sposób degradacji DNA rdzenia nukleosomu pod wpływem nukleaz

Szeregu istotnych informacji o ułożeniu i strukturze cząsteczki DNA w nukleosomie dostarcza analiza produktów działania nukleaz na rdzeń nukleosomu. Działanie nukleazy z *Micrococcus* na DNA rdzenia nukleosomu prowadzi do powstania 8—10 odcinków o długościach 40—120 par nukleotydów (30, 57, 61, 71—75), przy czym długości odcinków różnią się o wielokrotności 10 par nukleotydów. Odcinki te nie ulegają dalszej degradacji ani pod wpływem nukleazy z *Micrococcus*, ani innych nukleaz (207).

Na podstawie pierwszych prac opisujących przebieg degradacji DNA nukleosomu pod wpływem nukleaz, C a n t o r zaproponował model budowy rdzenia nukleosomu, tłumaczący ograniczoną podatność DNA nukleosomu na działanie nukleaz (160). Jednakże dokładniejsza analiza procesu trawienia DNA rdzenia nukleazami, przeprowadzona w nowszych pracach, wykazała błędność postulatów C a n t o r a.

Działanie DNazy I (EC 3.1.4.5), która w przeciwieństwie do nukleazy z *Micrococcus* nie wykazuje preferencji w stosunku do jednoniciowego DNA, ma inny przebieg i prowadzi do powstania innych produktów. Pęknięcia, powstające pod wpływem DNazy I w obu niciach DNA chromatyny, nie zawsze leżą naprzeciw siebie. Dlatego analiza produktów degradacji przy zastosowaniu standardowych technik elektroforezy nie pozwala na wykrycie wszystkich skutków działania DNazy I. Dopiero zastosowanie przez Nolla (161) elektroforezy DNA w stanie zdenaturowanym umożliwiło wykazanie, że DNaza I prowadzi do powstania w obu niciach DNA nukleosomu pęknięć rozmieszczonych dokładnie co $n \cdot 10$ nukleotydów* (gdzie n jest liczbą całkowitą).

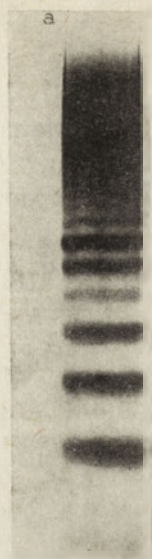
Zdenaturowanie i elektroforeza DNA chromatyny po działaniu DNazy I prowadzi do uzyskania charakterystycznej „drabinki” (Ryc. 2a) jednoniciowych odcinków DNA o długościach 10, 20, 30 itd nukleotydów, przy czym wielkość najdłuższych odcinków może dochodzić do 200 (70, 161), a nawet 300 (162) nukleotydów. Dowodzi to, że także rejon łącznika ma specyficzną ograniczoną podatność na DNazę I. Obecność odcinków o długości ponad 200 nukleotydów tłumaczono regularnym rozmieszczeniem rdzeni nukleosomowych, między którymi łącznik miałby dokładnie $n \cdot 10$ par nukleotydów, lub występowaniem układów rdzeni nie oddzielonych łącznikiem (162); wykryto takie układy w produktach trawienia chromatyny nukleazą z *Micrococcus*, lecz nie ma dowodów na ich natywny charakter (163, 164).

Już krótkie działanie DNazy I na chromatynę prowadzi do powstania odcinków mniejszych, niż 140 nukleotydów, co wskazuje, że trawienie DNA rdzenia jest tak samo szybkie, jak DNA łącznika. Ilości poszczególnych odcinków w produktach działania DNazy I nie są jednakowe: liczba odcinków o długości 70, 90, a zwłaszcza 80 nukleotydów jest większa, a odcinków o długości 60 i 100 nukleotydów mniejsza, niż pozostałych (Ryc. 2b).

Stosunkowo duża ilość odcinków 70—90 nukleotydowych wynika zapewne z ułożenia DNA dokoło rdzenia histonowego. Miejsca odległe wzdłuż cząsteczki DNA o 70—90 nukleotydów znajdują się w rdzeniu nukleosomu w niewielkiej odległości i mają podobne otoczenie. Dlatego przecięcie jednej nici DNA w dwu miejscach jest najbardziej prawdopodobne przy odległości tych miejsc wynoszącej 70, 80 lub 90 nukleotydów. Długotrwałe działanie DNazy I prowadzi stopniowo do całkowitej degradacji DNA rdzenia do odcinków dekanukleotydowych (165).

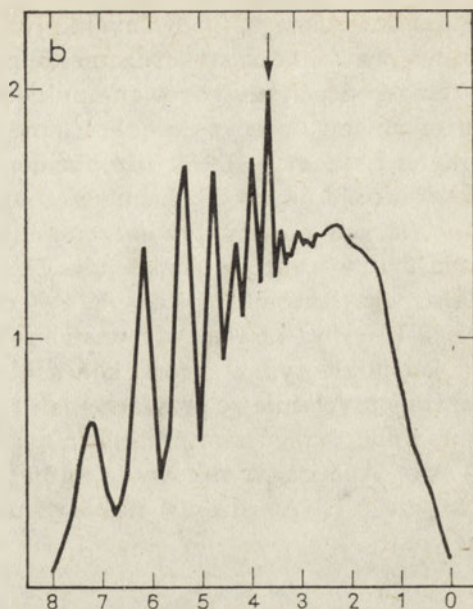
Badanie produktów działania nukleaz na DNA rdzenia dostarcza wprawdzie danych o względnym rozmieszczeniu miejsc podatnych na

*) Najnowsze badania Luttera (206) i Prunella i wsp. (210) wykazały, że powstające po działaniu DNazy I odcinki mają długość $n \cdot 10,4$ nukleotydów.



Ryc. 2a. Zdjęcie elektroforogramu zdenaturowanych fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia chromatyny *Physarum polycephalum* DNazą I.

Widoczne pasma o malejącej ruchliwości zawierają odcinki DNA o długościach odpowiednio około 20, 30, 40, 50 itd nukleotydów. Barwienie *Stains-all*. Wykonano jak Ryc. 1.



Ryc. 2b. Densytogram elektroforogramu z Ryc. 2a. Lewa strona densytogramu odpowiada dołowi Ryc. 2a.

Strzałka wskazuje położenie najintensywniejszego pasma, zawierającego odcinki 80 nukleotydów DNA. Oś odciętych — odległość od początku elektroforogramu (miejsca naniesienia prób DNA) w cm. Oś rzędnych — absorpcja światła widzialnego w jednostkach umownych.

degradację, nie pozwala jednakże na absolutną lokalizację tych miejsc w cząsteczce 140 par nukleotydów. Dopiero metoda zastosowana przez Simpsona i Whitlocka (166) umożliwiła jednoznaczne określenie położenia miejsc działania nukleaz. Polega ona na wyznakowaniu fosforem ^{32}P końców 5' cząsteczek DNA w preparatach wyizolowanych rdzeni nukleosomowych, trawieniu takich rdzeni nukleazami, a następnie przy zastosowaniu elektroforezy i autoradiografii na określeniu wielkości powstających odcinków DNA zawierających wyznakowany koniec 5'. Bardzo przejrzyste omówienie zasad tej metody daje L u t t e r (170). Stosując ją w badaniu kilku nukleaz wykazano (165—169), że miejsca ich działania na DNA rdzenia nukleosomu nie są identyczne, choć bliskie, oraz że wśród 12 obszarów odległych od siebie o 10 nukleotydów niektóre niemal zupełnie nie ulegają trawieniu, inne natomiast są szczególnie łatwo degradowane. I tak miejsca odległe od końców 5' cząsteczki DNA rdzenia nukleosomu o 30 i 110 nukleotydów są niemal zupełnie odporne na działanie nukleaz. Rejon blisko środka cząsteczki DNA jest słabo podatny na działanie DNazy I, natomiast jest łatwo przecinany przez DNazę II. Miejsca odległe od końców 5' cząsteczki DNA rdzenia o 10, 20, 40, 50, 100, 120, 130 nukleotydów bardzo łatwo ulegają działaniu nukleaz.

Analiza niezdenaturowanych produktów działania nukleaz na DNA rdzenia pozwoliła na stwierdzenie, że powstające dwuniciowe odcinki DNA mają na końcach niesparowane nukleotydy (169, 171, 172). Uwzględnienie tej informacji i precyzyjne określenie położenia miejsc działania poszczególnych nukleaz w DNA rdzenia doprowadziło do wniosku, że w DNA rdzenia znajduje się 12, rozmieszczonych co 10 par nukleotydów, miejsc, stanowiących punkty przyłączenia nukleaz do DNA, nie będących natomiast miejscem ich działania. Poszczególne nukleazy działają obok miejsc przyłączenia: DNaza I o jeden nukleotyd w stronę końca 3', DNaza II o dwa nukleotydy w stronę końca 3', a nukleaza z *Micrococcus* o jeden nukleotyd w stronę końca 5' (165, 171). Różne wyeksponowanie poszczególnych miejsc przyłączenia i różne właściwości nukleaz powodują, że prawdopodobieństwa przecięcia w poszczególnych miejscach nie są jednakowe. Analiza wyników działania nukleaz wykazała, że stosunkowo duża część DNA rdzenia nukleosomu jest dostępna dla oddziaływań z zewnątrz.

III-4. Symetria rdzenia nukleosomu

Sposób działania nukleaz na DNA rdzenia, w szczególności rozmieszczenie rejonów niepodatnych na degradację, sugeruje, zgodnie z wynikami analizy rentgenograficznej (83), symetryczną budowę rdzenia nukleosomu (169, 170). Silnym potwierdzeniem symetrycznego układu DNA w nukleosomie są wyniki działania DNazy II na natywną chromatynę (173) oraz egzonukleazy III z *E. coli* na wolne nukleosomy (174).

W obecności jonów 1 mM Ca^{++} lub 150 mM Na^+ DNaza II prowadzi degradację chromatyny komórek cielęcia lub szczura (zawierających w jednym nukleosomie około 200 par nukleotydów DNA) do odcinków $n \cdot 100$ par nukleotydów (173), wykazując tym samym preferencyjną degradację DNA rejonu między rdzeniami nukleosomów (tak jak nukleaza z *Micrococcus*), a także dokładnie w środku rdzeni.

Egzonukleaza III działając na wolne nukleosomy prowadzi do zmniejszania długości odcinka DNA w wyniku połączonych aktywności egzonukleolitycznych $3' \rightarrow 5'$ i $5' \rightarrow 3'$. W momencie skrócenia DNA nukleosomu do 140 par nukleotydów sposób działania enzymu ulega zmianie. Degradacja postępuje wyłącznie w kierunku $3' \rightarrow 5'$, przy czym po zredukowaniu długości jednej nici DNA o 10 nukleotydów następuje wyraźna pauza w aktywności. Dalsze działanie prowadzi do kolejnej degradacji odcinka 10 nukleotydów i pauzy. Tak więc w wyniku działania egzonukleazy III na rdzeń nukleosomu powstają odcinki DNA, zawierające nienaruszone końce 5' i końce 3' skrócone o $n \cdot 10$ nukleotydów (174). Odcinki krótsze niż 70 nukleotydów nie powstają, co wynika z mechanizmu działania enzymu. Ponieważ przebieg degradacji obu nici DNA rdzenia jest iden-

tyczny, można wnioskować o symetrycznym ułożeniu cząsteczki DNA.

Symetria rdzenia nukleosomowego, postulowana m.in. przez Weintrauba i wsp. (175), jest dodatkowo potwierdzona przez obserwacje Oudeta i wsp. (55). Badając przy pomocy mikroskopu elektronowego preparaty minichromosomów SV 40, utrwalane w niskiej temperaturze i sile jonowej, stwierdzili oni występowanie struktur o średnicy 93 Å, zawierających około 96 par nukleotydów DNA, których liczba (ok. 40—50) w minichromosomie była dwukrotnie większa, niż liczba nukleosomów o średnicy 125 Å, zawierających około 200 par nukleotydów DNA, w minichromosomach utrwalanych w sposób standardowy. Autorzy sądzą, iż osłabienie w niskiej sile jonowej i temperaturze oddziaływań hydrofobowych między tetramerami histonów (H2A·H2B·H3·H4) prowadzi do „rozdwójenia” nukleosomu na dwa pół-nukleosomy; wykazali też, że przejście takie jest odwracalne. Jest bardzo prawdopodobne, że obserwowane przez niektórych badaczy struktury o średnicy 60—80 Å (8, 36, 38), nazywane niekiedy ciałami ν (8), w rzeczywistości odpowiadały pół-nukleosomom, tym bardziej, że stosowana w tych pracach metoda przygotowania preparatów mikroskopowych polegała na zawieszaniu chromatyny w wodzie.

Mimo dużej atrakcyjności hipotezy o istnieniu pół-nukleosomów *in vivo*, w szczególności w czasie procesów wymagających rozplecenia podwójnego heliksu DNA, nie udało się zaobserwować ich w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Analiza kompleksów transkrypcyjnych nie wykazuje obecności pół-nukleosomów (176, 177), a konserwatywny mechanizm przekazywania białkowych rdzeni nukleosomów w czasie replikacji chromatyny (178) trudno pogodzić z istnieniem pół-nukleosomów.

III-5. Oddziaływanie DNA z histonami w nukleosomie

Brak jednoznacznych danych pozwalających na stwierdzenie, jakiego rodzaju oddziaływania odpowiedzialne są za charakterystyczną podatność DNA w nukleosomie na działanie nukleaz.

W obecności 5 M roztworu mocznika, gdy globularna struktura rdzenia nukleosomu jest zniszczona, a histony w dalszym ciągu pozostają związane z DNA (87), nukleaza z *Micrococcus* i DNaza II prowadzą całkowicie niespecyficzną degradację DNA, podczas gdy DNaza I w dalszym ciągu działa tylko na miejsca rozmieszczone co 10 nukleotydów (179). Względne ilości powstających w tych warunkach odcinków są inne, niż przy trawieniu natywnego nukleosomu. Można by zatem przypuszczać, że związanie z histonami wystarcza dla ograniczenia podatności DNA na DNazę I. Jednakże rekonstruowane kompleksy DNA z pojedynczymi histonami, czy nawet układami histonów nie zawierającymi jednocześnie H3 i H4, lub niespecyficzne kompleksy z sumą histonów, utworzone w roztworach o niskim stężeniu soli, nie wykazują specyficznej podatności na DNazę I (134, 135).

Działanie nukleaz na produkt trawienia rdzenia nukleosomu trypsyną przebiega w sposób podobny, jak w układzie natywnym (88, 110). Powstają jednakże tylko krótkie odcinki $n \cdot 10$ nukleotydów, przy czym im większy stopień strawienia histonów, tym mniejszy odcinek DNA zachowuje specyficzną podatność na DNazę I, mimo że prawdopodobnie także odtrawione odcinki N-końcowe cząsteczek histonów pozostają związane z DNA. Taka korelacja pozwala sądzić, że tylko odcinek DNA owinięty wokół globularnego kompleksu utworzonego przez niestrawione, centralne i C-końcowe, fragmenty cząsteczek histonów zachowuje swoistą podatność na nukleazę. Takie przypuszczenie potwierdza wynik trawienia DNazą I kompleksu DNA z białkiem zdolnym do powodowania superspiralizacji cząsteczek DNA — gyrazą (180). W tym kompleksie DNA, zapewne owinięty dokoła białka, ulega ograniczonej degradacji do odcinków, których wielkości różnią się o $n \cdot 10$ nukleotydów.

DNA związany z kryształami fosforanu wapniowego również ulega pod wpływem DNazy I ograniczonej degradacji do odcinków $n \cdot 10$ nukleotydów. W tym przypadku wydaje się, że przyczyną tego jest osłonięcie z jednej strony cząsteczki DNA przez kryształy (180). Na tej podstawie można sądzić, że specyficzna podatność na DNazę I jest cechą DNA jednostronnie związanego z jakąś powierzchnią, niekoniecznie sferyczną.

Poznanie sposobu związania poszczególnych histonów i fragmentów ich cząsteczek z DNA ma duże znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmów regulacji genetycznej u *Eukaryota*. Wiadomo, że histony są niespecyficznymi represorami aktywności matrycowej DNA (139, 181) i że represja ta może być modulowana przez białka niehistonowe (182—185). Dla wyjaśnienia mechanizmu działania białek niehistonowych — regulatorów genetycznych — niezbędne jest dokładne poznanie sposobu oddziaływań histonów z DNA i ich zmian pod wpływem białek niehistonowych.

Oddziaływanie DNA z histonami ma głównie charakter elektrostatyczny, o czym świadczy choćby możliwość oddysocjowania histonów od DNA w roztworach o wysokiej sile jonowej i zachowanie oddziaływań DNA-histony w wysokich stężeniach mocznika (11, 38, 87, 98, 110, 122). Oddziaływania poszczególnych histonów z DNA są specyficzne w stosunku do sekwencji nukleotydów, natomiast kompleksy histonów tworzące rdzeń nukleosomu nie wykazują tej cechy. Stwierdzono to badając rozmieszczenie nukleosomów w stosunku do miejsc rozpoznawanych przez nukleazy restrykcyjne w DNA plazmidów i wirusów zarówno w natywnych (SV 40), jak i rekonstruowanych nukleohistonach (186—188).^{*} Także analiza składu DNA wyizolowanych nukleosomów w porównaniu z całym DNA chro-

^{*} Przeprowadzenie rekonstrukcji nukleosomów przy zastosowaniu odcinków DNA o znanej sekwencji nukleotydów doprowadziło do wniosku, że wiązanie oktameru histonów DNA jest uzależnione od sekwencji nukleotydów (208). Ostatnie badania Varshvsky'ego i wsp. (209) wskazują, że w minichromosomie SV 40 rejon DNA położony blisko początku replikacji nie wykazuje struktury nukleosomowej.

matyny wykazuje brak zależności rozmieszczenia nukleosomów od sekwencji nukleotydów DNA (61, 189, 190).

Badanie dostępności grup N7 guaniny i N3 adeniny, występujących odpowiednio w dużym i małym rowku DNA, dla modyfikacji siarczanem metylu w wolnym DNA i w nukleohistonie pozwala na stwierdzenie, że histony chronią grupę N7 guaniny silniej, niż N3 adeniny, co sugeruje ich oddziaływanie z DNA od strony dużego rowka (191—193). Takie ułożenie histonów jest zgodne z wynikami doświadczeń, w których badano wpływ histonów na dostępność DNA dla związków o znanym miejscu oddziaływania z DNA (194, 195). Natomiast badania przy zastosowaniu spektroskopii ramanowskiej nie wykazują żadnych oddziaływań histonów z grupą N7 guaniny (102, 148). Oddziaływania takie występują natomiast między DNA a białkami niehistonowymi (148).

III-5.1. Udział odcinków N-końcowych histonów w oddziaływaniach z DNA

Zarówno elektrostatyczny charakter oddziaływań DNA-histony, jak i liczne inne fakty wskazują, że zasadniczym miejscem oddziaływania DNA z histonami są ich odcinki N-końcowe.

Określenie regionów cząsteczek histonów najsilniej związanych z DNA na podstawie ich częściowej oporności na długotrwałe działanie trypsyny wykazało, że głównie odcinki N-końcowe, w mniejszym stopniu C-końcowe, wszystkich histonów i krótkie fragmenty w środku cząsteczek H2A i H2B są związane z DNA (196).

W trakcie działania trypsyny na nukleosom odtrawieniu ulegają odcinki N-końcowe histonów. Jednocześnie maleje współczynnik sedymentacji nukleosomów i stopniowo ze wzrostem stopnia degradacji histonów rośnie ilość DNA w strukturze zbliżonej do wolnego (88). Analiza przebiegu topnienia DNA rdzeni o różnym stopniu degradacji histonów wykazuje obecność fragmentów DNA o temperaturze topnienia znacznie niższej (46—57°C), niż w natywnych rdzeniach (79°C). Ilość DNA o niskiej temperaturze topnienia jest proporcjonalna do stopnia strawienia histonów. Również badanie dichroizmu kołowego przy długości fali 280 nm wykazuje ze wzrostem stopnia degradacji histonów przybywanie fragmentów DNA o strukturze takiej, jak wolny DNA. Z przedstawionych danych wynika, że degradacja odcinków N-końcowych cząsteczek histonów rdzenia nukleosomowego prowadzi do uwalniania fragmentów DNA rdzenia, co dowodzi istotnej roli tych rejonów histonów w utrzymywaniu specyficznej struktury DNA w rdzeniu nukleosomowym.

Odtrawienie N-końcowych odcinków histonów prowadzi do wzrostu podatności DNA rdzenia na działanie DNazy I. Szczególnie silny wzrost podatności wykazują miejsca odległe o 20—35, 60, 70, 80 nukleotydów od końców 5' cząsteczki DNA (110). Można zatem przypuszczać, że głów-

nie te rejony DNA rdzenia są związane z odcinkami N-końcowymi histonów.

Acetylacja odcinków N-końcowych H3 i H4 prowadzi do osłabienia związania DNA w rdzeniu nukleosomowym, czemu odpowiada niewielkie obniżenie temperatury topnienia (z 74,5°C do 73,6°C) i niewielki wzrost eliptyczności przy 280 nm (197). Analiza podatności DNA rdzeni nukleosomowych zawierających silnie acetylowane H3 i H4 na działanie DNazy I i nukleazy z *Micrococcus* wykazuje, że końce cząsteczki i miejsca odległe o 60 nukleotydów od końców 5' cząsteczki DNA są bardziej podatne, niż w rdzeniach zawierających nieacetylowane histony (197). Zapewne te właśnie miejsca oddziałują z rejonami N-końcowymi H3 i H4.

III-5.2. Rozmieszczenie poszczególnych histonów wzdłuż cząsteczki DNA nukleosomu

Stosując sprzężanie histonów z aktywowanym DNA w rdzeniu nukleosomowym Simpson wykazał (198), że z końcami 5' cząsteczki DNA oddziałują histony H3. Sprzężanie histonów z DNA nukleosomu pod wpływem promieni nadfioletowych prowadzi do powstania produktu, zawierającego histony H2A i H2B związane z DNA (199), potwierdzając tym samym udział tych histonów w tworzeniu struktury nukleosomu. Powstaje także interesujący kompleks zawierający tylko DNA i H1 (199), słabo podatny na działanie nukleaz; w mikroskopie elektronowym ma on średnicę 90 Å, często z obszarem o mniejszej gęstości w środku. Widmo dichroizmu kołowego tego kompleksu w rejonie 280 nm jest podobne, jak dla nukleosomu. Na tej podstawie autorzy sugerują, że w nukleosomie histon H1 związany jest z obydwoma końcami cząsteczki DNA.

Zastosowana przez Mirzabekova i wsp. złożona metoda badania produktów sprzężania histonów z DNA w rdzeniu nukleosomowym pozwoliła na stworzenie szczegółowego modelu liniowego układu cząsteczek histonów wzdłuż DNA (193, 200). Rejony DNA związanego z histonami występują na zmianę z wolnym DNA, przy czym odcinki DNA wolnego rozmieszczone są co około 10 nukleotydów i odpowiadają miejscom podatnym na DNazę I. Każda z cząsteczek histonów związana jest z 2—4 dekanukleotydowymi odcinkami DNA. Zaproponowany model w przekonujący sposób wyjaśnia ograniczoną dostępność DNA rdzenia dla nukleaz i jest w zgodzie z większością innych danych dotyczących wzajemnego rozmieszczenia histonów w nukleosomie i w stosunku do DNA.

IV. Uwagi końcowe

Na podstawie dostępnych danych skonstruowano liczne modele budowy nukleosomu (83, 91—97, 150, 175, 200—203). Podczas gdy ogólne informacje dotyczące rozmiarów, kształtu i wzajemnego rozmieszczenia

DNA i histonów w rdzeniu wydają się być ostateczne, uderza niekompletność danych dotyczących szczegółów wewnętrznej organizacji nukleosomu. Z tego powodu proponowane schematy szczegółowej struktury nukleosomu mają ciągle charakter hipotez. W grupie tych modeli postulaty Mirzabekova i wsp. (200) wyróżniają się silną podbudową doświadczalną.

Zagadnienie struktury nukleosomu, mimo że podstawowe, jest tylko jednym z wielu aspektów badań chromatyny. Udział nukleosomów w tworzeniu struktur wyższego rzędu, w procesach replikacji i transkrypcji stanowi fascynujące i jedno z wiodących w biologii molekularnej zagadnienie, któremu poświęcono wiele badań i rozważań teoretycznych. Mimo ogromnej liczby danych dotyczących tych problemów ich rozwiązanie wydaje się wciąż odległe. Liczne wyniki przeczą sobie nawzajem i brak, jak dotąd, koncepcji porządkującej tę dziedzinę biologii molekularnej.

Krótki przegląd problemów dotyczących tych aspektów badań chromatyny można znaleźć w pracy Felsenfelda (204), jednego z pionierów zastosowania nukleaz do badania struktury chromatyny.

Niniejszy artykuł powstał w trakcie wykonywania przez autora pracy magisterskiej w Zakładzie Biochemii Ogólnej Instytutu Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Toczko i dr Andrzeja Jerzmanowskiego. Rozdziały elektroforetyczne wykonała Pani Aleksandra Bakula, zdjęcia Pan Artur Szymański.

Zaakceptowano do druku 5.9.1979

PIŚMIENICTWO

1. Lipińska A., Kłyszajko-Stefanowicz L., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 145—164.
2. Delange R., Smith E., (1975) w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Symposium 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholm G. E. W., str. 59—70; Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
3. Staynov D., (1978), *Nature*, **274**, 15—16.
4. Pardon J. F., Wilkins M. H. F., Richards B. M., (1967), *Nature*, **215**, 508—509.
5. Richards B. M., Pardon J. F., (1970), *Exp. Cell Res.*, **62**, 184—196.
6. Kornberg R., Thomas J., (1974), *Science*, **184**, 865—868.
7. Hewish D. R., Burgoyne L. A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 504—510.
8. Olins A. L., Olins D. E., (1974), *Science*, **183**, 330—332.
9. Kornberg R., (1974), *Science*, **184**, 868—871.
10. Ilyin Y. V., Varshavsky A. Y., Mikelsaar U. N., Georgiev G. P., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **22**, 235—245.
11. Ohlenbush H., Olivera B., Tuan D., Davidson N., (1967), *J. Mol. Biol.*, **25**, 299—315.
12. Roaerk R., Geoghegan T., Keller G., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 542—547.
13. D'Anna J., Jr., Isenberg I., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 343—347.
14. Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P., (1975), *Cell*, **4**, 281—300.
15. Lipps H., Morris N., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 230—234.
16. Prince D., Cummings D., Seale R., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 190—197.

17. Spadaora C., Bellard M., Compton J., Chambon P., (1976), *FEBS Letters*, **69**, 281—285.
18. Keichline R., Wassarman P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 139—151.
19. Parish R., Stalder J., Schmidlin S., (1977), *FEBS Letters*, **84**, 63—66.
20. Bakke A., Wu J., Bonner J., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 705—709.
21. Jerzmanowski A., Staroń K., Tyniec B., Bernhard-Śmigiel-ska J., Toczko K., (1976), *FEBS Letters*, **62**, 251—254.
22. Morris N., (1976), *Cell*, **8**, 357—363.
23. Noll M., (1976), *Cell*, **8**, 349—355.
24. Thomas J. O., Furber V., (1976), *FEBS Letters*, **66**, 274—280.
25. Silver J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **561**, 261—264.
26. Philipps G., Gigot C., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3617—3626.
27. Cheah K., Osborne D., (1977), *Biochem. J.*, **163**, 141—144.
28. Frado L., Annunziato A., Woodcock C., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 514—520.
29. Schmidt E., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2169—2180.
30. Noll M., (1974), *Nature*, **251**, 249—251.
31. Compton J., Bellard M., Chambon P., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 4382—4386.
32. Rill R., Nelson D., Oosterhof D., Hozier J., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 771—789.
33. Compton J., Hancock R., Oudet P., Chambon P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 555—568.
34. Hozier J., Kaus R., (1976), *Chromosoma*, **57**, 95—102.
35. Wigler M., Axel R., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 1463—1471.
36. Woodcock C., Safer J., Stanchfield J., (1976), *Exp. Cell Res.*, **97**, 101—110.
37. Laird C., Wilkinson L., Foe V., Chooi W., (1976), *Chromosoma*, **58**, 169—192.
38. Olins A., Carlson R., Wright E., Olins D., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3271—3291.
39. Bustin M., Goldblatt D., Sperling R., (1976), *Cell*, **7**, 297—304.
40. Germond J., Hirt B., Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1843—1847.
41. Langmore J., Wooley J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2691—2695.
42. Bellard M., Oudet P., Germond J., Chambon P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 543—553.
43. Morris N., (1976), *Cell*, **9**, 627—632.
44. Ermini M., Kuenzle C., (1978), *FEBS Letters*, **90**, 167—172.
45. Todd R., Garrard W., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4729—4738.
46. Martin D., Todd R., Lang D., Pei P., Garrard W., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8269—8277.
47. Lohr D., Corgen J., Tatchell K., Kovacic R., Van Holde K., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 79—83.
48. Stalder J., Braun R., (1978), *FEBS Letters*, **90**, 223—227.
49. Spadafora C., Oudet P., Chambon P., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 3479—3490.
50. Weintraub H., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 1179—1188.
51. Bustin M., Simpson R., Sperling R., Goldblatt D., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5381—5385.
52. Rall S., Okinaka R., Strniste G., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4940—4944.

53. Thomas J., Kornberg R., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2626—2630.
54. Thomas J., Kornberg R., (1975), *FEBS Letters*, **58**, 353—358.
55. Oudet P., Germond J., Bellard M., Spadafora C., Chambon P., (1978), *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **283**, 241—258.
56. Defer N., Kitzis A., Levy F., Tichonicky L., Sabatier M., Kruh J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 583—591.
57. Bakayev V., Bakayeva T., Varshavsky A., (1977), *Cell*, **11**, 619—629.
58. Goodwin G., Woodhead L., Johns E., (1977), *FEBS Letters*, **73**, 85—88.
59. Gottesfeld J., Murphy R., Bonner J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4404—4408.
60. Liew C., Chan P., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3458—3462.
61. Lacy E., Axel R., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3978—3982.
62. Sahasrabuddhe C., Van Holde K., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 152—156.
63. Rill R., Van Holde K., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1080—1083.
64. Greil W., Igo-Kemenes T., Zachau H., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 2633—2644.
65. Simpson R., Whitlock J., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 2255—2266.
66. Noll M., Kornberg R., (1977), *J. Mol. Biol.*, **109**, 393—404.
67. Varshavsky A., Bakayev V., Georgiev G., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 477—492.
68. Whitlock J., Simpson R., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3307—3314.
69. Shaw B., Herman T., Kovacic R., Beaudreau G., Van Holde K., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 505—509.
70. Simpson R., Whitlock J., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 117—127.
71. Sollner-Webb B., Felsenfeld G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2915—2920.
72. Axel R., Melchior W., Sollner-Webb B., Felsenfeld G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4101—4105.
73. Rill R., Oosterhof D., Hozier J., Nelson D., (1975), *Nucl. Acids Res.*, **2**, 1525—1538.
74. Weintraub H., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1212—1216.
75. Axel R., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2921—2925.
76. Pospelov V., Svetlikova S., Vorob'ev V., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3267—3279.
77. Clark R., Felsenfeld G., (1971), *Nature New Biology*, **229**, 101—103.
78. Clark R., Felsenfeld G., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3622—3628.
79. Bakayev V., Melnickov A., Osicka V., Varshavsky A., (1975), *Nucl. Acids Res.*, **2**, 1401—1419.
80. Poon N., Seligy V., (1978), *Exp. Cell Res.*, **113**, 95—110.
81. Wittig B., Wittig S., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3901—3917.
82. Weischet W., Tatchell K., Van Holde K., Klump H., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 139—160.
83. Finch J., Lutter L., Rhodes D., Brown R., Rushton B., Levitt M., Klug A., (1977), *Nature*, **269**, 29—36.
84. Dubochet J., Noll M., (1978), *Science*, **202**, 280—286.
85. Kornberg R., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 931—954.
86. Campbell A., Cotter R., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3877—3886.
87. Olins D., Bryan P., Harrington R., Hill W., Olins A., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 1911—1931.
88. Lilley D., Tatchell K., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2039—2055.
89. Voordouw G., Eisenberg H., (1978), *Nature*, **273**, 446—448.

90. Gordon V., Knobler C., Olins D., Schumaker V., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 660—663.
91. Suau P., Kneale G., Braddock G., Baldwin J., Bradbury E., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3769—3786.
92. Baldwin J., Boseley P., Bradbury E., Ibel K., (1975), *Nature*, **253**, 245—249.
93. Pardon J., Worcester D., Wooley J., Tatchell K., Van Holde K., Richards B., (1975), *Nucl. Acids Res.*, **2**, 2163—2176.
94. Pardon J., Worcester D., Wooley J., Cotter R., Lilley D., Richards B., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3199—3214.
95. Richards B., Pardon J., Lilley D., Cotter R., Wooley J., Worcester D., (1977), *Cell Biol. Int. Reports*, **1**, 107—116.
96. Subirana J., Martinez A., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3025—3042.
97. Hjelm R., Kneale G., Suau P., Baldwin J., Bradbury E., Ibel K., (1977), *Cell*, **10**, 139—151.
98. Stein A., Bina-Stein M., Simpson R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2780—2784.
99. Weintraub H., Palter K., Van Lente F., (1975), *Cell*, **6**, 85—100.
100. Bidney D., Reeck G., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1844—1849.
101. Cotter R., Lilley D., (1977), *FEBS Letters*, **82**, 63—68.
102. Thomas G., Prescott B., Olins D., (1977), *Science*, **197**, 385—388.
103. Cary P., Moss T., Bradbury E., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **89**, 475—482.
104. Campbell A., Cotter R., (1976), *FEBS Letters*, **70**, 209—211.
105. Wooley J., Pardon J., Richards B., Worcester D., Campbell A., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 810.
106. Thomas J., Butler P., (1977), *J. Mol. Biol.*, **116**, 769—781.
107. Su-Yun Chung, Hill W., Doty P., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 1680—1684.
108. Lilley D., Pardon J., Richards B., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2853—2860.
109. Lilley D., Howarth O., Clark V., Pardon J., Richards B., (1976), *FEBS Letters*, **62**, 7—10.
110. Whitlock J., Stein A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3857—3861.
111. Weintraub H., Van Lente F., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4249—4253.
112. Whitlock J., Simpson R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6516—6520.
113. Brandt W., Böhm L., Von Holt C., (1975), *FEBS Letters*, **51**, 88—93.
114. Dixon G., Candido E., Honda B., Louie A., McLeod A., Sung M., (1975) w The Structure and Function of Chromatin, Ciba Symposium **28**, red. Fitzsimons D., Wolstenholm G., str. 225—250; Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
115. Hardison R., Eichner M., Chalkley R., (1975), *Nucl. Acids Res.*, **2**, 1751—1759.
116. Hyde J., Walker I., (1975), *FEBS Letters*, **50**, 150—154.
117. Bonner W., Pollard H., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 282—288.
118. Van Lente F., Jackson J., Weintraub H., (1976), *Cell*, **5**, 45—50.
119. Martinson H., McCarthy B., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1073—1078.
120. Martinson H., Shetlar M., McCarthy B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2002—2007.
121. Jackson V., (1978), *Cell*, **15**, 945—954.
122. Hardison R., Zeitler D., Murphy J., Chalkley R., (1977), *Cell*, **12**, 417—427.

123. Wyns L., Lasters I., Hamers R., (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 2345—2358.
124. Martinson H., McCarthy B., (1976), *Biochemistry*, 15, 4126—4130.
125. Bonner W., (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 71—85.
126. D'Anna J., Isenberg I., (1974), *Biochemistry*, 13, 4992—4997.
127. Sperling R., Bustin M., (1975), *Biochemistry*, 14, 3322—3331.
128. Spiker S., Isenberg I., (1977), *Biochemistry*, 16, 1819—1826.
129. D'Anna J., Isenberg I., (1973), *Biochemistry*, 12, 1035—1042.
130. Nelson D., Oosterhof D., Rill R., (1977), *Nucl. Acids Res.*, 4, 4223—4234.
131. Böhm L., Hayashi H., Cary P., Moss T., Crane-Robinson C., Bradbury E., (1977), *Eur. J. Biochem.*, 77, 487—493.
132. Lewis P., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, 329—335.
133. Camerini-Otero R., Felsenfeld G., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 5519—5523.
134. Camerini-Otero R., Sollner-Webb B., Felsenfeld G., (1976), *Cell*, 8, 333—347.
135. Sollner-Webb B., Camerini-Otero R., Felsenfeld G., (1976), *Cell*, 9, 179—193.
136. Tatchell K., Van Holde K., (1977), *Biochemistry*, 16, 5295—5303.
137. Steinmetz M., Streeck R., Zachau H., (1978), *Eur. J. Biochem.*, 83, 615—628.
138. Germond J., Bellard M., Oudet P., Chambon P., (1976), *Nucl. Acids Res.*, 3, 3173—3192.
139. Weihe A., von Mickwitz C., Grade K., Lindigkeit R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 518, 172—176.
140. Bina-Stein M., Simpson R., (1977), *Cell*, 11, 609—618.
141. Bina-Stein M., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 5213—5219.
142. Moss T., Stephens R., Crane-Robinson C., Bradbury E., (1977), *Nucl. Acids Res.*, 4, 2477—2485.
143. Boseley P., Bradbury E., Butler-Browne G., Carpenter B., Stephens R., (1976), *Eur. J. Biochem.*, 62, 21—31.
144. Camerini-Otero R., Felsenfeld G., (1977), *Nucl. Acids Res.*, 4, 1159—1181.
145. Wilhelm F., Wilhelm L., Erard M., Daune M., (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 505—521.
146. Laskey R., Mills A., Morris R., (1977), *Cell*, 10, 237—243.
147. Laskey R., Honda B., Mills A., Finch J., (1978), *Nature*, 275, 416—420.
148. Goodwin D., Brahms J., (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 835—850.
149. Tsanev R., Petrov P., (1976), *J. Microsc. Biol. Cell.*, 27, 11—18.
150. Bram S., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 684—691.
151. Crick F., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 2639—2643.
152. Keller W., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 4876—4880.
153. Levitt M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 640—644.
154. Harrington R., (1977), *Nucl. Acids Res.*, 4, 3519—3535.
155. Sussman J., Trifonov E., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 103—107.
156. Sobell H., Tsai C., Gilbert S., Jain S., Sakore T., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 3068—3072.
157. Crick F., Klug A., (1975), *Nature*, 255, 530—533.
158. Yamada A., Kaneko H., Akasaka K., Hatana H., (1978), *FEBS Lettters*, 93, 16—18.
159. Kallenbach N., Appleby D., Bradley C., (1978), *Nature*, 272, 134—138.
160. Cantor C., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 3391—3393.
161. Noll M., (1974), *Nucl. Acids Res.*, 1, 1573—1578.

162. Lohr D., Tatchell K., Van Holde K., (1977), *Cell*, **12**, 829—836.
163. Klevan L., Crothers D., (1977), *Nucl. Acids Res.*, **4**, 4077—4089.
164. Tatchell K., Van Holde K., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 3583—3587.
165. Sollner, Webb B., Melchior W., Felsenfeld G., (1978), *Cell*, **14**, 611—627.
166. Simpson R., Whitlock J., (1976), *Cell*, **9**, 347—353.
167. Whitlock J., Rushizky G., Simpson R., (1977), *Jo. Biol. Chem.*, **252**, 3003—3006.
168. Whitlock J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7635—7639.
169. Noll M., (1977), *J. Mol. Biol.*, **116**, 49—71.
170. Lutter L., (1978), *J. Mol. Biol.*, **124**, 391—420.
171. Sollner-Webb B., Felsenfeld G., (1977), *Cell*, **10**, 537—547.
172. Lutter L., (1977), *J. Mol. Biol.*, **117**, 53—69.
173. Altenburger W., Hörz W., Zachau H., (1976), *Nature*, **264**, 517—522.
174. Riley D., Weintraub H., (1978), *Cell*, **13**, 281—293.
175. Weintraub H., Worcel A., Alberts B., (1976), *Cell*, **9**, 409—417.
176. Foe V., Wilkinson L., Laird C., (1976), *Cell*, **9**, 131—146.
177. Foe V., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 723—740.
178. Leflak I., Grainger R., Weintaub H., (1977), *Cell*, **12**, 837—845.
179. Yaneva M., Dessev G., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 1761—1767.
180. Liu L., Wang J., (1978), *Cell*, **15**, 979—984.
181. Bonner J., Dahmus M., Fambrough D., Huang R., Marushige K., Tuan D., (1968), *Science*, **159**, 47—56.
182. Spelsberg T., Hnilica L., Ansevin A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 550—562.
183. Gilmour L., Paul J., (1975), w Chromosomal Proteins and Their Role in the Regulation of Gene Expression, red. Stein G. S., Kleinsmith L. J., str. 19—33; Academic Press, New York.
184. Barret T., Maryanka D., Hamlyn P., Gould H., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 5057—5061.
185. Gadski R., Chi-Bom Chae, (1978), *Biochemistry*, **17**, 869—874.
186. Crémisi C., Pignatti P., Yaniv M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 548—554.
187. Steinmetz M., Streeck R., Zachau H., (1975), *Nature*, **258**, 447—450.
188. Steinmetz M., Streeck R., Zachau H., (1978), *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **283**, 159—168.
189. Brown I., Heikkila J., Silver J., Straus N., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **477**, 288—294.
190. Gottesfeld J., Melton D., (1978), *Nature*, **273**, 317—319.
191. Mirzabekov A., Melnikova A., (1974), *Mol. Biol. Reports*, **1**, 385—394.
192. Mirzabekov A., San'ko D., Kolchinsky A., Melnikova A., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **75**, 379—389.
193. Mirzabekov A., Shick V., Belavsky A., Karpov V., Bavykin S., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 149—155.
194. Melnikova A., Zasedatelev A., Kolchinsky A., Gursky G., Zhuze A., Grochovsky S., Mirzabekov A., (1975), *Mol. Biol., Reports*, **2**, 135—142.
195. Simpson R., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4814—4818.
196. Kato Y., Iwai K., (1977), *J. Biochem.*, **81**, 621—630.
197. Simpson R., (1978), *Cell*, **13**, 691—699.
198. Simpson R., (1978), *Nucl. Acids Res.*, **5**, 1109—1119.

199. Sperling J., Sperling R., (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 2755—2773.
200. Mirzabekov A., Shick V., Belyavsky A., Bavykin S., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 4184—4188.
201. Carter C., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 3649—3653.
202. Trifonov E., (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 1371—1380.
203. Baudy P., Bram S., Vastel D., Lepault J., Kitzis A., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 176—183.
204. Felsenfeld G., (1978), *Nature*, 271, 115—122.
205. Worcel A., Han S., Wong M., (1978), *Cell*, 15, 969—977.
206. Lutter L., (1979), *Nucl. Acids Res.*, 6, 41—56.
207. Yaneva M., Dessev G., (1977), *Mol. Biol. Reports*, 3, 223—226.
208. Chao M., Gralla J., Martinson H., (1979), *Biochemistry*, 18, 1068—1074.
209. Varshavsky A., Sundin O., Bohn M., (1978), *Nucl. Acids Res.*, 5, 3469—3478.
210. Prunell A., Kornberg R., Lutter L., Klug A., Levitt M., Crick F., (1979), *Science*, 204, 855—858.

KORNEL NOWAK *

Degradacja Edmana peptydów lub białek związanych ze stałym nośnikiem

Edman Degradation of Peptides or Proteins Attached to Solid Support

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Dobór stałego nośnika
- III. Metody wiązania peptydów ze stałym nośnikiem
 - III-1. Wiązanie peptydu grupą karboksylową
 - III-2. Wiązanie peptydu grupą aminową
 - III-3. Złożone metody przyłączania
- IV. Degradacja Edmana w fazie stałej
- V. Uwagi końcowe

Contents

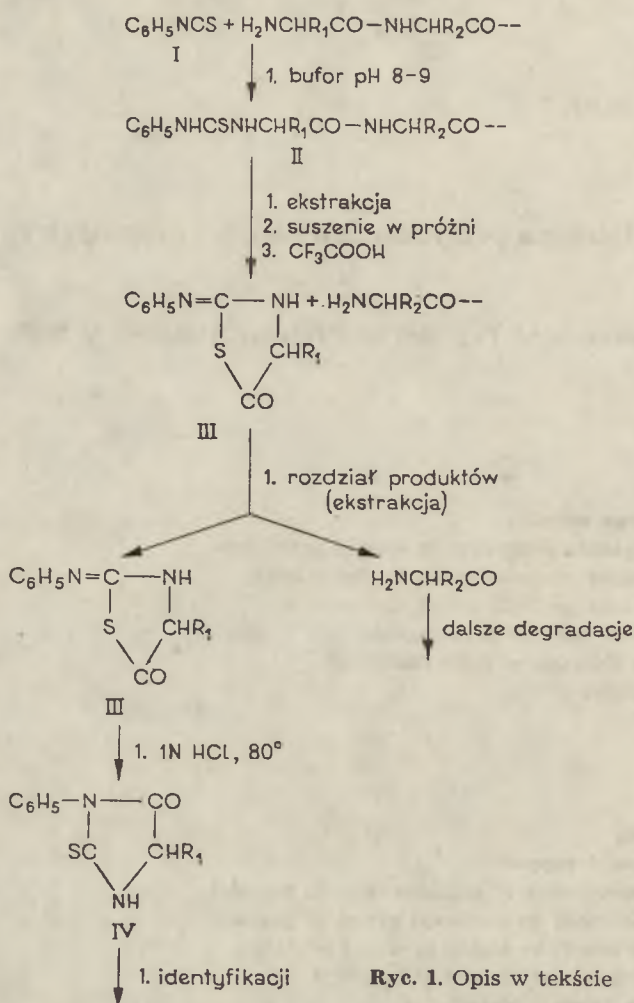
- I. Introduction
- II. Choice of solid support
- III. Coupling procedures of peptides to solid support
 - III-1. Attachment by carboxyl group of peptide
 - III-2. Attachment by amino group of peptide
 - III-3. Combined methods of attachment
- IV. Solid phase Edman degradation
- V. Final remarks

I. Wstęp

Jedyną skuteczną, stosowaną do dzisiaj metodą oznaczania sekwencji aminokwasów białek jest metoda zaproponowana przez Pehra Edm ana (1, 2) w 1949 roku. Polega ona na zastosowaniu trzech kolejnych reakcji

* Doc. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, Chałubińskiego 10, 50—368 Wrocław.

(Ryc. 1), a mianowicie przyłączaniu fenylizotiocyanianu I do peptydu, rozszczepieniu fenylotiokarbamylopeptydu II oraz konwersji fenylotiazolonu N-końcowego aminokwasu III do pochodnej fenylotiohydantoiny IV.



Ryc. 1. Opis w tekście

Oderwanie N-końcowego aminokwasu od degradowanego peptydu umożliwia przeprowadzenie następnych degradacji, których ilość ograniczona jest jedynie sensownością wyników identyfikacji produktów degradacji.

Metodę Edmana modyfikowano (3, 4, 5, 6, 7, 8) wielokrotnie, aż do pełnej automatyzacji włącznie (9). Posiada ona jednak swoje ograniczenia, z których najważniejsze to straty degradowanego peptydu występujące podczas rozdzielania produktów degradacji i usuwaniu nadmiaru odczynników i produktów ubocznych. W rzeczywistości odbywa się to na drodze ekstrakcji i dlatego im krótszy peptyd tym na ogół większe są straty. Opierając się na doniesieniu Merrifielda (10) Laurson zapropro-

nował pewne wyjście z tej sytuacji w swojej pionierskiej pracy (11). Miaowicie związał on heksapeptyd ze stałym nośnikiem i dopiero wówczas przeprowadził degradację Edmana. W takim dwufazowym układzie straty związanego ze stałym nośnikiem peptydu są oczywiście niemożliwe. Dzięki licznym, przeprowadzonym w ostatnim dziesięcioleciu przez *L a u r s e n a* i jego współpracowników modyfikacjom degradacji peptydów w fazie stałej znajduje ona coraz większe zastosowanie w analizie sekwencyjnej białek (12—19). Dostępność tanich fabrycznych automatycznych aparatów do degradacji w fazie stałej metodą *Laursena* przyczyni się do utrzymania tej tendencji jeszcze w najbliższych kilku latach.

Znaczenie tej metody podkreśla także fakt opublikowania o niej artykułu monograficznego w *Methods of Enzymology* (20).

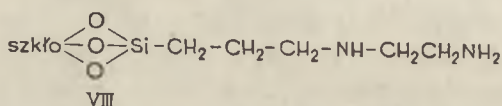
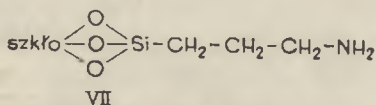
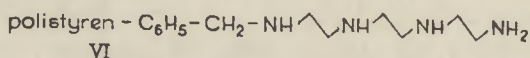
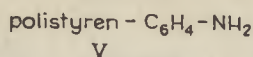
II. Wybór stałego nośnika

Najistotniejszym problemem w doborze nośnika w metodzie degradacji w fazie stałej jest wydajność z jaką przyłącza się peptyd do nośnika. Nie bez znaczenia jest też mechaniczna wytrzymałość ziaren nośnika oraz ich zdolność do pęcznienia w stosowanych rozpuszczalnikach.

Najwcześniej jako nośniki użyto pochodne polistyrenu, w których dwa, aminopolistyren V (Ryc. 2) (20) oraz trójetylenoczteteroaminopolistyren VI (21), odznaczające się najlepszymi właściwościami fizycznymi stosowane są także obecnie. Są to nisko usieciowane dwuwinylobenzenem (1%) aminowe pochodne polistyrenu o względnie dużej powierzchni i stosunkowo małym pęcznieniu. Właściwości hydrofobowe, w środowisku obojętnym tych nośników nie sprzyjają reakcjom wiązania związków polarnych a więc np. peptydów grupą karboksylową. Z wymienionych dwóch nośników korzystniejszy pod tym względem jest trójetylenoczteteroaminopolistyren bardziej polarny niż aminopolistyren. Ogólnie lepsze wydajności przyłączania peptydów do nośników polistyrenowych uzyskuje się stosując aktywację peptydu czynnikiem hydrofobowym np. fenylenodwuziotocyjanianem. Zlepianiu się cząstek nośnika podczas degradacji można zapobiec przez zmieszanie żywicy z nadmiarem ziarnistego szkła (22).

Badania *W e e t a l a* (23) nad przyłączaniem enzymów do mikroporowatego granulowanego szkła zwróciły uwagę na ten typ nośnika i jego ewentualne zastosowanie w degradacji w fazie stałej. *W a c h t e r* ze współpracownikami (24) opracowali łatwą metodę aminosililowania takiego szkła, otrzymując jako nośnik aminopropyloszkło VII (Rys. 2). Obecnie dostępny jest także w handlu inny nośnik szklany — beta aminotyloaminopropyloszkło VIII (Rys. 2).

Zaletą nośników szklanych jest ich wytrzymałość mechaniczna i odporność na zmiany rozpuszczalników, ponadto mają szczególnie rozwiniętą powierzchnię czynną tak, że grupy czynne, które znajdują się na



Ryc. 2. Opis w tekście

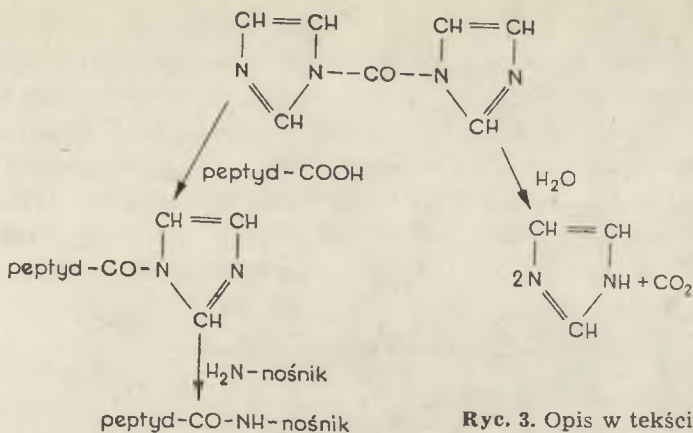
powierzchni są łatwo dostępne. Bardziej aktywnym z wymienionych dwóch pochodnych aminowych szkła jest beta aminoetyloaminopropyl-szkło, ze względu na katalizę zasadową (25, 26) sąsiedniej grupy aminowej znajdującej się w alifatycznym łańcuchu bocznym. Aktywność i dostępność grup aminowych nośników szklanych umożliwia wiązania z nimi znacznie dłuższych peptydów niż ma to miejsce w przypadku nośników aminopolistyrenowych.

III. Metody wiązania peptydów ze stałym nośnikiem

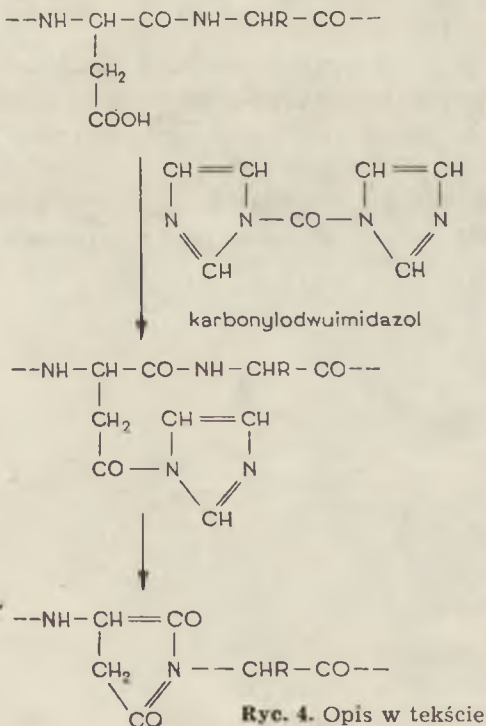
III-1. Wiązanie peptydu grupą karboksylową

Oprócz doboru właściwego nośnika drugim czynnikiem decydującym o powodzeniu metody degradacji w fazie stałej jest wydajność reakcji wiązania peptydu z nośnikiem. Zależy ona od wielu czynników, ale przyjmuje się, że jest tym większa im krótszy jest peptyd. Oczywiście stopień trudności maleje wraz ze wzrostem ilości posiadanego peptydu. Istnieje też wyraźna zależność wydajności od długości wiązanego peptydu, użytego nośnika i zastosowanej metody przyłączania.

Do wiązania peptydów z nośnikami poprzez aktywację grup karboksylowych peptydów stosuje się czynniki powszechnie używane w syntezie peptydów (27) takie, jak karbonylodwuimidazol (22) lub karbodwuimidazy (28, 29). Karbonylodwuimidazol łatwo reaguje z nukleofilami takimi, jak aminy i woda (Ryc. 3) i dlatego reakcję aktywacji należy prowadzić w środowisku bezwodnym, zazwyczaj w dwumetyloformamidzie. Warunek ten sprawia pewne kłopoty, i to nie tylko dlatego, że odczynniki trzeba suszyć i zabezpieczać przed wilgocią, ale również z tego względu, że rozpuszczalność peptydów w dwumetyloformamidzie maleje ze wzrostem masy cząsteczkowej. Karbonylodwuimidazol powoduje akty-

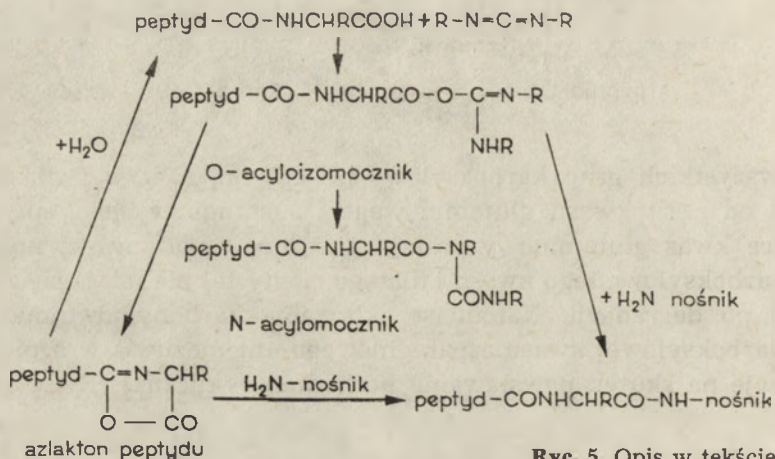


wację wszystkich grup karboksylowych peptydu, a więc pochodzących również od reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego. Peptydy zawierające kwas glutaminowy zostają związane dodatkowo z nośnikiem grupą karboksylową tego kwasu i dlatego reszty tej nie udaje się zidentyfikować po degradacji. Natomiast aktywacja karbonylodwuimidazolem grupy karboksylowej kwasu asparaginowego uniemożliwia w ogóle dalszą degradację na skutek powstawania pochodnej cyklicznej (Ryc. 4).



tej procedury jest również konieczność chronienia grupy aminowej N-końcowego aminokwasu peptydu aby zapobiec jego polimeryzacji.

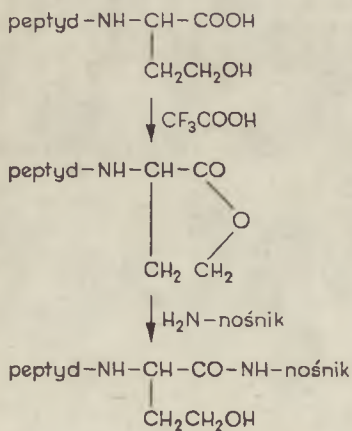
Przyłączanie peptydów do stałych nośników przy pomocy karbodwuimidów jest sposobem korzystniejszym, ponieważ związki te nie hydroлизują tak łatwo, jak karbonylodwuimidazol. Jednak aktywowane karbodwuimidami grupy karboksylowe peptydu mogą ulec nie tylko korzystnym reakcjom (tworzenie peptydylonośnika, Ryc. 5), ale także niekorzystnym jak przegrupowanie do N-acylomocznika (Ryc. 5). Inną



Ryc. 5. Opis w tekście

niekorzystną reakcją uboczną może być polikondensacja cząsteczek aktywowanego peptydu, której zapobiega się, bądź przez stosowanie znacznego nadmiaru nośnika (29), bądź przez ochronę grup aminowych peptydu (30).

Sz szczególnie dogodną i dobrą okazała się, wprowadzona przez H o r n a i L a u r s e n a (21) metoda wiązania peptydu posiadającego na C-końcu



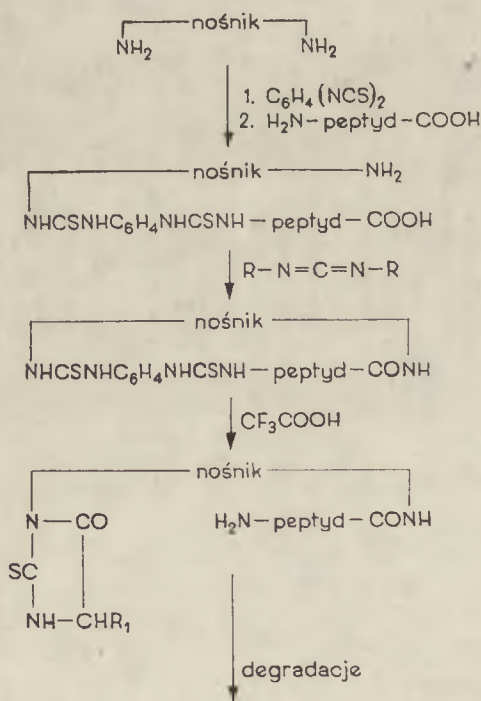
Ryc. 6. Opis w tekście

wiązania z nośnikiem takich peptydów było bardzo potrzebne. Właśnie L a u r s e n ze współpracownikami (33) zaproponowali użycie w tym celu fenyleneodwuziotiocyanianu, który przyłącza peptyd do nośnika zarówno grupą alfa aminową, jak i grupą aminową łańcucha bocznego lizyny (Ryc. 7). Pod wpływem kwasu trójfluorooctowego następuje uwolnienie grupy alfa aminowej drugiego aminokwasu w peptydzie, co umożliwia dalszą degradację Edmana (Ryc. 7). Oczywiście, przy takim postępowaniu, N-końcowy aminokwas wyjściowego peptydu musi być osobno oznaczony i robi się to zazwyczaj metodą dansylową G r a y a (6).

Peptydy z C-końcową arginina można też przyłączyć do nośnika fenyleneodwuziotiocyanianem ale po uprzednim przeprowadzeniu argininy w ornitynę łagodnym działaniem hydrazyną (33). W a c h t e r ze współpracownikami (24) opracowali dogodną modyfikację metody fenyleneodwuziotiocyanianowej polegającą na wcześniejszej syntezie izotiocyanianowej pochodnej nośnika, którą można przed użyciem dłuższy czas przechowywać.

III-3. Złożone metody przyłączania

Duże wydajności przyłączania peptydów lizynowych do nośników metodą fenyleneodwuziotiocyanianową, a także trudności w przyłączaniu innych peptydów, zwłaszcza metodami aktywacji grup karboksylowych skłoniły S c h i l t z a (34) do sprawdzenia przydatności metody dwóch

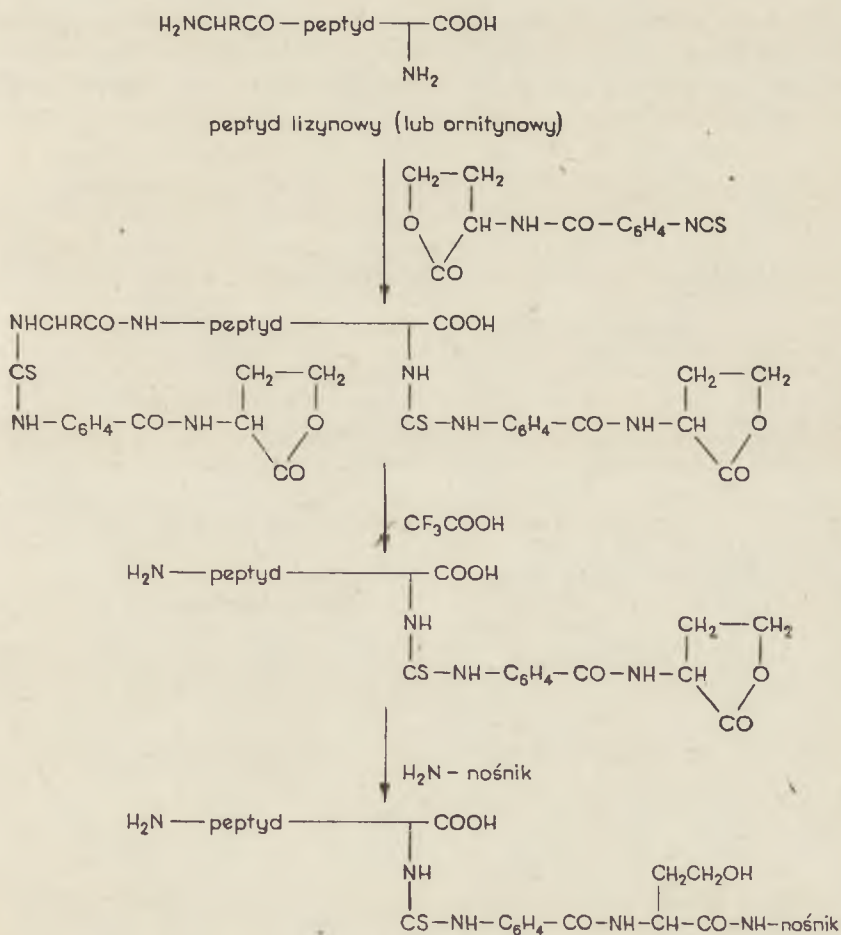


Ryc. 8. Opis w tekście

kolejnych aktywacji. Początkowo przyłączał on peptyd do nośnika grupą alfa aminową za pomocą fenyleneodwuziotycyanianu, a następnie aktywując grupę karboksylową peptydu karbodwuimidem wiązał tą grupą peptyd z nośnikiem drugi raz (Ryc. 8).

Uwalnianie grupy alfa aminowej drugiego aminokwasu w peptydzie następowało po działaniu kwasu trójfluorooctowego w zwykły sposób. Przewaga tej techniki postępowania w stosunku do bezpośredniego łączenia peptydu karbodwuimidem szczególnie wyraźnie została wykazana dla dłuższych peptydów np. wydajność wiązania A-łańcucha insuliny wzrosła z 46% w metodzie bezpośredniej do 92% w metodzie złożonej.

Zalety metody fenyleneodwuziotycyanianowej oraz dogodność łączenia peptydów homoserynowych z nośnikiem wykorzystano w celu opracowania nowego czynnika wiążącego peptydy. H e r b r i n k ze współpra-



Ryc. 9. Opis w tekście

również te same bufory sprzęgające, cyklizujący kwas trójfluoroocetowy oraz rozpuszczalniki ekstrahujące produkty uboczne reakcji przyłączenia, czy ekstrahujące fenylootiazoliony (36). Niemniej z racji związania peptydu degradowanego ze stałym nośnikiem korzystniej jest stosować intensywniejsze warunki ekstrakcji zwłaszcza podczas ekstrakcji produktów ubocznych, które ograniczają przecież czułość identyfikacji chromatograficznej fenylotiohydantoin otrzymanych po degradacji.

Najważniejsze zalety tej metody, wynikające ze zmiany fazy ciekłej na stałą, to możliwość prowadzenia wszystkich czynności na sączku lub w kolumnie wypełnionej nośnikiem z peptydem. Ten ostatni sposób wykorzystano w budowie fabrycznego automatycznego sekwenatora w fazie stałej (LKB, Szwecja), co w porównaniu z automatycznym cieczowym sekwenatorem Edmana znacznie uprościło budowę całego aparatu, wpłynęło też na obniżenie ceny. Ponieważ wykonuje on tyle samo degradacji na dobę co automat Edmana można przypuszczać, że będzie w najbliższych latach coraz częściej stosowany.

V. Uwagi końcowe

Atrakcyjność metody degradacji peptydów w fazie stałej jest ciągłym powodem stałego jej ulepszania. W ostatnich dwóch latach opublikowano kilka nowych modyfikacji tej metody. Szczególnie interesujące dotyczą zastosowania nośników poliamidowych (37, 38, 39), aktywowania nośnika szklanego jodoacetamidem (40) oraz zastosowania izotopowego [S^{35}] fenyloizotiocyanianu do degradacji w fazie stałej (41).

Obserwuje się także przystosowywanie innych niż fenyloizotiocyanianowych (Edmana) metod degradacji peptydów do degradacji w fazie stałej. I tak Doolittle nie tylko użył swojej oryginalnej metody tioacetylowej (42) do degradacji w fazie stałej, ale również zbudował automatyczny sekwenator (43) wykorzystujący tą technikę. Przy pomocy degradacji metodą tioacetylową w fazie stałej oznaczono między innymi sekwencję aminokwasów peptydów fibrynogenowych (44, 45) jak również całkowitą strukturę pierwotną dehydrogenazy mleczanowej (46). Do degradacji w fazie stałej zastosowano też fluoryzujący izotiocyanian pochodny stilbenu (47), znacznie zwiększający czułość analizy metodą bezpośrednią jak wykazano to podczas oznaczania sekwencji zasadowego inhibitora trypsyny (48). Tak więc ciągłe modyfikowanie i ulepszanie metody degradacji w fazie stałej trwa i jest wyrazem stałego zainteresowania tą metodą. Łatwość z jaką można ją zautomatyzować względnie małym kosztem pozwala przypuszczać, że w najbliższym czasie będzie ona szeroko stosowana.

PIŚMIENICTWO

1. Edman P., (1949) *Arch. Biochem.*, **22**, 475—476.
2. Edman P., (1950) *Acta Chim. Scand.*, **4**, 283—297.
3. Edman P., (1957) *Proc. Roy. Australian Chem. Inst.*, **24**, 434—442.
4. Edman P., (1960) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 602—605.
5. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H., (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 633—647.
6. Gray W. R., Hartley B. S., (1963) *Biochem. J.*, **89**, 379—380.
7. Konigsberg W., Hill R. J., (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 2547—2561.
8. Peterson J. D., Nehrlich S., Oyer P. E., Steiner D. F., (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4866—4871.
9. Edman P., Begg G., (1967) *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80—91.
10. Merrifield R. B., (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149—2154.
11. Laursen R. A., (1966) *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5344—5346.
12. Watt K. W. K., Takagi T., Doolittle R. F., (1979) *Biochemistry*, **18**, 68—76.
13. Heiland I., Brauer D., Wittmann-Liebold B., (1976) *Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1751—1770.
14. Reinbolt J., Tritsch D., Wittmann-Liebold B., (1978) *FEBS Letters*, **91**, 297—299.
15. Bonner A. G., Laursen R. A., (1977) *FEBS Letters*, **73**, 201—207.
16. Yoshitake S., Funatsu G., Funatsu M., (1978) *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1261—1265.
17. Timpl R., Fietzek P. P., Wachter E., Delden V., (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **490**, 420—429.
18. Michaelsen T. E., Frangione B., Franklin E. C., (1977) *J. Immunol.*, **119**, 558—601.
19. Wittmann-Liebold B., Marzing E., (1977) *FEBS Letters*, **81**, 214—219.
20. Laursen R. A., (1972) *Methods Enzymology*, **25B**, 344—359.
21. Horn M. J., Laursen R. A., (1973) *FEBS Letters*, **36**, 285—288.
22. Laursen R. A., (1971) *Eur. J. Biochem.*, **20**, 89—102.
23. Weetal H. H., (1969) *Nature (London)*, **223**, 959—960.
24. Wachter E., Machleidt W., Hofner H., Otto J., (1973) *FEBS Letters*, **35**, 97—102.
25. Bridgen J., (1975) *FEBS Letters*, **50**, 159—162.
26. Page M. I., Jencks W. P., (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8818—8827.
27. Gish D., (1970) Protein Sequence Determination, red. Needleman S. B., str. 276—310, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
28. Previero A., Derancourt J., Coletti-Previero M. A., Laursen R. A., (1973) *FEBS Letters*, **33**, 135—138.
29. Schellenberger A., Graubaum H., Mech C., Sternkopf G., (1972) *Z. Chem.*, **12**, 62—63.
30. Laursen R. A., Bonner A. G., Horn M. H., (1976) Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis, red. Perham R. N., str. 73—89. New York, Academic Press.
31. Gross E., Witkop B., (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1856—1860.
32. Ambler R. P., (1965) *Biochem. J.*, **28**, 96—97.
33. Laursen R. A., Horn M. J., Bonner A. G., (1972) *FEBS Letters*, **21**, 67—69.
34. Schiltz E., (1975) Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis, red. Rockford J., Pierce Chemical Co., str. 47 za: Laursen R. A., Horn M. J., (1977) Advanced Methods in Protein Sequence Determination, red. Needleman S. B., str. 21—37, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

35. Herbrink P., Tessler G. I., Lamberts J. I. M., (1975) *FEBS Letters*, **60**, 313—316.
36. Edman P., (1970) Protein Sequence Determination, red. Needleman S. B., str. 211—250, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
37. Atherton E., Bridgen J., Scheppard R. C., (1976) *FEBS Letters*, **64**, 173—175.
38. Cavadore J. C., Devancourt J., Preiviero A., (1976) *FEBS Letters*, **66**, 155—157.
39. Cavadore J. C., Vallet B., (1978) *Anal. Biochem.*, **84**, 402—405.
40. Chang J. Y., Creaser E. H., Hughes G. J., (1977) *FEBS Letters*, **84**, 187—190.
41. Bridgen J., (1976) *Biochemistry*, **15**, 3600—3604.
42. Mross G. A., Doolittle R. F., (1971) *Fed. Proc.*, **30**, 1241—1242.
43. Doolittle L. R., Mross G. A., Fathergill L. A., Doolittle R. F., (1977) *Anal. Biochem.*, **78**, 491—505.
44. Doolittle R. F., Cassman K. G., Catrell B. A., Friezner S. J., Hucko J. T., Takagi T., (1977) *Biochemistry*, **16**, 1703—1709.
45. Doolittle R. F., Cassman K. G., Catrell B. A., Friezner S. J., Takagi T., (1977) *Biochemistry*, **16**, 1710—1714.
46. Taylor S. S., (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 1799—1806.
47. Kuczek M., Nowak K., (1978) Abstracts of European Peptide Symposium, Gdańsk, str. 45, Gdańsk, Scientific Society.
48. Nowak K., Kuczek M., Słomińska A., Wilusz T., (1977) *Acta Biochim. Pol.*, **24**, 275—280.

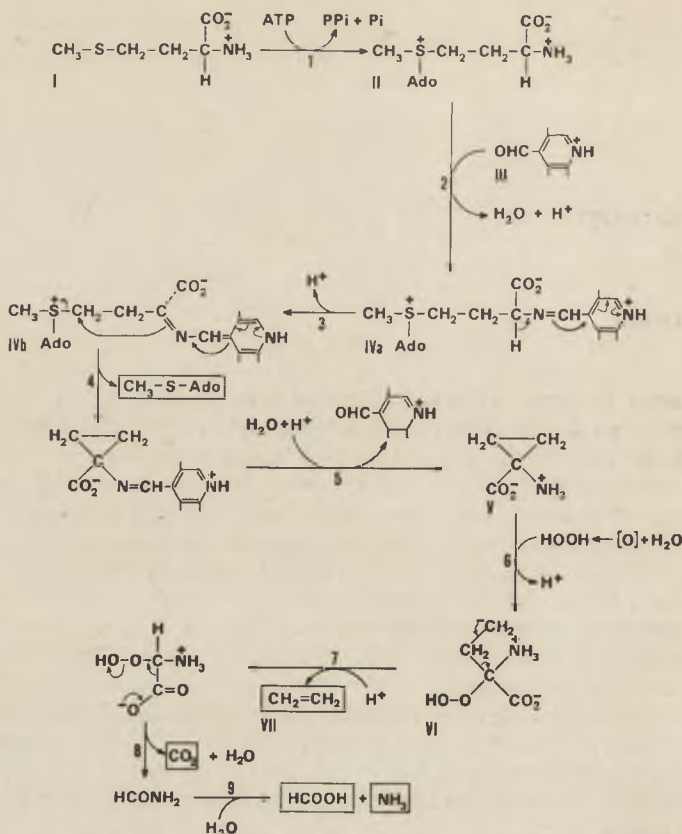
NOWE W BIOCHEMII

Biosynteza etylenu

Etylen należy do grupy naturalnych regulatorów wzrostu roślin; wraz z innymi fitohormonami — zwłaszcza auksynami i cytokininami kontroluje kiełkowanie nasion i wzrost organów roślinnych, odgrywając decydującą aczkolwiek nie inicjującą rolę w procesach starzenia się kwiatów, liści i dojrzewania owoców (1). Mimo wyjątkowo prostej budowy chemicznej: $\text{CH}_2=\text{CH}_2$, biosynteza etylenu pozostawała zagadkowa. Podstawowym jego prekursorem *in vivo* jest metionina (2); węgle C-3 i C-4 metioniny wykrywa się w etylenie, z węgli C-1 i C-2 powstaje odpowiednio CO_2 i — najczęściej, kwas mrówkowy. Grupę $-\text{SCH}_3$ metioniny wykrywa się w 5'-metylotioadenozynie (3) przy czym biosyntezę etylenu i 5'-metylotioadenozyny z metioniny blokuje aminoetoksywinyloglicyna tj. kwas 2-amino-4-(2'-aminoetoksy)*trans*-3-butenowy — inhibitor reakcji enzymatycznych zachodzących przy udziale fosforanu pirydoksalu. Ponieważ biosyntezę etylenu blokują czynniki rozkojarzające oksydacyjną fosforylację zasugeromiany — zachodzącej wyłącznie w nieuszkodzonych tkankach i w atmosferze tlenu a z niej 5'-metylotioadenozyna i etylen (4). Jednak szczegóły tej ostatniej przezwano, iż w wyniku aktywacji metioniny przez ATP powstaje S-adenozylometionina, wej, nie były znane.

W 1979 r. dwa zespoły badawcze doniosły, iż bezpośrednim prekursorem etylenu w tkankach jabłka (5), w liściach soi (6) i w innych roślinach (7) jest kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (skrót: ACC). Kwas ten nagromadza się w tkankach inkubowanych przez kilka godzin z $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ metioniną w atmosferze beztlenowej. Dopiero przy dostępie tlenu ACC zanika, z jednoczesną syntezą etylenu oraz 5'-metylotioadenozyny i produktu jej hydrolizy, tj. 5'-metylotioribozy. Aminoetoksywinyloglicyna blokuje syntezę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego z metioniny, nie wpływając na przemianę tego ostatniego do etylenu. Na podstawie tych danych obie grupy badaczy postulują następujący ciąg reakcji:

Metionina \rightarrow S-Adenozylometionina \rightarrow ACC \rightarrow Etylen, różniąc się interpretacją szczegółów. Etap pierwszy reakcji, tj. synteza S-adenozylometioniny z metioniny i ATP (Ryc. 1) nie budzi wątpliwości. Według Adamsa i Yanga z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Davis, w tkance jabłka S-adenozylometionina z kolei reaguje z fosforanem pirydoksalu tworząc zasadę Schiffa. Wiadomo, iż fosforan pirydoksalu może katalizować reakcję γ -eliminacji; jeżeli jednocześnie zajdzie reakcja eliminacji α -H, to powstanie pierścień cyklopropanu (Ryc. 1, reakcje 4 i 3). Po odłączeniu reszty fosfopirydoksalowej powstaje kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (Ryc. 1, związek V). Dalszej przemiany tego kwasu do etylenu dotąd nie znamy; wiadomo tylko, iż reakcja wymaga obecności tlenu. Donorem tlenu *in vivo* może być nadtlenek wodoru, ponieważ wcześniej ustalono, iż dojrzewanie owoców oraz biosynteza etylenu zależą od aktywności pewnych oksydaz (1) oraz stwierdzono, iż w warunkach *in vitro* H_2O_2 reaguje z kwasem 1-aminocyklopropano-1-karboksylowym w podwyższonych temperaturach dając etylen. Nadtlenek wodoru może więc

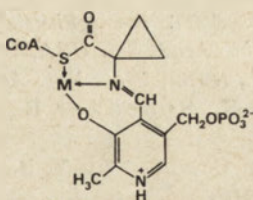


Ryc. 1. Postulowany mechanizm biosyntezy etylenu z metioniny (wg 5). I, metionina; II, S-adenozylometionina; III, fosforan pirydoksalu (zaznaczono tylko aldehyd pirydynokarboksyłowy); IVa i IVb, tautomeryczne formy zasady Schiffa; V, kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy; VI, hipotetyczny produkt utlenienia V; VII, etylen; Ado, reszta adenozyliny. (Reprodukcja za zgodą *Nat. Acad. Sci. USA*).

in vivo katalizować reakcję rozerwania pierścienia cyklopropanu z następnym rozpadem hipotetycznego pośrednika VI do etylenu, CO₂, kwasu mrówkowego i NH₃. Przedstawiony schemat (Ryc. 1) dobrze tłumaczy znane fakty eksperymentalne odnośnie do biosyntezy etylenu w dojrzewających tkankach jabłek, a zwłaszcza: 1. blokowanie syntezy etylenu z metioniny przez aminoetoksywinyloglicynę — prawdopodobnie na etapie przemiany S-metyloadenozyliny do ACC; 2. nagromadzenie się ACC w warunkach beztlenowych; oraz 3. jego dalszą przemianę do etylenu przy dostępie tlenu.

Badacze niemieccy z Bayer AG (Leverkusen) sugerują, iż powstawanie wolnego kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego *in vivo* jest reakcją wtórną (6). S-adenozylometionina (bądź wolny ACC, zwłaszcza wprowadzony z zewnątrz) powstająca z aktywacji metioniny tworzy zasadę Schiffa z fosforanem pirydoksalu, przy czym kompleks podlega aktywacji przez przyłączenie koenzymu A. Kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy pod postacią „związaną” tj. CoAS-zaktywowanej zasady Schiffa fosforanu pirydoksalu nie jest podatny ani na dekarboksylację ani transaminację; może on podlegać hydrogenacji w obecności NADH, z następnym rozpadem do etylenu i glicyny, z uwolnieniem CoASH i fosforanu pirydoksalu.

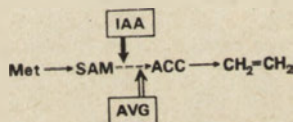
Schemat zaproponowany przez Lürssena, Naumanna i Schrödera lepiej tłumaczy fakt hamowania przemiany kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego do etylenu przez CoCl_2 . Metal wiązać się może ze „związanym” ACC (Ryc. 2), uniemożliwiająca



Ryc. 2. Stabilizowana przez metal (M) forma „związanego” kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego, tj. połączonego z resztami fosforanu pirydoksalu i koenzymu A (wg 6). (Reprodukcja za zgodą Fischer Verlag, Stuttgart).

jego hydrogenację przez NADH. Zaproponowana sekwencja przemian kłóci się jednak z faktem, iż aminoetoksywinyloglicyna blokując syntezę etylenu z metioniny nie hamuje jego syntezę z kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego. Wydaje się więc, że schemat zaproponowany przez Adamsa i Yanga stanowi lepsze odzwierciedlenie rzeczywistego stanu rzeczy, aczkolwiek nie można *a priori* wykluczyć, iż biosynteza etylenu w różnych tkankach roślinnych może przebiegać odmiennymi drogami.

Biosyntezę etylenu indukuje auksyna — kwas indolilo-3-octowy (IAA). Doświadczenia wykonane z tkanką *Vigna radiata* wykazały, iż IAA stymulując syntezę etylenu nie wpływa ani na przemianę metioniny do S-adenozylometioniny, ani kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego do etylenu. Cykloheksamid blokuje efekt IAA, nie wpływając na przemianę ACC do etylenu. Wydaje się więc, iż auksyna pobudza biosyntezę układu enzymatycznego, katalizującego przemianę S-adenozylometioniny do kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (Ryc. 3). Wykrycie tego faktu stanowi



Ryc. 3. Regulacja biosyntezy etylenu przez auksynę (wg 8). \rightarrow , reakcja limitująca, \rightarrow , indukcja syntezy enzymu przez kwas indolilo-3-octowy (IAA); \Rightarrow , inhibicja przez aminoetoksywinyloglicynę (AVG); Met, metionina; SAM, S-adenozylometionina. (Reprodukcja za zgodą *Amer. Soc. Plant Physiol.*).

spory krok naprzód w dziedzinie zrozumienia molekularnych mechanizmów działania fitohormonów (8).

Można spodziewać się, iż pełne rozszyfrowanie biosyntezy etylenu jest już bliskie, zwłaszcza iż szybko opracowano prostą metodę oznaczania kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego, opartą o wyzwolenie z niego etylenu *in vitro* w obecności fosforanu pirydoksalu, MnCl_2 i H_2O_2 (9). Dzięki tej metodzie stwierdzono, iż w przypadku pomidora K_m reakcji przemiany S-adenozylometioniny do kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego wynosi $13 \mu\text{M}$; reakcję blokuje aminoetoksywinyloglicyna ($K_i = 0,2 \mu\text{M}$).

Warto zaznaczyć, iż kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy wykryto po raz pierwszy w 1957 r. w owocach jabłoni, gruszy (10) i borówki (11). Czekano więc 22 lata na wyjaśnienie fizjologicznej funkcji tego nietypowego aminokwasu.

J. Stanisław Knypl

PIŚMIENICTWO

1. Abeles P. B., (1973), *Ethylene in Plant Biology*; Academic Press, New York.
2. Lieberman M., (1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 533.
3. Adams D. O., Yang S. F., (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 892—896.
4. Burg S. P., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 591—597.
5. Adams D. O., Yang S. F., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 170—174.
6. Lürssen K., Naumann K., Schröder R., (1979), *Z. Pflanzenphysiol.*, **92**, 285—294.
7. Cameron A. C., Fenton C. A. L., Yu Y. B., Adams D. O., Yang S. F., (1979), *HortScience*, **14**, 178—180.
8. Yu Y. B., Adams D. O., Yang S. F., (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 589—590.
9. Boller T., Herner R. C., Kende H., (1979), *Planta* (Berlin), **145**, 293—303.
10. Burroughs L. F., (1957), *Nature* (London), **179**, 360—361.
11. Vahatalo M. L., Virtanen A. I., (1957), *Acta Chem. Scand.*, **11**, 741—743.

SPRAWOZDANIA

Co nowego w biochemii po XI Międzynarodowym Kongresie Biochemii w Toronto (Kanada).

W dniach 8—13 lipca 1979 roku obradował w Toronto XI Międzynarodowy Kongres Biochemii, gromadząc ogromną rzeszę 7,5 tysiąca uczestników z całego świata, w tym około dwudziestu z Polski. Obrady podzielono na piętnaście sekcji tematycznych, obejmujących w zasadzie całą problematykę współczesnej biochemii, od genetyki, biochemii kwasów nukleinowych i białek, poprzez enzymatykę, regulację metabolizmu, biochemię błon, bioenergetykę, neurochemię czy immunochemię aż po problemy wzrostu, różnicowania i tzw. biochemię środowiska. Zakres zagadnień był zatem olbrzymi i, biorąc udział w Kongresie, z konieczności uczestniczyło się w jego obradach wybiórczo i fragmentarycznie, starając się dostrzec i usłyszeć przynajmniej to, co każdemu wydawało się najciekawsze lub najbliższe jego własnym pracom badawczym. Takim właśnie, subiektywnym obrazem Kongresu w Toronto chciałbym się podzielić.

W czasie trwania obrad interesowały mnie głównie dwie sekcje tematyczne, „Bioenergetyka” oraz „Struktura i funkcje błon”. W każdej z nich, choć wiele spraw omawiano, dały się zauważyć zagadnienia wyróżniające się albo dużą liczbą prac przedstawianych na podobny temat, albo wzbudzeniem szczególnie zaciętych dyskusji. Były to zatem przejawy pewnej „mody” lub kierunków, w których najprawdopodobniej zmierzać będą przyszłe badania. Kilka przykładów takich właśnie tematów chciałbym tu omówić, raz jeszcze jednak podkreślając subiektywizm wyboru.

Wydaje się, że w bioenergetyce, a ściślej bioenergetyce mitochondriów, dominują obecnie badania nad trzema problemami: ATP-azą mitochondrialną, stechiometrią $H^+/2e$ w łańcuchu oddechowym i, wiążącym się z tym, zagadnieniem tzw. pomp protonowych oraz nad szybko rozwijającym się zagadnieniem biogenezy mitochondriów, w zakresie którego odnotowano w ostatnich latach wiele osiągnięć.

ATP-aza mitochondrialna to stosunkowo dobrze już poznany enzym, do czego przyczyniły się w znacznej mierze dawniejsze badania E. Rackera i wsp. nad rekonstytucją ATP-azy oraz, ostatnio, intensywne badania kilku pracowni europejskich (L. Ernster, P. Vignais, A. Kempa i E. C. Slatera). Badano strukturę podjednostek ATP-azy, ich usytuowanie w błonie i względem siebie oraz oddziaływanie podjednostek katalitycznych tzw. ATP-azy rozpuszczalnej (inaczej tzw. czynnika F_1) z nukleotydami adeninowymi. Stwierdzono między innymi, że na powierzchni F_1 znajduje się co najmniej siedem miejsc wiążących ATP i ADP, wyróżniono miejsca silnie i słabo wiążące nukleotydy, wykazano, że dwie podjednostki β zawierają centra katalityczne enzymu, stwierdzono możliwość występowania zmian konformacyjnych enzymu pod wpływem silnego wiązania ATP lub ADP (jest to zresztą jeden z dowodów na prawdziwość tzw. konformacyjnej hipotezy oksydacyjnej fosforylacji, sformułowanej przez P. D. Boyera i dotyczącej początkowo całego łańcucha oddecho-

wego a obecnie ograniczanej jedynie do ATP-azy), wyróżniono wreszcie podjednostki silnie hydrofobowe, mające prawdopodobnie zadanie wiązania całego kompleksu ATP-azy z błoną. Pomimo tego, że o strukturze enzymu nazbierało się przez lata sporo informacji, wciąż dyskutuje się tę sprawę i wciąż nowe prace wzbogacają naszą wiedzę na ten temat. W Toronto było ich również kilka, a dotyczyły między innymi sposobu połączenia hydrofobowej części błonowej ATP-azy z hydrofilnym, skierowanym do matriks mitochondrialnej czynnikiem F_1 . Dotychczas uważało się, że rolę „łączników” pełnią dwie podjednostki kompleksu enzymatycznego, znane jako tzw. czynniki sprzężenia (ang. *coupling factors*), F_6 i OSCP (ang. *oligomycin sensitivity conferring protein*). Niektórzy wciąż tak uważają (E. Racker, E. C. Slater), jednakże w pracowni L. Ernстера udało się związać część błonową ATP-azy i F_1 z udziałem tylko F_6 lub tylko OSCP, a wreszcie — w ogóle bez nich. Taki kompleks tracił wrażliwość na oligomycynę i DCCD (dwucykloheksa-karbohidruimid), specyficzne inhibitory ATP-azy, i odzyskiwał ją po dodaniu F_6 i OSCP. Czyżby białka te grały zatem rolę w wiązaniu inhibitorów? Inny plakat z pracowni Ernстера wyjaśniał, że jednak nie. Stosując znakowane izotopowo pochodne DCCD i oligomycyny wykryto dwa małe polipeptydy (oba o masie cząsteczkowej około 4 tysięcy) specyficznie wiążące te inhibitory a wchodzące w skład części błonowej ATP-azy. W tym wypadku F_6 i OSCP pełniły raczej funkcję w przekazywaniu do centrów aktywnych wrażliwości na inhibitory a nie w bezpośrednim wiązaniu tych związków. Nadal jednak sposób, w jaki białka te pełnią swą funkcję, jak i ich przestrzenne usytuowanie w kompleksie ATP-azy pozostają dyskusyjne.

Inne plakaty tej grupy zajmowały się problemem tzw. kanału protonowego ATP-azy. Wiadomo, że oksydacyjnej fosforylacji ADP w sprzężonych mitochondriach towarzyszy powrót protonów, wyrzuconych uprzednio z mitochondriów w procesie energizacji błony i odpowiedzialnych za tworzenie potencjału transmembranowego. Ten powrotny przepływ ładunków, zmniejszający potencjał elektrochemiczny mitochondriów, uwalnia energię wykorzystywaną następnie do syntezy ATP. Uważa się, że protony przepływają przez samą ATP-azę, a struktura tzw. kanału protonowego tego enzymu, mechanizm jego działania oraz związek między przepływem protonu a syntezą ATP są obecnie przedmiotem intensywnych badań. Coraz więcej danych wskazuje, że samo uwolnienie protonu następuje w części błonowej enzymu, a w mechanizm działania kanału może być w jakiś sposób zaangażowana kardiolipina, ujemnie naładowany fosfolipid, którego obecność wykryto właśnie w części błonowej ATP-azy. Sprawa ta pozostaje jednak w dalszym ciągu wysoce niejasna. W Toronto dało się natomiast zauważyć, że coraz szersze grono badaczy przyjmuje teorię P. D. Boyera, według której transport protonu powoduje zmianę konformacyjną enzymu, przenoszoną następnie z jego części błonowej do katalitycznej i tam przekształcaną w wysokoenergetyczne wiązanie w cząsteczce ATP.

Mechanizm działania ATP-azy mitochondrialnej rozważano także z regulacyjnego punktu widzenia i tu warto zwrócić uwagę na niezwykle ciekawą pracę laboratorium meksykańskiego, przedstawioną przez Mariettę i Armanda Gómez-Puyou. Badacze ci zajęli się funkcją tzw. inhibitora ATP-azy. Jest to wykryty w 1963 roku przez Pullmana i wsp. niewielki polipeptyd występujący w matriks mitochondrialnej, mający zdolność odwracalnego wiązania się z ATP-azą i blokowania jej aktywności enzymatycznej w obu kierunkach, syntezy i hydrolizy ATP. Jak wykazali Gómez-Puyou, inhibitor ten odłącza się od enzymu pod wpływem energizacji błony mitochondrialnej (np. substratem oddechowym). Jeśli jednak przed podaniem substratu mitochondria inkubowano w obecności jonów wapnia, energizacja nie powodowała odłączenia inhibitora, który w tych warunkach blokował ATP-azę; obserwowano natomiast intensywny transport wapnia do wnętrza mitochondriów. W ten sposób energia elektrochemiczna została wykorzystana na transport jonów w miejsce syntezy

ATP. Inhibitor pełnił zatem rolę czynnika regulującego zużycie energii powstającej w łańcuchu oddechowym, co jest pierwszym przypadkiem wykazania molekularnego mechanizmu regulującego procesy energetyczne mitochondriów.

Pracę na podobny temat przedstawiła również grupa G. Raddy z Oksfordu, która stosując fotometryczny zapis utleniania NADH metodą zatrzymanego przepływu (ang. *stopped flow*) na cząstkach submitochondrialnych, z jednoczesnym pomiarem syntezy ATP w układzie lucyferyna-lucyferaza, wykazała znaczne, kilkusekundowe opóźnienie osiągnięcia maksymalnej fosforylacji oksydacyjnej po podaniu substratu, w stosunku do aktywności łańcucha oddechowego. Opóźnienie to było spowodowane „wyłączeniem” części ATP-az przez związany z nimi inhibitor i dopiero jego odysocjowanie pod wpływem energizacji przez NADH pozwoliło na osiągnięcie maksymalnej syntezy ATP. Sugeruje to, że wielkość fosforylacji nie zależy bezpośrednio od siły protonomotorycznej, lecz od ilości „aktywnych” ATP-az w błonie, co byłoby drugim przykładem regulacyjnej funkcji inhibitora Pullmana.

Reasumując, wydaje się, że zarówno struktura jak mechanizm działania i regulacja ATP-azy mitochondrialnej będzie absorbować laboratoria bioenergetyczne również w następnych latach, mimo bowiem dużego już zasobu informacji na temat tego enzymu szereg pytań wciąż pozostaje bez odpowiedzi.

Drugie zagadnienie bioenergetyczne, które chciałbym krótko omówić, to stechiometria $H^+/2e$ w łańcuchu oddechowym, czyli określenie ilości protonów wyrzucanych przez mitochondria w jednym tzw. miejscu sprzężenia (ang. *coupling site*), przypadających na dwa elektrony transportowane w łańcuchu oddechowym. Stechiometria ta jest również zapisywana jako H^+ /miejsce sprzężenia.

Historia badań nad stechiometrią protonów i elektronów w łańcuchu oddechowym jest już bardzo długa, wciąż jednak budzi żywe dyskusje, mobilizując dalsze prace w tym kierunku. Według chemiosmotycznej teorii P. Mitchella, protony uwalniane są w łańcuchu oddechowym w procesie cyklicznych reakcji redukcji i utleniania kolejnych przenośników elektronów, z tym, że topografia wewnętrznej błony mitochondrialnej i struktura samych przenośników jest taka, że protony pobierane są po jednej a uwalniane po drugiej stronie błony, co w efekcie powoduje powstanie potencjału transmembranowego. Mitchell opisuje w swojej teorii trzy miejsca łańcucha oddechowego, w których następuje uwalnianie protonu na zewnątrz mitochondriów, pierwsze na poziomie przepływu elektronów między dehydrogenazą NADH i ubichinonem, drugie na poziomie kompleksu $b-c_1$ i trzecie w oksydazie cytochromowej. Byłyby to trzy tzw. miejsca sprzężenia w łańcuchu, przy czym w każdym z nich następowałoby (według Mitchella) uwolnienie dwóch protonów. Ponieważ równolegle zmierzono, że hydroliza ATP przez mitochondria prowadzi również do „wyrzutu” dwóch protonów w przeliczeniu na jedną cząsteczkę rozłożonego związku, stąd wniosek, że miejsce sprzężenia produkuje energię wystarczającą na syntezę jednej cząsteczki ATP. Krótko mówiąc, z teorii Mitchella wynika, że stosunek H^+ /ATP równy jest stosunkowi $H^+/2e$ i wynosi 2. Miejsca sprzężenia nie są przy tym identyczne z miejscami syntezy ATP, które związane są z ATP-azą. Chemiosmotyczna natura oksydacyjnej fosforylacji znajduje liczne potwierdzenia. Wykazano, że protony istotnie ulegają przenoszeniu przez wewnętrzną błonę mitochondrialną lub chloroplastową, że ich gradient po obu stronach błony istotnie może produkować ATP, a żmudne badania immunochemiczne potwierdziły niejednorodność rozmieszczenia kompleksów łańcucha oddechowego w błonie. Natomiast wciąż żywo dyskutowana jest owa stechiometria $H^+/2e$. Jeśli bowiem założyć, że jest ona istotnie równa 2, wynika stąd że cała siła protonomotoryczna mitochondriów magazynowana byłaby w ATP, a wiadomo dziś, że potrzebna jest ona również na wytransportowanie ATP z mitochondriów (energochłonna translokacja nukleotydów adeninowych). Z drugiej strony — niemal wszystkie próby mierzenia ilości wyrzucanych protonów w przeli-

czeniu na miejsce sprzężenia dawały, w zależności od autorów i stosowanych metod pomiarowych, wartości od 2,5 aż do 4. Zaczęto więc szukać nowych rozwiązań interpretacyjnych i w ten sposób narodziło się pojęcie tzw. pomp protonowych. Mają to być dodatkowe układy posiadające zdolność wyrzucania protonu oprócz mechanizmu zaproponowanego przez Mitchella, podwyższając tym sposobem stechiometrię o jeden lub dwa protony na miejsce sprzężenia. Pompy protonowe, początkowo przewidywane czysto teoretycznie, już wkrótce znalazły pierwsze potwierdzenia doświadczalne. Pionierskie badania Märtena Wikströma w Helsinkach, prowadzone na całych mitochondriach lub cząstkach submitochondrialnych, wykazywały obecność systemu „pompującego” protony w końcowym odcinku łańcucha oddechowego, prawdopodobnie w oksydazie cytochromowej. Prace te stały się przysłowiowym „kijem w mrowisku”. Zaczęły mnożyć się nowe publikacje i nowe podejścia metodyczne do zagadnienia pomp protonowych, aż wreszcie, właśnie na kongresie w Toronto, równoległe doniesienia z pracowni A. Azziiego w Bernie, P. Hinkla w Ithace i E. Carafoliego w Zürichu przyniosły jednoznaczną odpowiedź: oksydaza cytochromowa jest pompą protonową. Badacze ci zastosowali bardzo prosty układ doświadczalny. Oczyszczona oksydaza cytochromowa, jako jedyne białko, została wbudowana do błon liposomów i po dodaniu zredukowanego cytochromu c w warunkach tlenowych, pompowała protony, tworząc gradient elektrochemiczny po obu stronach błony liposomalnej. Ten niewątpliwy sukces doświadczalny jest jednak zaledwie początkiem długiej drogi do zrozumienia samego zjawiska pompy protonowej i należy się spodziewać, że temat ten będzie intensywnie rozwijany w nadchodzących latach. Głównym zaś problemem dyskutowanym obecnie jest mechanizm działania pompy. Zaproponowano już dwie różne hipotezy tego mechanizmu. Pierwsza, przedstawiona przez S. Papę, opiera się na tzw. efekcie Bohra, czyli oddysocjowaniu protonu pod wpływem przegrupowań elektronowych w cząsteczkach białka, towarzyszących przejściu danego enzymu z jego formy zredukowanej do utlenionej. Druga, zaproponowana przez A. Azziiego, M. Wikströma i E. Carafoliego, zakłada istnienie „kanału protonowego” w oksydazie cytochromowej, analogicznego do istniejącego w ATP-azie mitochondrialnej. Azzi, stosując dwucykloheksa-karbohidroimid (DCCD), wspomniany już inhibitor przepływu protonów przez ATP-azę, jest w stanie w 80% zahamować transport protonów przez oksydazę cytochromową. Stosując zaś radioaktywny DCCD stwierdza, że wiąże się on specyficznym z podjednostką III oksydazy, jedyną transmembranową częścią enzymu. W dalszym ciągu są to jednak tylko przesłanki i ostateczne potwierdzenie jednej z hipotez wymagać będzie dalszych badań.

Wracając jeszcze na chwilę do problematyki samej stechiometrii $H^+/2e$ oraz tzw. stosunku P/O, czyli stosunku ilości zsyntezowanego w procesie oksydacyjnej fosforylacji ATP do ilości zużytego tlenu w łańcuchu oddechowym, warto odnotować wypowiedź A. L. Lehningera dotyczącą tych zagadnień. Zdaniem Lehningera, w obliczu ostatnich odkryć wydaje się rzeczą pewną, że ilość protonów wyrzucanych w miejscu sprzężenia jest wyższa niż 2 i dyskusyjne pozostaje jedynie to, czy równa jest ona 3 czy 4. Jeśli zaś chodzi o liczby używane do opisu stosunku P/O i zwyczajowo zaokrąglane do liczb całkowitych, nic nie stoi na przeszkodzie aby uznać obarczone ułamki wartości mierzone za rzeczywiste, odpowiadające danym warunkom doświadczalnym. To przywiązanie do liczb całkowitych, tłumaczy Lehninger, bierze się jeszcze z czasów gdy obowiązywała teoria chemicznego sprzężenia E. C. Slatera i kiedy, mówiąc o wysokoenergetycznych pośrednikach, było nie do pomyślenia uważać, że stosunek P/O może być liczbą ułamkową. W tej chwili jednak, kiedy przyjmujemy chemiosmotyczny charakter oksydacyjnej fosforylacji, wiedząc na dodatek, że potencjał transmembranowy może być niecałkowicie zużyty na fosforylację, liczby typu 2,4 czy 2,8 nabierają realnego, dającego się łatwo tłumaczyć, znaczenia.

Kolejnym tematem wartym wspomnienia jest zagadnienie biogenezy mito-

chondriów. Problem ten rozwijał się w ostatnich latach bardzo intensywnie, przynosząc sporo nowych informacji. Wiadomo już w tej chwili, że bardzo wiele, a właściwie większość białek mitochondrialnych syntezowana jest w oparciu o geny jądrowe, w cytoplazmie. Mitochondria syntezują wprawdzie pewne białka w oparciu o własny materiał genetyczny, jest to jednak zaledwie kilka podjednostek dużych kompleksów enzymatycznych, jak ATP-aza, oksydaza cytochromowa czy kompleks b-c₁ w łańcuchu oddechowym. W tej sytuacji na pierwszy plan wysuwa się pytanie, w jaki sposób syntezowane w cytoplazmie białka przedostają się do błon i do wnętrza mitochondriów? Początkowo przypuszczano, że na zewnętrznej powierzchni mitochondriów znajdują się zaadsorbowane rybosomy syntezujące łańcuchy peptydowe w ten sposób, że są one bezpośrednio „wstrzykiwane” do mitochondriów. Gdyby tak było, białka mitochondrialne nigdy nie mogłyby występować w stanie wolnym w cytoplazmie i byłyby znajdowane jedynie we frakcji mitochondrialnej. Tymczasem ostatnie badania laboratorium G. Schatza w Bazylei wykazywały obecność całego szeregu białek mitochondrialnych w cytoplazmie, a Schatzowi wręcz udało się pokazać ich stopniowe znikanie z cytoplazmy. Dalej okazało się, że „formy cytoplazmatyczne” białek mitochondrialnych różnią się nieznacznie od swych właściwych odpowiedników w mitochondriach. Różnica ta polega na występowaniu dodatkowego odcinka aminokwasowego (20—60 aminokwasów w różnych białkach badanych), obecnego jedynie w „formie cytoplazmatycznej” danego białka. Odcinek ten „gubi się”, gdy białko znajduje się już w mitochondriach. Znaczyłoby to, że w cytoplazmie syntezowany jest prekursor prawdopodobnie charakteryzujący się zdolnością przechodzenia przez błonę mitochondrialną, która to cecha wiązałaby się być może właśnie z owym dodatkowym odcinkiem aminokwasowym. Odkrycie to, choć niewątpliwie bardzo istotne, nadal nie wyjaśnia jednak mechanizmu samego wnikania do błony lub przechodzenia przez nią dużej struktury białkowej.

W Toronto można było zaobserwować pojawianie się prac, w których ujawniło się nowe podejście do zagadnienia przepuszczalności błon. Badano np. specyficzny transport aminotransferazy asparaginianowej przez błony mitochondrialne (S. Passarella i wsp.) lub transport dehydrogenazy jabłczanowej przez błony liposomów o różnym składzie fosfolipidowym (K. A. Webster i wsp.). Omawiane tu enzymy są typowymi enzymami mitochondrialnymi, nie ich cytoplazmatycznymi prekursorami, a mimo to przenikają przez bariery błon sztucznych lub naturalnych.

Wspomniane powyżej zagadnienia wiążą się częściowo z problematyką drugiej sekcji tematycznej Kongresu Biochemii w Toronto, na którą chciałbym tu zwrócić uwagę. „Struktura i funkcje błon”, bo tak brzmiał jej tytuł, była jedną z najbardziej „załoczonych” sekcji. Ogromna liczba przedstawionych prac, jak również szeroki wachlarz zagadnień jeszcze bardziej utrudniają wybór rzeczy najważniejszych, warty wspomnienia w tak skrótowej relacji. I tu jednak zaznaczyły się pewne nowe kierunki badawcze.

Ładunek powierzchniowy błony, metody jego pomiaru i przypuszczalne funkcje to jedno z tych zagadnień, które zdobywają coraz większe znaczenie. Dał się w Toronto zauważyć pewien zwrot zainteresowań od spraw płynności błony, jej asymetrii i przypuszczalnych zmian konformacyjnych w stronę oddziaływań elektrycznych, mogących wpływać na transport, aktywności enzymatyczne i szereg innych procesów, w których zaangażowane są zjonizowane, a zatem posiadające ładunek, cząsteczki.

Pierwsza sfera badań, która obecnie wyraźnie odwołuje się do spraw ładunku, to fuzje błon. Od szeregu lat było wiadomo, że fuzje błon wywołują lub stymulują czynniki o charakterze kationowym, np. wysokie stężenia wapnia lub magnezu, poliaminy czy związki w rodzaju kupryzonu. Mechanizm ich działania był rozmaicie interpretowany, głównie jednak przy pomocy postulowanych zmian w strukturze i płynności błony. W tej chwili pojawia się nowe spojrzenie na te wyniki. Wiadomo,

że ogromna większość, jeśli nie wszystkie błony biologiczne, posiadają ujemny ładunek powierzchniowy, tworzony przez liczne grupy fosforanowe i karboksylowe fosfolipidów i białek. Dodatek kationowych związków do zawiesiny błon powoduje neutralizację tego ujemnego ładunku, co może być kluczowym powodem stymulującego działania tych związków na zachodzenie fuzji. Warto przytoczyć w tym miejscu dwie prace. I* tak, Eytan i wsp., stosując modelowy system fuzji erytrocytów króliczych z liposomami, stwierdzili, że przy użyciu liposomów zawierających kardiolinę (silnie ujemny fosfolipid) mogą wywołać proces fuzji błon jedynie w obecności wysokich stężeń wapnia. Jeśli jednak zastosowano liposomy zbudowane z fosfatydylocholino z dodatkiem kationowej stearylaminy, fuzja zachodziła samorzutnie. Podobnie, V. Fan i wsp., wykazali, że fuzja hodowanych *in vitro* komórek hepatoma HEp2, wywołana podawaniem glikolu polietylenowego, wiązała się z usuwaniem naładowanych ujemnie fragmentów lipidowych (znajdowano je już po zajęciu fuzji, w środowisku), zawierających duże ilości fosfatydyloseryny i kwasu fosfatydowego. Swobodna elektroforeza komórek, po podaniu glikolu, wskazywała stopniową, następującą w czasie neutralizację ładunku powierzchniowego tych struktur, aż do całkowitego zahamowania migracji elektroforetycznej. Mniej więcej po takim samym czasie obserwowano masowe łączenie się komórek i fuzję ich błon.

Nie wiadomo narazie, czy zmiany w ładunku powierzchniowym jedynie ułatwiają zetknięcie się błon w początkowej fazie fuzji, czy też uczestniczą w samym procesie. Z pewnością jednak ładunek powierzchniowy stał się obecnie istotnym elementem tego zjawiska.

Wpływ ładunku powierzchniowego błony na aktywność znajdujących się w niej enzymów to inny aspekt problemu oddziaływań elektrycznych, szeroko zresztą w Toronto dyskutowany. Po raz pierwszy zagadnienie to pojawiło się na początku lat siedemdziesiątych, w pracach E. Katchalskiego, który badał kinetykę enzymów proteolitycznych unieruchomionych na poli-jonowych nośnikach. Postulaty sformułowane przez Katchalskiego zostały następnie rozszerzone na enzymy błon biologicznych między innymi przez naszą grupę (L. Wojtczak i wsp.). Według tych postulatów, ładunek powierzchniowy błony może wpływać na stężenie zjonizowanego substratu w bezpośrednim sąsiedztwie błony, regulując w ten sposób jego dostępność dla enzymów, poprzez elektryczne przyciąganie lub odpychanie substratu przez błonę. Oddziaływania takie powinny zatem zmieniać mierzone wartości K_m enzymów błonowych, co stało się przedmiotem badań. Na przykładzie sześciu różnych enzymów błonowych, reagujących z kationowymi lub anionowymi substratami, udało się nam wykazać zmiany stałych Michaelisa (przy jednocześnie niezmiennych wartościach szybkości maksymalnych reakcji), towarzyszące traktowaniu błon przez czynniki wpływające na ładunek powierzchniowy, jak np. kwasy tłuszczowe, kationy dwuwartościowe czy niewielkie stężenia detergentów jonowych (w rodzaju SDS lub cetawlonu). Zmiany wartości K_m enzymów były ściśle skorelowane z mierzonymi równolegle zmianami ładunku powierzchniowego błony (elektroforeza swobodna, fluorescencja ANS). Podobne wyniki otrzymaliśmy również wbudowując enzymy do liposomów o różnym, bardziej „ujemnym” lub bardziej „dodatnim” ładunku powierzchniowym (zmieniany skład fosfolipidowy) lub też fosforylując błonę z pomocą endogennych kinaz białkowych. Zwłaszcza ten ostatni układ wydaje się mieć istotne znaczenie w zmienianiu ładunku powierzchniowego błon *in vivo*.

Powyższe obserwacje, poparte wynikami innych laboratoriów (G. Lenaz i wsp., podwyższanie K_m cholinesterazy erytrocytowej przez kationowe anestetyki, widoczne jedynie gdy enzym związany jest z błoną i zanikające po solubilizacji błony; A. Ahrens i wsp., wpływ stopnia zjonizowania błony na aktywność ATP-azy sodowo-potasowej) wskazują, że zmiany w ładunku powierzchniowym błony są w stanie wpływać na aktywność enzymów błonowych i mogą mieć istotne znaczenie

regulacyjne w komórce. Zresztą szereg zjawisk opisywanych dotychczas jako specyficzna inhibicja lub stymulacja procesów katalizowanych przez błony biologiczne (transport, aktywność enzymatyczna) daje się doskonale tłumaczyć wpływem zmienionego ładunku powierzchniowego, bez konieczności odwoływania się np. do zmian konformacyjnych w enzymach czy zmian w strukturze i płynności błony. Wydaje się przy tym, że rośnie zainteresowanie zagadnieniami dotyczącymi oddziaływań elektrycznych w komórce w ogóle. Oddziaływania wykazane dla błon biologicznych można również odnieść np. do enzymów rozpuszczalnych, mówiąc o roli pewnych domen elektrycznych w podjednostkach i całych kompleksach (E. Margoliash i wsp., wpływ zmian pola elektrycznego cytochromu c na jego oddziaływanie z oksydazą cytochromową) lub do oddziaływań między białkami histonowymi i kwasami nukleinowymi w jądrze. Problematyka ta będzie się z pewnością pojawiać na kongresach i sympozjach biochemicznych w przyszłości.

I wreszcie ostatnie zagadnienie, jakie chciałbym poruszyć, to zastosowanie liposomów do specyficznego przenoszenia leków i innych substancji w systemach modelowych i żywych organizmach. Problem ten, intensywnie badany od kilku lat, z którym wszyscy wiązaliśmy cichą nadzieję, że jest w stanie rozwiązać wiele kłopotów lecznictwa a być może znajdzie zastosowanie w walce z rakiem, przeżywa, niestety, wyraźny regres. Mnożą się problemy, maleją natomiast szanse na szybkie i pozytywne rezultaty. Wiadomo w tej chwili, że przy pomocy liposomów można z powodzeniem przynieść materiał błonowy, czyli lipidy wchodzące w ich skład, daje to jednak ograniczony zakres zastosowań. O wiele trudniej jest „dnieść” substancję zamkniętą w liposomach do konkretnych komórek, np. nowotworowych. Na przeszkodzie stają dwa zjawiska. Z jednej strony — liposomy łatwo ulegają zmianom przepuszczalności bądź rozbięciu i tracą wówczas swoją zawartość, z drugiej — mogą być „zatrzymywane” przez niespecyficzne oddziaływania np. z komórkami krwi i nie docierają do komórek wykazujących zmiany chorobowe. Wprawdzie, i to należy podkreślić, w niektórych przypadkach opisano zakończone powodzeniem poszukiwania takich warunków doświadczalnych (skład fosfolipidowy błon liposomalnych, różne stężenia zamkniętego związku, wielkość liposomów itd.), w których większość liposomów w stanie nieuszkodzonym docierała do właściwych komórek. Stało się tak między innymi w przypadku pracy przedstawionej w Toronto przez Richardsona i wsp., gdzie sztucznie wywołany u myszy nowotwór węzłów chłonnych był prawie całkowicie likwidowany w ciągu kilkudniowego (3—5 dni) podawania myszkom metotreksatu, zamkniętego w ujemnie naładowanych liposomach (fosfatydylocholina z dodatkiem fosfatydyloinozytolu i kwasu fosfatydowego). Skuteczność działania metotreksatu tak podanego była ponad pięćdziesięciokrotnie wyższa od działania wolnego związku. Nadal jednak tego typu doniesienia są rzadkością. Głównym powodem jest brak ogólnej „recepty” na zastosowania liposomalne, gdyż każdy układ wymaga specyficznych warunków dla prawidłowego działania, a warunki te przeważnie nie dają się już zastosować z pozytywnym skutkiem w żadnym innym układzie. A zatem, po kilku wycinkowych sukcesach, przyszło pewne rozczarowanie tą techniką. Jeśli jednak wziąć pod uwagę liczbę prac w dalszym ciągu na ten temat publikowanych, sprawa pozostaje w centrum zainteresowania i być może doczeka się jeszcze sukcesów odpowiadających nadziejom.

Maciej J. Natęcz

VIII Międzynarodowe Kolokwium na temat Bioenergetyki i Mitochondriów Smolenice k/Bratysławy, 16—20 września 1979 r.

Kolejne, doroczne spotkanie bioenergetyków krajów socjalistycznych zorganizowane zostało tym razem przez kolegów ze Słowacji. Odbyło się ono w pięknie położonym zamku smolenickim. Trzydniowe obrady wypełnione były porannymi sesjami plenarnymi, popołudniowymi prezentacjami doniesień (w formie plakatów) oraz wieczornymi dyskusjami ogólnymi. Dzień czwarty poświęcony był na wycieczkę do Devina i Bratysławy ze zwiedzaniem po drodze jaskini Driny.

Zgodnie z założeniem organizatorów wiodącymi tematami kolokwium były biogeneza mitochondriów i wzajemne powiązania metaboliczne pomiędzy mitochondriami a cytoplazmą. Tym tematom poświęcona była większość wykładów plenarnych. Prezentacje plakatowe były natomiast zróżnicowane i dotyczyły zarówno zagadnień poruszanych w wykładach jak i innych aspektów bioenergetyki i metabolizmu mitochondriów.

Na ogólną liczbę dziesięciu, 3 wykłady dotyczyły genetyki mitochondriów. A. Putrament (Warszawa) przedstawiła obecny stan wiedzy na temat mitochondrialnego genomu oraz rodzajów mutacji mitochondrialnego DNA. Z. Kotylak (Wrocław) szczegółowo omówił biogenezę oksydoreduktazy ubichinon — cytochrom c w komórkach drożdży. S. Kužela (Bratysława) w przeglądowym wykładzie omówił właściwości mitochondriów komórek nowotworowych, podkreślając że posiadają one wiele wspólnych cech niezależnie od rodzaju nowotworów z których zostały wyizolowane.

Drugim tematem kolokwium było powiązanie metabolizmu mitochondriów i cytoplazmy. A. B. Wojtczak (Warszawa) omówiła czynniki regulujące powstawanie glukozy i mocznika w komórce wątroby. Opierając się na badaniach własnych i danych z piśmiennictwa autorka przedyskutowała rolę potencjałów fosforylacyjnych, stanu nukleotydów pirydynowych i dostępności substratów dla regulacji obydwu tych procesów zachodzących częściowo w obrębie mitochondriów a częściowo w cytoplazmie. S. G. van den Bergh (Utrecht) poświęcił swój wykład ketogenezie i jej regulacji, zwracając jednocześnie uwagę na znaczenie ciał ketonowych jako substratów dla tkanki mózgowej. O możliwości regulacji niektórych reakcji cytoplazmatycznych poprzez zmianę szybkości przenoszenia równoważników redukcyjnych przez błonę mitochondrialną na przykładzie cyklu glicerofosforanowego w brunatnej tkance tłuszczowej mówił Z. Drahoťa (Praga).

Szczególne zainteresowanie uczestników kolokwium wzbudziło zagadnienie regulacji komórkowych procesów oddychania oraz roli translokazy nukleotydów adeninowych w tym procesie podjęte w wykładzie R. Bohnensacka (Magdeburg). Według autora głównym czynnikiem regulacji oddychania jest wewnątrzmitochondrialny, a nie jak dotychczas uważano, zewnątrzmitochondrialny potencjał fosforylacyjny. Przemawia za tym obserwacja, że translokaza nukleotydów adeninowych nie doprowadza do stanu równowagi rozmieszczenia tych nukleotydów w przedziałach wewnątrz i zewnątrzmitochondrialnym. Zgodnie z dawną koncepcją, że zewnątrzmitochondrialny potencjał fosforylacyjny jest czynnikiem regulującym należało spodziewać się stanu równowagi w rozmieszczeniu nukleotydów adeninowych w obydwu przedziałach.

W kolokwium uczestniczyło ok. 100 osób, w tym 17 z Polski. Było ono udanym i miłym spotkaniem. Następane kolokwium odbędzie się w roku 1981 w N.R.D.

*Jerzy Duszyński
Józef Zborowski*

RECENZJE

Biosynteza Mikroorganizmami Nukleaz i Proteaz

Akademia Nauk SSSR, Naučnýj sovet po problemam fizjologii i biochimii mikroorganizmov; Institut mikrobiologii; Ordena Lenina Institut biochimii im. A. N. Bacha. Red. odpowiedzialny akademik A. A. Imšeneckij.

Izd. Nauka, 1979, Moskva, str. 295, cena 3,30 rb (66 zł)

Celem tej monografii było — jak stwierdza w słowie wstępnym prof. L. G. Loginova, syntetyczne przedstawienie stanu wiedzy nt. biosyntezy, struktury i funkcji nukleaz i proteaz bakterii i grzybów. Ze względu na bogactwo materiału doświadczalnego niektóre zagadnienia pominięto; natomiast przy proteazach skupiono się na uogólnieniu wyników badań własnych.

Część pierwszą, poświęconą nukleazom, rozpoczyna rozdział pióra M. I. Beljajevej, I. B. Leščinskiej i D. V. Jusupovej nt. biosyntezy pozakomórkowych nukleaz. Autorki starają się udowodnić, iż regulacja aktywności nukleaz zachodzi na poziomie transkrypcji, translacji oraz sekrecji do środowiska, przy czym niektóre przynajmniej nukleazy mogą być indukowane przez substrat oraz represowane przez końcowe produkty degradacji kwsów nukleinowych. Jednak przekonujących dowodów na potwierdzenie tej tezy nie dostarczają. Przykładowo, czy z faktu iż po dodaniu do pożywki RNA bądź DNA aktywność nukleolityczna wydzielana przez *Bacillus* jest o 1,5—2,3 raza wyższa w porównaniu do kontroli można wnioskować: „Przeto wmożenie biosyntezy nukleaz stanowi odpowiedź bakterii na obecność w pożywce specyficznego substratu lub jego strukturalnego analogu, co dowodzi indukcyjnego charakteru syntezy nukleaz” (s. 18)? Podobnych wniosków, nieadekwatnych do wyników uzyskanych prostymi metodami i nie popartych dogłębną charakterystyką biochemiczną dyskutowanych enzymów, znajduje się na kartach tej monografii więcej. Natomiast mocną stroną I rozdziału jest wykazanie, iż czynniki fizjologiczne i troficzne wpływają przemożnie na produkcję nukleaz przez dany szczep bakteryjny. Nie można, niestety, skorelować zmian aktywności nukleolitycznej z cyklem życiowym komórki bakteryjnej.

T. V. Šachova, S. A. Konovalov i G. I. Chomjakova zwracają uwagę na promienowce — zwłaszcza *Actinomyces coelicolor* i *A. aureoverticillatus*, jako producentów specyficznego guanilo-RNazy oraz 5'-ogzoRNazy.

W III rozdziale S. I. Bezborodova i A. M. Bezborodov omawiają funkcje wewnątrzkomórkowych RNaz bakterii podając kody enzymatyczne, optima pH, kofaktory, substraty i produkty reakcji, sposób działania enzymów i ich występowanie w substrukturach komórkowych. Ci sami autorzy charakteryzują następnie endonukleazy prokariotów podając klasyfikację, zasady nomenklatury, występowanie i specyficzność lokacyjną (ros. *sajt-specifičnost'*), masy molowe itp. Różne funkcje

przypisuje się restryktazom; jednak „należy wnioskować, iż najbardziej prawdopodobną funkcją specyficzności lokacyjnej endonukleaz jest rozkładanie obcego DNA oraz restrykcja wirusów” (s. 73).

Stosunkowo dużo wiadomo o udziale RNaz w metabolizmie drożdży i grzybów (rozd. V); mimo to, funkcje nukleaz *in vivo* nie są jasne.

W końcowym rozdziale Bezborodova i Bezborodov omawiają pozakomórkowe RNazy w aspekcie porównawczym, dzieląc je na dwie grupy: specyficzne guanilo-RNazy oraz niespecyficzne RNazy, a następnie znajdując podobieństwo i różnice w ramach każdej grupy jeśli chodzi o strukturę pierwszo- i trzeciorzędową, centra aktywne, specyficzność substratów, mechanizmy działania. Podobieństwa między guanilo-RNazami — enzymami o masie molowej do 30 000 daltonów, są uderzające; zdaje się to świadczyć o ich wspólnym filogenetycznym źródle. RNazy niespecyficzne są stosunkowo słabo poznane. Autorzy wysuwają koncepcję, iż RNazy te mogły powstać w wyniku duplikacji genu strukturalnego z następnym funkcjonowaniem dwóch lub trzech genów potomnych jako jednego genu strukturalnego; ta pozornie fantastyczna hipoteza znajduje pewne uzasadnienie w faktach.

W części II N. S. Egorov, Z. K. Loriga i N. S. Landau opisują metody selekcji i hodowli mikroorganizmów wytwarzających pozakomórkowe proteazy o aktywności fibrynolitycznej bądź koagulacyjnej. Zwraca uwagę, iż syntezę tych enzymów można pobudzać wybiórczo. Kwas asparaginowy — przykładowo, represuje syntezę proteaz kwaśnych i obojętnych *Actinomyces spheroides*, pełniąc funkcję optymalnego induktora proteaz alkalicznych o wysokiej aktywności fibrynolitycznej. Toczą się badania nad możliwością stosowania wymienionych enzymów do rozpuszczania skrzepów lub do przyśpieszania koagulacji białek krwi *in vivo*; dodatek heparyny do preparatów — wiążącej endogenne inhibitory fibrynolizy, znacznie skraca czas lizy skrzepów w układzie krwionośnym szczurów.

Zagadnienia związane z syntezą proteaz obojętnych oraz alkalicznych omawia I. A. Caplina oraz L. I. Erochina i E. O. Dobrzanskaja. Sporo uwagi poświęcono zagadnieniu intesyfikacji produkcji proteaz (zwłaszcza przez stosowanie radiacji oraz kultury mieszane gatunków wytwarzających i nie wytwarzających proteazy), mechanizmów ich indukcji i represji oraz pełnionym funkcjom fizjologicznym.

W tekście zamieszczono 43 ryciny i 66 tabel. Wykaz literatury obejmuje 303 pozycje w języku rosyjskim i 850 w innych językach, bez tytułów; jest to więc dobra okazja do zapoznania się z dorobkiem uczonych radzieckich na tle osiągnięć innych pracowni. W wykazie literatury znajduje się sporo błędów w pisowni nazwisk i czasopism. Pewną trudność sprawia rozumienie tabel i wykresów, pozbawionych odnośników do źródeł i opisów istotnych szczegółów stosowanych metod. Brak częstszych podtytułów w tekście sprawia, iż o tym samym zagadnieniu wzmiankuje się niejednokrotnie w różnych miejscach danego rozdziału; oko zaś z trudem przedziera się przez gęstwą zwartego tekstu.

Mimo wymienionych usterek formalnych omawianą monografię można polecić jako cenne źródło informacji dla zainteresowanych tematem biochemików, mikrobiologów i fizjologów, ponieważ na jej stronach zaprezentowano sporo nowych i ciekawych osiągnięć eksperymentalnych oraz interesujących a miejscami wręcz frapujących uogólnień bądź sugestii teoretycznych. Trzeba się jednak zgodzić, iż odszukanie potrzebnej informacji może zająć sporo czasu bez rękojmi sukcesu, ponieważ tej specjalistycznej monografii nie uzupełniono indeksem rzeczowym.

J. S. Knypl

Metody Molekularnej Biologii

Red. G. Ch. Macuka, I. P. Kok, A. V. El'skaja, O. M. Platonov, V. K. Kibirev

Naukowa Dumka, 1979, Kiev, str. 268, cena 3,10 rb (62 zł)

W książce przedstawiono 30 opisów metod, stosowanych w Instytucie Biologii Molekularnej i Genetyki Akademii Nauk Ukraińskiej SSR do badań nad funkcjami i strukturą kwasów nukleinowych i białek; zespół autorów obejmuje 59 nazwisk.

Opisy rozpoczyna grupa metod instrumentalnych, tj. zastosowania mikroskopii elektronowej do analizy biopolimerów; planowanie eksperymentów z zastosowaniem techniki wirowania strefowego w gradientach sacharozy, z wykorzystaniem komputerów; oraz zasady oznaczania radioaktywności w płynnych scyntylatorach.

Drugą grupę stanowią opisy metod oczyszczania, badania struktury i biologicznej aktywności kwasów nukleinowych. Przedyskutowano zagadnienia związane z hybrydizacją DNA i RNA; wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych do charakterystyki struktury nukleoproteidów; otrzymywaniem różnych typów DNA i RNA oraz poli-ribosomów z wirusów, bakterii, drożdży i komórek zwierzęcych; aż po ultramikro-spektrofotometryczne metody analizy struktury pierwszorzędowej tRNA. Interesująca może być wiadomość, iż radziecki spektrofotometr SF-4 wyposażony jest opcyjnie w automatyczną przystawkę MSFP-3 z kiuwetą przepływową o pojemności 2 μ l, umożliwiającą zapis A przy dowolnie wybranych pięciu długościach fal w zakresie od 220 do 650 nm podczas rozdziału chromatograficznego.

Z kolei omówiono metody wydzielenia i charakterystyki enzymów i białek, takich jak tRNA-syntetazy, aminoacylo-tRNA-syntetazy, trypsyna, trombina itp. Podano metody analizy N-końcowych aminokwasów w petydach; zastosowania elektroforezy i ogniskowania izoelektrycznego w żelach poliakryloamidowych do charakterystyki białek; metody badania struktury i funkcji hemoglobiny ssaków; oraz metody syntezy DNA na mRNA eukariontów (odwrotna transkrypcja).

Ostatnią czwartą grupę, stanowią metody hodowli komórek i tkanek w zastosowaniu do badań genetycznych i molekularnych. Książkę kończy opis metody oznaczania wiązania azotu atmosferycznego przez mikroorganizmy beztlenowe; metoda oparta jest na oznaczaniu ilości wydzielanego etylenu.

Jest to cenny podręcznik metodyczny, godny polecenia młodym biochemikom i biologom molekularnym. Autorzy wykazali dużą inwencję w dostosowaniu nie zawsze najprostszyc współczesnych metod analitycznych do postaci rzeczywiście prostej (lecz nie prostackiej!), możliwej do zreprodukowania w naszych pracowniach. Opisy są przejrzyste; rady budzą zaufanie. Rangę opracowań podnosi literatura przytoczona z tytułami, dobre ilustracje (łącznie 64) z wyczerpującymi opisami, oraz streszczenia każdego artykułu.

J. S. Knypl

SPIS TREŚCI

M. Kopeć — Białka krzepnięcia krwi „zależne od witaminy K”	3
I. Stiasna, J. Grabowska-Hibner, B. Szukalski — Metabolizm alkoholu etylowego w wątrobie	29
E. Turska — Enzymatyczna i chemiczna charakterystyka mitochondriałej błony zewnętrznej	47
J. Szopa, H. Jańska, W. Mejbaum-Katzenellenbogen — Białka destabilizujące DNA	63
J. Fronk — Struktura nukleosomu	77
K. Nowak — Degradacja Edmana peptydów lub białek związanych ze sa- łym nośnikiem	105
Nowe w biochemii	
Biosynteza etylenu (<i>J. S. Knypl</i>)	119
Sprawozdania	
XI Międzynarodowy Kongres Biochemii w Toronto (Kanada)	123
VIII Międzynarodowe Kolokwium nt. Bioenergetyki i Mitochondriów, Smolence k/Bratysławy, 16—20 września 1979 r.	130
Recenzje książek	
Biosynteza Mikroorganizmami Nukleaz i Proteaz	131
Metody Molekularnej Biologii	133

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1980

ARTICLES IN POLISH

Volume 26

Number 1

M. Kopeć — Vitamin K dependent Blood Clotting Proteins (Dept. Radiobiology and Health Protection, Institute of Nuclear Research, Warszawa)	3
I. Stiasna, J. Grabowska-Hibner, B. Szukalski — Metabolism of Ethanol in the Liver — (Dept. Biochem. Institute of Psychoneurology, Warszawa)	29
E. Turcka — Enzymatic and Chemical Characteristics of the Outer Membrane of Mitochondria (Dept. Biochem. Institute of Physiology and Biochemistry, Medical School, Łódź)	47
J. Szopa, H. Jańska, W. Mejsbaum-Katzenellbogen — Helix Destabilizing Proteins — (Institute of Biochemistry, University of Wrocław, Wrocław)	63
J. Fronk — Structure of Nucleosome — (Institute of Biochemistry, University of Warsaw, Warszawa)	77
K. Nowak — Edman Degradation of Peptides or Proteins Attached to Solid Support — (Dept. Biochem., Institute of Biochemistry and Biophysics, Medical School, Wrocław)	105
Biochemical News	119
Meeting reports	123
Book review	131

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

półrocznie zł 40.—

rocznie zł 80.—

Prenumeratę **na kraj** przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do 25 listopada na I półrocze roku bieżącego i na cały rok następny,

— do 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki **za granicę** przyjmują RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie Nr 1153-201045-139-11 — w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki **za granicę** jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zleceniodawców instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter) 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order starting the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona — Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P.O. Box 1001, Poland. Please send payments to the account of Ars Polona — Ruch in Bank Handlowy S.A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, Poland.

Indeks 36969

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 przedstawionej 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.:

Pipa 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 stroną 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*, red. 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 powinny 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 spójność 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 przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy zatem uzyskać zgodę na przedruk lub wykorzystanie danych i przedłożyć ją Redakcji. W razie modyfikowania rycin zaczerpniętych z opublikowanych prac należy także przedłożyć Redakcji do wglądu kopie oryginalnych ilustracji.

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

SPIS TREŚCI

M. Kopeć — Białka krzepnięcia krwi „zależne od witaminy K”	3
I. Stiasna, J. Grabowska-Hibner, B. Szukalski — Metabolizm alkoholu etylowego w wątrobie	29
E. Turska — Enzymatyczna i chemiczna charakterystyka mitochondrialnej błony zewnętrznej	47
J. Szopa, H. Jańska, W. Mejbaum-Katzenellenbogen — Białka destabilizujące DNA	63
J. Fronk — Struktura nukleosomu	77
K. Nowak — Degradacja Edmana peptydów lub białek związanych ze stałym nośnikiem	105
Nowe w biochemii	
Biosynteza etylenu (<i>J. S. Knypl</i>)	119
Sprawozdania	
XI Międzynarodowy Kongres Biochemii w Toronto (Kanada)	123
VIII Międzynarodowe Kolokwium nt. Bioenergetyki i Mitochondriów, Smolenice k/Bratysławy, 16–20 września 1979 r.	130
Recenzje książek	
Biosynteza Mikroorganizmami Nukleaz i Proteaz	131
Metody Molekularnej Biologii	133