

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

**1970**  
**tom 16**  
**nr 3**

**KWARTALNIK**

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

*Postępy Biochemii* publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postęпах Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach. Artykuły są honorowane wg ustalonych stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek pracy; żądanie dalszych odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie nadsyłając pracę. Autora obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor.

Redakcja zastrzega sobie możliwość wprowadzenia skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy.

**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 oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

Rozdziały w tekście należy oznaczyć numeracją rzymską, a podrozdziały — arabską. Tytuły nie wydzielone z tekstu nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków, schematów i wzorów. W żądanym miejscu należy pozostawić wolny wiersz i oznaczyć: Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1 lub liczbą rzymską w nawiasie — numer odpowiedniego wzoru. W tekście należy odwołać się do numeracji wzoru po słownym wymienieniu związku, np.: kwas glutaminowy (I).

Powołując się na literaturę należy podać w tekście, w nawiasie, kolejny numer pozycji w spisie literatury.

**Załączniki do tekstu.** Każdy załącznik należy dołączyć na oddzielnej kartce, opatrzonej kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście, np. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej rubryki powinny być zaopatrzone w odpowiedni tytuł.

Podpisy i objaśnienia pod rysunkami i schematami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem. W fotografiach i wykresach należy oznaczyć „górze” i „dół”.

**Literatura.** Wykaz literatury należy wypisać oddzielnie, na ostatnich stronach maszynopisu, w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów.

*Obrypańska*

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1970  
tom XVI  
zeszyt 3

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), B. Filipowicz (Łódź),  
W. Gajewski (Warszawa), Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejb-  
baum-Katzenellenbogen (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poz-  
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),  
K. L. Wierzchowski (Warszawa)

Komitet Redakcyjny  
Redaktor — Zofia Lassota  
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

### Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki  
Warszawa 12 ul. Rakowiecka 36  
tel. 44-52-01, wewn. 506

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1970

Nakład 2090 (1956+134)	Oddano do składania 8.V.1970
Ark. wyd. 12,75, druk 11,5 + 4 wklejki	Podpisano do druku w sierpniu
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono we wrześniu
Cena zł 20.—	Zam. nr 816/70 K-59

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA



TADEUSZ BARANOWSKI\*

## Zależność między budową a funkcją białek\*\*

### Relation between the Protein Structure and Function

The present state of research on conformational changes of protein molecules in function and their structural heterogeneity is reviewed.

W strukturze wielu cząsteczek białkowych zawarta jest informacja o ich funkcji. Przyjęło się nawet pojęcie „białka informacyjne”. W użyciu jest również pojęcie „białka regulatorowe”. Dotyczy ono enzymów, których aktywność katalityczna jest zmieniana przez dołączanie wiązaniem niekowalencyjnym różnych ligandów, mających charakter substratów, aktywatorów lub inhibitorów. Czynniki regulujące nazywamy najogólniej efektorami lub modyfikatorami. Będąc małymi cząsteczkami lub jonami wpływają one na proces katalizy biologicznej, same nie ulegając zmianom chemicznym.

Regulacja funkcji katalitycznej cząsteczki białkowej pod wpływem modyfikatorów nazywa się efektem allosterycznym. Polega ona na indukowaniu zmian konformacyjnych w cząsteczce enzymu. Zbadanie efektu allosterycznego i stwierdzenie jego powszechności utrwaliło pogląd, że funkcja katalityczna cząsteczki białkowej wynika z jej konformacji i że sam akt katalizy przebiega ze zmianami konformacyjnymi.

Przez konformację w ogólnym ujęciu rozumiemy przestrzenny układ atomów w cząsteczce białkowej. Zmiany konformacyjne oznaczają odchylenia od średnich pozycji jąder atomowych wywołane bez naruszenia wiązań kowalencyjnych. Jeżeli substrat wiąże się z enzymem tworząc kompleks enzym-substrat, to towarzyszą temu określone i swoiste zmiany w konformacji enzymu i substratu. Jest to podstawowe założenie hipotezy wzbudzonego dopasowania (ang. *induced fit*) K o s h l a n d a (21, 22). Zakłada ona, że małe cząsteczki indukują w enzymie zmiany konforma-

---

\* Prof. dr, Katedra Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, Wrocław

\*\* Referat wygłoszony na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wrocław, 18—23 września 1969

cyjne, wywołują określoną orientację grup chemicznych uczestniczących bezpośrednio w katalizie oraz stwarzają, o ile są substratami, odpowiednie dopasowanie przestrzenne centrum katalitycznego. Rozległe badania przeprowadzone w ostatnim 10-leciu na wielu enzymach potwierdziły tę fundamentalną tezę. Z funkcją katalityczną związane są zmiany konformacyjne, które dają się bezpośrednio wykrywać nowoczesnymi metodami fizykochemicznymi: pomiarami własności hydrodynamicznych, dyfrakcji rentgenowskiej, dyspersji skręcalności i dichroizmu kołowego, widm jądrowego rezonansu magnetycznego, a nawet pomiarami obrazów elektronoptycznych. Zmiany konformacyjne są odwracalne w cyklu katalitycznym, powtarzają się z określoną przez warunki otoczenia częstotliwością, cząsteczka enzymu jak gdyby pulsuje lub przedstawiając obrazowo oddycha.

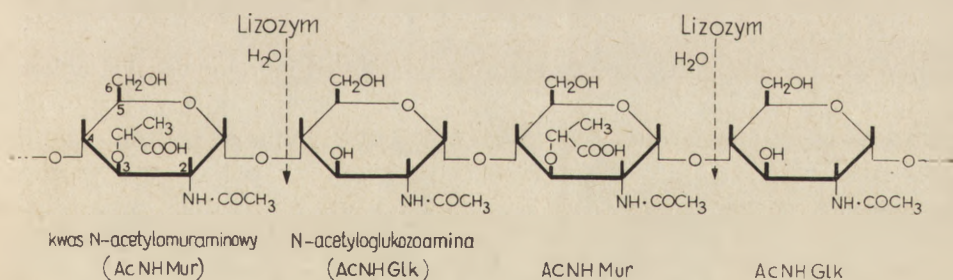
Nowoczesna technika badania zmian konformacyjnych wyzwoliła lawinę prac nad zmianami struktury cząsteczek białkowych związanych z ich funkcją. W miarę rozwoju tych badań zaczyna się rysować unitarystyczny obraz związku między strukturą i funkcją. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że wiele zjawisk biologicznych związanych z funkcją białek jak kataliza biologiczna, przepuszczalność błon komórkowych, mechanizm odporności, krzepnięcia krwi, przenoszenia energii, przenoszenia bodźców nerwowych i inne, polega na określonych, uwarunkowanych przez środowisko tranzycjach konformacyjnych, to jest odwracalnych zmianach struktury wielkocząsteczek.

Największy postęp w zrozumieniu zmian konformacyjnych dokonał się w biologii molekularnej enzymów. Rzuca on na postępowanie w zrozumieniu funkcji pozostałych białek i dlatego skupię uwagę na roli konformacji cząsteczek białkowych w mechanizmie katalizy, ograniczając się do wybranych aspektów tego zagadnienia. Zajmiemy się więc absolutną strukturą niektórych enzymów w akcji katalitycznej, zmianami konformacyjnymi enzymów, związanymi z allosteryczną regulacją ich aktywności oraz heterogennością strukturalną enzymów. W tym zakresie postęp biologii molekularnej jest największy i najszerzej otwiera nowe perspektywy.

Poznanie roli struktury w rozwijaniu funkcji katalitycznej polega na identyfikacji grup chemicznych biorących bezpośredni udział w wiązaniu substratu i rozszczepianiu wiązania chemicznego, poprzez chemiczną modyfikację tych grup i badanie kinetyki reakcji katalizowanej. Interpretacja tych danych dostarczyła ogólnych pojęć o budowie centrów katalitycznych i regulatorowych w enzymie. Niezbędnym jednak warunkiem pełnego poznania mechanizmu katalizy biologicznej jest określenie rzeczywistej struktury enzymu, to jest położenia przestrzennego wszystkich atomów w cząsteczce z dokładnością bliską odstępom międzyatomowym. Oprócz istotnego dla wiązania i przekształcania substratu struktury cent-

rum katalitycznego równie istotną i niezbędną jest struktura pozostałej części cząsteczki białkowej. Do jej poznania zbliżyły nas badania krystalograficzne z ostatnich lat. Analiza dyfrakcyjna kryształów enzymów w różnych fazach czynności katalitycznej wykrywa zmiany konformacyjne z nią związane i jednoznacznie określa strukturę cząsteczki utrwaloną w sieci krystalicznej. Wyznaczyć miejsce wiązania substratu można metodą różnicowej analizy Fourriera, jeżeli uda się wdyfundować do kryształu enzymu substrat lub inhibitor bez naruszenia sieci krystalicznej. Takie badania zostały przeprowadzone przez Phillipsa i wsp. (4, 5, 40) na krystalicznym lizozymie i jego kompleksach z inhibitorami i dały realną podstawę molekularnej teorii działania enzymów. Do tej pory osiem enzymów oraz mioglobinę określono strukturalnie z dokładnością do odstępów międzyatomowych (2—2,8Å), a 10 dalszych z rozdzielczością 4—5Å. Absolutne struktury wyznaczono dla enzymów zawierających od 124 (rybonukleaza) do 307 (karboksypeptydaza) reszt aminokwasowych w pojedynczym łańcuchu peptydowym. Enzymy te prawie wyłącznie są hydrolazami (peptydowymi lub glikozydowymi).

Lizozym jest szczególnie dogodnym obiektem dla studiów nad katalizą biologiczną, gdyż zawiera tylko jeden łańcuch peptydowy złożony z 129 reszt aminokwasowych, nie ma grup prostetycznych i nie wymaga metalu lub kofaktorów dla aktywności. Jego swoistość substratowa i funkcja katalityczna zależą wyłącznie od przestrzennego układu reszt aminokwasowych. Enzym hydrolizuje polimery naprzemiennie występujących reszt kwasu N-acetylomuraminowego (AcNHMur) i N-acetyloglukozaminy (AcNHGlc), rozszczepiając wiązanie  $\beta$ -glikozydowe na C<sub>1</sub> AcNHMur (schemat 1).

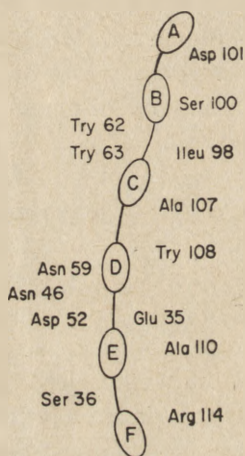


**Schemat 1.** Miejsca działania lizozymu na substrat

Konformacja enzymu wynika z struktury pierwszorzędowej, tj. sekwencji aminokwasów, gdyż można rozwinąć łańcuch peptydowy i z powrotem sfałdować, przy czym odtwarza się jedyna konformacja, właściwa dla czynnego enzymu. Analiza dyfrakcyjna wykazała, że cząsteczka ma budowę spoistą, a to dzięki skupieniu grup hydrofobowych w środku czą-



steczki i wystawieniu grup hydrofilowych na zewnątrz, w kierunku płaszcza wodnego. Pomiary promieni zasięgu sił van der Waalsa w środowisku hydrofobowym wskazały, że podczas zwijania się łańcucha peptydowego nie ma w niej wolnego miejsca i że woda musi być ze środka cząsteczki wypchnięta. Przez cząsteczkę enzymu przebiega symetrycznie głęboka szczelina, którą zidentyfikowano jako miejsce wiązania substratu. W tym samym miejscu znajduje się również centrum katalityczne. Szczelina jest wyścielona (schemat 2) z jednej strony resztami aminokwasowymi o łańcuchach hydrofobowych, z drugiej o łańcuchach hydrofilowych. Związaniu substratu towarzyszy zwężenie się szczeliny, czego wyrazem jest, między innymi, przesunięcie się Try 62 o około  $3/4\text{\AA}$ .



**Schemat 2.** Aminokwasy w centrum katalitycznym lizozymu (24)

Związanie substratu odbywa się przy udziale sił van der Waalsa w kontakcie z Try 62, Try 63 i Try 108, natomiast rozszczepienie wiązania glikozydowego w substracie (AcNHMur-AcNHGlk) wymaga zbliżenia się do wiązania dwóch grup karboksylowych (schemat 3), położonych w głębi szczeliny, a należących do Glu 35 i Asp 52. Miejsce to zostało przestrzenie dokładnie określone i jest jednym z 6 miejsc wiążących odcinek łańcucha substratu, obejmujący 6 reszt cukrowych (oznaczonych A—F na schemacie 2).

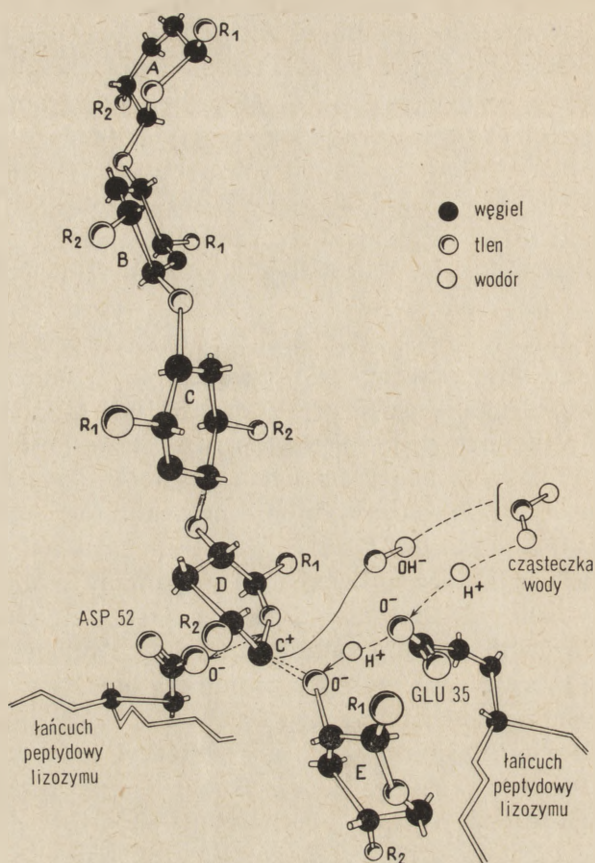
W akcie katalizy zasługują na uwagę dwa efekty konformacyjne. Pierwszym jest powstanie wskutek działania substratu na enzym lokalnego środowiska skupionych reszt hydrofobowych o niskiej stałej dielektrycznej po jednej stronie szczeliny, a reszt hydrofilowych o wysokiej stałej dielektrycznej po drugiej jej stronie. Drugą istotną zmianą jest równoczesna zmiana konformacji substratu. Pod wpływem kontaktu



z aktywnym miejscem enzymu kwas N-acetylmuraminowy, znajdujący się w przylegającym odcinku polimeru AcNHMur-AcNHGlc, zmienia swoją normalną konfigurację krzeselkową na napiętą półkrzeselkową, w której C<sub>6</sub> zajmuje pozycję osiową, a C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub> i tlen mostka tworzą prawie płaski pierścień. Substrat w formie napiętej jest ściśle dostosowany do szczeliny. Wszelkie odchylenia od konformacji wiązanego ligandu, np. wskutek modyfikacji jego budowy powodują inhibicję. Ułożenie przestrzenne grup chemicznych enzymu biorących bezpośredni udział w katalizie pozwala zakładać, że wiązanie glikozydowe ulega rozszczepieniu przez zgrane współdziałanie dwóch grup karboksylowych, znajdujących się w różnych mikrośrodkach. Jedna z nich, należąca do Glu 35, jest dawcą protonu, z którego tworzy się w połączeniu z tlenem mostka grupa hydroksylowa, druga, pochodząca z Asp 52, silnie zjonizowana, stabilizuje powstały ładunek dodatni. Następstwem takiego układu jest rozbicie wiązania glikozydowego z udziałem cząsteczki wody (schemat 3). Mechanizm ten jest analogiczny do nieenzymatycznej hydrolizy przez kwas.

Konformacja krystalicznego lizozymu i jej zmiany w akcji katalitycznej potwierdziły założenie hipotezy K o s h l a n d a. Istnienie zmian konformacyjnych, zarówno centrum katalitycznego jak i substratu i wzajemne dopasowanie się przestrzenne wykryto za pomocą analizy dyfrakcyjnej we wszystkich dotychczas zbadanych enzymach.

W rybonukleazie A, której strukturę oznaczyli K a r t h a, B e l l o i H a r k e r (19), oraz w rybonukleazie S, zbadanej przez W y c k o f f a i wsp. (55), stwierdzono również obecność głębokiej szczeliny przecinającej cząsteczkę enzymu symetrycznego kształtu. Szczelina ta jest wyścielona resztami arginyłowymi i lizylowymi. Wiążą one siłami elektrostatycznymi ujemnie naładowane grupy fosforanowe substratu, którym jest RNA. Centrum katalityczne, które określono na podstawie pozycji przestrzennej związanego z nim inhibitorowego analogu substratu (2', 3'-cykliczny UMP), tworzy His 12, His 119 oraz Liz 41. Przypuszcza się, że tak zbudowane środowisko stwarza warunki dla ogólnej katalizy zasadowej. Istotny dla aktywności rybonukleazy jest S-peptyd, utworzony przez 20 aminokwasów od N-końca łańcucha peptydowego, zwinięty w  $\alpha$ -spiralę. Tę konfigurację przyjmuje S-peptyd tylko wtedy, kiedy jest częścią składową enzymu, po oddzieleniu przyjmuje w roztworze inną konfigurację (chaotycznego zwoju). Wynika z tego, że łańcuch peptydowy rybonukleazy (124 reszty aminokwasowe) może zwinąć się tylko w jedną, specyficzną formę przestrzenną, katalitycznie czynną. Fakt ten potwierdzono ostatnio za pomocą syntezy chemicznej rybonukleazy A, dokonanej dwoma różnymi drogami (15, 18). Zarówno osobno syntetyzowany peptyd S po połączeniu z pozostałą częścią łańcucha peptydowego rybonukleazy



**Schemat 3.** Hydroliza wiązania glikozydowego przez lizozym (40)

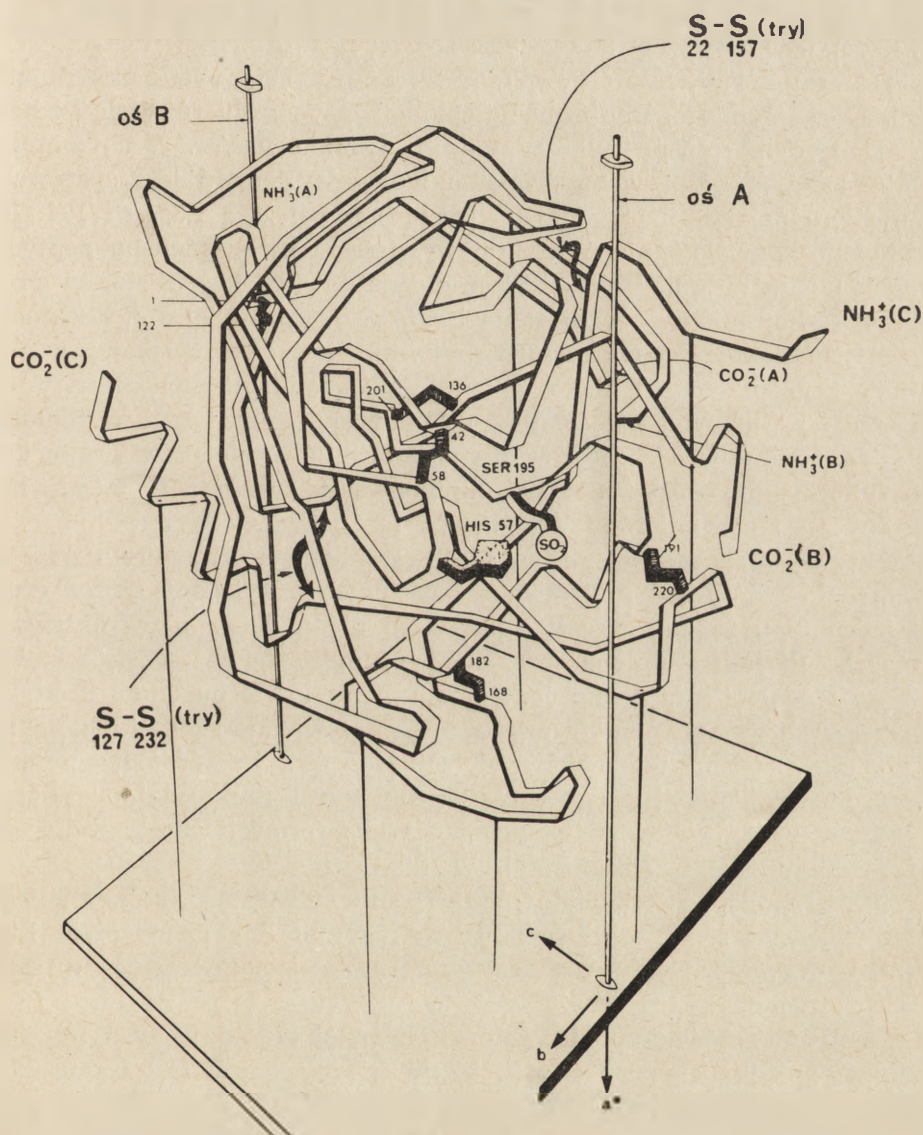
jak i liniowa sekwencja 124 aminokwasów zwinęły się w odpowiednich warunkach dając samorzutnie specyficzną i unikalną konfigurację aktywnego enzymu.

Molekularny mechanizm aktywowania proenzymu określono za pomocą analizy dyfrakcyjnej krystalicznych chymotrypsyn i chymotrypsynogenu. Struktura  $\alpha$ -chymotrypsyny została wyznaczona z rozdzielczością 2Å przez grupę Blow'a (29, 46) a chymotrypsynogen i pozostałe aktywne odmiany chymotrypsyny ( $\pi$ ,  $\sigma$  i  $\gamma$ ) przez Kraut'a i wsp. (25) oraz Matthews'a i wsp. (28) z rozdzielczością 4—5Å.

Aktywacja chymotrypsynogenu jest procesem chemicznym bardzo prostym. Aby zamienić chymotrypsynogen, złożony z 245 reszt aminokwasowych, na aktywną chymotrypsynę wystarczy zhydrolizować trypsyną jedno wiązanie peptydowe położone między Arg 15 a Ileu 16 (35). Chymotrypsyna usuwa następnie z dwóch odcinków łańcucha dwa dwupeptydy,



przez co powstają dalsze odmiany aktywnej chymotrypsyny.  $\alpha$ -Chymotrypsyna składa się po takich przekształceniach z trzech nowopowstałych łańcuchów A, B i C, przy czym zostaje zachowana budowa przestrzenna cząsteczki odpowiadająca chymotrypsynogenowi. Trzy łańcuchy peptydowe pozostają utrwalone w pierwotnych konformacjach przez łączące je mostki dwusiarczkowe.



Schemat 4. Model  $\alpha$ -chymotrypsyny (38)

Diagram strukturalny (schemat 4) przedstawia model  $\alpha$ -chymotrypsyny opracowany przez grupę Blowa.

W modelu tym, w którym taśma plastykowa przedstawia przebieg łańcucha peptydowego, zwraca uwagę zwartość struktury cząsteczki mimo prawie zupełnego braku uporządkowanych obszarów struktury drugorzędowej ( $\alpha$ -spirala,  $\beta$ -sfałdowane warstwy). Spoistą budowę usztywniają mostki dwusiarczkowe między łańcuchami peptydowymi. Ciasne upakowanie łańcuchów peptydowych wynika ze skupienia znacznych ilości grup hydrofobowych we wnętrzu cząsteczki.

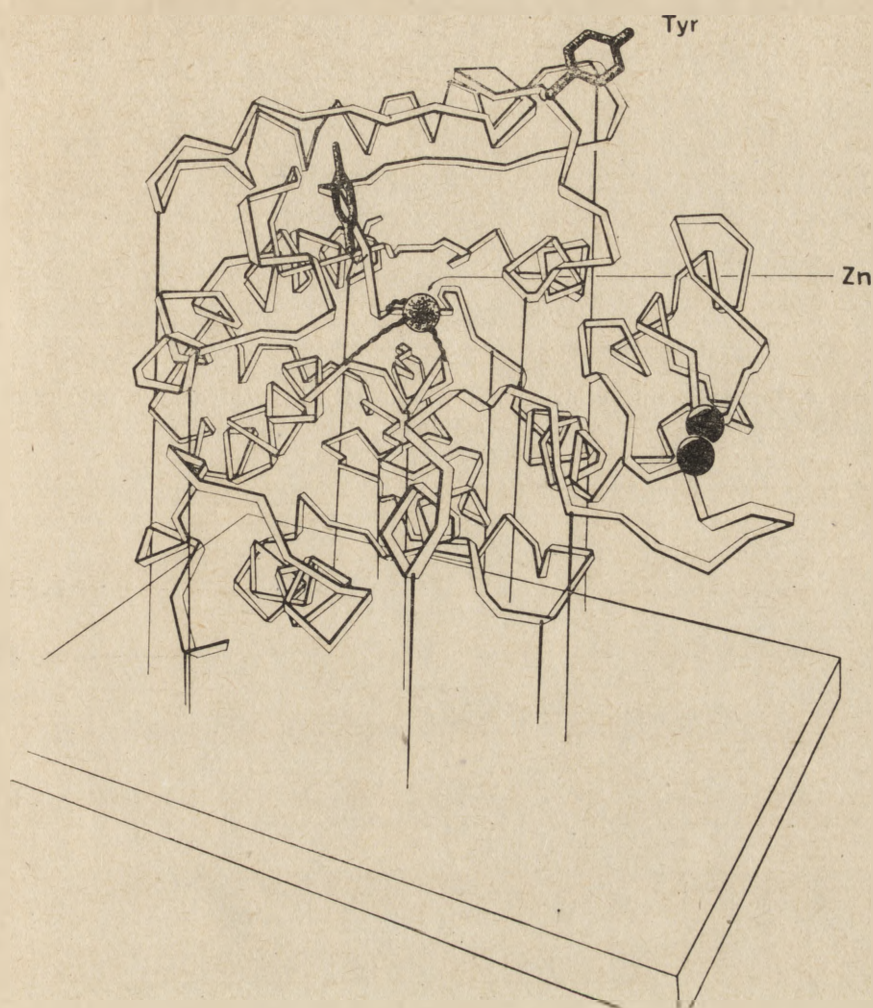
Wszystkie grupy hydrofilowe oprócz jednej są skierowane na zewnątrz do płaszcza wodnego. Konformacja chymotrypsynogenu różni się od konformacji chymotrypsyn tylko w pozycji 2 aminokwasów. W chymotrypsynie dodatkowo naładowana grupa aminowa w Ileu 15 jest sparowana z ujemnie naładowaną grupą karboksylową, należącą do Asp 194. Ich wzajemne oddziaływanie powoduje wywinięcie pętli łańcucha peptydowego i ukształtowanie płytkiej kieszonki na powierzchni cząsteczki enzymu, w której odbywa się wiązanie i rozszczepianie substratu. Kieszonka ta jest wyścielona grupami hydrofobowymi, które tworzą lokalny mikrośrodek o niskiej stałej dielektrycznej. W chymotrypsynogenie Asp 194 nie mogłaby utrzymać się w takim środowisku i musi szukać kontaktu z wodą. Przesunięcie się tej reszty powoduje zakrycie przez grupę karboksylową grupy -OH w Ser 195. Aminokwas ten wraz z His 57 jest niezbędny dla aktywności katalitycznej chymotrypsyn.

Aktywacja chymotrypsynogenu polega zatem na wciągnięciu Asp 194 w głąb kieszonki wskutek elektrostatycznego przyciągania przez grupę aminową Ileu 15, która tkwiąc na końcu uwolnionego przez aktywację łańcucha B, jak zwolniona sprężyna przesunęła się do powstającej kieszonki i odsłoniła aktywne centrum. Zmiany konformacyjne, które towarzyszą aktywacji chymotrypsynogenu, są niewielkie i raczej lokalne i to wyłącznie w strukturze trzeciorzędowej. Mogą one być przykładem aktywacji innych białek, które są prekursorami formy funkcjonalnej, za czym przemawia np. brak większych zmian w konformacji fibrynogenu podczas polimeryzacji na fibrynę (48).

Duże zmiany konformacyjne po związaniu substratu przez krystaliczną karboksypeptydazę ujawniła analiza dyfrakcyjna, wykonana przez Lipscomba i wsp. (26, 41) z rozdzielczością 2Å. Model budowy enzymu przedstawia schemat 5.

Centrum aktywne znajduje się w głębokiej szczelinie, w której kontaktowe grupy chemiczne są przyciągane przez substrat i dociskają go do atomu cynku związanego koordynacyjnie z His 69, Glu 72 i Liz 196 (schemat 6). Łańcuch boczny Tyr 248 wiąże się z grupą iminową peptydu użytego jako substrat (glicylofenyloalaniny). Wysuwająca się na kształt

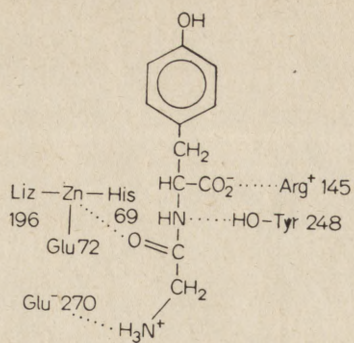




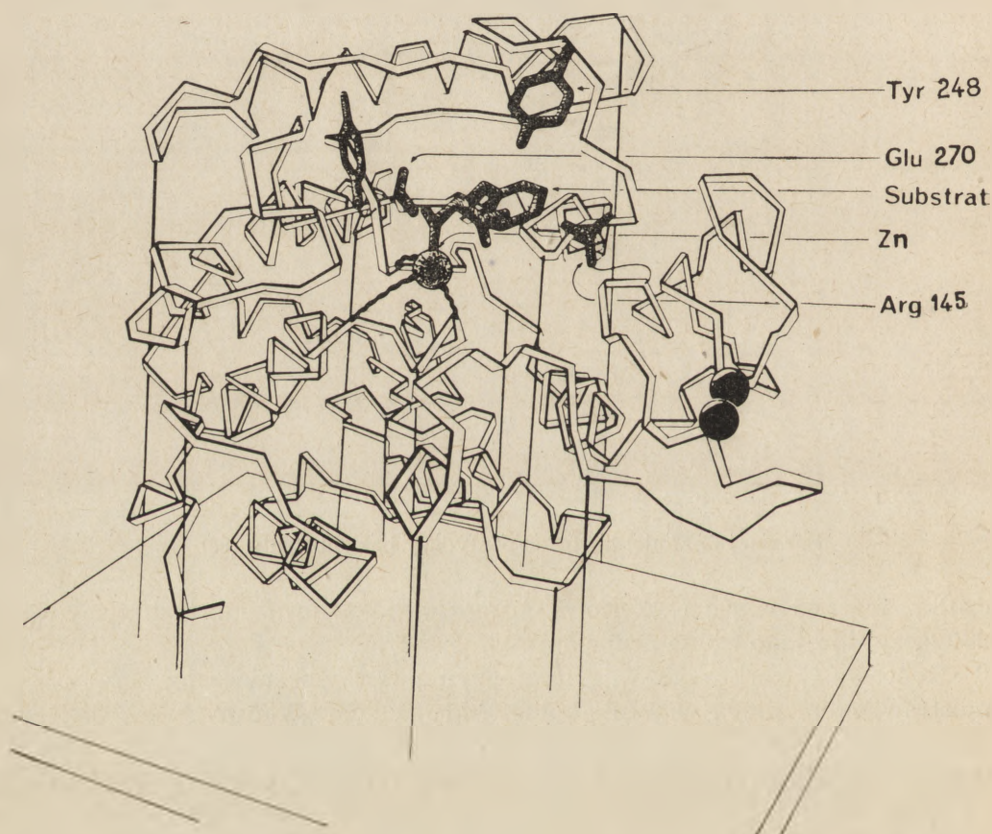
**Schemat 5.** Model karboksypeptydazy bez substratu (38)

czułki Arg 145 wiąże C-końcową grupę karboksylową substratu, a Glu 270 łączy się z jego wolną grupą aminową.

Końcowa C-karboksylowa grupa enzymu jest zabezpieczona przed samostrawieniem przez wiązanie solne z grupą guanidynową Arg 265. Na schemacie 7 pokazano co dzieje się z Tyr 248, gdy substrat znajdzie się w centrum aktywnym. Grupa hydroksylowa tyrozyny przesuwa się o około  $15\text{\AA}$  w kierunku substratu, co z kolei powoduje rotację łańcucha bocznego oraz przesunięcie sąsiadującego odcinka łańcucha peptydowego. Również grupa guanidynowa, należąca do Arg 145, przemieszcza się o  $2\text{\AA}$  podczas wiązania grupy karboksylowej substratu.



**Schemat 6.** Oddziaływanie centrum aktywnego karboksypeptydazy z glicylofenyloalaniną



**Schemat 7.** Model karboksypeptydazy w obecności substratu (38)



Warunki przestrzenne dla związania substratu w centrum katalitycznym są w tym wypadku bardzo dokładnie sprecyzowane. Tyrozyloglicyna użyta jako substrat zamiast glicylotyrozyny nie jest w ogóle hydrolizowana przez karboksypeptydazę a rozkład tego peptydu wymagałby zupełnie odmiennej struktury katalitycznego białka, właściwej chymotrypsynie.

Atom cynku nie wpływa na konformację kieszonki katalitycznej, ale jest niezbędny dla rozbicia wiązania peptydowego substratu. Proponowany przez Lipscomba mechanizm katalizy zakłada w karboksypeptydazie jako centrum katalityczne atom cynku, łańcuch boczny tyrozyny i grupę karboksylową z sąsiadującego z nią kwasu asparaginowego lub glutaminowego. Grupa karboksylowa działa tu jako nukleofil i tworzy przejściowy bezwodnik z grupą karbonylową substratu, która zostaje przez cynk spolaryzowana. Równocześnie cynk powoduje właściwe zorientowanie przestrzenne substratu. Ten warunek topologiczny, który również i w przypadku działania lizozymu tak drastycznie uzależnia aktywność enzymu, wydaje się podstawowym czynnikiem funkcji biologicznej każdego enzymu. Dotyczy to również „honorowego enzymu”, jakim jest mioglobina, w której wiązanie tlenu jest ściśle uzależnione od pozycji osi cząsteczki tlenu w stosunku do hemu.

Badania nad strukturą krystalicznych enzymów dowiodły, że własności katalityczne oraz swoistość substratowa wynika z unikalnej dla danego białka konformacji centrum katalitycznego oraz miejsca wiążącego substrat. Własności katalityczne warunkuje także duża część struktury pierwszorzędowej. Możliwe są natomiast pewne genetyczne modyfikacje struktury pierwszorzędowej, które nie zmieniają konformacji centrum katalitycznego i nie wpływają na ogólną konformację cząsteczki. W miejscach odległych od centrum aktywnego mogą występować fluktuacje konformacyjne, przy czym zachowana jest niezmienniona funkcja katalityczna. Istnienie odmian konformacyjnych tego samego enzymu stwierdzono na podstawie różnic we własnościach optycznych i hydrodynamicznych przy tej samej aktywności katalitycznej i swoistości substratowej, na przykład w przypadku fosfoglukomutazy (10). Znaczenie takich izomerów łańcucha peptydowego, zwanych konformerami, nie jest jeszcze jasne.

Wspólną i charakterystyczną cechą strukturalną dotychczas zbadanych enzymów jest istnienie niepolarnego środowiska wewnątrz cząsteczki. Środowisko o niskiej stałej dielektrycznej ułatwia oddziaływanie między łańcuchami elektrycznymi, które są w nim wielokrotnie silniejsze niż w wodzie. Może to być jeden z czynników współdziałających w obniżeniu energii aktywacji substratu. Środowisko hydrofobowe może również spełniać rolę stereochemicznego mechanizmu chroniącego przed kontaktem z wodą,

jak to ma miejsce w hemoglobinie, której żelazo musiałoby ulec utlenieniu w kontakcie z wodą, gdyby nie chroniło je środowisko hydrofobowe.

Opisane zmiany absolutnej struktury enzymów są następstwem oddziaływania substratu na centrum katalityczne i wpływu tego centrum na konformację substratu. Hipoteza Fischera o stosunku enzymu do substratu typu zamek-klucz została jednoznacznie potwierdzona z tym, że nie chodzi tu o stosunki przestrzenne statyczne lecz dynamiczne. Dopasowanie substratu do enzymu jest indukowane i prowadzi do zniekształcenia względnie elektrycznego spolaryzowania substratu, które ułatwia jego rozszczepienie. Są to strukturalne warunki aktu katalizy, które są niezbędnym elementem w zrozumieniu jego mechanizmu.

Istnieją i innego rodzaju zmiany konformacyjne w enzymie niż wzbudzone dopasowanie substratu i enzymu. Ogromna większość enzymów jest obdarzona własnościami regulatorowymi, to jest zdolnością zmieniania aktywności katalitycznej przy udziale ligandów. Do ligandów zaliczamy małe cząsteczki lub jony, które łącząc się z białkiem wiązaniem niekowalencyjnym wpływają na jego aktywność. Należą tu substraty, aktywatory i inhibitory enzymów. Nazwę efektora lub modyfikatora dajemy małym cząsteczkom (ligandom), które wpływają na aktywność enzymatyczną, ale same nie ulegają przy tym zmianom. Własności regulatorowe uzależnione od efektorów lub modyfikatorów występują w cząsteczkach białkowych złożonych z podjednostek i są związane z wewnątrzcząsteczkowymi transformacjami konformacyjnymi.

Obserwacje nad wpływem drobnych cząsteczek nie będących substratami na aktywność enzymów zapoczątkowane zostały 10 lat temu. W roku 1955 Morawiecki (33) zauważył, że kinaza pirogronianowa jest hamowana przez produkt reakcji przez nią katalizowanej, tj. przez ATP. Jest to jedna z pierwszych obserwacji funkcji regulatorowej. Zdolność hamowania aktywności enzymu przez końcowe produkty ciągów metabolicznych wykryli w roku 1962 Gerhart i Pardee (13) na przykładzie transkarbamyazy asparaginianowej. Udowodnili oni, że enzym ma odrębne miejsce dla wiązania substratów, asparagianu i karbamylofosforanu, oraz odrębne miejsce regulatorowe, w którym wiąże się inhibitor reakcji, CTP. Takie topologicznie różne od centrum katalitycznego miejsce enzymu, które samo przez się nie ma własności katalitycznych, ale które wpływa na funkcję centrum katalitycznego, nazwano miejscem allosterycznym, a tego typu oddziaływanie efektem allosterycznym.

Monod, Changeux i Jacob (31) nazwali wszystkie ligandy działające na enzym w miejscu innym niż miejsce wiązania substratu efektorami allosterycznymi, a zmiany konformacji z tym związane zjawiskiem allosterycznym. Koshland i Neet (24) wprowadzili termin: efekt allosteryczny. Substraty mogą być allosterycznymi efektorami w en-



zymach złożonych z podjednostek (polimerycznych), jeżeli wiązanie pierwszej cząsteczki substratu zmienia reaktywność pozostałych podjednostek w tworzeniu kompleksu enzym-substrat.

Monod, Wyman i Changeux (32) opracowali model allosterycznej tranzycji, znany pod nazwą modelu M.W.C., który przyjęli jako podstawę teorii zjawisk allosterycznych w enzymach polimerycznych. Jest to ogólna teoria wiążąca zmiany konformacyjne, wynikające z oddziaływań między podjednostkami enzymów polimerycznych, z aktywnością enzymów, ujmowaną parametrami kinetycznymi. Model ten, chociaż nie jedyny z opisanych, jest często przyjmowany jako podstawa dla interpretacji danych kinetycznych białek regulatorowych.

Zdolność regulowania funkcji katalitycznej białek przez wiązanie ligandów (efektorów, modyfikatorów) w miejscach allosterycznych jest własnością wielu enzymów, ogólnie klasyfikowanych jako enzymy allosteryczne. Mechanizmy regulacyjne rozwinęły się w procesie ewolucji biochemicznej pod wpływem zmieniających się warunków środowiska. Możliwość strukturalnego dostosowania się organizmu do wykonywania funkcji metabolicznych korzystnych dla przeżywania gatunku zadecydowała o tym kierunku ewolucji struktury enzymów.

W enzymach allosterycznych aktywność katalityczna i jej regulowanie są związane z mniej lub więcej wybitnymi zmianami w strukturze czwartorzędowej. Podstawową zmianą jest asocjacja i dysocjacja protomerów, czyli strukturalnych podjednostek cząsteczki, która powoduje włączanie się i wyłączanie aktywności katalitycznej. Do tego dołączają się zmiany spowodowane regulacją allosteryczną, która wpływa na konformację zarówno czynnej jak i nieczynnej formy enzymów.

W enzymach allosterycznych funkcje katalityczne i swoistość substratowa zależą od kooperacji między częściami różnych łańcuchów peptydowych. Model M.W.C. posłużył właśnie do obliczenia kinetyki takiej kooperacji między podjednostkami hemoglobiny, którą skonfrontowano z doświadczalnie oznaczoną kinetyką wiązania tlenu. Model M.W.C. zakłada silne pozytywne oddziaływanie między sąsiadującymi podjednostkami, które po związaniu ligandów ulegają zmianom konformacyjnym, przebiegającym w sposób zgrany. Efektor homotropowy wpływa na wiązanie tego samego ligandu, albo na aktywność enzymu w innym miejscu, efektor heterotropowy wpływa na miejsca wiążące inny ligand. Efekt kooperatywności wyraża się zwiększeniem szybkości wiązania i reakcji w miejscu odrębnym od miejsca wiązania efektora, podczas gdy ich zmniejszenie oznacza negatywne oddziaływanie. Model M.W.C. oparty jest o zasadę symetrii. W enzymie polimerycznym wszystkie monomery znajdują się albo w stanie R (z mniejszą stałą dysocjacji  $K_R$ ) albo w stanie T (z dużą stałą  $K_T$ ). Oznacza to, że  $\text{tranzycja } n \text{ monomer} \rightarrow \text{oligomer}_n$  jest zupeł-

na i nie występują formy mieszane stanów konformacyjnych. Znanym efektem kinetycznym takiego założenia jest esowata krzywa tworzenia kompleksu enzym-substrat przy nasycaniu ligandem.

Bardziej ogólnie ujmuje zjawiska allosteryczne model Koshlanda, Nemethy i Filmera (23), który dopuszcza szerszy zakres oddziaływań między podjednostkami (monomerami), od silnie pozytywnych, czyli przyciągających, do silnie negatywnych, czyli odpychających. To ostatnie oznacza, że jedna z podjednostek może ulec zmianie konformacji bez wpływu na sąsiednią, podczas gdy pozytywna kooperacja oznacza, że dołączenie ligandu do pierwszej podjednostki ułatwia przyłączenie go przez następne.

Przykłady obu typów oddziaływania wynikających z wiązania ligandów z teoretycznymi modelami są znane. Pozytywna kooperatywność występuje między łańcuchami  $\alpha$  i  $\beta$  hemoglobiny, co wyraża się wystąpieniem takich własności, których nie wykazuje pojedynczy łańcuch  $\alpha$  lub  $\beta$  (36) ani analogicznie zbudowana mioglobina (esowata krzywa nasycenia tlenem, efekt Bohra, własności hydrodynamiczne, własności immunologiczne). Pojedyncze łańcuchy nie wykazują efektu Bohra, mają większe powinowactwo do ligandów niż hemoglobina, reagują szybciej z ligandami, ale oddysocjują je z szybkością podobną do hemoglobiny i nie wykazują oddziaływań między grupami hemowymi. Konformacje hemoglobiny przed i po związaniu ligandu (oksyhemoglobina) są uderzająco różne i przesunięcia między podjednostkami sięgają kilkunastu Å. Wyrazem różnic konformacyjnych są różne formy krystaliczne, które mogą współistnieć tylko przy jedynej wartości parcjalego ciśnienia tlenu.

Przykładem negatywnej kooperatywności jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego z mięśni króliczych, złożona z 4 podjednostek. Podczas dołączania koenzymu (NAD) pierwsza z 4 wiążących się cząsteczek NAD dołącza się szybciej niż następne. Zjawisko kooperatywności pozytywnej lub negatywnej w enzymach allosterycznych może mieć istotne znaczenie w regulacji metabolizmu. Pozytywna kooperacja uczula niektóre enzymy biorące udział w przemianach na zmieniające się warunki otoczenia, negatywna zaś czyni je mniej wrażliwymi.

Oddziaływania między protomerami, które są następstwem wiązania ligandów w miejscach allosterycznych, powodują zmiany w strukturze czwartorzędowej, dające się wykryć metodami hydrodynamicznymi, widmowymi i elektronooptycznymi. Aby te zmiany dały się interpretować parametrami strukturalnymi niezbędna jest znajomość absolutnej struktury cząsteczek w różnych stanach allosterycznych. W ich braku trzeba posługiwać się kinetyczną analizą oddziaływań między podjednostkami. Stąd zrodziło się zastosowanie techniki pomiarów czasu relaksacji po skoku temperaturowym, który zmienia stan równowagi układu protomerów



w oligomerze. Pomocne są również teoretyczne opracowania modeli takich układów i porównywanie funkcji stanu dla nich wyznaczonych z doświadczalnymi funkcjami zależności aktywności enzymu o danej konformacji i w określonych warunkach środowiska.

Efekt allosteryczny i własności kooperatywne występują we wszystkich białkach oligomerycznych (złożonych z podjednostek). Zmiana konformacji (tranzycja) indukuje się w miejscu allosterycznym pod wpływem związania modyfikatora (ligandu) i zachodzi zgodnie z mechanizmem wzbudzonego dopasowania Koshlanda. Modyfikator przyłącza się w miejscu allosterycznym albo obok miejsca aktywnego. Zmiana wywołana w miejscu allosterycznym udziela się miejscu katalitycznemu, które może znajdować się w tej samej lub w odrębnej podjednostce. Przykładem tej drugiej możliwości jest transkarbamylaza asparaginianowa, którą można zdysocjować na łańcuchy peptydowe dwojakiego typu. Jeden z nich zawiera miejsce katalityczne, drugi miejsce wiążące allosteryczny inhibitor (CTP), ale pozbawione własności katalitycznych. Część cząsteczki enzymu składa się (52) z 6 par łańcuchów peptydowych, każda para zawiera jeden łańcuch — regulacyjny R i jeden katalityczny — C, z dwoma miejscami wiązania substratów (asparaginianu i karbamylfosforanu).

Oddziaływania między podjednostkami mogą wpływać również na swoistość substratów. Przykładem jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego z mięśni królika (17), która w pH 7 tworzy odwracalnie układ równowagowy dimer-tetramer. Enzym wykazuje kilka swoistości katalitycznych: dehydrogenazową, transferazową i esterazową. Tylko tetrameryczna forma enzymu jest aktywna jako dehydrogenaza, natomiast aktywność esterazową wykazują zarówno dimeryczna jak tetrameryczna forma enzymu. NAD łącznie z fosforanem przesuwą równowagę układu w kierunku tetrameru, ale żaden z tych ligandów z osobna nie działa.

Wyjaśnienie związku między konformacją a funkcją białek oligomerycznych stanowi znacznie trudniejszy problem niż w przypadku enzymów, których funkcja jest zawarta w pojedynczym łańcuchu peptydowym. Na razie otrzymuje się informacje o zmianach struktury czwartorzędowej białek regulatorowych w akcji na drodze pośredniej, głównie przez pomiary kinetyki wiązania ligandów i tranzycji między różnymi stanami allosterycznymi. Wachlarz wielkości zmian konformacyjnych jest bardzo szeroki. Czasem cząsteczki enzymu w akcji tak znacznie zmieniają konformację, że można to zauważyć, a nawet zmierzyć w mikroskopie elektronowym zmiany wymiarów cząsteczki pod wpływem wiązania modyfikatora. Przykładem jest syntetaza cytrynianowa z gramujemnych bakterii (42). Enzym należy do białek allosterycznych i jest silnie hamowany przez zred. NAD — produkt cyklu kwasu cytrynowego. Część cząsteczki

enzymu składa się z 3 podjednostek i ma wymiary  $107 \times 107 \times 52$  Å. Po dołączeniu w miejscu allosterycznym zredukowanego NAD wymiary cząsteczki wynoszą  $96 \times 137 \times 62$  Å. Jeżeli odczuła się miejsce allosteryczne (np. p-chlorortęciobenzoesanem) albo podziała modyfikatorem (AMP) cząsteczka przyjmuje pierwotne wymiary.

Przykładem złożoności zmian konformacyjnych jest syntetaza glutaminianowa z *E. coli* (45, 51). Enzym ten jest wrażliwy na allosteryczne hamowania przez co najmniej 8 różnych metabolitów, znajdujących się na torach przemiany glutaminy. Cząsteczka enzymu składa się z 12 podjednostek, o masie 50 000 każda, ułożonych w dwie heksagonalne warstwy na siebie nałożone. Forma rodzima, która jest katalitycznie czynna, ma budowę bardziej spójną (sztywną), jest kulista i zawiera  $Mn^{2+}$ . Usunięcie tego jonu znosi aktywność enzymu co jest połączone z utworzeniem bardziej rozluźnionej formy i bardziej asymetrycznej cząsteczki. Forma rozluźniona, nieaktywna, reaguje z odczynnikami na wolne grupy -SH i rozpada się pod wpływem łagodnych czynników denaturujących.

Widma różnicowe wykazują, że podczas inaktywacji enzymu 12—24 reszt tyrozyny i tryptofanu przechodzi z ośrodka niepolarnego do bardziej polarnego. Dodanie jonu metalu dwuwartościowego odwraca bieg zmian i reaktywuje formę rozluźnioną na sztywną. Nie tłumaczy się to w tym wypadku oddziaływaniem między podjednostkami, ale niezależnym wiązaniem jonów przez 12 niezależnych protomerów.

Każdy z protomerów ma odrębne miejsce wiązania dla każdego z 8 metabolicznych inhibitorów. Skomplikowaną regulację aktywności syntetazy glutaminianowej zwiększa mechanizm dodatkowy, polegający na dołączeniu reszty adenylilowej (AMP) do każdego protomeru przez wiązanie kowalencyjne z grupą -OH tyrozyny (16). Dołączanie AMP katalizuje odrębny układ enzymatyczny, również podlegający regulacji przez metaboliczne efekторы. Zmiany konformacyjne są regulowane przez ilość (0—12) reszt AMP dołączonych do białka (11).

Olbrzymi materiał doświadczalny, opublikowany w ostatnich latach, dowodzi istnienia wybitnych zmian konformacji enzymów po związaniu ligandów, oraz pod wpływem modyfikatorów. Nawet związanie lekkich jonów jak  $K^+$  lub  $Na^+$  przez kinazę pirogronianową, wywołuje wyraźne zmiany konformacyjne (49). Enzym ma odrębne miejsce wiązania obu rodzajów jonów, natomiast nie reaguje zmianami aktywności pod wpływem jonu  $NH_4^+$ .

Jak to zobrazowały powyższe przykłady, molekularny mechanizm a ściślej wewnątrz-molekularny mechanizm funkcji białek regulatorowych jest bardzo złożony i bez wątpienia jego poznanie będzie wymagało zbadania absolutnej konformacji poszczególnych form enzymów allosterycznych, możliwego jedynie na drodze analizy dyfrakcyjnej. Dlatego charak-



terystycznym kierunkiem współczesnych badań jest otrzymywanie krystalicznych enzymów, związanych z ligandami i bez nich, nadających się do badań krystalograficznych. Takim okazał się np. sporządzony przez nas (2) holoenzym dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego z mięśnia ludzkiego, na którym oznaczono parametry struktury czwartorzędowej (14). Niezbędne okazało się jednak porównanie struktury holo- i apoenzymu. Udało się otrzymać krystaliczny apoenzym (3) o identycznej formie krystalicznej, który zostanie wkrótce poddany analizie dyfrakcyjnej. Można na podstawie tego oczekiwać, że wdyfundowanie NAD do kryształu nie spowoduje jego rozsądzenia, jak to się nieraz obserwuje w przypadku dużych zmian w konformacji krystalicznego białka po wdyfundowaniu ligandów.

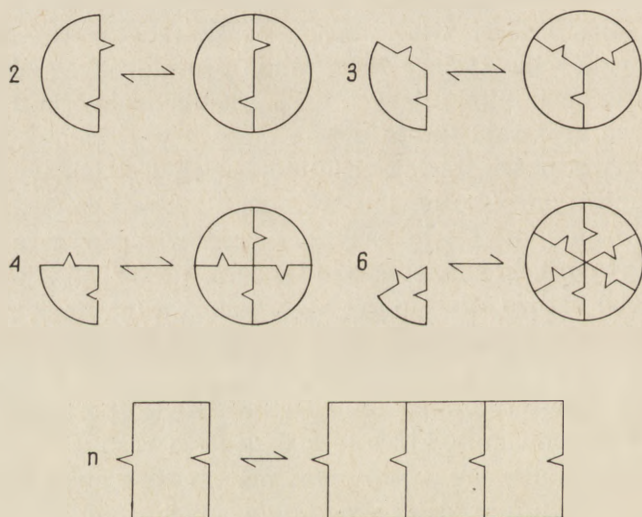
Pomiary aktywności enzymatycznej, wykonane na kryształach enzymów, wykazały, że zmiany konformacyjne są niezbędne dla aktywności katalitycznej. Jeżeli enzym zostaje skryształizowany, to w dużym stopniu utrwała się pewna, określona konformacja cząsteczki. Ponieważ utrwale nie struktury w sieci krystalicznej uniemożliwia lub utrudnia fluktuacje konformacyjne, należy oczekiwać obniżenia  $V_{\max}$  w porównaniu z enzymem w roztworze. Jak to wykazano na licznych przykładach szybkość maksymalna reakcji rzeczywiście spada po skryształizowaniu enzymu od kilkudziesięciu do kilku tysięcy razy, mimo prowadzenia reakcji enzymatycznej w warunkach eliminujących ograniczenie szybkości dyfuzji ligandów do wnętrza kryształu (przez użycie małych kryształów).

Uderzającą własnością białek regulatorowych jest ich wysoka wrażliwość na czynniki zewnętrzne, jak stężenie i rodzaj jonów, zmiany pH, temperaturę, różne modyfikatory. Wpływ środowiska wyraża się zmianami konformacyjnymi, co z kolei odbija się zarówno na  $V_{\max}$  jak i  $K_m$ . Stąd wynika potrzeba bardzo ścisłego precyzowania warunków pomiarów kinetycznych w badaniach nad enzymami, jeżeli wyniki mają być porównywalne i właściwie interpretowane. Ustalenie jednoznacznych pojęć w zakresie regulacji allosterycznych jest również bardzo pożądane.

Allosteryczne konwersje, które leżą u podłoża różnych funkcji cząsteczek białkowych, są obecnie często przedmiotem opracowań teoretycznych na modelach, mniej lub bardziej skomplikowanych. Chodzi o wyznaczenie dla określonych typów układów monomer-polimer kinetyki konwersji allosterycznej, czasów relaksacji i funkcji wysycenia ligandami. Wspomniany poprzednio model M.W.C. stanowi układ najprostszy, złożony z jednakowych podjednostek, w którym mamy identyczne zmiany spowodowane przez ligandy we wszystkich monomerach. Ten, oparty o zasadę symetrii model może być rozciągnięty w dwuwymiarową matrycę (błone), jak zaproponowali Changeux, Thiery, Tung i Knittel (7). Zaczęto również opracowywać funkcje dla czasu relaksacji i wysycania ligandami

dla modelu polimeryzującego różniącego się od modelu M.W.C. tym, że mamy w nim przejście nie od stanu  $T_0$  (czynnego) do  $R_0$  (nieczynnego), ale ze stanu  $T_0$  do  $nR$ , gdzie  $n$  oznacza stopień spolimeryzowania protomerów modelu allosterycznego (9). Podjednostki w tym modelu (protomery) mają wysokie i swoiste powinowactwo wzajemne. Wyraża się to obecnością powierzchni kontaktowych, poprzez które dochodzi do polimeryzacji, na przykład na zasadzie stosunku przestrzennego zamek-klucz, to jest lokalnych komplementarności konformacji. Taka komplementarność może być pomyślana na zasadzie kontaktu grup hydrofobowych i to w jednym lub więcej miejscach asocjacji protomerów. Obowiązują wtedy pewne prawa geometryczne. Schemat 8 pokazuje, że stopień spolimeryzowania jest wyznaczony przez kąt między osią klucza i zamku w przypadku tylko dwóch miejsc wiążących. Gdy kąt jest  $0^\circ$  tworzą się tylko dimery, gdy  $90^\circ$  — tetramery. Kąt  $120^\circ$  dopuszcza powstawanie trimerów a  $60^\circ$  heksamerów. Przy kącie  $180^\circ$  powstaje liniowy układ o nieograniczonej długości (błona). Przykład ten ilustruje jak czwartorzędowa budowa oligomeru zależy od orientacji przestrzennej określonych grup wiążących.

Aby uzyskać efekty stereospecyficzne, miejsca polimeryzujące muszą



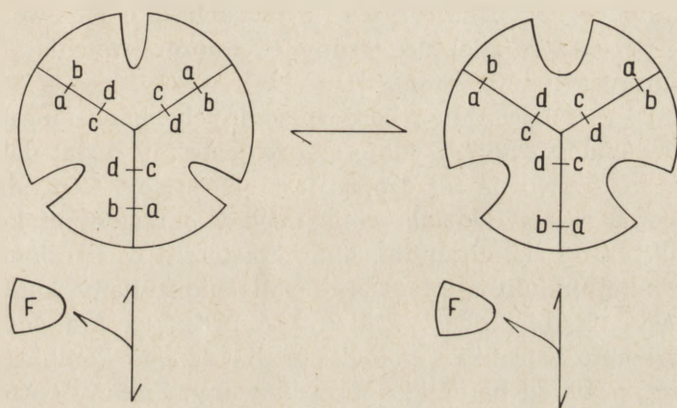
**Schemat 8.** Zależność budowy czwartorzędowej oligomeru od orientacji przestrzennej grup wiążących (9)

zawierać co najmniej 3 wiązania. Wiązania te mogą być heterologiczne i izologiczne. Heterologiczne wiązanie może składać się z dawcy protonu i z różnego biorcy, np. ładunku ujemnego lub niesparowanego elektronu. Izologiczne wiązanie składa się z podobnych grup, które asocjują jak np. reszty hydrofobowe aminokwasów. Aby para komplementarna działała na

zasadzie klucza i zamku, jej miejsce polimeryzacji musi zawierać przynajmniej jedno wiązanie heterologiczne.

Z charakteru grup wiążących wynika, że ulegają one wpływowi różnych czynników, jak mocznika zrywającego wiązania wodorowe, wysokiej siły jonowej rozdzielającej ładunki przeciwnego znaku, lipidów rozluźniających wiązania wodorowe, zmian  $pH$ , które wytwarzają ładunki. Równowaga monomer-oligomer może być zatem zależną od lokalnego występowania tych czynników.

Model M.W.C. zakłada zrywanie i ponowne tworzenie się wiązań niezbędnych dla allosterycznej tranzycji. Model polimeryzujący Czerlińskiego (9) nie wymaga tak silnych oddziaływań wzajemnych. Wystarczy zmiana geometrii miejsca polimeryzującego aby wywołać konwersję allosteryczną. Schematycznie taką tranzycję obrazuje schemat 9, na którym  $a$  i  $c$  oznacza klucz, zaś  $b$  i  $d$  — zamek.



**Schemat 9.** Geometria konwersji allosterycznej (9). F = ligand

Zwiększenie odstępów między  $a$  i  $c$  lub między  $b$  i  $d$  jest skojarzone z wytwarzaniem miejsca dla ligandu F. Zmiana tego odstępów inicjuje zmiany we wszystkich protomerach, z których składa się oligomer. Jeżeli istnieją tylko dwie trwałe struktury protomerów, zmiana w jednym musi spowodować zmiany w pozostałych poprzez sprzężenie w miejscu polimeryzacji. Założenie tego modelu, że w układzie równowagowym mogą być obecne tylko monomery i  $n$  polimer, bez stopni pośrednich polimeryzacji, jest spełnione przy określonej charakterystyce kątowej powierzchni polimeryzacji.

Rozważania modelowe uzupełniają badania strukturalne, w których dąży się do ustalenia liczby i wymiarów kontaktów między resztami aminokwasowymi. Jest to konieczne dla wyboru między teoretycznie możli-



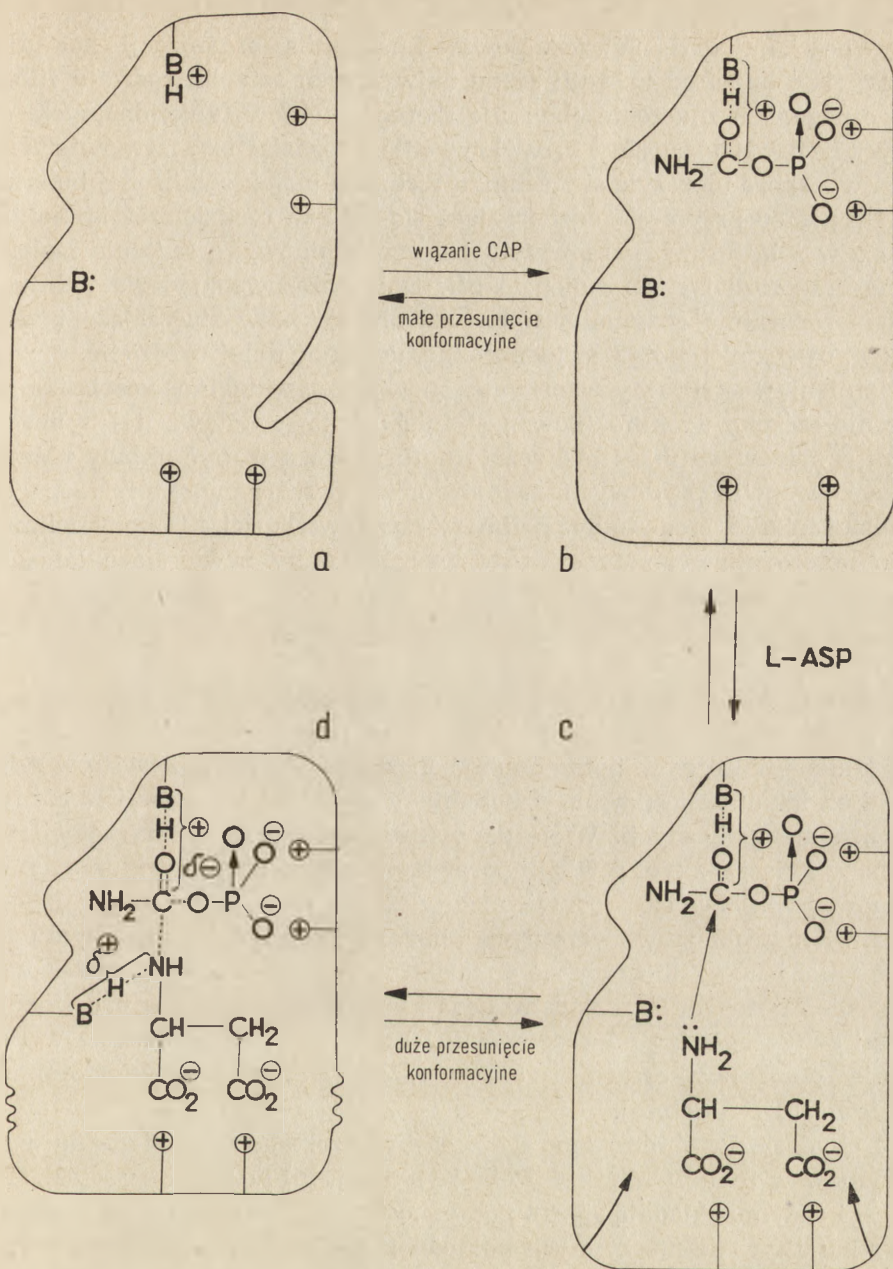
wymi mechanizmami allosterycznej konwersji w białkach regulatorowych.

Aby przykładem objaśnić istotę zagadnienia zwróćmy się do oddziaływań typu van der Waalsa (w promieniu  $4\text{\AA}$ ) hemu w hemoglobinie z kontaktowymi resztami aminokwasowymi (38). Takich kontaktów w łańcuchu  $\alpha$  i  $\beta$  jest 60 i wszystkie one nie podlegają gatunkowym zmianom, co wskazuje na ich niezbędność funkcjonalną. Powierzchnie oddziaływania między sąsiadującymi  $\alpha$  i  $\beta$  podjednostkami utworzone są z 80 atomów kontaktowych w przypadku pierwszego i 110 atomów w przypadku drugiego łańcucha. Większość kontaktów jest typu niepolarnego, a tylko kilka typu wiązania wodorowego. Chociaż mechanizm efektów kooperatywnych w hemoglobinie nie jest jeszcze zupełnie jasny, struktura kontaktów między podjednostkami i własności nieprawidłowych hemoglobin wskazują, że funkcjonalną jednostką w allosterycznej konwersji jest tetramer, a nie, jak początkowo sądzono,  $\alpha$ - $\beta$  dimer (39). Dołączenie ligandu ( $O_2$ ) do hemu powoduje obrót łańcucha  $\alpha$  o  $9,4^\circ$ , a łańcucha  $\beta$  o  $7,4^\circ$  wokół niezależnych osi, przy czym niektóre grupy chemiczne zmieniają wzajemne położenie w granicach do  $14\text{\AA}$  (34).

Jak rodzaj i rozmiary zmian konformacyjnych białek mogą tłumaczyć istotę katalizy biologicznej? Wydaje się, że jesteśmy nadal dalecy od jej wyjaśnienia, ale postęp na tej drodze jest obiecujący. Centralną pozycję tego zagadnienia zajęły oddziaływania między określonymi komplementarnymi strukturami chemicznymi. Małe cząsteczki o określonej strukturze przestrzennej indukują przez swe zbliżenie zmiany konformacyjne w wielkocząsteczkach białkowych. Zmiany te przez zgrane oddziaływanie stwarzają unikalne warunki topologiczne dla danego kompleksu enzym-substrat, tworząc układ bardziej uporządkowany. Zmiany entropii i swobodnej energii, związane z lokalnymi zmianami konformacyjnymi, nabierają istotnego znaczenia. Wyrazem tego jest pojawienie się poglądu, że enzymy przedstawiają pewien rodzaj energetycznych transformatorów. W jaki sposób mogą one dostarczać lokalnie energii dla obniżenia energii aktywacji substratu pozostaje do zbadania.

Mechanizm, w którym enzym, jak proponują autorzy, zamienia część energii elektrostatycznego wiązania substratu (kwasu asparaginowego) w energię mechanicznego aktu zbliżenia do siebie obu substratów reakcji, przedstawiają na przykładzie transkarbamylazy asparaginianowej Collins i Stark (8). Obrazuje go graficznie schemat 10.

Zagadnienie fluktuacji struktury cząsteczki białkowej jest częścią szerszego problemu heterogenności budowy enzymów. Ważne miejsce we współczesnych badaniach enzymologicznych zajmuje rola molekularnych odmian enzymów zwanych ogólnie izoenzymami. Istnienie takich form, różniących się strukturą czwartorzędową, ale objawiających ten sam typ



**Schemat 10.** Model mechanizmu katalizy w podjednostce katalitycznej transkarbamylazy asparaginianowej (8)

a — enzym z niedostępnym miejscem dla substratu (L-asparaginianu); b — związanie karbamylfosforanu (CAP) z równoczesną aktywacją grupy karbonylowej i niezakończonym wiązaniem L-asparaginianu; c — niestabilny (wysokoenergetyczny) kompleks enzym-karbamylfosforan-asparaginian; d — stan przejściowy



aktywności katalitycznej, jest powszechną cechą organizacji komórkowych, zaczynając od bakterii aż do najwyższych szczebli rozwoju filogenetycznego. Ich znaczenie obejmuje szereg aspektów funkcjonalnych, genetycznych i strukturalnych. Wykrywanie i rozdział izoenzymów stał się możliwy, skoro ulepszyła się technika rozdziału białek o zbliżonej budowie. Wielki postęp przyniosła odznaczająca się wysoką rozdzielczością elektroforeza w żelach, zwłaszcza w żelu poliakrylamidowym, sączenie molekularne oraz rozdział w gradiencie  $pH$ . Dotychczasowe kryteria jednorodności preparatów enzymatycznych okazały się niewystarczające i wiele białek, uważanych dotąd za jednorodne, udało się dalej rozdzielić.

Istnienie wielokrotnych form enzymów u indywidualnego osobnika jest obecnie szeroko udokumentowane. Molekularna podstawa tej mnogości form enzymowych może być różnej natury. Mogą to być układy różnych łańcuchów polipeptydowych, zakodowanych przez geny, które mogą być allelami lub nie. Mogą to być polimery różnej wielkości, i to homopolimery albo heteropolimery. Mogą występować odmiany zawierające łańcuchy wtórnie zmodyfikowane oraz białka o różnych konformacjach, wynikających z permutacji podjednostek, albo wykazujące zmienność struktur trzecio- i czwartorzędowej.

Izoenzymowe formy enzymów, mimo że katalizują tę samą reakcję, różnią się własnościami katalitycznymi, co prawdopodobnie dostosowuje ich funkcję do różnych potrzeb metabolicznych organizmu, czy to w zależności od lokalizacji enzymu w komórce, czy też od lokalizacji w różnych ciągach metabolicznych. Wiele danych kinetycznych w enzymologii wymaga w związku z tym rewizji i porównania własności indywidualnych enzymów, jeżeli chce się zrozumieć ich właściwą funkcję.

Z wielu problemów związanych z budową izoenzymów chciałbym poruszyć tylko jeden, odnoszący się do struktury czwartorzędowej białek katalitycznie czynnych. Przykładami będą klasyczne już badania nad izoenzymami dehydrogenazy mleczanowej (LD) oraz ostatnie osiągnięcia w dziedzinie podjednostkowych struktur aldolazy fruktozodwufosforanowej z mięśni (FDP-aldolaza).

Dehydrogenaza mleczanowa osocza krwi została rozdzielona na 5 izoenzymów w roku 1957 przez Wielanda i Pfleiderera (53). Częsteczki enzymu składają się z 4 podjednostek (27). Izoenzymy są zbudowane z katalitycznie nieczynnych podjednostek dwojakiego rodzaju: typu H (sercowego) i typu M (mięśniowego), które tworzą 5 układów tetramerycznych:  $H_4$ ,  $H_3M$ ,  $H_2M_2$ ,  $HM_3$  i  $M_4$ . Jest to przykład molekularnej hybrydyzacji z 3 formami hybrydowymi obok dwóch form homomerycznych. W wielu pracach opisano występowanie układów izoenzymów LD w różnych tkankach i różnych gatunkach zwierząt, stosunki ilościowe, w jakich występują i przypuszczalną funkcję (piśmiennictwo patrz (27)).



Opisany na przykładzie LD mechanizm łączenia podjednostek okazał się ogólną prawidłowością w budowie izoenzymów, które powstają przez ich dysocjacje i rekombinacje. Niezależnie od tego, w układach złożonych z podjednostek istnieje zawsze możliwość funkcji regulatorowej przez ich wzajemne oddziaływanie. Wykazano to dla dehydrogenazy mleczanowej, która jest kontrolowana przez metabolity cyklu kwasu cytrynowego (12) oraz metabolit ciągu glikolitycznego, fruktozo-1,6-dwufosforan (54).

Teoria budowy izoenzymów drogą asocjacji homo- i heteromerów nie tłumaczy ostatnio poznanych faktów występowania więcej niż 5 odmian LD różniących się ruchliwością elektroforetyczną. Dalsze różnice to obecność 7—8 N-końcowych aminokwasów oraz różny przebieg trawienia trypsyną. Ostatnie badania (30) wyjaśniły, że rzeczywistą strukturalną podjednostką rekombinacyjną nie jest podjednostka H lub M o masie 35 000 lecz podjednostka o masie dwukrotnie mniejszej. Podjednostka H lub M może odwracalnie zdysocjować w chlorowodorku guanidyny w *pH* 2, natomiast w *pH* 7 dysocjacja jest niekompletna. Rzeczywistym monomerem w układzie izoenzymów LD jest więc pojedynczy łańcuch peptydowy, których mamy po dwa w każdym monomerze LD.

Te dane mają istotne znaczenie dla powstawania i kształtowania się profilów dystrybucyjnych izoenzymów LD a także innych enzymów. Zakładając istnienie 2 nieidentycznych łańcuchów peptydowych w każdym protomerze H i M, otrzymuje się dla modelu, złożonego z mono-, di-, tetra-, i oktamerów, a więc zupełnie symetrycznego, 165 możliwych kombinacji. Należy jednak oczekiwać, że oddziaływanie między monomerami może podlegać pewnym ograniczeniom wynikającym z utrudnionych kontaktów między pewnymi konformacjami. Umiarkowane stopnie restrypcji kombinacyjnych prowadzą do wykrywania 45, 15, a w skrajnym wypadku do 5 odmian, identyfikowanych jako prążki elektroforetyczne. Podobne wielokrotności w występowaniu izoenzymów były obserwowane. Fakt, że w warunkach fizjologicznych występuje ograniczona liczba odmian przemawia za tym, że mechanizm asocjacji monomerów jest wysoko swoisty, a kombinacje niedozwolone pojawiają się jedynie w warunkach silnej denaturacji. Odmiana pozornie jednoskładnikowa  $H_4$  nie jest strukturalnie jednorodna, o czym świadczy obserwacja, że z 8 łańcuchów peptydowych w niej zawartych, 4 są mniej podatne na trawienie karboksypetydazą.

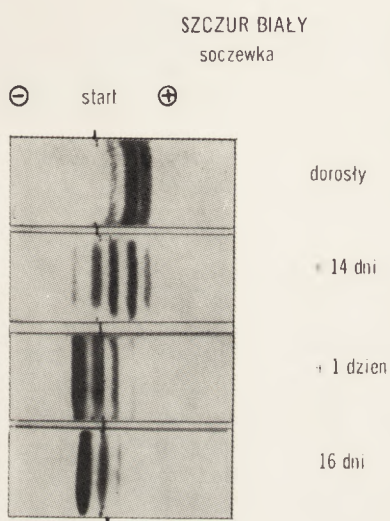
Podobna heterogenność populacji izoenzymowej występuje w aldolazach FDP różnych tkanek i na różnym poziomie rozwoju filogenetycznego zwierząt. Aldolaza klasy I, którą cechuje niezbędność lizyny w miejscu katalitycznym, a zbędność metalu jako aktywatora, występuje w trzech macierzystych odmianach strukturalnych układu tetramerycznego (43). Odmiana A jest głównym enzymem mięśniowym, odmiana B przeważa w tkance wątrobowej, a odmianę C wydzielono ostatnio z móz-

gu (6, 37, 44). Te izoenzymy mają, jak wykazały badania grupy Ruttera (43), w których brał udział Kochman, bardzo zbliżone własności molekularne, ale różnią się immunologicznie i mają różny skład aminokwasowy. Różnią się także własnościami kinetycznymi jak  $V_{max}$ ,  $K_m$  oraz stosunkiem aktywności w rozszczepianiu fruktozo-1,6-dwufosforanu i fruktozo-1-fosforanu. Różne tkanki i gatunki zwierząt zawierają różne garnitury izoenzymów aldolazy które powstają z kombinacji dwóch rodzajów podjednostek (z 3 możliwych, A, B lub C). Macierzyste formy izoenzymów są tetramerami identycznych podjednostek, np. aldolaza A z mięśnia składa się z 4 podjednostek a czyli jest  $a_4$ . Oprócz dwóch form macierzystych istnieją formy izoenzymowe hybrydowe np.  $a_3b$ ,  $a_2b_2$  i  $ab_3$ , gdzie a i b oznaczają podjednostki w odmianach macierzystych A i B. Izoenzymy aldolazy dają się łatwo wykrywać przez elektroforezę wyciągów tkankowych na paskach acetylocelulozy. Rysunki 1 i 2 ilustrują rozdział elektroforetyczny izoenzymów aldolazy oraz profile dystrybucyjne izoenzymów soczewki w różnych okresach rozwoju osobniczego (20).

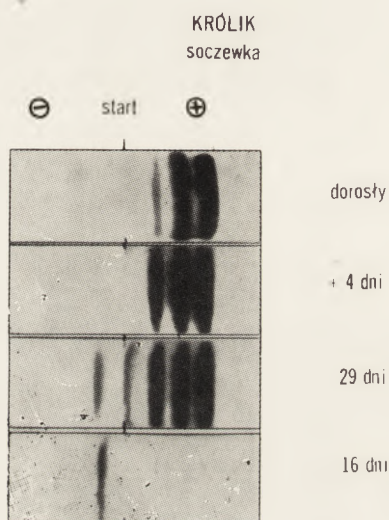
Strukturalna jednorodność budowy macierzystych form izoenzymów aldolazy okazała się pozorną podobnie jak w LD, gdy użyto techniki rozdziału w gradiencie pH. Pozornie homogenna, krystaliczna aldolaza mięśniowa rozdzieliła się na 5 składników (54). Niejednorodność budowy wynika z istnienia dwóch rodzajów łańcuchów peptydowych w podjednostce ( $a_1$  i  $a_2$  w a,  $b_1$  i  $b_2$  w b itd.), których kombinacje dają 5 dalszych układów tetramerycznych. Zakładając obecność 2 rodzajów łańcucha peptydowego w podjednostce i 2 rodzaje podjednostek, mamy 9 możliwych układów tetramerycznych. Wszystkie te odmiany aldolazy są aktywne katalitycznie.

Podobną heterogenność budowy izoenzymów wykryto tą samą techniką w niektórych enzymach glikolitycznych (50). Fakty te obok przypuszczalnego znaczenia w zrozumieniu fizjologicznej roli wielokrotnych form molekularnych enzymów mają również wpływ na metodykę enzymologiczną. Jest oczywistym, że prawidłowe określenie budowy enzymu i wyznaczenie jego parametrów katalitycznych musi opierać się na badaniach rzeczywiście jednorodnej populacji cząsteczek.

Współczesny stan wiedzy o budowie białek katalitycznie czynnych charakteryzuje ogromna różnorodność struktur molekularnych. Drugą, uderzającą cechą jest plastyczność tych struktur związana z oddziaływaniami między podjednostkami oraz wewnątrz podjednostek między grupami chemicznymi tych samych lub sąsiadujących łańcuchów peptydowych. Zjawisku katalizy towarzyszą zmiany konformacyjne, spowodowane wzajemnym oddziaływaniem substratu i miejsca aktywnego oraz oddziaływaniem modyfikatorów i miejsc allosterycznych. Upraszczając zagadnienie można powiedzieć, że funkcja białek sprowadza się do oddzia-



**Rys. 1.** Elektroforetyczny rozdział hybrydów aldolazy A i C w soczewce szczura (20). Najdalej w stronę katody wędruje aldolaza A, najdalej w stronę anody — aldolaza C



**Rys. 2.** Elektroforetyczny rozdział hybrydów aldolazy A i C w soczewce królika (20)





ływań między submolekularnymi strukturami peptydowymi, które są wzajemnymi konformacyjnymi modyfikatorami. O funkcji decyduje struktura pierwszorzędowa, która determinuje, jaką, w określonych warunkach środowiskowych, unikalną konformację przyjmie cząsteczka białka. Informacja zawarta w strukturze pierwszorzędowej zostaje przetłumaczona na funkcję przez fluktuację konformacji.

Jak widać z przytoczonych przykładów związku między strukturą i funkcją białek śledzenie zmian konformacyjnych subtelnymi metodami fizykochemicznymi jest główną linią ataku współczesnej nauki na tajemnicę zjawiska katalizy i innych biologicznych funkcji cząsteczek białkowych. Niezbędnym warunkiem powodzenia jest obecnie znajomość absolutnej struktury cząsteczki w różnych fazach funkcji, osiągalna jedynie na drodze analizy dyfrakcyjnej. Poznanie struktury coraz większej liczby krystalicznych białek daje właściwe podstawy dla korelacji zmian w budowie z parametrami optycznymi i magnetycznego rezonansu jądrowego. Taki związek między trzeciorzędową budową a optyczną aktywnością najlepiej poznanych białek, mioglobiny, hemoglobiny i lizozymu, został wyznaczony i skonfrontowany z teoretycznymi założeniami aktywności optycznej (47). Jest to początek nowych dróg rozwoju badań nad białkami, które napewno odsłonią wspiane prawa funkcji materii żywej.

#### LITERATURA

1. Appella E., Markert C. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 8, 171 (1961).
2. Baranowski T., Wolny M., *Acta Biol. Germanica* 11, 651 (1963).
3. Baranowski T., Wolny M., doniesienie prywatne.
4. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* 167, 348 (1967).
5. Blake C. C. F., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., *Nature* 206, 757 (1965).
6. Blostein R., Rutter W. J., *J. Biol. Chem.* 238, 3280 (1963).
7. Changeux J. P., Thiery J., Tung Y., Knittel C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 335 (1967).
8. Collins K. D., Stark G. R., *J. Biol. Chem.* 244, 1869 (1969).
9. Czerliński G. H., *Currents in Modern Biol.* 2, 219 (1968).
10. Dawson D. M., Mitchel A., *Biochemistry* 8, 609 (1969).
11. Donton M. D., Ginsburg A., *Biochemistry* 8, 1714 (1969).
12. Fritz P. J., *Science* 150, 364 (1965).
13. Gerhart J. C., Pardee A. B., *J. Biol. Chem.* 237, 891 (1962).
14. Goriunow A. I., Andreewa N. C., *Molekularnaja Biologia* 1, 302 (1967).
15. Gutto B., Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.* 91, 501 (1969).
16. Heilmeyer L. Jr., Battig F., Holzer H., *Eur. J. Biochem.* 9, 254 (1969).

17. Hoagland V. D., Jr., Teller D. C., *Biochemistry* 8, 594 (1969).
18. Hirschmann R., Nutt R. F., Veber D. F., Vitali R. A., Varga S. L., Jacob T. A., Holly F. W., Denkwalter R. G., *J. Am. Chem. Soc.* 91, 502 (1969).
19. Kartha G., Bello J., Harker D., *Nature* 213, 862 (1967).
20. Kochman M., Krzywda U., Kwiatkowska D., Baranowski T., *Int. J. Biochem.* (w druku)
21. Koshland D. E. Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 44, 98 (1958).
22. Koshland D. E. Jr., w *The Enzymes*, wyd. 2. red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., Academic Press, New York 1959, t. 1, str. 305.
23. Koshland D. E. Jr., Nemethy G., Filmer D., *Biochemistry* 5, 365 (1966).
24. Koshland D. E. Jr., Neet K. E., *Ann. Rev. Biochem.* 37, 359 (1968).
25. Kraut J., Wright H. T., Kellerman M., Freer S. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58, 304 (1967).
26. Lipscomb W. N., Hartsuck J. A., Reeke G. N. Jr., Quieche F. A., Bethge P. H., Ludwig M. L., Steitz T. A. A., Muirhead A., Coppola J. C., *Brookhaven Symp. Biol.* 21, 24 (1968).
27. Markert C. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 14 (1968).
28. Matthews B. W., Cohen G. H., Silverton E. W., Braxton H., Davies D. R. *J. Mol. Biol.* 36, 179 (1968).
29. Matthews B. W., Sigler B. P., Henderson R., Blow D. M., *Nature* 214, 652 (1967).
30. Millar D. B., Frattali V., Willick G. E., *Biochemistry* 8, 2416 (1969).
31. Monod J., Changeux J. P., Jacob F., *J. Mol. Biol.* 6, 306 (1963).
32. Monod J., Wyman J., Changeux J. P., *J. Mol. Biol.* 12, 88 (1965).
33. Morawiecki A., III Congres International de Biochemie. Bruxelles 1955, Resumes de communications, p. 60.
34. Muirhead H., Perutz M., *Nature* 199, 633 (1963).
35. Neurath H., *Federation Proc.* 23, 1 (1964).
36. Noble R. W., *J. Mol. Biol.* 39, 479 (1969).
37. Penhoet E. E., Rajkumar T. V., Rutter W. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 56, 1275 (1966).
38. Perutz M. F., *Eur. J. Biochem.* 8, 455 (1969).
39. Perutz M. F., Lehman H., *Nature* 219, 902 (1968).
40. Phillips D. C., *Sci. Am.* 215, 78 (1966).
41. Reeke G. N. Jr., Hartsuck J. A., Ludwig M. L., Quieche F. A., Steitz T. A., Lipscomb W. N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58, 2220 (1967).
42. Rewe A. J., Weitzman P. P. J., *J. Mol. Biol.* 43, 345 (1969).
43. Rutter W. J., Rajkumar T., Penhoet E., Kochman M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 102 (1968).
44. Rutter W. J., Woodfin M. B., Blostein R. E., *Acta Chem. Scand.* 17, 226 (1963).
45. Shapiro B. M., Ginsburg A., *Biochemistry* 7, 2153 (1968).
46. Sigler B. P., Blow D. M., Matthews B. W., Henderson R., *J. Mol. Biol.* 35, 143 (1968).
47. Straus J. H., Gordon A. S., Wallach D. F. H., *Eur. J. Biochem.* 11, 201 (1969).
48. Stryer L., Cohen C., Landgridge R., *Nature* 197, 793 (1963).



49. Succlter C. H., *Biochemistry* **6**, 418 (1967).
50. Susor W., Kochman M., Rutter W. J., *Science* **165**, 1260 (1969).
51. Valentine R. C., Shapiro B. M., Stadtman E. R., *Biochemistry* **7**, 2143 (1968).
52. Weber K., *Nature* **218**, 1116 (1968).
53. Wieland T., Pfeleiderer G., *Biochem. Z.* **329**, 112 (1957).
54. Wolin M. J., *Science* **146**, 775 (1964).
55. Wyckoff H. W., Kardman K. D., Allewell N. M., Inagami T., Johnson L. N., Richards F. M., *J. Biol. Chem.* **242**, 3984 (1967).



LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ\*, JACEK BARTKOWIAK\*\*

## Biologiczna aktywność histonów

### The Biological Activity of Histones

The actual views on the interactions of histones with certain compounds, the reversible modifications of their structure and metabolism and biological activity of these proteins are presented.

Na czoło zagadnień współczesnej biologii molekularnej wysuwa się sprawa planowego przekazywania informacji genetycznej zakodowanej w DNA, zapewniającego zróżnicowany rozwój komórek w organizmie. Udział w ekspresji i w regulowaniu funkcji genów przypisuje się białkom powiązanym z DNA, między innymi histonom. Od 20 lat nie udaje się odrzucić atrakcyjnego sloganu *Stedman* (214): „histon — inhibitor genu”.

Według *Dulbecco* (54) jednak cząsteczka pretendująca do roli regulatora genowego winna być wytwarzana przez gen i wykazywać specyficzność co do miejsca działania na genie. Konieczna zatem byłaby mnogość, różnorodność i specyficzność cząsteczek regulujących. Tymczasem niejednorodność histonów nie jest posunięta zbyt daleko a ich komórkowa i gatunkowa specyficzność jest wciąż kontrowersyjna. Jedynie niski ciężar cząsteczkowy histonów a także ich ilościowy stosunek do jądrowego DNA, większy od jedności, przemawiałby za udziałem tych białek w selektywnej regulacji aktywności genetycznej.

Szczególną uwagę zwraca się na interakcję histonów z DNA, a także na możliwości zmiany ich konformacji w sposób regulujący aktywność matrycową DNA w kompleksie nukleoproteidowym.

---

\* Doc. dr, Zakład Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

\*\* Mgr, Zakład Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wykaz stosowanych skrótów: DNP — dezoksyrybonukleoproteid, GAR — histon glicynowo-argininowy, NH — nukleohiston, PHA — fitohemaglutynina.



## I. Nieenzymatyczne interakcje histonów

Mechanizm hamowania przez histony matrycowej aktywności DNA (por. poz. 116) sprowadza się najprawdopodobniej do ich interakcji z komponentami chromosomów, a także różnymi substancjami metabolicznie czynnymi.

### 1. Interakcje histonów z DNA

Johns (99) wykazał, że nie ma specyficznego oddziaływania różnych frakcji histonowych z określonymi odcinkami DNA, stwierdził jednak, że najintensywniej łączy się z DNA frakcja argininowa. Frakcja silnie lizynowa natomiast najslabiej oddziaływująca z DNA, wytrąca go całkowicie, dając produkt o najniższej wartości stosunku histon/DNA, w porównaniu z innymi histonami (tablica 1).

**Tablica 1**

Stosunki histon/DNA w sztucznych nukleohistonach otrzymanych przez dodanie DNA do nadmiaru poszczególnych frakcji histonowych (wg 99)

Frakcja histonowa	Stosunek histon/DNA w zrekonstruowanym NH
F1	0,75
F2a	2,30
F2b	1,80
F3	1,80

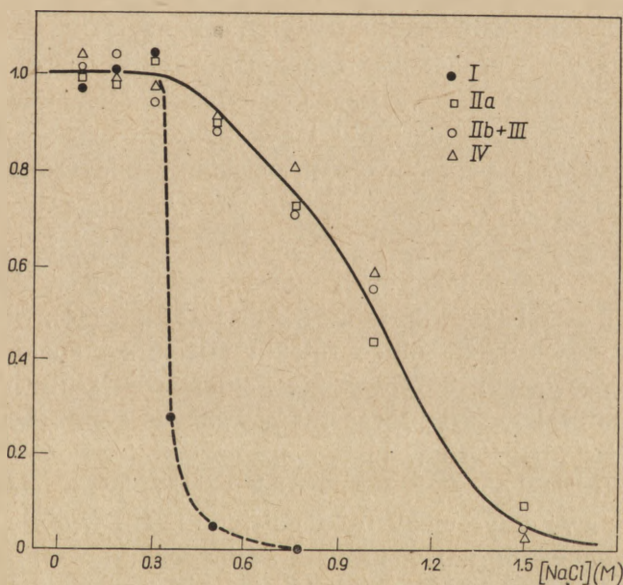
Różnic w wytrącaniu kompleksów DNA-histon przez poszczególne frakcje nie można wytłumaczyć różnicami w wielkości ładunku cząsteczek histonowych. Najprawdopodobniej decyduje tu ilość aminokwasów zasadowych dostępnych w sferycznej cząsteczce histonu dla połączeń elektrostatycznych z grupami fosforanowymi DNA. To zgadzałoby się z przypisywaną histonowi lizynowemu rozciągniętą strukturą oraz z występowaniem pętli hydrofobowych w łańcuchu polipeptydowym frakcji F2a. Taką konformację sugeruje też silne wiązanie się z histonem F2a kwasu 8-anilino-ftaleno-1-sulfonowego, oddziałującego z ugrupowaniami hydrofobowymi (130).

Podczas oddziaływania DNA z mieszaniną frakcji F1 i F3 najpierw przyłącza się histon argininowy, jednak po ustaleniu się określonego stosunku F3/DNA wzmagają się przyłączanie frakcji lizynowej (11).

Johnson i Bryan (102) stwierdzili, że DNA unieruchomione na

kolumnach agarowych można „nasyć” zarówno frakcją lizynową jak i argininową, co wyklucza istnienie w DNA różnych obszarów specyficznie oddziałujących z różnymi typami histonów. Wzrost siły jonowej i przesunięcie w kierunku krańcowych wartości pH powodowały uwalnianie wszystkich frakcji histonowych, choć krzywe dysocjacji wykazywały istotne różnice. Identyczne wyniki doświadczeń z poli A i poli C, użytymi zamiast DNA, sugerują, że wiązania histon-DNA nie są specyficzne.

Johns i Forrester (100) stwierdzili, że histon lizynowy F1 dodany przy pH 7,0 do wodnego roztworu DNA nawet w czterokrotnym nadmiarze nie strąca całości DNA. Największe wytrącenie (65%) odpowiadało stosunkowi histon/DNA = 1,6. Natomiast w 0,14M NaCl całkowite wytrącanie DNA osiągnęto już przy stosunku histon/DNA = 0,8, a w 0,7M  $MgCl_2$  — przy stosunku równym 0,4. Autorzy ci ustalili też, że pełne wytrącanie zachodzi przy niskich siłach jonowych a przekroczenie określonej wartości progowej NaCl wynoszącej 0,4—0,5M powoduje dysocjację. Dane te potwierdzają wcześniejsze doniesienia (58) na ten temat (rysunek 1).



Rys. 1. Selektywna dysocjacja frakcji histonowych z nukleohistonu kiełków grochu

I — histon silnie lizynowy (F1); IIa i IIb — histony umiarkowanie lizynowe; (F2b i F2a2); III — histon argininowy (F3); IV — histon argininowy (F2a1) (Wg 58)

W przypadku  $MgCl_2$  oddysocjowanie F1 zachodzi w roztworach 0,08—0,2M. DNP wyekstrahowany 0,1M  $MgCl_2$  był już prawie zupełnie pozbawiony frakcji lizynowej.

Analizy fizykochemiczne kompleksów DNA i histonu silnie lizynowego

(159) wykazały, że histon ten lokalizuje się w szerokim rowku spirali DNA. W tymże rowku glikozyłowanego T2 DNA umiejscowione są bowiem reszty glikozyłowe związane z 5-hydroksymetylocytosyną, a okazało się, że histon F1 może obniżać poziom glikozylacji T2 DNA. W kompleksach z F1 DNA zachowuje konfigurację B i może wiązać aktynomycynę D. Histon silnie lizynowy ma natomiast bardzo słabo zaznaczoną strukturę  $\alpha$ -spirali. Olins (159) uważa, że współistnieją prawdopodobnie dwa rodzaje cząsteczek rodzimego nukleohistonu. W pierwszym z nich niezasadowe odcinki białka tworzą pętle, podczas gdy reszty zasadowe zubożniają grupy fosforanowe DNA. W drugim rodzaju histon jest rozciągnięty wzdłuż spirali DNA (około 12 skrętów) a wtedy około 75% reszt kwasu fosforowego nie ulega zubożnieniu i może oddziaływać z innymi kationami. Niepolarne fragmenty histonu w obu typach struktury mogą reagować z innymi związkami.

Równocześnie zaobserwowano jednak (25) u *Planococcus citri*, że eukromatyna przyłącza około 3,5 raza więcej aktynomycyny D niż heterochromatyna, a usunięcie frakcji silnie lizynowej znacznie wzmacnia przyłączanie antybiotyku do heterochromatyny.

O decydującym wpływie konformacji cząsteczki DNA na interakcję z histonem świadczy obserwacja (45), że frakcja lizynowa wytrącająca normalnie 95% DNA, po ogrzaniu i gwałtownym ochłodzeniu roztworu DNA wytrąca 68%, a przy powolnym oziębianiu podgrzewanych roztworów tylko 54% DNA. Rozwinięcie spirali DNA osłabia zatem jego oddziaływanie.

Ze względów metodologicznych interesujące są spostrzeżenia Combard-Vanderplanke i Vendrely'ego (44). Stwierdzili oni, że inkubacja dezoksyrybonukleoproteidu (DNP) ze znakowanym DNA (30 min., 4°) prowadziła do powstania kompleksów 3-krotnie bogatszych w DNA niż naturalne DNP. Mogą też powstawać kompleksy DNP z histonem 2—3 razy bogatsze w białko niż normalnie. Podobne efekty zaobserwowali też Lloyd i Peacocke (137) przy badaniu wpływu promieniowania  $\gamma$  na dysocjację nukleohistonu (NH). Wydaje się, że wiązania w tej nadmolekularnej strukturze są innego typu niż wiązania typu soli. Tego typu reakcje wtórne należy brać pod uwagę analizując zjawiska dysocjowania DNP na komponenty składowe.

Naturalny lub sztuczny NH z grasicy cielęcej dodany do roztworu jednoimiennego histonu w 0,15M NaCl łączy się z dwukrotną ilością tego białka (histon F1 przyłącza się najslabiej), przy czym dodatkowy histon wiąże się z NH słabszymi siłami niż normalne białko zasadowe, najprawdopodobniej reagując z grupami -COOH aminokwasów dwukarboksylowych histonu rodzimego (179).



## 2. Interakcje histonów z RNA i białkami kwaśnymi

Procesy represji i derepresji aktywności matrycowej DNA nie mogą być ograniczone jedynie do interakcji DNA i histonów.

Już Frenster (65) w swojej słynnej hipotezie roboczej z 1965 r. porównując chromatynę aktywną, tj. rozproszoną (euchromatynę) ze zbitą i reprimowaną heterochromatyną podkreślił, że różnią się one zawartością jądrowych polianionów innych od DNA.

Aktywna chromatyna zawiera 2-krotnie więcej białka niehistonowego, 5-krotnie więcej RNA oraz fosfolipidów i niemal 4-krotnie więcej fosforu fosfoproteidów. Przewaga polianionów w euchromatynie sugeruje, że mogą one przeciwdziałać interakcji histon-DNA powodując odhamowanie matrycowej aktywności DNA. Szczególnie skutecznym derepresorem miał być specjalny jądrowy RNA sprzężony z histonem (21, 66, 93, 221), lub z jakimś innym białkiem (94). Ten RNA nazwany chromosomowym jest uważany za niejednorodny, narządowo specyficzny i niemal powszechnie występujący w jądrach komórkowych. Obecność jego stwierdzono w kiełkach grochu (30), wątrobie szczura (21), embrionach kurczęcia (92), a także w grasicy cielęcej i komórkach guza puchlinowego u szczura (19).

Inni autorzy sugerowali udział w procesie derepresji jądrowych fosfoproteidów (10, 112, 113, 114, 128) lub białek kwaśnych (20, 175).

Chipperfield (42) zaobserwował, że między DNA i białkiem kwaśnym lub RNA istnieje współzawodnictwo o histon (całkowity oraz frakcje F3 i F2b ale nie o frakcje F1 i F2a).

Wang i Johns (237) scharakteryzowali bliżej interakcje między białkami histonowymi a kwaśnymi. Różne frakcje kwaśnych białek z wątroby szczura tworzyły nierozpuszczalne kompleksy z różnymi frakcjami histonowymi (1-godzinna inkubacja w 4°, 0,05M bufor tris, pH 7,4) przy czym ilość wytrąconego kompleksu zależała od stosunku  $\frac{\text{białko kwaśne}}{\text{histon}}$ .

Gdy stosunek ten przekroczył wielkość progową (różną dla różnych typów kompleksów) rozpuszczalność kompleksu rosła. Wzrost siły jonowej środowiska obniżał intensywność procesu wytrącania. Zbliżone obserwacje poczynili Marushige i wsp. (143) dla interakcji histonów z białkami niehistonowymi chromosomów wątroby szczura.

Należy też podkreślić, że białka kwaśne działają antagonistycznie w stosunku do histonów w układzie polimerazy RNA (110, 224, 236). Wang (236) doniosła, że całkowite białko kwaśne z wątroby szczura, a zwłaszcza pewna jego frakcja tworzyły nierozpuszczalne kompleksy, najsilniej z histonem F1 a najsłabiej z F2b grasicy. Dodanie omawianej frakcji białka kwaśnego do układu polimerazy RNA z *M. lysodeicticus*,

w którym enzym był zahamowany przez frakcje histonowe, przywracało syntezę RNA zależną od DNA. Efekt ten był największy przy zahamowaniu polimerazy RNA przez histon argininowy (F3), a najslabszy przy zahamowaniu przez histon silnie lizynowy (F1). Wang jest zdania, że przywrócenie zahamowanej przez histony syntezy RNA, odznacza się pewną specyficznością i jest czymś więcej niż wynikiem prostej interakcji między białkami kwaśnymi i histonami.

King i wsp. (110) wykazali, że w tworzeniu nierozpuszczalnych kompleksów histonów z białkami kwaśnymi biorą udział zjonizowane  $\epsilon$ -aminowe grupy lizyny oraz grupy karboksylowe. Histon argininowy znacznie łatwiej tworzył kompleksy niż histony silnie lizynowe, a całkowity histon powodował maksymalne strącenie przy stosunku wagowym

$$\frac{\text{białko kwaśne}}{\text{histon}} = 1:1.$$

Interakcje histonów z kwasami nukleinowymi i białkami można badać również w nośnikach.

Gurvich i wsp. (80, 81) badali oddziaływanie histonów z kwasami nukleinowymi oraz z białkami surowicy metodą dyfuzji w płytkach agarozowych, a Gorodecky i Sidorova (75) opracowali sposób określania stopnia intensywności oddziaływania różnych typów histonów z białkami surowicy, stosując celulozę jako nośnik dający kopolimery z białkami.

### 3. Interakcje histonów z fosfoproteidami i polifosforanami

Oddziaływanie fosfoproteidów i polifosforanów z histonami wolnymi oraz związanymi z DNA w nukleohistonie, a także udział fosfoproteidów w funkcji histonów były przedmiotem wnikliwych badań zespołu biochemików Uniwersytetu Leningradzkiego.

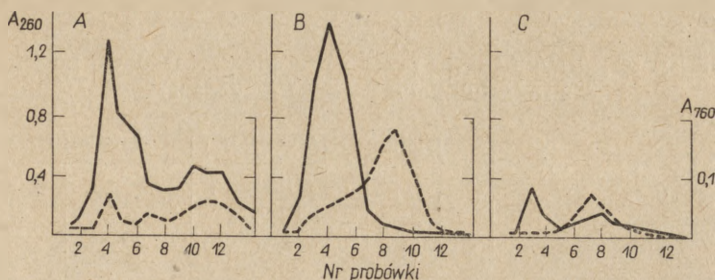
Aszmarin i Komkova (9) w doświadczeniach *in vitro* udowodnili zdolność niektórych fosfoproteidów (kazeina), a także pirofosforanu, heksametafosforanu i metafosforanu do tworzenia z histonami trwałych kompleksów.

Frakcje histonowe F1, F2b, F3 i F2a wytrącały się pod wpływem kazeiny przy niskiej sile jonowej, przy wyższej zaś tworzenie kompleksów ulegało zahamowaniu.

Komkova i wsp. (122) zaobserwowali, że w obecności  $\text{NaPO}_3$  ( $\text{pH}$  7,2 i  $\mu = 0,2$ ) maleje znacznie strącalność kompleksów DNA z histonami F2b, F2a i F3, a w mniejszym stopniu kompleksów z frakcją silnie lizynową. W 0,2M NaCl kompleks DNA-histon F2b- $\text{NaPO}_3$  dzieli się na żelu *Sephadex G-100* jak i *G-200* na dwie frakcje, z których każda zawiera



DNA i białko (rysunek 2A), podczas gdy w nieobecności metafosforanu przy tej samej sile jonowej kompleks DNA-histon wytrąca się prawie całkowicie a supernatant zawiera jedynie ślady nieskompleksowanego DNA i białka (rysunek 2C).



**Rys. 2.** Wymywanie układu DNA-histon F2b- $\text{NaPO}_3$  z żelu *Sephadex G-200*

Kolumny  $1,5 \times 17$  cm, nanoszono 0,2mg DNA w 4ml. Objętość eluowanych frakcji 3ml. Pochłanianie oznaczano przy 260nm (pełna linia) a białko metodą Lowry'ego (linia przerywana). A) DNA + histon +  $\text{NaPO}_3$  (1:4:2), 0,2M NaCl; B) DNA + histon (1:4), 1M NaCl; C) DNA + histon (1:4), 0,2M NaCl. (Wg 122)

Obecność związków fosforowych zmienia zatem fizykochemiczne właściwości kompleksu DNA-histon bez jego dysocjacji. Zdaniem Walkera (235) w nukleohistonie około 80% grup aminowych histonów znajduje się w stanie wolnym. Najprawdopodobniej związki fosforowe oddziałujące z tymi właśnie grupami, wywołują zmiany konfiguracji histonów i znoszą bądź też zmniejszają blokowanie odcinków DNA przez histony.

#### 4. Interakcje histonów z polimerazą RNA

Nieco światła na mechanizm hamowania syntezy RNA przez histony rzuciły wyniki doświadczeń z laboratorium Hnilicy (209, 210) (tablica 2).

Okazało się (209), że histony lizynowe silniej hamowały syntezę RNA niż argininowe po wstępnej preinkubacji z DNA, a histony argininowe — po preinkubacji z enzymem.

Frakcje lizynowe (z wyjątkiem F2b) preinkubowane wstępnie z matrycą DNA, bądź z enzymem nieznacznie różniły się od siebie stopniem hamowania. Bardziej argininowe histony (z wyjątkiem F2a1) oraz siarczan protaminy powodowały 2—4-krotnie wyższe zahamowanie po wstępnej interakcji z enzymem niż z DNA. W przypadku syntetycznych polikationów nie zauważono korelacji między zawartością argininy czy lizyny, a stopniem zahamowania syntezy RNA zależnym od preinkubacji.

Następnie udowodniono (210), że interakcje histonów argininowych z polimerazami RNA *E. coli* lub ssaków zachodzą w sile jonowej zbliżonej



do istniejącej w żywych komórkach bądź nieco wyższej. Przemawiałoby to za rolą histonów argininowych jako naturalnych inhibitorów polimerazy RNA podczas gdy histony silnie lizynowe utrzymywałyby skomplikowaną architekturę chromatyny (136), a umiarkowanie lizynowe ogranicza-

**Tabela 2**

Zahamowanie syntezy RNA *in vitro* przez różne białka zasadowe po ich interakcji z DNA lub polimerazą RNA (wg 209)

Frakcja	Białko: DNA = 0,7		Białko: DNA = 0,3	
	z DNA %*	z polimerazą RNA %*	z DNA %*	z polimerazą RNA %*
Grasica cielęca				
Histon całkowity	54	30	74	36
F1	20	30	66	76
F2a	61	24	82	34
F2a1	42	36	59	55
F2b	77	29	94	35
F3	67	29	91	25
Sperma jeźowca				
Histon H-1	44	33	77	61
Histon H-3	40	16	88	27
Erytrocyty kurczęcia				
Histon F2c	40	40	77	69
Siarczan protaminy	65	59	83	31
Polilizyna	—	—	88	77
Poliarginina	10	30	50	90

\* Wyniki wyrażone w procentach, przyjmując za 100% syntezę RNA w układzie bez dodatku białka

łyby jej aktywność matrycową (28). Stwierdzono też (210), że histony wiążą się z polimerazą RNA najprawdopodobniej siłami elektrostatycznymi, ponieważ kompleksy te dysocjowały w mocnych roztworach soli. Skompleksowanie polimerazy RNA z histonami silnie lizynowymi nie wpływa na jej aktywność, a DNA oddysocjowuje z takich kompleksów, natomiast w kompleksie enzymu z frakcją argininową DNA jest trwale związany. Interesujące jest, że polimeraza DNA z *E. coli*, będąca podobnie do polimerazy RNA białkiem kwaśnym nie reaguje z żadną z frakcji histonowych (210).

Omówione obserwacje tłumaczą rozbieżne wyniki dotychczasowych badań nad hamowaniem syntezy RNA zależnej od DNA przez histony lizynowe i argininowe.

### 5. Interakcje histonów ze związkami niskocząsteczkowymi

*Interakcje z węglowodorami aromatycznymi.* Badania *in vitro* wykazały (118, 153), że węglowodory aromatyczne oddziałują z aminokwasami aromatycznymi histonów zarówno wolnych jak i związanych w DNP. Tego typu oddziaływanie może mieć podstawowe znaczenie w procesach rakotwórczych, a także w mechanizmach regulacyjnych, w których uczestniczą hormony sterydowe.

Slyser (205) inkubował różne frakcje histonowe z wątroby szczura ze znakowanymi substancjami rakotwórczymi i stwierdził, że N,N-dwumetylo-4-aminobenzen wiązał się silniej z frakcją F3 niż z F1, a benzo-piren wykazywał większe powinowactwo do histonu F3 niż do frakcji F2a. Miejscem przyłączenia tych związków do histonów są obszary białka pozbawione aminokwasów zasadowych.

*Interakcje ze sterydami i gangliozydami.* W tej dziedzinie wysunięto koncepcję, że w cząsteczkach histonów są specyficzne receptory dla sterydów, a te ostatnie działają jako allosteryczne efekторы, kontrolujące wiązanie histonów do DNA. Sunaga i Koide (219) wykazali, że *in vitro* kortykosterydy łączą się trwale z histonami grasicy, przy czym oddziaływanie to w pH 7,4 jest silniejsze przy wyższej temperaturze. Z badanych sterydów najsilniej oddziaływały z histonami kortyzon, kortyzol, czterohydrokortyzon i czterohydrokortyzol. Zarówno *in vitro* jak i *in vivo* sterydy łączą się trwale z histonem argininowym (204, 220). Stwierdzono też (206), że hydrokortyzon wiąże się z obszarem hydrofobowym histonu oraz, że dodanie kompleksu histon-hydrokortyzon do DNA powoduje wytrącenie się hydrokortyzonu z zespołem nukleohistonowym. Istotny wpływ na wiązanie kortyzonu przez histony ma stopień acetylacji tych białek; acetylacja histonu F2a zwiększa przyłączanie kortyzonu przez ten histon aż o 37% (133).

Nie wykluczone, że i gangliozydy uczestniczą w procesie regulacji aktywności matrycowej DNA. W stężeniu  $10^{-5}M$  obniżają one niemal do zera efekt ochronny histonu na termiczną denaturację DNA (145). Wpływ ten na NH polega na odrywaniu białka od DNA.

*Interakcje z barwnikami.* Muira i Ohba (151) kompleksowali NH i DNA z błękitem toluidynowym, a z przesunięć w widmach biopolimerów oraz różnic w ilości związanego barwnika wywnioskowali m. in. że około połowy grup fosforanowych w NH jest niepołączonych z zasadowymi grupami histonu.

Gittelson i Walker (74) zaobserwowali, że interakcja proflawiny z DNA i dezoksyrybonukleohistonem powoduje jakościowo podobne zmiany zarówno w nadfioletowym jak i widzialnym widmie barwnika co sugeruje, że proflawina łączy się z nimi w podobny sposób, tzn. poprzez

elektrostatyczne wiązania kationowego barwnika z anionowymi grupami makrocząsteczek oraz siłami Van der Waalsa między pierścieniami aromatycznymi barwnika a zasadami DNA. Sam histon nie wiązał się z proflawiną i nie zmieniał jej widma, a tylko nieznacznie obniżał siłę wiązania DNA z proflawiną, ale na zasadzie zmniejszenia wolnej energii elektrostatycznej a nie jakiejś przeszkody przestrzennej lub czynnika blokującego. Wskazywałoby to, że proflawina oddziałuje tylko z obszarem w obrębie szerokiego rowka podwójnej spirali DNA a histon znajduje się w węższym rowku (Hipoteza przeciwna do podanej przez Olinsa (159)).

Konformację całkowitego histonu i jego frakcji badano też działając na nie czterofenylporfinosiarczanem i purpurą Biebricha i oznaczając spektrofotometrycznie i spektrofluorymetrycznie cechy powstałych kompleksów (239).

## II. Odwracalne modyfikacje struktury histonów

### 1. Acetylacja histonów

Zagadnienie łatwo odwracalnych modyfikacji strukturalnych histonów otwiera doniesienie z Instytutu Rockefellera o acetylowaniu *in vitro* histonów jąder komórkowych (2).

Korzystając z techniki Chou i Lipmanna (43) Nohara i wsp. (155, 156, 157) wyizolowali z wątroby gołębia frakcje najaktywniej stymulujące acetylację histonów w obecności ATP,  $Mg^{2+}$ , CoA przy pH 6,5—7,5 i doszli do wniosku, że działają tu dwa enzymy: aktywujący i przenoszący resztę acetylową (być może acetyltransferaza aryloaminy — EC 2.3.1.5.). Autorzy ci stwierdzili też, że najsilniej był acetylowany histon argininowy grasicy, a kolejno słabiej frakcje umiarkowanie lizynowe (F2a i F2b), histon całkowity guza puchlinowego, histon silnie lizynowy i całkowity grasicy cielęcej. Albumina jaja praktycznie w ogóle nie włączała radioaktywnego octanu.

Badacze tej grupy (156, 157) działając na histony hydroksylaminą wykazali ponadto obecność labilnych grup O-acetylowych, związanych głównie z tyrozyną oraz stabilnych grup N-acetylowych, prawdopodobnie ε-N-lizynowych. Grupy labilne na hydroksylaminę znacznie szybciej wbudowują się w histony argininowe i są tam obfitsze niż w histonach umiarkowanie lizynowych, co może wskazywać na różnice konformacji tych typów histonów lub różne miejsca włączania do nich reszt acetylowych.

Na możliwość deacetylacji histonów w żywej komórce wskazuje praca Inoue i Fujimoto (95), którzy w ekstrakcie z grasicy cielęcej znaleźli deacetylazę histonów, atakującą grupy acetylowe tylko w dużych cząsteczkach histonowych.



*Acetylacja histonów w izolowanych jądrach komórkowych.* Allfrey i wsp. (2) badając jądra komórek grasicy stwierdzili, że puromycyna nie wpływa na acetylowanie histonów, a więc acetylacji ulega zapewne już zsyntetyzowany łańcuch polipeptydowy. Zaobserwowana przez nich najintensywniejsza acetylacja histonów argininowych (F3 i F2a) przy słabszym acetylowaniu frakcji F1 i F2b kontrastują z niemal kompletną acetylacją reszt N-końcowych w F1. Autorzy ci sugerowali, że donatorem grup acetylowych jest acetylo-CoA.

Gershney i wsp. (72) badając acetylowaną  $^{14}\text{C}$ -octanem frakcję F2a1 z jąder komórek grasicy stwierdzili, że niemal cała radioaktywność występuje jako  $\epsilon$ -N-acetylolizyna. Sugerują oni, że acetylacja  $\epsilon$ -N-lizyny może zmniejszać zasadowość histonu. Praca ta uzupełnia wykrycie N-końcowych peptydów (N-acetylo-serylo-glicyloargininy) we frakcjach F2a1 i F2a2 (178) i w histonie GAR, równoważnym z frakcją F2a1 (213) i wskazuje na jeszcze jedno miejsce acetylacji histonu F2a1, tj.  $\epsilon$ -aminowe grupy lizyny.

Gallwitz i Sekeris (71) badając włączanie *in vitro* grup acetylowych z acetylo-CoA w izolowane jądra komórkowe wątroby szczura stwierdzili, że najlepszym akceptorem jest frakcja F3, następnie frakcja F2a, F2b i F1, a kwaśne białka jądrowe są znacznie słabiej zacetylowane. W histonie argininowym 35% octanu wbudowanego było w postaci grup O-acetylowych, a 65% jako N-acetylowe, w pozostałych frakcjach zaś wykryto tylko N-acetylowane aminokwasy. Włączanie octanu rosło ze wzrostem pH mieszaniny inkubacyjnej, przy czym w pH 7—8 było ono procesem enzymatycznym, a przy wyższych wartościach pH — głównie chemicznym. Acetylacja enzymatyczna histonów wzmagala się w obecności układu regenerującego ATP, a także układu kinaza kreatynowa-fosforan kreatyny.

*Acetylacja histonów w komórkach hodowli tkankowej.* W hodowli tkankowej limfocytów ludzkich pod wpływem fitohemaglutyniny (PHA), uczynniającej prawdopodobnie polimerazę DNA (138) obserwuje się wzrost syntezy RNA i białka (46, 104, 195) oraz podziały, co uważa się za przejaw rozległej aktywacji genowej. Termin fitohemaglutynina wprowadzili Rigas i wsp. (190) dla ekstraktu białkowego z *Phaseolus vulgaris*, aglutynującego erytrocyty i leukocyty. Badania późniejsze (158) udowodniły niejednorodność chemiczną i funkcjonalną (aglutynacja i aktywność mitotyczna) PHA oraz charakter glikoproteidowy czynnika mitogennego. Nie jest wykluczone, że w początkowym stadium stymulującego działania PHA punktem zaczepienia jest kwas sialowy z powierzchni komórek (135).

Pogo i wsp. (181) badali histony limfocytów w okresie wzmożonej aktywności genowej pod wpływem PHA. Stwierdzili oni, że stymulacja syntezy RNA i białka wyprzedzała bardzo znacznie powiększanie się i wy-

dłużanie komórek, a także syntezę DNA. Jeszcze wcześniej dochodziło do acetylacji histonów zwłaszcza argininowych.

W wielojądrzastych leukocytach końskich jednak synteza RNA i acetylacja histonów ulegały znacznemu obniżeniu po wprowadzeniu PHA (182).

Interesujące są badania Zetterberga i Auera (244) nad zmianami w kompleksie DNP leukocytów ludzkich pod wpływem PHA, oparte na wiązaniu błękitu bromofenolowego przez reszty zasadowe w białku. Na podstawie wcześniejszych doświadczeń (191) ustalono, że usunięcie DNA za pomocą TCA udostępnia dla barwnika reszty argininowe i lizynowe a kwas pikrynowy wiążąc się z resztami argininy, udostępnia jedynie  $\epsilon$ -aminowe grupy lizyny. W przypadku leukocytów stymulowanych PHA zaobserwowano 25% obniżenie wiązania błękitu bromofenolowego po hydrolizie w TCA i 80% spadek zdolności wiązania kwasu pikrynowego przy niezmienionej reakcji z barwnikiem (244). Autorzy dochodzą do wniosku, że pod wpływem PHA reszty argininowe w histonie ulegają zamaskowaniu, jednak nie w wyniku acetylacji a wskutek związania z innymi kwaśnymi komponentami w jądrze, różnymi od DNA.

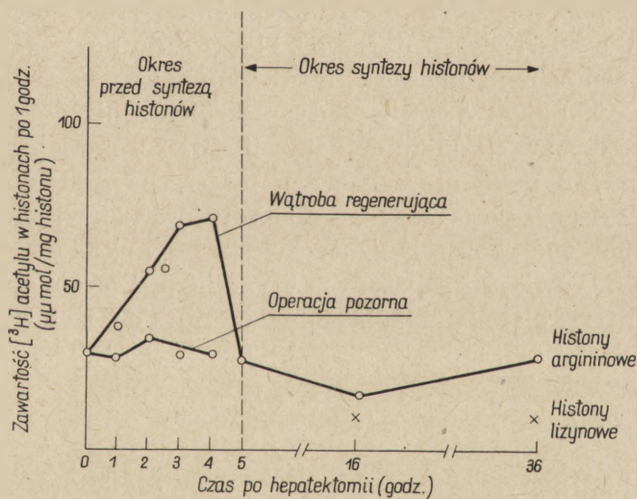
Mac Guillivray i Monjardino (77) podważają specyficzność acetylacji histonów indukowanej przez PHA. W oparciu o badania Hirschhornów (88) podkreślają oni znaczną niejednorodność budowy chemicznej i funkcji fitohemaglutyniny *Difco-P*. Stosowany przez nich preparat PHA pozbawiony działania mitogennego wzmacniał syntezę RNA w hodowlach limfocytów ale obniżał acetylację histonów. Co więcej analiza RNA syntetyzowanego przez limfocyty spoczynkowe (148) oraz poddane działaniu PHA (176) wykazała, że PHA wywołuje syntezę sRNA, a nie mRNA. Być może limfocyty zawierają długotrwałe mRNA, a regulacja syntezy białka odbywa się w nich poprzez kontrolę raczej jego funkcji niż syntezy.

Ono i wsp. (160, 161) porównując limfocyty prawidłowe i traktowane PHA *Difco-P* zaobserwowali w tych ostatnich zwiększoną acetylację, przy czym do histonów przyłączało się niemal dwukrotnie więcej  $^3\text{H}$ -octanu niż do białek resztkowych. Jeśli białka jądrowe, izolowane z komórek inkubowanych z  $^3\text{H}$ -octanem poddano hydrolizie w HCl histony traciły 90% radioaktywności a białka resztkowe tylko około 40%. Autorzy sądzą zatem, że radioaktywność w histonach była obecna w postaci grup acetylowych, w białku resztkowym zaś w formie wbudowanej w szkielet aminokwasów. Okazało się też (tablica 6), że hydrokortyzon, który znosi stymulujący wpływ PHA na syntezę RNA prawie nie wpływa na acetylację histonów ani białek resztkowych. Podważa to pogląd, że acetylacja jest wstępnym warunkiem aktywacji genu przez PHA. Można przypuszczać, że podobnie jak w regenerującej wątrobie (13) wzrost syntezy RNA jest



związany głównie ze zwiększeniem zawartości polimerazy RNA, a nie matrycowej aktywności chromatyny.

*Acetylacja histonów w organizmach zwierzęcych.* W pracowni Mirsk y'e g o (183) zaobserwowano, że obraz acetylacji w wątrobie prawidłowej i regenerującej jest zupełnie różny. Zwraca uwagę zwolniona wymiana grup acetylowych w histonie argininowym w procesie regeneracji. Zwolniony proces deacetylacji (ewentualnie wzmożona acetylacja) jest cechą specyficzną dla frakcji F2a1, F2a2 jak również F3 oraz umiarkowanie lizynowej (F2b), a nie dotyczy frakcji silnie lizynowej (F1). Szczególnie intensywnie acetylowany jest histon F2a1, który gromadzi 50—60% całości wbudowanego izotopu. Histon ten bogaty w argininę i glicynę, jest acetylowany na azocie N-końcowej seryny. Miejsce włączania grup acetylowych w histon F3, którego terminalnym aminokwasem jest alanina, pozostaje nadal niejasne. Wiadomo jedynie, że 55% radioaktywności wykazuje labilność właściwą dla wiązań O-acetylowych. Przebieg acetylacji histonu argininowego w różnych okresach regeneracji wątroby ilustruje rysunek 3. Zawartość reszt acetylowych rośnie szybko osiągając szczyt już w 3—4 godz. po operacji. Niewielką acetylację histonów lizynowych natomiast obserwuje się dopiero w 16 godzinie po hepatektomii.



Rys. 3. Włączenie  $^3\text{H}$ -octanu w histony argininowe regenerującej wątroby szczurów. (Wg 183)

Szczyt acetylacji histonów argininowych regenerującej wątroby wyprzedza wyraźnie wzrost syntezy RNA, podobnie jak to ma miejsce w przypadku ludzkich limfocytów stymulowanych przez PHA (181). W okresie najbardziej aktywnej syntezy histonów acetylacja tych białek pozostaje mniej lub więcej stała (183).



Chromosomy olbrzymie ślinianek owadów dwuskrzydłych są dobrym obiektem badań procesu acetylacji histonów ze względu na tworzenie się tzw. pufów uważanych za geny w akcji (18). Wyniki początkowo były sprzeczne. Ellgaard (56) doniósł o definitywnym braku acetylacji chromosomowej i zakwestionował wybiórczość tego procesu dla histonów w obszarach pufowych u *Drosophila melanogaster*. W rok później jednak Allfrey i wsp. (6) udowodnili autoradiograficznie acetylację histonów w chromosomach gruczołów ślinowych *Chironomus thummi* i wykazali, że powszechnie używany (między innymi przez Ellgaarda) sposób utrwalania preparatów mieszaniną etanolu i kwasu octowego (3:1) a następnie 45%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  powoduje ekstrakcję histonów jak również nowołączonych radioaktywnych grup acetylowych (por. poz. 15). Zwrócili też uwagę na doniesienie Roberta i Kroegera (193), że histony w pufach są wrażliwsze niż w obszarach międzypufowych co może sprzyjać ich ekstrakcji kwaśnymi utrwalczami.

Proces acetylacji histonów badano też w mózgu myszy zakażonych czynnikiem *Scarpie*. Czynniki ten powodujący powolną degenerację centralnego układu nerwowego nie może być zaliczony do żadnego ze znanych szczepów zakaźnych (1). Wywołuje on znaczną hipertrofię astrocytów (62) przypominającą nieco aktywację limfocytów za pomocą PHA. Skłoniło to Caspary'ego i Sewella (39) do porównania acetylacji histonów w centralnym układzie nerwowym myszy prawidłowych oraz zakażonych czynnikiem *Scarpie*. Znaczne zwiększenie stopnia acetylacji histonów (ok. 25%) w stosunku do kontroli stwierdzono u myszy w 3 miesiącu po zakażeniu, kiedy nie były widoczne jeszcze żadne objawy kliniczne ani histologiczne, poza minimalną astrocytozą. Zjawisko to może być wyrazem zaburzonej kontroli syntezy kwasów nukleinowych i białek w astrocytach. U zwierząt zakażonych czynnikiem *Scarpie* stwierdzono też zmiany w syntezie białek nukleohistonów mózgu (38), izolowanych według Laurence'a i wsp. (132).

## 2. Metylacja histonów

Badania nad metylowaniem histonów prowadzono zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

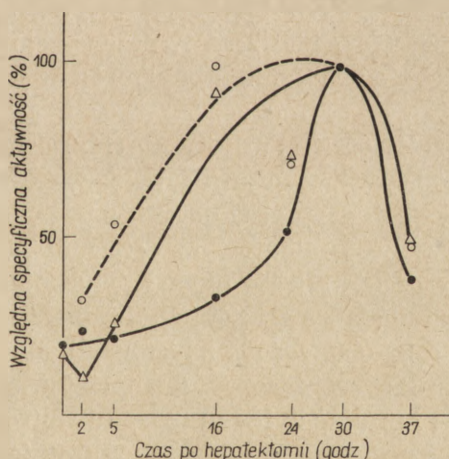
*Metylowanie histonów in vitro*. Allfrey i wsp. (2) wykazali, że włączenie grup metylowych w histony jest wynikiem przenoszenia grup metylowych z aktywnych donatorów do wolnych  $\epsilon$ -aminowych grup lizyny w zsyntetyzowanym już łańcuchu polipeptydowym. Sugerowali oni, że metylacja histonu wpływa na interakcję histon-DNA w chromatynie i w ten sposób modyfikuje matrycową aktywność DNA.

Kim i Paik (109) w doświadczeniach z izolowanymi jądrami ko-

mórkowymi grasicy cielęcej zastosowali S-adenozyno-(metyl- $^{14}\text{C}$ ) metioninę a także (metyl  $^{14}\text{C}$ ) metioninę jako donatory grup metylowych. Radioaktywne pochodne L-lizyny izolowane z hydrolizatu białkowego po metylacji okazały się  $\epsilon$ -N-monometylo- oraz  $\epsilon$ -N-dwumetylo-L-lizyną. Autorzy ci stwierdzili możliwość aktywacji  $\epsilon$ -N-metylolizyny w obecności ATP i syntetazy aminoacyloadenilanu, nie zaobserwowali jednak transportu tego aminokwasu na sRNA ani jego wbudowania w łańcuch peptydowy. Sądzą oni, że układ metylujący grupę  $\epsilon$ -aminową lizyny wbudowanej w łańcuch polipeptydowy, obok stwierdzonych wcześniej  $\epsilon$ -lizynoacylasy (171),  $\epsilon$ -lizynoalkilasy (108) oraz enzymu syntetyzującego  $\epsilon$ -N-acetylo-L-lizynę z L-lizyny i acetylofosforanu (172) może służyć do włączania i wyłączenia syntezy RNA w różnych miejscach chromosomów i w różnym czasie.

Enzymatyczne przenoszenie grup metylowych z S-adenozynometioniny na reszty  $\epsilon$ -N-lizyny histonów stwierdzono w materiale roślinnym (174) uzupełniając tym dane (59) o występowaniu  $\epsilon$ -N-metylolizyny w roślinnym histonie argininowym.

*Metylacja histonów in vivo.* Tidwell, Allfrey i Mirsky (226) badali metylację histonów w regenerującej wątrobie w powiązaniu ze stosunkiem RNA/DNA w jądrach komórkowych a także syntezą histonów i DNA. Zajęli się oni frakcją AF-4 (argininową), reprezentującą 14% całości histonu, która zawierała 9,3 mol% lizyny, a w tym około 10% zmetylowanych reszt lizynowych w łańcuchu polipeptydowym. Badając w tej frakcji techniką Paika i Kima (173) stosunek stężeń dwumetylolizyny



**Rys. 4.** Przebieg metylacji i syntezy histonów w regenerującej wątrobie szczura. Jądra komórkowe wątroby izolowano w 20 minut po podaniu dootrzewnowo  $^{14}\text{C}$ -argininy i (metyl  $^{14}\text{C}$ ) metioniny. Histony ekstrahowano, frakcjonowano acetonem a następnie hydrolizowano. Dla frakcji AF-3 i AF-4 oznaczano specyficzną aktywność argininy (o---o), metioniny (Δ---Δ) oraz  $\epsilon$ -N-metylolizyny (●---●). Względne specyficzne aktywności oznaczają stosunek wartości aktualnie mierzonych do wartości w 30 godz. po częściowej hepatektomii (Wg 226)



do monometylolizyny stwierdzili, że po częściowej hepatektomii, w okresie intensywnej syntezy histonów przeważa proces monometylacji, a podczas spadku syntezy tych białek — dwumetylacja. Okazało się też (rysunek 4) że synteza histonów frakcji AF-4 zaczyna się zanim metylacja tego histonu osiąga swój szczyt, co potwierdza, że nowosyntetyzowane histony nie ulegają natychmiast metylacji. Maksymalna metylacja histonów w regenerującej wątrobie miała miejsce w 6—12 godzin po szczycie syntezy DNA, co wskazywałoby, że metylacja jest dość późnym procesem względem replikacji chromosomów. Wprowadzie szczytowy stosunek RNA/DNA w jądrach komórkowych zbiegający się w czasie ze szczytem syntezy DNA mogłyby reprezentować aktywację genową dla syntezy RNA, jednak autorzy nie wyciągają tego wniosku ze względu na niesynchronizowane cykle życiowe różnego rodzaju komórek wątroby. Wydaje się, że zespół Mirsky'ego wycofuje się ze swych wcześniejszych sugestii, że metylacja histonów może znosić hamujące działanie tych białek w syntezie RNA. Zyskuje na sile pogląd Murra'y'a (152) o niepodobieństwie takiego wpływu metylacji na interakcję histon-DNA z uwagi na większą zasadowość N-metylowanych amin alifatycznych.

### 3. Grupy siarkowe w histonach

Na początku lat 60-tych pięć niezależnych od siebie zespołów badawczych (48, 97, 105, 106, 115, 177) wykryło obecność grup tiolowych w białkach jąder komórkowych tkanek zwierzęcych. Zmianom w stanie oksydoredukcyjnym grup tiolowych białek jądrowych przypisywano jakąś funkcję podczas mitozy (144, 185) bądź w przenoszeniu informacji z DNA (por. poz. 116) bądź też we włączaniu prekursorów w jądrowe białka i RNA (207, 211).

Marsh i wsp. (141) oraz Ord i wsp. (162) oznaczyli dla jąder komórkowych wątroby i grasicy szczura tzw. zawartość „jawną” oraz całkowitą grup tiolowych, tj. grup reagujących z odczynnikiem Ellmana (57) bezpośrednio oraz po 5-minutowym działaniu na jądra 4M mocznikiem. Jądra wątroby cechowały się niemal dwukrotnie wyższą całkowitą ilością grup tiolowych niż jądra grasicy. W obu tkankach około 50% „jawnych” grup tiolowych było sprzężone z histonami, a 30—40% — z białkami resztkowymi jąder. Jednak odsetek „jawnych” grup tiolowych w histonie bogatym w lizynę i prolinę był w przypadku wątroby prawie 6-krotnie wyższy niż w histonie argininowym, a tylko 2-krotnie wyższy w przypadku grasicy.

Incubowanie jąder komórkowych wątroby i grasicy z czynnikami alkilującymi i dwusiarczkami wykazało, że prawie połowa grup tiolowych histonu bogatego w lizynę i prolinę oraz większość tych grup w histonie



bogatym w argininę i tyrozynę nie reaguje natychmiast ze stosowanymi związkami (162). Sugeruje to, że w nietkniętych jądrach znaczna część grup tiolowych histonów jest zamaskowana i staje się dostępna dopiero po dezorganizacji III-rzędowej struktury tych białek. Histony o niższej zawartości „jawnych” grup tiolowych (argininowe) w porównaniu z bogatymi w lizynę i prolinę — słabiej włączały *in vitro* radioaktywne aminokwasy, skuteczniej unieczynniali DNA jako matrycę dla polimerazy RNA, a ich sztuczne kompleksy z jednoimiennym DNA wykazywały wyższą temperaturę topnienia (162).

Frenster (65) doniósł o niemal identycznej ilości i jakości histonów w chromatynie rozproszonej oraz zbitej. Posługując się jego techniką (68) wyosobniania obu typów chromatyn Ord i Stocken (164) stwierdzili wyższą zawartość grup sulfhydrylowych w histonie lizynowo-prolinowym z rozproszonej, a więc bardziej aktywnej chromatyny, a w histonach ze zbitej chromatyny — wyższą zawartość grup dwusiarczkowych. Nie jest wykluczone, że wiązania -S-S- łączące histony lizynowe w tych samych, a nawet odrębnych cząsteczkach DNA decydują o zbitej postaci chromatyny, a zmiany w stosunku -SH/S-S warunkują zmiany postaci i funkcje chromatyny. Równocześnie Hilton i Stocken (87) wykazali, że utlenienie grup siarkowych w histonie argininowym z grasicy cielęcej wzmacnia, redukcja zaś czy zablokowanie grup -SH np. chlorortęciobenzenosulfonianem (55) obniża jego aktywność represorową w stosunku do matrycy DNA badanej w układzie polimerazy RNA zależnej od DNA.

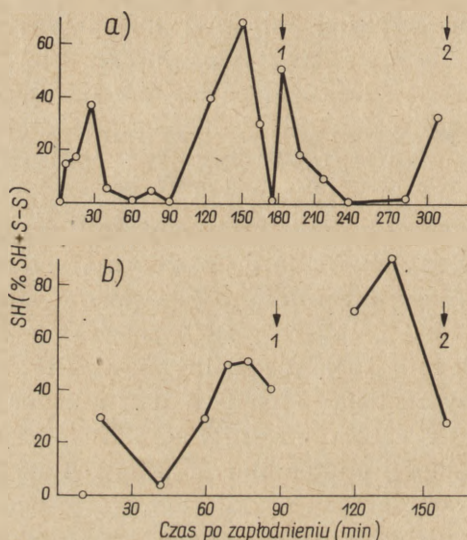
Ord i Stocken (166) rozdzielili następnie zespół argininowy (F3 + F2a) izolowany metodą Johnsa (98) z jąder komórkowych na dwa składniki: F3-1 i F3-2, które różniły się ilością grup siarkowych i fosforanowych, w zależności od sposobu preparowania i pochodzenia tkankowego. Ogólnie zawartość reszt siarkowych i fosforanowych była wyższa w histonach wątroby niż w histonach grasicy.

Fracja F3-1 z wątroby kurczęcia zawierająca 3—5 razy więcej siarki niż frakcja F3-2 (168) znacznie słabiej hamowała *in vitro* syntezę DNA niż F3-2.

Obniżenie drogą utlenienia zawartości grup sulfhydrylowych w histonie F3-1 do około 50% nie zwiększało jednak hamującego wpływu na syntezę DNA, a przy 25% zawartości grup -SH obserwowano się nawet podwyższenie aktywności polimerazy DNA.

Dążąc do wyjaśnienia roli grup -SH jak i -S-S- w histonach Ord i Stocken (169) zbadali ich zmiany w niezapłodnionych i zapłodnionych jajach jeźowców. Potwierdzili oni wcześniejsze obserwacje (12) o niskiej zawartości histonu lizynowego w dojrzałych niezapłodnionych jajach i wykazali, że we wczesnych stadiach podziału histon ten występuje jedynie w śladowych ilościach. Uzupełnili też niezbyt jednoznaczne wyniki

doświadczeń M a z i a (144) stwierdzając, że w dojrzałych niepłodzonych jajach stosunek grup -SH do sumy -SH i -S-S- jest niższy od 0,2, po zapłodnieniu zawartość grup -SH rośnie, sięgając do 44—59% tej sumy tuż przed pierwszym podziałem, a po podziale maleje do poziomu wyjściowego. Warto tu przypomnieć, że w histonach tkanki wątrobowej i grasiczej grupy -SH stanowią około 80% wszystkich grup siarkowych. Wysoki odsetek grup dwusiarczkowych obserwowany w histonie całkowitym z dojrzałych niepłodzonych jaj charakteryzuje jak się zdaje komórki spoczynkowe. Początkowi syntezy DNA po zapłodnieniu towarzyszył wzrost zawartości grup -SH, co potwierdzałoby sugestie (168) o ich znaczeniu dla aktywności polimerazy DNA.



**Rys. 5.** Zmiany w zawartości grup -SH (w % sumy -SH i -S-S-) w histonach z jaj *Echinus* i *Psammechinus* po zapłodnieniu

a) *Echinus* w 8°; ekstrakcja za pomocą HCl-etanol. b) *Psammechinus* w 12°; ekstrakcja za pomocą 250mM HCl po przemyciu osadu jąder 5% TCA. Strzałka 1 — pierwsze bruzdkowanie, strzałka 2 — stadium 4 komórek (Wg 170)

Dalsze badania Orda i Stockena (170), które ilustruje rysunek 5 potwierdzają poprzednie ich wyniki. Wysoka zawartość grup -SH w jajach jeżowców tuż po zapłodnieniu, a także podczas I i II podziału zbiega się w czasie ze wzmożeniem syntezy DNA w tych okresach. Prawdopodobnie jednak obecność grup -SH w histonach warunkuje raczej strukturalne zmiany w chromatynie zachodzące w okresie zapłodnienia i mitozy, niż samą syntezę DNA.



#### 4. Fosforylacja histonów

Zagadnienie fosforylacji histonów jako odwracalnej modyfikacji strukturalnej tych białek zapoczątkował L a n g a n, który w latach 1965—1966 wykrył w jądrze frakcję białkową zawierającą 1,0—1,2% fosforu głównie w postaci fosfoseryny (127).

Doświadczenia L a n g a n a podsumowane w jego pracy referatowej z 1967 (126) udowodniły trzy fakty: 1) Fosfoproteidy jądrowe mogą oddziaływać z histonami *in vitro*, a tworzenie tego rodzaju kompleksów obniża hamujący wpływ histonów na syntezę RNA zależną od DNA. 2) Chromatyna limfocytów aktywna w syntezie RNA w odróżnieniu od nieaktywnej cechuje się wyższym stężeniem fosfoproteidów. 3) Fosfoproteidy zdolne są aktywować syntezę RNA w heterochromatynie. Obserwacje były frapujące, nasuwały bowiem myśl, że dodatkowy wieloanionowy układ fosfoproteidów obok wieloanionowego DNA może konkurować o kationowe białko, histon, modyfikować jego interakcję z DNA i tym samym wpływać na matrycową aktywność chromatyny w syntezie RNA.

Należy tu podkreślić pomijany zwykle w literaturze zachodniej fakt, że już w latach 1964—1965 K o m k o v a i wsp. (119, 120, 121) z Zakładu Biochemii Leningradzkiego Uniwersytetu donosili, iż około 20% fosfoproteidów jądra komórkowego jest związane z frakcją dezoksyrybonukleoproteidów.

*Reszty fosforanowe w histonach.* Obecność reszt fosforanowych stwierdzono w histonach wątroby i grasicy szczura we frakcji argininowej (89, 113, 114, 163), a także w histonach lizynowych (163). Histon silnie lizynowy otrzymany według J o h n s a (98) zawierał 1 mol fosforanu na cząsteczkę rzędu 42 000—43 000 przy zupełnym braku grup siarkowych, a histony lizynowe i argininowe (ekstrahowane do 50 i 250mN HCl) zawierały reszty fosforanowe obok siarkowych (163). O r d i S t o c k e n (166) oznaczyli zawartość fosforanu we frakcjach argininowych F3-1 i F3-2 z jąder komórkowych grasicy oraz wątroby szczura. Frakcja F3-2 z wątroby wykazywała najmniejszą ilość zarówno fosforanów jak i grup siarkowych, a histon F3-1 z obu typów tkanek zawierał prawie dwukrotnie więcej fosforu niż całości grup -SH i -S-S-.

Włączanie się radioaktywnego fosforanu w histony grasicy szczura zarówno *in vivo* (164) jak *in vitro* (216) zachodziło na resztach seryny histonu silnie lizynowego. Nie było ono hamowane przez puromycynę ani przez aktynomycynę, co wskazywało na niezależność procesu fosforylacji od syntezy białka. Dane te potwierdzili następnie D i x o n i wsp. (53) badając białka chromatynowe komórek gruczołów jądrowych pstrąga w różnych stadiach spermatogenezy.

*Fosforylacja histonów a mitozy.* Badania w tym kierunku dotyczyły



głównie frakcji silnie lizynowej najłatwiejszej do otrzymywania (ekstrakcja 50%  $\text{HClO}_4$ ).

Stevely i Stocken (217, 218) wykazali, że frakcja F1 ulega fosforylacji w większym stopniu w tkankach dzielących się niż spoczynkowych. Stwierdzili oni, że histony F1 z rozproszonej chromatyny grasicy, z regenerującej wątroby, a także z hiperplastycznej nerki (po jednostronnej nefrektomii) szczura były bardziej fosforylowane niż histony izolowane z nieaktywnej chromatyny grasicy oraz z prawidłowej tkanki wątrobowej i nerkowej a zwłaszcza z erytrocytów kurczęcia znanych z niemal wyłączonej w nich syntezy RNA i DNA (tablica 3). Również frakcja F1 z komórek Ehrlicha w logarytmicznej fazie wzrostu odznaczała się znacznie wyższym stopniem fosforylacji niż w etapach późniejszych.

**Tablica 3**

Fosforylacja histonu F1 w różnych tkankach (wg 218)

Tkanka zwierzęca	Zawartość fosforanu $\mu\text{mol/mg}$ białka
Grasica szczura	22
Grasica szczura (chromatyna zbita)	10
Grasica szczura (chromatyna rozproszona)	90
Śledziona szczura	24
Mózg szczura	24
Nerki szczura (kora)	50
Nerki szczura (kora) (po jednostronnej nefrektomii)	71
Wątroba szczura prawidłowa	35
Wątroba szczura regenerująca	75
Guzy puchlinowe szczura (8 dni)	52
Guzy puchlinowe szczura (5 dni)	87
Grasica cielęcia	19
Grasica owcy	21
Nerki owcy (kora)	33
Erytrocyty kurczęcia	12

Ord i Stocken (167, 168) we frakcji silnie lizynowej z regenerującej wątroby stwierdzili niemal dwukrotny wzrost ilości reszt fosforanowych w okresie S, tj. syntezy DNA (16—24 godz. po hepatektomii). Obserwowane zwiększenie względnej aktywności właściwej  $^{32}\text{P}$  nieorganicznego badacze ci (168) wiążą raczej ze wzrostem liczby cząsteczek fosforylowanego histonu F1 niż z wyższą ilością reszt fosforanowych na cząsteczkę tego białka. Natomiast w 4—5 godz. od operacji, tj. w okresie kiedy przyspieszenie syntezy RNA i białka stawało się widoczne, nie wykryto żadnej zmiany w zawartości fosforanów ani też w specyficznej radioaktywności histonu F1. Fosforylacja histonu argininowego F3-1 nie zmieniała się w róż-

nych okresach po częściowej hepatektomii, co autorzy wiążą z wysoką zawartością -SH i -S-S- w tym histonie.

Ord i Stocken (170) opracowali sposób wyodrębniania z wątroby histonów silnie lizynowego (F1) i argininowego (F3), pozwalający usuwać nieorganiczne fosforany, a jednocześnie zapobiegający utlenianiu grup -SH. Badanie włączania  $^{32}\text{P}$  w tak oczyszczonych frakcjach F1 i F3 wątroby regenerującej wykazało, że szczyt fosforylacji dla obu frakcji przypadał w okresie intensywnej syntezy DNA. W okresie odpowiadającym pierwszej fali mitotycznej następuje obniżenie fosforylacji tych histonów nawet do wartości prawidłowych. Zmian tego rodzaju nie zaobserwowano w materiale ze szczurów poddanych adrenalektomii, która zdaniem autorów zwalnia proces regeneracji wątroby. Zwiększone zużycie fosforanów dla fosforylacji histonów jak i dla syntezy RNA w regenerującej wątrobie nie zachodzi kosztem puli ATP (170).

*Fosforylacja histonów a promieniowanie.* Szczególnie czułą na promieniowanie jonizujące okazała się fosforylacja histonów w tkankach pobudzonych do mitozy, np. w regenerującej wątrobie czy hiperplastycznej nerce (168, 218). U szczurów poddanych naświetlaniu całego ciała dawką 1000 radów promieni  $\gamma$  zaobserwowano (165) znaczne obniżenie włączania  $^{32}\text{P}$  w histony F1 grasicy co podtrzymuje sugestię, że natychmiastowe uszkodzenie biochemiczne spowodowane przez promieniowanie jonizujące lokalizuje się w jądrze komórkowym. Natomiast stopień fosforylacji histonu F3-1 w tych warunkach nie ulegał żadnej zmianie. Jest więc nieprawdopodobne, aby zahamowanie włączania fosforanów we frakcję silnie lizynową jak i w DNA pod wpływem promieniowania było spowodowane zmniejszeniem puli wysokoenergetycznych fosforanów lub obniżeniem syntezy nowego DNA czyli brakiem akceptora reszt fosforanowych.

Niedawno Ord i Stocken (170) donieśli, że napromieniowanie szczurów dawką 500 radów promieni  $\gamma$ , 30 min. przed hepatektomią powodowało pewne zwiększenie zawartości fosforanu we frakcji F3 wątroby. Fakt ten wiążą oni z obserwacją (202), że naświetlanie całego ciała wywołuje natychmiast przejściowy wzrost zawartości ATP w wątrobie. Jeśli jednak napromieniowanie zastosowano w 3 godziny po hepatektomii, to stopień fosforylacji frakcji F3 nie zmieniał się a fosforylacja w histonie F1 ulegała obniżeniu.

*Fosforylacja histonów a układy polimerazy RNA i DNA.* Stevely i Stocken (216) zwrócili uwagę, że kompleksy histonów F1 z DNA w układzie polimerazy RNA tym silniej obniżały zdolność DNA w podtrzymywaniu syntezy RNA im mniej zawierały reszt fosforanowych.

Następnie autorzy ci (218) zbadali wpływ różnego stopnia fosforylacji F1 w układzie polimerazy RNA zachowując zgodnie z sugestiami But-

lera i Chipperfielda (33) stały stosunek histon/DNA = 0,7:1 i stwierdzili niemal liniową zależność między zawartością fosforanów w histonie a matrycową aktywnością kompleksu F1-DNA.

Ord i Stocken (168) wykazali, że zwiększenie zawartości fosforanu w histonie F1 z grasicy obniża jego zdolność do hamowania układu polimerazy DNA (tablica 4).

Tablica 4

Wpływ fosforylacji na funkcję histonu F1 w układzie polimerazy DNA\*  
(wg 168)

Histon (μg)	Włączanie d8- <sup>14</sup> C-ATP w DNA (imp./100 sek.)	
	F1 (19,4 ngatomów P/mg)	F1 (52,0 ngatomów P/mg)
0	2020	2020
2	1827	2200
4	479	2010
6	37	1589
8	6	1420

\* Środowisko reakcji (0,5ml): 5,0 μmoli buforu tris, pH 7,2 5,0 μmoli KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,8 μmoli MgCl<sub>2</sub>; 0,23 μmoli EDTA; 0,3 μmoli β-merkaptocytoaminy-HCl; po 8 μmoli dCTP, dUTP i dTTP 1,4 μmoli dATP i 7,0 μmoli d8-<sup>14</sup>C-ATP; 10 μg DNA; 100 μg enzymu EC.2.7.7.7. Kolejność dodawania składników: DNA, histon, substraty, enzym.

*Fosforylacja a specyficzność histonów.* Gutierrez i Hnilica (82) przedstawili dane wskazujące na specyficzność tkankową fosforylacji histonów u szczurów. Stwierdzili oni wyraźne różnice w ufosforylowaniu lizynowych i argininowych frakcji histonowych z wątroby prawidłowej, regenerującej i nowotworowej oraz ze śledziony, przy czym stopień fosforylacji można było korelować z aktywnością metaboliczną tkanek. Był on najwyższy dla śledziony i wątroby prawidłowej (tkanek wysoko zróżnicowanych) a znacznie niższy w przypadku regenerującej wątroby i wątrobiaka, w których aktywność mitotyczna przeważała nad metaboliczną. Wprawdzie regenerująca wątroba czy wątrobiak syntetyzowały więcej histonów ale fosforylacji ulegała większa ilość histonów właśnie w tkankach prawidłowych i metabolicznie aktywnych. Zaobserwowano również zmienność tego procesu wraz z wiekiem. Bardzo młode szczury wykazywały niemal dwukrotnie większy stopień fosforylacji niż osobniki dojrzałe.

*Enzymatyczna fosforylacja histonów.* Langan i Smith (129) wyodrębnili z wątroby cielęcej enzym, który specyficznie przenosił reszty fosforanowe z ATP na grupy hydroksylowe seryny histonów grasicy oraz protamin łososia i śledzia. Enzym ten nie fosforylował białek niehistonowych i był różny od kinazy katalizującej ufosforylowanie kazeiny i fos-



fityny. Fosfokinaza histonowa, zdolna do fosforylowania wszystkich frakcji histonowych, wykazywała szczególne powinowactwo do histonu silnie lizynowego.

Dalsze badania (125) wykazały stymulujące działanie cyklicznego adenylo-3',5'-monofosforanu na proces fosforylacji histonów. Ponieważ cykliczny AMP znany jest jako mediator wielu reakcji hormonalnych z wyjątkiem tych, które są blokowane przez inhibitory syntezy RNA (194), można przypuszczać, że stymulowanie fosforylacji histonów sprzyja hormonalnej indukcji syntezy RNA. Ten mechanizm mógłby obejmować modyfikację interakcji histon-DNA poprzez fosforylację histonów hamujących matrycową aktywność DNA. Ostatnie doświadczenia L a n g a n a (124) potwierdziły te przypuszczenia. Stwierdził on, że w 2 godziny po dootrzewnowym wstrzyknięciu szczurom roztworu glukagonu wzrasta 10—20-krotnie stopień fosforylacji reszt seryny w silnie lizynowym histonie wątroby. Według L a n g a n a (124) fosforylacja histonu może być mechanizmem, za pomocą którego glukagon i być może inne hormony, które działają za pośrednictwem 3',5'-cyklicznego AMP, indukują syntezę RNA w tkankach pobudzonych. Wzrost fosforylacji frakcji F1 pod wpływem glukagonu nie ulegał zablokowaniu przez aktynomycynę D czy cykloheksimid. Insulina zwiększała fosforylację histonów w wątrobie podobnie jak glukagon, natomiast hydrokortyzon ani ACTH nie dawały tego efektu.

M i y a m o t o i wsp. (147) wykazali, że *in vitro* adenylo-3',5'-monofosforan w stężeniu  $5 \times 10^{-7}$  M/l powoduje 4-krotne zwiększenie fosforylacji histonów, katalizowanej przez częściowo oczyszczony enzym z mózgu królika. Jest to pierwszy bezpośredni dowód biochemicznego działania cyklicznego AMP w mózgu tłumaczący tak wysoką w tej tkance aktywność cyklazy adenilowej i fosfodwuesterazy cyklicznego AMP.

### III. Metabolizm histonów

Znaczenie histonów jako regulatorów metabolizmu komórkowego czyni zrozumiałym zainteresowanie ich biosyntezą.

#### 1. Miejsce biosyntezy histonów

Występowanie histonów w jądrze skierowało uwagę badaczy przede wszystkim na tę podstrukturę komórki. Rozważano możliwość syntezy histonów na chromosomach jądrowych, na mRNA, na rybosomach jądrowych, w jąderku i na jądrowym retikulum rybonukleoproteidowym (por. poz. 116).

Szczególnie wnikliwe są badania Reida i wsp. (186, 187). Posługując się systemem Allfreya i wsp. (5) do włączania aminokwasów w białka jąder komórkowych grasicy cielęcej autorzy ci badali tworzenie się oraz charakter fizykochemiczny nowosyntetyzowanych histonów silnie lizynowych. Okazały się one identyczne z natywnymi histonami F1 grasicy pod względem składu aminokwasowego, zachowania się w toku elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (188), chromatografii jonowymiennej na CM-celulozie (101), a także na Amberlite IRC-50 (199). Reid i wsp. (187) potwierdzili dane (2) o nieco słabszym inhibitorowym wpływie puromycyny na biosyntezę histonów niż innych białek oraz wykazali, że antybiotyk ten najslabiej hamuje syntezę histonów silnie lizynowych.

Pojawiły się jednak również dane wskazujące na lokalizację biosyntezy histonów w cytoplazmie. Gallwitz i Mueller (69, 70) stwierdzili *in vitro* w układzie bezkomórkowym z synchronizowanych hodowli komórek HeLa, że jądra komórkowe z tych hodowli były niezdolne do syntezy histonów. Natomiast frakcja mikrosomalna izolowana z cytoplazmy komórek HeLa w fazie S powodowała powstawanie kwasorozpuszczalnych białek, które podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym zachowywały się tak jak  $^{14}\text{C}$ -histony z syntetyzujących DNA jąder komórkowych HeLa znakowanych *in vivo*.

Za cytoplazmatyczną syntezą histonów przemawiają też w pewnym stopniu badania Namera i Lindsay'a (154). Po 5-minutowej inkubacji z  $^{14}\text{C}$ -argininą i  $^3\text{H}$ -tryptofanem wczesnych embrionów *Strongylocentrotus purpuratus* zaobserwowali oni bardzo intensywne włączanie argininy (w przeciwieństwie do tryptofanu) w wolno sedymentujące polisomy cytoplazmatyczne. Zdaniem autorów te właśnie s-polisomy są miejscem syntezy histonów chromosomowych.

## 2. Czas syntezy histonów

Histony występują w komórce w połączeniu z DNA i z tego względu ważne jest ustalenie czasu ich biosyntezy w stosunku do czasu biosyntezy DNA.

Badania cytochemiczne wykazały, że synteza histonów przebiega równomiernie z syntezą DNA (27, 184). Wyniki doświadczeń biochemicznych były mniej jednoznaczne. Szereg prac (184, 192, 208) wskazywało na sprzężenie czasowe syntezy histonów a także ich frakcji z syntezą DNA. W komórkach *Tetrahymena pyriformis* zawartość obu składników, DNA i histonu, obniżała się dwukrotnie podczas podziału, a po podziale wzrastała o 85% (86), co sugerowało, że histony syntetyzują się prawdopodobnie przed lub równocześnie z syntezą DNA. Jednak dla zsynchronizowa-

nych hodowli *Tetrahymena pyriformis* nie zaobserwowano sprzężenia syntezy histonów z okresem replikacji DNA (146).

Szereg wcześniejszych doniesień wskazywało również, że w pewnych warunkach synteza histonów nie towarzyszy syntezie DNA. Hamowanie 5-metylotryptofanem syntezy DNA w komórkach HeLa, nie narusza syntezy histonów (223). W komórkach mozaiki tytoniowej potraktowanych 5-fluorodezoksyurydyną synteza histonów biegnie mimo ustania syntezy DNA (63). Syntezę kilku frakcji histonowych obserwuje się też po zahamowaniu syntezy DNA przez ametoptyrynę czy tymidynę (208). Według Chalkley'a i Maurera (40) w tkankach nie syntetyzujących DNA (błona śluzowa macicy niedojrzałych cieląt) oraz w komórkach w których syntezę DNA zahamowano 5-fluorodezoksyurydyną tworzą się jedynie histony argininowe a nie stwierdza się syntezy histonów lizynowych. Te a także inne dane (240) sugerują, że synteza histonów lizynowych jest silniej sprzężona z replikacją DNA niż synteza innych histonów. Sadgopal i Bonner (197) badając komórki HeLa zsynchronizowane w logarytmicznej fazie wzrostu potwierdzili różny stopień zależności syntezy poszczególnych histonów od syntezy DNA, wykazali też jednak, że nawet w nieobecności syntezy DNA wszystkie frakcje histonowe są syntetyzowane.

Gurley i Hardin (78) badając zsynchronizowaną hodowlę tkanek chomika stwierdzili, że synteza 5 frakcji histonowych (F1, F2a1, F2a2, F2b i F3) zachodzi głównie w fazie S, nie potwierdzili jednak obserwacji Chalkley'a i Maurera (40) o różnicach w syntezie poszczególnych frakcji po zahamowaniu syntezy DNA.

Ci sami autorzy (79) donieśli następnie o różnicach w okresach półtrwania frakcji histonowych w komórkach jajnikowych chomika. Zaobserwowali oni, że okres półtrwania histonu F1 wynoszący w fazie logarytmicznej 74 godziny skraca się do 31 godzin w okresie syntezy stabilnego RNA, po czym po zatrzymaniu tej syntezy wydłuża się do 47 godzin. Autorzy ci sądzą, że histon F1 nie tylko jak to sugerowali inni (136) uczestniczy w utrzymaniu struktury chromatynowej, ale pełni także funkcję dynamiczną, związaną z syntezą stabilnego RNA. Zgadza się to z wcześniejszymi obserwacjami, że mutant *Xenopus laevis*, niezdolny do syntezy rybosomowego RNA, nie zawiera histonów lizynowych (24), oraz, że zahamowanie syntezy RNA w retikulocytach kurcząt, pod wpływem aktynomycyny D hamuje silniej biosyntezę histonów F1 i F2b niż innych frakcji (64).

Kontrowersyjne okazały się również wyniki badań nad powiązaniem czasowym biosyntezy DNA i histonu w regenerującej wątrobie. Holbrook i wsp. (91) oraz Butler i Cohn (34) obserwowali wzrost syntezy histonów w kilka godzin przed replikacją DNA. Według Taka i



i wsp. (222) natomiast synteza histonów jest ściśle sprzężona z syntezą DNA przynajmniej podczas I fali replikacji DNA. Zdaniem T a k a i i wsp. (222) odmienne wyniki badań innych autorów przypisać należy zanieczyszczeniu ich preparatów histonowych białkiem niehistonowym.

S a d g o p a l i B o n n e r (197) podsumowując doświadczenia własne oraz innych badaczy doszli do wniosku, że powiązania między syntezą histonów i DNA są różne w różnych stanach fizjologicznych i rozwojowych komórki, a mianowicie: komórki wolno dzielące się i niedojrzałe lub niewysoko zróżnicowane cechują się ściśle sprzężoną syntezą histonów i DNA, komórki nie dzielące się i wysoko zróżnicowane syntetyzują tylko histony argininowe, a w komórkach szybko dzielących się i niezróżnicowanych część syntezy wszystkich histonów jest niezależna od syntezy DNA i przebiega w fazie G 1. Autorzy sądzą, że te różnice w przebiegu syntezy dwóch składników chromosomowych są raczej przyczyną niż skutkiem zmian w obrazie podziału czy innych biologicznych procesów metabolicznie różnych komórek.

Ciekawe są wyniki badań (83, 84) nad zachowaniem się histonowych składników chromatyny podczas wzrostu komórek i mitozy. Badano hodowle komórek ssaków znakowane w ciągu kilku generacji  $^3\text{H}$ -tymidyną oraz  $^{14}\text{C}$ -lizyną i następnie hodowane w środowisku nieradioaktywnym. Okazało się, że chromatyny komórek interfazowych i w mitozie nie różnią się ani zawartością histonów i DNA, ani stosunkiem wspomnianych radioaktywności, ani też ilościami poszczególnych podfrakcji histonów. Wskazuje to na brak jakiegokolwiek odwracalnej dysocjacji większej frakcji histonowej z chromatyny podczas wzrostu i mitozy. Jedynie odsetek białka niehistonowego był wyższy w chromatynie komórek mitotycznych w porównaniu z interfazowymi. H a n c o c k (83) podkreśla jednak, że stosowane przez niego metody nie pozwalały uchwycić modyfikacji struktury I-rzędowej histonów w postaci acetylacji, metylacji czy fosforylacji.

### 3. Intensywność przemiany histonów

Metaboliczną stabilność DNA stwierdzono dla wielu różnorodnych systemów biologicznych (22). Występowanie DNA w kompleksie z histonami sprowokowało badania aktywności metabolicznej histonów.

*Metabolizm histonów całkowitych i ich frakcji.* Stopień przemiany histonów całkowitych jest stosunkowo niski w tkankach spoczynkowych a wyższy w tkankach mitotycznie aktywnych. P i h a i wsp. (180) porównywali u myszy metabolizm histonów w mózgu, w którym podziały komórkowe są bardzo rzadkie, oraz w wątrobie. Po wprowadzeniu do otrzewnowo  $^{14}\text{C}$ -lizyny oznaczano okres konieczny do spadku do połowy

specyficznej aktywności wbudowanego aminokwasu. W mózgu znaleziono frakcje histonów dla których okres ten wynosił 18, 56, 93 i 117 dni, a w wątrobie — frakcje o półtrwaniu rzędu 58 i 105 dni, co dowodzi metabolicznej stabilności histonów odpowiadającej stabilności DNA.

Liczne dane (3, 32, 90, 163, 164, por. też poz. 116) wskazują, że frakcje histonowe różne pod względem chemicznym i biologicznym jak również frakcje o jednolitym składzie i funkcji mogą różnić się aktywnością metaboliczną. Jednakże Laurence i Butler (131) nie stwierdzili znaczniejszych różnic w włączaniu aminokwasów *in vitro* w 4 typowe frakcje o jednolitym składzie i funkcji mogą różnić się aktywnością metaboliczną. Dick i Johns (51, 52) badając *in vivo* włączanie  $^3\text{H}$ -lizyny w 5 frakcji histonowych z grasicy szczurów zaobserwowali jednakowy stopień odnowy badanych histonów.

*Metabolizm grup acetylowych w histonach.* Metaboliczna integralność kompleksu DNP skłaniała do porównania wymiany grup modyfikujących strukturę histonów z ogólną przemianą cząsteczek histonowych. Byvoet (35) badając *in vivo* włączanie  $^{14}\text{C}$ -alaniny i  $^3\text{H}$ -octanu w histony tkanek prawidłowych i nowotworowych stwierdził, że włączanie octanu było silniejsze dla histonów argininowych i umiarkowanie lizynowych niż dla silnie lizynowych. Histon silnie lizynowy F1, w którym około 80% N-końcowych reszt aminokwasowych jest zamaskowana wykazuje też najszybszą wymianę N-końcowych reszt acetylowych. Dane te potwierdzają, że histon F1 występuje głównie w formie acetylowanej i są w zgodzie z najsłabszą dla tego histonu zdolnością hamowania *in vitro* syntezy RNA zależnej od DNA (152).

Okres półtrwania radioaktywnych grup N-acetylowych był zbliżony dla badanych tkanek prawidłowych i nowotworowych, natomiast okres półtrwania wbudowanej w histony  $^{14}\text{C}$ -alaniny, z reguły znacznie dłuższy niż octanu, był różny dla różnych tkanek. Wyjątek stanowił jedynie wątrobiak Novikoffa, w którym przemiana histonów argininowych i umiarkowanie lizynowych była praktycznie równa wymianie grup acetylowych. Nie jest wykluczone, że ten typ nowotworu pozbawiony jest acetylujących układów enzymatycznych. Badania Byvoeta (35) wskazują, że N-końcowe grupy aminowe histonów podlegają odwracalnej acetylacji a proces wymiany reszt acetylowych jest szybszy w wątrobie niż w tkankach aktywnych mitotycznie.

#### 4. Wpływ histonów na niektóre systemy enzymatyczne

Hipoteza Stedmanów (214, 215) przypisujących histonom rolę regulatorów genowych znalazła poparcie w licznych doświadczeniach dowodzących, że białka te zmniejszają zdolność matrycową DNA w biosyntezie



mRNA chromatyny, a także hamują tworzenie łańcuchów polipeptydowych (por. poz. 116).

*Wpływ histonów na syntezę RNA in vitro.* Synteza mRNA *in vitro* jest hamowana silniej przez histony argininowe oraz wysokocząsteczkowe sztuczne polikationy niż przez histony lizynowe, kationy niskocząsteczkowe czy produkty trawienia histonów (203, 224). Zahamowanie przez polikationy funkcji polimerazy RNA okazało się proporcjonalne do sumy adeniny i tyminy w matrycowym DNA a produkty działania polimerazy RNA w obecności polikationów były mniejsze i wykazywały odmienny stosunek oraz sekwencję zasad azotowych (203). Stosunek  $\frac{A+U}{C+G}$  dla RNA syntetyzowanego na matrycy DNA typu AT wynoszący normalnie 3,15 przyjmował wartość 2,08 w obecności histonu lizynowego i 4,53 w obecności frakcji argininowej.

Skalka i wsp. (203) badali zmiany w zawartości niektórych sekwencji dwunukleotydowych w RNA syntetyzowanych na matrycach DNA, typu AT i GC w obecności różnych polikationów jako inhibitorów. Okazało się, że zmiany w zawartości dwunukleotydów dość wyraźnie zależą od rodzaju inhibitora, chociaż nie zaobserwowano wyraźnej korelacji między oddziaływaniami histonu argininowego i lizynowego a odpowiednimi polikationami, tj. protaminą i polilizyną (tablica 5).

**Tablica 5**

Wpływ polikationów na włączanie GMP do poliribonukleotydów otrzymanych na matrycy DNA (typ GC) z *M. lysodeikticus* (wg 203)

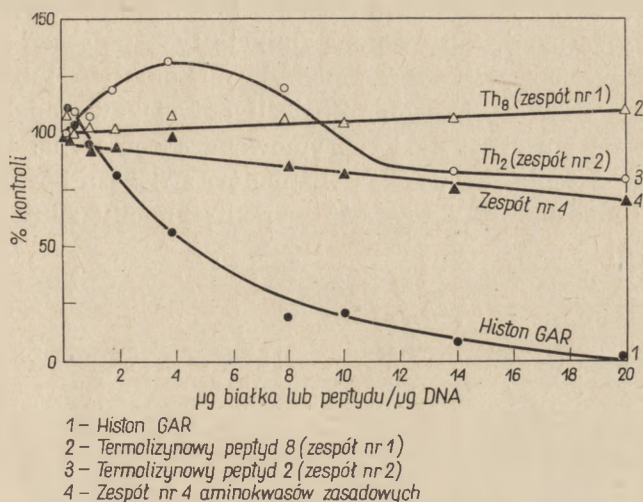
Badane pary dwunukleotydowe	Frakcja całkowitej radioaktywności				
	Bez polikationu	Histon lizynowy (10µg)	Poli-L-lizyna (0,309g)	Histon argininowy (3,5µg)	Protamina (0,25µg)
C <sub>F</sub> G	0,392	0,354	0,316	0,273	0,210
A <sub>F</sub> G	0,136	0,169	0,221	0,158	0,140
G <sub>p</sub> G	0,315	0,325	0,291	0,427	0,540
U <sub>F</sub> G	0,157	0,152	0,172	0,142	0,110

Skład zasad oraz brak równoważności w wielu parach dwunukleotydowych RNA tworzonego w warunkach zahamowania, sugeruje, że jeden z komplementarnych łańcuchów DNA był nieaktywny bądź też odczytywany z mniejszą wydolnością. Ci sami autorzy (203) stwierdzili ponadto różny wpływ nierozfrakcjonowanych histonów z różnych narządów szczura na rodzaj dwunukleotydowych sekwencji RNA syntetyzowanych na matrycy DNA z gruczołów jądrowych szczura. Wyniki omówionych do-



świadczeń skłaniają do spekulacji co do histonów jako regulatorów genowych.

Do nieco innych wniosków prowadzą jednak wyniki badań z laboratorium Buscha (150), które ilustruje rysunek 6.



**Rys. 6.** Wpływ histonu GAR (glicynowo-argininowego) i peptydów zawierających zespoły aminokwasów zasadowych na aktywność matrycową DNA z grasicy cielęcej w układzie polimerazy RNA z *M. luteus*

Mieszanina reagująca zawierała w końcowej objętości 0,12ml:12,5µmoli buforu tris, pH 7,6, 0,1µmoli ATP, GTP i CTP, 0,31µmoli  $MnCl_2$ , 5µg DNA grasicy cielęcej, 1 jednostkę enzymu z *M. luteus*, 0,12µmoli 2- $^{14}C$ -UTP (specyficzna aktywność  $2,7 \times 10^8$  imp./min./µmol) i wykazane ilości histonu GAR bądź peptydów termolizynowych. (Wg 150)

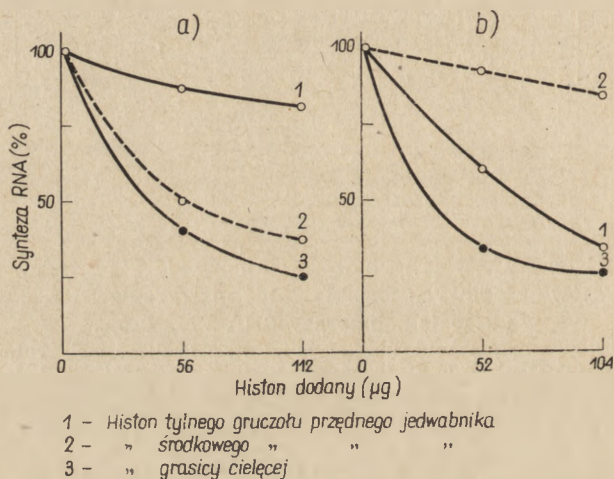
Zdaniem tej grupy badaczy zahamowanie polimerazy RNA przez histon GAR nie jest związane ze zobojętnianiem ujemnych ładunków DNA przez dodatnie grupy histonów ale ze strąceniem sztywnych hydrofobowych kompleksów DNA-histonów z roztworu. Rozpuszczalność tych kompleksów w wodzie mogłyby obniżać hydrofobowe obszary w karboksylowej połowie frakcji GAR (por. poz. 15).

Yoshida i Shimura (241) badali układ polimerazy RNA z *E. coli* i chromatyny z gruczołów tylnych (syntetyzujących fibroinę) lub środkowych (produkujących serycynę) larwy jedwabnika wprowadzając jako represory histony homologiczne bądź heterologiczne (z niejednoimiennych gruczołów jedwabnika lub z grasicy cielęcej) (rysunek 7).

Stopień zahamowania syntezy RNA w układach z obu typami chromatyn był nieznaczny w obecności histonów jednoimiennych, a intensywny w przypadku histonów obcych zwłaszcza pochodzących z grasicy. Przyczyny zaobserwowanej represji autorzy dopatrują się w pewnej swoistości wiązań między DNA i histonami.

Aszmarin i wsp. (10) badali *in vitro* syntezę RNA na dezoksynuk-

leohistonach związanych z metafosforanem (DHM) lub z kazeiną (DHK). Podobnie jak w doświadczeniach L a n g a n a i S m i t h a (128) kompleksy te podtrzymywały syntezę RNA zależną od DNA, przy czym zespoły zawierające frakcje umiarkowanie lizynowe odznaczały się tą zdolnością nawet wtedy gdy zawartość histonu przewyższała dwukrotnie ilość DNA. Autorzy zasugerowali dwojaką funkcję tych połączeń fosforowych: podwyższenie rozpuszczalności kompleksów histon-DNA lub rozluźnienie wiązań między DNA i histonem. Znaleźli oni ciekawe analogie między tymi kompleksami a aktywną i reprimowaną chromatyną. W obu przypadkach podwyższenie zawartości polianionów zwiększa bowiem stan rozproszenia a jednocześnie aktywność w podtrzymaniu syntezy RNA zależnej od DNA.



**Rys. 7.** Wpływ histonów na syntezę RNA kierowaną przez chromatynę

a) Chromatyna tylnego gruczołu przedniego jedwabnika zawierająca 28μg DNA; b) chromatyna środkowego gruczołu przedniego zawierająca 26μg DNA (Wg 241)

**Wpływ histonów na syntezę RNA *in vivo*.** Egzogenne histony wpływają podobnie jak aktynomycyna na rozwój embrionalny płazów (31) i kurcząt (140, 201). Histony, głównie argininowe i polilizyna analogicznie do aktynomycyny powodują w oocytach płazów retrakcję pętli w chromosomach szczoteczkowych i zahamowanie syntezy RNA (96).

Te dane o hamującym wpływie histonów na syntezę RNA nie znalazły jednak potwierdzenia w biochemicznych i autoradiograficznych doświadczeniach F i c q (61). Badała ona wpływ histonów homo- i heterologicznych a także polilizyny i aktynomycyny na syntezę RNA podczas oogenezy u *Asterias rubens*. Okazało się, że spośród stosowanych substancji tylko aktynomycyna hamowała włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny w RNA oocytów, i to na poziomie jąderka, a później w cytoplazmie. Histony hetero- i homologiczne oraz polilizyna wbrew oczekiwaniom stymulowały ten proces.

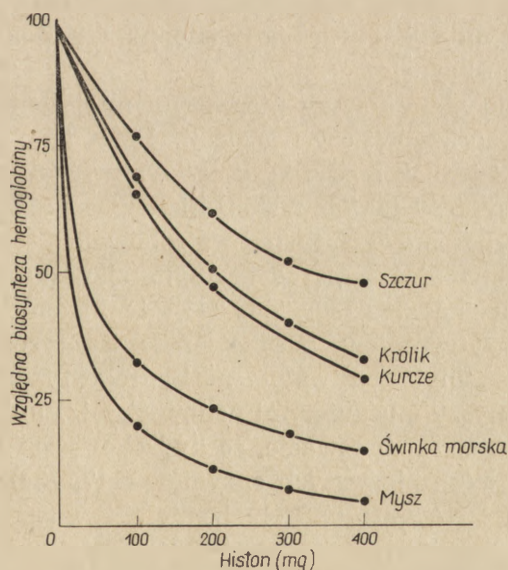


Desai i Tencer (50) zajmowali się wpływem histonów i polilizyny na włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny w RNA chromosomów olbrzymich ślini-  
nek owadów dwuskrzydłych. Autorzy wykazali, że histony lizynowe gra-  
sicy cielecej, a także polilizyna, wstrzyknięte larwie gromadziły się wzdłuż  
DNA chromosomów politenicznych i hamowały włączanie radioaktyw-  
nych prekursorów w RNA i w DNA. Zahamowanie to było proporcjonal-  
ne do stężenia polikationów. Histony zapobiegały również indukowanemu  
przez ekdyson tworzeniu nowych pufów w chromosomach olbrzymich.

*Histony a synteza białka w układzie bezkomórkowym.* Wiadomo, że  
histony podobnie jak syntetyczne polipeptydy zasadowe hamują włączanie  
aminokwasów (4, 29), natomiast DNA i syntetyczne polianiony stymulują  
ten proces (67) w izolowanych jądrach komórkowych czy w obecności  
rybosomów jądrowych. Sugeruje to, że histony i DNA mogą uczestniczyć  
w fizjologicznej kontroli syntezy białek jądrowych.

Berlinguet i Normand (23) donieśli, że histony jak również  
polilizyna hamują niemal kompletnie włączanie *in vitro* fenyloalaniny  
w rybosomowe białka wątroby. Najsilniejszym inhibitorem okazała się  
polilizyna w stanie wysokopolimeryzowanym. Równoważne ilości dodat-  
nio naładowanych monomerów nie wywierały żadnego efektu. Inhibito-  
rowe działanie polikationów autorzy wiążą z tworzeniem przez te sub-  
stancje kompleksów z mRNA czy sRNA.

Kruh i Labie (123) stwierdzili hamujący wpływ histonów na poza-  
komórkową syntezę hemoglobiny oraz RNA retikulocytów. Wpływ histo-



Rys. 8. Działanie histonów całkowitych jąder komórkowych wątroby różnych ga-  
tunków zwierząt na pozakomórkową biosyntezę hemoglobiny królika (Wg 123)



nów na te procesy zmieniał się wraz z pochodzeniem histonów (rysunek 8).

Najsilniejsze działanie inhibitorowe wykazywały histony lizynowe (F1 i F2b). Hamowanie biosyntezy hemoglobiny autorzy wiąźali z interakcją histonów z mRNA, co miało powodować destrukcję polisomów.

#### 5. Histony a działanie hormonów

Badania ostatnich lat wskazują, że hormony oddziałując z chromatyną jąder komórkowych powodują stymulację syntezy RNA (14, 103, 212). Zaobserwowano też stymulację włączania aminokwasów w jądrach komórkowych pod wpływem kortyzolu (49).

W pracowni Sekerisa (16, 17, 139) wykazano, że kortyzol stymulujący w izolowanych jądrach komórkowych aktywność polimerazy RNA wiąże się głównie z niehistonowymi białkami jądrowymi, a tylko częściowo z histonami. Podobnie wiąże się też 17 $\beta$ -estradiol (110) i kortyzon (149).

Salganik i wsp. (198) badali chromatynę całkowitą (142) oraz reprimowaną i aktywną (7, 68) z wątroby szczurów, którym w 4 dni po adrenalektomii wstrzykiwano dootrzewnowo hydrokortyzon. Stwierdzili oni po indukcji hydrokortyzonowej zwiększenie ilości chromatyny aktywnej przy niezmienionej ilości RNA i białka niehistonowego w jądrach. Rosła też w DNA ilość grup fosforanowych wiążących błękit toluidynowy oraz względna lepkość chromatyny. Fakty te autorzy przypisywali uwolnieniu grup fosforanowych blokowanych przez histon, albo ich zwiększonej dostępności na skutek interakcji hormonów z histonami prowadzących do zmian konformacji cząsteczek białkowych (204). Wolne miejsca na DNA mogły stawać się dostępne dla polimerazy RNA, co umożliwiałoby transkrypcję.

Wciąż pozostaje niejasne, czy pierwszym miejscem działania hormonów jest proces transkrypcji czy translacji. Hanoune i Feigelson (85) nie stwierdzili jednak modyfikującego wpływu glikokortykosterydów na intensywność syntezy jakiejś frakcji histonowej czy specyficznej podjednostki białek rybosomowych tkanki wątrobowej.

Należy też wspomnieć o paradoksalnym zjawisku zaobserwowanym w laboratorium Irvina (36, 238, 242, 243), że histony hamują indukcję enzymów (pirolazy tryptofanu, aminotransferazy tyrozyny i hydroliazy dezaminującej treoniny) pod wpływem hydrokortyzonu, ale pobudzają ich aktywność u myszy z usuniętymi nadnerczami. Punktem wyjścia tych badań były wcześniejsze obserwacje, że hydrokortyzon i kortyzon zwiększają aktywność dwóch pierwszych enzymów (117, 134) oraz, że kortyzon stymuluje syntezę RNA (60, 76). Pobudzenie aktywności enzymów wywoływały histony całkowite i ich frakcje, zwłaszcza silnie lizynowe, a także siarczany protaminy oraz poli-lizyna, -alanina, -tyrozyna i -arginina (37, 243).

Caffery i wsp. (37) wykorzystując badania Schimke'ego i wsp. (200) stwierdzili, że aktywacja pirolazy tryptofanu i aminotransferazy tyrozyny przez histony była wynikiem raczej obniżonej degradacji niż zwiększonej syntezy enzymów. Na podstawie wniosków Kenney'a (107), że w degradacji aminotransferazy tyrozyny uczestniczy jakiś polipeptyd o krótkim okresie półtrwania Caffery i wsp. (37) sądzą, że polikationy hamując syntezę RNA blokują syntezę polipeptydu lub polipeptydów, zaangażowanych w degradację badanych enzymów.

## 6. Histony w spermiogenezie i embriogenezie

Jednym z najbardziej pasjonujących problemów współczesnej biologii jest zróżnicowanie komórkowe, tkwiące fundamentalnie w zmianach genetycznej aktywności DNA. Wytwarzanie nowych odmian makromolekuł przez komórkę embrionu prowadzi do wysokiej specjalizacji tkankowej i w konsekwencji do powstania nowego indywiduum w obrębie danego gatunku. Jednak mechanizm tych unikalnych przekształceń nie jest znany.

Przypisywana histonom rola regulatorów genetycznych blokujących zbędne w danej chwili odcinki DNA zawierającego całość informacji dla organizmu kieruje zainteresowanie na zachowanie się histonów w spermiogenezie i embriogenezie.

Metodami cytochemicznymi różnicuje się 4 typy białek zasadowych: histony somatyczne, dojrzałe, histony argininowe, protaminę i histony przejściowe, tzw. histony bruzdkowania (por. poz. 116). Ustalane tymi metodami zmiany składu białkowego nukleoproteidów w cyklu życiowym myszy, ślimaka i muszki owocowej obrazuje rysunek 9.

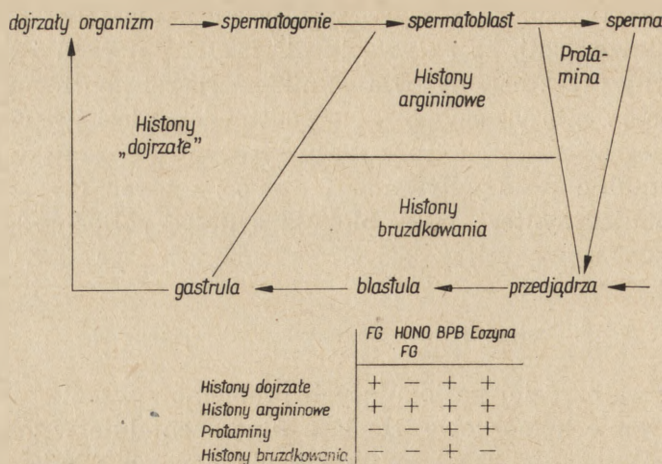
Spermiogeneza zawiera dwa stadia: 1) zastąpienie histonu somatycznego o prawie równym odsetku argininy i lizyny histonem spermatoblastów, argininowym oraz 2) pojawienie się protaminy w dojrzałej spermie.

Po zapłodnieniu komórki jajowej przebiega proces odwrotny: protaminy spermy znikają, a pojawienie się typowych somatycznych histonów w momencie gastrulacji poprzedza tworzenie się histonów bruzdkowania, łączących w sobie własności histonów i protamin.

Odmienny charakter zachowania się histonów w spermiogenezie i wczesnej embriogenezie stwierdzono (227, 228, 229, 230) u kraba dziesięcionoga *Emerita analoga* (rysunek 10).

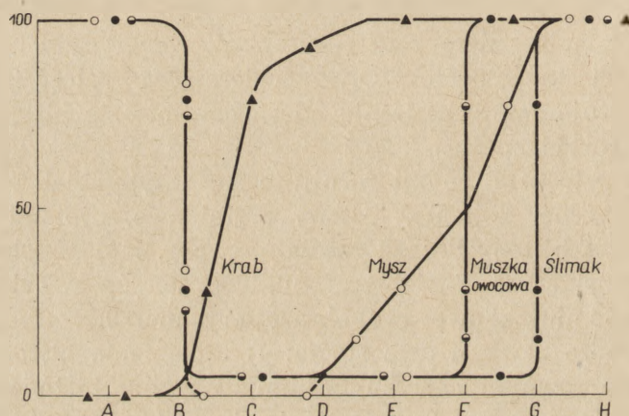
Zaobserwowano przemieszczanie się białek zasadowych z jądra do cytoplazmy w komórkach spermatoblastów podczas ich dojrzewania. Jądra komórkowe dojrzałej spermy nie zawierały cytochemicznie zdefiniowanych histonów ani protamin, a zasadowe białka cytoplazmatyczne zachowały





Rys. 9. Przemiany histonów podczas cyklu życiowego u *Helix aspersa*

FG — barwienie zieleniną trwałą, BPB — barwienie błękitem bromofenolowym, HONO — proces dezaminacji i acetylacji. (Wg 26)

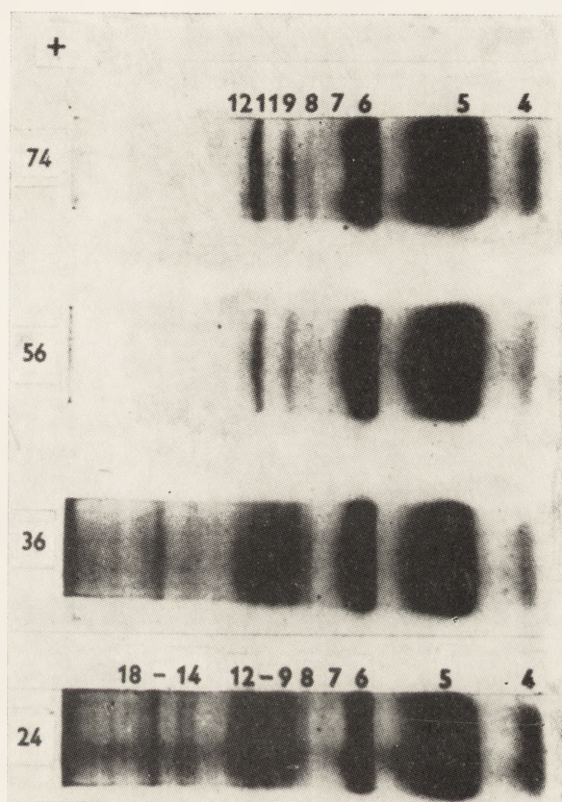


Rys. 10. Schemat zmian w obrazie histonów w jądrach dojrzałej spermy i po zapłodnieniu u myszy, muszki owocowej, ślimaka oraz u kraba *Emerita analoga*

Na osi rzędnych kwasochłonność jąder z maksymalną wartością wyrażoną przez 100; na osi odciętych stadia rozwojowe tych organizmów: A — dojrzała sperma, B — wczesne przedjądrze, C — późne przedjądrze, D — zygota, E — bruzdkowanie, F — blastula, G — gastrula, H — organizm dojrzały. (Wg 229)

\* wywały się w toku elektroforezy w żelu poliakrylamidowym analogicznie do wzorcowych histonów grasicy cięcej. Dane te potwierdzały wcześniejsze doniesienia (27, 41, 47) o obecności w cytoplazmie różnych dziesięcionogów białek zasadowych (prawdopodobnie somatycznych histonów) nazwanych dekapodinami. Natomiast tuż po zapłodnieniu w jądrach spermy kraba pojawiała się klasa słabo zasadowych białek, różniących się barwnością od histonów typu dojrzałego i protamin. Białka





**Rys. 11.** Elektroferogramy w żelu poliakrylamidowym histonów z różnych stadiów rozwojowych jeżowca (24, 36, 56 i 74 godz. rozwoju, 7—8)  
(czas doświadczenia 2 godz. (Wg 233))



te pozostawały aż do późnego stadium przedjądrza, po czym w chromosomach obecne były histony nieodróżnialne cytochemicznie od somatycznych.

Asao i Ishida (8) donieśli o wyraźnym zwiększeniu ilości histonów oraz ich syntezy w stadium późnej gastruli u *Triturus pyrrhogaster*. Wzrostowi ilości histonów w jądrze towarzyszył spadek zawartości białek zasadowych w cytoplazmie, co sugerowałoby wędrówkę cytoplazmatycznych białek zasadowych do jąder komórkowych.

Vorobyev i wsp. (73, 231, 232, 233, 234) badając embriony jeżowca *Strongylocentrotus drobachiensis* oraz ryby *Misgurnus fossilis* stwierdzili najbardziej istotne różnice w zachowaniu się elektroforetycznym między histonami, zwłaszcza argininowymi, izolowanymi w stadium blastuli oraz gastruli (rysunek 11). Histony pochodzące z późniejszych okresów embriogenezy cechowały się obniżeniem zawartości frakcji argininowych oraz stosunkiem  $Liz/Arg = 1,98$  wobec odpowiedniej wartości 1,8 dla histonów wczesnej blastuli.

Dane te potwierdzały obserwację Repsisa (189) nad zachowaniem się w żelu poliakrylamidowym histonów z kilku stadiów embrionalnych (np. zapłodnione jajo, blastula) *Lytechinus variegatus*.

W czasie embriogenezy zmieniała się też intensywność włączania aminokwasów do poszczególnych frakcji histonów. W stadium wczesnej blastuli frakcje nr 4 i 6 histonu silnie lizynowego włączały aminokwasy znacznie intensywniej niż frakcja nr 5, w późnej blastuli różnice te ulegały zatarciu, a w okresie gastruli najsilniej włączała aminokwasy frakcja nr 5.

Vorobyev i wsp. (232) udowodnili też, że histony homo- i heterologiczne obniżają intensywność syntezy RNA w embrionach jeżowca a ponadto hamują ich rozwój. Spośród histonów homologicznych największą aktywność hamującą okazywały histony z dojrzałej spermy jeżowca, a najmniejszą — histony z późnej blastuli. Różnice te można wiązać z różną zawartością argininy, zwłaszcza że spośród frakcji histonów grascicy cięłej najsilniej hamowała argininowa (F3), a najslabiej silnie lizynowa. Acetylowane histony grascicy cięłej nie wpływały w ogóle na rozwój embrionalny jeżowca co wskazywałoby, że inhibitorowa funkcja histonów wiąże się nie tyle z ich naturą polikationową, ile ze specyficzną strukturą tych białek.

Kischer i Hnilica (111) badając histony podczas organogenezy (skóry, wątroby i mózgu) 7-14-dniowych embrionów kurczęcia stwierdzili ich pełną identyczność pod względem składu aminokwasowego i elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, a także znaczne podobieństwo do histonów grascicy cięłej. Zdaniem autorów histologicznemu zróżnicowaniu w nieco późniejszym rozwoju kurczęcia nie towarzyszyły większe ilościowe zmiany w składzie histonów.



Regulatorowy udział histonów w embriogenezie reprezentowałyby zapewne ich najważniejszą funkcję biologiczną. Niestety mechanizm za pomocą którego białka te modyfikują matrycową aktywność DNA nadal jest daleki od rozszyfrowania. Gdyby histony były permanentnymi represorami funkcji genetycznej DNA, to derepresję genów mogłyby prowokować bądź zmiany konformacji tych białek, bądź ich reakcje z innymi wielko- czy niskocząsteczkowymi związkami (np. białkami niehistonowymi). I w jednym i w drugim przypadku należałoby jednak oczekiwać od czynnika derepresorowego zdolności rozpoznawania sekwencji nukleotydowej obszaru, który ma ulec odhamowaniu. Nie wykluczone jest również regulowanie funkcji histonów poprzez zmiany strukturalnej organizacji nitek chromatynowych (196).

#### LITERATURA

1. Adams D. H., Field E. J., *Lancet* **2**, 714 (1962).
2. Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 786 (1964).
3. Allfrey V. G., Littau V. C., Mirsky A. E., *J. Cell Biol.* **21**, 213 (1964).
4. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II*, **21**, 3 (1958).
5. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Osawa S., *J. Gen. Physiol.* **40**, 454 (1957).
6. Allfrey V. G., Pogo B. G. T., Littau V. C., Gershey E. L., Mirsky A. E., *Science* **159**, 314 (1968).
7. Arbuzova G. S., Gryzanova I. M., Morozova J. M., Salganik R. I., *Mol. Biol.* **2**, 308 (1968).
8. Asao T., Ishida J., Histones and Gene Function, The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969, str. 137.
9. Aszmarin I. P., Komkova A. I., *Biochimija* **32**, 640 (1967).
10. Aszmarin I. P., Komkova A. I., Pirogova E. A., *Mol. Biol.* **2**, 826 (1968).
11. Aszmarin I. P., Muratczajeva P. S., *Vestn. Leningr. Univ.* **15**, 85 (1968).
12. Bäckstrom S., *Acta Embryol. Morphol. Exptl.* **8**, 20 (1965).
13. Bannai S., Terayama H., *Biochim. Biophys. Acta* **142**, 410 (1967).
14. Barker K. L., Warren J. C., *Endocrinology* **80**, 536 (1967).
15. Bartkowiak J., Kłyszejko-Stefanowicz L., *Post. Biochem.* **16**, 263 (1970).
16. Beato M., Homoki J., Lukacs I., Sekeris C. E., *Z. Physiol. Chem.* **349**, 1099 (1968).
17. Beato M., Homoki J., Sekeris C. E., *Exptl. Cell Res.* **55**, 107 (1969).
18. Beerman W., Clever U., *Sci. Am.* Nr **4**, 50 (1964).
19. Bekhor I., Kung G. M., Bonner J., *J. Mol. Biol.* **39**, 351 (1969).
20. Benjamin W., Gellhorn A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 262 (1968).

21. Benjamin W., Levander O. A., Gellhorn A., DeBellis R. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 55, 858 (1966).
22. Bennet L. L., Simpson L., Skipper H. E., *Biochim. Biophys. Acta* 42, 237 (1960).
23. Berlinguet L., Normand A., *Biochim. Biophys. Acta* 161, 509 (1968).
24. Berlowitz L., Birnstiel M. L., *Science* 156, 78 (1967).
25. Berlowitz L., Pallotta D., Sibley C. H., *Science* 164, 1527 (1969).
26. Bloch D. P., Hew H. Y., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 69 (1960).
27. Bloch D. P., Macquigg R. A., Brack S. D., Wu J. R., *J. Cell Biol.* 33, 451 (1967).
28. Bonner J., Dahmus M. E., Fambrough D., Huang R. C. C., Marushige K., Tuan D. Y. H., *Science* 159, 47 (1969).
29. Bonner J., Huang R. C. C., *J. Mol. Biol.* 6, 169 (1963).
30. Bonner J., Widholm J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 1379 (1967).
31. Brachet J., *Nature* 204, 1218 (1964).
32. Bustos-Valdes S. E., Deisseroth A., Dounce A. L., *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 848 (1968).
33. Butler J. A. V., Chipperfield A. R., *Nature* 215, 1188 (1967).
34. Butler J. A. V., Cohn P., *Biochem. J.* 87, 330 (1963).
35. Byvoet P., *Biochim. Biophys. Acta* 160, 217 (1968).
36. Caffery J. M., Whichard L., Irvin J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 364 (1964).
37. Caffery J. M., Whichard L., Irvin J. L., *Biochim. Biophys. Acta* 157, 616 (1968).
38. Caspary E. A., Sewell F. M., *Biochem. J.* 108, 37P (1968).
39. Caspary E. A., Sewell F. M., *Experientia* 24, 793 (1968).
40. Chalkley G. R., Maurer H. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 54, 498 (1965).
41. Chevaillier P., *J. Cell Biol.* 32, 547 (1967).
42. Chipperfield A. R., *Life Sci.* 6, 2643 (1967).
43. Chou T. C., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* 195, 89 (1951).
44. Combard-Vanderplancke A., Vendrely R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 427 (1968).
45. Cvetkovic M. D., Savic R. M., *Biochem. J.* 112, 801 (1969).
46. Darzynkiewicz Z., Krassowski T., Skopińska E., *Nature* 207, 1402 (1965).
47. Das N. K., Micou-Eastwood J., Alfert M., *J. Cell Biol.* 35, 455 (1967).
48. Deakin H., Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* 89, 296 (1963).
49. Deisseroth A., *Biochim. Biophys. Acta* 186, 392 (1969).
50. Desai L., Tencer R., *Exptl. Cell Res.* 52, 185 (1968).
51. Dick C., Johns E. W., *Biochem. J.* 109, 15P (1968).
52. Dick C., Johns E. W., *Biochim. Biophys. Acta* 174, 380 (1969).
53. Dixon G. H., Marushige K., Ling V., Sung M., Wigle D. T., *Federation Proc.* 28, 599 (1968).
54. Dulbecco R. R., The Nucleohistones, red. Bonner J. i Ts'o, Holden Day Inc. San Francisco 1964, str. 362.
55. Eldjarn L., Jellum E., *Acta Chem. Scand.* 17, 2610 (1963).
56. Ellgaard E. G., *Science* 157, 1070 (1967).
57. Ellman C. L., *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70 (1959).

58. Fambrough D. M., Bonner J., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 601 (1968).
59. Fambrough D. M., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **243**, 4434 (1968).
60. Feigelson M., Gros P. K., Feigelson P., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 495 (1962).
61. Ficq A., *Exptl. Cell Res.* **51**, 12 (1968).
62. Field E. J., Raine C. S., *Acta Neuropathol.* **4**, 200 (1964).
63. Flamm W. G., Birnstiel M. J., *Exptl. Cell Res.* **33**, 616 (1964).
64. Freedman M. L., Honig G. R., Rabinovitz M., *Exptl. Cell Res.* **44**, 253 (1966).
65. Frenster J. H., *Nature* **206**, 680 (1965).
66. Frenster J. H., *Nature* **206**, 1269 (1965).
67. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 130 (1961).
68. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 1026 (1963).
69. Gallwitz D., *Federation Proc.* **28**, 600 (1969).
70. Gallwitz D., Mueller G. C., *Science* **163**, 1351 (1969).
71. Gallwitz D., Sekeris C. E., *Z. Physiol. chem.* **350**, 150 (1969).
72. Gershey E. W., Vidali G., Allfrey V. G., *J. Biol. Chem.* **243**, 5018 (1968).
73. Gineitis A. A., Vinogradova J. A., Vorobyev V. I., *Citologija* **10**, 581 (1968).
74. Gittelson B. L., Walker I. O., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 619 (1967).
75. Gorodecky S. I., Sidorova E. V., *Wopr. Med. Chim.* **14**, 140 (1968).
76. Greengard O., Acs G., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 652 (1962).
77. Mac Guillivray A. J., Monjardino J. P. P. V., *Biochem. J.* **108**, 22P (1968).
78. Gurley L. R., Hardin J. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 285 (1968).
79. Gurley L. R., Hardin J. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 1 (1969).
80. Gurvich A. E., Gorodecky S. I., Sidorova E. V., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 499 (1967).
81. Gurvich A. E., Gorodecky S. I., Sidorova E. V., *Biochimija* **32**, 302 (1967).
82. Gutierrez R. M., Hnilica L. S., *Science* **157**, 1324 (1967).
83. Hancock R., *J. Mol. Biol.* **40**, 457 (1969).
84. Hancock R., Ryser H. J. P., *Nature* **213**, 701 (1967).
85. Hanoune J., Feigelson P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 215 (1969).
86. Hardin J. A., Einem G. E., Lindsay D. T., *J. Cell Biol.* **32**, 709 (1967).
87. Hilton J., Stocken L. A., *Biochem. J.* **100**, 21C (1966).
88. Hirschhorn K., Hirschhorn R., *Lancet* **10**, 1046 (1965).
89. Hnilica L. S., Bess L. G., *Anal. Biochem.* **12**, 421 (1965).
90. Hnilica L. S., Kappler H. A., Hnilica V. S., *Science* **150**, 1470 (1965).
91. Holbrook D. J., Evans J. H., Irvin J. L., *Exptl. Cell Res.* **28**, 120 (1962).
92. Huang R. C. C., *Federation Proc.* **26**, 1933 (1967).
93. Huang R. C. C., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 960 (1965).
94. Huang R. C. C., Huang P. C., *J. Mol. Biol.* **39**, 365 (1969).
95. Inoue A., Fuijimoto D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 146 (1968).
96. Izawa M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 544 (1963).
97. Jellum E., Eldjarn L., *Biochem. J.* **92**, 7P (1964).



98. Johns E. W., *Biochem. J.* **92**, 55 (1964).
99. Johns E. W., The Cell Nucleus-Metabolism and Radiosensitivity 1966, str. 115.
100. Johns E. W., Forrester S., *Biochem. J.* **111**, 371 (1969).
101. Johns E. W., Phillips D. M. P., Simson P., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **77**, 631 (1960).
102. Johnson R. G., Bryan J. H. D., *J. Cell Biol.* **39**, 169a (1968).
103. Karlson P., Sekeris C. E., *Acta Endocrinol.* **53**, 505 (1966).
104. Kay J. E., Korner A., *Biochem. J.* **100**, 815 (1966).
105. Kedrova E. M., Antokolskaja Z. A., Rodionov V. M., *Biochimija* **26**, 234 (1961).
106. Kedrova E. M., Antokolskaja Z. A., Rodionov V. M., *Biochimija* **27**, 685 (1962).
107. Kenney F. T., *Science* **165**, 515 (1967).
108. Kim S., Benoiton L., Paik W. K., *J. Biol. Chem.* **239**, 3790 (1964).
109. Kim S., Paik W. K., *J. Biol. Chem.* **240**, 4629 (1965).
110. King R. J. B., Gordon J., Steggles A. W., *Biochem. J.* **114**, 649 (1969).
111. Kischer C. W., Hnilica L. S., *Exptl. Cell Res.* **48**, 424 (1967).
112. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 123 (I) i 136 (II) (1969).
113. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1182 (1966).
114. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Science* **154**, 790 (1966).
115. Klouven H. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 116 (1962).
116. Kłyszewko L., Histony, Monografia Biochemiczna, PTBioch. PWN Warszawa 1967.
117. Knox W. E., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **32**, 462 (1951).
118. Kodama M., Tagashira Y., Nagata C., *J. Biochem.* **64**, 81 (1968).
119. Komkova A. J., *Tez Dokl. I Wsesojuz. Biochim. Sjezda* **2**, 44 (1964).
120. Komkova A. J., Maszanskij W. F., Rogozkin V. A., *Citologija* **7**, 679 (1965).
121. Komkova A. J., Petrov V. C., Goriuchina O. A., *Vestn. Leningr. Univ.* **9**, 74 (1965).
122. Komkova A. J., Pirogova E. A., Aszmarin I. P., *Biochimija* **33**, 465 (1968).
123. Kruh J., Labie D., *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 518 (1969).
124. Langan T. A., *Federation Proc.* **28**, 600 (1969).
125. Langan T. A., Kellering C. F., *J. Cell Biol.* **39**, 77a (1968).
126. Langan T. A., Koningsberger V. N., Bosch L., Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, Elsevier, Amsterdam 1967, str. 233.
127. Langan T. A., Lipmann F. (maszynopis w przygotowaniu), (cyt. wg poz. 65 i 113).
128. Langan T. A., Smith L. H., *Federation Proc.* **25**, 778 (1966).
129. Langan T. A., Smith L. H., *Federation Proc.* **26**, 603 (1967).
130. Laurence D. J. R., *Biochem. J.* **99**, 419 (1966).
131. Laurence D. J. R., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **96**, 53 (1965).
132. Laurence D. J. R., Simson P., Butler J. A. V., *Biochem. J.* **87**, 200 (1963).
133. Lavrinenko I. A., *Mol. Biol.* **3**, 406 (1969).
134. Lin E. C. C., Knox W. E., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 85 (1957).

135. Lindahl-Kiessling K., Peterson D. A., *Exptl. Cell Res.* **55**, 81 i 85 (1969).
136. Littau V. C., Burdick C. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1204 (1965).
137. Lloyd P. H., Peacocke A. R., *Biochem. J.* **109**, 341 (1968).
138. Loeb L. A., Agarwal S. S., Woodside A. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 827 (1968).
139. Lukacs I., Sekeris C. E., *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 85 (1967).
140. Malpoix P., Emelinckx A., *J. Exptl. Embryol. Morphol.* **18**, 1 (1967).
141. Marsh W. H., Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **93**, 539 (1964).
142. Marushige K., Bonner J., *J. Mol. Biol.* **15**, 160 (1966).
143. Marushige K., Brutlag D., Bonner J., *Biochemistry* **7**, 31 (1968).
144. Mazia D., The Cell, red. Bonner J., Mirsky A. E., New York, N. Y. Acad. Press Inc., t. 3, str. 77.
145. Meisler M. H., Mc Cluer R. H., *Science* **154**, 896 (1966).
146. Mita T., Yabuke H., Hamana K., Iwai K., Histones and Gene Function, The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969, str. 128.
147. Miyamoto K., Kuo J. F., Greengard P., *Science* **165**, 63 (1969).
148. Monjardino J. P. P. V., Mac Guillivray A. J., *Biochem. J.* **108**, 22P (1968).
149. Morozova T. M., Salganik R. J., *Mol. Biol.* **3**, 745 (1969).
150. Moskowitz G., Ogawa Y., Starbuck W. C., Busch H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **35**, 741 (1969).
151. Muira A., Ohba Y., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 436 (1967).
152. Murray K., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 209 (1965).
153. Nagata C., Kodama M., Matsuyama A., Histones and Gene Function, The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969, str. 60.
154. Nemer M., Lindsay D. T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **35**, 156 (1969).
155. Nohara H., Takahashi T., Igaroshi A., Ogata K., Histones and Gene Function, The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969, str. 113.
156. Nohara H., Takahashi T., Ogata K., *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 282 (1966).
157. Nohara H., Takahashi T., Ogata K., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 529 (1968).
158. Nowell P. C., *Cancer Res.* **20**, 462 (1960).
159. Olins D. E., *J. Mol. Biol.* **43**, 439 (1969).
160. Ono T., Terayama H., Tataku F., Nakao K., *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 361 (1968).
161. Ono T., Terayama H., Tataku F., Nakao K., *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 214 (1969).
162. Ord M. G., Raaf J. H., Smit J. A., Stocken L. A., *Biochem. J.* **95**, 321 (1965).
163. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **98**, 5P (1966).
164. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **98**, 888 (1966).
165. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **101**, 34P (1967).
166. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **102**, 631 (1967).
167. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **103**, 5P (1967).
168. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **107**, 403 (1968).

169. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **109**, 24P (1968).
170. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **112**, 81 (1969).
171. Paik W. K., Benoiton L., *Can. J. Biochem.* **41**, 1643 (1963).
172. Paik W. K., Kim S., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 221 (1964).
173. Paik W. K., Kim S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 479 (1967).
174. Patterson B. D., Davies O. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 791 (1969).
175. Paul J., Gilmour R. S., *J. Mol. Biol.* **34**, 305 (1969).
176. Penmann S., *New Engl. J. Med.* **276**, 502 (1967).
177. Phillips D. M. P., *Biochem. J.* **97**, 669 (1965).
178. Phillips D. M. P., *Biochem. J.* **107**, 135 (1968).
179. Phillips D. M. P., *Experientia* **24**, 668 (1968).
180. Piha R. S., Cuenod M., Waelsch H., *J. Biol. Chem.* **241**, 2397 (1966).
181. Pogo B. G. T., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 805 (1966).
182. Pogo B. G. T., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *J. Cell Biol.* **35**, 477 (1967).
183. Pogo B. G. T., Pogo A. O., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 1337 (1968).
184. Prescott D. M., *J. Cell Biol.* **31**, 1 (1966).
185. Rapkine L., *Ann. Physiol.* **7**, 382 (1931), (cyt. wg poz. 106).
186. Reid B. R., Cole R. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1044 (1964).
187. Reid B. R., Stellwagen R. H., Cole R. D., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 593 (1968).
188. Reisefeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E., *Nature* **195**, 281 (1962).
189. Repsis L. C., *Exptl. Cell Res.* **48**, 146 (1967).
190. Rigas D. A., Osgood E. E., *J. Biol. Chem.* **212**, 607 (1955).
191. Ringertz N. R., Zetterberg A., *Exptl. Cell Res.* **42**, 243 (1966).
192. Robbins E., Borun T. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 409 (1967).
193. Robert M., Kroeger H., *Experientia* **21**, 326 (1965).
194. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W., *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 149 (1968).
195. Rubin A. D., Cooper H. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 469 (1965).
196. Runnström J., *Exptl. Cell Res.* **48**, 691 (1967).
197. Sadgopal A., Bonner J., *Biochim. Biophys. Acta* **186**, 349 (1969).
198. Salganik L. J., Morozova T. M., Zakharov M. A., *Biochim. Biophys. Acta* **174**, 755 (1969).
199. Satake K., Rasmussen P. S., Luck J. M., *J. Biol. Chem.* **235**, 2801 (1960).
200. Schimke R. T., Sweeney E. W., Berlin C. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 214 (1964).
201. Sherbet G. V., *J. Exptl. Embryol. Morphol.* **16**, 159 (1966), (cyt. wg poz. 50).
202. Sherman F. G., Forssberg A., *Arch. Biochem. Biophys.* **48**, 293 (1954).
203. Skalka A., Fowler A. V., Hurwitz J., *J. Biol. Chem.* **241**, 588 (1966).
204. Sluyser M., *J. Mol. Biol.* **22**, 411 (1966).
205. Sluyser M., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 606 (1968).
206. Sluyser M., *Biochim. Biophys. Acta* **182**, 235 (1969).
207. Smit J. A., Stocken L. A., *Biochem. J.* **91**, 155 (1964).
208. Spalding J., Kajiwarra K., Mueller G. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1535 (1966).



209. Spelsberg T. C., Tankersley S., Hnilica L. S., *Experientia* **25**, 129 (1969).
210. Spelsberg T. C., Tankersley S., Hnilica L. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **62**, 1218 (1969).
211. Srinivasan P. R., Braunfaut M., Errera M., *Exptl. Cell Res.* **34**, 61 (1964).
212. Stackhouse H. L., Chetsanga C. J., Tan C. H., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 159 (1968).
213. Starbuck W. C., Mauritzen C. M., Taylor C. V., Saroja I. S., Busch H., *J. Biol. Chem.* **243**, 2038 (1968).
214. Stedman E., Stedman E., *Nature* **166**, 780 (1950).
215. Stedman E., Stedman E., *Phil. Trans. Roy. Soc., London, Ser. B*, **235**, 565 (1951).
216. Stevely W. S., Stocken L. A., *Biochem. J.* **100**, 20C (1966).
217. Stevely W. S., Stocken L. A., *Biochem. J.* **109**, 24P (1968).
218. Stevely W. S., Stocken L. A., *Biochem. J.* **110**, 187 (1968).
219. Sunaga K., Koide S. S., *Arch Biochem. Biophys.* **122**, 170 (1967).
220. Sunaga K., Koide S. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 342 (1967).
221. Sypherd P. S., Strauss N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 1059 (1963).
222. Takai S., Borun T. W., Muchmore I., Lieberman I., *Nature* **219**, 860 (1968).
223. Taylor J. H., *Proc. 10th Int. Congr. Genetics t. 1, str. 63 (cyt. wg poz. 83)*.
224. Teng C. S., Hamilton T. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **63**, 465 (1969).
225. Terayama H., Bannai S., Histones and Gene Function, The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969, str. 102.
226. Tidwell T., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *J. Biol. Chem.* **243**, 707 (1968).
227. Vaughn J. C., *J. Cell Biol.* **31**, 257 (1966).
228. Vaughn J. C., *J. Cell Biol.* **39**, 138a (1968).
229. Vaughn J. C., *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 473 (1968).
230. Vaughn J. C., Chaitoff J., Deleon R., Garland C., Thomson L., *Exptl. Cell Res.* **54**, 362 (1969).
231. Vorobyev V. J., *Exptl. Cell Res.* **55**, 168 (1968).
232. Vorobyev V. J., Gineitis A. A., Kostileva E. I., Smirnova T. A., *Citologija* **10**, 487 (1969).
233. Vorobyev V. J., Gineitis A. A., Vinogradova I. A., *Exptl. Cell Res.* **57**, 1 (1969).
234. Vorobyev V. J., Nejfach A. A., *Citologija* **6**, 496 (1964).
235. Walker J. O., *J. Mol. Biol.* **14**, 381 (1965).
236. Wang T. Y., *Exptl. Cell Res.* **53**, 288 (1968).
237. Wang T. Y., Johns E. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 176 (1968).
238. Whichard L., Irvin J. L., Bone N., Caffery J. M., *Federation Proc.* **24**, 282 (1965).
239. Winkelman J., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 577 (1967).
240. Yarbo J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 531 (1967).
241. Yoshida M., Shimura K., Histones and Gene Function, The Research Group on Histones and Gene Function in Japan, 1969, str. 83.
242. Young C. W., Hodas S., *Science* **146**, 1172 (1964).
243. Young C. W., Irvin J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 643 (1968).
244. Zetterberg A., Auer G., *Exptl. Cell Res.* **56**, 122 (1969).

LEOPOLD MYSZKOWSKI \*

## Denaturacja białka jako zmiana jego struktury

### Protein Denaturation as a Structural Modification of its Molecules

The paper presents the characteristics of structural changes and some of physical, chemical, and biological consequences of protein denaturation.

#### I. Wstęp

W miarę rozwoju chemii białek oraz pogłębiania wiedzy o ich strukturze i funkcji kształtowało się pojęcie denaturacji białek. Denaturacja dotyczy budowy przestrzennej białka i polega na zmianie jego struktury II, III, IV lub ponad-IV-rzędowej (28, 66). Definicja ta ogólnie dziś przyjęta ma charakter teoretyczny. W praktyce biochemicznej posługujemy się definicją biologiczną, która przyjmuje, że denaturacja białka jest zmianą w jego naturalnych właściwościach (100). Należy jednak pamiętać wówczas, że zmiany w strukturze nie pociągające za sobą zmian we właściwościach dostępnych badaniu uchodzą spod kontroli.

#### II. Pojęcia podstawowe

Na wstępie należy podkreślić, że denaturacja może być odwracalna (58) chociaż niektórzy autorzy jak np. K u n i t z (54) zgłaszają w tej mierze pewne zastrzeżenia. O denaturacji odwracalnej mówimy wtedy gdy białko po usunięciu czynnika denaturującego odzyskuje wszystkie swoje własności jakie miało przed zadziałaniem tego czynnika. O odwracalności denaturacji białka możemy mówić z taką samą pewnością jak i o jego natywności. Natomiast bezwzględny punkt odniesienia — „modelowe białko naturalne”, jest nieuchwytny. Wynika to stąd, że nawet w zdrowych organizmach

---

\* Dr habil., Pracownia Biochemii Eksperymentalnej, II Klinika Położnictwa i Chorób Kobietych, Akademia Medyczna, Warszawa.

białka przyjmują różne formy konfiguracyjne pod wpływem stale zmieniających się warunków związanych z procesem życia. Ostatecznie, nie będziemy chyba dalecy od prawdy, jeśli za naturalne uznamy białko, które spełnia całkowicie swoją rolę biologiczną.

Stopień zaawansowania denaturacji białka może wynikać z nasilenia zmian wszystkich cząsteczek objętych procesem, lub też ze stosunku ilości cząsteczek zdenaturowanych do natywnych.

Przebieg denaturacji może być ciągły lub etapowy. Na przykład denaturacja rybonukleazy pod wpływem mocznika w  $pH$  4,7 przebiega jednoetapowo, a pod wpływem KCNS lub kwasu mrówkowego czy też solnego — wieloetapowo. Innym przykładem może być opisany przez Biltona i Lumry (8) i wyjaśniony termodynamicznie, dwuetapowy przebieg denaturacji  $\alpha$ -chymotrypsynogenu w środowisku kwaśnym. Stwierdzono też dwuetapowy przebieg nieodwracalnej denaturacji termicznej rozpuszczalnego kolagenu (24).

Mianem denaturacji obejmujemy też tworzenie struktur ponadczwartorzędowych w białkach, które w stanie natywnym takich struktur nie wykazują. Na przykład rybonukleaza A trzustki, której cząsteczki mają budowę IV-rzędową, na skutek denaturacji podczas wysuszania asocjuje na struktury zbudowane z dwu lub więcej makrocząsteczek (18). Zjawisko asocjacji czyli łączenia się cząsteczek nazywamy polimeryzacją jeśli masa cząsteczkowa nowopowstałych form molekularnych nie przekracza ośmiokrotnie masy cząsteczkowej białka pierwotnego. Dalej posuniętą asocjację obejmujemy mianem agregacji. Taka denaturacja może prowadzić do powstawania supercząsteczek o stałej, ściśle określonej masie cząsteczkowej. Na przykład tropomiozyna królika w zależności od siły jonowej i  $pH$  roztworu tworzy supercząsteczki dwu- i sześć-molekularne (48). Niektóre tego typu struktury stanowią naturalny składnik organizmów żywych, na przykład supercząsteczki IgM — globuliny surowicy krwi zbudowane z sześciu jednakowych struktur polipeptydowych o budowie czwartorzędowej (91).

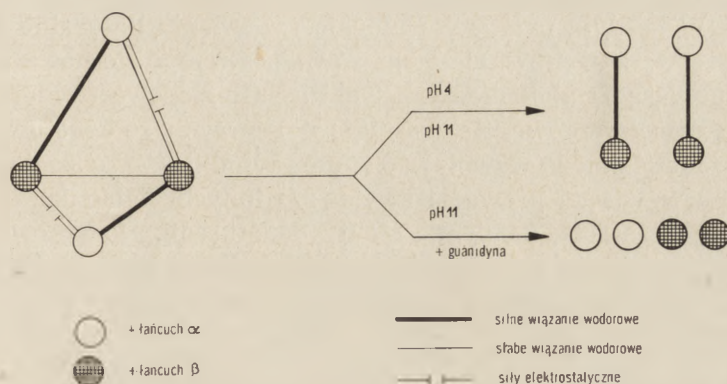
### III. Charakterystyka zmian strukturalnych

#### 1. Zmiany struktury IV-rzędowej

Struktura IV-rzędowa białka natywnego oparta jest na trwałości wiązań łączących niezależne, zdefiniowane w swojej budowie przestrzennej, łańcuchy polipeptydowe. Na pierwszym miejscu należy wymienić wiązania wodorowe i przyciągania elektrostatyczne, jak to ma miejsce w przypadku hemoglobiny (12, 53, 90). Zwykle wchodzą w grę również mostki dwu-



siarczkowe np. w immunoglobulinach (73) i w haptoglobinaх (16). Rozerwanie wszystkich wiązań zaangażowanych w tworzeniu danej struktury IV-rzędowej powoduje dysocjację białka na podjednostki. Tego typu denaturacji ulega hemoglobina ludzka w zmienionym pH (schemat 1). Dochodzi wówczas do dysocjacji na skutek rozerwania mostków wodorowych i zmniejszenia oddziaływania elektrostatycznego między podjednostkami tego białka (12, 53, 90).



**Schemat 1.** Denaturacja struktury IV-rzędowej hemoglobiny

Trójwymiarowa organizacja cząsteczki białka jest istotna dla jego czynności biologicznej. Zmiany tej struktury a więc denaturacja, mogą mieć swój udział w funkcji białka, jak to ma miejsce na przykład podczas utlenowania hemoglobiny. Przyłączenie atomów tlenu do grup hemowych pociąga za sobą odwracalną zmianę konfiguracji przestrzennej tego białka, co jest połączone ze zbliżaniem się do siebie hemów związanych z łańcuchami  $\beta$  (68, 78).

W białkach, które w stanie naturalnym nie posiadają struktury IV-rzędowej, zmiany w tym zakresie są konsekwencją wcześniejszych zmian w konfiguracji białka (42). Proces polega na tworzeniu polimerów lub agregatów utrwalanych przez powstanie nowych międzycząsteczkowych wiązań (20), najczęściej mostków dwusiarczkowych (2). Pewną rolę w tym zjawisku odgrywają również mostki wodorowe (13) i wiązania hydrofobowe (20).

## 2. Zmiany struktury III-rzędowej

Uporządkowanie łańcucha polipeptydowego w przestrzeni, czyli III-rzędowa struktura warunkuje odpowiednie ułożenie geometryczne sił mogących wiązać inne substancje do cząsteczki białkowej. Decyduje to o swo-

istości własności fizyko-chemicznych i biologicznych danego białka. Chodzi tu między innymi o właściwe zbliżenie części łańcucha polipeptydowego, które mają brać udział w reakcjach.

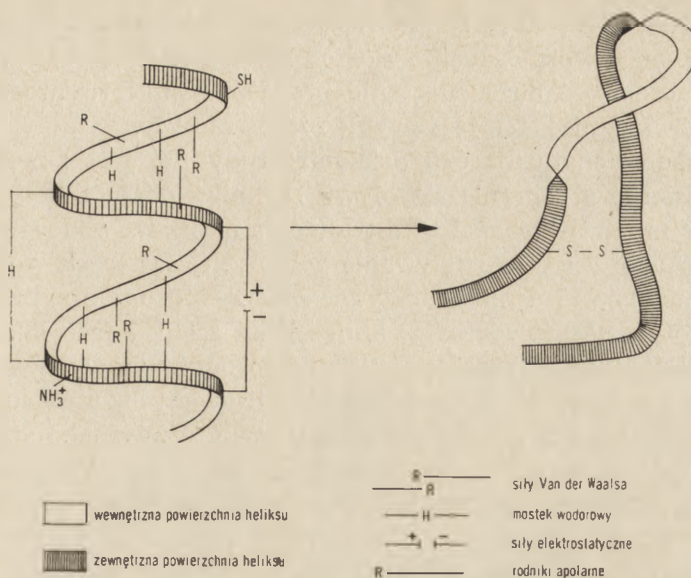
Denaturacja białka polegająca na zmianach jego III-rzędowej struktury jest zwykle objawem uszkodzenia cząsteczki (71, 96). Jak już wspomniano może być jednak również podstawą jego funkcji, a wówczas jak się wydaje jest zawsze odwracalna.

Denaturacja III-rzędowej struktury białka wykazuje największą różnorodność. W każdym przypadku ulegają rozerwaniu naturalne wiązania wewnątrzcząsteczkowe (27), ale mogą również tworzyć się nowe wiązania. Różnorodność wiązań stabilizujących strukturę III-rzędową (wodorowe, hydrofobowe, dwusiarczkowe, elektrostatyczne) sprawia, że denaturację białka w tym zakresie mogą wywoływać różne czynniki. Uszkodzenie poszczególnych typów wiązań prowadzi zwykle do innych zmian konfiguracyjnych i pociąga za sobą odmienne efekty denaturacji. Dodatkowe różnicowanie wynika z uszkodzenia różnej ilości wiązań danego typu, lub też z miejsca uszkodzenia. Dotyczy to głównie działania czynników o swoistym działaniu destrukcyjnym.

### 3. Zmiany struktury II-rzędowej

Proponowany obecnie dla większości białek, spiralny przebieg łańcucha polipetydowego stanowi jego II-rzędową strukturę (50, 74). Wiele białek globularnych nie posiada jednak takiej struktury. Wymienić tu można immunoglobuliny (39, 87) i  $\alpha$ -kwaśny glikoproteid (89). W stabilizacji  $\alpha$ -spirali udział biorą wiązania wodorowe (17, 76), dwusiarczkowe (77), elektrostatyczne (3) i hydrofobowe (88, 104) z tym jednak, że podstawą są wiązania wodorowe (17, 76), a nie dwusiarczkowe jak to ma miejsce w przypadku struktury III-rzędowej (77). Uszkodzenie wiązań stabilizujących  $\alpha$ -spirale, przede wszystkim wodorowych, może prowadzić do denaturacji białka. Denaturację taką obrazuje schemat 2 przedstawiający przejście spirali  $\alpha$  w stan nieuporządkowany łańcucha polipeptydowego.

Podczas denaturacji II-rzędowej struktury białka uszkodzenie może dotyczyć wszystkich wiązań stabilizujących lub tylko niektórych. W związku z tym konfiguracja białka może ulec zniszczeniu całkowitemu, bądź też jedynie na niektórych odcinkach łańcucha polipetydowego, jak to ma miejsce w przypadkach denaturacji odwracalnej (37). Denaturacja struktury II-rzędowej jest trudniejsza do odwrócenia niż denaturacja w zakresie innych struktur. Na uwagę zasługuje też fakt, że denaturacja II-rzędowej struktury białka może polegać na rozbudowie jego  $\alpha$ -spiralnej konfiguracji. Callaghan i Martin (13) na podstawie badania dys-



**Schemat 2.** Denaturacja struktury II-rzędowej białka

persji rotacyjnej sugerują, że dodatek 2-chloro-etanolu do roztworu albuminy surowicy krwi człowieka powoduje wzrost procentowego udziału spirali w budowie tego białka.

#### IV. Czynniki denaturujące

Czynniki denaturujące możemy rozgraniczyć na dwie grupy: czynniki fizyczne i czynniki chemiczne. Kwestia addytywności i konkurencji przy równoczesnym działaniu na białko czynników z obydwu grup stanowi odrębne zagadnienie.

Spośród bardzo wielu czynników wywołujących denaturację, ograniczę się do przedstawienia tylko niektórych, wybierając te, które wywierają wpływ najsilniejszy względnie są częstą przyczyną denaturacji białek oraz te, które łatwo uchodzą naszej uwadze.

##### 1. Czynniki fizyczne

Woda jest jednym z najmniej docenianych czynników denaturujących. Szkodliwe jej działanie przejawia się bardzo wyraźnie podczas przechowywania liofilizowanych preparatów białkowych. Daleko posuniętą denaturację wielu białek w roztworach wodnych obserwuje się podczas ich rozcieńczania (55). Ponadto w roztworze wodnym na granicy faz woda-



-gaz lub woda-ciało stałe zbiera się jednomolekularna warstwa białka, które stało się nierozpuszczalne a więc zdenaturowane (64). To ostatnie zjawisko może mieć duże znaczenie przy spienianiu roztworów białkowych, ponieważ proces ten jest zwykle nieodwracalny.

Mechanizm denaturującego działania wody nie jest zupełnie jasny. Jest to działanie z pogranicza wpływu czynników fizycznych i chemicznych. Z jednej strony chodzi tu o tworzenie mostków wodorowych z wodą (26) z drugiej zaś o oddziaływanie polarnych cząsteczek wody na apolarnie fragmenty łańcucha polipetydowego. Ten drugi przypadek zachodzi przede wszystkim podczas denaturacji na granicy faz (36). Natomiast podczas daleko idącego rozcieńczania roztworów białkowych jak też przy nawilżaniu przechowywanych białek liofilizowanych mechanizm denaturacji jest zbliżony do mechanizmu denaturacji termicznej.

Denaturacja termiczna zachodzi poprzez rozrywanie tych wiązań, które decydują o wysokiej wartości wolnej energii układu białko-środowisko (60). Mamy tu do czynienia z tworzeniem nowych konfiguracji cząsteczki białkowej, które powstają po rozerwaniu niektórych wiązań niewalencyjnych (wewnątrzcząsteczkowych) i są stabilizowane przez nowopowstałe wiązania wewnątrzcząsteczkowe i międzycząsteczkowe (26). Największą rolę przypisuje się rozrywaniu wiązań typu soli oraz mostków dwusiarczkowych z następowym tworzeniem odpowiednich wiązań międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych w innych miejscach tego samego łańcucha (82). Nie można również lekceważyć wymiany mostków wodorowych wewnątrzcząsteczkowych na międzycząsteczkowe i zewnątrzcząsteczkowe (26). Zgodnie z poglądami Steinraufa i Dandlikera (97) można przyjąć, że przynajmniej w niektórych przypadkach denaturacji termicznej najpierw pękają wiązania wodorowe, a dopiero później tworzą się mostki dwusiarczkowe, które utrwalają początkowo powstałe konfiguracje oparte na wiązaniach wodorowych i hydrofobowych. Powstawanie w toku denaturacji termicznej międzycząsteczkowych, przypadkowych wiązań dwusiarczkowych jest podstawowym czynnikiem prowadzącym do koagulacji białka. Jakkolwiek ogólna definicja nie przewiduje degradacji chemicznej białka podczas denaturacji, to jednak w przypadku denaturacji termicznej należy przyjąć pewne ograniczenia odnośnie tego punktu. Zjawisku temu często towarzyszy bowiem częściowy rozpad grup aminowych (21).

Ważnym czynnikiem denaturującym jest promieniowanie (promienie X,  $\gamma$  oraz ultrafioletowe). Przy napromieniowaniu roztworów białkowych, zmiany kowalencyjnych wiązań chemicznych są poprzedzane uszkodzeniem struktury II-rzędowej białka (1). Jonizacja bowiem wnosi nowe ładunki elektryczne, co pociąga za sobą rozpad mostków wodorowych i dezorganizację struktury przestrzennej cząsteczki. W przypadku takiej

denaturacji ludzkiej albuminy surowiczej od dawki promieniowania zależy ilość zdenaturowanych cząsteczek, natomiast pozostałe cząsteczki białkowe, jak się wydaje, są nienaruszone (85).

Rola czynników mechanicznych w denaturacji białek jest na ogół znana i często jest przytaczany przykład denaturacji  $\alpha$ -keratyny podczas rozciągania włosa, kiedy to dochodzi do uszkodzenia struktury III-rzędowej (75). Mało znanym natomiast, ale ciekawym zjawiskiem jest denaturacja immunoglobulin podczas sączenia przez celofan w czasie elektroforezy wysokonapięciowej (46). Denaturacja ta wynika z utraty naturalnej struktury IV-rzędowej.

Denaturację białka w roztworze może wywołać zmiana  $pH$  (107). Chodzi tu przede wszystkim o obniżenie  $pH$  ponieważ przy jego podwyższeniu prawie zawsze ma miejsce degradacja i reakcje wtórne. Tak np. albumina surowicy krwi (106) oraz immunoglobuliny (107) przechodzą odwracalne zmiany strukturalne przy obniżeniu  $pH$  poniżej 4. Zmiany te są całkowicie odwracalne (38, 106) i polegają na ekspansji cząsteczek wskutek zmian struktury III-rzędowej, jednak bez rozfałdowania spiralnego łańcucha, a więc bez zmian w strukturze II-rzędowej. Dopiero długotrwałe działanie obniżonego  $pH$  przy niezbyt małym stężeniu białka prowadzi do nieodwracalnej denaturacji wielu białek. Powstają wówczas nienaturalne struktury IV-rzędowe i ponadczwartorzędowe czego zewnętrznym wyrazem jest agregacja. Ten rodzaj denaturacji wykorzystuje się w niektórych metodach oznaczania ilościowego białka (70) i przy odbiałczaniu roztworów. Mechanizm denaturacji białka podczas obniżenia  $pH$  zawsze wiąże się z przyłączeniem protonów przez białko. Ta reakcja pociąga za sobą rozrywanie mostków wodorowych stabilizujących naturalną konfigurację cząsteczki i umożliwia powstawanie nowych wiązań międzycząsteczkowych wodorowych i hydrofobowych wynikających z działania sił Van der Waalsa.

Należy też wspomnieć o denaturującym wpływie ultradźwięków na białko. Fale ultradźwiękowe prowadzą zwykle do reakcji chemicznych wskutek rozrywania wiązań walencyjnych (23), jednak niektóre enzymy ulegają pod ich wpływem inaktywacji wywołanej denaturacją bez objawów hydrolizy (5).

## 2. Czynniki chemiczne

Sole są jednym z najwcześniej poznanych czynników denaturujących białko. Zjawisko odwracalnej denaturacji pod wpływem siarczanu amonu, siarczanu sodu, czy fosforanu potasu znalazło zastosowanie przy frakcjonowaniu mieszanin białkowych i izolacji enzymów. Denaturująco działają



też sole metali wielowartościowych (Fe, Ni, Co, Al, Cu, Zn, Cd). Obok dominującej roli kationu w tym procesie istotne znaczenie ma także obecny w roztworze anion (83, 95). Miejscem wiązania jonów metalicznych mogą być wolne grupy karboksylowe (np. dla  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$ ) azot imidazolowy lub peptydowy, a wg Rao i Lala (81) także tlen wiązania peptydowego (np. dla  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ ). Wiązanie wielowartościowych jonów metalicznych przez białko prowadzi do jego polimeryzacji, zwykle bez wytrącania się z roztworu. W odpowiednich warunkach produkt denaturacji może mieć ściśle określoną masę cząsteczkową, na przykład albumina surowicy krwi bydlęcej pod wpływem azotanu miedzi ulega w roztworze wodnym dimeryzacji (86). Denaturacja białka pod wpływem soli polegająca na powstawaniu połączeń typu soli z wielowartościowymi kationami lub anionami daje produkty nietrwałe i często może dochodzić do pełnej, jak się wydaje, renaturacji. Dotyczy to wielu enzymów wyizolowanych z mieszanin białkowych przez wytrącanie siarczanem amonu. Również dimery albuminy surowicy krwi bydlęcej otrzymane działaniem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  dysocjują na natywne cząsteczki pod wpływem wersenianu czy też chłorowodoru cysteiny (86).

Wiele związków organicznych wykazuje działanie denaturujące przy czym różnorodność zachowania się białek wobec nich jest większa niż wobec innych czynników denaturujących. Do najczęściej stosowanych należą: mocznik, chlorowodorek guanidyny, detergenty oraz alkohole alifatyczne, które powodują żelifikację białek w temperaturze pokojowej. Te ostatnie podnoszą również stopień agregacji termicznej.

Najbardziej znanym związkiem z tej grupy jest mocznik. Białka zdenaturowane mocznikiem pozostają zwykle rozpuszczone. Mechanizm denaturacji pod wpływem mocznika podobnie jak i guanidyny polega na tworzeniu silnych wiązań wodorowych między tymi związkami a białkiem z równoczesnym rozrywaniem mostków wodorowych wewnątrzcząsteczkowych (98, 105). Oba te związki działają dopiero w dużych stężeniach, przy czym ze wzrostem ich stężenia wzrasta nieodwracalność denaturacji. W stężonych roztworach mocznika prowadzi to do wzrostu lepkości i skręcalności optycznej roztworu bez zmiany ciężaru cząsteczkowego białka (35).

Czynniki powierzchniowo aktywne często działają denaturująco na białka i to zwykle już w niskich stężeniach. Detergenty nie działają zwykle na wiązania wodorowe, ale osłabiają wiązania hydrofobowe (62, 63). Tak więc zmiany wywołane przez detergenty dotyczą głównie struktury III-rzędowej, chociaż w niektórych przypadkach może dochodzić do rozrywania wiązań wodorowych i uszkodzania spirali (62, 63). Istotą działania detergentów na białka jest udostępnienie do reakcji chemicznych grup czynnych.



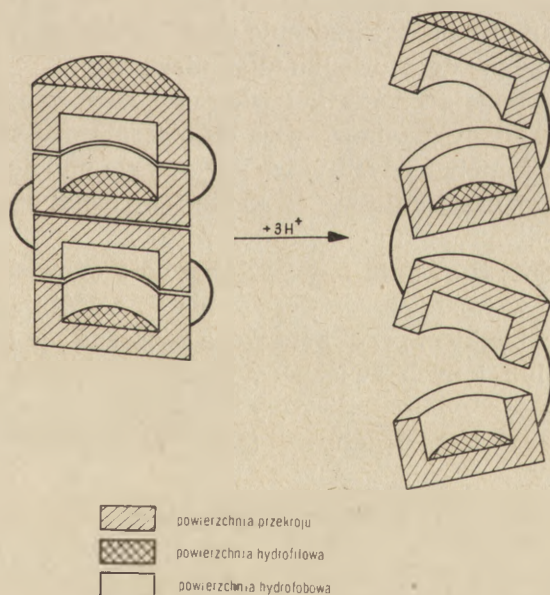
## V. Skutki denaturacji

Jakkolwiek własności fizyczne, chemiczne i biologiczne białka są ze sobą ściśle związane i współzależne, to jednak dla jaśniejszego przedstawienia omówię je oddzielnie.

### 1. Własności fizyczne

Rozpuszczalność, stała dyfuzji, ruchliwość elektroforetyczna, lepkość roztworów białkowych oraz własności optyczne są podstawowymi elementami charakterystyki natywności białek. Zmiany w tym zakresie w przebiegu denaturacji wynikają ze zmiany wymiarów cząsteczkowych, ładunku elektrycznego, kształtu oraz stanu rozproszenia cząsteczek białkowych.

Denaturacja łączy się zwykle, choć nie zawsze ze zwiększeniem wymiarów cząsteczki. Na przykład denaturacja termiczna albuminy jaja prowadzi do zwiększonej hydratacji tego białka, tak że objętość każdej zdenaturowanej cząsteczki wzrasta dwukrotnie (61). Ekspansja molekularna nie zawsze jednak pociąga za sobą wzrost objętości cząsteczkowej i tak objętość cząsteczki albuminy surowicy krwi zmniejsza się w czasie ekspansji (14) co ilustruje schemat 3.



**Schemat 3.** Ekspansja molekularna albuminy surowiczej (przekrój modelu)

Zarówno dysocjacja białek na podjednostki jak też polimeryzacja, które mogą mieć miejsce w czasie denaturacji, pociągają za sobą odpowiednie zmiany w parametrach molekularnych, które są prostą konsekwencją zmiany masy cząsteczkowej.

Ruchliwość elektroforetyczna zależy od ładunku elektrycznego i od przestrzennej budowy cząsteczki białkowej, toteż zmiany konfiguracji molekularnej i ładunku elektrycznego w czasie denaturacji mogą tę ruchliwość znacznie zmieniać. Ponieważ ładunek elektryczny w procesie denaturacji zwykle wzrasta, elektroforeza jest bardzo pożyteczną metodą do wykrycia różnic jakościowych (modyfikacji) cząsteczek białkowych, lecz niestety nie daje precyzyjnego poglądu co do natury tej modyfikacji. Zmiany ładunku elektrycznego białek pod wpływem denaturacji znajdują swe odzwierciedlenie również w zmianie przewodnictwa elektrycznego roztworów białkowych.

Własności optyczne białek odnoszą się do ich wewnętrznej struktury i dlatego są niezwykle czułe na modyfikujące działanie denaturacji. Badania dwójłomności światła (41), zmętnienia (93, 94) widm absorpcyjnych w nadfiolecie (32, 45) i podczerwieni (56) oraz dyspersji rotacyjnej (44, 57) należą do najważniejszych metod badania denaturacji. Charakterystyczne zmiany dyspersji rotacyjnej podczas denaturacji struktury II-rzędowej pozwalają dość dokładnie obliczyć procentowy udział  $\alpha$ -spirali w tworzeniu tej struktury (39, 65). Zmiany w różnicowych widmach absorpcyjnych w UV i w dyspersji rotacyjnej pozwoliły Biltonenowi i Lumry'emu (9) na stwierdzenie dwu niezależnych stanów równowagi w dwuetapowej denaturacji  $\alpha$ -chymotrypsyny.

Zmiany konformacji, topografii i własności chemicznych powierzchni białka powodują zmiany powinowactwa do otaczającego środowiska. Rozpuszczalność białek globularnych, w wodzie zwykle maleje po denaturacji. Zjawisko to często przyjmuje się za kryterium denaturacji (59), jednak ilościowe oznaczenie produktu denaturacji metodą precypitacji jest umowne ponieważ w dużym stopniu może zależeć od środowiska (102). Należy tu wspomnieć, że w wodnych roztworach białek wyróżniamy wodę wolną i wodę związaną z białkiem przy czym woda związana nie jest rozpuszczalnikiem dla soli lub innych związków. „Objętość nierozpuszczalnikowa” (suma objętości wody związanej i samych cząsteczek białkowych) zwykle maleje nieznacznie podczas denaturacji (34).

## 2. Własności chemiczne

Wpływ denaturacji na własności chemiczne białka polega zwykle na udostępnieniu nowych grup funkcyjnych lub zmianie otoczenia tych czynnych grup, które były wolne w białku natywnym.

Na ogół denaturacja powoduje wzrost ilości grup czynnych w cząsteczce białkowej. Po denaturacji zwykle wzrasta wiązanie jonów metalicznych (101) i wodorowych (6). Przybywa wolnych grup  $\text{NH}_2^-$ , tak że reakcja biuretowa jest szybsza (4), odmaskowują się też reszty tyrozynowe i tryptofanowe co powoduje silniejszą reakcję Folina-Ciocalteu i zmianę widm absorpcyjnych w nadfiolecie (31, 84). Szczególnie duże znaczenie ma denaturacja w uwalnianiu grup  $-\text{SH}$  (47, 103), po denaturacji stają się też łatwiej dostępne do redukcji grupy  $-\text{S}-\text{S}-$ . Ciekawą ilustracją tego zjawiska jest praca Andersona (2) dotycząca polimeryzacji albuminy surowicy krwi bydlęcej. W natywnej albuminie surowicy krwi ludzkiej można wykryć tylko jedną grupę  $-\text{S}-\text{S}-$  podczas gdy po denaturacji daje się wykryć 17 takich ugrupowań w cząsteczce (52).

Denaturacja powoduje też znaczne zmiany w wiązaniu przez białko barwników i innych substancji drobnocząsteczkowych. Po denaturacji obserwuje się zwykle wzrost wiązania (niekiedy bardzo znaczny) jak to na przykład ma miejsce w przypadku wiązania hemu przez zdenaturowaną globinę (51), taka hemoglobina jednak jest niezdolna do wiązania tlenu (49). Zmiany w wiązaniu barwników przez białka w czasie ich denaturacji zależą w dużym stopniu od środowiska, głównie od  $\text{pH}$  roztworu w jakim denaturacja zachodzi (7). Ważnym objawem wzrostu reaktywności białek po denaturacji jest również wzrost ich podatności na działanie enzymów proteolitycznych. Obserwujemy to np. podczas denaturacji albuminy jaja,  $\beta$ -laktoglobuliny czy też bydlęcej albuminy surowiczej (15).

### 3. Własności biologiczne

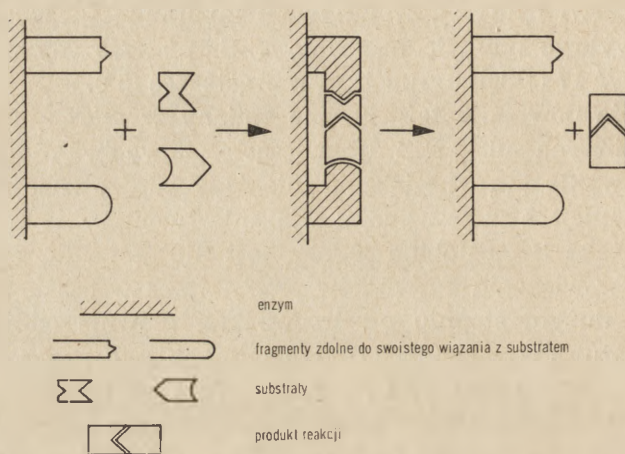
Z biologicznego punktu widzenia istotnym zjawiskiem towarzyszącym denaturacji jest spadek aktywności enzymatycznej. Tylko w bardzo nielicznych przypadkach denaturacja może powodować wzrost lub nawet pojawienie się nieistniejącej przedtem aktywności enzymatycznej. Na przykład miozyna A z serca, po denaturacji zwiększa swoją aktywność ATP-azy (10), albumina jaja zaś, która w stanie naturalnym nie wykazuje własności enzymatycznych, po denaturacji termicznej wykazuje własności katalazy chociaż aktywność jej wobec  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest wielokrotnie mniejsza od aktywności katalazy naturalnej (99).

Wskutek wielkiej specyficzności reakcji immunologicznych należałoby się spodziewać, że denaturacja powinna silnie wpływać na własności immunologiczne białka. Przypuszczenie to jednak tylko częściowo znajduje potwierdzenie w faktach. Natywna albumina jaja nie reaguje z surowicą zawierającą przeciwciała przeciw zdenaturowanej albuminie jaja, podobnie jak zdenaturowana albumina jaja nie reaguje z antysurowicą przeciw natywnej albuminie jaja (33). Innym przykładem jest zdenaturowana



termicznie albumina surowicy krwi bydlęcej, która daje tylko 15% reakcji krzyżowej z antysurowicą przeciw natywnej albuminie (63). Tymczasem denaturacja albuminy surowiczej za pomocą mocznika i guanidyny nie zmienia właściwości antygenowych tego białka (79).

Denaturacja białka przez zmianę jego struktury III-rzędowej stoi też u podstaw działania większości enzymów. Przyjmuje się, że w czasie działania syntetaz substraty po połączeniu z enzymem zbliżają się do siebie na skutek stosownego odkształcenia cząsteczki enzymu. Zjawisko to przedstawiono na schemacie 4.



**Schemat 4.** Denaturacja części białkowej enzymu podczas katalizy

Innym przykładem denaturacji (zmian strukturalnych) białka jako zjawiska naturalnego może być proponowany przez Monoda, Changeux i Jacoba (67) model allosterycznej reakcji represora podczas regulacji biosyntezy.

## VI. Addycja i konkurencja

Szczególnymi zjawiskami dotyczącymi denaturacji są: addycja i konkurencja w działaniu czynników denaturujących. Najbardziej powszechna jest współzależność temperatury z innymi czynnikami denaturującymi. Wpływ  $pH$  na denaturację cieplną tylko w niewielkim stopniu daje się tłumaczyć katalitycznym działaniem jonów  $H^+$  i  $OH^-$ . Wydaje się, że bardziej istotną rolę odgrywa zmiana równowagi między różnymi stanami dysocjacji cząsteczki białkowej (30). Tak na przykład dodatek etanolu powoduje wzrost stopnia denaturacji termicznej globulin surowicy krwi ludzkiej (40). Podobnie dodatek mocznika do roztworu albuminy jaja obniża znacznie temperaturę konieczną do jej denaturacji (29).

Mechanizm addytywności można objaśnić na przykładzie inaktywacji funkcji ATP-azowej miozyny wskutek naświetlania promieniami X lub  $\gamma$  (22). Inaktywacja ta zachodzi w dwu etapach, bezpośrednio w czasie naświetlania i w kilka godzin po napromieniowaniu. Przyjmuje się, że napromieniowanie białka indukuje długotrwałe wzbudzenie atomów w cząsteczce co obniża próg aktywacji dla następnej reakcji wskutek czego już w temperaturze 25° po kilku godzinach dochodzi do denaturacji termicznej.

O konkurencji mówimy wtedy gdy działanie czynników denaturujących znosi się. Bardzo dobrym tego przykładem jest fakt, że dodanie 10 do 14 moli detergentu na 1 mol albuminy surowicy krwi ludzkiej wywiera bardzo silny wpływ ochronny wobec denaturacji zarówno termicznej jak i w 6 molarnym roztworze mocznika (62). Ochronne działanie kaprylanu sodu na albuminę surowicy hamują aminokwasy dwuazotowe (30). Jest więc prawdopodobne, że kaprylan tworzy wiązania z guanidynową grupą reszty argininowej w łańcuchu polipeptydowym białka. Ciekawy też jest brak efektu denaturującego przy równoczesnym działaniu na albuminę surowicy krwi kwasu trójchlorooctowego i etanolu lub acetonu w stężeniach wystarczających do natychmiastowej denaturacji (92).

Podobne efekty jak przy działaniu dwóch czynników denaturujących uzyskujemy przez dodanie do roztworu białka substancji, których ogólnie nie uważa się za czynniki denaturujące. Stwierdzono na przykład, że 0,1 molarny roztwór NaCl znacznie przyspiesza denaturację termiczną albuminy surowicy krwi ludzkiej, podczas gdy 1 molarny roztwór tej soli działa ochronnie (69). Obok siły jonowej również rodzaj jonów (43) może decydować o przebiegu denaturacji pod wpływem czynników fizycznych. W tych przypadkach chodzi prawdopodobnie o wzajemne oddziaływanie elektrostatyczne między solami a cząsteczkami białka.

Ważnym czynnikiem ochraniającym białka przed denaturacją jest DNA, przy czym działanie DNA jest o wiele większe niż nukleozydów lub nukleotydów w tym samym stężeniu (72, 108). Również rodzaj nukleotydu może mieć wpływ na przebieg denaturacji jak to na przykład ma miejsce w przypadku polimeryzacji aktynu F (25). Niektóre aminokwasy oraz glutation także działają ochronnie przeciw denaturacji (19). Substancje te stabilizują strukturę białka wiążąc się z nim. W przypadku enzymów taka stabilizacja może prowadzić do obniżenia ich aktywności.

#### LITERATURA

1. Alexander P., Hamilton L. D. G., Stacey K. A., *Nature* **134**, 226 (1959).
2. Anderson L. O., *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 277 (1969).

3. Anfinsen C. B., *The Molecular Basis of Evolution*, Wiley, New York 1959.
4. Araya S., Kobayashi M., *J. Biochem.* **38**, 7 (1951).
5. Babij T. P., Skvyrska E. B., *Ukr. Biochim. Zh.* **34**, 853 (1962).
6. Beychok S., Steinhardt J., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5679 (1959).
7. Bezkorowainy A., *Biochemistry* **2**, 10 (1963).
8. Biltonen R., Lumry R., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 4251 (1969).
9. Biltonen R., Lumry R., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 4256 (1969).
10. Brahms J., Kay C. M., *J. Biol. Chem.* **237**, 3449 (1962).
11. Brandbury J. K., King L. R., *Nature* **223**, 1154 (1969).
12. Braunitzer G., Gehring-Müller R., Hilschmann N., Hilse K., Hobohm G., Rudloff V., Wittmann-Liebold B., *Z. Physiol. Chem.* **325**, 283 (1961).
13. Callaghan P., Martin N. H., *Biochem. J.* **83**, 144 (1962).
14. Champagne M., Luzzati V., Nicolaieff A., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1002 (1958).
15. Christensen L. K., *Nature* **163**, 1003 (1949).
16. Connell G. E., Dixon G. H., Smithies O., *Nature* **193**, 505 (1962).
17. Corey R. B., Pauling R., *Proc. Roy. Soc. B* **141**, 10 (1953).
18. Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S., *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* **1**, 217 (1962).
19. Dietrich F. M., *Nature* **195**, 146 (1962).
20. Echols G. H., Andereg J. W., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5085 (1960).
21. Ehrenpreis S., Maurer P. H., Sri Ram J., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 178 (1957).
22. Ejodus L. K., Ganassi E. E., *Biofizika* **4**, 215 (1959).
23. Elpiner I. E., Stekolnikow L. I., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **146**, 700 (1962).
24. Engel J., *Z. Physiol. Chem* **325**, 287 (1961).
25. Estes J. E., Moos C., *Arch. Biochem. Biophys.* **132**, 388 (1969).
26. Foss J. G., Schellman J. A., *J. Phys. Chem.* **63**, 2007 (1959).
27. Foster J. D., Putnam F. W. w *The Plasma Proteins*, Academic Press. New York 1960, str. 179.
28. Foster J. F., Samsa E. G. H., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1387 (1951).
29. Foster J. F., Samsa E. G. H., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 5388 (1951).
30. Gibbs R. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 229 (1952).
31. Glazer A. N., McKenzie H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 526 (1962).
32. Glazer A. N., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **235**, PC 43 (1960).
33. Grabar P., Kamiński M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **32**, 620 (1950).
34. Haurowitz F., *Kolloid Z.* **71**, 198 (1935).
35. Hospelhorn V., Cross B., Jensen E. V., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 2827 (1954).
36. Imahori K., *Bull. Chem. Soc. Japan* **25**, 13 (1952).
37. Imahori K., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 336 (1960).
38. Jirgensons B., *Arch. Biochem. Biophys.* **39**, 261 (1952).
39. Jirgensons B., *Makromol. Chem.* **44/46**, 123 (1961).
40. Johnson F. H., Campbell D. H., *J. Biol. Chem.* **163**, 689 (1946).
41. Joly M., *Trans. Faraday Soc.* **48**, 279 (1952).
42. Joly M., *Progr. Biophys.* **5**, 168 (1955).
43. Joly M., Barbu E., *J. Chim. Phys.* **48**, 636 (1951).
44. Josefsson L., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 128 (1962).



45. Kaldor G., Saifer A., Westley F., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 275 (1962).
46. Kargin V. A., Kozłow P. W., Mirlina S. J., Kapralowa Z. A., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **135**, 1421 (1960).
47. Katyal J. M., Leslie J., Butler M. F., Gorin G., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 54 (1961).
48. Kay C. M., Bailey K., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 149 (1960).
49. Keilin J., *Nature* **187**, 365 (1960).
50. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. G., Davies D. R., Phillips D. C., Shore V. D., *Nature* **185**, 422 (1960).
51. Kleinwächter V., *Nature* **186**, 313 (1960).
52. Kolthoff I. M., Anastasi A., Tan B. H., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3235 (1958).
53. Konigsberg W., Hill R. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2547 (1962).
54. Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **32**, 241 (1948).
55. Labouesse J., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 52 (1957).
56. Lenormant H., *Bull. Soc. Chim. Franc.* str. 214 (1953).
57. Leonard W. L., Foster J. F., *J. Biol. Chem.* **236**, 2662 (1961).
58. Levy M., Bengalia A. E., *J. Biol. Chem.* **185**, 829 (1950).
59. Levy M., Warner R., *J. Phys. Chem.* **58**, 106 (1954).
60. London M., McHugh R., Hudson P. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **73**, 72 (1958).
61. Loughlin W. J., *Biochem. J.* **26**, 1557 (1932).
62. Markus G., Karush F., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3264 (1957).
63. Maurer P. H., Ram J. S., Ehrenpreis S., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 196 (1957).
64. Mazia D., Hayashi T., *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 424 (1953).
65. Meyer M. L., Kauzmann W., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 348 (1962).
66. Mirska A. E., Pauling L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **22**, 439 (1936).
67. Monod J., Changeux J. P., Jacob F., *J. Mol. Biol.* **6**, 306 (1963).
68. Muirhead H., Perutz M. F., *Nature* **199**, 633 (1963).
69. Munk P., Frié I., *Collection Czech. Chem. Comm.* (wyd. ang.) **24**, 2882 (1959).
70. Myszkowski L., *Acta Physiol. Pol.* **8**, 476 (1957).
71. Neely W. B., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4416 (1959).
72. Okada S., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 113 (1957).
73. Palmer J. L., Nisonoff A., Van Holde K. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 314 (1963).
74. Pauling L. E., Corey R. B., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 5349 (1950).
75. Pauling L. E., Corey R. B., *Nature* **171**, 59 (1953).
76. Pauling R., Corey R. B., *Proc. Roy. Soc. B* **141**, 21 (1953).
77. Perlmann G. E., Diringier R., *Ann. Rev. Biochem.* **29**, 151 (1960).
78. Perutz M. F., *Science* **140**, 3569 (1963).
79. Porter R., *Biochim. Biophys. Acta* **2**, 105 (1948).
80. Poszwiński P., Zakrzewski K., May Z., *Acta Biochem. Pol.* **7**, 115 (1960).
81. Rao M. S. N., Lal H., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3226 (1958).
82. Riley D. P., Arnd O. W., *Proc. Roy. Soc. B* **141**, 93 (1953).
83. Robinson T., Phillips A. W., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 290 (1960).

84. Saha A., Sawh V. L., Chen A. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 178 (1969).
85. Sanigar E. B., Krejci L. E., Kraemer E. O., *Biochem. J.* **33**, 1 (1939).
86. Saroff H. A., Choate W. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 245 (1958).
87. Schellman J. A., Schellmann C. G., *J. Polymer Sci.* **49**, 129 (1961).
88. Scheraga H. A., Némethy G., Steinberg J. Z., *J. Biol. Chem.* **232**, 2506 (1962).
89. Schmid K., Kamiyama S., *Biochemistry* **2**, 271 (1963).
90. Schroeder W. A., Shelton R. J., Shelton J. B., Cormick J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 284 (1962).
91. Schultze H. E., Heremans J. F., *Molecular Biology of Human Proteins*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1966, t. 1, str. 41, 225.
92. Schwert G. W., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 139 (1957).
93. Segal L., w Struktur und biologische Funktion der Eiweisse — III. Humboldt Symposium über Grundfragen der Biologie, Berlin 1960, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1962, str. 80.
94. Segal L., *Acta Biol. Med. Germ.* **10**, 488 (1963).
95. Sela M., Anfinsen C. B., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 229 (1957).
96. Smillie L. B., Neurath H., *J. Biol. Chem.* **234**, 355 (1959).
97. Steinrauf L. K., Dandliker W. B., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3833 (1958).
98. Steven F. S., Tristram G. R., *Biochem. J.* **85**, 207 (1962).
99. Thiele H., Ax R., *Kolloid Z.*, **149**, 20 (1956).
100. Timasheff S. N., Gibbs R. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 547 (1957).
101. Tkacz V. K., Frenkel L. A., *Radiobiologia SSSR* **1**, 824 (1961).
102. Warner R. C., Levy M., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5735 (1958).
103. Watts D. C., Rabin B. R., Crook E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 380 (1961).
104. Wetlaufer D. B., Lourien R., *J. Biol. Chem.* **239**, 596 (1954).
105. Williams E. J., Foster J. F., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 865 (1959).
106. Yang J. T., Foster J. F., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1588 (1954).
107. Yang J. T., Foster J. F., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2374 (1955).
108. Zubay G., Doty P., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 213 (1957).

RENATA DĄBROWSKA \*, WITOLD DRABIKOWSKI \*\*

## Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych

### Regulation of Contraction-Relaxation Cycle in the Skeletal Muscle

Recent progress in the investigations on the molecular mechanism of the role of calcium ions as a regulating agent of the contractile system has been reviewed.

#### I. Aparat kurczliwy mięśni szkieletowych

##### 1. Ultrastruktura miofibryli

Mięsień jest wysoce wyspecjalizowaną tkanką zdolną do przetwarzania energii chemicznej w energię mechaniczną skurczu.

Główną masę mięśni szkieletowych stanowią elementy kurczliwe — miofibryle zbudowane z dwóch rodzajów filamentów (54). Tak zwane „grube” filamenty, o średnicy 100Å, znajdują się w prążkach anizotropowych (A), natomiast „cienkie” filamenty, o średnicy 60Å, zajmują prążek izotropowy (I) oraz zachodzą w prążku A na pewnym odcinku między „grube” filamenty. Pośrodku prążka I znajduje się linia o dużej gęstości optycznej zwana linią Z, natomiast środkowy odcinek prążka A, o mniejszej gęstości optycznej, gdzie „cienkie” filamenty nie dochodzą, zwany jest strefą H (schemat 1a). Odcinek pomiędzy dwoma liniami Z nazywa się sarkomerem.

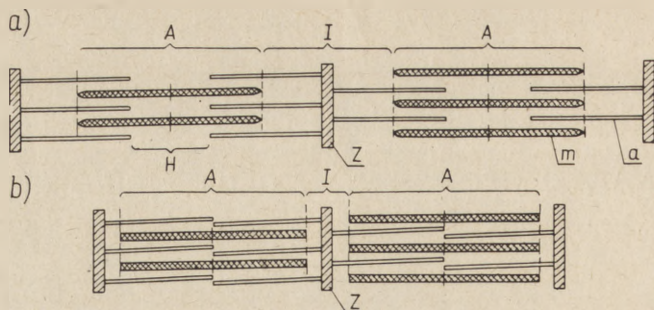
A. F. Huxley i Niedergengerke (52) oraz H. E. Huxley i Hanson (57) wykazali, że długość obu rodzajów filamentów pozostaje stała w różnych stanach skrócenia miofibryli. Autorzy ci zaproponowali ogólnie dziś przyjętą teorię, według której zmiany długości mięśnia poprzecznie prążkowanego podczas skurczu są wynikiem przesuwania się

\* Dr inż., Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

\*\* Prof. dr habil., Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: EDTA — sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczworoowego, EGTA — sól sodowa kwasu etylenoglikolo-bis/eterβ-aminometylo-/NN'-czteroowego.





**Schemat 1.** Ułożenie filamentów w miofibryli

a) w stanie spoczynku, b) w stanie skurczu  
m — filamenty grube, a — filamenty cienkie

„grubych” i „cienkich” filamentów względem siebie, bez zmiany długości poszczególnych filamentów. Powoduje to w czasie skurczu skracanie prążków I i zmniejszanie strefy H aż do ich zaniku (schemat 1b), a w czasie rozkurczu — rozszerzanie prążka I i strefy H bez zmiany długości prążka A.

Prowadzone równolegle badania biochemiczne wykazały, że głównymi składnikami miofibryli są specyficzne białka mięśniowe miozyna i aktyna. Zastosowanie techniki mikroskopii elektronowej w połączeniu z frakcjonowaną ekstrakcją białek oraz z metodami immunochemicznymi ujawniło, że „grube” filamenty zbudowane są z miozyny, a „cienkie” z aktyny (37, 55, 80, 91). Aktyna występuje w „cienkich” filamentach w postaci podwójnie skręconych nici — liniowych polimerów — zwanych F-aktyną (38).

## 2. Aktomiozyna i inne modele mięśniowe

W roku 1939 Engelhardt i Ljubimowa (33) donieśli, że miozyna jest enzymem rozkładającym ATP. Wkrótce potem Szent-Györgyi (95) zaobserwował, że miozyna tworzy kompleks z aktyną i połączenie to nazwał aktomiozyną. W roztworach o wysokiej sile jonowej ( $\mu = 0,6$ ) interakcja obu tych białek manifestuje się wzrostem lepkości i rozpraszania światła. Dodanie ATP do roztworu aktomiozyny powoduje gwałtowny spadek lepkości, świadczący o dysocjacji na składniki. W miarę rozkładania dodanego ATP przez ATP-azę miozynową ponownie powstaje połączenie aktyny z miozyną. W roztworach o niskiej sile jonowej ( $\mu < 0,25$ ) aktomiozyna występuje w formie żelu. W tych warunkach dodanie ATP powoduje, równolegle z enzymatycznym rozkładem ATP, synerezę żelu aktomiozynowego, polegającą na wyciśnięciu wody ze struktury żelu i zmniejszeniu jego objętości. Zjawisko to nazwane superprecypitacją stanowi jeden z najprostszych modeli skurczu mięśniowego. Skurcz „nici” z żelu aktomiozynowego, zachodzący pod wpływem ATP opisał Szent-

G y ö r g y i już w roku 1941 (95). Prowadzone następnie na szeroką skalę badania wykazały, że aktywność ATP-azy aktomiozynowej jest znacznie wyższa od miozynowej i charakteryzuje się tym, że ulega stymulacji pod wpływem jonów  $Mg^{2+}$ . Natomiast aktywność ATP-azy miozynowej zmniejsza się pod wpływem tych jonów (96).

W a r d i wsp. (101) spostrzegli, że aktywność ATP-azy ekstrahowanych gliceryną włókien mięśniowych zależy od długości sarkomeru. Zmniejszenie długości sarkomeru prowadzi do wzrostu aktywności ATP-azy stymulowanej jonami  $Mg^{2+}$ , zwiększenie zaś do zaniku aktywności. Jest to zgodne z poglądem, że wraz ze skracaniem sarkomerów podczas pokrywania się filamentów „cienkich” i „grubych” występuje silna interakcja między aktyną i miozyną, która prowadzi do hydrolizy ATP, dostarczającej energii potrzebnej do skurczu. Przy maksymalnym rozciągnięciu sarkomeru połączenie to zostaje zerwane i aktywność ATP-azy jest niska (cyt. wg 58).

W wyniku wieloletnich badań ugruntował się pogląd, że interakcja dwóch strukturalnych białek mięśniowych aktyny i miozyny w obecności ATP stanowi podstawowy mechanizm skurczu mięśniowego.

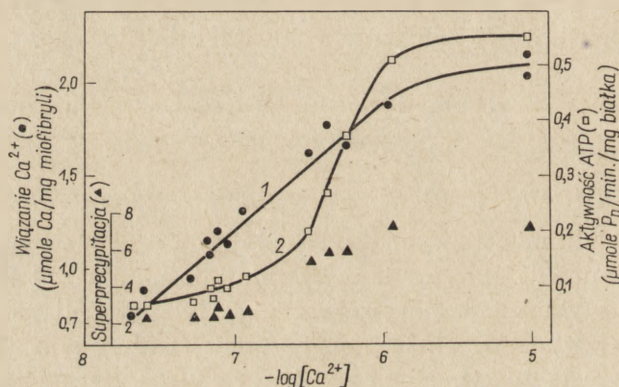
## II. Rola wapnia w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych

### 1. Wpływ stężenia jonów wapnia na aktywność mięśni

Skurcz modeli mięśniowych pod wpływem ATP jest nieodwracalny i odpowiada stanowi *rigor mortis* w żywym mięśniu. B o z l e r (4) i W a t a n a b e (99) wykazali jednak, że rozkurcz tych modeli może zachodzić pod wpływem związków chelatujących jony  $Ca^{2+}$ , na przykład EDTA. W niedługim czasie po tym P e r r y i G r e y (83, 84) zaobserwowali, że związki te znacznie obniżają poziom ATP-azy aktomiozynowej aktywowanej przez jony  $Mg^{2+}$ .

Równolegle prowadzono badania nad udziałem poszczególnych jonów w skurczu mięśnia. H e i l b r u n n i W i e r c i Ń s k i (49) badając wpływ iniekcji kationów dwuwartościowych na zachowanie się mięśnia zauważyli, że spośród szeregu kationów tylko kationy  $Ca^{2+}$  powodowały jego skurcz. Spostrzeżenie to potwierdzili następnie N i e d e r g e r k e (75) i P o d o l s k i (85). W następnych latach W e b e r i wsp. (104, 105, 106) wykazali, że dla uzyskania pełnej aktywacji ATP-azy aktomiozynowej poza jonami  $Mg^{2+}$ , konieczne jest również niewielkie stężenie jonów  $Ca^{2+}$ . Usunięcie jonów wapnia ze środowiska inkubacyjnego, na przykład przez dodatek EGTA, prowadzi do zahamowania rozkładu ATP (19, 20, 22, 72). EGTA jest analogiem EDTA o kilkakrotnie większym powinowactwie do  $Ca^{2+}$  niż do  $Mg^{2+}$ .

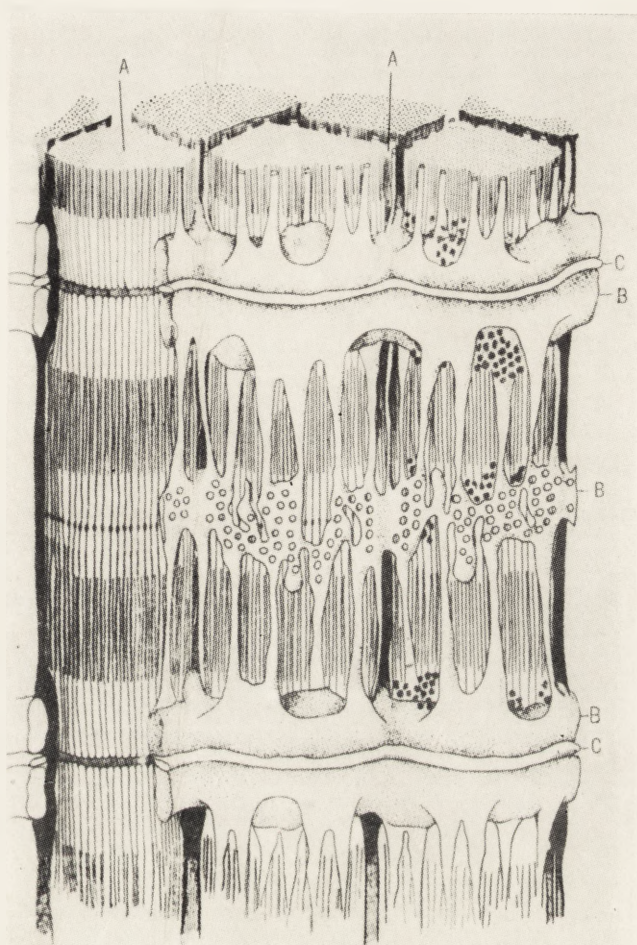
Dowody na to, że do aktywacji ATP-azy aktomiozynowej potrzebne są jony wapnia uzyskano dość późno, co można wytłumaczyć tym, że stosunkowo małe ilości tych jonów, zazwyczaj obecne jako zanieczyszczenia, wystarczą by zaktywować współdziałanie ATP z białkami kurczliwymi. Dlatego dopiero zastosowanie przez Weber i Herz (103, 104) buforów wapniowych, utrzymujących stężenie wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na stałym poziomie, pozwoliło rozwiązać ten problem. Szczególnie przydatny okazał się bufor  $\text{Ca-EGTA} + \text{EGTA}$ . Wykazano, że maksymalna aktywacja aktomiozyny następuje dopiero przy stężeniu  $10^{-4}\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$  i  $10^{-4}\text{M}$  ATP, natomiast zapotrzebowanie na  $\text{Ca}^{2+}$  zaspokaja w pełni 100 razy mniejsze stężenie tego kationu. Podczas badania wpływu stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na aktywność ATP-azy aktomiozynowej stwierdzono, że maksymalną aktywację tego enzymu uzyskuje się już przy stężeniu  $\text{Ca}^{2+}$   $10^{-6}\text{M}$ , natomiast zahamowanie rozkładu ATP i superprecypitacji następuje przy obniżeniu stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  poniżej  $10^{-7}\text{M}$  (103) (rysunek 1).



**Rys. 1.** Zależność między stężeniem wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  a aktywnością ATP-azy, superprecypitacji i wiązaniem  $\text{Ca}^{2+}$  przez miofibryle (104)

Analogiczne badania prowadzono *in vivo*, wstrzykując bufor wapniowy do żywego mięśnia w celu ustalenia poziomu wolnych jonów wapnia w różnych stanach fizjologicznych. Stwierdzono, że zarówno stężenie  $\text{Ca}^{2+}$ , poniżej którego następuje rozkurcz mięśnia, jak i stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w czasie skurczu jest takie samo jak w izolowanych systemach *in vitro* (89, 90). Całkowite stężenie wapnia w żywym mięśniu jest dużo wyższe i wynosi  $10^{-3} - 10^{-2}\text{M}$  (cyt. wg 44). Jednakże badania nad rozmieszczeniem  $\text{Ca}^{2+}$  we frakcjach subkomórkowych homogenatów mięśniowych wykazały, że główna jego część pozostaje związana z elementami strukturalnymi i nie daje się usunąć za pomocą EGTA, ani wymienić z wolnym  $^{45}\text{Ca}$  (42, 43, 79).





**Schemat 2.** Przekrój przez włókno mięśniowe (79a)  
 A) miofibryle B) sarkoplazmatyczne reticulum C) kanałiki systemu T



## 2. Sarkoplazmatyczne reticulum i jego funkcja

Po zaniku bodźca mięsień ulega szybko rozkurczowi, musi zatem istnieć mechanizm umożliwiający usunięcie ze środowiska jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , które są obecne podczas skurczu. Badania nad tak zwanym „czynnikiem rozkurczowym” datują się od 1951 roku, kiedy to Marsh (71) zauważył, że prze-mywanie homogenatów mięśni szkieletowych zwiększa skłonność do superprecypitacji. Punktem zwrotnym było zaobserwowanie przez Portzehl (88), że cała aktywność „rozkurczowa” mięśni, czyli zdolność do hamowania superprecypitacji miofibrili, znajduje się we frakcji mikrosomalnej, sedymentującej przy 35 000g. Jak się okazało, frakcja ta zawiera pęcherzyki stanowiące fragmenty sarkoplazmatycznego reticulum (86).

Sarkoplazmatyczne reticulum razem z tak zwanym systemem poprzecznym (systemem T) stanowi układ wewnątrzkomórkowych kanalików, otaczających włókienka mięśniowe (78, 93). Kanaliki sarkoplazmatycznego reticulum ułożone są równolegle do osi włókien i przy końcu każdego sarkomeru rozszerzają się tworząc pęcherzyki. System T tworzy osobny układ poprzecznych kanalików otaczających włókienka mięśniowe na poziomie linii Z, lub na granicy między prążkami A i I. Ponieważ depolaryzacja błony komórkowej powoduje lokalny skurcz sarkomerów w miejscu występowania systemu T, A. F. Huxley i Taylor (53) wysunęli przypuszczenie, że system ten stanowi przewodnik, poprzez który stan pobudzenia błony zewnętrznej komórki mięśniowej przenoszony jest do reticulum, a więc do jej wnętrza. Badania nad przenikaniem ferrytyny (56), albuminy (50) i barwników fluorescencyjnych (31) do systemu T wykazały, że stanowi on w istocie wpuklenie błony komórkowej. Obydwa systemy wewnątrzkomórkowych kanalików tworzą tak zwane triady złożone z dwóch pęcherzyków sarkoplazmatycznego reticulum należących do sąsiednich sarkomerów i położonego między nimi kanalika poprzecznego (schemat 2). Do tej pory nie udało się jednak stwierdzić bezpośredniego połączenia między obu tymi systemami.

Hasselbach i Makinose (45, 46) oraz Ebashi i Lipmann (30) dowiedli, że *in vitro* mechanizm hamowania ATP-azy aktomiozynowej przez mikrosomy mięśni jest zasadniczo podobny do działania EGTA. Na tej podstawie uważa się, że *in vivo* sarkoplazmatyczne reticulum spełnia rolę czynnika rozkurczowego dzięki usuwaniu z sarkoplazmy jonów  $\text{Ca}^{2+}$  potrzebnych do aktywacji ATP-azy aktomiozynowej. Akumulacja wapnia w sarkoplazmatycznym reticulum zachodzi przeciw gradientowi stężeń, kosztem energii pochodzącej z rozkładu ATP, na zasadzie tak zwanej „pompy wapniowej” (30, 46, 47, 48, 70). Pompa ta przestaje działać jeśli stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  na zewnątrz osiąga wartość graniczną  $10^{-8}$  —  $10^{-9}\text{M}$  (48, 70), powodując rozkurcz mięśnia.



ATP jest więc potrzebny nie tylko do skurczu, ale również do rozkurczu mięśnia. W mięśniu związek ten ulega regeneracji przy udziale fosfotransferazy ATP:AMP (EC 2.7.4.3.), lub fosfotransferazy ATP:kreatyna (EC 2.7.3.2.). Ponieważ dodanie tych enzymów do układów pozostających w stanie skurczu i zawierających rozłożony ATP powodowało rozkurcz, początkowo sądzono, że systemy te stanowią rozpuszczalny czynnik rozkurczowy (3, 36, 69, 87). Dopiero później okazało się, że zregenerowany ATP umożliwia wiązanie wapnia przez sarkoplazmatyczne reticulum a więc usunięcie go z sarkoplazmy.

Dodatek szczawianu do układu zawierającego mikrosomy, ATP, jony  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  z wielokrotnia transport  $Ca^{2+}$  oraz zwiększa jego stężenie wewnątrz reticulum wskutek jego akumulacji w postaci kryształów szczawianu wapnia. W tych warunkach można było za pomocą mikroskopu elektronowego zlokalizować w sposób bezsporny wapń w pęcherzykach sarkoplazmatycznego reticulum (6).

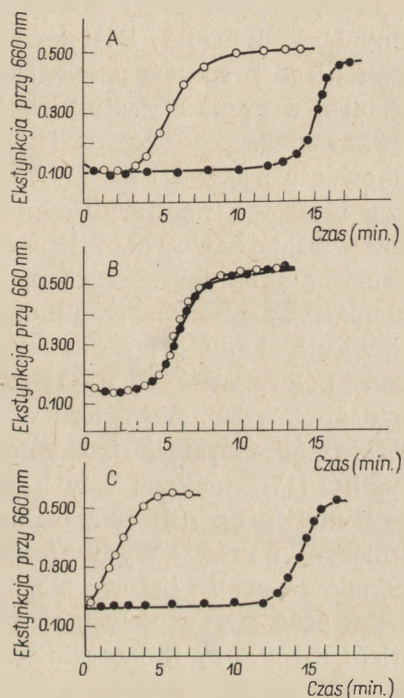
Mechanizm uwalniania z sarkoplazmatycznego reticulum wapnia potrzebnego do skurczu jest dotąd przedmiotem dyskusji. Wydaje się, że bezpośrednią odpowiedzią na impuls nerwowy jest zmiana potencjału komórkowego, która w konsekwencji powoduje uwalnianie wapnia z reticulum i pojawianie się go w sarkoplazmie w postaci zjonizowanej. Lee i wsp. (68) stwierdzili, że umieszczenie frakcji mikrosomalnej mięśni w polu elektrycznym powoduje wydzielanie wapnia do środowiska. Pierwszy bezpośredni dowód wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w sarkoplazmie w wyniku elektrycznego pobudzenia pochodzi od Jobsisa i O'Connora (60), którzy wstrzykiwali do żywego mięśnia mureksyd, barwnik wiążący  $Ca^{2+}$ . Przemieszczanie jonów  $Ca^{2+}$  w różnych fazach pracy mięśnia obserwował również Winograd (107, 108, 109) na autoradiogramach mięśni znakowanych  $^{45}Ca$ . W czasie spoczynku mięśnia wapń znajdował się w pęcherzykach sarkoplazmatycznego reticulum, wchodzących w skład triad, podczas gdy w mięśniu pobudzonym elektrycznie obecny był również w podłużnych kanalikach oraz na poziomie prążka A. Jeśli mięśnie utrwalano po coraz to dłuższym czasie od zaniku skurczu tężcowego,  $^{45}Ca$  znikał z prążków A i z kanalików i gromadził się w pęcherzykach.

### III. System białek rozkurczowych

#### 1. Preparaty białek „uczulających” aktomiozynę na jony $Ca^{2+}$

Już w 1956 roku Perry i Grey (84) zaobserwowali, że EDTA i EGTA hamujące ATP-azę miofibryli i aktomiozyny ekstrahowanej w postaci kompleksu z mięśni, czyli tak zwanej aktomiozyny naturalnej, nie mają wpływu na ATP-azę aktomiozyny rekonstruowanej z oddzielnie otrzymanych i wysoce oczyszczonych preparatów aktyny i miozyny. Spo-

strzeżenia te potwierdzone przez Weber i Winicur (106) można było tłumaczyć albo „modyfikacją” aktywności bądź miozyny podczas ich otrzymywania i oczyszczania, albo obecnością w naturalnej aktomiozynie dodatkowych składników białkowych, których nie posiada aktomiozyna rekonstruowana. W 1963 roku Ehashi (21) potwierdził drugą z tych możliwości; otrzymał on z mięśni frakcję białkową, obecną w preparatach aktomiozyny naturalnej, której dodatek do aktomiozyny rekonstruowanej powodował hamowanie ATP-azy w obecności EGTA (rysunek 2). Frakcję tę nazwano tropomiozyną rodzimą (23), gdyż własnościami fizykochemicznymi przypominała tropomiozynę.



**Rys. 2.** Wpływ tropomiozyny rodzimej na superprecypitację aktomiozyny (9)

A) aktomiozyna naturalna B) aktomiozyna rekonstruowana C) aktomiozyna rekonstruowana + tropomiozyna rodzima

Superprecypitacja w obecności  $10^{-4}$ M EGTA ●, w nieobecności EGTA O, mierzona zmiana zmiętnienia przy 660 nm

Tropomiozynę, trzecie obok aktywności i miozyny białko miofibrilarnie, opisał po raz pierwszy Bailey (1) już w roku 1948, ale przez długi okres czasu nie udało się określić funkcji tego białka w żywym mięśniu. Tropomiozyna stanowi około 10% białek miofibrilli (7) i jest białkiem wysoce asymetrycznym, o strukturze prawie w 100%  $\alpha$ -spiralnej (5, 51). W roztworach o niskiej sile jonowej wykazuje ona skutek tworzenia liniowych

polimerów bardzo wysoką lepkość i wysokie podwójnie załamanie prądowe. W miarę wzrostu siły jonowej następuje dysocjacja i spadek lepkości (1, 2, 98). Tropomiozyna jest bardzo wrażliwa na działanie trypsyny (66, 77). Własność tę wykorzystali Ebashi (23) dla udowodnienia roli tropomiozyny rodzimej w „uczulaniu” systemu aktomiozyny na  $\text{Ca}^{2+}$ , wykazując, że aktomiozyna naturalna po łagodnym trawieniu tym enzymem nie reaguje na zmiany stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  podobnie jak aktomiozyna rekonstruowana.

Mimo podobnych właściwości fizykochemicznych do preparatów tropomiozyny rodzimej czysta tropomiozyna, otrzymana klasyczną metodą Bailey'a (1) nie miała wpływu na układ zawierający rekonstruowaną aktomiozynę, ATP, jony  $\text{Mg}^{2+}$  i EGTA. Dlatego Ebashi początkowo sądził, że otrzymane przez niego preparaty odpowiadają formie tropomiozyny występującej *in vivo*, a preparaty otrzymane metodą Bailey'a są w jakiś sposób „zmodyfikowane”.

Wkrótce po opublikowaniu pracy Ebashich (23) ukazało się kilka prac dotyczących frakcji białkowej miofibryli odpowiedzialnej za uczulanie aktomiozyny na  $\text{Ca}^{2+}$ . Mueller (73, 74) przedstawił dane przemawiające za tym, że uczulanie aktomiozyny na jony wapnia następuje już w obecności samej tropomiozyny, preparowanej metodą Bailey'a, ale w warunkach zapobiegających utlenianiu grup tiolowych. Tropomiozyna zawiera około 6 moli reszt półcystynowych na  $10^5\text{g}$  białka (63, 65), które łatwo ulegają autooksydacji (17, 59). Zawartość wolnych grup tiolowych wykrywanych zazwyczaj w preparatach tropomiozyny, wynosiła tylko około 2 mole/ $10^5\text{g}$  białka (17), podczas gdy preparaty tropomiozyny Muellera zawierały 4—6 moli grup  $-\text{SH}/10^5\text{g}$  białka i wykazywały zdolność „uczulania” aktomiozyny na  $\text{Ca}^{2+}$ . Wyniki prac Ebashiego i wsp. (28, 29) świadczyły jednak, że grupy tiolowe tropomiozyny rodzimej nie mają wpływu na jej aktywność, gdyż stosowanie różnych sposobów ochrony tych grup przed utlenieniem nie powodowało wzrostu aktywności.

Równoległe badania nad frakcją białkową uczulającą aktomiozynę na jony wapnia prowadzone były w pracowni Perry'ego (40, 82), gdzie stwierdzono, że przemywanie aktomiozyny naturalnej roztworami buforowymi o odczynie lekko alkalicznym pozbawia ją zdolności reagowania na jony  $\text{Ca}^{2+}$ . Białko usuwane podczas tego procesu, nazwanego „odczulaniem”, miało właściwości zbliżone do tropomiozyny rodzimej.

Jeszcze inny rodzaj preparatu białkowego „uczulającego” aktomiozynę na jony  $\text{Ca}^{2+}$  otrzymał Katz (62) z aktywny ekstrahowanej w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Aktywna otrzymywana w tych warunkach zawierała, jak już wcześniej wykazano, tropomiozynę (15). Uzyskane przez Katza preparaty miały również właściwości fizykochemiczne podobne do tropomiozyny, jednakże analiza składu aminokwasowego, wykazująca dużą zawartość tryp-



tofanu i proliny — aminokwasów nieobecnych w tropomiozynie (65), ujawniła obecność dodatkowego materiału białkowego.

Wkrótce po odkryciu tropomiozyny rodzimej Ebashi i Kodama (26) donieśli, że białko to można rozdzielić w pH 4,6 (w punkcie izoelektrycznym tropomiozyny) na dwie komponenty, z których jedna okazała się identyczna z tropomiozyną Bailey'a, druga natomiast stanowiła białko globularne, różne od dotychczas poznanych białek strukturalnych mięśni. Białko to zostało następnie nazwane troponiną (27). Obecność troponiny w tropomiozynie rodzimej tłumaczyła dobrze różnicę między składem aminokwasowym oraz różnymi własnościami tych preparatów a czystą tropomiozyną. Ponieważ troponina podnosiła znacznie lepkość tropomiozyny Ebashi i Kodama (26) wysunęli przypuszczenie że białko to powoduje agregację tropomiozyny. Dalsze badania wykazały, że nie tylko sama tropomiozyna, ale i sama troponina nie „uczulają” aktomiozyny na  $\text{Ca}^{2+}$ , a jedynie kompleks tych białek jest aktywny (28). Okazało się zresztą, że preparaty tropomiozyny Muellera zawierały troponinę i tym, a nie redukcją grup -SH, należało tłumaczyć ich aktywność (110).

Jak wynika z powyższego przeglądu preparaty „uczulające” aktomiozynę na jony  $\text{Ca}^{2+}$  otrzymywano dość odmiennymi sposobami: przez ekstrakcję homogenatów mięśni roztworami o niskiej sile jonowej (Ebashi), lub przez ekstrakcję zarówno roztworami o niskiej (Katz), jak i wysokiej sile jonowej (Mueller) homogenatów odwodnionych acetonem, lub alkoholem. Porównawcze badania tych preparatów wykazały, że we wszystkich przypadkach podstawowymi ich składnikami są tropomiozyna i troponina. W zależności od metody otrzymywania preparatów obserwowano jedynie różne proporcje obu tych białek (14). Porównawcza analiza różnego typu preparatów zwróciła ponadto uwagę na zależność między zawartością troponiny a zdolnością „uczulania” aktomiozyny na  $\text{Ca}^{2+}$ . Największą zawartość troponiny i największą zdolność do hamowania ATP-azy aktomiozynowej i superprecypitacji w obecności EGTA wykazują preparaty białka otrzymanego metodą Ebashiego, jakkolwiek nawet w tym wypadku stopień hamowania ATP-azy można jeszcze zwiększyć wzbogacając je w troponinę (14). Prawdopodobnie preparaty tropomiozyny rodzimej nie są „wysyczone” troponiną, której nadmiar w stosunku do tropomiozyny potrzebny jest dla maksymalnego działania na system aktomiozyny (14, 29, 39, 110).

## 2. Interakcja tropomiozyny z troponiną

Preparaty białek „uczulających” aktomiozynę na jony  $\text{Ca}^{2+}$ , zawierające tropomiozynę i troponinę w różnych proporcjach wykazują zawsze pojedynczą „granice” sedymentacji o stałej 5,2S, różnej od stałych sedy-

mentacji tropomiozyny i troponiny (23, 39, 94). Hartshorne i Mueller (39), badając w ultrawirówce sztucznie wytworzone kompleksy troponiny i tropomiozyny zaobserwowali, że nawet przy znacznym wzroście zawartości troponiny nie pojawia się odpowiadająca temu białku osobna „granica” sedymentacji. Badania wiskozymetryczne kompleksów troponiny i tropomiozyny wykazały również ciągły wzrost lepkości w miarę wzrostu zawartości troponiny (10). Tropomiozyna tworzy zatem z troponiną kompleksy o bardzo różnych stosunkach obu tych białek, które są trwałe w przedziale temperatur  $0^{\circ}$ — $35^{\circ}\text{C}$  i  $\text{pH}$  6,0—9,0 (10) i zarówno podczas sączenia molekularnego na żelu *Sephadex G-200* jak i chromatografii jonowymiennej na *DEAE*-celulozie ulegają tylko częściowej dysocjacji (9, 92, 100).

### 3. Lokalizacja tropomiozyny i troponiny w mięśniach

Obecność tropomiozyny i troponiny w preparatach aktomiozyny naturalnej nasuwała przypuszczenie, że białka te mogą być powiązane z aktyną lub miozyną. Badania Kominza i Maruyamy (64) wykluczyły możliwość wiązania tropomiozyny rodzimej przez miozynę, Ebashi i Kodama (27) natomiast zaobserwowali powstawanie kompleksów F-aktyny z tropomiozyną rodzimą. Silne powinowactwo F-aktyny do tropomiozyny było już znane wcześniej. Interakcję obu tych białek wykazano na podstawie pomiarów lepkości, podwójnego załamania prądowego i badań w ultrawirówce (15, 18, 67). Z drugiej strony znane są pewne dowody, że F-aktyna wiąże się również z troponiną (16). Jeżeli więc uwzględnić omówione wyżej znaczne powinowactwo tropomiozyny do troponiny, to wyniki tych wszystkich badań nad wzajemną interakcją trzech białek miofibrylarnych: F-aktyny, tropomiozyny i troponiny *in vitro*, wskazywały na możliwość powiązania ich również w miofibrylach.

Już w 1958 roku Corsi i Perry (7) przypuszczali, że aktyna i tropomiozyna występują razem w „cienkich” filamentach, ponieważ ekstrahują się jednocześnie z mięśni. Niestety w mikroskopie elektronowym obraz „cienkich” filamentów i spirali F-aktyny jest praktycznie jednaki, stąd też Hanson i Lowy (38) wysunęli przypuszczenie, że tropomiozyna jest usytuowana w rowkach podwójnej spirali F-aktyny. Dopiero jednak zastosowanie znakowanych przeciwciał (90, 91) pozwoliło bezpośrednio wykazać obecność tropomiozyny na całej długości „cienkich” filamentów. Dotychczas jednak zagadnienie, czy tropomiozyna znajduje się również w linii Z, jak to sugerował Huxley (55), jest dyskusyjne.

W pracowni Ebashiego (32, 76), przy użyciu troponiny znakowanej izotocyjanianem fluoresceiny oraz przeciwciał tego białka stwierdzono również jego lokalizację w „cienkich” filamentach. Wyniki wskazywały na



rozłożenie cząsteczek troponiny wzdłuż cienkich filamentów z okresowością około 400Å. Odległość ta odpowiada długości pojedynczej cząsteczki tropomiozyny. Chociaż cząsteczki troponiny w miofibrylach są bardzo regularnie ułożone, interakcja F-aktyny z troponiną *in vitro* wydaje się zachodzić w sposób nieskoordynowany. Istnieją dowody na to, że interakcja ta zachodzi w sposób odmienny w obecności tropomiozyny (16). Próbując wytłumaczyć przebiegającą *in vivo* w sposób wysoce uporządkowany interakcję wszystkich trzech białek: F-aktyny, tropomiozyny i troponiny prowadzącą do wytworzenia „cienkich” filamentów, wysunięto koncepcję, że z jednej strony liniowe polimery tropomiozyny łącząc się bezpośrednio ze spiralą F-aktyny zapobiegają nieskoordynowanej interakcji cząsteczek aktyny z troponiną, z drugiej strony troponina spełnia jak gdyby rolę cementującą wiązanie F-aktyny z tropomiozyną (11).

#### 4. Troponina jako akceptor jonów $\text{Ca}^{2+}$ podczas skurczu

W poprzednich latach wykazano (102), że aktywacja skurczu mięśniowego następuje w wyniku wiązania wapnia przez miofibryle. Superprecypitacji oraz optymalnej aktywności ATP-azy aktomiozynowej towarzyszy wiązanie 1,5—2,0  $\mu\text{moli}$   $\text{Ca}^{2+}$  na 1g białek miofibrylarnych (104). Obserwacje te były jednym z fundamentów „wapniowej” teorii skurczu. W miofibrylach musiał zatem znajdować się jakiś akceptor jonów wapnia uwolnionych pod wpływem bodźca nerwowego z sarkoplazmatycznego reticulum. Jakkolwiek miozyna i aktyna wiążą wapń to powinowactwo tego kationu do miozyny jest stosunkowo niskie (25, 102), a wapń związany z F-aktyną jest praktycznie niewymienialny i nie udało się wykazać jego udziału w cyklu skurczowo-rozkurczowym (61). Fuchs i Briggs (34, 35) poszukując miejsc receptorowych dla wapnia w miofibrylach stwierdzili, że spośród wszystkich obecnych w nich białek największe powinowactwo do wapnia przejawia troponina. W tym samym czasie wiązanie wapnia przez troponinę wykryto w dwu innych pracowniach (12, 24). Wszystkie dane wskazywały, że preparaty troponiny zawierają wapń w ilości około 5 moli/ $10^5\text{g}$  białka, z czego większość jest wymienialna. Obliczono, że całkowita ilość wymienialnego wapnia, którą może związać troponina odpowiada oznaczonej wcześniej ilości wapnia związanego przez miofibryle podczas skurczu. Z kolei stała powinowactwa wapnia do troponiny wynosząca około  $10^6\text{M}^{-1}$ , jest tego samego rzędu co stała wiązania wymienialnego wapnia przez miofibryle (35). Wszystkie te obserwacje zdają się wskazywać, że troponina jest tym białkiem w miofibrylach, które odwracalnie wiąże wapń i w ten sposób jest bezpośrednio włączone w system regulujący cykl skurczowo-rozkurczowy w mięśniach.



#### IV. Hipotezy dotyczące molekularnych podstaw skurczu mięśnia

Spośród szeregu teorii dotyczących interakcji aktyny i miozyny na poziomie molekularnym, najbardziej wszechstronną była ogłoszona w 1963 roku teoria Daviesa (8). Jej myślą przewodnią było założenie, że interakcja między aktyną i miozyną zachodzi przy bezpośrednim udziale wapnia. Według Daviesa wapń, uwalniany z sarkoplazmatycznego reticulum po zadziałaniu bodźca, tworzy chelatowe połączenie pomiędzy ADP trwale związanym z F-aktyną i ATP wiążącym się z cząsteczką miozyny. Takiemu połączeniu aktyny z miozyną towarzyszą zmiany strukturalne w cząsteczce miozyny powodujące jednoczesne przesuwanie filamentów aktynowych i miozynowych względem siebie. Przeniesienie związanego przez miozynę ATP w obszar aktywności ATP-azy powoduje rozłożenie go na ADP i ortofosforan i w konsekwencji przerwanie połączenia aktyny z miozyną. Jest to koniec aktywnego stanu mięśnia związany z transportem  $\text{Ca}^{2+}$  spowrotem do sarkoplazmatycznego reticulum.

Początkowo wydawało się, że teoria Daviesa ma wystarczające potwierdzenie eksperymentalne. Z chwilą jednak stwierdzenia, że do interakcji aktyny z miozyną niepotrzebne są jony  $\text{Ca}^{2+}$ , stało się jasne, że zagadnienie molekularnego mechanizmu skurczu mięśnia jest dużo bardziej skomplikowane i nie da się sprowadzić wyłącznie do interakcji miozyny i aktyny, ale że biorą w nim udział białka systemu rozkurczowego: tropomiozyna i troponina. Chociaż hipoteza Daviesa (8) okazała się błędna, teoria, że jony wapnia w warunkach fizjologicznych spełniają zasadniczą rolę w cyklu skurczowo-rozkurczowym nie utraciła na aktualności. Działanie jonów wapnia związane jest z regulacją przebiegu poszczególnych faz tego cyklu i wymaga obecności kompleksu tropomiozyny i troponiny.

Mechanizm działania układu: jony wapnia i kompleks tropomiozyna-troponina na aktomiozynę na poziomie molekularnym pozostaje dotychczas w sferze hipotez. Ebashi i Endo (25) uważają, że wiązanie wapnia przez troponinę powoduje zmiany konformacyjne tego białka, które przenoszone poprzez tropomiozynę powodują strukturalne zmiany filamentów aktynowych, wpływając na ich interakcję z filamentami miozynowymi.

Według Perry'ego (81) troponina odznaczająca się wysokim powinowactwem do wapnia, w warunkach nasycenia tym kationem nie wpływa w kompleksie z tropomiozyną na centra aktywne aktomiozyny. Kiedy na skutek działania czynników rozkurczowych (*in vitro* — czynników chelatujących wapń, *in vivo* — sarkoplazmatycznego reticulum), poziom wolnego wapnia w sarkoplazmie zostaje obniżony do wartości poniżej  $10^{-7}\text{M}$ , troponina traci związany wapń. Kompleks troponiny z tropomiozyną pozbawiony wapnia wiąże się specyficznie albo z enzymatycznym

centrum miozyny, albo ze współdziałającym z nim aktywnym centrum aktyny, hamując w konsekwencji aktywowaną jonami  $Mg^{2+}$  hydrolizę ATP. Podwyższenie poziomu wolnego wapnia powyżej  $10^{-6}M$  w wyniku uwalniania wapnia z sarkoplazmy powoduje ponowne wiązanie wapnia przez kompleks tropomiozyny i troponiny i odblokowanie ATP-azy aktomiozynowej.

## V. Uwagi końcowe

Wydaje się, że dopiero zastosowanie nowoczesnych metod fizykochemicznych pozwoli na głębsze wniknięcie w subtelne zmiany konformacyjne całego systemu białek aparatu kurczliwego mięśni, zachodzące podczas cyklu skurczowo-rozkurczowego. Za pierwszą pracę tego typu można uważać ogłoszoną ostatnio przez Tonomurę i wsp. (97), w której autorzy zastosowali technikę *spin label*. Okazało się, że wykazujące właściwości paramagnetyczne pochodne N-etylomaleimidu po przyłączeniu do tropomiozyny odpowiadają na zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$  tylko w obecności troponiny.

Z drugiej strony ostatnie doniesienia wskazują, że system białkowy biorący udział w regulacji stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w mięśniach jest jeszcze bardziej złożony, to znaczy nie składa się jedynie z dwu indywidualów białkowych: tropomiozyny i troponiny. Preparaty tej ostatniej są wyraźnie heterogenne w elektroforezie na żelu poliakrylamidowym i przy rozdziale na *DEAE-Sephadex A-50* (13). Według Hartshorne i wsp. (41) troponinę można rozdzielić w pH 1,0 na dwie frakcje, z których jedna hamuje ATP-azę aktomiozyny w nieobecności tropomiozyny i EGTA, podczas gdy druga nie ma tych właściwości, ale z kolei prawdopodobnie jest miejscem akceptorowym jonów  $Ca^{2+}$  (13). Jednak jedynie obecność obu frakcji powoduje „uczulanie” aktomiozyny na jony  $Ca^{2+}$ .

Wszystkie te obserwacje świadczą w każdym razie o tym, że w latach ostatnich dawne, zdawałoby się już wystarczająco udokumentowane, poglądy sprowadzające skurcz mięśni wyłącznie do interakcji aktyny z miozyną zostały nieodwracalnie odrzucone. Zagadnienie okazało się dużo bardziej skomplikowane i jest chyba jeszcze dalekie od całkowitego wyjaśnienia.

Praca częściowo dotowana z funduszków umowy polsko-amerykańskiej 05—015-1.

## LITERATURA

1. Bailey K., *Biochem. J.* **43**, 271 (1948).
2. Bailey K., Gutfreund H., Ogston A. G., *Biochem. J.* **44**, 279 (1948).
3. Bendall J. R., *Proc. Roy. Soc. (London) B*, **142**, 409 (1954).

4. Bozler E., *J. Gen. Physiol.* **38**, 53 (1954).
5. Cohen C., *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem.* Vienna 1958, str. 108, Pergamon Press, Oxford.
6. Constantin L. L., Franzini-Armstrong C., Podolsky R. J., *Science* **147**, 158 (1965).
7. Corsi A., Perry S. V., *Biochem. J.* **68**, 12 (1958).
8. Davies R. E., *Nature* **199**, 1068 (1963).
9. Dąbrowska R., *Praca Doktorska*, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 1969 r.
10. Dąbrowska R., Drabikowski W., Symposium „Functional and Structural Aspects of the Myofibrillar Proteins”. Balatonboglár, Węgry 1968, str. 3.
11. Drabikowski W., Sympozjum: „Functional and structural aspects of myofibrillar proteins”, Balatonboglár, Węgry 1968, str. 2.
12. Drabikowski W., Baryłko B., Dąbrowska R., Nowak E., *Bull. Acad. Polon. Sci.* **16**, 397 (1968).
13. Drabikowski W., Dąbrowska R., Baryłko B., Greaser M., Gergely J., Third Intern. Biophysic Congress. Cambridge, Mass., U.S.A. 1969, Abstracts of Commun., str. 193.
14. Drabikowski W., Dąbrowska R., Nowak E., *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **4**, 112 (1969).
15. Drabikowski W., Gergely J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3412 (1962).
16. Drabikowski W., Nonomura Y., *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 129 (1968).
17. Drabikowski W., Nowak E., *Acta Biochim. Polon.* **12**, 61 (1965).
18. Drabikowski W., Nowak E., *Eur. J. Biochem.* **5**, 376 (1968).
19. Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **48**, 150 (1960).
20. Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **50**, 236 (1961).
21. Ebashi S., *Nature* **200**, 1010 (1963).
22. Ebashi S., Ebashi F., *Nature* **194**, 378 (1962).
23. Ebashi S., Ebashi F., *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 604 (1964).
24. Ebashi S., Ebashi F., Kodama A., *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 137 (1967).
25. Ebashi S., Endo M., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **18**, 123 (1968).
26. Ebashi S., Kodama A., *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 107 (1965).
27. Ebashi S., Kodama A., *J. Biochem. (Tokyo)* **59**, 425 (1966).
28. Ebashi S., Kodama A., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 733 (1966).
29. Ebashi S., Kodama A., Ebashi F., *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 465 (1968).
30. Ebashi S., Lipmann F., *J. Cell. Biol.* **14**, 389 (1962).
31. Endo M., *J. Physiol.* **185**, 224 (1966).
32. Endo M., Nonomura Y., Masaki T., Ohtsuki I., Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 605 (1966).
33. Engelhardt W. A., Ljubimowa M. N., *Nature* **144**, 668 (1939).
34. Fuchs F., Briggs F. N., *Federation Proc.* **26**, 586 (1967).
35. Fuchs F., Briggs F. N., *J. Gen. Physiol.* **51**, 655 (1968).
36. Goodall M. C., Szent-Györgyi A. G., *Nature* **172**, 84 (1953).
37. Hanson J., Huxley H. E., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 50 (1957).
38. Hanson J., Lowy J., *Proc. Roy. Soc. (London) B*, **160**, 449 (1964).
39. Hartshorne D. J., Mueller H., *J. Biol. Chem.* **242**, 3089 (1967).
40. Hartshorne D. J., Perry S. V., Davies V., *Nature* **209**, 1352 (1966).



41. Hartshorne D. J., Theiner M., Mueller H., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 320 (1969).
42. Hasselbach W., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 355 (1956).
43. Hasselbach W., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 365 (1957).
44. Hasselbach W., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **14**, 167 (1964).
45. Hasselbach W., Makinose M., *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* **272**, 45 (1960).
46. Hasselbach W., Makinose M., *Biochem. Z.* **333**, 518 (1961).
47. Hasselbach W., Makinose M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 132 (1962).
48. Hasselbach W., Makinose M., *Biochem. Z.* **339**, 94 (1963).
49. Heilbrunn L. V., Wierciński F. J., *J. Cell. Comp. Physiol.* **29**, 15 (1947).
50. Hill D. K., *J. Physiol.* **175**, 275 (1964).
51. Holtzer A., Clark R., Lowey S., *Biochemistry* **4**, 2401 (1965).
52. Huxley A. F., Niedergerke R., *Nature* **173**, 971 (1954).
53. Huxley A. F., Taylor R. E., *J. Physiol.* **144**, 426 (1958).
54. Huxley H. E., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 387 (1953).
55. Huxley H. E., *J. Mol. Biol.* **7**, 285 (1963).
56. Huxley H. E., *Nature* **202**, 1067 (1964).
57. Huxley H. E., Hanson J., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 229 (1957).
58. Huxley H. E., Hanson J., w *Structure and Function of Muscle I*, red. Bourne G. H., Academic Press, New York 1960, str. 183.
59. Jen M., Hsü T., Tsao T. C., *Sci Sinica* **14**, 81 (1965).
60. Jöbsis F. F., O'Connor M. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 246 (1966).
61. Kasai M., Oosawa F., *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 300 (1969).
62. Katz A. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 1522 (1966).
63. Kominz D. R., Hough A., Symonds P., Laki K., *Arch. Biochem. Biophys.* **50**, 148 (1954).
64. Kominz D. R., Maruyama K., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 269 (1967).
65. Kominz D. R., Saad F., Gladner J. A., Laki K., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 16 (1957).
66. Laki K., *J. Cell. Comp. Physiol.* **49**, Suppl., 249 (1957).
67. Laki K., Maruyama K., Kominz D. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 323 (1962).
68. Lee K. S., Ladinsky H., Choi S. J., *J. Gen. Physiol.* **49**, 689 (1966).
69. Lorand L., *Nature* **172**, 1181 (1953).
70. Makinose M., Hasselbach W., *Biochem. Z.* **343**, 360 (1965).
71. Marsh B. B., *Nature* **167**, 1065 (1951).
72. Maruyama K., Wanatabe S., *J. Biol. Chem.* **237**, 3437 (1962).
73. Mueller H., *Biochem. Z.* **345**, 300 (1966).
74. Mueller H., *Nature* **209**, 1128 (1966).
75. Niedergerke R., *J. Physiol.* **128**, 12P (1955).
76. Ohtsuki I., Masaki T., Nonomura Y., Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 817 (1967).
77. Ooi W., *Biochemistry* **6**, 2433 (1967).
78. Page S., *Brit. Med. Bull.* **24**, 170 (1968).
79. Parker C. J., Gergely J., *J. Biol. Chem.* **236**, 411 (1961).
- 79a. Peachey L. D., *J. Cell. Biol.* **25**, 209 (1965).

80. Pepe F. A., *J. Cell. Biol.* **23**, 505 (1966).
81. Perry S. V., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **17**, 324 (1967).
82. Perry S. V., Davies V., Hayter D., *Biochem. J.* **99**, 1c (1966).
83. Perry S. V., Grey T. C., *Biochem. J.* **64**, 184 (1956).
84. Perry S. V., Grey T. C., *Biochem. J.* **64**, 5P (1956).
85. Podolski R. J., *Proc. in Union Physiol. Sci. II, XXII Intern. Congress, Leiden 1962*, str. 902.
86. Porter K. R., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, Suppl. 219 (1961).
87. Portzehl H., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 477 (1957).
88. Portzehl H., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 373 (1957).
89. Portzehl H., *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* **281**, 71 (1965).
90. Portzehl H., Caldwell P. C., Rüegg J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 581 (1964).
91. Samosudowa N. W., Kałamkarowa M. W., Ogijewiecka-j a M. M., *Biofizika* **10**, 268 (1965).
92. Schaub M. C., Perry S. V., Hartshorne D. J., *Biochem. J.* **105**, 1235 (1967).
93. Smith D. S., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **16**, 107 (1966).
94. Staprans J., Arai K., Watanabe S., *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 65 (1968).
95. Szenn-Györgyi A., *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* **1**, 17 (1941—42).
96. Szent-Györgyi A., *Acta Physiol. Scand.* **9**, Suppl. 25 (1945).
97. Tonomura Y., Watanabe S., Morales M., *Biochemistry* **8**, 2171 (1969).
98. Tsao T. C., Bailey K., Adair G. S., *Biochem. J.* **49**, 27 (1951).
99. Wanatabe S., *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 559 (1955).
100. Wanatabe S., Staprans I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 572 (1966).
101. Ward P. C., Edwards C., Benson E. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1377 (1965).
102. Weber A., w *Current Topics in Bioenergetics* Red. D. R. Sanadi, Academic Press, New York i Londyn 1966, str. 203.
103. Weber A., Herz R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 364 (1962).
104. Weber A., Herz R., *J. Biol. Chem.* **238**, 559 (1963).
105. Weber A., Herz R., Reiss I., *J. Gen. Physiol.* **46**, 679 (1963).
106. Weber A., Winicur S., *J. Biol. Chem.* **236**, 3198 (1961).
107. Winegrad S., *J. Gen. Physiol.* **48**, 455 (1965).
108. Winegrad S., *J. Gen. Physiol.* **48**, 997 (1965).
109. Winegrad S., *J. Gen. Physiol.* **51**, 65 (1968).
110. Yasui B., Fuchs F., Briggs F. N., *J. Biol. Chem.* **243**, 735 (1968).

JÓZEF JANICKI\*, JANUSZ SKUPIN\*\*, ANDRZEJ GIEC\*\*\*

## Stan badań nad kwasem pangamowym (witaminą B<sub>15</sub>)

### The Actual State of Research on Pangamic Acid (Vitamin B<sub>15</sub>)

The chemical structure, biochemical and physiological functions, as well as the therapeutic application of vitamin B<sub>15</sub>, are discussed.

W roku 1950 Tomiyama i Yone (42) donieśli o wyodrębnieniu z wodnego wyciągu wątroby wołu krystalicznego czynnika wzrostowego dla kurcząt, który nazwali witaminą B<sub>15</sub>. Surowy preparat czynnika zawierał tylko śladowe ilości witaminy B<sub>12</sub> i kwasu foliowego, nie zapewniające efektów żywieniowych właściwych dla tych substancji. Preparat dodany do paszy wyraźnie stymulował wzrost kurcząt.

W 1951 roku Krebs i wsp. (25) wykryli w niektórych produktach naturalnych związek nazwany później ze względu na swe powszechne występowanie kwasem pangamowym. Okazało się następnie, że jest on identyczny z czynnikiem odkrytym przez Tomiyamę i Yone. Krebs i wsp. (35) donieśli o wyosobnieniu tego nowego związku w formie krystalicznej z kielków ryżu, otrąb i łusek ryżowych, drożdży piwnych, krwi wołu i wątroby konia, nie precyzując jednak warunków wyodrębniania i oczyszczania. Autorzy ci przypuszczają, że związek ten powszechnie występuje w przyrodzie i jest niezbędnym czynnikiem pokarmowym mimo, że nie udało się zaobserwować wyraźnych objawów jego niedoboru. Stwierdzono jednak wydzielanie go w moczu, kale i pocie. Z badań nad chemizmem, aktywnością biologiczną i zastosowaniem terapeutycznym kwasu pangamowego wynika, że bierze on udział w procesach metylacji i utleniania komórkowego. Z uwagi na ważną rolę fizjologiczną tego związku i brak w piśmiennictwie polskim opracowań z zakresu tej tematyki w niniejszej pracy omówiono obecny stan badań nad kwasem pangamowym.

---

\* Prof. dr, Katedra Technologii Rolnej, Wyższa Szkoła Rolnicza, Poznań

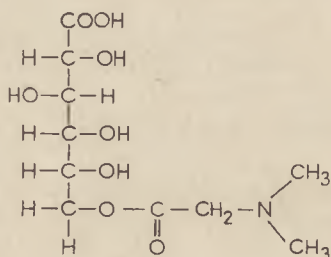
\*\* Doc. dr, Zakład Biochemii Żywności, Wyższa Szkoła Rolnicza, Poznań

\*\*\* Mgr, Zakład Biochemii Żywności, Wyższa Szkoła Rolnicza, Poznań



# I. Charakter chemiczny kwasu pangamowego i preparatów handlowych pod nazwą „Witamina B<sub>15</sub>”

Naturalny kwas pangamowy jest zdaniem większości autorów glukono-6-acetylo-N-dwumetyloaminą o wzorze sumarycznym C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>N i strukturze przedstawionej wzorem I.

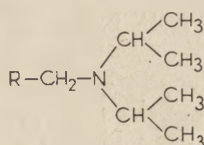


I

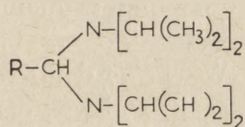
Kwas pangamowy można zatem uważać za pochodną kwasu glukonowego, w którym grupa hydroksylowa przy szóstym atomie węgla jest zestryfikowana dwumetyloglicyną. Na podkreślenie zasługują tutaj nieścisłości danych dotyczących struktury chemicznej kwasu pangamowego. K r e b s i wsp. (25) podali, że wyosobniony przez nich kwas pangamowy jest aminową pochodną kwasu glukuronowego o masie cząsteczkowej 281 i wzorze sumarycznym C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>N, ale nie określili jej budowy. Masa cząsteczkowa związku nie odpowiada jednak masie cząsteczkowej obliczonej według wzoru sumarycznego, z drugiej zaś strony taki wzór sumaryczny nie może być wzorem pochodnej kwasu glukuronowego. W kilka lat później K r e b s i K r e b s (24) opisując w formie patentu syntezę chemiczną witaminy B<sub>15</sub> zmienili swoją pierwotną hipotezę, określając witaminę B<sub>15</sub> jako pochodną kwasu glukonowego opisaną wzorem I.

Niektórzy autorzy (5, 34) przyjmują jednak mylnie kwas pangamowy za pochodną kwasu glukuronowego opierając się na pierwszej hipotezie Krebsa nawet po zmianie stanowiska przez tego badacza. Jeżeli nawet przyjąć, że witamina B<sub>15</sub> jest pochodną kwasu glukuronowego, wówczas reszta dwumetyloglicyny mogłaby się przyłączyć do jednego z czterech węgli tego kwasu, posiadających grupy -OH lub do pierwszego węgla z grupą aldehydową. Pierwszy przypadek jest niemożliwy, bowiem jak ustalił N a v a r r o (33) kwas pangamowy nie zawiera wolnej grupy aldehydowej, co wskazuje, że w skład witaminy B<sub>15</sub> wchodzi kwas glukonowy a nie glukuronowy. Inni autorzy skłonni są przypisywać kwasowi pangamowemu większą ilość grup metylowych (33, 34), prawdopodobnie na

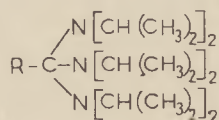
podstawie analiz określonych syntetycznych pochodnych. Obecnie wiele firm zagranicznych, oprócz właściwego kwasu pangamowego produkuje i zaopatruje rynek w preparaty pod nazwą „witamina B<sub>15</sub>”, odznaczające się działaniem terapeutycznym zbliżonym do kwasu pangamowego, lecz o odmiennym składzie chemicznym. Są to opisane przez K r e b s ó w (24) syntetyczne pochodne kwasu pangamowego o wzorach II, III i IV, zawierające większą ilość grup metylowych. Związki te według szeregu autorów (3, 4, 5, 32, 34, 35, 46) przejawiają również, podobnie jak kwas pangamowy, zdolność do metylowania, mimo że grupy metylowe związane z atomem węgla są mniej aktywne niż związane z atomem azotu.



II



III



IV

R – cząsteczka kwasu glukonowego

Drugim rodzajem preparatów, którym przypisuje się działanie witaminy B<sub>15</sub> i nadaje tę nazwę handlową, są mieszaniny, składające się w większości z glukonianu wapnia lub sodu i dwuchloroacetylo-N-dwuzopropylaminy niekiedy z dodatkiem glicyny. D a n s i (12) oraz C a s u i wsp. (10) z Instytutu Chemii w Mediolanie przeprowadzili badania nad preparatem amerykańskim witaminy B<sub>15</sub>. Z analizy chemicznej i widma w podczerwieni wynika, że preparat ten jest mieszaniną dwuchloroacetylo-N-dwuzopropylaminy, glicyny i glukonianu sodu. Podobnie J a n i c k i i wsp. (21) stwierdzili, że witamina B<sub>15</sub> firmy *Nutritional Biochemicals Corporation*, Cleveland, Ohio, jest mieszaniną o identycznym składzie. Również włoskie preparaty „Pangamin” i „Biopangamin” firmy *Istalseber* oraz japońskie firmy *Santyo* zawierają wymienione składniki zmieszane w różnych stosunkach wagowych.

Preparaty handlowe (74) zawierają zatem bądź kilka związków o budowie zbliżonej do kwasu pangamowego, bądź są mieszaninami jego komponentów składowych, które wykazują działanie podobne ale nie identyczne jak witamina B<sub>15</sub>.

## II. Aktywność kwasu pangamowego w procesach biochemicznych

Właściwości biochemiczne kwasu pangamowego i jego aktywność fizjologiczna są uwarunkowane obecnością labilnych grup metylowych w cząsteczce. Jak wykazano, mogą one brać udział w procesach metylacji

w ustroju. Natomiast reszta kwasu glukonowego warunkuje głównie udział kwasu pangamowego w reakcjach utleniania komórkowego.

### 1. Udział kwasu pangamowego w reakcjach metylowania

Wiele niezbędnych dla ustroju związków powstaje w wyniku reakcji, której prawidłowy przebieg warunkuje sprawna przemianę materii i energii (13). W tym aspekcie kwas pangamowy, jako nowy czynnik dostarczający labilnych grup metylowych, wzbudził duże zainteresowanie. Liczni autorzy przeprowadzili badania nad biosyntezą kreatyny, metioniny, N-metyloamidu kwasu nikotynowego z udziałem kwasu pangamowego jako donatora grup metylowych oraz nad działaniem lipotropowym witaminy B<sub>15</sub>.

W 1956 roku Beard i Wofford (3) w doświadczeniach przeprowadzonych na szczurach wykazali, że kwas pangamowy i jego syntetyczny analog glukono-6-acetylo-N-dwuizopropylaamina są donatorami grup metylowych w biosyntezie kreatyny. Po podaniu witaminy B<sub>15</sub> zaobserwowali oni zwiększenie poziomu kreatyny w wątrobie, mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych. Okazało się, że mniejsze dawki były bardziej efektywne niż większe, co nasunęło przypuszczenie o koenzymatycznej funkcji witaminy B<sub>15</sub>.

Mascitelli, Coriandoli i wsp. (30) wykazali, że kwas pangamowy pobudza biosyntezę kreatyny w wątrobie szczurów w przypadku zahamowania jej tyroksyną. O stymulacji syntezy kreatyny przez kwas pangamowy donieśli także inni autorzy (34, 44). Kliniczne obserwacje Cugadtla i Dispensa (11) wykazały, że witamina B<sub>15</sub> wpływa na zwiększenie zawartości kreatyny i kreatyniny w krwi u człowieka. Sołowjewa i Garkina (39) u szczurów nie zauważyły natomiast wpływu kwasu pangamowego na syntezę kreatyny *in vivo*, co można by prawdopodobnie tłumaczyć znacznymi wahaniami zawartości kreatyny u tych zwierząt i zbyt małą ilością doświadczeń. W warunkach *in vitro* autorki stwierdziły bowiem pobudzanie syntezy kreatyny przez witaminę B<sub>15</sub>, a ponadto zauważyły wyraźny wpływ ATP na syntezę kreatyny przy udziale witaminy B<sub>15</sub>. Można z tego wnosić, że synteza kreatyny z kwasu guanidynooctowego przebiega prawdopodobnie jedną drogą niezależnie od tego czy donatorem grup metylowych jest metionina czy kwas pangamowy. Ponieważ układ enzymatyczny syntetyzujący kreatynę jest bardzo specyficzny wobec donatora grupy metylowej — metioniny (7), udział kwasu pangamowego w enzymatycznych reakcjach metylacji stanowi bardzo interesujące zagadnienie. W 1959 roku Mangiantini (29) zauważyła, że homogenaty wątroby szczura w obecności homocysteiny i witaminy B<sub>15</sub> syntetyzowały metioninę, chociaż mniej intensywnie niż w obec-



ności betainy, jednak w 1965 roku Sołowjewa i Garkina (39) nie potwierdziły tej obserwacji.

Kwas pangamowy może być donatorem labilnych grup metylowych w biosyntezie N-metylowej pochodnej amidu kwasu nikotynowego w organizmie człowieka (44), natomiast *in vitro* nie udało się (39) wykazać wpływu witaminy B<sub>15</sub> na syntezę N-metylo-amidu kwasu nikotynowego. Nie jest wykluczone, że w organizmie kwas pangamowy może ulegać różnym przemianom i oddawać swoje grupy metylowe za pośrednictwem innych związków.

Badano również lipotropowe działanie witaminy B<sub>15</sub> stosując ją w przypadkach stłuszczenia wątroby wywołanego niedoborem w diecie związków posiadających aktywne grupy metylowe związane z siarką lub azotem. Brak tych rodników powoduje zakłócenie metabolizmu i prowadzi do patologicznego nagromadzenia tłuszczu w wątrobie. Wykazanie charakteru leczniczego witaminy B<sub>15</sub> w przypadku stłuszczenia wątroby pozwoliło udowodnić aktywność metylującą tego związku (3, 6, 27, 34, 38, 43).

## 2. Udział kwasu pangamowego w procesach utleniania komórkowego

Drugim ważnym działaniem fizjologicznym witaminy B<sub>15</sub> jest jej wpływ na przemianę tlenową w komórkach i tkankach. Wszyscy prawie autorzy obserwowali tę właściwość witaminy B<sub>15</sub> w badaniach zarówno laboratoryjnych jak i klinicznych. Po raz pierwszy tę właściwość zauważyli Krebs i wsp. (25), którzy sugerują, że witamina B<sub>15</sub> jest grupą prostetyczną enzymów oddechowych związanych z utlenieniem glukozy.

W doświadczeniach na zwierzętach stwierdzono (43), że podawanie witaminy B<sub>15</sub> zwiększa odporność systemu sercowo-naczyniowego na niedotlenienie ustroju. Badano również (44) wpływ kwasu pangamowego na organizm w warunkach niedotlenienia panujących na dużych wysokościach i stwierdzono wyraźny wpływ witaminy B<sub>15</sub> na aktywność enzymów oddechowych. Wprowadzenie do organizmu zwierząt doświadczalnych witaminy B<sub>15</sub> podwyższało aktywność dehydrogenazy kwasu bursztynowego przy jednoczesnym obniżeniu aktywności oksydazy cytochromowej. Powyższy fakt można przypisać pobudzeniu beztlenowego etapu procesu oddychania komórkowego przez kwas pangamowy. W związku z tym obserwowano obniżenie intensywności przenoszenia tlenu przez system cytochromów. Mechanizm działania kwasu pangamowego w procesach oddychania tkankowego przy niedostatecznej ilości tlenu nie jest w pełni wyjaśniony.

Na podstawie wyników doświadczeń, w których badano działanie witaminy B<sub>15</sub> przy ogólnej asfiksji i lokalnej hipoksji mięśnia sercowego wywołanej częściowym zamknięciem jednej z tętnic wieńcowych można przy-

puszczać, że mechanizm działania witaminy B<sub>15</sub> w procesach oddechowych polega na aktywacji określonych układów enzymatycznych (43).

Sołowiewa i Garkina (39) rozpatrywały również inny mechanizm działania witaminy B<sub>15</sub> na utlenianie komórkowe. Wykazały one w doświadczeniach *in vitro*, że podobnie jak dwumetyloglicyna i sarkozy- na również kwas pangamowy zawierający resztę dwumetyloglicyny może ulegać oksydacyjnej demetylacji w szeregu reakcji enzymatycznych. Jak wykazali Frisell i Mackenzie (14), utlenianie dwumetyloglicyny i sarkozy-ny przebiega z udziałem dehydrogenazy flawinowej. Sołowiewa i Garkina (39) stwierdziły, że kwas pangamowy ulega oksydacyjnej demetylacji na skutek działania układu enzymatycznego bardzo zbliżonego do dehydrogenazy dwumetyloglicyny. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że enzymy biorące udział w utlenianiu grup metylowych kwasu pangamowego i dwumetyloglicyny są identyczne. Podobne badania przeprowadzone na pochodnych kwasu pangamowego zawierających cztery grupy metylowe w cząsteczce nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Możliwość udziału witaminy B<sub>15</sub> jako substratu w reakcjach oksydacyjnej demetylacji nie wyjaśnia jeszcze jej specyficznego działania na utlenianie komórkowe.

### III. Funkcje fizjologiczne kwasu pangamowego

Autorzy radzieccy (19, 20, 28) prowadzili liczne badania nad wpływem witaminy B<sub>15</sub> na funkcjonowanie organizmu podczas wysiłku fizycznego i bezpośrednio po nim. Wynika z nich, że kwas pangamowy niezależnie od metody wprowadzenia go do organizmu zwiększa metaboliczną aktywność lipidów w czasie wysiłku fizycznego, co wyraża się zwiększeniem liczby jodowej w mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym, wątrobie i tkance tłuszczowej (19, 20), oraz zwiększeniem zawartości fosfolipidów w wątrobie i mięśniach szkieletowych i sercowym. Obserwowano również bardziej stałą zawartość cukru w krwi, mniejsze nagromadzenie kwasu mlekowego w mięśniach, bardziej ekonomiczne wykorzystywanie glikogenu mięśniowego, a po skończonym wysiłku wysoki poziom fosfokreatyny (22, 23).

Autorzy radzieccy (19, 22, 28) porównali wpływ witaminy B<sub>15</sub>, metioniny i mieszaniny glukonianu wapnia z glicyną na przemianę węglowodanowo-tłuszczową. Okazało się, że metionina, w przeciwieństwie do mieszaniny glukonianu wapnia z glicyną, wykazywała podobne do kwasu pangamowego działanie na zawartość lipidów, fosfolipidów, liczbę jodową i stabilność wysokoenergetycznych wiązań fosforowych. Metionina nie wywierała jednak wpływu na poziom glikogenu ani nie zapobiegała nagromadzaniu się większych ilości kwasu mlekowego (22). Znaczne podo-



bieństwo działania kwasu pangamowego i metioniny związane jest prawdopodobnie z obecnością aktywnych grup metylowych w cząsteczce. Z cytowanych w literaturze danych wynika, że działanie witaminy B<sub>15</sub> w przemianie lipidów i węglowodanów nie jest równoważne działaniu metioniny czy mieszaniny glukonianu wapnia z glicyną, jest ono bowiem uwarunkowane jednoczesną obecnością labilnych grup metylowych, reszty glukonowej i wiązania estrowego w cząsteczce kwasu pangamowego (19).

Ważną właściwością kwasu pangamowego jest jego zdolność do detoksykacji organizmu w przypadkach zatrucia alkoholem, jadami, truciznami i narkotykami (11, 25, 26, 40, 46). Tę właściwość witaminy B<sub>15</sub> wykazano również w warunkach zatrucia preparatami kwasu barbiturowego, salicylanu sodu, acetylocholiny i kortyzonu (6, 26), związkami organicznymi zawierającymi chlor (6), a także niektórymi antybiotykami (8). Według Krebsa i wsp. (25, 26) działanie odtruwające kwasu pangamowego, np. w przypadku zatrucia alkoholowego, a także przy nagromadzeniu w krwi kwasu pirogronowego, mlekowego czy moczowego, uwarunkowane jest jego zdolnością metylującą i udziałem w procesach utleniania.

Kwas pangamowy i jego pochodne stymulują funkcje układu przysadkowo nadnerczowego (3, 7, 11, 15, 34) i centralnego systemu nerwowego (15, 34, 45), a także podwyższają zawartość 17-kortykosterydów w moczu pacjentów (18). Badania Bertelli i wsp. (6) i Leone i wsp. (27) świadczą o zwiększonej produkcji hormonów sterydowych po wprowadzaniu witaminy B<sub>15</sub> do organizmu. Donoszono również (6, 20, 43) o wpływie witaminy B<sub>15</sub> na przemianę cholesterolu. Kolesniczenko (23) zauważył, że wpływ witaminy B<sub>15</sub> zależy od dawki i częstotliwości podawania. Wielokrotne podawanie (10-dniowe) w małej dawce prowadzi do zmniejszenia zawartości cholesterolu w nadnerczu i w krwi oraz zwolnienia jego syntezy w wątrobie. Przy jednokrotnym wprowadzeniu do organizmu witaminy B<sub>15</sub>, niezależnie od wielkości dawki, występuje jedynie tendencja do zmniejszenia powyższych parametrów. Natomiast wielokrotne podawanie tego związku w dużej dawce powoduje odwrotny efekt: następuje bowiem zwiększenie zawartości cholesterolu i przyspieszenie jego syntezy w wątrobie. Można przypuszczać, że wpływ kwasu pangamowego na przemianę cholesterolu związany jest z wykorzystywaniem go przy wzmożonej biosyntezie kortykosterydów.

#### IV. Zastosowanie witaminy B<sub>15</sub> w leczeniu stanów patologicznych

Badania kliniczne wskazują na działanie lecznicze witaminy B<sub>15</sub> (ewentualnie jej pochodnych) w wielu stanach patologicznych. Na podkreślenie zasługują choroby, którym towarzyszą stany niedotlenienia tkanek. Tera-



peutyczne działanie witaminy  $B_{15}$  zauważono w chorobach naczyń wieńcowych np. niewydolności wieńcowej, dusznicy bolesnej, zakrzepicy wieńcowej (18, 21, 25, 27, 43), a także w miażdżycy naczyń wieńcowych (3, 4) oraz w chorobach serca wynikających z niedotlenienia, a mianowicie: hipoksji mięśnia sercowego (3, 11, 25, 34), anoksji i histotoksycznej anoksji, w zapaleniu i marskości mięśnia sercowego (11, 18, 31). Zauważano korzystny wpływ witaminy  $B_{15}$  na oddychanie mięśnia sercowego także w przypadku niedomykalności zastawek (2).

Lecnicze działanie witaminy  $B_{15}$  zaobserwowano również w przypadkach zapalenia i marskości wątroby wywołanych przewlekłym alkoholizmem (17) i w przebiegu kiły (41). Uwidocznił się on nie tylko w polepszeniu subiektywnego stanu chorych, lecz także w pełnej lub częściowej normalizacji niektórych obiektywnych czynników, np. składu białek osocza (26, 27, 46). Opisano lecznicze działanie witaminy  $B_{15}$  w chorobach mózgu, przy udarach, zakrzepicach, miażdżycy naczyń mózgowych i zakłóceniach pamięci (1, 36). Witaminę  $B_{15}$  stosowano również w gościecu stawowym, przy czym osiągnięto pozytywne wyniki (6, 7, 25).

Strelczuk (40), Gudkowa i Sienkiewicz (16) wykazali, że przy stosowaniu witaminy  $B_{15}$  w procesie leczenia nałogowego alkoholizmu znikał u pacjentów pociąg do alkoholu i powracała naruszona równowaga psychiczna. Szczególnie korzystny wpływ zauważono u alkoholików ze zmianami sercowo-naczyniowymi. Terapia witaminą  $B_{15}$  jest zalecana, ponieważ nie wywołuje ona skutków ubocznych dla organizmu. Zauważono również korzystny wpływ witaminy  $B_{15}$  w przypadku niektórych chorób krwi i chorób skórno-wenerycznych (9, 37).

Możliwości wielokierunkowego zastosowania kwasu pangamowego czynią ten związek nader interesującym przedmiotem badań biochemicznych, klinicznych i żywieniowych.

#### LITERATURA

1. Andrejew C. W., Dokukin A. W., Czeczulin J. S., Bukin J. W., Witamina  $B_{15}$ , Nauka, Moskwa 1956, str. 80.
2. Apsit S. O., Witamina  $B_{15}$ , Nauka, Moskwa 1965, str. 151.
3. Beard H. H., Wofford G., *Exptl. Med. Surg.* **14**, 169 (1956).
4. Benati E., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **63**, 830 (1957).
5. Benati E., *Minerva Med.* **48**, 3436 (1957).
6. Bertelli A., Casentini S., Lanzetta A., *Minerva Med.* **48**, 3425 (1957).
7. Borsook H., Dubnof I. W., *J. Biol. Chem.* **138**, 389 (1941).
8. Braude A. J., Szewniuk A. L., Urjamsjaja W. N., Witamina  $B_{51}$ , Nauka, Moskwa 1965, str. 38.
9. Camp D. I., Panjean J. A., *Excerpta Med.* **13**, 10 (1965).

10. Casu B., Dansi A., Regiani M., Zañizi C. B., *Bull. Chim. Farm.* **97**, 3 (1958).
11. Cugadtla E., Dispensa E., *Minerva Med.* **48**, 3428 (1957).
12. Dansi A., *Bull. Chim. Farm.* **101**, 335 (1962).
13. Davis M., Manglicht T., *J. Bacteriol.* **60**, 17 (1950).
14. Frisell W. R., Mackenzie C. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 94 (1962).
15. Garkina J. M., *Wopr. Med. Chim.* **83**, 236 (1962).
16. Gudkowa N. K., Sienkiewicz Z. L., Witamina B<sub>15</sub>, Nauka, Moskwa 1965, str. 110.
17. Huberman E. D., Malamud S. W., *La Prensa Med.* **45**, 3404 (1958).
18. Idzumia M., *Vitamins (Japan)* **16**, 279 (1959).
19. Jakowlew N. N., *Wopr. Med. Chim.* **13**, 339 (1967).
20. Jakowlew N. N., Leszkiewicz L. G., Kołomiejcewa W. I., Witamina B<sub>15</sub>, Nauka, Moskwa 1965, str. 48.
21. Janicki J., Skupin J., Giec A., *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.* **16**, 273 (1968).
22. Karpuchina I. L., Oreszczenko N. I., Stołojakowa N. A., *Wopr. Pit.* **26**, 3 (1967).
23. Kolesniczenko J. A., *Wopr. Pit.* **26**, 13 (1967).
24. Krebs E. T. Sr., Krebs E. T. Jr., *US Patent* **2**, 710, 876 (1965).
25. Krebs E. T. Sr., Krebs E. T. Jr., Beard H. H., Molin R., Harris A. T., Barlett C. L., *Intern. Rec. Acad.* **164**, 19 (1951).
26. Krebs E. T., Johanson V., *J. Appl. Nutr.* **8**, 360 (1955).
27. Leone M., Longaretti A., Lucchelli A., *Minerva Med.* **48**, 3438 (1957).
28. Leszkiewicz Ł. G., Kołomiejcewa W. J., *Wopr. Pit.* **26**, 7 (1967).
29. Mangiantini M. T., *Ricerca Sci.* **29**, 2197 (1959).
30. Mascitelli-Coriandoli E., Boldrini R., Citterio C., *Naturwissenschaften* **45**, 190 (1958).
31. Millet R. C., *Rev. Clin. Espan.* **64**, 196 (1957).
32. Navarro M. D., *Santo Tomas. J. Med.* **11**, 335 (1956).
33. Navarro M. D., *Santo Tomas. J. Med.* **26**, 97 (1959).
34. Pestel M., *Presse Med.* **66**, 416 (1958).
35. Pettigrew A. L., *Am. Osteopathol. Assoc.* **51**, 320 (1952).
36. Primalic F. R., *Minerva Med.* **48**, 34 (1957).
37. Randazze S. D., *Rassegna Dermatol. Sifilegr.* **N2** (1958).
38. Sokołowa M. M., Witamina B<sub>15</sub>, Nauka, Moskwa 1966, str. 34.
39. Sołowiewa N. W., Garkina I. N., Witamina B<sub>15</sub>, Nauka, Moskwa 1965, str. 28.
40. Strelczuk J. W., Witamina B<sub>15</sub>, Nauka, Moskwa 1965, str. 104.
41. Studencin A. A., Masłow P. E., Witamina B<sub>15</sub>, Nauka, Moskwa 1965, str. 257.
42. Tomiyama T., Yone Y., *Proc. Japan. Acad.* **29**, 178 (1953).
43. Udałow J. F., *Dokł. A. N. ZSRR* **143**, 734 (1962).
44. Udałow J. F., Czerniakow I. N., Witamina B<sub>15</sub>, Nauka, Moskwa 1965, str. 64.
45. Udałow J. F., Sokołowa N. M., *Farmak. Toksykol.* **26**, 355 (1963).
46. Vailati G., Invernizzi G., *Minerva Med.* **48**, 3431 (1957).
47. Vale Serano J. F., *Roque de Silva A. M.* **14**, N6, 3, 281 (1964).







JAN HUTNY \*

## Metabolizm glikogenu i mechanizmy jego regulacji

### The Glycogen Metabolism and its Regulatory Mechanisms

New data about structure and metabolism of glycogen are presented. Regulatory mechanisms of phosphorylase and glycogen syntetase activity, and effect of adrenaline, insuline, glucagon on the glycogen metabolism are discussed.

#### I. Budowa glikogenu

Glikogen jest wielocukrem złożonym z jednostek glukozowych, połączonych łańcuchowo wiązaniami  $\alpha$ -1,4 i  $\alpha$ -1,6-glukozydowymi, przy czym ilość wiązań 1,4- jest kilkanaście razy większa od wiązań 1,6- (68, 75, 115). Miejsce rozgałęzienia łańcucha glikogenu, powstałe dzięki wiązaniu  $\alpha$ -1,6-glukozydowemu przypada na co czwartą jednostkę glukozową (32, 34, 80, 87). Długość wewnętrznych odcinków łańcucha glikogenu odpowiada średnio długości trzech cząsteczek glukozy, połączonych wiązaniami 1,4-, jednakże pewna część odcinków wewnętrznych odbiega od tego rozmiaru (34,43).

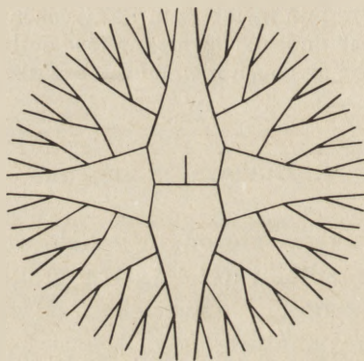
Średnia całkowita długość łańcuchów glikogenu odpowiada 12—15 jednostkom glukozy (12, 64, 77) a średnia długość zewnętrznych, nierozgałęzionych już odcinków łańcucha, odpowiada 7—10 jednostkom glukozy (13, 128). Wartości te odnoszą się także do glikogenu ekstrahowanego z tkanek w okresie życia płodowego, tuż po pojawieniu się pierwszych zapasów tego wielocukru (13).

Cząsteczki glikogenu wątrobowego o stałej sedymentacji rzędu 100S stanowią podjednostki, które łącząc się, tworzą makrocząstki o stałej sedymentacji rzędu od kilkuset do około 10 000S. Masa makrocząsteczek jest więc rzędu od kilkuset milionów do około trzech miliardów (18, 29, 92, 93, 95).

---

\* Dr, Katedra Biochemii, Wydział Weterynaryjny, Wyższa Szkoła Rolnicza, Wrocław

W mięśniach nie stwierdzono agregacji glikogenu w tak wielkie cząsteczki. Masa cząsteczkowa glikogenu mięśniowego odpowiada masie cząsteczkowej podjednostek glikogenu wątrobowego i wynosi około 8 milionów (83, 93, 95). Średnica tych podjednostek, oznaczona na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego wynosi 20—40m $\mu$  (29, 95). Te empiryczne dane pokrywają się dość dokładnie z maksymalnymi wartościami, obliczonymi teoretycznie przez F r e n c h a (34) dla klasycznego modelu cząsteczki glikogenu M e y e r a (80). Przy maksymalnym upakowaniu łańcuchów na obwodzie sferycznej cząsteczki glikogenu (rysunek 1), jej średnica powinna wynosić około 36 m $\mu$  a masa cząsteczkowa w granicach od 4 do 10 milionów, zależnie od stopnia uwodnienia.



Rys. 1. Model cząsteczki glikogenu wg M e y e r a (80)

Charakter wiązań łączących podjednostki glikogenu w większe agregaty nie został wyjaśniony. Jedno takie wiązanie przypada na około 50 tysięcy jednostek glukozowych (83). Wiązania te nie są wiązaniami  $\alpha$ -1,4- ani  $\alpha$ -1,6-glukozydowymi, gdyż są od nich bardziej labilne (83, 93). Wiązania łączące podjednostki glikogenu ulegają rozbiciu w środowisku o  $pH$  poniżej 3,5 i powyżej 13,0 lub pod wpływem temperatury powyżej 65°. Wykluczono występowanie wiązań wodorowych oraz udział białek lub kwasów nukleinowych w łączeniu podjednostek glikogenu (92, 93).

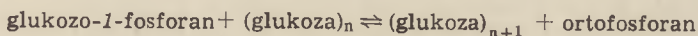
M o r d o h i w s p. (84) otrzymali wysokocząsteczkowe preparaty glikogenu *in vitro*, drogą inkubacji glukozo-1-fosforanu z dokładnie oczyszczoną fosforylazą i enzymem rozgałęziającym. Obraz tych preparatów na zdjęciach w mikroskopie elektronowym, zbliżony był do obrazu natywnego glikogenu wątrobowego. Jednakże, jak wynika z nowszych danych (95), glikogen syntetyczny w porównaniu z natywnym wykazuje pewne różnice wskazujące na brak wiązań labilnych w glikogenie syntetyzowanym

*in vitro*. W związku z tym Parodi i wsp. (95) rozpatrują możliwość powstawania wiązań labilnych wskutek włączania w cząsteczkę glikogenu fruktozy (105) lub glukozoaminy (74).

## I. Funkcja enzymów katalizujących przemianę glikogenu

### 1. Fosforylaza glikogenowa (EC 2.4.1.1)

Enzym ten katalizuje następującą przemianę:



Stosunek stężeń ortofosforanu do glukoza-1-fosforanu w punkcie równowagi tej reakcji wynosi 3,5 (22). Gdy stosunek ten jest wyższy od 3,5 następuje degradacja, gdy zaś jest niższy — synteza glikogenu. W mięśniach przepony szczurów współczynnik ten wynosi około 300 (63), można zatem sądzić, że fosforylaza prowadzi tylko rozkład glikogenu. Nie wiadomo jednak czy ortofosforan jest w komórkach rozmieszczony równomiernie oraz czy mierzone stężenie ortofosforanu nie obejmuje również bardzo labilnych fosforanów organicznych.

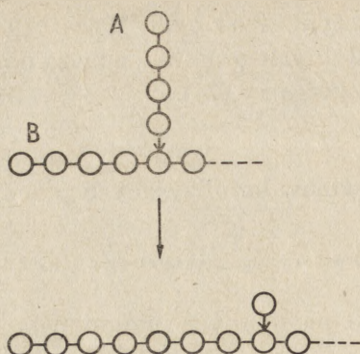
Spencer-Peet i wsp. (70, 114) stwierdzili obecność glikogenu w wątrobach osobników z genetycznym defektem, polegającym na całkowitym braku w tej tkance aktywności syntetazy glikogenu. Autorzy sugerują w tych przypadkach możliwość syntezy glikogenu przy udziale fosforylasy. Wydaje się to tym bardziej możliwe, że fosforylaza może katalizować syntezę glikogenu nawet w braku primera (51).

Wyodrębniona fosforylaza prowadzi rozkład zewnętrznych gałęzi glikogenu tylko do momentu powstania tzw. Ø-dekstryny granicznej typu Walkera-Whelana (128) (rysunek 2), posiadającej na każdym ramieniu rozgałęzionego łańcucha po 4 jednostki glukozowe, licząc od tej cząsteczki, na którą przypada wiązanie 1,6-glukozydowe (2, 46).

### 2. Oligo-1,4→1,4-glukanotransferaza (EC 2.4.1.25)

Enzym ten przenosi resztę maltotriozy z gałęzi A Ø-dekstryny granicznej na gałąź B (rysunek 2), przekształcając tym samym dekstrynę graniczną typu Walkera-Whelana w dekstrynę typu Cori-Larnera (16, 17, 46). Dekstryna typu Cori-Larnera uważana była dawniej za bezpośredni produkt działania fosforylasy (23). Aktywność oligo-1,4→1,4-transferazy obserwuje się zawsze wraz z aktywnością dekstryno-1,6-glukozydazy (16, 17, 46).





**Rys. 2.** Przekształcenie dekstryny granicznej Walkera-Whelana (128) w dekstrynę Cori-Larnera (23) przez oligo-1,4 $\rightarrow$ 1,4-glukanotransferazę (wg 16,17,46)

O—jednostki glukozowe połączone 1 $\rightarrow$ 4 glukozydowo; O $\rightarrow$  jednostki glukozowe połączone 1 $\rightarrow$ 6 glukozydowo

### 3. $\alpha$ -1,4 $\rightarrow$ 1,4-glukozylotransferaza (EC 2.4.1.3)

Enzym ten przenosi resztę glukozy pochodzącą z nieredukującego końca cząsteczki maltozy lub większego  $\alpha$ -glukanu na akceptor, którym może być glukoza, maltoza lub wyższe oligosacharydy typu  $\alpha$ -glukanu (50, 117). Nie ustalono dotąd definitywnie czy aktywność tego typu w tkankach zwierzęcych jest wynikiem działania odrębnego enzymu (53, 96, 97), czy też aktywnością uboczną enzymów typu glukozydaz (45, 117, 122, 131).

Walker i Whelan (128) przypisują  $\alpha$ -1,4 $\rightarrow$ 1,4-glukozylo-transferazie podobną funkcję jak oligo-1,4 $\rightarrow$ 1,4-transferazie, a więc przekształcanie  $\emptyset$ -dekstryny granicznej. Karpiak (53) postuluje możliwość udziału tego enzymu w niefosforylacyjnym tworzeniu wyższych  $\alpha$ -1,4-glukanów, kosztem maltozy i niższych dekstryn.

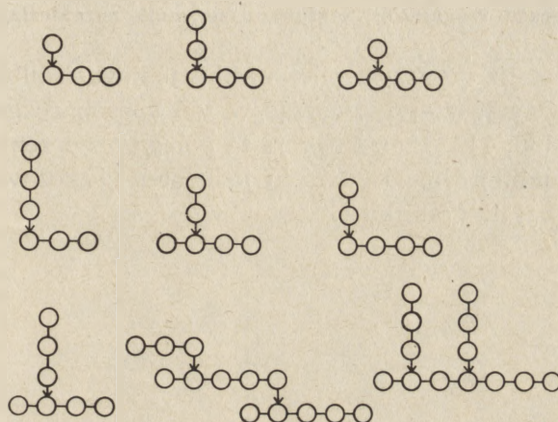
### 4. Dekstryno-1,6-glukozydaza (EC 3.2.1.33)

Ten enzym rozbija wiązanie  $\alpha$ -1,6-glukozydowe w dekstrynie granicznej typu Cori-Larnera, uwalniając cząsteczkę glukozy. Tym sposobem dalsze fragmenty łańcucha glikogenu stają się dostępne dla działania fosforylasy lub glukoamylazy (1, 2, 76, 128).

### 5. $\alpha$ -Amylaza (EC 3.2.1.1)

$\alpha$ -Amylaza rozbija wiązania  $\alpha$ -1,4-glukozydowe glikogenu i doprowadza do uwolnienia maltozy i maltodekstryn oraz do wytworzenia  $\alpha$ -dekstryn granicznych (9, 105, 127) o budowie podanej na rysunku 3.

Kwestionowana przez pewien czas obecność tego enzymu w tkankach zwierzęcych, została ostatecznie udowodniona (8, 38, 53, 59). Według Olavarii i Torresa (91) działanie  $\alpha$ -amylazy na glikogen jest dwustopniowe. W pierwszym etapie amylaza atakuje zewnętrzne gałązki łańcucha glikogenowego. W następnym etapie dochodzi dopiero do rozbicia wewnętrznych odcinków łańcucha glikogenu i do utworzenia specyficznych  $\alpha$ -dekstryn granicznych.



Rys. 3. Budowa  $\alpha$ -dekstryn granicznych (wg 9, 14, 105)

Objaśnienia znaków patrz rysunek 2

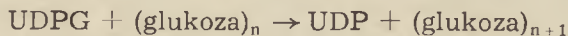
#### 6. Glukoamylaza (EC 3.2.1.3)

Rozbija wiązania  $\alpha$ -1,4-glukozydowe glikogenu, odcinając jednostki glukozowe od nieredukującego końca łańcuchów (45, 65, 108, 122), aż do natrafienia na jednostkę połączoną wiązaniem 1,6-. W wyniku tego powstają  $\gamma$ -dekstryny graniczne.

Niedawno stwierdzono w tkankach i płynach ustrojowych obecność aktywatora, wielokrotnie zwiększającego stosunkowo niską aktywność tego enzymu (54).

#### 7. Glukozylotransferaza UDPG-glikogen (syntetaza glikogenu) (EC 2.4.1.11)

Enzym ten jest przypuszczalnie głównym katalizatorem syntezy glikogenu w tkankach (40, 66, 69, 107). Katalizuje on syntezę glikogenu według następującego schematu:

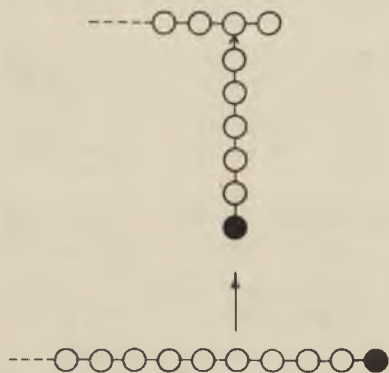


Dla rozpoczęcia reakcji konieczna jest obecność primeru (40, 66). Najlepszym primerem jest glikogen a najmniejszym z możliwych maltoteroaoz

(40), jednak powinowactwo syntetazy glikogenu do maltotetraozy jest bardzo niskie. Donorem reszt glukozowych mogą być oprócz UDPG, także inne nukleotydy tego typu, jednak syntetaza z tkanek zwierzęcych wykazuje wobec nich niższe powinowactwo. Np. w stosunku do ADPG powinowactwo syntetazy glikogenowej z tkanek zwierzęcych jest o 50% niższe niż wobec UDPG (40).

#### 8. Glikozylotransferaza rozgałęzień $\alpha$ -glukanu (czynnik rozgałęziający) (EC 2.4.1.18)

Enzym ten katalizuje przeniesienie kilku jednostek glukozowych z pozycji  $1 \rightarrow 4$  w pozycję  $1 \rightarrow 6$ , tworząc w ten sposób rozgałęzienia łańcuchów glikogenu (60, 112, 125). Reakcja ta polega na przeniesieniu  $\alpha$ -oligo-glukanu o minimalnej długości sześciu jednostek glukozowych (125), według reakcji podanej na rysunku 4.



Rys. 4. Mechanizm reakcji katalizowanej przez enzym rozgałęziający według Verh-ue i Hersa (125)

● — znakowana  $^{14}\text{C}$  glukoza, pozostałe objaśnienia patrz rysunek 2

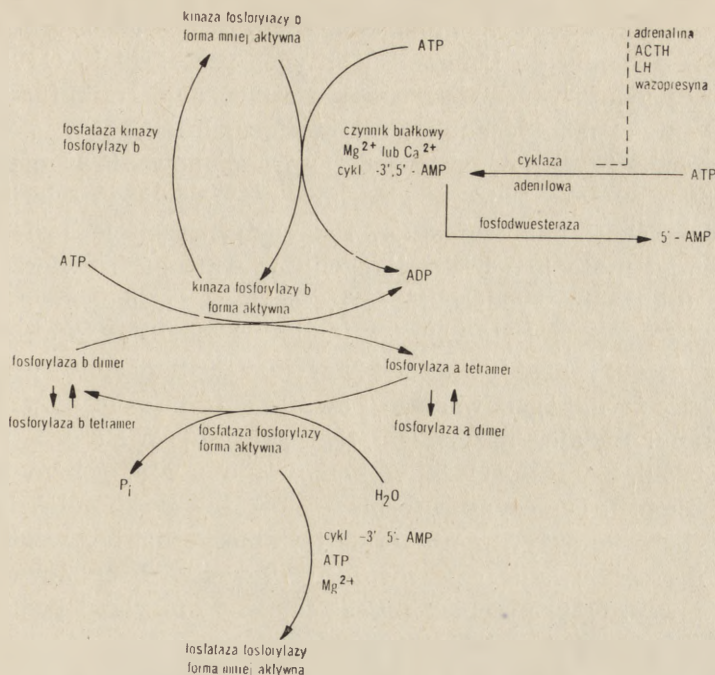
### III. Główne mechanizmy regulacji przemiany glikogenu

#### 1. Układ fosforylazy

Fosforylaza jest białkiem zbudowanym z podjednostek, których masa cząsteczkowa wynosi 90 000 (27, 109). Struktura czwartorzędowa fosforylazy zmienia się bądź to samorzutnie, w zależności od składu i stężenia czynników znajdujących się w roztworze (129, 130), bądź też pod wpływem odpowiednich enzymów prowadzących fosforylację i defosforylację fosforylazy (patrz schemat 1).

Fosforylaza w formie ufosforylowanej jest enzymem o pełnej aktywności, niezależnej od obecności 5'-AMP i nazwana jest fosforylazą „a”. Występuje ona głównie w formie tetrameru o masie cząsteczkowej około





**Schemat 1.** Zasadnicze elementy układu regulującego aktywność fosforylasy

360 000 (27, 109). Nieufosforylowana forma fosforylasy występuje głównie w formie dimeru o masie cząsteczkowej około 180 000 (27, 109) i zwana jest fosforylazą „b”. Fosforylaza „b” jest aktywna tylko w postaci związanej z 5'-AMP (44, 73, 90). 5'-AMP działa w tym przypadku jako czynnik wzmagający powinowactwo fosforylasy „b” do wszystkich substratów. Efekt ten jest kompetycyjnie hamowany przez ATP i G-6-P (85).

Każda z podjednostek fosforylasy zawiera cząsteczkę fosforanu pirydoksalu, którego obecność warunkuje aktywność enzymu (5, 55). Brak tego czynnika nie wpływa jednak ani na przejście fosforylasy „a” w formę „b” ani na sposób wiązania 5'-AMP (43, 111).

Przejście fosforylasy „b” w formę „a” wymaga czterech cząsteczek ATP i katalizowane jest przez specyficzną kinazę fosforylasy „b” w obecności jonów magnezu i cyklicznego 3,5'-AMP (25, 33, 56, 100) (patrz niżej). Reakcja odwrotna, przejście formy „a” w formę „b”, prowadzone jest przez fosfatazę fosforylasy „a” (21, 47) (patrz niżej). Wzajemna konwersja form fosforylasy jest jednym z głównych elementów mechanizmu regulującego szybkość glikogenolizy, dlatego też omawiany proces zależny jest od całego szeregu czynników wpływających na aktywność enzymów katalizujących tę konwersję (schemat nr 1).

Nieenzymatyczne zmiany struktury czwartorzędowej fosforylasy na-

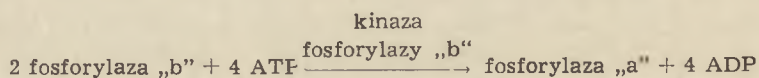
stępują m.in. pod wpływem glikogenu, który wiąże się z tym enzymem w kompleks podobny do kompleksu antygen-przeciwciało (110). Poprzez glikogen, fosforylaza wiąże się z endoplazmatycznym retikulum i podczas frakcjonowania elementów subkomórkowych znaleziono ją w osadzie frakcji mikrosomalnej (71). Jednakże podczas frakcjonowania elementów subkomórkowych wątroby zwierząt głodzonych, fosforylaze znaleziono w supernatancie frakcji mikrosomalnej. Przyczyną przejścia fosforylasy do frakcji lżejszej może być brak glikogenu w wątrobach zwierząt głodzonych (71). Inkubacja wyodrębnionej fosforylasy z glikogenem powoduje sześciokrotny wzrost jej aktywności. Ponieważ zjawisko to obserwuje się tylko przy pomiarach aktywności fosforylasy testem syntezy glikogenu, można sądzić, że glikogen wzmacnia powinowactwo fosforylasy do glukozy-1-fosforanu. Badając mechanizm tego procesu, Wang i wsp. (129, 130) stwierdzili, że fosforylaza w kompleksie z glikogenem występuje w postaci dimeru. Dimeryczna forma fosforylasy w kompleksie z glikogenem jest bardziej aktywna niż forma tetrameryczna, bez względu na to, czy jest ufosforylowana czy nieufosforylowana. Proponowany przez Wang i wsp. (130) przebieg przekształceń fosforylasy pod wpływem glikogenu, przedstawia się jak następuje:



gdzie T — tetramer; D — dimer; G — glikogen.

Tetramer łączy się z wieloma cząsteczkami glikogenu i dysocjuje do dimeru. Glikogen hamuje reakcję odwrotną. Wang i wsp. (130) wykazali też brak zależności między aktywacją fosforylasy przez glikogen a funkcją glikogenu jako primera w reakcji prowadzonej przez fosforylaze, sugerując więc istnienie odrębnych miejsc wiązania primera i polisacharydu aktywującego.

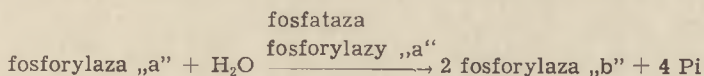
Enzymatycznym ogniwem układu regulującego aktywność fosforylasy jest kinaza fosforylasy „b” (EC 2.7.1.38). Enzym ten aktywuje niżej podaną reakcję (33, 56):



Kinaza fosforylasy „b” występuje podobnie jak i sama fosforylaza, w dwu formach: aktywnej i mniej aktywnej (58, 100). Wiele danych wskazuje, że regulacja aktywności kinazy odbywa się również poprzez fosforylację i defosforylację. Stwierdzono bowiem, że aktywność kinazy fosforylasy „b” wzrasta po inkubacji z jonami magnezu lub wapnia, z cyklicznym-3',5'-AMP oraz z ATP (57, 82, 100), w obecności odpowiedniego enzymu (81). Udział ATP w tym procesie wskazuje, że czynnik białkowy

uczestniczący w aktywacji ma również charakter kinazy. W ekstraktach serca szczurów stwierdzono istnienie inhibitora, blokującego aktywujący wpływ jonów wapnia na kinazę fosforylasy (30, 31). Przejście aktywnej kinazy fosforylasy w formę mniej aktywną biegnie z udziałem enzymu typu fosfatazy (104).

Przekształcenie fosforylasy „a” w fosforylazę „b” katalizowane jest przez fosfatazę fosforylasy (EC 3.1.3.17) (21, 47) według reakcji:



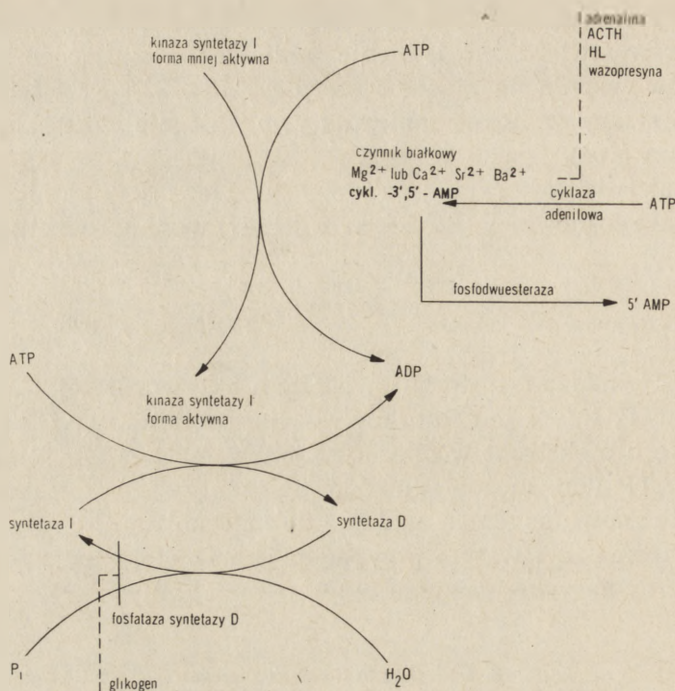
Glukoza i glukozo-6-fosforan zwiększają aktywność tej fosfatazy (47), natomiast AMP, IMP i jon fluorkowy są jej inhibitorami (89, 118). Inkubując tkankę lub ekstrakt w obecności jonów magnezu, cyklicznego-3',5'-AMP oraz ATP (79), można spowodować inaktywację fosfatazy fosforylasy. Dane te znowu sugerują analogię do mechanizmu konwersji fosforylasy „b” w formę „a”. W tym przypadku jednak efektem fosforylacji jest przejście formy aktywnej enzymu w formę mniej aktywną.

## 2. Układ syntetazy glikogenu

Sposób regulacji syntetazy glikogenu wykazuje wiele podobieństwa do mechanizmu regulacji fosforylasy (schemat 2). Syntetaza glikogenu występuje podobnie jak fosforylaza w dwu formach o różnej aktywności. Aktywność formy D (ang. *dependent*) zależy od obecności glukozo-6-fosforanu, natomiast aktywność formy I (ang. *independent*), nie zależy od tego czynnika (3, 61, 69).

Wzajemna konwersja form D i I odbywa się, podobnie jak w przypadku fosforylasy, poprzez ufosforylowanie przy udziale ATP i defosforylację (patrz niżej) (35, 36, 107, 123). Fosforylacja daje formę mniej aktywną natomiast defosforylacja formę o pełnej aktywności. Zatem mechanizm analogiczny do mechanizmu regulującego fosforylazę działa w tym przypadku w odwrotnym kierunku. Procesy fosforylacji fosforylasy i syntetazy dają jednak ostatecznie ten sam wynik, mianowicie obniżenie poziomu glikogenu w tkance. Następuje to dzięki wzmożeniu rozkładu glikogenu przez fosforylazę i równoczesnemu zahamowaniu jego syntezy. Podobnie defosforylacja obydwu enzymów, powodując zahamowanie fosforolizy glikogenu i wzmożenie jego syntezy, prowadzi do jednego efektu — podwyższenia poziomu glikogenu w tkance. Jeśli dodać do tego zaobserwowany przez Madsena (72) fakt, że UDPG hamuje aktywność fosforylasy, widać wyraźnie sprzężenie najważniejszych układów regulujących przemianę glikogenu, przy czym głównym czynnikiem sprzęgającym jest poziom ATP.

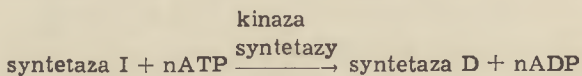




**Schemat 2.** Zasadnicze elementy układu regulującego aktywność syntetazy glikogenowej

Syntetaza glikogenu tworzy podobnie jak i fosforylaza, kompleksy z glikogenem (67, 71, 124). Vardanis (124), preparując syntetazę glikogenu związaną z glikogenem wielkocząsteczkowym stwierdził, że jej aktywność jest uzależniona od dodatku glikogenu niskocząsteczkowego spełniającego rolę primera. Dane te są zbliżone do wyników doświadczeń Wanga i wsp. (129, 130), odnośnie fosforylazy, gdzie postuluje się istnienie w cząsteczce fosforylazy odrębnych miejsc wiązania glikogenu tworzącego kompleks i primera.

Kinaza syntetazy glikogenu katalizuje fosforylację enzymu według reakcji:

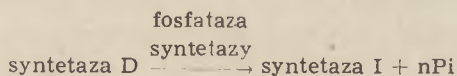


Kinaza syntetazy występuje w dwu formach o różnej aktywności i przechodząc w formę o większej aktywności zachodzi przy udziale ATP, cyklicznego-3',5'-AMP oraz jonów magnezu, lub wapnia, strontu i baru (4, 48) wraz z odpowiednim czynnikiem białkowym (7).

Znaczne podobieństwo pomiędzy kinazą syntetazy glikogenu i kinazą

fosforylasy skłoniło Friedmana i Larnera (37) do zbadania ewentualnej identyczności tych dwu enzymów, jednakże dotychczasowe wyniki raczej przeczą takiemu przypuszczeniu.

Fosfataza syntetazy glikogenu prowadzi do zwiększenia aktywności syntetazy, przeprowadzając ją w formę I według reakcji:



Aktywność tego enzymu jest hamowana przez glikogen (126). Tworzy się w ten sposób mechanizm typu sprzężenia zwrotnego ujemnego, większa ilość glikogenu doprowadza do zmniejszenia szybkości jego syntezy (24).

### 3. Wpływ czynników hormonalnych na przemianę glikogenu

*Wpływ adrenaliny.* Adrenalina powoduje spadek poziomu glikogenu w tkankach. Następuje wtedy zarówno przyspieszenie rozkładu glikogenu jak i hamowanie jego syntezy. Wywołane adrenaliną zmiany w układach regulacji fosforylasy i syntetazy glikogenu przedstawiają się następująco:

- 1) Kinaza fosforylasy „b” przechodzi z formy mniej aktywnej w formę bardziej aktywną (57, 100).
- 2) Kinaza syntetazy glikogenu przechodzi z formy mniej aktywnej w formę bardziej aktywną (48).
- 3) Aktywność fosfatazy fosforylasy ulega zmniejszeniu (79).
- 4) Fosforylaza z formy „b” przechodzi w formę „a” (102, 103, 119).
- 5) Syntetaza glikogenu z formy I przechodzi w formę D (6, 106).

Rall i Sutherland (101) stwierdzili, że podczas inkubacji nierozpuszczalnej frakcji homogenatu wątroby z dodatkiem ATP i adrenaliny, nagromadza się ciepłotały, dializujący czynnik, który dodany do rozpuszczalnej frakcji homogenatu, aktywuje przejście fosforylasy „b” w fosforylazę „a”. Po identyfikacji (103, 119) okazało się, że tym czynnikiem jest cykliczny-3',5'-AMP. Związek ten pośredniczy zatem w wywoływaniu zmian aktywności fosforylasy i syntetazy glikogenu przez adrenalinę (schemat 1 i 2).

Cykliczny-3',5'-AMP powstaje w tkankach z ATP. Proces ten katalizuje enzym lub układ enzymatyczny zwany cyklazą adenilową. Mechanizm działania adrenaliny polega na aktywacji cyklazy (26, 86, 98). Układ cyklazy adenilowej jest zlokalizowany głównie w błonach plazmatycznych (26, 86, 98). Ostatnio stwierdzono obecność tego enzymu także we frakcji jąder komórkowych mięśnia sercowego (15).

Prócz adrenaliny, poziom cyklicznego-3',5'-AMP podwyższają takie hormony jak glukagon (11, 98), ACTH (42, 120), LH (78) i wazopresyna

(41). Cykliczny-3',5'-AMP odgrywa zatem kluczową rolę w procesie hormonalnej regulacji przemiany glikogenu.

Rozkład cyklicznego-3', 5'-AMP prowadzi specyficzna fosfodwuesteraza, która przekształca ten związek w 5'-AMP (88). Fosfodwuesteraza cyklicznego-3',5'-AMP znajduje się w rozpuszczalnej frakcji homogenatów tkankowych, może jednak również asocjować z błonami plazmatycznymi (19). Teofilina i kofeina są inhibitorami tego enzymu, dzięki czemu wywołują wzrost poziomu cyklicznego-3',5'-AMP w tkankach (19).

Jakkolwiek wpływ adrenaliny na aktywność fosforylasy jest w tkankach bardzo silny i efekt działania tego hormonu jest wyraźnie widoczny już po jednej minucie od momentu wzrostu stężenia adrenaliny w krwi (99), to jednak wydaje się iż wzrost aktywności fosforylasy, jaki obserwuje się podczas skurczu mięśniowego, przebiega z udziałem innego mechanizmu niż wyżej opisany. Przejście fosforylasy w formę „a” podczas skurczu mięśniowego przebiega ok. 500 razy szybciej niż analogiczny proces, wywołany wzrostem stężenia cyklicznego-3',5'-AMP pod wpływem adrenaliny (25, 100).

*Wpływ insuliny na przemianę glikogenu.* Insulina powoduje przyspieszenie syntezy glikogenu przez wzrost aktywności syntetazy glikogenowej (61, 62, 116). Mechanizm tego efektu nie jest do końca wyjaśniony. L a r n e r i wsp. (62) stwierdzili, że insulina przyspiesza przejście syntetazy z formy D o niepełnej aktywności, w formę I o pełnej aktywności. W tym przypadku można mówić o opozycyjnym działaniu insuliny wobec adrenaliny. Jednakże S t e i n e r i K i n g (116) postulują inny mechanizm działania insuliny na syntetazę glikogenu. Autorzy ci nie stwierdzili aktywującego wpływu insuliny na syntetazę glikogenu po podaniu typowych inhibitorów syntezy białka lub inhibitorów syntezy RNA. Natomiast bez podawania tych związków, aktywacja syntetazy glikogenu przez insulinę była wyraźna. Wyniki tego doświadczenia wskazywały by, że insulina wzmacnia aktywność syntetazy glikogenowej poprzez przyspieszenie wytwarzania tego enzymu.

Sprawa wpływu insuliny na aktywność fosforylasy jest również dyskusyjna. W 1964 roku L a r n e r i wsp. (62) nie znaleźli zmian aktywności fosforylasy w przeponach szczurów, traktowanych insuliną. Zmiany aktywności fosforylasy pod wpływem insuliny stwierdzono jednak w tkance tłuszczowej. Stwierdzono mianowicie spadek aktywności fosforylasy „a” (52), przy czym mechanizm tego efektu polega na blokowaniu przez insulinę wzrostu stężenia cyklicznego-3',5'-AMP wywołanego adrenaliną (20, 113).

W ostatnich latach stwierdzono również wpływ insuliny na fosforylaze wątrobową (10) i mięśniową (39, 49, 121). Jednakże odnośnie mechanizmu działania insuliny na układ fosforylasy w tkance mięśniowej, istnieje



ją w piśmiennictwie pewne rozbieżności. W krótkim komunikacie *Torresa i wsp.* (121) doniesiono o hamującym wpływie insuliny na wywołany adrenaliną, wzrost aktywności fosforylasy „a” w przeponach szczurów. W pracy tej stwierdzono również hamowanie przyrostu aktywności kinazy fosforylasy. Autorzy sugerują, że efekt ten jest podobny do analogicznego procesu stwierdzonego w tkance tłuszczowej (20) i polega na hamowaniu przez insulinę produkcji cyklicznego-3',5'-AMP. Przeczą temu jednak wyniki prac prowadzonych *in vivo* (10, 49), kiedy to stwierdzono spadek aktywności zarówno fosforylasy „a” jak i fosforylasy całkowitej (a + b). Wynikom *Torresa i wsp.* (121) przeczą również zaskakujące dane *Goldberga i wsp.* (39), którzy w doświadczeniach prowadzonych *in vivo* wykazali przyrost cyklicznego-3',5'-AMP w przeponach szczurów, którym podawano insulinę.

*Wpływ glukagonu na przemianę glikogenu.* Glukagon wzmacnia rozkład glikogenu poprzez przyspieszenie konwersji fosforylasy „b” w fosforylazę „a”. Efekt ten zaobserwowano w wątrobie (103) i w mięśniu sercowym (85, 94). Glukagon wpływa również na układ syntetazy glikogenu, doprowadzając do obniżenia jej aktywności poprzez przyspieszenie konwersji syntetazy I w formę D (10, 28). *DeWulf i Hers* (28) stwierdzili, że układ syntetazy glikogenu reaguje nawet na niższe dawki glukagonu niż układ fosforylasy glikogenowej.

Mechanizm działania glukagonu jest podobny do działania adrenaliny i polega na stymulacji układu cyklazy adenilowej. Cyklaza adenilowa podnosi poziom cyklicznego-3', 5'-AMP, wywołując tym samym wzrost aktywności czynników aktywujących kinazę fosforylasy „b” i kinazę syntetazy I (11, 15, 86, 98, 120).

*Bitensky i wsp.* (11) dostarczyli dowodów na istnienie dwóch niezależnych systemów cyklazy adenilowej, z których jeden może być aktywowany przez adrenalinę a drugi przez glukagon. Dane te potwierdzili *Pohl i wsp.* (98), którzy izolując błony plazmatyczne komórek parenchymalnych wątroby, uzyskali cyklazę adenilową, aktywowaną przez glukagon a niewrażliwą na adrenalinę. Autorzy ci sugerują możliwość różnic w rozmieszczeniu dwóch omawianych systemów cyklazy adenilowej w komórkach i tkankach.

*Murad i Waugham* (86), badając cyklazę adenilową mięśnia sercowego, również stwierdzili różnice w jej zachowaniu się pod wpływem adrenaliny i glukagonu. Jednak w tym przypadku, odmiennie niż w poprzednio wymienionych pracach, efekt dotyczył pojedynczego systemu cyklazy adenilowej, co autorzy wyraźnie udowodnili. *Murad i Waugham* (86) postulują więc odmienną mechanizm działania adrenaliny i glukagonu na pojedynczy system cyklazy adenilowej mięśnia sercowego.

#### IV. Uwagi końcowe

Opisane wyżej mechanizmy regulacji przemiany glikogenu nie obejmują całości zagadnienia regulacji przemiany tego wielocukru, gdyż dotyczą tylko dwu głównych enzymów omawianego procesu, fosforylazy i syntetazy glikogenu. Brak jest w piśmiennictwie danych o regulacji aktywności pozostałych enzymów przemiany glikogenu, a można sądzić, że procesy takie również mają miejsce. Należy się zatem spodziewać prac uzupełniających obraz omawianej przemiany zwłaszcza o dane, dotyczące regulacji enzymów katalizujących hydrolityczny rozkład glikogenu i procesy nefosforylacyjnej transglikozylacji. Można również spodziewać się, że w najbliższych latach poznana zostanie dynamika procesu agregacji i dysocjacji podjednostek glikogenu wątrobowego oraz znaczenie tego zjawiska dla pozostałych elementów mechanizmu regulacji przemiany glikogenu.

#### LITERATURA

1. Abdullah M., Fleming I. D., Taylor P. M., Whelan W. J., *Biochem. J.* **89**, 35 P (1963).
2. Abdullah M., Whelan W. J., *Nature* **197**, 979 (1963).
3. Algranati I. D., Cabib E., *J. Biol. Chem.* **237**, 1007 (1962).
4. Appleman M. M., Birnbaumer L., Belocopitow E., Torres H. N., *Federation Proc.* **24**, 537 (1965).
5. Baranowski T., Illingworth B., Brown D. H., Cori C. F., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 16 (1957).
6. Belocopitow E., *Arch. Biochem.* **93**, 457 (1961).
7. Belocopitow E., Appleman M. M., Torres H. N., *J. Biol. Chem.* **240**, 3473 (1965).
8. Beloff-Chain A., Cantanzaro R., Chain E. B., Masi J., Pochiari T., Rosi C., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B*, **143** 481 (1955).
9. Bines B. J., Whelan W. J., *Biochem. J.* **76**, 253 (1960).
10. Bishop D. Larner J., *J. Biol. Chem.* **242**, 1354 (1967).
11. Bitensky M. W., Russel V., Robertson W., *Biochem. Biophys. Res. Com.* **31**, 706 (1968).
12. Bourne E. J., Fantès K. H., Peat S., *J. Chem. Soc.* str. 1109 (1949).
13. Bourne E. J., McLean A., Pridham J. B., *Biochem. J.* **98**, 678 (1966).
14. Brown D. H., A Ciba Foundation Symposium, Control of Glycogen Metabolism, J. A. Churchill Ltd. 1964, str. 83.
15. Brown D. H., Chattopadhyay S. K., Matthews W. S., *Naturwissenschaften* **55**, 181 (1968).
16. Brown D. H., Illingworth B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1783 (1962).
17. Brown D. H., Illingworth B., Cori C. F., *Nature* **197**, 980 (1963).
18. Bueding E., Orrel S. A., *J. Biol. Chem.* **239**, 4021 (1964).
19. Butcher R. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1244 (1962).
20. Butcher R. W., Sutherland E. W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **139**, 849 (1967).

21. Cori G. T., Cori C. F., *J. Biol. Chem.* **158**, 321 (1945).
22. Cori C. F., Cori G. T., Green A. A., *J. Biol. Chem.* **151**, 39 (1943).
23. Cori G. T., Larner J., *J. Biol. Chem.* **188**, 17 (1951).
24. Dandforth W. H., *J. Biol. Chem.* **240**, 588 (1965).
25. Dandforth W. H., Helmreich E., *J. Biol. Chem.* **239**, 3133 (1964).
26. Davoren P. R., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **238**, 3016 (1963).
27. De Vincenzi D. L., Hedrick J. L., *Biochemistry* **6**, 3489 (1967).
28. De Wulf H., Hers H. G., *Eur. J. Biochem.* **6**, 558 (1968).
29. Drochman P. J., *Ultrastruct. Res.* **6**, 141 (1962).
30. Drummond G. I., Duncan L., *J. Biol. Chem.* **241**, 3097 (1966).
31. Drummond G. I., Duncan L., Friesen A. J. D., *J. Biol. Chem.* **240**, 2778 (1965).
32. Erlander S., French D., *J. Polymer Sci.* **20**, 7 (1965).
33. Fisher E. H., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **216**, 121 (1955).
34. French D., A Ciba Foundation Symposium, Control of Glycogen Metabolism, J. A. Churchill Ltd., 1964, str. 7.
35. Friedman D. L., Larner J., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 185 (1962).
36. Friedman D. L., Larner J., *Biochemistry* **2**, 669 (1963).
37. Friedman D. L., Larner J., *Biochemistry* **4**, 2261 (1965).
38. Frishman W. H., Sie H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 121 (1958).
39. Goldberg N. D., Villar-Palasi C., Sasko H., Larner J., *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 665 (1967).
40. Goldemberg S. H., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 357 (1962).
41. Handler J. S., Butcher R. W., Sutherland E. W., Orloff J., *J. Biol. Chem.* **240**, 4524 (1965).
42. Haynes R. C., Koritz S. B., Peron F. D., *J. Biol. Chem.* **234**, 1421 (1959).
43. Hedrick J. H., Shaltiel S., Fisher E. H., *Biochemistry* **5**, 2117 (1966).
44. Helmreich E., Cori C. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 131 (1964).
45. Hers H. C., *Biochem. J.* **86**, 11 (1963).
46. Hers H. G., Verhuc W., Mathieu M., A Ciba Foundation Symposium, Control of Glycogen Metabolism, J. A. Churchill Ltd. 1964, str. 151.
47. Holmes P. A., Mansour T. E., *Biochim. Biophys. Acta* **156**, 266 (1968).
48. Huijing F., Larner J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 259 (1966).
49. Hutny J., *Zesz. Naukowe WSR Wrocław Wet.* **78**, 243 (1968).
50. Hutny J., Kossobudzki L., *Arch. Immunol. Ther. Exptl.* **16**, 670 (1968).
51. Illingworth B., Brown D. H., Cori C. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 469 (1961).
52. Jungas R. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 757 (1966).
53. Karpiak S. E., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II* **2**, 383 (1959).
54. Karpiak S. E., Iwanowski H., *Zesz. Nauk. WSR Wrocław Wet.* **85**, 43 (1969).
55. Kent A. B., Krebs E. G., Fisher E. H., *J. Biol. Chem.* **232**, 549 (1958).
56. Krebs E. G., Fisher E. H., *Advan. Enzymol.* **24**, 263 (1962).
57. Krebs E. G., Graves D. J., Fisher E. H., *J. Biol. Chem.* **234**, 2867 (1959).
58. Krebs E. G., Love D. S., Bratvold G. E., Trayser K. A., Meyer W. L., Fisher E. H., *Biochemistry* **3**, 1022 (1964).
59. Krzyżanowski M., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II* **14**, 675 (1966).
60. Larner J., *J. Biol. Chem.* **202**, 491 (1953).



61. Larner J., Rossell-Perez M., Friedman D., Craig J., *Biochem. J.* **89**, 36P (1963).
62. Larner J., Rosell-Perez M., Friedman D., Craig J., A Ciba Foundation Symposium, Control of Glycogen Metabolism, J. A. Churchill Ltd. 1964, str. 273.
63. Larner J., Villar-Palasi C., Richman D. J., *Arch. Biochem.* **89**, 56 (1960).
64. Lee E. Y. C., Whelan W. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 162 (1966).
65. Lejeune N., Thines-Sempoux T., Hers H. G., *Biochem. J.* **86**, 16 (1963).
66. Leloir L. F., Cardini C. E., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6340 (1957).
67. Leloir L. F., Goldemberg S. H., *J. Biol. Chem.* **235**, 919 (1960).
68. Leloir L. F., Goldemberg S. H., *Encycl. Polymer Sci. Technol.* **7**, 462 (1967).
69. Leloir L. F., Olavarria J. H., Goldemberg S. H., Carminatti H., *Arch. Biochem.* **8**, 508 (1959).
70. Lewis G. M., Stewart K. M., Spencer-Peet J., *Biochem. J.* **84**, 115 P (1962).
71. Maddaiach V. T., Madsen N. B., *Can. J. Biochem.* **46**, 521 (1968).
72. Madsen N. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 310 (1961).
73. Madsen N. B., Cori C. F., *J. Biol. Chem.* **224**, 899 (1957).
74. Maley F., McGarrah J. F., DelGiaccio R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 85 (1966).
75. Manners D. J., *Advan. Carbohydr. Chem.* **17**, 371 (1962).
76. Manners D. J., Wright A., *Biochem. J.* **79**, 18P (1961).
77. Manners D. J., Wright A., *J. Chem. Soc.* str. 2681 (1961).
78. Marsh J. M., Savard K., *J. Biol. Chem.* **239**, 1 (1964).
79. Merlevede W., Riley G. A., *J. Biol. Chem.* **241**, 3517 (1966).
80. Meyer K. H., *Advan. Enzymol.* **3**, 109 (1943).
81. Meyer W. L., *Federation. Proc.* **21**, 82 (1962).
82. Meyer W. L., Fisher E. M., Krebs E. G., *Biochemistry* **3**, 1033 (1964).
83. Mordoh J., Krisman C. R., Leloir L. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 265 (1966).
84. Mordoh J., Leloir L. F., Krisman C. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 86 (1965).
85. Morgan H. E., Parmeggiani A., A Ciba Foundation Symposium Control of Glycogen Metabolism, J. A. Churchill Ltd. 1964, str. 254.
86. Murad F., Vaughan M., *Biochem. Pharmacol.* **18**, 1053 (1969).
87. Myrbäck K., Sillen L. G., *Acta Chem. Scand.* **3**, 190 (1949).
88. Nair K. G., *Biochemistry* **5**, 150 (1966).
89. Nolan C., Novoa W. B., Krebs E. G., Fischer E. H., *Biochemistry* **3**, 542 (1964).
90. Okazaki Takeshi, Nakazawa Atsushi, Hayaishi Osamu *J. Biol. Chem.* **243**, 5266 (1968).
91. Olavarria J., Torres H. N., *J. Biol. Chem.* **237**, 1746 (1962).
92. Orrel S. A., Bueding E., *J. Biol. Chem.* **239**, 4018 (1964).
93. Orrel S. A., Bueding E., Reissig M., A Ciba Foundation Symposium Control of Glycogen Metabolism, J. A. Churchill Ltd. 1964, str. 24.
94. Parmeggiani A., Morgan H. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 252 (1962).

95. Parodi A. J., Krisman C. R., Leloir L. F., Mordoh J., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 769 (1967).
96. Pietrowa A. N., Pisarenko N. F., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **130**, 217 (1960).
97. Pisarenko N. F., Pietrowa A. N., *Biochimija* **31**, 458 (1966).
98. Phol S. L., Birnbaumer L., Rodbell M., *Science* **164**, 566 (1969).
99. Posner J. B., Stern R., Krebs E. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 293 (1962).
100. Posner J. B., Stern R., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **240**, 982 (1965).
101. Rall T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **224**, 463 (1957).
102. Rall T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **232**, 1065 (1958).
103. Rall T. W., Sutherland E. W., Wosilait W. D., *J. Biol. Chem.* **218**, 483 (1956).
104. Riley W. D., Krebs E. G., *Federation Proc.* **25**, 220 (1966).
105. Roberts P. J. P., Whelan W. J., *Biochem. J.* **76**, 246 (1960).
106. Rosell-Perez M., Larner J., *Biochemistry* **3**, 81 (1964).
107. Rosell-Perez M., Villar-Palasi C., Larner J., *Biochemistry* **1**, 763 (1962).
108. Rozenfeld E. L., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **128**, 6 (1959).
109. Seery V. L., Fischer E. M., Teller D. C., *Biochemistry* **6**, 3315 (1967).
110. Selinger Z., Schramm M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 208 (1963).
111. Shaltiel C., Hedrick J. H., Fischer E. H., *Biochemistry* **5**, 2108 (1966).
112. Slater T. F., *Nature* **209**, 36 (1966).
113. Sneyd J. G. T., Corbin J. D., Park C. R., *Advan. Exp. Med. Biol.* **2**, 367 (1967).
114. Spencer-Peet J., Lewis G. M., Stewart K. M., A Ciba Foundation Symposium, Control of Glycogen Metabolism, J. A. Churchill Ltd. 1964, str. 377.
115. Stacey M., Barker J. A., Carbohydrates of Living Tissues. Van Nostrand, Londyn 1962, str. 1.
116. Steiner D. E., King J., *J. Biol. Chem.* **239**, 1292 (1965).
117. Stetten M., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1437 (1959).
118. Sutherland E. W., Phosphorus Metabolism, red. McElroy W. D., Glass B. The Johns Hopkins Press, Baltimore 1951, str. 53.
119. Sutherland E. W., Rall T. W., *Pharmacol. Rev.* **12**, 265 (1960).
120. Sutherland E. W., Robison G. A., *Pharmacol. Rev.* **18**, 145 (1966).
121. Torres H. N., Marechal L. R., Bernard E., Belocopitow E., *Biochim. Biophys. Acta* **156**, 206 (1968).
122. Torres H., Olavarria J., *Acta Physiol. Lat. Am.* **2**, 95 (1961).
123. Traut R. R., Lipman F., *J. Biol. Chem.* **238**, 1213 (1963).
124. Vardanis A., *Can J. Biochem.* **46**, 579 (1968).
125. Verhue W., Hers H. G., *Biochem. J.* **99**, 222 (1966).
126. Villar-Palasi C., Larner J., *Federation Proc.* **25**, 583 (1966).
127. Walker G. J., Whelan W. J., *Biochem. J.* **76**, 257 (1960).
128. Walker G. J., Whelan W. J., *Biochem. J.* **76**, 264 (1960).
129. Wang J. H., Graves D. J., *Biochemistry* **3**, 1437 (1964).
130. Wang J. H., Shonka M. L., Graves D. J., *Biochemistry* **4**, 2296 (1965).
131. Yoshida H., Hiromi K., Ono S., *J. Biochem.* **62**, 439 (1967).







MARIA JANINA PIECHOWSKA \*, ZOFIA SIENKIEWICZ \*\*,  
MAŁGORZATA BIELIŃSKA \*\*

## Hormony metamorfozy owadów

### Hormones of Insect Metamorphosis

Some data of biological activity and chemical structure of ecdyson and juvenile hormone have been reviewed.

Metamorfoza owadów, sterowana przez układ endokrynnny, charakteryzuje się szeregiem mniej lub więcej skomplikowanych przeobrażeń natury zewnętrznej i wewnętrznej. Zwykle wyróżnia się dwa główne typy metamorfozy. Zasadnicza różnica polega na tym, że u owadów o przeobrażeniu niezupełnym (*Insecta hemimetabola*) w rozwoju osobniczym występują dwa stadia wzrostu — larwa i imago, natomiast przy przeobrażeniu zupełnym (*Insecta holometabola*) między larwą i postacią dorosłą występuje spoczynkowe stadium poczwarki. Rozwój larwy dzieli się na kilka intensywnych okresów wzrostu, z których każdy kończy się odrzuceniem starej kutikuli, czyli linką. Ilość kolejnych linek jest stała i charakterystyczna dla danego gatunku.

Badania nad poznaniem przyczyn metamorfozy zapoczątkowane przez K o p c i a (75, 76) prowadzone później przez kilka ośrodków naukowych, koncentrowały się początkowo wokół poznania i ustalenia mechanizmu procesów endokrynnnych zachodzących podczas cyklu rozwojowego. W następnej fazie badań podjęto próby izolowania poszczególnych hormonów, a obecnie wysiłki idą przede wszystkim w kierunku poznania struktury i biosyntezy już wyodrębnionych hormonów.

---

\* Doc. dr, Zakład Biochemii Porównawczej, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

\*\* Mgr, Zakład Biochemii Porównawczej, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: c.a. — *corpo'a allata*, JH — hormon juwenilny, PF — czynnik bibulowy, TLC — chromatografia cienkowarstwowa, GLC — chromatografia gazowa w układzie gaz—ciecz, TU — jednostka *Tenebrio*, CU — jednostka *Calliphora*.

Metamorfoza owadów uwarunkowana jest w głównej mierze obecnością w hemolimfie trzech hormonów, wydzielanych przez różne ośrodki endokrynne:

1) hormon mózgu, aktywujący okresowo gruczoły protorakalne, wydzielany jest przez komórki neurosekrecyjne mózgu, zlokalizowane w części międzymózgowej przedniego płata (*pars intercerebralis protocerebri*),

2) hormon linienia — ekdyson, produkowany przez gruczoły protorakalne, wydzielany jest w okresach poprzedzających każde linienie,

3) hormon młodociany — juvenilny wydzielany przez specjalne gruczoły — ciała przyległe (*corpora allata*) odpowiedzialny za stan larwalny młodych osobników.

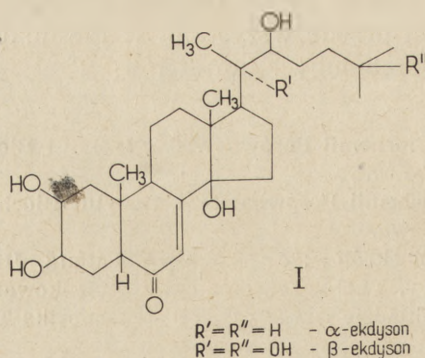
Współdziałanie tych hormonów daje obraz prawidłowej metamorfozy przebiegającej bez zakłóceń.

### A. Ekdyson

Ekdyson produkowany jest przez gruczoły protorakalne pod wpływem hormonu protorakotropowego („hormon mózgu”). Morfologię i fizjologię silnie unerwionych gruczołów znajdujących się w przedtułowiu po stronie brzusznej opisali Scharrer (120) i Wigglesworth (162). Dalsze badania Wiggleswortha (163) i Williamsa (172) wykazały brak specyficzności gatunkowej ekdysonu.

### I. Budowa chemiczna i biosynteza

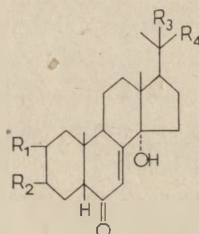
W 1954 r. Butenandt i Karlson wyizolowali po raz pierwszy hormon linienia w postaci krystalicznej w ilości 25 mg z pół tony poczwarek jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) i nazwali go od greckiego ekdysis (linienie) — ekdysonem (18). Określono wtedy ciężar cząsteczkowy równy 310 i wzór sumaryczny  $C_{18}H_{30}O_4$  (I).



Później poprawiono ciężar cząsteczkowy hormonu na 462, a wzór sumaryczny na  $C_{27}H_{44}O_6$ . Jednocześnie ustalono przynależność hormonu do grupy steroli i określono jego wzór strukturalny (wzór I) (49, 59, 65).

Karlson i Bückman wykazali, że ekdyson składa się co najmniej z dwóch czynników o podobnej funkcji fizjologicznej i występuje jako forma  $\alpha$  i  $\beta$  (63).

Wstrzykując larwom *Calliphora erythrocephala* trytowany cholesterol wykazano, że owady nie mogą syntetyzować sterydów z pojedynczych cząsteczek i prekursorem ekdysonu jest prawdopodobnie cholesterol. Badania przeprowadzane na *Blattella germanica* (96) oraz *Dermestes vulpinus* (21) wykazały, że do syntezy hormonu mogą być wykorzystane różne pochodne cholesterolu. Prekursor cholesterolowy musi mieć ogólną strukturę bardzo zbliżoną do hormonu, boczny łańcuch typu cholestanu i grupę  $\beta$ -3-hydroksylową (22). Owady podobnie jak skorupiaki i pajęczaki mogą wykorzystywać octan cholesterylu,  $\beta$ -sitosterol, dwuhydroksycholesterol, cholestanon, nie mogą natomiast wykorzystywać aktywnego octanu (43).



1-8

EKDYSON I JEJEGO ANALOGI	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1 EKDYSON	$\beta$ OH	$\beta$ OH	H	
2 EKDYSTERON	$\beta$ OH	$\beta$ OH	OH	
3 INOKOSTERON	$\beta$ OH	$\beta$ OH	OH	
4 PONASTERON — A	$\beta$ OH	$\beta$ OH	OH	
5 PONASTERON — B	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH	OH	
6 PONASTERON — C	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH	OH	
7 PTEROSTERON	$\beta$ OH	$\beta$ OH	OH	
8 CYASTERON	$\beta$ OH	$\beta$ OH	OH	

Schemat 1. Struktura chemiczna analogów ekdysonu (51).



Larwy *Calliphora stygia* posiadają hydroksylazy, które mogą wprowadzać grupę OH do analogów ekdysonu na C<sub>25</sub> i C<sub>26</sub> (157). Jest więc prawdopodobne, że wyizolowany z *Calliphora* krustekdyson jest dalej metabolizowany do 20,26-dwuhydroksyekdysonu podobnie jak u szkodnika tytoniu *Manduca sexta*. Dalsze badania nad konwersją roślinnych steroli o C<sub>28</sub> i C<sub>29</sub> do cholesterolu u *Manduca sexta* potwierdziły dotychczasowe przypuszczenia, że sterole u owadów stanowią egzogeny czynnik pokarmowy (142).

Horn i wsp. sugerowali, że  $\alpha$ -ekdyson jest prekursorem  $\beta$ -ekdysonu (52). Istotnie okazało się, że u niektórych skorupiaków i owadów  $\alpha$ -ekdyson jest bardzo nietrwałym przejściowym produktem w biosyntezie  $\beta$ -ekdysonu (72).

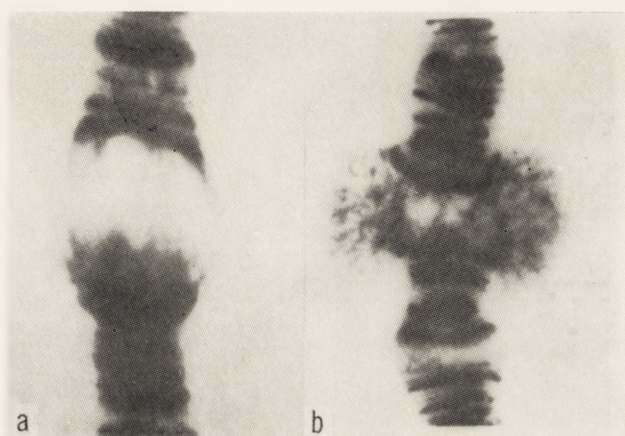
Dane o budowie analogów ekdysonu wyodrębnionych z owadów skorupiaków i roślin zebrano w schemacie 1, przy czym zaobserwowano, że różnorodność występowania analogów jak ich aktywność biologiczna związana jest z budową łańcucha bocznego.

## II. Mechanizm działania ekdysonu

Aktywność hormonu określa się w jednostkach *Calliphora* (C. U.). Przez jednostkę tę rozumie się najmniejszą, wstrzykniętą ilość hormonu, zdolną wywołać u larwy *Calliphora erythrocephala* przepoczwarczenie odwłoka, oddzielonego od reszty ciała przewiązką. Test biologiczny uważa się za pozytywny, gdy następuje przepoczwarczenie u 50—70% badanych owadów (52). Jednostka *Calliphora* dla formy  $\alpha$ -ekdysonu wynosi 0,0075  $\mu$ g, dla  $\beta$ -0,15  $\mu$ g (18), a dla czystego krustekdysonu (20-hydroksyekdyson) lub syntetycznego ekdysonu — 0,025  $\mu$ g (55).

Mechanizm działania ekdysonu mimo kilku lat badań nie jest jeszcze dobrze poznany, ponieważ niewiele wiadomo dotąd o naturze akceptorów w komórkach owadów. Badania nad rozmieszczeniem trytowanego ekdysonu w komórkach larw *Rhynchosciara spec.* i *Chironomus tentans* nie wskazują aby hormon gromadził się w jądrze w większym stopniu niż w cytoplazmie (160). Podobne wyniki uzyskano u muchy *Drosophila hydei* (34).

Przypuszcza się, że hormon podobnie jak w modelu Jacoba-Monda (53) działa jako efektor i poprzez geny regulatorowe, kierujące tworzeniem specyficznych represorów wpływa na aktywność genów strukturalnych. Zanim omówimy dane o roli ekdysonu w aktywacji genów, należy jednak podkreślić, że nie wyjaśniono dotąd czy jest to działanie bezpośrednie, czy pośrednie (64). Kroeger (80, 81) przyjmuje, że pierwotnym efektem działania ekdysonu jest obniżenie w komórce stężenia jonów



**Rys. 1.** Funkcjonalne struktury chromosomów olbrzymich ze ślinianek *Acricotopus lucidus* (106).  
a — puf, b — pierścień Balbianiego





sodowych na korzyść potasowych prawdopodobnie na skutek zmiany przepuszczalności błony jądrowej. Przypuszcza się, że niektóre elektrolity mogą selektywnie osłabiać wiązania DNA-histon co może być podstawą funkcjonalnych zmian w strukturze chromosomów (79). Do podobnych wniosków doszli też K r o e g e r (81) i L e z z i (86), którzy stwierdzili, że pewne zmiany w chromosomach (tak zwane puffy pierwotnego działania) mogą powstawać wskutek zwiększania stężenia  $K^+$  w komórce i wewnątrz jądra bez udziału ekdysonu. Natomiast najnowsze badania Congota, Sekerisa i Karlsona na wyizolowanych jądrach komórek ciała tłuszczowego u *Caliphora erythrocephala* wykazały bezpośredni niezależny od obecności jonów wpływ ekdysonu na syntezę RNA *in vitro* (28).

### 1. Aktywacja genów

Chromosomy olbrzymie pochodzące z gruczołów śliniankowych muchówek: *Drosophila* i *Chironomus* są szczególnie dogodnym obiektem nad przekazywaniem informacji genetycznej. Chromosomy te, dobrze widoczne w mikroskopie świetlnym, są odpowiednikami chromosomów typowych komórek somatycznych (5). Od czasu gdy zdołano doprowadzić do identyfikacji specyficznych i charakterystycznych cech zewnętrznych muchówek z poszczególnymi loci lub prążkami na chromosomach olbrzymich, prążki te uważa się za materialny równoważnik koncepcyjnych genów Mendla (17, 104).

Zmianie kształtu poprzecznego prążka chromosomu towarzyszy zmniejszenie stopnia skondensowania i zanik ostrego konturu, tworzą się tak zwane puffy. W szczególnych przypadkach proces ten może utrudniać łączenie się chromatydów w pary w obrębie pufu i wskutek tego tworzą się pętle wychodzące na zewnątrz i układające się wzdłuż osi chromosomu jako nabrzmiałe pierścienie (105, 106), które zostały po raz pierwszy opisane przez Balbianiego w 1881 r. i stąd ich nazwa pierścienie Balbianiego (rysunek 1).

Puffy i pierścienie są ilościowym wynikiem jednego zjawiska i ze względu na swą naturę są odwracalne. Różnią się one od niezmodyfikowanych prążków poprzecznych chromosomu nie tylko strukturą, ale i biochemicznie. Badania cytochemiczne wykazały, że tworzenie się pufów zachodzi wraz ze wzmożoną aktywnością hormonu i charakteryzuje się gromadzeniem białka niehistonowego i RNA. Histony natomiast występują w chromosomie poza pierścieniami Balbianiego. Proces ten można podzielić czasowo na kilka etapów, a mianowicie w 2—2,5 min. po uaktywnieniu w bezpośredniej bliskości prążka poprzecznego gromadzi się kwaśne białko i dopiero w połączeniu z nim rozpoczyna się tworzenie pufów i synteza RNA. (108).

Określone stadia rozwoju postembrionalnego u muchówek (*Diptera*), jak linienie i przeobrażenie związane są z daleko idącymi zmianami w obrzędzie pufów.

Przeobrażenie u muchówek rozpoczyna się transformacją larwy w poczwarkę, a kończy wyłeganiem *imago*. Kolejne linki wywoływane są przez ekdyson, natomiast drugi hormon metamorfozy — juwenilny — określa stan larwalny i jego stężenie w hemolimfie jest wysokie w okresie między linkami, a niskie podczas kolejnych linek i w czasie przeobrażenia (59, 70).

Warunki w jakich puffy powstają i zmieniają się badał Clever (25, 26).

W większości chromosomów gruczołów śliniankowych muchówek po fazie tworzenia się pufów następuje faza ich zaniku. Ze względu na szybkość tworzenia się dzieli się puffy na 3 grupy:

- 1) nie mające związku z linką,
- 2) pojawiające się regularnie po rozpoczęciu linki, jedne na początku, inne później; prawdopodobnie te loci chromosomów biorą udział w procesach metabolicznych zachodzących w komórce podczas linki,
- 3) występujące u larw w każdym okresie rozwoju, a powiększające się jedynie w czasie metamorfozy (9, 27).

Ekdyson nie tylko inicjuje linkę, ale jego obecność w hemolimfie jest konieczna również w czasie trwania linki. U *Calliphora* niewielkie miano ekdysonu występuje w ciągu 4—7 dni życia larwalnego, po czym rośnie ono i podczas linek larwalnych wynosi około 2 C.U. a podczas linki poczwarkowej sięga 8—10 C.U. (134). Jeżeli larwy *Chironomus* (9) w okresie linienia pozbawi się dopływu ekdysonu to zanikają wtedy wszystkie puffy charakterystyczne dla linki, co wskazuje, że hormon kontroluje aktywność genów podczas linki.

Podobnie, jeśli larwom *Drosophila* rozpoczynającym metamorfozę założyć przewiązkę oddzielającą gruczoł protorakalny i część gruczołu śliniankowego od reszty ciała, to w badanych po pewnym czasie komórkach gruczołu śliniankowego odciętych od dopływu ekdysonu nie pojawiają się puffy charakterystyczne dla metamorfozy (7, 8).

Szybkość działania ekdysonu na puffy wykazuje znaczne różnice. Po wstrzyknięciu ekdysonu larwom, które nie rozpoczęły jeszcze linki dwa puffy reagują natychmiast. Jeden z nich pojawia się w 15—30 minut na chromosomie 18-C-I, drugi w 30—60 minut na chromosomie 2-B-IV. Jest to najwcześniej obserwowana aktywacja genów po zastosowaniu ekdysonu (puffy pierwotnego działania ekdysonu). Większość pufów nie reaguje przez czas dłuższy, dla niektórych wynosi to kilka godzin, dla innych 1 lub kilka dni (puf wtórnego działania ekdysonu). Dla indukcji chromosomu 18-C-I minimum stężenia ekdysonu wynosi  $10^{-7}$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  wagi ciała, a dla chromosomu 2-B-IV  $10^{-6}$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Puf 2-B-IV zaczyna zanikać pod koniec



okresu larwalnego przed przepoczwarczeniem (*praepupa*) a 18-C-I zostaje niezmieniony do końca. Wstrzyknięcie hemolimfy larw przed przepoczwarczeniem larwom młodym wywołuje u nich powstawanie pufów w 18-C-I i w 2-B-IV. Pierwszy z nich jest zwykle duży co wskazuje, że hemolimfa larw starych zawiera ekdyson w dużym stężeniu. Prawdopodobnie u tych larw poza hemolimfą istnieje czynnik antagonistyczny, który hamuje puf 2-B-IV nawet w obecności hormonu. Wskazuje to, że u owadów aktywacja genów podlega kontroli więcej niż jednego czynnika (61). Podczas linki przebiegającej bez zakłóceń poziom ekdysonu wzrasta stopniowo. Tak więc zmienne stany aktywności tych loci można wytłumaczyć jako odpowiedź na ten sam czynnik, a mianowicie zmiany stężenia hormonu. W przypadku pufów pierwotnego działania ekdysonu stężenie hormonu wpływa na wielkość i czas trwania pufów. Wykazano, że podanie 10—15 jednostek *Calliphora* (C.U.) inicjuje powstawanie pufów, przy czym obserwuje się ich stosunkowo szybki zanik. Podawanie 45 jednostek warunkuje ich trwałość. Obserwowana zależność wielkości i czasu trwania pufów nie dotyczy pufów wtórnego działania ekdysonu (23).

## 2. Biosynteza DNA

Pierwszym doniesieniem dotyczącym syntezy DNA w pufach była praca Rudkina i Corlette, którzy sugerowali, że powstające DNA pufów związane jest z rozwojem osobnika (118). Następnie Crouse (29) wykazała, że u *Sciara coprophila* formowanie pufów DNA jest związane z uwalnianiem ekdysonu i odrzuciła stwierdzenie Goodman'a i wsp. (47), że metamorfoza może zachodzić bez tworzących się pufów DNA. Przez wzrost liczby matryc DNA, puffy DNA tworzą mechanizm rozszerzający aktywację poszczególnych miejsc chromosomów.

Oberlander (99, 100) badając płytki skrzydłowe u *Galleria mellonella in vitro* wykazał inicjowanie metamorfozy pod wpływem ekdysonu i jego analogów ekdysteronu i inokosteronu. Dodanie ekdysonu do układu syntetyzującego zwiększało syntezę DNA i do jej utrzymania *in vitro* potrzebny był stały dopływ hormonu. Są to pierwsze badania, które *in vitro* wykazały zależność syntezy DNA od obecności ekdysonu i potwierdziły wcześniejsze badania *in vivo* Krishnakumara i wsp. (77), którzy wykazali, że komórki epidermy poczwarki jedwabnika *Cecropia* syntetyzują DNA w okresie poprzedzającym linkę.

Natomiast działanie krustekdysonu i inokosteronu różni się zapewne od działania właściwego hormonu, ponieważ nie udało się wykazać zwiększania pod ich wpływem syntezy DNA *in vitro* (98).

Oberlander stwierdził, że u *Galleria mellonella* ekdyson nie jest szybko ani w znacznym stopniu inaktywowany w płytkach. Duża różnorod-



ność w przebiegu syntezy DNA w odpowiedzi na działanie ekdysonu przeskadza w śledzeniu niewielkiej inaktywacji (98).

Ostatnie badania Ohtaki i wsp. z 1968 r. wykazały, że ekdyson jest gwałtownie inaktywowany *in vivo* (103). Zdaniem Karlsona i Boda za inaktywację odpowiedzialne jest ciało tłuszczowe (62), co może być skutkiem nadmiaru hormonu, który wywołuje wydzielanie kutikuli zanim nastąpi różnicowanie innych tkanek. Podobny nietypowy rozwój w obecności wysokiego miana ekdysonu wykazał u pluskwiaka *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) wcześniej Wigglesworth (163).

Madhavan i Schneiderman (91) zaobserwowali też, że wstrzyknięcie mitomycyny poczwarkom *Antheraea polyphemus* przed przeobrażeniem imaginalnym hamuje syntezę DNA i blokuje wydzielanie kutikuli. Podanie tym poczwarkom ekdysonu nie odwracało działania mitomycyny C, co wskazywałoby na bezpośredni wpływ mitomycyny C na komórki epidermy. Zaobserwowali oni, że komórki epidermy poczwarek *Antheraea polyphemus* odpowiadają na ekdyson podany przed syntezą DNA apolizą, a po syntezie DNA wydzielaniem kutikuli. Biorąc te fakty pod uwagę komórki epidermy różnią się od komórek dorosłych osobników, które mogą wydzielać kutikulę bez syntezy DNA. Jednocześnie zaobserwowali oni, że u poczwarek, którym wstrzyknięto ekdyson rozwija się pigmentacja oczu.

### 3. Biosynteza RNA

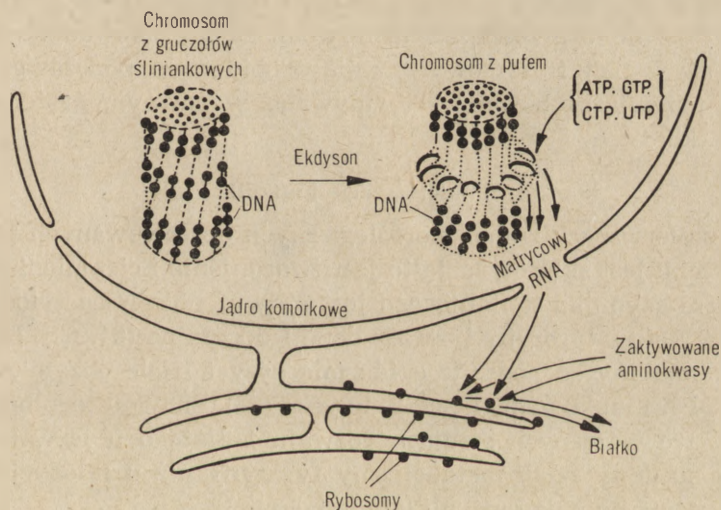
Śledząc aktywację genów indukowaną hormonem wykazano, że ekdyson kontroluje puffy RNA u *Chironomus* (24) i *Drosophila* (12).

Wyatt badał syntezę RNA, DNA i białek w komórkach *epithelium* skrzydeł poczwarki *Cecropia*, indukując zakończenie diapauzy\* przez wzrost temperatury lub wstrzyknięcie ekdysonu. Pierwszym obserwowanym faktem w 8—12 godzin po iniekcji hormonu była synteza wszystkich typów RNA łącznie z RNA rybosomów. Piętno włączonej  $^3\text{H}$ -urydyny wskazujące na syntezę nowego RNA pozostaje wysokie przez 48 godzin, a potem spada do poziomu typowego dla diapauzy. Wzrost syntezy białka i DNA następuje w kilka godzin po wzroście syntezy RNA (182).

Podobne badania Pellinga ze znakowaną  $^3\text{H}$ -urydyną przeprowadzone u larw *Chironomus* przy pomocy mikroautoradiografii wykazały, że piętno już po kilku minutach pojawia się w pufach i pierścieniach Balbianiego, po czym powoli przechodzi do cytoplazmy. Wykazał on, że stopień syntezy RNA jest ściśle związany z wielkością pufu (108).

\* diapauza — okres życia utajonego poczwarki.

Dla zbadania, czy RNA występujący w pufach jest informacyjnym RNA Edström i Beerman (32) opracowali technikę mikroelektroforetyczną, która umożliwia określanie składu zasad w małych ilościach RNA. Wykazali oni, że pierścień Balbianiego posiada zupełnie specyficzne dla siebie RNA, który charakteryzuje się przez określony stosunek komplementarnych miejsc. RNA cytoplazmy i jąderka wyraźnie różnią się od RNA pufów. Są to pierwsze dane świadczące o odrębności RNA powstającego w pufach i przemawiające za jego funkcją informacyjną. Wyniki badań Clevera (24) sugerują, że RNA pufu jest kopią tylko jednej nici DNA. Wreszcie elektronowa mikrografia skrawków pierścieni Balbianiego wykazała przemieszczanie się powstającego tam RNA. Rybonukleoproteidy obserwowano w soku jądrowym, jak i w porach błony jądrowej, a ponadto stwierdzono, że w cytoplazmie ulegają one rozpadowi. Według Beermanna i Clevera cząsteczki te przenoszą mRNA na rybosomy, gdzie służą jako matryca do syntezy białka (9). Schemat działania ekdysonu przedstawia schemat 2.



**Schemat 2.** Schemat działania ekdysonu (59)

#### 4. Biosynteza białka

Arking i Shaaya (49) stwierdzili, że wstrzyknięcie ekdysonu 6 i 8-dniowym larwom *Calliphora erythrocephala* gwałtownie stymuluje syntezę białka w ciele tłuszczowym. 6-dniowe larwy osiągały maksimum stymulacji po 2 godz., a 8-dniowe po 1 godz. od podania hormonu. Włączenie  $^{14}\text{C}$  leucyny przebiegało podobnie w obu grupach i nie zmieniało się przy zastosowaniu wyższych stężeń  $^{14}\text{C}$  leucyny (4). Mimo różnicy



w strukturze komórek ciała tłuszczowego i epidermy wydaje się, że czas stymulacji syntezy białka w ciele tłuszczowym u *Calliphora* pod wpływem ekdysonu jest analogiczny do syntezy w tkankach *Drosophila* (12).

Neufeld, Thomson i Horn (95) badali *in vivo* wpływ ekdysonu i egzogenego krustekdysonu (20-hydroksyekdysonu) na syntezę białka i RNA w epidermie i ciele tłuszczowym w 3-cim stadium rozwoju larwy *Calliphora stygia*.

Czas stymulacji syntezy białka pod wpływem obu związków w ciele tłuszczowym i ścianie ciała tych larw był podobny. Podawanie hormonu powodowało początkowo hamowanie, po którym następował szybki wzrost syntezy białka i RNA w ciele tłuszczowym. Wzrost syntezy po podaniu hormonu obserwowano tylko w przypadku syntezy RNA w ścianie jelita po podaniu krustekdysonu.

Omówione wyniki różnią się znacznie od uzyskanych przez Arkinga i Shaayę. Różnice tłumaczyć może fakt, że Neufeld i wsp. nie stosowali przewiązki, a według Karlsona (71) rozmieszczenie i stężenie  $^3\text{H}$ -ekdysonu u larw z przewiązką różni się od larw nieprzewiązanych. W godzinę po podaniu hormonu przewiązanym larwom, 20% znakowanego ekdysonu lokalizuje się w ciele tłuszczowym, a nie w epidermie, podczas gdy w larwach bez przewiązki hormon odnajdywano w równym stężeniu (10%) w obydwu tkankach.

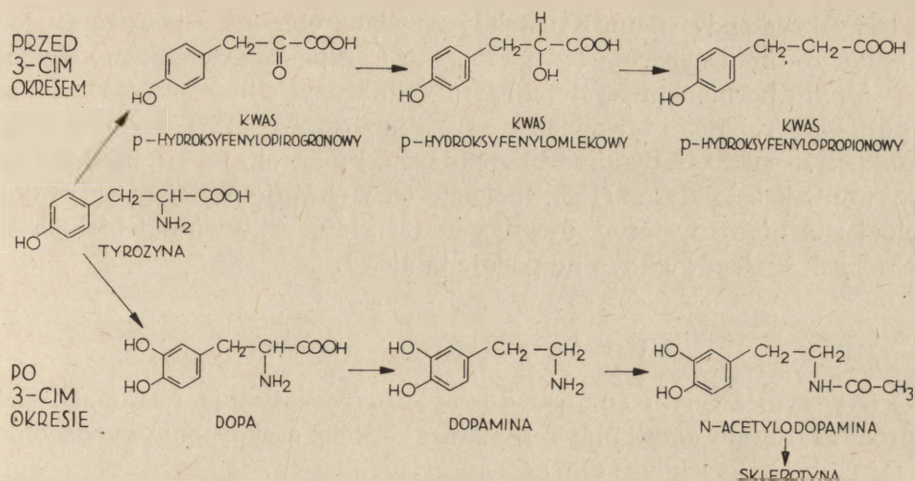
#### 5. Sklerotyzacja kutikuli

Jedną z pierwszych zmian morfologicznych obserwowanych pod wpływem ekdysonu jest sklerotyzacja to jest ztwardnienie i ciemnienie kutikuli. Prekursorem czynnika taninującego jest o-dwufenolo-*N*-acetylodopamina, która tworzy się z tyrozyny poprzez dopę i dopaminę (61, 69). Biosynteza *N*-acetylodopaminy zachodzi w epidermie przy udziale enzymu dekarboksylazy DOPA indukowanego przez ekdyson (68). Enzymu tego brak u larw *Calliphora* we wczesnych stadiach rozwoju i dlatego u larw młodszych obserwuje się inny szlak metaboliczny tyrozyny niż u młodych poczwerek podczas ztwardnienia kutikuli (60) (schemat 3).

RNA powstające w epidermie pod wpływem ekdysonu ma charakter mRNA dla DOPA-dekarboksylazy (132) a wzrost poziomu enzymu obserwuje się w 2 godziny po wstrzyknięciu hormonu (50).

Ostatnie badania na larwach muchy *Phormia regina* (85) wykazały, że w procesie taninowania i sklerotyzacji kutikuli oprócz ekdysonu współdziała też neurohormon występujący w komórkach neurosekrecyjnych mózgu (*pars intercerebralis*) i ciałach kardialnych (*corpora cardiaca*), ale różny od znanego już hormonu mózgowego. Neurohormon ten wstrzyknięty razem z ekdysonem potęguje jego działanie biologiczne. U wielu owadów (*Diptera*, *Lepidoptera* i *Orthoptera*) w przeobrażeniu imaginalnym





Schemat 3. Metabolizm tyrozyny u muchy *Calliphora erythrocephala* (wg 60)

bierze też udział polipeptydowy hormon zwany „hormonem taninującym” (bursikon) opisany przez Fraenkla (37, 38, 39) i Whitehead (161).

### III. Analogi ekdysonu

#### 1. Wyizolowane z owadów i skorupiaków

Karlson stwierdził, że hormon linkowy ze skorupki *Crangon vulgaris* jest aktywny u much *Calliphora* (58) co sugerowało identyczność lub analogię budowy z hormonem owadzi. Jednocześnie stwierdzono, że stężenie hormonu u skorupki w stadium międzylinkowym jest bardzo niskie (97). Pierwszą udaną ekstrakcję przeprowadzili Lowe i Horn z głowotułowia langusty *Jasus lalandei* (90), a wyodrębniony hormon został

Tablica 1

Aktywność biologiczna analogów ekdysonu u muchy *Sarcophaga peregrina* (102)

Substancja	Dawka hormonu $\mu\text{g}$	Względna aktywność*
$\alpha$ -ekdyson	0,035	1,0
$\beta$ -ekdyson	0,018	1,9
Cyasteron	0,016	2,2
Inokosteron	0,064	0,5
Ponasteron A	0,011	3,2
Ponasteron B	0,023	1,5
Ponasteron C	0,025	1,4

\* aktywność 0,035 $\mu\text{g}$   $\alpha$ -ekdysonu przyjęto za 1

nazwany krustekdysonem. Krustekdyson wyodrębniono z poczwarek jedwabnika *Antheraea pernyi* (145, 150), a u *Calliphora* stwierdzono, że jest on jedynym hormonem występującym w znacznych ilościach (41). Z *Calliphora* wyodrębniono też ponasteron A i inokosteron (157), a z poczwarek *Manduca sexta* 20,26-dwuhydroksyekdyson, który okazał się bardziej polarnym niż krustekdyson (155). Inokosteron wykazuje mniejszą aktywność biologiczną niż ekdysteron ( $\beta$ -ekdyson) (21, 149). Aktywności biologiczne niektórych analogów ekdysonu podaje tablica 1.

## 2. Wyizolowane z materiału roślinnego

Pierwszym znanym źródłem  $\alpha$ -ekdysonu pochodzenia roślinnego była paproć (*Pteridium aquilinum* L.), z której oprócz  $\alpha$ -ekdysonu wyodrębniono też 20-hydroksyekdyson (57).

Jizba i wsp. (54) wyizolowali z paproci (*Polypodium vulgare*) dwie substancje krystaliczne polipodinę A i B. Polipodina A okazała się identyczna z ekdysteronem co do własności fizycznych i chemicznych a także aktywności biologicznej. Wprowadzenie 50 $\mu$ g polipodiny A do hemolimfy larw *Pyrrhocoris apterus* krótko po lince wywoływało następną linkę po 2 i pół dniach, podczas gdy normalnie następuje ona po około 7 dniach. Pochodne ekdysonu wyodrębnione z paproci są aktywne u larw szarańczy, tylko po wstrzyknięciu do ciała, natomiast podane jako główny składnik pokarmu nie wpływają na linkę, wzrost i rozwój (19).

Podobne badania nad wpływem ekdysonów i syntetycznych analogów wyizolowanych z roślin podawanych w diecie podjęli Robbins i Kaplanis (112) i wykazali ich hamujący efekt na wzrost i reprodukcję owadów. Z liści morwy wyodrębniono następnie inokosteron i isoinokosteron, z kilku gatunków *Achyranthes* — ekdysteron (74, 143, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152), pterosteron i ponasteron z rodziny *Aspidiaceae* (94, 144).

Obecnie dość powszechnie badane są substancje steroidowe różnych gatunków, nawet odległych systematycznie (73, 117, 141), ale tylko niewielki ich odsetek wykazuje działanie biologiczne. Rola fitoekdysonów nie jest znana. Nie wiadomo czy są one końcowymi produktami metabolizmu steroidu u roślin, czy też pełnią jakąś funkcję fizjologiczną. Możliwe, że podobnie do estrogenów stymulują one kiełkowanie i wzrost (48).

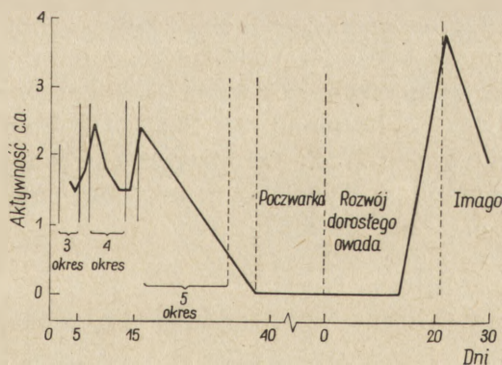
## B. Hormon juwenilny

Hormon juwenilny wydzielany jest jak już wspomniano przez gruczoły zwane *corpora allata* (c.a.) leżące w pobliżu mózgu, morfologia ich została opisana w 1762 r. przez Lyoneta. W początkach XX wieku stwierdzono, że

cykliczny wzrost objętości gruczołów połączony jest z aktywnością wydzielniczą.

Znaczenie i funkcję tych gruczołów określił w latach 1934—36 Wigglesworth u pluskwiaka *Rhodnius prolixus* (167). W wyniku transplantacji c.a. z młodych larw do larw w ostatnim okresie rozwoju uzyskiwał on po lince zamiast imago powtórnie postać larwy. Przypisał to działaniu czynnika humoralnego, który przeciwdziałał przeobrażeniu owada, utrzymując nadal stan larwalny. Czynniki te Wigglesworth nazwał „inhibitory hormone”, a później hormonem juwenilnym (JH). Badania nad wpływem ekstyrpacji lub implantacji c.a. wykazały, że u wielu rzędów owadów, zarówno o przeobrażeniu zupełnym jak i niezupełnym, można uzyskać dodatkowe postacie larwy nie występujące normalnie w przyrodzie. W zależności od stadium rozwoju, w którym następował zabieg pojawiały się czasem formy przejściowe o cechach zewnętrznych przypominających poprzedni okres rozwoju (44, 167, 176). Ponieważ formy te wytwarzały przynajmniej częściowo kutikule charakterystyczne dla poprzedniego stadium rozwoju przyjęto, że głównym docelowym organem działania hormonu jest epiderma i kutikula.

Wigglesworth wykazał u *Rhodnius* (167), co później potwierdzono na innych gatunkach, że obecność c.a. podtrzymuje prawidłową działalność gruczołu protorakalnego, a u diapauzujących poczwerek *H. cecropia* aktywne c.a. pobudzają gruczoł do wydzielania ekdysonu. Tego typu działanie nazwano efektem protorakotropowym. Usunięcie samicom c.a. wywoływało niedorozwój jajników, natomiast implantacja aktywnych c.a. stymulowała rozwój gonad i odkładanie żółtka jajowego (167, 169). Zaczęto więc przypuszczać, że JH lub inna nieznana substancja wydzielana przez c.a. działa jako gonadotropina. Przez łączenie dwóch owadów, z których jeden posiadał aktywne c.a., drugi nieaktywne oraz zakładanie przewiązek od-



**Rys. 2.** Aktywność wydzielnicza *corpora allata* (c.a.) w czasie rozwoju motyla *Hyalophora cecropia* wyrażona w skali zmian w poczwarkach pod wpływem implantacji tych gruczołów z odpowiedniego okresu rozwojowego (175)



cinających *c.a.* od reszty ciała wykazano, że hormon jest przekazywany z hemolimfą. Aktywność wydzielnicza *c.a.*, a więc pośrednio i miano hormonu podczas kolejnych etapów metamorfozy obrazuje rysunek 2.

Miano JH jest najwyższe w młodych stadiach larwalnych, obniża się przy przeobrażeniu w poczwarkę i maleje prawie do zera przy przeobrażeniu poczwarka—*imago*. W każdym okresie rozwoju występuje wyraźny wzrost miana JH tuż po lince, a spadek przed następnym linieniem.

### I. Aktywność wydzielnicza *corpora allata*

Sposób, w jaki *c.a.* zostają pobudzone do wydzielania hormonu, nie został dokładnie ustalony. Na podstawie badań histologicznych wydaje się, że wydzielanie następuje pod wpływem substancji neurosekrecyjnej pochodzącej z komórek mózgowych (42, 167), przekazywanej drogą połączeń nerwowych albo przez hemolimfę. W stanie nieaktywnym w komórkach gruczołów widoczne są duże jądra z ubogą warstwą cytoplazmy, a błony komórkowe są silnie pofałdowane, w czasie aktywacji zaś zwiększa się ilość cytoplazmy, następuje wyprostowanie błon, i uwidocznienie mitochondriów, rybosomów i reticulum endoplazmatycznego. Thomsen i Thomsen (156) zaobserwowali, że w miarę aktywacji retikulum tracą wyraźne kontury a w jego pobliżu i obok mitochondriów pojawiają się liczne wakuole oraz kropelki przypominające tłuszcz. Kropelki te zlewają się następnie z wakuolami. Autorzy ci przypuszczają, że hormon lub prekursor syntetyzowany jest w retikulum, następnie rozpuszcza się w lipidach i poprzez wakuole przedostaje się do hemolimfy.

Aktywacji towarzyszy wspomniany już wzrost wymiarów *c.a.*, pochodzący nie ze wzrostu ilości komórek, a ze zwiększenia ich objętości. Engelmann (35) przypuszczał, że zmiana stosunku objętości cytoplazmy do objętości jąder może być miarą ilości wytworzonego hormonu. U różnych rzędów owadów wykazano, że wzrost wymiarów *c.a.* nie jest równoznaczny z wydzielaniem hormonu (84, 120, 171). Adams (1) sugeruje, że w gruczołach o zwiększonych wymiarach hormon jest produkowany i magazynowany, natomiast wydzielanie jego następuje w czasie zmniejszania wymiarów *c.a.*

### II. Budowa hormonu juvenilnego i jego analogów

Pierwszą frakcję o aktywności JH wyodrębnił w 1956 r. Williams (173). Ekstrahując eterem odwłoki samców motyli *Hyalophora cecropia* uzyskał żółtą oleistą ciecz w ilości około 200mg z jednego odwłoku. Był

to materiał obojętny, nierozpuszczalny w wodzie, dobrze rozpuszczalny w tłuszczach i rozpuszczalnikach tłuszczowych, nie tracący aktywności po ogrzaniu. Dalsze badania Williamsa (174, 176) wykazały, że odwłoki samców *H. cecropia* są wyjątkowo obfitym źródłem hormonu. Z innych części ciała owada i z samic można było uzyskać tylko minimalne ilości aktywnego materiału. Po wstrzyknięciu olejku poczwarkom jedwabników uzyskiwał Williams dodatkową postać poczwarki podobnie jak po implantacji aktywnych c.a. Badania biologiczne potwierdziły własności protorakotropowe (45) i gonadotropowe (20) olejku z *H. cecropia*.

Preparaty o podobnych właściwościach uzyskano następnie z innych jedwabników, pluskwiaków, chrząszczy i karaluchów. Poza owadami okazało się, że wyciągi eterowe z innych zwierząt wykazują działanie juvenilizujące. Oprócz bliskich systematycznie skorupiaków i pajęczaków, aktywne były wyciągi z niektórych bakterii, drożdży (125), pierścienic, a nawet z grasicy, kory nadnercza i łożyska ssaków (44, 180).

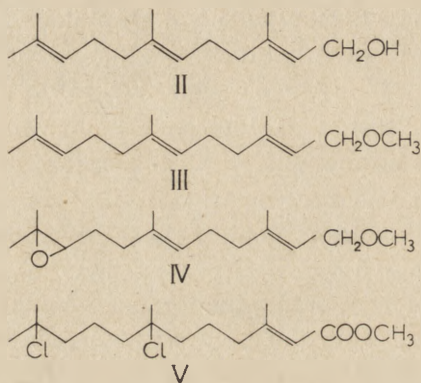
Opracowano kilka testów biologicznych pozwalających na ilościowe określenie aktywności hormonu.

Gilbert i Schneiderman (46) zaproponowali dwa rodzaje testów: Test punktowy, w którym aktywność wyrażano w punktach od 0 (prawidłowy imago) do 5 (prawidłowa poczwarka), a punkty środkowe odpowiadały zmianom w niektórych organach *imago* (oczy, czułki, genitalia, narządy gębowe, skrzydła) po wstrzyknięciu hormonu diapauzującym poczwarkom *Antheraea polyphemus* trzymanym w niskiej temperaturze. Test woskowy — preparat rozpuszczano w mieszaninie parafiny i oliwy z orzeszków ziemnych i nakładano na odwłokowy segment poczwarki, z którego uprzednio usunięto kutikulę i określano, u jakiej ilości osobników po lince imaginalnej kutikula w tym miejscu zachowa charakter poczwarki. Testem woskowym wyraża się aktywność JH najczęściej w jednostkach *Galleria* (G.U.). Za jednostkę przyjęto najmniejszą ilość wagową JH, która daje odpowiedź dodatnią u około 50% owadów badanych (170), lub ilość badanego preparatu, która wywołuje zmiany kutikuli takie jak 1mg olejku z *H. cecropia* (126). Podobne testy dla *Rhodnius* i *Tenebrio* opracował Wigglesworth (164).

Karlson i Nachtigall (66) zaproponowali wyrażenie aktywności w jednostkach *Tenebrio* (TU). Wstrzykiwali znaną ilość preparatu w oliwie do odwłoka poczwarki mączniaka *Tenebrio molitor* i obserwowali w tym miejscu pojawienie się jasnej kutikuli typu poczwarki po lince imaginalnej. Jako 1 TU określili najmniejszą ilość hormonu, która daje reakcję pozytywną u 30—50% osobników. Jednostka *Tenebrio* ma obecnie największe zastosowanie, a za odpowiedź dodatnią uważa się zmiany u 40% *imago*.

### 1. Farnezol i jego pochodne

Karlson i Schmialek (67) stwierdzili, że wysoką aktywność hormonu wykazuje wyciąg eterowy z kału *Tenebrio*. Schmialek (121) oczyścił surowy wyciąg i zidentyfikował aktywny składnik jako mieszaninę alkoholu terpenowego farnezołu (II) i aldehydu — farnezału. Związki te w ilościach miligramowych znalazł on też w wyciągu z jedwabnika *Samia cynthia* (122). Wstrzykując owadom  $^{14}\text{C}$ -mewalonian Schmialek odnajdywał dużą część radioaktywności w farnezołu i farnezału. Jeszcze większą aktywność biologiczną niż farnezol wykazywały eter metylowy farnezyłu (III) i epoksyfarnezyłu (IV) oraz dwuetyloamina farnezyłu (59, 123, 166).



Farnezol i jego pochodne poza tym, że wywoływały zaburzenia w metamorfozie wykazywały też właściwości protorakotropowe (78) i gonadotropowe (165), a spośród izomerów farnezołu najwyższą aktywność miały formy typu *trans,trans* (184). Schmialek utrzymywał, że właśnie farnezol lub jedna z jego pochodnych jest właściwym hormonem juvenilnym.

Pewne fakty przemawiały jednak przeciw tej hipotezie. W poczwarkach *H. cecropia* pozbawionych c.a. farnezol występował w takiej samej ilości jak u normalnych osobników (42). Inne substancje pochodzenia roślinnego między innymi geraniol i nerolidol okazały się również aktywne u niektórych owadów. W porównaniu z olejkiem *H. cecropia* jednak zarówno farnezol i jego pochodne jak i inne badane związki były znacznie mniej aktywne biologicznie (Tablica 2).

Stwierdzono (126), że aktywność zależała głównie od długości łańcucha (geraniol zbudowany z dwu cząsteczek izoprenowych był znacznie mniej aktywny niż wszystkie trójterpeny) natomiast zwiększenie długości łańcucha podstawnika eterowego obniżało aktywność. Związki, które wykazywały działanie morfogenetyczne działały również protorakotropowo i gonadotropowo.



Tablica 2

Aktywność niektórych substancji o działaniu hormonu juwenilnego w porównaniu z olejkiem *H. cecropia* mierzona testem woskowym u poczwerek *G. mellonella* (wg 124)

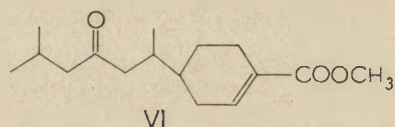
Substancja	Jednostki aktywności na gram substancji
Olejek z <i>H. cecropia</i>	1000
Fitol	32
Izofitol	0
Farnezol (handlowy)	16
Farnezol (izomery trans)	140
Farnezał	32
Farnezyłu octan	5,4
Kwas farnezynowy	7,8
Heksahydrofarnezol	0
Nerolidol	8,9
Linalool	0,08
Geraniol	0
Geranylo linalool	0,14
Solanęzol	0,15

Mieszanina izomerów uzyskana syntetycznie przez przepuszczanie gazowego HCl przez etanolowy roztwór kwasu farnezyłowego (82) okazała się bardzo aktywna u prawie wszystkich rzędów owadów (177). Czynnym jej składnikiem jest „dwuchlorowoderek” metylofarnezonianu (V) (116).

## 2. Czynniki bibułowy

W 1965 r. Slama i Williams (136) donieśli o wyekstrahowaniu z niektórych amerykańskich drzew szpilkowych czynnika bibułowego (PF, ang. *paper factor*). Nazwa pochodzi stąd, że pewne gatunki bibuły umieszczone w naczyniach, w których hodowano pluskwiaka *Pyrrhocoris apterus* powodowały pojawienie się jednej, a czasem dwóch dodatkowych postaci larwalnych, tak zwanych superlarw, pozbawionych możliwości dalszego rozmnażania.

Z czynnika bibułowego Bowers (16) otrzymał czystą substancję nazywaną juwabionem i określił jej budowę chemiczną (VI).



Działanie biologiczne czynnika bibułowego ogranicza się do *Pyrrhocoris* i pokrewnego rodzaju *Dysdercus*. Zastosowany na powierzchnię jaj

*Pyrrhocoris* PF hamuje rozwój w stadium embriona lub we wczesnych stadiach larwalnych (137). Czynniki ten próbowano zastosować do zwalczania szkodników bawełny (119).

Wiele syntetycznych preparatów owadobójczych wykazuje własności podobne do JH, szczególnie te, które zawierają w cząsteczce pierścien i łańcuch boczny typu terpenów, a nawet niektóre związki cykliczne (14, 15, 154). Pochodne kwasu *p*-(1,5-dwumetyloheksylo)-benzoesowego okazały się aktywne u pluskwiaków (140). Związki aktywne, które mają acykliczny terpenoidowy szkielet nie zmieniają własności po wprowadzeniu do łańcucha atomu azotu ani też po zmianie zdolności akceptowania elektronów przez terminalną grupę funkcyjną (138, 159).

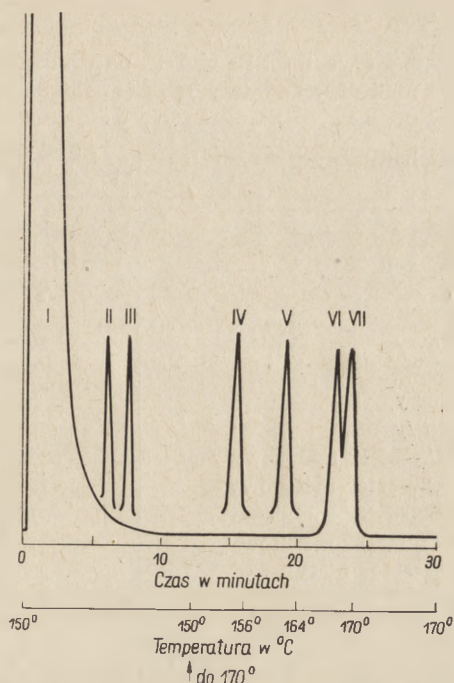
Niektórzy badacze (33, 178) są zdania, że zastosowanie naturalnych preparatów pochodzenia owadziego jako środków owadobójczych miałyby niewątpliwie zalety, ponieważ nie są one toksyczne dla roślin i zwierząt, a wytworzenie przez owady odporności na własne substancje będzie trudniejsze niż w przypadku związków syntetycznych.

### 3. Wyodrębnienie i określenie struktury JH

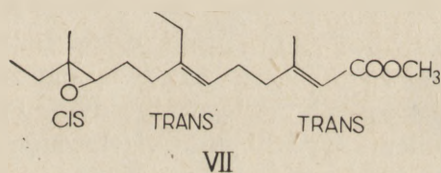
Drogą chromatografii na kwasie krzemowym i chromatografii gazowej w układzie gaz-ciecz (GLC) uzyskano z olejku *H. cecropia* frakcję o 50 000 razy wyższej aktywności (179). Równocześnie metodą GLC otrzymano w innej pracowni (92) frakcje oczyszczone  $10^5$  razy. Homogeny materiał o pełnej teoretycznej aktywności JH uzyskali Roeler i wsp. (114) stosując precypitację wyciągu eterowego w niskich temperaturach, a następnie wieloetapową chromatografię cienkowarstwową (TLC) i GLC. Farnazol i jego pochodne pojawiły się w GLC przed właściwym hormonem (rysunek 3).

Badania biologiczne (113) wykazały, że 1TU wynosi dla czystego JH  $2 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ . Efekt protorakotropowy u poczwerek *H. cecropia* pozbawionych mózgu wywołuje  $0,2 \mu\text{g}$  preparatu, efekt gonadotropowy u samic karaczana, którym usunięto c.a. daje  $0,05 \mu\text{g}$  preparatu. Z jednego odwłoka samca *H. cecropia* otrzymano  $1,6 \mu\text{g}$  hormonu. Współczynnik oczyszczania wynosił  $1,25 \times 10^{-5}$ .

Roeler i wsp. (115) zidentyfikowali następnie czynny związek jako ester metylowy kwasu 7-etylo-3,11-dwumetylo-10-epoksy-2,6-trójdekadienowego. Otrzymane syntetycznie formy D i L tego związku miały takie samo działanie biologiczne (31). Zsyntetyzowano też 16 możliwych izomerów geometrycznych tych form (30). Porównując czas retencji w GLC, widmo cząsteczkowe i magnetyczny rezonans jądrowy poszczególnych syntetycznych izomerów i naturalnego JH ustalono, że ten ostatni jest *trans, trans, cis*-10-epoksy-7-etylo-3,11-dwumetylo-2,6-trójdekadienianem (hormon juwenilny — VII).



**Rys. 3.** Chromatogram (GLC) hormonu juwenilnego (VI), pochodnych farnezolu (I—V) oraz estru metylowego kwasu DL-*trans*epoksyheksadekanowego (VII) (133)



Porównanie biologicznej aktywności analogów syntetycznych, izomerów JH i naturalnego preparatu przedstawia tablica 3.

Z danych tych wynika, że istotne znaczenie ma obecność pierścienia epoksydowego przy C 6, 10, 11, a jego konfiguracja jest sprawą drugorzędą. Zmiana konfiguracji przy C 6, 7 obniża aktywność bardziej niż zmiana w pozycji C 2, 3. Wszystkie izomery *trans* przy grupie epoksydowej były 8000 razy bardziej aktywne niż *trans,trans* farnezol i wszystkie działały protorakotropowo i gonadotropowo. Związki z pierścieniem epoksydowym jak również *trans,trans,trans*-C<sub>17</sub>-ester metylowy wywoływały zmiany morfogenetyczne w ilościach zbliżonych do JH i to nawet u *Pyrrhocris apterus*, który nie był wrażliwy na olejek *H. cecropia*.

Meyer i wsp. (93) po udoskonaleniu procesu oczyszczania olejku z *H. cecropia* otrzymali w GLC dwa homogenne piki B i E odpowiadające



Tablica 3

Aktywność biologiczna i wartości  $R_f$  w TCL naturalnego hormonu juwenilnego i niektórych syntetycznych analogów (wg 30)

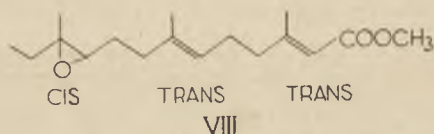
Związek chemiczny****	Specyficzna aktywność TU $\mu\text{g}$	$R_f$ **
<i>t,t</i> - $\text{C}_{12}$ -ester etylowy	nieaktywny w ilości 10 $\mu\text{g}$ na owada	0,67
<i>t,t</i> - $\text{C}_{15}$ -keton	5	0,48
<i>t,t,t</i> - $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	200	0,67
<i>t,c,t</i> - $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	30	0,67
<i>c,t,t</i> - $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	1	0,73
<i>c,c,t</i> - $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	1	0,73
DL- <i>t,t,t</i> -10-epoksy- $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	2000	0,40
DL- <i>t,c,t</i> -10-epoksy- $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	150	0,40
DL- <i>c,t,t</i> -10-epoksy- $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	10	0,41
DL- <i>c,c,t</i> -10-epoksy- $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	10	0,41
DL- <i>t,t,t</i> -6-epoksy- $\text{C}_{17}$ -ester metylowy	200	0,44
Hormon juwenilny	5000	0,40

\* wszystkie związki były homogenne w GLC.

\*\*  $R_f$  w TLC (na żelu krzemionkowym G Mercka w układzie benzen:octan etylu, 15:1).

\*\*\* *t* oznacza *trans*, *c* — *cis*.

łącznie całkowitej wyjściowej aktywności JH. Ponieważ obydwie frakcje były aktywne biologicznie, autorzy uważają, że są to dwa naturalne hormony i żaden z nich nie stanowi produktu degradacji drugiego, chociaż nie wykluczają możliwości, że są one związane ze sobą metabolicznie w aspekcie fizjologicznym lub filogenetycznym. Frakcja B okazała się identyczna z hormonem juwenilnym wyizolowanym przez Roelera, natomiast frakcja E na węglu 7 miała zamiast grupy etylowej grupę metylową. Nazwano ją 12-homo-10*cis* juwenianem (VIII). Termin juwenian zaproponował von Tamen, który zsyntetyzował metylo-10,11-epoksy-2,6-*trans,trans* farnezonian, związek o wysokiej aktywności biologicznej (153). Meyer i wsp. uważają, że wprowadzenie terminu juwenian jest uzasadnione, ponieważ szkielet związków tego typu różni się od seskwiterpenoidów.



Metylo-12-homojuwenian otrzymali następnie Johnson i wsp. (55)

drogą syntezy chemicznej. W teście woskowym wykonanym na *Galleria* metylo-12-homojuwenian nie różnił się aktywnością od preparatu Roelera, natomiast w teście *Tenebrio* był kilkakrotnie aktywniejszy. Tym tłumaczą autorzy fakt, że Roeler nie wykrył jego obecności u *H. cecropia*, stosując przy sprawdzaniu biologicznym frakcji wyższe dawki.

Do chwili obecnej wykonano już kilka stereospecyficznych syntez hormonu juwenilnego (56, 127, 187). Nie można wykluczyć, że metylo-12-homojuwenian okaże się jednym z produktów metabolizmu JH. Na temat biosyntezy JH i jego przemian w organizmie owada nie ma dotychczas żadnych danych.

### III. Działanie biologiczne hormonu juwenilnego

Wigglesworth (168) przebadał na larwach *Rhodnius* efekt morfogenetyczny 42 związków a wśród nich JH naturalny, syntetyczne izomery i juwabion. Niektóre wyniki przedstawia tablica 4.

Tablica 4

Ilości wagowe hormonu juwenilnego i analogów wywołujące maksymalne zmiany u *Rhodnius prolixus* (wg 168)

Substancja*	Ilość $\mu\text{g}$ substancji na 1g wagi ciała, dająca maksimum zmian
Farnezol (70% izomerów <i>trans</i> )	2300,0
„dwuchlorowodorek” farnezonianu etylu	38,4
DL-hormon juwenilny	19,2
(DL- <i>t,t,t</i> -10-epoksy- $\text{C}_{17}$ -ester metylowy)	6,9
Ester metylowy farnezyli (70% izomerów <i>trans</i> )	
DL- <i>t,t,t</i> -hormon juwenilny	2,3

\* t oznacza *trans*

Najbardziej aktywny okazał się naturalny JH. Jak już wspomniano wysoką aktywność wykazują wszystkie związki o konfiguracji *trans,trans* przy C 2,3 i C 6,7 oraz te, które mają grupę epoksydową przy C 10,11. Wigglesworth uważa, że różnice w izomerii optycznej i własności polarne mają większy wpływ na własności biologiczne niż specyficzne grupy chemiczne. Obecność pewnych grup polarnych w cząsteczkach może stabilizować je w hemolimfie i w ten sposób wzmacniać ich działanie. Na przykład „dwuchlorowodorek” metylofarnezonianu (IV) ma większą aktywność niż eter metylowy farnezyli.

Należy pamiętać jednak, że badania Wiggleswortha nie uwzględniają możliwości specyficzności gatunkowej substancji o działaniu hormonalnym. Ponadto wydaje się, że JH jest szybko usuwany z organizmu *Rhodnius* (lub metabolizowany).

Srivastava i Gilbert (138, 139) przebadali kilka substancji syntetycznych oraz naturalny JH u muchy *Sarcophaga bullata* i podobnie jak u *Rhodnius* stwierdzili, że najbardziej aktywny był naturalny JH. Autorzy przypuszczają więc, że własny hormon juwenilny much jest identyczny lub pokrewny JH z *H. cecropia*. Ostatnie badania Roelera (wg 139) wykazały, że JH z *H. cecropia* wykazuje bardzo wysoką aktywność w porównaniu z innymi preparatami u wielu rzędów owadów.

### 1. Zmiany morfologiczne pod wpływem JH w czasie metamorfozy

Zależność zmian morfologicznych od okresu rozwoju, w którym podano hormon badali Sehnal i Meyer (129, 130) u poczwarek *Galleria mellonella*. W przypadku podania JH tuż po ostatniej lince larwalnej lub pod sam koniec stadium larwy, powstaje po lince normalna postać poczwarki, natomiast po zastosowaniu JH w połowie okresu larwalnego powstają postacie przejściowe lub dodatkowe stadium larwy. Autorzy przypuszczają więc, że efekt działania hormonu zależy od stanu komórek epidermy, w których następuje determinacja typu kutikuli następnego stadium. JH podany tuż po lince larwalnej zanika z organizmu zanim rozpocznie się proces determinacji, a tuż przed linką larwa—poczwarka wszystkie komórki są już zróżnicowane. Im więcej zatem komórek przedstawiło się na produkcję kutikuli poczwarki, tym trudniej osiągnąć zmiany po podaniu hormonu. Oczywiście długość okresu determinacji zależy od gatunku owada.

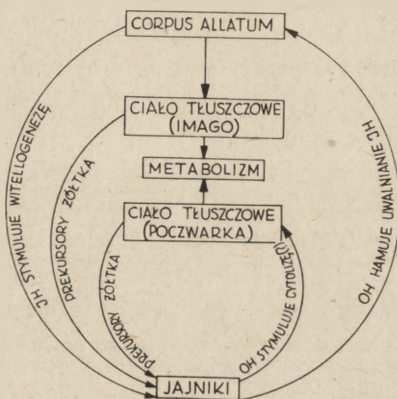
Podobną zależność wykazali Srivastava i Gilbert u *Sarcophaga* (138). U *Sarcophaga argyrostoma* (40) wstrzyknięcie ekdysonu poczwarkom, które wcześniej otrzymały JH dawało postaci dorosłe o zmienionej pigmentacji oczu, u których melanizacja występowała tylko na głowie i tułowiu.

Zlotkin i Levinson (186) stosując metodę Karlsona i Nachtigall (66) stwierdzili u *Tenebrio*, że po lince imaginalnej kutikula w miejscu podania olejku z *H. cecropia* tylko zewnętrznie przypomina poczwarkę. Jest ona jednak znacznie grubsza bez charakterystycznego dla poczwarki zróżnicowania na warstwę endo- i egzokutikuli. Brak też jest kanalików porowych, których funkcja wiąże się z przenoszeniem związków polifenolowych koniecznych do melanizacji i sklerotyzacji. W związku z tym zawartość dwufenoli w tych miejscach kutikuli jest znacznie obniżona.



## 2. Gonadotropowe działanie JH

Związek między przemianami w ciele tłuszczowym, rozwojem jajników a c.a. przebadali u muchy *Musca domestica* Adams i Nelson (3). U dorosłej postaci much istnieje ciało tłuszczowe pochodzące z poczwarki, które zanika w miarę rozwoju jajników i jaj, a na jego miejsce pojawia się ciało tłuszczowe postaci dorosłej. Te dwa ciała tłuszczowe różnią się histologicznie. Prawdopodobnie obydwa produkowane są w komórkach warstwy okrywającej. Usunięcie c.a. powoduje hipertrofię ciała tłuszczowego poczwarki na skutek zahamowania rozwoju jajników. Podobny efekt powoduje podanie JH a także usunięcie jajników. Na tej podstawie Adams i Nelson uważają, że pomiędzy dojrzewaniem jajników, wydzielaniem JH przez c.a. i zmianami w ciele tłuszczowym zachodzi wzajemna kontrola w rodzaju *feed-back* (schemat 4). *Corpora allata* przy



**Schemat 4.** Zależność między aktywnością *corpora allata*, rozwojem jajników a metabolizmem ciała tłuszczowego u much (3)

JH — hormon juwenilny, OH — hormon oostatyczny

pomocy JH bądź innej nieznanej substancji gonadotropowej aktywują jajniki, które z kolei pobierają do rozwoju jaj białka, tłuszcze i węglowodany z ciała tłuszczowego, powodując jego zanikanie. Podczas dojrzewania jaj powstaje w jajnikach czynnik hormonalny natury lipoidalnej, który został wyodrębniony przez Adamsa i wsp. (2) i nazwany hormonem oostatycznym (OH). Hormon ten wstrzyknięty niedojrzałym samicom powoduje wzrost wymiarów c.a., a więc hamuje uwalnianie hormonu juwenilnego (1). Chociaż tego typu mechanizm wykazano dotychczas jedynie u much, wydaje się, że może on występować i u innych rodzajów owadów, ponieważ wcześniejsze badania (169) sugerowały możliwość kontrolowania aktywności wydzielniczej c.a. u dorosłych owadów nie tylko przez neurosekrecyjne komórki mózgu, ale także przez układ rozrodczy.

Dojrzewające samice owadów wytwarzają specyficzne białka, tak zwane witellogeniny, obecne w hemolimfie i żółtku jaj (11). Miejsce syntezy tych białek nie jest ustalone; de Loof i de Wilde (89) wykazali, że większość ich pochodzi z hemolimfy, są jednak dane, że komórki folikularne jajników (87) biorą udział, jeśli nie w syntezie to w przemianie tych białek, prowadzącej do nadania im specyficzności. Po usunięciu c.a. witellogeniny gromadzą się w hemolimfie zamiast w żółtku (36, 88). Implantacja aktywnego c.a. przywraca poprzedni stan. Ostatnio wykazano, że synteza witellogenin jest przynajmniej częściowo kontrolowana przez hormon juwenilny. Wyss-Huber i Luescher (183) stwierdzili, że syntetyczny hormon w ilości 1—2 $\mu$ g wzmacnia syntezę tych białek w wyizolowanych jajnikach, natomiast 10 $\mu$ g JH wywiera efekt hamujący. Obecnie przypuszcza się, że JH wpływa na syntezę witellogenin a także na ich włączanie do żółtka (10, 171).

U samic karaczana *Periplaneta americana* kontroli hormonalnej podlega także wytwarzanie przez gruczoły dodatkowe substancji powodujących twardnienie osłonki jajowej: szczawianu wapnia i glikozydu kwasu protokatechinowego (13, 133, 135). Dodanie syntetycznego izomeru JH samicom pozbawionym c.a., u których nie występuje synteza glikozydu powoduje pojawienie się go w ilościach zależnych od ilości podanego hormonu. Bodenstein i Shaaya (13) zaproponowali nawet, aby przy pomocy oznaczania ilości glikozydu w gruczołach dodatkowych określać endogenne miano JH u samic. JH kontroluje zapewne pewien etap w łańcuchu reakcji prowadzącym od tyrozyny do glikozydu kwasu protokatechinowego, ale nie udało się jeszcze wykazać tego eksperymentalnie (135).

### 3. Kontrola rozwoju embrionalnego i postembrionalnego przez hormon juwenilny

Riddiford (109) i Riddiford i Williams (111) stwierdzili, że skrapianie świeżo złożonych jaj *Hyalophora* i *Antheraea* hormonem obniża żywotność larw, które giną przeważnie po pierwszej lince. Z jaj złożonych przez samice, którym podawano hormon wykluwały się larwy tylko wtedy, jeśli zapłodnienie nastąpiło przed zabiegiem i ich żywotność również była obniżona. Jeśli zaś zapłodnienie następowało po podaniu hormonu zaburzenia w blastokinezie uniemożliwiały dalszy rozwój embrionów.

Podobny wpływ syntetycznego JH na wszy ludzkie stwierdzili Vinson i Williams (158).

Riddiford (110) badała również wpływ syntetycznego JH na rozwój postembrionalny *Pyrrhocoris* i *Oncopeltus*. Skrapianie hormonem jaj w ostatnim stadium rozwoju embrionalnego powodowało u larwy powstawanie dodatkowej szóstej a niekiedy i siódmej postaci larwalnej, która ginęła nie osiągając metamorfozy. Stosowanie hormonu we wczesnym

okresie ostatniego stadium larwy wywoływało powstawanie postaci przejściowych. Ponieważ usunięcie larwom w ostatnim okresie *corpora allata* nie zakłóca metamorfozy, a gruczoły te przeszczepione innym owadom wykazywały słabą lub brak aktywności, autorka sądzi, że wpływ hormonu na zahamowanie metamorfozy polega na uszkodzeniu mechanizmu, prawdopodobnie neurotropowego, który u normalnych osobników inaktywuje *c.a.* w ostatnim okresie rozwoju larwalnego.

Willis i Lawrence (181) traktowali powierzchniowo jaja pluskwiaka *Oncopeltus fasciatus* syntetycznym preparatem hormonalnym (84) i stwierdzili zaburzenia dopiero po końcowej lince kiedy to pojawiała się zamiast *imago* dodatkowa larwa lub postać pośrednia. Autorzy ci przeszczepiali także larwom normalnym kutikulę z larw, którym podano preparat w ostatnim okresie. Po lince imaginalnej otrzymali w miejscu przeszczepu kutikulę larwalną otoczoną pierścieniem zmienionych komórek. Uważają oni, że hormon juwenilny podany powierzchniowo nie przedostaje się do wnętrza, a w komórkach kutikuli może przetrwać i zostać przeniesiony do następnego stadium za pośrednictwem płynu linkowego.

Omówione tu badania wydają się potwierdzać możliwość wykorzystania preparatów hormonalnych do zwalczania przynajmniej niektórych owadów szkodliwych.

#### 4. Wpływ JH na oddychanie

U wielu rzędów owadów wykazano, że usunięcie *c.a.* obniża szybkość pobierania tlenu, a implantacja gruczołów przywraca stan poprzedni (42, 167). Sehnal i Slama (131) wykazali, że każde stadium (larwa, poczwarka i *imago*) u *Pyrrhocoris* i *Galleria* charakteryzuje się odrębnym modelem oddychania. Implantacja *c.a.* z młodych larw do larw *Galleria* w ostatnim okresie rozwoju powoduje powstanie dodatkowych dużych larw, ulegających normalnemu przeobrażeniu do *imago*. Te dodatkowe larwy charakteryzowały się larwalnym typem oddychania, a i następne stadia oddychały tak, jak ich analogiczne postacie w czasie normalnego rozwoju. Sehnal i Slama uważają, że *c.a.* tylko pośrednio wpływa na oddychanie przez determinację odpowiedniego stadium rozwojowego.

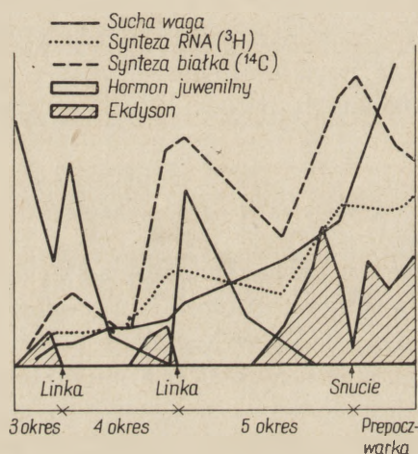
#### 5. Synteza RNA i białka pod wpływem JH

Oberlander i Schneiderman (101) wykazali, że podanie JH u normalnych poczwarek powoduje wzrost szybkości syntezy RNA, a nie wywołuje tego efektu w odwłokach pozbawionych dopływu ekdysonu. Badania te przeprowadzali w różnych tkankach. Sądzą oni na tej podstawie, że działanie JH ma charakter pośredni: sam hormon nie może inicjo-



wać syntezy RNA w tkankach, a stymulujące działanie wywiera tylko wtedy, kiedy synteza została już zapoczątkowana przez bodziec bezpośredni, prawdopodobnie ekdyson. Jedyną tkanką, która odpowiada na JH rozpoczęciem syntezy RNA jest gruczoł protorakalny.

Są jednak dane przemawiające za wpływem bezpośrednim JH na syntezę RNA i białka (28, 107). JH podany do izolowanych jąder ciała tłuszczowego w minimalnych ilościach stymulował wyraźnie syntezę natomiast dodany w mieszaninie z ekdysonem wpływał nieco słabiej (28). Wskazywałoby to, że współzależne działanie obu hormonów odbywa się na poziomie jądrowym. Podobną zależność otrzymano *in vitro* także w płytkach skrzydłowych *Samia cynthia ricini* (107), przy czym wpływ hormonu był największy, kiedy podawano go do płytek wyizolowanych z owada w momencie najniższego endogennego miana JH. Cykliczne zmiany szybkości syntezy w zależności od stadium rozwojowego i poziomu hormonów JH i ekdysonu przedstawia rysunek 4.



Rys. 4. Cykliczne zmiany syntezy RNA i białka w czasie rozwoju jedwabnika *Samia cynthia ricini* (107).

#### 6. Aktywacja fragmentów chromosomów w śliniankach *Chironomus* przez JH

Próby wykazania aktywacji chromosomów przez zastosowanie oleju z *H. cecropia* dały wyniki negatywne (25, 80).

Znane są fakty, że po zabiegach chirurgicznych u owadów uzyskuje się efekt juvenilizujący podobnie jak po zastosowaniu JH. W gruczołach śliniankowych usuniętych z larw występuje niekiedy w chromosomach wzór pufów charakterystyczny dla niskiego miana ekdysonu. Efekt ten nazwano „rollback” lub rejuwenacją. Wykazano (86), że w komórkach tych gruczołów występuje duża ilość jonów  $\text{Na}^+$ . Bauman (6) badał

zmiany potencjału w błonie komórkowej ślinianek *Galleria* w środowisku zawierającym jony  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  po dodaniu olejku z *H. cecropia* i preparatów o wysokiej aktywności JH i stwierdził, że działały one depolaryzująco na błony szczególnie w obecności jonów  $\text{Na}^+$ . Autor sugeruje, że preparaty typu JH wpływają na transport tych jonów przez błonę komórkową.

Na podstawie tych danych przypuszczano, że JH może indukować bezpośrednio puffy wtórnego działania ekdysonu. Wykazali to eksperymentalnie Lezzi i Gilbert u *Chironomus tentans* (85).

Po 2—4 godzin po podaniu JH widoczna była aktywacja pufu we fragmencie chromosomu 19-A-I i redukcja aktywowanego przez ekdyson pufu 18-C-I i pierwszego pierścienia Balbianiego. Fragment 19-A-I nie jest aktywowany w czasie linki larwa—poczwarka, pojawia się dopiero wtórnie w ciągu 10—12 godz. po podaniu ekdysonu. Ponieważ JH wywołuje pojawienie się tego pufu już po 1—2 godz., Lezzi i Gilbert uważają, że jest on miejscem pierwotnego działania hormonu juwenilnego. Sądzą oni też, że pojawianie się pufów odgrywa mniejszą rolę w procesie determinacji metamorfozy niż aktywacja pierścieni Balbianiego. Zmiany we wzorze aktywacji chromosomów pod wpływem JH wykazali też Lauffer i Greenwood (83) w prepoczwarkach *Chironomus*. Z 14 pufów ulegających normalnie zmianie przy transformacji w poczwarkę 7 zanikało po zastosowaniu JH, a pierścień Balbianiego IV B aktywny zwykle u larw wykazywał wzrost wymiarów. Owady te nie podlegały dalszej metamorfozie.

Lezzi i Gilbert (85) tłumaczą działanie JH na chromosomy, podobnie jak w przypadku ekdysonu zmianą równowagi  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  na korzyść  $\text{Na}^+$  w jądrze i w następstwie osłabieniem wiązania DNA-histon we fragmentach chromosomu wrażliwych na  $\text{Na}^+$ . Praca Congote'a i wsp. (28) wskazuje na możliwość działania JH na syntezę RNA bez udziału jonów. W jakim stopniu stymulacja syntezy RNA pod wpływem JH odnosi się do aktywacji chromosomu pozostaje kwestią otwartą.

### C. Uwagi końcowe

Autorzy chcieliby na zakończenie dodać kilka słów wyjaśnienia, ponieważ zdają sobie sprawę, że podany tu przegląd jest niepełny i w niektórych fragmentach brak jasności. W piśmiennictwie światowym istnieje już ponad tysiąc pozycji na temat mechanizmu i funkcji ekdysonu i jego analogów i kilkaset pozycji dotyczących działania *corpora allata* i hormonu juwenilnego. Przy ogromnej ilości istniejących gatunków, różniących się zarówno cyklem rozwojowym jak i środowiskiem bytowania jak również z uwagi na różnorodne i trudne metody badawcze jednoznaczna interpretacja otrzymanych wyników jest bardzo trudna.

Autorzy tego przeglądu starali się dodawać jak najmniej uwag własnych, ponieważ uważają, że żaden aspekt działania hormonu juwenilnego nie został jeszcze należycie wyjaśniony, a badania nad wpływem ekdysonu na biosyntezę białka są jeszcze w fazie wstępnej. Prawdopodobnie wiele obecnie stosowanych pojęć ulegnie weryfikacji. Uważamy jednak, że nawet w obecnym stadium wiedzy o hormonach owadzych należało przedstawić niniejszy artykuł ze względu na to, że opracowanie modelu działania hormonów metamorfozy u owadów, u których każde następne stadium rozwojowe jest ściśle odgraniczone od poprzedniego, pozwoli lepiej zrozumieć działanie systemów endokrynnych zarówno u bezkręgowców jak i u organizmów wyższych.

#### LITERATURA

1. Adams T. S., *J. Insect Physiol.* **16**, 349 (1970).
2. Adams T. S., Hinz A. M., Pomonis J. G., *J. Insect Physiol.* **14**, 983 (1968).
3. Adams T. S., Nelson D. R., *J. Insect Physiol.* **15**, 1729 (1969).
4. Arking R., Shaaya E., *J. Insect Physiol.* **15**, 287 (1969).
5. Bauer H., *Z. Zellforsch.* **23**, 220 (1935).
6. Baumann G., *J. Insect Physiol.* **14**, 1459 (1968).
7. Becker H., *J. Chromosoma* **10**, 654 (1959).
8. Becker H. J., *Chromosoma* **13**, 341 (1962).
9. Beermann W., Clever U., *Sci. Am.* **210**, 50 (1964).
10. Bell W. J., *J. Insect Physiol.* **15**, 1279 (1969).
11. Bell W. J., *J. Insect Physiol.* **16**, 291 (1970).
12. Berendes H. D., *Chromosoma* **22**, 274 (1967).
13. Bodenstein D., Shaaya E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 1223 (1968).
14. Bowers W. S., *Science* **161**, 895 (1968).
15. Bowers W. S., *Science* **164**, 323 (1969).
16. Bowers W. S., Fales H. M., Thompson M. J., Uebel E. C., *Science* **154**, 1020 (1966).
17. Bridges C. B., *J. Heredity* **26**, 60 (1935).
18. Butenandt A., Karlson P., *Z. Naturforsch. Sect. B* **9**, 389 (1954).
19. Carlisle D. B., Ellis P. E., *Science* **159**, 1472 (1968).
20. Chen D. H., Robbins W. E., Monroe R. E., *Experientia* **18**, 577 (1962).
21. Clark A. J., Bloch K. J., *J. Biol. Chem.* **234**, 2583 (1959).
22. Clayton R. B., Bloch K. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 586 (1963).
23. Clever U., *Chromosoma* **12**, 607 (1961).
24. Clever U., *Chromosoma* **13**, 385 (1962).
25. Clever U., *Chromosoma* **14**, 651 (1963).
26. Clever U., *Develop. Biol.* **14**, 421 (1966).
27. Clever U., Karlson P., *Exptl. Cell Res.* **20**, 623 (1960).
28. Congote L. F., Sekeris C. E., Karlson P., 5th Cong. Europ. Comp. Endocrinol. Utrecht 1969, Abstr. Nr 38.
29. Crouse H. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 971 (1968).



30. Dahm K. H., Roeller H., Trost B. M., *Life Sci. part II*, **7**, 129 (1968).
31. Dahm K. H., Trost B. M., Roeller H., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5299 (1967).
32. Edstroem J. E., Beermann W., *J. Cell Biol.* **14**, 371 (1962).
33. Elheny Mc V. K., *Science* **154**, 248 (1966).
34. Emmerich H., *Nature* **221**, 994 (1969).
35. Engelmann F., *J. Insect Physiol.* **1**, 257 (1967).
36. Engelmann F., 5th Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Utrecht, 1969, Abstr. Nr 50.
37. Fogal W., Fraenkel G., *J. Insect Physiol.* **15**, 1235 (1969).
38. Fogal W., Fraenkel G., *J. Insect Physiol.* **15**, 1437 (1969).
39. Fraenkel G., Hsiao C., *J. Insect Physiol.* **13**, 1387 (1967).
40. Fraenkel G., Hsiao C., *J. Insect Physiol.* **14**, 707 (1968).
41. Galbraith M. N., Horn D. H. S., Thomson J. A., Neufeld G. J., Hackney R. J., *J. Insect Physiol.* **15**, 1225 (1969).
42. Gilbert L. I., w *The Physiology of Insecta*, red. M. Rockstein, Academic Press, New York—Londyn 1964, t. 1, str. 163—178.
43. Gilbert L. I., w *The Physiology of Insecta*, red. M. Rockstein, Academic Press, New York—Londyn 1967, t. 4, str. 157—168.
44. Gilbert L. I., Schneiderman H. A., *Science* **128**, 844 (1958).
45. Gilbert L. I., Schneiderman H. A., *Nature* **184**, 171 (1959).
46. Gilbert L. I., Schneiderman H. A., *Trans. Amer. Micr. Soc.* **79**, 38 (1960).
47. Goodman R. M., Goidl J. A., Richart R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 553 (1967).
48. Heftmann E., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **14**, 225 (1963).
49. Hoffmeister H., *Angew. Chem.* **78**, 269 (1966).
50. Hoffmeister H., Grutzmacher H. F., Dunnebeil K., *Z. Naturforsch. Sect. B*, **22**, 66 (1967).
51. Hori M., *Steroids* **14**, 33 (1969).
52. Horn D. H. S., Fabbri S., Hampshire F., Lowe N. E., *Biochem. J.* **109**, 399 (1968).
53. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
54. Jizba J., Herant V., Sorm F., *Tetrahedron Letters* **18**, 1689 (1967).
55. Johnson W. S., Campbell S. F., Krishnakumaran A., Meyer A. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **62**, 1005 (1969).
56. Johnson W. S., Tsung-Tse L., Faulkner D. J., Campbell S. F., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6625 (1968).
57. Kaplanis J. N., Thompson M. J., Robbins W. E., Bryce B. M., *Science* **157**, 1436 (1967).
58. Karlson P., *Ann. Sci. Nat. (Zool)* **18**, 125 (1956).
59. Karlson P., *Angew. Chem.* **75**, 257 (1963).
60. Karlson P., *J. Cell Compt. Physiol.* **66**, suppl. 1 (1965).
61. Karlson P., *Naturwissenschaften* **53**, 445 (1966).
62. Karlson P., Bode C., *J. Insect Physiol.* **15**, 111 (1969).
63. Karlson P., Buckman D., *Naturwissenschaften* **43**, 44 (1956).
64. Karlson P., Hoffmeister H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **331**, 298 (1968).
65. Karlson P., Hoffmeister H., Hoppe W., Huber R., *Ann. Chem.* **662**, 1 (1963).
66. Karlson P., Nachtigall M., *J. Insect Physiol.* **7**, 210 (1961).

67. Karlson P., Schmialek P., *Z. Naturforsch. Sect. B*, **14**, 821 (1959).
68. Karlson P., Sekeris C. E., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 489 (1962).
69. Karlson P., Sekeris C. E., *Nature* **195**, 183 (1962).
70. Karlson P., Sekeris C. E., *Comparative Biochemistry*, Academic Press, 1964, t. 6, str. 221.
71. Karlson P., Sekeris C. E., Maurer R., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **336**, 100 (1964).
72. King D. S., Siddall J. B., *Nature* **221**, 955. (1969).
73. Knight J. C., Pettit G. R., *Phytochemistry* **8**, 477 (1969).
74. Kobayashi M., Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., *J. Insect Physiol.* **13**, 1395 (1967).
75. Kopeć S., *Zool. Anz.* **40**, 353 (1917).
76. Kopeć S., *Biol. Bull.* **42**, 322 (1922).
77. Krishnakumaran A., Berry S. J., Oberlander H., Schneiderman H. A., *J. Insect Physiol.* **13**, 1 (1967).
78. Krishnakumaran A., Schneiderman H. A., *J. Insect Physiol.* **11**, 1517 (1965).
79. Kroeger H., *Nature* **200**, 1234 (1963).
80. Kroeger H., *Chromosoma* **15**, 36 (1964).
81. Kroeger H., w *Metamorphosis Problem in Development Biology*, red. Et-kin W., Gilbert L. I., Appleton Century Crofts, New York 1968.
82. Law J. W., Ching Yuan, Williams C. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 576 (1966).
83. Laufer H., Greenwood H., *Am. Zoologist* **9**, 603 (1969).
84. Lea A. O., Thomson E., *J. Insect Physiol.* **15**, 477 (1969).
85. Lezzi M., Gilbert L. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 498 (1969).
86. Lezzi M., Kroeger H., *Z. Naturforsch. Sect. B*, **21**, 274 (1966).
87. Loof de A., 5th Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Utrecht, 1969, Abstr. Nr 103.
88. Loof de A., Laggase A., *J. Insect Physiol.* **16**, 211 (1970).
89. Loof de A., Wilde de J., *J. Insect Physiol.* **16**, 171 (1970).
90. Lowe M. E., Horn D. S., *Nature* **213**, 408 (1967).
91. Madhavan K., Schneiderman H. A., *J. Insect Physiol.* **14**, 777 (1968).
92. Meyer A. S., Schneiderman H. A., Gilbert L. I., *Nature* **206**, 272 (1965).
93. Meyer A. S., Schneiderman H. A., Hanzmann E., Ko J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 853 (1968).
94. Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S., Chang M. L., Hsu H. Y., *Chem. Comm.* str. 915 (1966).
95. Neufeld G. J., Thomson J. A., Horn D. H. S., *J. Insect Physiol.* **14**, 789 (1968).
96. Noland J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **48**, 370 (1954).
97. Novak V. J. A., *Gen. Comp. Endocrinol. suppl.* **2**, 439 (1969).
98. Oberlander H., *J. Insect Physiol.* **15**, 297 (1969).
99. Oberlander H., *J. Insect Physiol.* **15**, 1803 (1969).
100. Oberlander H., Fulco L., *Nature* **216**, 1140 (1967).
101. Oberlander H., Schneiderman H. A., *J. Insect Physiol.* **12**, 37 (1966).
102. Ohtaki T., Milkman R. D., Williams C. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 981 (1967).
103. Ohtaki T., Milkman R. D., Williams C. M., *Biol. Bull. Woods Hole* **135**, 322 (1968).

104. Painter T. S., *Genetics* **20**, 301 (1935).
105. Panitz R., *Biol. Zentr.* **83**, 197 (1964).
106. Panitz R., *Biol. Zentr.* **87**, 545 (1968).
107. Patel N., Madhavan K., *J. Insect Physiol.* **15**, 2141 (1969).
108. Pelling C., *Chromosoma* **15**, 71 (1964).
109. Riddiford L. M., Commun. Internat. Symp. Insect Endocrines. Brno, 1966, Abstr. str. 33.
110. Riddiford L. M., *Science* **167**, 287 (1970).
111. Riddiford L. M., Williams C. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 595 (1967).
112. Robbins W. E., Kaplanis J. N., Thompson M. J., Shorttino T. J. Cohen C. F., Joyner S. C., *Science* **161**, 1158 (1968).
113. Roeller H., Bjerke J. S., Holthaus L. M., Norgard D. W., Mc Shan W. H., *J. Insect Physiol.* **15**, 379 (1969).
114. Roeller H., Bjerke J. S., Mc Shan W. H., *J. Insect Physiol.* **11**, 1185 (1965).
115. Roeller H., Dahm K. M., Sweeley C. C., Trost B. M., *Angew. Chem.* **79**, 190 (1967),
116. Romanuk M., Slama K., Sorm F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 349 (1967).
117. Rowe J. W., *Phytochemistry* **4**, 1 (1965).
118. Rudkin G. T., Corlette S. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**, 961 (1957).
119. Saxena K. N., Williams C. M., *Nature* **210**, 441 (1966).
120. Scharrer B., *Biol. Bull.* **102**, 261 (1952).
121. Schmialek P., *Z. Naturforsch. Sect. B* **16**, 461 (1961).
122. Schmialek P., *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 462 (1963).
123. Schmialek P., *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 513 (1963).
124. Schneiderman H. A., Gilbert L. I., *Science* **143**, 325 (1964).
125. Schneiderman H. A., Gilbert L. I., Weinstein M. J., *Nature* **188**, 1041 (1960).
126. Schneiderman H. A., Krishnakumaran A., Kulkarni V. G., Friedman L., *J. Insect Physiol.* **11**, 1641 (1965).
127. Schulz H., Sprung I., *Angew. Chem.* **81**, 258 (1969).
128. Schwarz M., Sonnet P. E., Wakabayashi N., *Science* **167**, 191 (1970).
129. Sehnał F., 5th Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Utrecht, 1969, Abstr. Nr 146.
130. Sehnał F., Meyer A. S., *Science* **159**, 981 (1968).
131. Sehnał F., Slama K., *J. Insect Physiol.* **12**, 1333 (1966).
132. Sekeris C. E., Lang N., Karlson P., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **341**, 36 (1965).
133. Shaaya E., 5th Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Utrecht, 1969, Abstr. Nr 148.
134. Shaaya E., Karlson P., *Develop. Biol.* **11**, 424 (1965).
135. Shaaya E., Sekeris C. E., *J. Insect Physiol.* **16**, 323 (1970).
136. Slama K., Williams C. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 411 (1965).
137. Slama K., Williams C. M., *Nature* **210**, 329 (1966).
138. Srivastava U. S., Gilbert L. I., *Science* **161**, 61 (1968).
139. Srivastava U. S., Gilbert L. I., *J. Insect Physiol.* **15**, 177 (1969).
140. Suchy M., Slama K., Sorm F., *Science* **162**, 582 (1968).
141. Sucrow W., Reimedes A., *Z. Naturforsch. Sect. B* **23**, 42 (1968).



142. Svoboda J. A., Robbins W. E., *Experientia* **24**, 1131 (1968).
143. Takemoto T., Arihara S., Hikino Y., Hikino H., *Tetrahedron Letters*, Nr 3, 375 (1968).
144. Takemoto T., Hikino Y., Arai T., Kawahara M., Konno C., Arihara S., Hikino H., *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 1816 (1967).
145. Takemoto T., Hikino Y., Nomoto K., Hikino H., *Tetrahedron Letters*, Nr 33, 3191 (1967).
146. Takemoto T., Ogawa S., Morita M., Nishimoto N., Dome K., Morishima K., *Yakugaku Zasshi* **88**, 39 (1968).
147. Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., *Yakugaku Zasshi* **87**, 1463 (1967).
148. Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., *Yakugaku Zasshi* **87**, 1469 (1967).
149. Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., *Yakugaku Zasshi* **87**, 1474 (1967).
150. Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., Arihara S., Bue K., *Yakugaku Zasshi* **87**, 1414 (1967).
151. Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., Mue K., *Yakugaku Zasshi* **87**, 1481 (1967).
152. Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., Taniguchi S., *Yakugaku Zasshi* **87**, 1478 (1967).
153. Tamelen van E. E., Storni A., Hessler E. J., Schwarz M., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3295 (1963).
154. Thomas P. J., Bhatnagar-Thomas P. L., *Nature* **219**, 949 (1968).
155. Thompson M. J., Kaplanis J. N., Robbins W. E., Yamamoto R. T., *Chem. Comm.* **13**, 650 (1967).
156. Thomsen E., Thomsen M., 5th Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Utrecht, 1969, Abstr. Nr 159.
157. Thomson J. A., Siddall J. B., Galbraith M. N., Horn D. H. S., Middleton E. J., *J. Chem. Soc., Chem. Comm. (D)*, **12**, 669 (1969).
158. Vinson J. W., Williams C. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 294 (1967).
159. Wakabayashi N., Sonnet P. E., Law M. W., *J. Med. Chem.* **12**, 911 (1969).
160. Weirich G., 5th Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Utrecht, 1969, Abstr. Nr 177.
161. Whitehead D. L., *Nature* **224**, 721 (1969).
162. Wigglesworth V. B., *J. Exptl. Biol.* **29**, 561 (1952).
163. Wigglesworth V. B., *J. Exptl. Biol.* **29**, 620 (1952).
164. Wigglesworth V. B., *J. Insect Physiol.* **2**, 73 (1958).
165. Wigglesworth V. B., *J. Insect Physiol.* **7**, 73 (1961).
166. Wigglesworth V. B., *J. Insect Physiol.* **9**, 105 (1963).
167. Wigglesworth V. B., *Advances in Insect Physiology*, red. J. W. L. Beament i in., Academic Press, Londyn—New York, 1964, t. 2, str. 280—295.
168. Wigglesworth V. B., *J. Insect Physiol.* **15**, 73 (1969).
169. Wilde de J., *Konink. Nederl. Academic van Wetenschappen-Amsterdam, Proceedings*, s. C **71**, 321 (1968).
170. Wilde de J., w *The Physiology of Insecta*, red. M. Rockstein, Academic Press, New York, Londyn 1964, t. 1, str. 59—71.
171. Wilkens J. L., *J. Insect Physiol.* **14**, 927 (1968).
172. Williams C. M., *Anat. Record.* **120**, 96 (1954).
173. Williams C. M., *Nature* **178**, 212 (1956).

174. Williams C. M., *Biol. Bull.* **116**, 323 (1959).
175. Williams C. M., *Biol. Bull.* **121**, 572 (1961).
176. Williams C. M., *Biol. Bull.* **124**, 355 (1963).
177. Williams C. M., *Science* **152**, 677 (1966).
178. Williams C. M., *Sci. Am.* **217**, 13 (1967).
179. Williams C. M., Law H. J., *J. Insect Physiol.* **11**, 513 (1965).
180. Williams C. M., Moorhead L. V., Pulis J. F., *Nature* **183**, 405 (1959).
181. Willis J. H., Lawrance P. A., *Science* **225**, 81 (1970).
182. Wyatt G. R., Commun. Internal. Symp. Insect Endocrines, Brno, 1966, str. 4.
183. Wyss-Huber M., Ludscher M., 5th Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Utrecht, 1969, Abstr. Nr 183.
184. Yamamoto R. T., Jacobson N., *Nature* **196**, 908 (1962).
185. Zdarek J., Fraenkel G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 565 (1969).
186. Zlotkin E., Levinson H. Z., *J. Insect Physiol.* **15**, 105 (1969).
187. Zurflueh R., Wall E. N., Siddall J. B., Edwards J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6624 (1968).





## RECENZJE

### **J. A. Ramsay, *Physiological Approach to the Lower Animals* II wydanie, Cambridge University Press, 1968, 150 stron, 49 rysunków**

Książeczka Ramsay'a przeznaczona jest dla studentów biologii. Referuję ją z dwóch względów.

Po pierwsze: W zestawieniu z pierwszym wydaniem 1952 roku stanowi ciekawy dokument epoki, świadczący o rewolucyjnym wprost opanowaniu przez biochemię klasycznych dziedzin biologii. Przykładem są dodane rozdziały o biochemicznych podstawach oddychania, o regulacji hormonalnej, wprowadzenie do rozdziału o nerwach jonowej teorii pobudliwości itp. Trzeba pamiętać, że adresaci tej książeczki interesowali się nie tak dawno wyłącznie systematyką i morfologią świata żywego. Drugim względem, który mną kierował, jest chęć zwrócenia uwagi na tę książeczkę tych biochemików i biofizyków, którzy mają za sobą podstawowe wykształcenie niebiologiczne. Coraz liczniejsi adepci naszej nauki, należący do tej kategorii, czują się często zagubieni w obliczu obszernych podręczników biochemii i biofizyki, przy czym trudność sprawia im nie tyle przyswojenie nowych faktów, ile opanowanie biologicznego stylu myślenia. Uważam, że dokładne przestudiowanie tej bardzo przystępnie napisanej książeczki, ułatwiłoby im w dużym stopniu orientację w świecie istot żywych. Lektura ta byłaby również pożyteczna dla medyków, dla których „drabina ewolucyjna” świata zwierzęcego urywa się zwykle na żabie.

Z tych względów uważam również, że przetłumaczenie książeczki *Physiological Approach to the Lower Animals* było bardzo pożądane.

J. Heller

### **L. N. Johnson: *Structural Aspects of Enzymatic Activity* The Federation of European Biochemical Societies Letters, Vol. 2, 4, 201, 1969**

Autor przedstawia osiągnięcia najnowszych badań nad zależnością aktywności enzymów od ich budowy. Według aktualnej hipotezy stereochemicznej specyfiki aktywności enzymów mechanizm swoistego działania enzymu na dany substrat jest ściśle uzależniony od nastawienia „grup aktywnych”, tzn. ugrupowań aminokwasów, w stronę „aktywnego centrum enzymu”. Wyjątek stanowi w tym wypadku struktura papainy. Hipotezę tę uzupełniają wyniki badań C. A. Vernona,

według których każdy moment biokatalizy enzymatycznej musi w konsekwencji spowodować przemiany jakościowe i ilościowe związków pośrednich. Badaniami objęto następujące enzymy: lizozym i  $\alpha$ -laktalbuminę, rybonukleazę, grupę proteinaz serynowych, karboksypeptydazę, papainę oraz grupę swoistych enzymów oligomerycznych.

Najdokładniej przebadany został lizozym, którego budowę potwierdził ostatnio D. C. Phillips. Raftery i Rapley są zdania, że zasadnicze „centrum aktywności” tego enzymu stanowi jon karboniowy. Mechanizm działania lizozymu na substrat (błone komórkową) opisują R. C. Davies i B. M. Wilson; mechanizm ten jest jedynie dalszym potwierdzeniem teorii jonowej. A. T. C. North zwrócił uwagę na podobieństwo struktury lizozymu do  $\alpha$ -laktalbuminy, katalizującej procesy syntezy laktozy. Poza stwierdzeniem niemal analogicznej budowy strukturalnej obu tych enzymów, nie rozwiązano jednak problemu zależności ich aktywności od swoistej struktury, zwłaszcza jeśli się zważy, że laktalbumina katalizuje syntezę, natomiast lizozym — hydrolizę wiązania  $\beta$  (1-,4-) glikozydowego. Brew, Vanaman i Hills wykazali, że rola  $\alpha$ -laktalbuminy w biosyntezie glukozy jest w rzeczywistości o wiele bardziej skomplikowana. Prawdopodobnie białko to działa jako modyfikator substratu, zmieniając równocześnie swoje właściwości innego białka oznaczonego symbolem A, które współdziała z laktalbuminą w procesach biosyntezy laktozy w ten sposób, że hamuje syntezę galaktozylo-N-acetyloglukozoaminy aktywując równocześnie syntezę galaktozyloglukozy.

W badaniach nad rybonukleazami, na czoło wybijają się prace B. R. Rabina, ponadto F. M. Richardsa i H. W. Wyckoffa oraz Westheimera i wsp.

Z grupy proteinaz serynowych zbadano budowę i aktywność chymotrypsyny, elastazy, trombiny, trypsyny i subtilizyny. Zespół badaczy pod kierunkiem D. M. Blowa wykazał, że stosując metodę analizy czwartorzędowej struktury związków organicznych, można wyjaśnić układ aminokwasów w cząsteczce  $\alpha$ -chymotrypsyny, natomiast R. Henderson uzasadnia swoje rozmieszczenie wiązań wodorowych w tej molekuale. Dalsze badania Hendersona pozwoliły na wysunięcie następującej hipotezy: konformacja, zainicjowana przez łańcuch polipeptydowy w rejonie tak zwanej „aktywnej seryny” ustala położenie reszty glicyny. Powyższa hipoteza wyjaśnia zachowanie się swoistego układu aminokwasów -Gli-Asp-Sper-Gli- w grupie proteinaz serynowych.

Na znaczne podobieństwo budowy tosyloelastazy do chymotrypsyny zwracają uwagę H. C. Watson i D. M. Shotton. Analogiczne podobieństwo występuje pomiędzy budową chymotrypsyny A i elastazy, trypsyny i chymotrypsyny B, a także w strukturze poszczególnych hemoglobin i miogloblin.

Według J. Krauta, subtilizyna bakteryjna typu BPN', jakkolwiek różni się strukturalnie od cząsteczki chymotrypsyny, posiada pomimo to analogiczny układ aktywujący serynę.

Potwierdzeniem aktualnej teorii enzymów Koshlanda są badania W. N. Lipscomba i wsp. oraz T. A. Steitza nad mechanizmem działania karboksypeptydazy i innych metalopeptydaz, wskazujące że jon cynku, wchodzący w skład cząsteczki karboksypeptydazy posiada podwójną funkcję: 1) „orientuje” substrat oraz 2) działa jak kwas Lewisa, polaryzujący wiązanie karbonylowe substratu.

Według J. N. Jansoniusa, „centrum aktywności” papainy tworzy grupa histydylowa i cysteinylowa; L. A. A. E. Sluyterman wykazał, że enzym ten wywiera swą pełną aktywność również i w postaci krystalicznej, natomiast H. Gutfreund podał wyniki badań krystalograficznych i kinetycznych papainy.

Z grupy enzymów oligomerycznych przebadano dehydrogenazę kwasu mlekowego (A. J. Wonacott, H. Gutfreund) oraz różne odmiany hemoglobiny (F. M. Perutz).

W. J. Pajor

## **F. Pliquett, Biophysikalische Untersuchungen von Zellen und Geweben durch passive elektrische Verfahren**

**Zeszyt 11. Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik, VEB Georg Thieme, 1969, stron 96**

Własności elektryczne komórek i tkanek są ostatnio tematem wielu prac eksperymentalnych i teoretycznych, odczuwa się jednak brak przeglądowego opracowania badań z zakresu tej problematyki.

Omawiany zeszyt, którego autorem jest F. Pliquett, relacjonuje badania kilku parametrów elektrycznych, głównie stałej dielektrycznej, przeprowadzone do roku 1967. Całość liczy 96 stron i zawiera 13 rozdziałów.

We wstępnych rozdziałach autor analizuje znaczenie badań własności elektrycznych komórek i tkanek, jako wskaźnika zmian stanu komórki przy działaniu różnych zewnętrznych parametrów oraz jako istotnego czynnika przy wyjaśnianiu kinetyki procesów wewnątrzkomórkowych. W kilku następnych rozdziałach przedstawia klasyczną teorię zależności stałej dielektrycznej (i optycznego współczynnika załamania) od wielkości charakteryzujących mikrostrukturę materii oraz własne uogólnienie tej teorii na ultraniskie częstotliwości. W uogólnionej teorii efekty zachodzące w obiekcie biologicznym i na powierzchni elektrod pomiarowych, autor traktuje globalnie; zdaniem autora impedancja polaryzacyjna elektrod wnosi bardzo istotne informacje o badanym obiekcie. W rozdziałach zawierających opracowania teoretyczne przedstawiona jest ponadto mechaniczna teoria procesu relaksacji, wyjaśniająca dyspersję stałej dielektrycznej oraz oparte na tej teorii metody — niektóre własnej koncepcji autora — wyznaczania podstawowych parametrów relaksacji dla badanego materiału.

W rozdziale zatytułowanym „Urządzenia eksperymentalne” opisane są szkieletowo powszechnie stosowane metody pomiaru impedancji i stałej dielektrycznej i przedstawione bardzo dokładnie metody pomiarowe, stosowane przez autora, częściowo zmodyfikowane w porównaniu z dawnymi.

Wyniki eksperymentów i analiza tych wyników zawarte są w trzech kolejnych rozdziałach. Doświadczenia dotyczące wpływu pola elektrycznego na materiał biologiczny wykazują, że istnieje pewne graniczne natężenie pola (wartość tego natężenia jest funkcją częstotliwości), poniżej której pole nie wywiera żadnego wpływu na żywą materię. W rozdziale traktującym o badaniach pojedynczych komórek autor w oparciu o najnowszą literaturę przedstawia zmiany wartości różnych parametrów fizycznych i fizyko-chemicznych, zachodzące w procesie rozwoju i obumierania komórki. Ponieważ parametry te są w korelacji z parametrami elektrycznymi, wynika stąd, że stała dielektryczna pojedynczej komórki winna mieć charakterystyczny przebieg czasowy. Takie charakterystyczne zmiany stałej dielektrycznej w czasie, rejestrowane były przez autora dla komórki *Oxytricha*. Dla około 400 komórek przebadano zmiany stałej dielektrycznej w naturalnych warunkach, przy niewielkich zmianach środowiska prowadzących do tworzenia się



cyst i przy silnych zmianach otoczenia prowadzących do śmierci komórki. Obserwowane w procesie obumierania komórki zmniejszanie się stałej dielektrycznej w obszarze niskich częstotliwości i wzrost jej w obszarze częstotliwości wysokich wyjaśnia autor rozpadem dużych elementów strukturalnych. Eksperymenty przeprowadzone na tkankach mięśnia sercowego potwierdzają ogólne zależności zaobserwowane na pojedynczych komórkach i zsynchronizowanych koloniach komórek.

W opracowaniu F. Pliquetta szczególnie silnie akcentowane są badania zespolonej stałej dielektrycznej w obszarze niskich częstotliwości sięgających  $8 \times 10^{-4}$  Hz. Autor uważa, że dyspersja stałej dielektrycznej w tym obszarze jest wynikiem istnienia w komórce struktur o dużym czasie relaksacji, interesujących z punktu widzenia funkcji życiowych komórki i może służyć jako źródło informacji o tych strukturach. Wysunięta przez autora koncepcja — niewątpliwie interesująca — istnienia w komórce takich struktur wymaga jednak powiązania ich z odpowiednimi strukturami morfologicznymi. Natura struktur wykazujących tak duży czas relaksacji i mechanizm tego procesu relaksacyjnego nie są jeszcze znane.

Książka F. Pliquetta może nasuwać pewne krytyczne uwagi. Przedstawione w niej prace dotyczące badań pasywnych elektrycznych własności komórek i tkanek zostały wykonane niemal wyłącznie na komórkach *Oxytricha* i tkance mięśniowej i stanowią tylko wąski wycinek prac z zakresu tej problematyki. Jako przykład zawężenia problematyki można podać brak nawet wzmianki o tak szeroko stosowanej dziś mikroelektrodowej metodzie badań parametrów elektrycznych komórek. Pewne zastrzeżenia może również budzić zastosowana przez autora metoda globalnego traktowania impedancji badanego obiektu i impedancji polaryzacyjnej elektrod pomiarowych.

Należy jednak stwierdzić, że przedstawione w książce dane dotyczące zespolonej stałej dielektrycznej badanych obiektów, teoretyczno-eksperymentalna analiza zmian tej wielkości i powiązanie tych zmian z innymi parametrami komórki opracowane zostały niezwykle starannie w oparciu o obszerną literaturę (267 pozycji), toteż książka przedstawia dużą wartość, szczególnie dla osób zajmujących się badaniami fizycznych i fizyko-chemicznych własności organizmów żywych.

Książka F. Pliquetta stanowi poważny wkład do głębszego zrozumienia elektrycznych własności materii na płaszczyźnie molekularnej i komórkowej.

J. Skierczyńska

### **Advances in Enzyme Regulation, tom 6, red. Georg Weber, Pergamon Press 1968, stron 517**

Seria wydawnicza „Advances in Enzyme Regulation” przedstawia problemy dyskutowane podczas kolejnych sympozjów, z których szóste prezentowane w tomie VI, nosiło tytuł: „Regulacja aktywności enzymów i syntez w tkankach prawidłowych i nowotworowych” (2-3 październik 1967, *Indiana University School of Medicine*). Hasła pod jakimi obradowały poszczególne sesje sympozjum nie były jednolite tak pod względem precyzji tytułów jak i zakresu oraz formy wypowiedzi kolejnych referentów. Wszystkie referaty wszakże obrazowały aktualne w 1967 roku osiągnięcia w omawianej dziedzinie biochemii.

Tematem sesji I była regulacja i współzależność metabolizmu węglowodanów i lipidów w wątrobie. Regulacja cyklu kwasów trójkarboksylowych pod wpływem

utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach omówiono w referacie P. B. Garlanda i wsp. Autorzy w oparciu o bogate dane doświadczalne wnioskują, że spadek intensywności utleniania pirogronianu i aktywności cyklu Krebsa w mitochondriach utleniających palmitylokarnitynę jest wynikiem podwyższenia poziomu acetylo-CoA, wzrostu stosunku zredukowanego NAD (P) do NAD (P) oraz wzrostu poziomu ATP. Okazało się bowiem, że acetylo-CoA silnie aktywuje izolowaną z mitochondriów karboksylazę pirogronianową, hamuje zaś dehydrogenazę pirogronianową a także aktywuje system syntezy acetooctanu; podwyższenie poziomu zredukowanego NAD (P) hamuje natomiast aktywność dehydrogenaz pirogronianowej i izocytrynianowej; wzrost stężenia ATP hamuje syntetazę cytrynianową a wolne kwasy tłuszczowe i palmitylokarnityna hamują transport nukleotydów adeninowych przez błonę mitochondrialną. Wszystkie te fakty doświadczalne wystarczająco wyjaśniają, zdaniem autorów, przyhamowanie cyklu Krebsa i zwiększoną produkcję tzw. ciał ketonowych podczas utleniania kwasów tłuszczowych w wątrobie przy niedoborze innych substratów. Problemy współzależności utleniania kwasów tłuszczowych i glukogenezy omawiał artykuł J. R. Williamsona i wsp. Fakty doświadczalne uzyskane przez pracownię Garlanda i pracownię Williamsona potwierdzają i uzupełniają się wzajemnie. Badacze ci różnią się jednak poglądem na sprawę regulacji syntetazy cytrynianowej: Williamson uważa, że synteza cytrynianu ograniczana jest przez dostępność szczawiooctanu i poddaje krytyce wysuwaną przez Garlanda tezę o kontroli syntetazy cytrynianowej przez nukleotydy adeninowe.

W ścisłym związku tematycznym z obu w.w. pracami był referat końcowy Sir Hansa Krebsa o wpływie etanolu na procesy glukoneogenezy i lipogenezy w wątrobie. Autor podkreśla, że istotną zmianą, którą etanol wywołuje jest znaczne podwyższenie poziomu zredukowanego NAD w frakcji cytoplazmatycznej, co z kolei obniża stężenie pirogronianu i tym samym obniża intensywność glukoneogenezy. Ponadto wysoki poziom zredukowanego NAD w cytoplazmie hamuje utlenianie  $\alpha$ -glicerofosforanu, który ulega wtedy intensywnej acylacji i w efekcie w wątrobie nagromadzają się tłuszcze. Regulacja aktywności kluczowych enzymów szlaku glikozy przez wolne kwasy tłuszczowe, acetylo-CoA, zredukowanego NAD i alaninę została omówiona przez gospodarzy Sympozjum (G. Weber, M. A. Lee i N. B. Stamm). Przedstawione dane potwierdzają pogląd o zwrotnym hamowaniu syntezy tłuszczów z glukozy przez kwasy tłuszczowe i produkty ich utleniania. Z kolei artykuł N. R. Marquis, R. P. Francesconi i C. A. Ville tłumaczy hamujący wpływ karnityny na proces syntezy kwasów tłuszczowych hamowaniem karboksylazy acetylo-CoA. Autoregulacja zużycia glukozy jest tematem artykułu E. F. McCraw, M. J. Peterson, G. Yarnell i J. Ashmore. W oparciu o doświadczenia z perfundowaną wątrobą autorzy wnioskują, że w normalnych warunkach zużycie glukozy jest regulowane przez glukokinazę i dyskutują jakie czynniki ponadto kontrolują ten proces podczas głodu i w stanach cukrzycowych.

W sesji II zatytułowanej „Regulacje enzymatyczne u człowieka” R. D. Koler i P. Vanbellinchen zajmują się zjawiskiem modulacji izoenzymu kinazy pirogronianowej z erytrocytów ludzkich (PK I) przez fruktozo-1,6-dwufosforan (FDP). Wg wysuniętej hipotezy wiązanie FDP w miejscu katalitycznym jednego z protomerów PK I zmienia konformację dimeru, powodując wzrost powinowactwa drugiego miejsca do substratu; FDP dodany w nadmiarze działa jako inhibitor kompetycyjny modulując aktywność enzymu. Autorzy dyskutują znaczenie modulacji PK I przez FDP w homeostazie glikozy i glikoneogenezy w erytrocytach i wątrobie ssaków. Przypomnieć warto, że badany izoenzym kinazy pirogronianowej erytro-



cytów ludzkich ma szczególne znaczenie metaboliczne skoro jego brak przejawia się znaną z patologii anemią hemolityczną. Druga praca referowana w tej Sesji dotyczyła adaptacji mózgu człowieka do użytkowania ketokwasów po długotrwałym okresie głodu. Opisane doświadczenia (D. F. Cahill Jr., O. E. Owen i P. A. Morgan) polegały na cewnikowaniu krwi tętniczej i żyłnej i oznaczaniu w niej  $O_2$ ,  $CO_2$ , glukozy i szeregu kwasów organicznych.

Mechanizm działania glukokortykoidów był tematem sesji III zatytułowanej „Steroidy — mechanizm działania”. W referacie „Efekt kortyzolu na poziom metabolitów i enzymów kontrolujących syntezę glukozy z pirogronianu” przedstawiono (W. Seubert, H. V. Henning, W. Schoner i M. L'Age) dane wskazujące, że glukokortykoidy podnosząc poziom acetylo-CoA sprzyjają aktywacji karboksylazy pirogronianowej, enzymu kluczowego w glukoneogenezie oraz, że sprawują negatywną kontrolę glukozy. Z kolei omówiono w tej sesji pobudzający wpływ glikokortykoidów na aktywność polimeraz RNA zależnych od DNA oraz ich dodatni wpływ na wbudowywanie znaczonych prekursorów do RNA jądrowego i cytoplazmatycznego przy równoczesnym zmniejszeniu szybkości rozpadu znaczonego RNA (O. Barnabei i C. Ottolenghi). Problem kontroli polimeraz RNA zależnych od DNA poprzez hormony sterydowe był również tematem jednego z wykładów sesji VIII przeznaczonej na omówienie regulacji przemian w raku wątroby (*hepatoma*). W sesji tej mówiono również (C. H. Lo, F. Farina, H. P. Moris i S. Weinhouse) o korelacji między szybkością rozrostu i aktywnością glikolityczną tkanki nowotworowej, dyskutując przede wszystkim, jako czuły punkt kontroli metabolicznej procesu glikolizy, aktywność transfosforylaza szlaku glikolitycznego i oddechowego współzawodniczących o ADP. Szczególnie interesujące jest stwierdzenie, że w zdrowej wątrobie i w wolno rosnących nowotworach o zróżnicowanej strukturze, niskiej glikolizie i wydajnym oddychaniu przeważa izoenzym kinazy pirogronianowej (PK 2) adsorbujący się na DEAE celulozie, podczas gdy izoenzym (PK 1) nie ulegający adsorpcji posiada bardzo wysoką aktywność w niektórych mało zróżnicowanych i silnie inwazyjnych nowotworach wątroby o niskim oddychaniu i wydajnej glikolizie.

Sesja IV objęła dwie niezwiązane tematycznie prelekcje. Pierwsza z nich zobrazowała wyniki badań i nadal kontrowersyjne poglądy na temat regulacji syntezy protrombiny przez witaminę K (R. E. Olson, G. Philipps i N. T. Wang). Druga zaś dotyczyła badań nad regulacją i różnicowaniem się wątrobowego i nerkowego izoenzymu glutaminazy niezależnej od fosforanu (PIG). Japońscy autorzy tej pracy (N. Katunuma, T. Katsunuma, I. Tomino i Y. Matsuda) podkreślają odmiennosć mechanizmów regulacji aktywności każdego z izoenzymów przez aktywatory, a w oparciu o fakt obecności obydwu izoenzymów w płodowych nerkach i wątrobie szczura oraz o fakt zanikania w ciągu kilku dni po urodzeniu niespecyficznego dla narządu izoenzymu — tłumaczą dyferencjację narządowo specyficznego izoenzymu PIG poprzez mechanizm represji skierowany przeciw niespecyficznej dla narządu formie PIG.

O aktywacji i sprzężeniu zwrotnym w regulacji aktywności enzymatycznej mówiono (Sesja V) opisując własności i kontrolę aktywności kinazy fosforylazowej w mięśniach szkieletowych (E. G. Krebs, R. B. Huston i F. L. Hunkeler) oraz syntetazy glutaminowej u *E. coli* (E. R. Stadtman, B. M. Shapiro, H. S. Kingdon, C. A. Woolfolk i J. S. Hubbard). W sesji tej D. E. Koshland Jr. przedstawił znane już z innych wypowiedzi i artykułów swoje poglądy na mechanizm kontroli aktywności enzymatycznej przez zmiany konformacyjne cząsteczki pod wpływem ligandów.



W Sesji VI omawiano regulację reduktazy dwuhydrofolanowej, który to enzym limitując syntezę tyminy i rdzenia purynowego kontroluje syntezę DNA i RNA. 4-amino-analogi folanu bywają stosowane jako środki terapeutyczne np. w przypadkach niektórych form leukemii a ich krótkotrwałość na ogół efekt leczniczy daje się tłumaczyć zahamowaniem aktywności reduktazy dwuhydrofolanowej *in vivo*. W sesji przedstawiono trzy przeglądowe referaty zbierające dane o właściwościach tego enzymu z różnych tkanek zwierzęcych i z różnych mikroorganizmów, oraz omówiono wrażliwość a także wtórnie wytworzoną oporność pewnych linii komórkowych na różne chemoterapeutyki, a w szczególności na aminoanalogi folanu.

Oddzielną sesję przeznaczono na przedyskutowanie roli cyklicznego AMP w regulacji enzymów. Wiadomo dziś, że działanie wielu biologicznie różnych hormonów można sprowadzić do ich wpływu na poziom cyklicznego AMP w tkankach, co następuje poprzez modyfikację aktywności enzymu zwanego cyklazą adenilową. Cykliczne AMP z kolei zmienia aktywność wielu metabolicznie ważnych enzymów. Powstają zatem pytania: w jaki sposób komórki odróżniają poszczególne hormony o specyficznej przeciw aktywności skoro właściwym efektem ich działania jest ten sam cykliczny AMP; oraz: jak się to dzieje, że to samo zjawisko, jakim jest wewnątrzkomórkowa zmiana poziomu cyklicznego AMP może powodować wiele różnych odpowiedzi w różnych komórkach. Na te i podobne pytania starają się odpowiedzieć autorzy pięciu prelekcji składających się na sesję VII (C. G. Smith; R. W. Butcher, G. A. Robinson, J. G. Hardman i E. W. Sutherland; J. H. Exton i C. R. Park; J. Larner, C. Villar-Palasi, N. D. Goldberg, J. S. Bishop, F. Huijing, J. I. Wenger i N. B. Brown; R. C. Adelman, C. H. Lo i S. Weinhouse).

Symposium zakończył, jak wspomniano wyżej, specjalny referat Sir Hansa Krebsa na temat efektów działania alkoholu na aktywność metaboliczną wątroby.

Z. Zielińska

### **Advances in Enzyme Regulation, vol. 7**

**Proceedings of the Seventh Symposium on Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues held at Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, September 30 and October 1, 1968**

**Red. Georg Weber, Pergamon Press Ltd, 1969, str. 447**

Tom jest zbiorem wykładów sympozjalnych prowadzonych w 13 sesjach, poświęconych dość różnorodnej tematyce choć podporządkowanych wspólnemu problemowi. Jest nim regulacja aktywności enzymów i ich syntezy, przede wszystkim u ssaków. Ze względu na obfitość materiału zawartego w tomie można tu jedynie zasygnalizować niektóre zagadnienia poruszane w poszczególnych wykładach. Na uwagę zasługuje m.in. wykład B. Feliga, E. Marliissa, O. E. Owena i G. F. Cahilla jr. o roli substratu w regulacji glukoneogenezy w wątrobie w czasie głodu u człowieka; wykład H. D. Sölinga, J. Kaplana, M. Erbstoeszera i H. C. Pitota na temat roli hormonów w represji glukozowej w wątrobie szczura; sesja poświęcona enzymatycznej kontroli metabolizmu kortykosteroidów w nadnerczach; wreszcie sesja na temat regulacji aktywności różnych enzymów w komórkach nowotworowych.

Niektórym wykładom poświęcimy nieco więcej uwagi. Wykład inauguracyjny sesję, wygłoszony przez Alberta Szent-Györgyi'ego, dotyczył niektórych czynników regulujących aktywność enzymatyczną w komórce. Autor, przeciwstawiając organizmy jednokomórkowe organizmom filogenetycznie bardziej rozwiniętym, uzasadniał niezbędność występowania u tej ostatniej grupy organizmów złożonych mechanizmów regulujących podziały komórkowe w taki sposób, by rozwój poszczególnych komórek ustroju był podporządkowany i skorelowany z rozwojem całego organizmu. Tylko wówczas bowiem organizm jest w stanie obronić się przed niekontrolowaną proliferacją komórek, charakterystyczną dla procesów nowotworowych. Zdaniem A. Szent-Györgyi'ego, jednym z mechanizmów regulacyjnych w tym względzie byłoby hamowanie aktywności niektórych enzymów, np. glioksalazy I (E.C.4.4.1.5.) i glioksalazy II (E.C.3.1.2.6.) na drodze ich wiązania przez komórkę w określonych momentach rozwoju. W takim ujęciu, zaburzenia zdolności wiązania tych enzymów przez komórkę byłyby czynnikiem zapoczątkowującym procesy jej rakowacenia.

G. Weber przedstawił dane dotyczące badań nad czynnikami regulującymi syntezę i aktywność kinazy pirogronianowej (E.C.2.7.1.40) w wątrobie szczura. Nukleozydotrójfosforany okazały się inhibitorami tego enzymu, co — zdaniem autora — sugeruje, że metabolizm kwasów nukleinowych może hamować, na drodze sprzężenia zwrotnego, aktywność tego enzymu. Należałoby więc spodziewać się, iż metabolizm ten wpływa na przebieg i natężenie procesów glikolitycznych, co z kolei może znaleźć odbicie w natężeniu podziałów komórkowych. Badania te mogą okazać się szczególnie pomocne dla lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących metabolizm komórek nowotworowych.

Godnym uwagi jest niewątpliwie wykład R. C. Olsona, R. K. Kipfera i F. L. Li, w którym autorzy donoszą, że witamina K dodana *in vitro* do perfundowanej wątroby szczura stymuluje syntezę *de novo* kilku czynników krzepliwości, m. in. protrombiny.

W tomie tym znajdujemy również interesujący wykład K. J. Lembacha i J. M. Buchanana o regulacji procesów syntezy białek indukowanych przez faga T4 u *Escherichia coli* szczepu B. Autorzy sugerują m. in., że transkrypcja fagowego DNA, przynajmniej częściowo, może być regulowana przez procesy translacji pewnych białek indukowanych przez faga.

Warto też zwrócić uwagę na wykład prezentowany przez S. Sakiyama, S. Usui i Y. Miura; autorzy ci donoszą, że leworfanol (syntetyczna morfina) hamuje specyficznie syntezę rybosomowego RNA (rRNA) w jąderku komórek wątroby szczura. Jest to pierwsze doniesienie na temat hamowania syntezy rRNA u organizmów eukariotycznych za pomocą tego związku. Autorzy stwierdzili ponadto, że poliaminy — a szczególnie spermidyna — związki stabilizujące strukturę rybosomu, działają antagonistycznie w stosunku do hamującego wpływu leworfanolu. W związku z tym Sakiyama i wsp. dyskutują możliwość pośredniej regulacji procesów syntezy rRNA przez aminooksydazę — zahamowanie aktywności tego enzymu doprowadza bowiem do wzrostu stężenia poliamin w komórce i jednocześnie do wzmożenia wbudowywania kwasu orotowego do rRNA u zarodka kurczęcia.

Wykład R. B. Hulberta, E. G. Millera i C. L. Vaughana jest poświęcony kontroli reakcji przeprowadzanych przez polimerazę RNA w jądrze komórek wątroby szczura. Technika hybrydyzacji RNA-DNA autorzy stwierdzili, że wbrew faktowi ogromnej przewagi syntezy rRNA nad syntezą innych typów RNA w jąderku, cistrony dla rRNA stanowią jedynie niewielką część (poniżej 1%) DNA tej organeli. Jąderkowa polimeraza RNA jest związana z tymi cistronami i pozostaje

w stanie wysokiej aktywności. W przeciwieństwie do niej, pozająderekowa polime-  
raza RNA występująca w jądrze jest silnie hamowana przez histony.

Warto zwrócić uwagę na wykład A. C. Griffina poruszający problemy badań  
porównawczych nad przenoszącymi kwasami rybonukleinowymi (tRNA) i nad  
aminoacylosyntetazami w wątrobie szczura i w wątrobowej puchlinie Novikoffa.  
Znaczenie takich badań wynika m.in. z faktu, iż enzymy te, jak też tRNA naj-  
prawdopodobniej spełniają rolę regulacyjną w rozwoju systemów komórkowych,  
np. poprzez kontrolę syntezy białek. Autor zwrócił uwagę, że pewne związki kar-  
cinogenne zapoczątkowują bliżej dotychczas nieokreślone zmiany strukturalne  
tRNA jako wynik np. metylacji jego zasad. Autor przypomina, w związku z tym,  
że już dawniej zauważono zwiększoną aktywność metylazy przenoszących kwa-  
sów nukleinowych w komórkach nowotworowych. Tym samym, badania autora  
dotyczyłyby enzymatycznej regulacji procesów formowania struktur o określonych  
funkcjach.

Tom ten zakończony jest wykładem H. A. Krebsa i R. L. Veecha; wykład ten  
zainteresuje zapewne wszystkich, którzy śledzą dyskusje prowadzone na temat  
regulacyjnej roli potencjału oksydo-redukcyjnego nukleotydów adeninowych w me-  
tabolizmie komórkowym.

Jak widać z przytoczonych pokrótce tematów, można sądzić, iż nowy tom  
*Advances in Enzyme Regulation* spotka się z szerokim zainteresowaniem czytelników.

T. Gołaszewski





## SPRAWOZDANIA

### XII Szkoła Letnia FEBS w Halle, NRD

W dniach 14—18 listopada 1969 roku odbyła się w Halle (NRD) Szkoła Letnia nr 12 FEBS poświęcona hormonom roślinnym, ich metabolizmowi i współdziałaniu. Szkołę zorganizowało Towarzystwo Biochemiczne NRD oraz Instytut Biochemii Roślin Niemieckiej Akademii Nauk w Halle. Uczestniczyło w niej około 90 osób. Reprezentowane były niemal wszystkie ważniejsze europejskie ośrodki badań nad roślinnymi substancjami wzrostowymi, jak również jedna z najpoważniejszych amerykańskich pracowni zajmujących się tą tematyką (*Plant Research Laboratory, Michigan State University*). Nieprzypadkowo Szkoła Letnia organizowana była w NRD. Instytut Biochemii Roślin w Halle, gdzie między innymi pracuje prof. Mothes, jest znanym ośrodkiem badań nad substancjami wzrostowymi. Gospodarze byli licznie reprezentowani, przede wszystkim jako autorzy szeregu interesujących wykładów. Delegacja polska, w odróżnieniu od wielu innych sympozjów i zjazdów międzynarodowych, była jedną z najliczniejszych. Z Polski przyjechało siedem osób: doc. dr Maria Bielińska-Czarnecka z Instytutu Ziemniaka, doc. dr Janina Pieniążkowa i prof. dr Leszek Jankiewicz z Instytutu Sadownictwa, doc. dr Mirosław Tomaszewski i mgr Kazimierz Krawiarz z Zakładu PAN w Kórniku oraz dr Alina Kacperska-Palacz i niżej podpisana z Uniwersytetu Warszawskiego.

Szkoła Letnia, wbrew swej nazwie, nosiła charakter sympozjum naukowego poświęconego określonej, ale dość szerokiej dziedzinie biochemii i fizjologii roślin. Obrady poświęcone były kolejno następującej tematyce: biosyntezie i metabolizmowi auksyn, giberelin i cytokinin, kwasowi abscysynowemu i innym natywnym inhibitorom wzrostu, retardantom wzrostu, działaniu i współdziałaniu różnych substancji wzrostowych, mechanizmowi działania hormonów i wreszcie nowoczesnym metodom ustalania struktury tych związków.

Spśród wykładów poświęconych problematyce auksyn szczególnie interesujący był referat prof. Libberta z Uniwersytetu w Rostocku, NRD. Podkreślił on słabe strony powszechnie przyjętego schematu biosyntezy auksyn. Nie ma przekonujących danych za lub przeciw założeniu, że tryptofan jest zasadniczym prekursorem kwasu indoloocetowego. Badania dróg biosyntezy w tkankach roślinnych utrudnia fakt, że muszą być one prowadzone w warunkach sterylnych, gdyż drogi metaboliczne prowadzące do syntezy kwasu indoloocetowego u bakterii są prawdopodobnie różne od roślinnych.

Z tematyki giberelin wykład prof. Graebe z Uniwersytetu w Göttingen, NRF, był próbą uporządkowania dotychczasowych wiadomości o biosyntezie tych związków. Rola kaurenu jako pośrednika jest raczej bezsporna, natomiast występują pewne nieznanne pośredniki między aldehydem gibbanowym i pierwszą gibereliną w szeregu biosyntetycznym, którą jest GA<sub>12</sub>. Zwrócił również powszechną uwagę wykład dr Hansa Kende *Michigan State University, USA* na temat metabolizmu giberelin. Mówił on o metodach otrzymywania znaczonych gibberelin oraz poru-



szły stale dyskusyjny problem czy giberelina przejawia swą aktywność w formie niezmienionej, czy też aby spowodować reakcję biologiczną musi łączyć się z jakimś akceptorem. Pochodne giberelin (*conjugated gibberellins*) były tematem referatu dr Sembdnera z Instytutu Biochemii Roślin w Halle. Podkreślił on konieczność dokładnego rozróżnienia terminologicznego giberelin związanych (*bound gibberellins*) od pochodnych giberelin (*conjugated gibberellins*), połączonych wiązaniami kowalencyjnymi ze związkami niskocząsteczkowymi. W dyskusji prof. Shreiber (NRD) poruszył problem definicji giberelin, często bowiem występuje tu różnica zdań między chemikami i fizjologami roślin. Przyjęto, że gibereliną można nazwać tylko taki związek, który ma strukturę chemiczną giberelin, ich aktywność biologiczną i jest związkiem natywnym występującym w materiale roślinnym.

O cytokininach mówili badacze z Instytutu Biochemii Roślin w Halle: dr Elizabeth Engelbrecht oraz prof. Kurt Mothes. Prof. Mothes zajął się głównie omówieniem zależności między aktywnością biologiczną cytokinin a ich strukturą. Dr Kende w dyskusji zwrócił uwagę na bardzo istotny problem, czy różnice w aktywnościach cytokinin są związane z ich strukturami czy też z przepuszczalnością protoplastu dla tych związków.

Prof. Wareing z *University of Wales*, Wielka Brytania, omówił wyniki ostatnich badań nad efektami biologicznymi kwasu abscysynowego. Kierunek badań jego pracowni zmierza do wyjaśnienia mechanizmu działania kwasu abscysynowego.

W trakcie obrad wiele mówiono na temat działania i współdziałania roślinnych substancji wzrostowych. Prof. Nitsch z Gif-sur-Yvette, Francja, omówił współdziałanie auksyn, giberelin i cytokinin we wzroście i różnicowaniu tkanek roślinnych. Omawiając dane doświadczalne dotyczące mechanizmów działania tych związków wspomniał o ciekawej interpretacji zjawiska hamowania wzrostu elonacyjnego przez wysokie stężenia kwasu indoloocetowego. Dane doświadczalne zdają się wskazywać, że czynnikiem odpowiedzialnym za to zjawisko jest etylen.

Jednym z najciekawszych referatów Szkoły Letniej był wykład dr Kende o mechanizmie działania roślinnych substancji wzrostowych na poziomie komórkowym i molekularnym. Zdaniem prelegenta aby zbliżyć się do poznania mechanizmu działania regulatorów wzrostu roślin należy przede wszystkim zbadać najwcześniejszą reakcję rośliny na podany czynnik. Kende postuluje udział specyficznych, białkowych akceptorów czynników wzrostowych w regulacji procesów fizjologicznych i stoi na stanowisku, że prace prowadzone przy użyciu inhibitorów biosyntezy kwasów nukleinowych czy białek nie mogą w pełni uzasadnić postulowanego schematu działania hormonów na poziomie genu. W rozmowach kularowych ktoś zauważył, że po raz pierwszy w spotkaniu poświęconym mechanizmowi działania substancji wzrostowych nie padło słowo represor lub ko-represor. Nie znaczy to, że Kende wykluczył tę możliwość działania substancji wzrostowych, położył jednak duży nacisk na receptor typu białkowego.

Osobną tematyką Szkoły były nowoczesne metody ustalania struktury substancji wzrostowych. Zebrani z zaciekawieniem i nawet pewną dozą zazdrości wysłuchali prof. MacMillana z Wielkiej Brytanii, który opowiadał o nowoczesnym wyposażeniu jego pracowni. Interesującą była dyskusja między prof. Kuczerowem (ZSRR), MacMillanem i Schreiberem na temat metod ustalania budowy chemicznej naturalnych regulatorów wzrostu roślin.

Duża ilość wykładów i długie dyskusje wypełniały całkowicie cztery dni obrad Szkoły Letniej. W nielicznych wolnych chwilach mieliśmy okazję zwiedzenia nowoczesnych budynków Instytutu Biochemii Roślin w Halle. W części towarzysko-



rozrywkowej Szkoły byliśmy uczestnikami dwóch recepcji. Pierwsza wydana była przez Instytut Biochemii Roślin w Halle a druga, na zakończenie, przez Prezesa Niemieckiego Towarzystwa Biochemicznego prof. Schreibera. Na szczególne podkreślenie zasługuje niezwykle sprawna organizacja Szkoły, dzięki czemu uczestnicy w pełni wykorzystali intensywny jej program.

Wysoki poziom wykładów, a szczególnie sprowokowane przez nie dyskusje, umożliwiły dyskutantom wymianę poglądów i doświadczeń, a słuchaczom zapoznanie się z kierunkami badań czółowych pracowni światowych w dziedzinie roślinnych substancji wzrostowych.

*A. Rychter*



## SPIS TREŚCI

T. Baranowski — Zależność między budową a funkcją białek . . . .	319
L. Kłyszejko-Stefanowicz, J. Bartkowiak — Biologiczna aktywność histonów . . . . .	347
L. Myszkowski — Denaturacja białka jako zmiana jego struktury . .	389
R. Dąbrowska, W. Drabikowski — Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych . . . . .	405
J. Janicki, J. Skupin, A. Giec — Stan badań nad kwasem pangamowym (witaminą B <sub>15</sub> ) . . . . .	421
J. Hutny — Metabolizm glikogenu i mechanizmy jego regulacji . . . .	431
M. J. Piechowska, Z. Sienkiewicz, M. Bielińska — Hormony metamorfozy owadów . . . . .	449
Recenzje książek (J. Heller, W. J. Pajor, J. Skierczyńska, Z. Zielińska, T. Gołaszewski) . . . . .	483
XII Szkoła Letnia FEBS w Halle, NRD (A. Rychter) . . . . .	493

W 4-tym zeszycie 16-tego tomu ukażą się:

1. Funkcja metaboliczna cytochromu P-450, *K. Staroń*
2. Drogi przemian metyloglioksalu w organizmach żywych, *A. M. Konecka, J. Rytko*
3. Biochemiczne właściwości kalcytoniny, *R. Lorenc*
4. Zmiany wyrównawcze w nerce po jednostronnej nefrektomii, *M. Ombach*
5. Rozdział kwasu rybonukleinowego na żelach poliakrylamidowych, *J. Wójcicki*
6. Automatyzacja badań w chemii klinicznej i elektroniczne przetwarzanie wyników, *J. Krawczyński*
7. Od nukleiny do DNA, *W. Ostrowski*



## POSTĘPY BIOCHEMII

July 1970

### ARTICLES IN POLISH

Volume 16

Number 3

T. Baranowski — Relation Between the Protein Structure and Function (Dep. Physiol. Chem. Med. School, Wrocław) . . . . .	319
L. Kłyszejko-Stefanowicz, J. Bartkowiak — The Biological Activity of Histones (Dep. Gen. Biochem. Univ., Łódź) . . . . .	347
L. Myszkowski — Protein Denaturation as a Structural Modification of its Molecules (Exptl. Biochem. Lab. II Gynecol. Clin., Med. School, Warszawa) . . . . .	389
R. Dąbrowska, W. Drabikowski — Regulation of Contraction-Relaxation Cycle in the Skeletal Muscle (Dep. Biochem. Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	405
J. Janicki, J. Skupin, A. Giec — The Actual State of Research on Pangamic Acid (Vitamin B <sub>15</sub> ) (Dep. Agricult. Technol. High School Agricult., Poznań) . . . . .	421
J. Hutny — The Glycogen Metabolism and Its Regulatory Mechanisms (Dep. Biochem. Vet. Fac. High School Agricult., Wrocław) . . . . .	431
M. J. Piechowska, Z. Sienkiewicz, M. Bielińska — Hormones of Insect Metamorphosis (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	449
Chronicle . . . . .	483









Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793 (1953). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., Podręcznik Biochemii, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np. Schneider W.C., w Methods in Enzymology, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.

## SPIS TREŚCI

T. Baranowski — Zależność między budową a funkcją białek . . . . .	319
L. Kłyszejko-Stefanowicz, J. Bartkowiak — Biologiczna aktywność histonów . . . . .	347
L. Myszkowski — Denaturacja białka jako zmiana jego struktury . . . . .	389
R. Dąbrowska, W. Drabikowski — Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych . . . . .	405
J. Janicki, J. Skupin, A. Giec — Stan badań nad kwasem pangamowym (witaminą B <sub>15</sub> ) . . . . .	421
J. Hutny — Metabolizm glikogenu i mechanizmy jego regulacji . . . . .	431
M. J. Piechowska, Z. Sienkiewicz, M. Bielińska — Hormony metmorfozy owadów . . . . .	449
Recenzje książek (J. Heller, W. J. Pajor, J. Skierczyńska, Z. Zielińska, T. Gołaszewski) . . . . .	483
XII Szkoła Letnia FEBS w Halle, NRD (A. Rychter) . . . . .	493