P.939

Post. biochem.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

POSTĘPY BIOCHEMII

KWARTALNIK

TOM XI 1965 ZESZYT 3

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM XI 1965 ZESZYT 3

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

http://rcin.org.pl

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor — Irena Chmielewska

Sekretarz — Witold Brzeski

ADRES REDAKCJI

KATEDRA BIOCHEMII UW

Warszawa 22, Al. Żwirki i Wigury 6

tel. 22-30-51, wewn. 46

P. 1310

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1964

Nakład 1330 (1203+127)	Oddano do składania 22.IV.1965 r.
Ark. wyd. 10,25. Ark. druk. 9,25	Podpisano do druku w lipcu 1965 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono w lipcu 1965 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 645/65. E-54

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ. WARSZAWA.

http://rcin.org.pl

P O S T Ę P Y B I O C H E M I I

TOM XI 1965 ZESZYT 3

*STELLA NIEMIERKO**

Występowanie i właściwości esterazy acetylocholinowej**

Distribution and Characteristics of Acetylcholinesterase

The distribution of AChE in the tissues of various animals, and the activity of the enzyme in subcellular fractions are reviewed. Some characteristics of the active sites of the enzyme are discussed.

Naturalnym substratem esterazy acetylocholinowej (acetylohydrolazy acetylocholinowej, EC. 3.1.1.7), enzymu występującego głównie w tkance nerwowej i w czerwonych ciałkach krwi, jest acetylocholina. Inne estry cholinowe i niecholinowe są również rozkładane przez ten enzym, ale z mniejszą szybkością. Pomimo słabo zaznaczonej specyficzności względem substratu omawiany enzym nosił przez wiele lat nazwę cholinesterazy specyficznej lub prawdziwej czy też cholinesterazy I, w przeciwstawieniu do obecnej w osoczu krwi pseudocholinesterazy, która również rozkłada acetylocholinę, lecz hydrolizuje z większą szybkością inne estry cholinowe. Aktywność obu wymienionych rodzajów esteraz cholinowych hamowana jest przez eserynę w stężeniu 10^{-5} M, co jest jedną z cech odróżniających je od innych esteraz, wrażliwych dopiero na wyższe stężenie eseryny. Według obecnie przyjętej nomenklatury potoczne nazwy poszczególnych esteraz cholinowych oznacza się odpowiednio do substratu, który rozkładają najszybciej (np. esteraza acetylo-, butyrylo- bądź benzoilocholinowa).

Esteraza acetylocholinowa przyciągała zainteresowanie badaczy różnych pogranicznych dziedzin nauki. Liczba prac ogłoszonych na temat tego enzymu jest olbrzymia i z roku na rok wciąż się powiększa (por. 8, 37). Dzięki wspólnym wysiłkom biochemików, neurofizjologów i farmakologów zbadano występowanie tego enzymu w świecie zwierzęcym, jego lokalizację tkankową i wewnątrzkomórkową. Ponadto za pomocą subtelnych metod biochemicznych scharakteryzowano enzym pod względem właściwości kinetycznych, co umożliwiło w znacznym stopniu zdanie so-

* Prof. dr, samodzielny pracownik naukowy Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

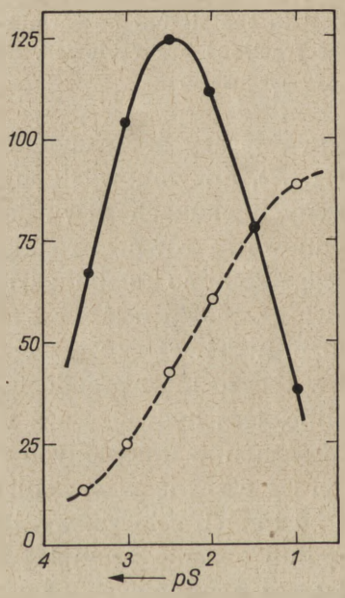
** Stosowane symbole: DFP — dwuizopropylofluorofosforan.

http://rcin.org.pl

bie sprawy z wydolności (*in vivo*) enzymu przy rozkładzie acetylocholiny. Jak wiadomo acetylocholina jest mediatorem w transmisji nerwowo-mięśniowej i w wielu przypadkach międzyneuronowej. Ze względów funkcjonalnych jest ważne, ażeby nadmiar acetylocholiny został szybko rozłożony.

I. Wykrywanie i oznaczanie aktywności

Jak podano wyżej jedną z charakterystycznych cech esterazy acetylocholinowej jest jej zdolność do szybszej hydrolizy acetylocholiny niż innych estrów cholinowych; spośród estrów tiocholinowych także najszybciej rozkładany jest octanowy. Jeśli chodzi o estry niecholinowe, to estry octanowe są hydrolizowane również szybciej od innych.



Rys. 1. Wpływ stężenia substratu na aktywność esterazy acetylocholinowej (linia ciągła) i esterazy butyrylocholinowej (linia przerywana) w µl CO_2/30 min. wg Augustinssona (5)

Substrat — acetylocholina; preparat esterazy acetylocholinowej z narządu elektrycznego *Electrophorus*, esteraza butyrylocholinowa — preparat z osocza krwi ludzkiej

Drugą cechą odróżniającą esterazę acetylocholinową od innych esteraz cholinowych jest to, że wysokie stężenie substratu hamuje jej aktywność. Optimum stężenia acetylocholiny przypada na około 3×10^{-3} M, przy wykreśleniu więc zależności pomiędzy szybkością hydrolizy substratu a ujemnym logarytmem jego stężenia (p*S*) otrzymuje się charakterystyczną krzywą w kształcie dzwonu z wyraźnym maksimum, natomiast krzywa wyrażająca tę samą zależność dla esterazy butyrylocholinowej z osocza krwi nie wykazuje tego maksimum (rys. 1).

http://rcin.org.pl

Różnice we właściwościach obydwóch esteraz cholinowych wyraźnie występują w preparatach przynajmniej częściowo oczyszczonych. Przy badaniach homogenatów zawierających mieszaninę różnych esteraz wynik jest wypadkową ich działania i dlatego może być mniej wyraźny.

Trzecią cechą, która może służyć do odróżnienia poszczególnych esteraz cholinowych, jest ich wrażliwość na niektóre inhibitory, zwłaszcza zawierające w cząsteczce dwa ugrupowania z azotem czterowiązalnym lub niektóre związki fosforoorganiczne, które ze względu na swoje działanie noszą nazwę czynników antycholinesterazowych. Na przykład dwuizopropylofluorofosforan (DFP) całkowicie hamuje czynność esterazy butyrylocholinowej już w stężeniu 10^{-8} M, natomiast dla zahamowania aktywności esterazy acetylocholinowej potrzebny jest w stężeniu 10^{-4} M (36, 41). Stosowanie więc różnych substratów i inhibitorów umożliwia oznaczenie aktywności esterazy acetylocholinowej w homogenatach tkanek nawet w obecności esterazy butyrylocholinowej, niemniej jest to obarczone pewnym błędem ze względu na to, że nie ma ani bezwzględnej specyficzności esteraz cholinowych wobec substratu ani wybiórczego hamowania ich przez inhibitory. Najbardziej specyficznym substratem dla esterazy acetylocholinowej jest acetylo-β-metylocholina (42); stosowanie jej przy oznaczaniu aktywności tego enzymu w obecności innych esteraz cholinowych jest najbardziej bezpieczne. Jednakże wymieniony substrat jest wolniej rozkładany przez esterazę acetylocholinową niż acetylocholina, utrudnia więc to pomiary przy oznaczeniach w tkankach, które wykazują słabą aktywność enzymatyczną.

Metod ilościowego badania aktywności esterazy acetylocholinowej opracowanych jest bardzo dużo i ogłoszonych jest szereg artykułów przeglądowych na ten temat (6, 7, 8). Przy zastosowaniu acetylocholiny jako substratu, aktywność enzymatyczną określa się bądź z ilości powstającego kwasu octowego, bądź też z oznaczenia ilości acetylocholiny, która nie ulega rozpadowi w czasie inkubacji. Ilość uwalnianego kwasu octowego można oznaczyć: 1) miareczkowo, 2) ze zmian *pH* i 3) z ilości CO_2 wypieranego przez kwas octowy z dwuwęglanu, np. metodą Warburga lub metodą nurków Kartezjusza. Ostatnia metoda pozwala na oznaczanie aktywności w pojedynczych komórkach (27); stosując elektromagnetyczne nurki Kartezjusza określono aktywność enzymu w oddzielnych płytkach nerwowomięśniowych (12).

Oznaczanie ilościowe acetylocholiny przeprowadza się bądź za pomocą testów biologicznych, bądź też kolorymetrycznie według H e s t r i n e'a (31). Przy użyciu acetylotiocholiny jako substratu można łatwo oznaczyć ilość uwalnianych podczas inkubacji grup SH — jodometrycznie (43) lub kolorymetrycznie (24).

http://rcin.org.pl

II. Występowanie w świecie zwierzęcym

W badaniach nad występowaniem esterazy acetylocholinowej w różnych tkankach ogromne usługi oddały metody histo- i cytochemiczne. Piśmiennictwo dotyczące tego zagadnienia jest ogromne i w tym miejscu nie może być szczegółowo omawiane; jest ono zebrane w szeregu opracowań monograficznych (por. 17, 35, 37). Należy przy tym zaznaczyć, że szczególnie dużo jest prac nad rozmieszczeniem esterazy acetylocholinowej w układzie nerwowym.

Dzięki ulepszaniu metod cytochemicznych, zastosowaniu w nich inhibitorów znakowanych trytem (48), oraz dzięki postępom mikroskopii elektronowej (50, 54) coraz dokładniej udaje się zlokalizować esterazę acetylocholinową w komórce. Wykazano, że jej aktywność w poszczególnych częściach neuronu jest różna: intensywna aktywność w ciele komórki (perikarionie) i na zakończeniach nerwowych, natomiast znacznie słabsza w aksonie. Z obrazów mikroskopowych można wnioskować, że komórki Schwanna, otaczające włókna nerwowe, wcale nie posiadają esterazy acetylocholinowej (13. 53).

Za pomocą metod frakcjonowanego wirowania homogenatów z mózgu wykazano obecność esterazy acetylocholinowej we frakcji mikrosomów i mitochondriów (2, 28, 33, 47). Jednakże wnikliwe badania Whittakera (55) wykazały, że enzymu tego w mitochondriach najprawdopodobniej nie ma. Poddał on bowiem dalszemu rozdziałowi frakcję mitochondriów z homogenatu tkanki mózgowej na kilka subfrakcji i stwierdził, że jedna z nich, która zawierała „urwane" zakończenia nerwowe (*pinched-off nerve endings*), była szczególnie bogata w esterazę acetylocholinową (22). W niedawno ogłoszonej pracy Whittaker i współpracownicy (56) podali wyniki dalszego rozdzielenia w gradiencie stężeń subfrakcji zawierającej „urwane" zakończenia nerwowe z mózgu. Nazwali je *synaptosomami* dla podkreślenia ich związku z synapsami i dla zaznaczenia, że cząstki te stanowią subkomórkowe organelle. Okazało się, że w skład synaptosomów wchodzą pęcherzyki synaptyczne, mitochondria, błony post-synaptyczne oraz mikrosomy. Wszystkie te struktury opisano pod względem morfologicznym za pomocą mikroskopii elektronowej i zbadano w nich aktywność niektórych enzymów, zwłaszcza zaś lokalizację poszczególnych członów układu: acetylocholiny, transferazy acetylocholinowej i esterazy acetylocholinowej. Największą aktywność esterazy acetylocholinowej wykryto w mikrosomach. Występuje ona tylko w błonach frakcji mikrosomalnej, natomiast nie wykryto jej obecności w ziarnistościach (1).

Szczegółowe rozmieszczenie esterazy acetylocholinowej we frakcjach komórkowych zbadano dotychczas tylko w homogenatach z mózgu, natomiast w innych narządach oznaczono jedynie aktywność w całych homogenatach. Zestawienie danych z piśmiennictwa, które by były ze

http://rcin.org.pl

Tablica 1

Aktywność esterazy acetylocholinowej w homogenatach z narządów różnych zwierząt

Narząd	Zwierzę	Aktywność w μmolach rozłożonej acetylocholiny/ 1 godz./ 1 g*	Literatura
Mózg	Szczur	1500	5
	Świnka morska	600 — 700	46
	Wróbel	2000	5
	Żaba	250 — 500	46
	Żółw	530	5
Jądro ogoniaste	Ssaki	1500	5
Rdzeń przedłużony i mózg	Minóg	75	11
Głowa	*Calliphora*	2240	11
Zwój szyjny	Kot	500	41
Nerwy obwodowe	Kot, pies	30 — 100	41
Nerw sympatyczny	Kot	350	41
Zwój głowowy	Sepia	15 000 — 30 000	5
Mięśnie	Szczur	50 — 150	46
	Jaszczurka	220	5
	Dżdżownica	1000	5
Czerwone krwinki**	Człowiek	158	4
	Świnka morska	40 — 54	4,15
	Pies	35	15
	Szczur	14	15
	Kura	0	4,15
Narząd elektryczny	*Electrophorus electricus*	13 000 — 25 000	46
Jad	Kobra	500 — 1500	5

* Dane przeliczone i zaokrąglone.
** W obliczeniu na 1 ml krwi.

sobą porównywalne, napotyka na dość duże trudności, ponieważ warunki pomiarów prowadzonych przez poszczególnych badaczy (rodzaj i stężenie substratu, *pH*, temperatura, czas inkubacji, stosowana metodyka), bardzo się różnią. Dlatego też wartości podane w tablicy 1 mają tylko charakter orientacyjny, chociaż zostały odpowiednio przeliczone dla ich ujednolicenia.

Jak widać z tablicy aktywność esterazy acetylocholinowej waha się w dużych granicach nawet w tym samym narządzie u przedstawicieli różnych gatunków zwierzęcych. Na ogół wysoki poziom aktywności omawianego enzymu występuje w ośrodkowym układzie nerwowym, nato-

http://rcin.org.pl

miast w nerwach obwodowych jest on znacznie niższy. Na podkreślenie zasługuje fakt dużej aktywności esterazy acetylocholinowej spotykanej u bezkręgowców. Jednakże trudno jest sądzić na zasadzie dotychczasowych danych, czy można utożsamiać esterazę acetylocholinową zwierząt wyższych z esterazą cholinową bezkręgowców. Pomimo bowiem licznych badań prowadzonych nad esterazami cholinowymi u owadów, głównie w związku z insektycydami (por. 14) brak jest oczyszczonych preparatów enzymatycznych z owadów (do nielicznych wyjątków należy częściowo oczyszczona esteraza acetylocholinowa z *Calliphora,* (21)).

Szczególnie dużą aktywnością esterazy acetylocholinowej odznacza się narząd elektryczny występujący u niektórych ryb. Jeśli wziąć pod uwagę, że narząd ten u *Electrophorus* zawiera aż 93% wody i zaledwie 2% białka, to łatwo można sobie uświadomić jak dobrym jest on źródłem do otrzymania oczyszczonego preparatu enzymatycznego.

III. Własności

W tablicy 2 zestawiono niektóre dane o oczyszczonych preparatach esterazy acetylocholinowej pochodzących z różnych źródeł.

Tablica 2

Aktywność właściwa preparatów esterazy acetylocholinowej pochodzącej z różnych tkanek zwierzęcych

Tkanka	Zwierzę	Stopień oczyszczania (ilość razy)	Wydajność %	Literatura
Erytrocyty	Człowiek	100	10 — 20	16
„	Wół	250 — 400		18
Narząd elektr.	*Electrophorus*	75	15	46
Jad żmiji	Kobra	20	21	61

Jak wiadomo dla przeprowadzenia charakterystyki biochemicznej enzymu niezbędny jest możliwie jak najlepiej oczyszczony preparat enzymatyczny. Nic więc dziwnego, że najszczegółowiej opracowano esterazę acetylocholinową pochodzącą z narządu elektrycznego *Electrophorus* i że wiele danych, które wyjaśniają mechanizm działania tego enzymu, zawdzięcza się pracowni Nachmansohna i Wilsona, z której pochodzi ten najczystszy preparat esterazy acetylocholinowej. Dane tyczące się masy cząsteczkowej esterazy acetylocholinowej wahają się zależnie od sposobu oznaczenia i od czystości preparatu. Według Rothenberga i Nachmansohna (49) masa cząsteczkowa tego enzymu, oznaczona

http://rcin.org.pl

za pomocą szybkości sedymentacji w ultrawirówce, w najczystszym z dotychczas otrzymanych preparatów z narządu elektrycznego *Electrophorus* — wynosi 2×10^6, cząsteczka zaś zawiera 48 centrów aktywnych. Późniejsze badania (39) wskazały, że masa cząsteczki jest wyższa — 12×10^6. Serlin i Fluke (52), którzy swój preparat, również pochodzący z *Electrophorus electricus*, poddawali działaniu elektronów, protonów i cząsteczek α, obliczyli, że tak zwana minimalna masa cząsteczkowa esterazy acetylocholinowej, to jest odpowiadająca tylko jednemu centrum aktywnemu, wynosi 105 000, a więc około dwukrotnie więcej niż obliczona z danych Nachmansohna i Rothenberga ($2 \times 10^6 : 48 =$ $= 45\,000$). Serlin i Fluke przyjęli, że kształt cząsteczki enzymu jest cylindryczny i obliczyli, że długość cząsteczki odpowiadającej 1 centrum aktywnemu wynosi 360 Å, średnica zaś 21 Å. Według danych innych autorów (39), tzw. minimalna masa cząsteczki wynosi 250 000. Ponieważ duża cząsteczka esterazy acetylocholinowej łatwo ulega dysocjacji na fragmenty obdarzone w dalszym ciągu aktywnością enzymatyczną, nasuwa więc to przypuszczenie, że cząsteczka tego enzymu składa się z licznych podjednostek (58).

Bernsohn i współpracownicy (9) poddając elektroforezie homogenat z mózgu ludzkiego otrzymali 3 pasma, w których można było wykryć aktywność esterazy acetylocholinowej. Na zasadzie swych wyników autorzy ci wysuwają przypuszczenie, że w czasie procedury mogły się wytworzyć mniejsze lub większe agregaty podjednostek o właściwościach katalitycznych; otrzymane elektroforegramy nie świadczyłyby więc o istnieniu trzech różnych podjednostek enzymatycznych esterazy acetylocholinowej.

Rothenberg i Nachmansohn (49) z danych charakteryzujących aktywność właściwą swego preparatu obliczyli, że aktywność cząsteczkowa esterazy acetylocholinowej wynosi 3×10^7. W ciągu 1 sekundy 1 cząsteczka enzymu hydrolizuje więc 500 000 cząsteczek substratu. Stawia to esterazę acetylocholinową w rzędzie najbardziej aktywnych enzymów — aktywniejszych nawet od katalazy.

Dokładniejsze scharakteryzowanie stopnia aktywności esterazy acetylocholinowej na jedno centrum katalityczne stało się możliwe dopiero po bardziej precyzyjnym niż wykonane przez Nachmansohna oznaczeniu liczby centrów czynnych w cząsteczce. Przyjmując założenie, że jedna cząsteczka DFP, nieodwracalnego inhibitora esterazy acetylocholinowej, łączy się z jednym centrum aktywnym tego enzymu, Michel i Krop (44) zastosowali do badań $DF^{32}P$ i z ilości fosforu promieniotwórczego połączonego z białkiem enzymatycznym mogli obliczyć liczbę centrów aktywnych swego preparatu. Z danych tych wynika, że jedno centrum aktywne rozkłada w ciągu jednej minuty $7{,}2 \times 10^5$ cząsteczek acetylocholiny. Cohen i Warringa (19), biorąc pod uwagę, że DFP mógłby

http://rcin.org.pl

fosforylować i inne grupy esterazy acetylocholinowej poza centrum aktywnym, wprowadzili modyfikację postępowania Michela i Kropa, która następnie była stosowana w różnych wersjach przez innych autorów przy badaniach enzymatycznych (por. 17). Cohen i Warringa zablokowali centrum aktywne enzymu pochodzącego z erytrocytów przez butyrylocholinę, która działa jak inhibitor kompetycyjny. Następnie enzym został poddany działaniu DFP, z którym połączyły się wszystkie poza grupami uprzednio zablokowanymi grupy białka enzymatycznego zdolne do reagowania z DFP. Nadmiar inhibitora i butyrylocholinę usunięto całkowicie przez dializę, uzyskano wówczas enzym o wyjściowym poziomie aktywności. Wskazywało to, że esteraza acetylocholinowa otrzymana po tych wszystkich manipulacjach ma czynne, odblokowane centra aktywne. Wówczas podziałano na nią $DF^{32}P$. W ten sposób tylko centra aktywne zostały połączone z fosforem promieniotwórczym. Obliczona na zasadzie tych wyników aktywność centrum katalitycznego esterazy acetylocholinowej z czerwonych krwinek wyniosła 3×10^5 w t 37°, a więc tylko nieco mniej niż podana przez Michela i Kropa dla esterazy acetylocholinowej z narządu elektrycznego *Electrophorus*. Stosując jako inhibitor fluorek dwumetylokarbamylu Wilson i Harrison (59) otrzymali dla preparatu enzymatycznego z *Electrophorus* wartość $7,4 \times 10^5$ w t 25° przy optymalnym stężeniu acetylocholiny $2,5 \times 10^{-3}$ M. Prawie taką samą wartość (6×10^5) uzyskała Lawler (40) przy zablokowaniu centrów aktywnych za pomocą ^{32}P-tetraetylopirofosforanu po uprzedniej inkubacji preparatu enzymatycznego z substratem.

Z danych charakteryzujących aktywność centrów katalitycznych esterazy acetylocholinowej można obliczyć czas, w którym rozkładana jest przez enzym jedna cząsteczka acetylocholiny. Czas ten wynosi zaledwie 80—100 μsek.

Nasuwa się bardzo istotny problem, jakie musi być stężenie esterazy acetylocholinowej, ażeby zdążyła ona rozłożyć acetylocholinę wyzwoloną pod wpływem impulsu nerwowego przed następnym impulsem. Próbę odpowiedzi na takie pytanie przeprowadzili Wilson i Harrisson (59). Biorąc pod uwagę, że stężenie acetylocholiny na zakończeniach nerwowych musi być mniejsze niż stała Michaelisa esterazy acetylocholinowej (10^{-4} M), następnie posiłkując się danymi z kinetyki hydrolizy acetylocholiny przez enzym oraz uwzględniając, że częstotliwość impulsów nerwowych jest rzędu 1000 razy na sekundę, obliczyli oni, że postulowane stężenie enzymu winno wynosić nie mniej niż 5×10^{-6} M. Stężenie takie w ograniczonych częściach płytki nerwowomięśniowej, jak się wydaje, jest możliwe do przyjęcia.

Jak już zaznaczono, dotychczas w sposób tak dokładny była badana tylko esteraza acetylocholinowa z narządu elektrycznego i czerwonych krwinek. Jedną z głównych przyczyn tego jest trudność otrzymania z in-

http://rcin.org.pl

nych źródeł wystarczającej ilości czystego preparatu. Większość więc oznaczeń przeprowadzono na preparatach mało oczyszczonych, bądź też nawet na homogenatach. Dlatego też dane te nie mogą służyć do porównania z wartościami przedstawionymi dla esterazy acetylocholinowej z narządu elektrycznego i czerwonych krwinek. Ostatnio Brik i Jakowlew (11), stosując inhibitory fosforoorganiczne oznaczyli aktywność w obliczeniu na 1 min. i jedno centrum aktywne esterazy acetylocholinowej z mózgu białej myszy, mózgu minoga, rdzenia żaby i głów *Calliphora erytrocephala*, uzyskując wartości bardzo zbliżone do siebie i wynoszące około 10^5. Uważają oni, że esterazy acetylocholinowe pochodzące z tkanki nerwowej zwierząt, wykazujących nawet znaczne różnice w rozwoju funkcjonalnym układu nerwowego, mało się pomiędzy sobą różnią: mają bowiem nie tylko zbliżoną aktywność, lecz również podobne i inne właściwości jak optimum stężenia substratu, optimum *pH* oraz wrażliwość na inhibitory. Wydaje się jednak, że przytoczone dane mogą być obarczone pewnym błędem; wprawdzie inhibitory w użytym przez Brika i Jakowlewa stężeniu praktycznie nie hamowały czynności innych esteraz, to jednak brak jest dowodów, że nie reagowały z innymi białkami obecnymi w homogenatach. Tym niemniej ogólny wniosek autorów może być słuszny. Spotyka się również pogląd, że esterazy acetylocholinowe pochodzące z różnych źródeł wykazują nieco odmienne właściwości (np. optimum stężenia substratu, wrażliwość na inhibitory), trudno jednak na razie powiedzieć, czy obserwowane różnice w niektórych właściwościach enzymu wywołane są cechami gatunkowymi lub tkankowymi, czy też zależą od domieszek zawartych w preparatach enzymatycznych lub homogenatach (7, 29, 34).

Należy jeszcze wspomnieć, że są w piśmiennictwie dane wskazujące na preferencję preparatów esterazy acetylocholinowej (z narządu elektrycznego *Electrophorus, Torpedo marmorata* i czerwonych krwinek) w stosunku do stereoizomerów acetylocholinowych, np. rozkładany jest tylko jeden (D) enancjomer acetylo-β-metylocholiny i laktoilocholiny (3,8). W związku z tym istnieje pogląd, że na powierzchni enzymu występuje asymetryczne centrum, które ułatwiałoby hydrolizę tylko jednej formy substratu.

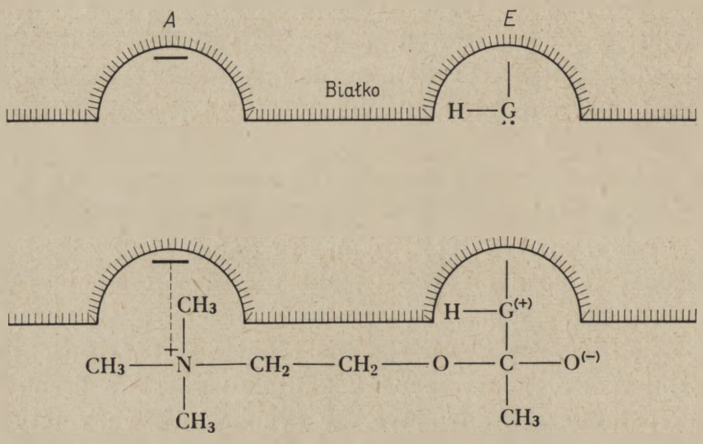
IV. Mechanizm działania

Badania nad kinetyką hydrolizy różnych substratów przez esterazę acetylocholinową oraz działanie szeregu odwracalnych inhibitorów kompetycyjnych oraz nieodwracalnych (w pierwszym rzędzie związków fosforoorganicznych) wyjaśniły w znacznym stopniu mechanizm działania tego enzymu.

http://rcin.org.pl

Obecnie przyjmuje się dzięki pracom całego szeregu badaczy (por. 17, 58), że enzymatyczna hydroliza acetylocholiny zachodzi na skutek istnienia w esterazie acetylocholinowej co najmniej dwóch oddzielnych podcentrów katalitycznych: centrum estrowego i anionowego.

Struktura tych centrów nie została dotychczas wystarczająco wyjaśniona i modele proponowane przez różnych badaczy mają charakter hipotetyczny i wciąż jeszcze dyskusyjny. Według powszechnie przyjętych poglądów (23, 58) centrum estrowe, dzięki któremu zachodzi hydroliza substratu, składa się z dwóch grup: zasadowej, „nukleofilnej" i kwasowej „elektrofilnej". Łączenie się acetylocholiny z enzymem przedstawiono na schemacie 1.

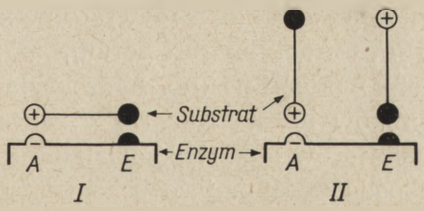


Schemat 1. Schemat centrum katalitycznego esterazy acetylocholinowej i tworzenie kompleksu enzym-substrat wg Wilsona (57). A — podcentrum anionowe, E — podcentrum estrowe, G — grupa zasadowa.

Zachodziłoby ono na skutek: 1) wiązania jonowego pomiędzy ujemnie naładowanym centrum anionowym a dodatnio naładowanym atomem azotu reszty cholinowej, 2) przyciągania siłami van der Waalsa grup metylenowych estru przez niepolarną część centrum anionowego, 3) słabego wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupą zasadową centrum estrowego i węglem karbonylowym acetylocholiny.

Obecność dwóch podcentrów w esterazie acetylocholinowej była postulowana już w 1943 roku (60), bowiem w ten sposób można było wytłumaczyć charakterystyczne dla tego enzymu hamowanie aktywności przez wysokie stężenie substratu; w takich warunkach jest duże prawdopodobieństwo, że podcentrum anionowe połączy się z jedną cząsteczką substratu, podcentrum estrowe zaś — z drugą i żadna z cząsteczek substratu nie ulegnie hydrolizie (schemat 2).

http://rcin.org.pl



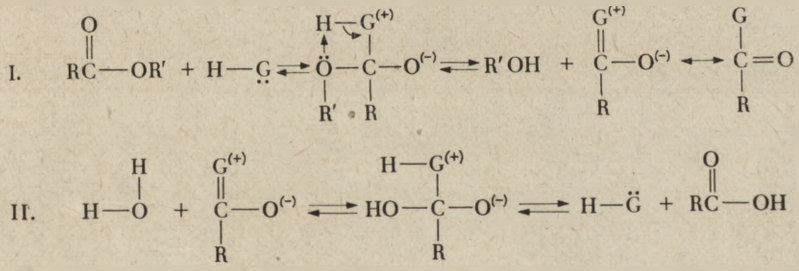
Schemat 2. Schemat hamowania aktywności enzymu przez wysokie stężenie substratu przy założeniu istnienia dwóch podcentrów katalitycznych. (wg Zellera i Bissegera, 60). A — podcentrum anionowe, E — podcentrum estrowe. I — powstawanie kompleksu enzym — substrat w normalnych warunkach. II — nadmiar substratu hamuje tworzenie kompleksu.

Jako najbardziej prawdopodobny przebieg hydrolizy acetylocholiny przez esterazę acetylocholinową, jak się sądzi właściwy również i innym esterazom, przyjmuje się tworzenie pośredniego produktu, acetylowanego enzymu, który pod wpływem cząsteczki wody rozpada się na enzym i kwas octowy (schemat 3).

$$E + S \overset{K_{+1}}{\underset{\longleftarrow}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_{+2}} (E\text{-acyl}) + \text{alkohol} \xrightarrow[H_2O]{K_{+3}} E + \text{kwas octowy} + \text{alkohol}$$

Schemat 3. Schemat enzymatycznej hydrolizy estru

Zachowując sposób oznaczania centrów aktywnych esterazy acetylocholinowej przez Wilsona można przedstawić hydrolizę acetylocholiny według schematu 4.



Schemat 4. Mechanizm hydrolizy estru przez enzym wg Wilsona (57). HG — podcentrum estrowe. I) wytworzenie acylowanego enzymu i odłączenie alkoholu. II) Pod wpływem cząsteczki wody z acylowanego enzymu uwalnia się enzym i kwas octowy.

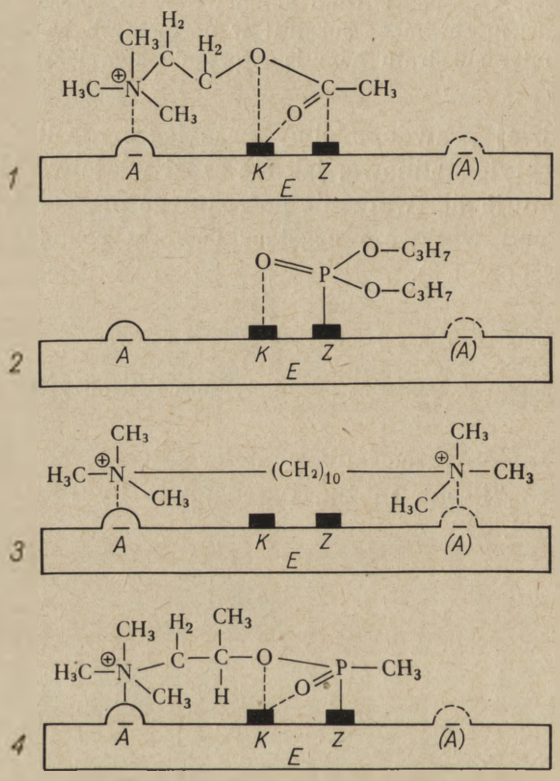
Jakkolwiek dotychczas nie udało się jeszcze wyizolować pośredniego, prawdopodobnie niezwykle labilnego, acylowanego enzymu powstającego przy reakcji z esterazą acetylocholinową — udało się to jednak w przypadku innej esterazy (59).

Z proponowanym schematem daje się dobrze pogodzić szereg danych eksperymentalnych (20) np. wymiana $^{18}O_2$ pomiędzy cząsteczką wody

http://rcin.org.pl

a kwasem octowym, zahamowanie nieodwracalne enzymu przez fosforany alkilowe (np. DFP, tetraetylopirofosforan), jak również reaktywacja enzymu przez czynniki nukleofilne (np. hydroksylamina, pirydyna).

Na podstawie wyników licznych badań w zakresie właściwości różnych substratów i inhibitorów oraz współdziałania z nimi esterazy acetylocholinowej można podać następujące schematy połączeń enzym-substrat i enzym-inhibitor (schemat 5) wykorzystując przy tym zestawienie Cohena i Oosterbaana (17).



Schemat 5. Schematy kompleksów esterazy acetylocholinowej z substratem (1) i z inhibitorami: DFP (2); z decamethonium — o 2 atomach N czterowiązalnego (3); z grupy fluorofosforylocholin (4). Na podstawie Cohena i Oosterbaana, (17). A — podcentrum anionowe; E — podcentrum estrowe; K — grupa kwaśna, Z — grupa zasadowa.

Najważniejszymi osiągnięciami, które mogłyby w znacznym stopniu ułatwić wyjaśnienie mechanizmu działania esterazy acetylocholinowej byłyby, podobnie jak i dla innych enzymów, chemiczna identyfikacja grup wchodzących w skład centrum aktywnego, ich przestrzenne ułożenie i znajomość grup chemicznych położonych blisko centrum aktywnego. Dotychczas poznano jednak zaledwie drobny ułamek właściwości enzymu, który nie pozwala jeszcze na ugruntowanie wysuwanych hipotez.

http://rcin.org.pl

Jak wiadomo aktywność prawie wszystkich enzymów zależy od *pH*. Tę zależność można wytłumaczyć przyjmując, że enzym posiada grupy jonizujące i że tylko w ograniczonej liczbie stanów ich zjonizowania może on spełniać funkcje katalityczne. Dla esterazy acetylocholinowej pK_a wynosi około 6-7 i około 9-10, co zgadza się z poglądem, że w centrum estrowym są 2 grupy: kwaśna i zasadowa. Ponieważ jedyną znaną grupą w białkach o pK_a w pobliżu pH 6-7 jest pierścień imidazolowy histydyny, nasuwa się przypuszczenie, że występuje on w podcentrum estrowym esterazy acetylocholinowej. Dotychczas brak jednak danych, które by bezpośrednio wskazywały na obecność pierścienia imidazolowego w centrum aktywnym tego enzymu (20, 58). Natomiast obecność seryny udało się wykazać bezpośrednio w badaniach nad esterazą acetylocholinową z czerwonych krwinek (17). Po zablokowaniu grup czynnych enzymu za pomocą $DF^{32}P$ przeprowadzono chromatografię produktów kwaśnej hydrolizy białka enzymatycznego i znaleziono ufosforylowaną serynę. Wydaje się, że obecność seryny w centrum aktywnym zarówno esterazy acetylocholinowej, jak i szeregu esteraz wrażliwych na DFP jest już pewna, pomimo że według niektórych badaczy fosforylacja seryny mogłaby być zjawiskiem wtórnym, wywołanym drastycznym postępowaniem przy hydrolizie.

Według Schaffera, Maya i Summersona (51) DFP reaguje wyłącznie z seryną znajdującą się w centrum aktywnym chymotrypsyny, natomiast nie fosforyluje innych reszt serynowych obecnych w tym białku. Ponadto wiadomo, że DFP nie reaguje ze zdenaturowaną chymotrypsyną. W związku z tym należy sądzić, że seryna znajdująca się w centrum aktywnym chymotrypsyny, jak i innych esteraz wrażliwych na DFP, w tym esterazy acetylocholinowej, musi mieć jakieś specjalne cechy, dzięki którym działa ona jako akceptor grup fosforylowych i acylowych (17, 23). Dotychczas nie udało się wyjaśnić na czym polega „reaktywność" seryny znajdującej się w centrum aktywnym. Próby tłumaczenia tego zjawiska są różne. Istnieje np. pogląd, że jest ona włączona w specjalną strukturę, tworząc pierścień oksazolinowy (Δ^2), o którym wiadomo, że może reagować z DFP. Inni przypuszczają, że jakieś grupy sąsiadujące z seryną dzięki specjalnemu ułożeniu przestrzennemu (np. pierścień imidazolowy histydyny) mogą wywoływać jej reaktywność (20). Wydaje się jednak, że pierścień imidazolowy jest zbyt słabą zasadą, ażeby móc wywołać aktywację seryny (10).

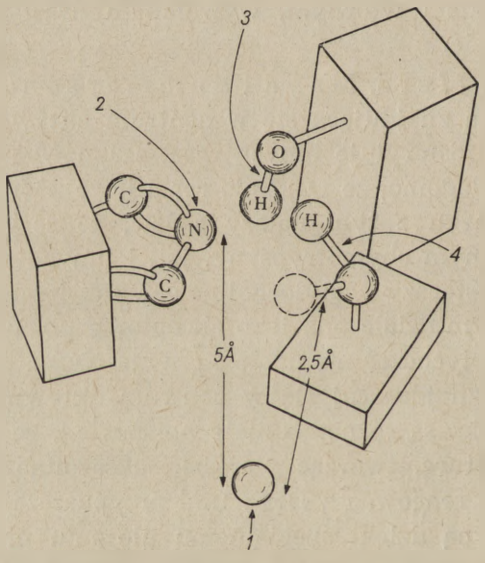
Badań dotyczących budowy centrum anionowego jest mniej; wysuwane są przypuszczenia, że w skład centrum anionowego wchodzą grupy β-karboksylowe kwasu asparaginowego lub γ-karboksylowe kwasu glutaminowego.

Friess i Baldridge (26) wykazali, że niektóre estry octanowe są lepszymi substratami dla esterazy acetylocholinowej niż acetylocho-

http://rcin.org.pl

lina; na podstawie tych wyników, jak również działania niektórych inhibitorów na czynność omawianego enzymu, przypuszczają oni, że odległość pomiędzy podcentrum anionowym i estrowym wynosi około 2,5 Å. Przy zastosowaniu innych inhibitorów Wilson (58) obliczył, że odległość ta jest większa (5 Å).

Krupka i Laidler (38), posiłkując się danymi z piśmiennictwa jak również własnymi wynikami badań kinetycznych, zaproponowali przestrzenny model centrum aktywnego esterazy acetylocholinowej (rys. 2). Model ten uwzględnia odległości grupy kwaśnej i zasadowej od podcentrum anionowego, podawane przez innych autorów, jak również wskazuje, że grupa wodorotlenowa seryny położona jest dalej od podcentrum anionowego niż pierścień imidazolowy. Rys. 3 przedstawia przestrzenny model połączenia enzym-substrat. Według tych autorów jednocześnie występuje rozerwanie 3 wiązań i powstanie 3 nowych, doprowadzające do wytworzenia labilnego produktu przejściowego, acetylowanego enzymu. Krupka i Laidler sugerują, że podobny model centrum aktywnego, tylko że bez podcentrum anionowego, można by zastosować do trypsyny i chymotrypsyny.

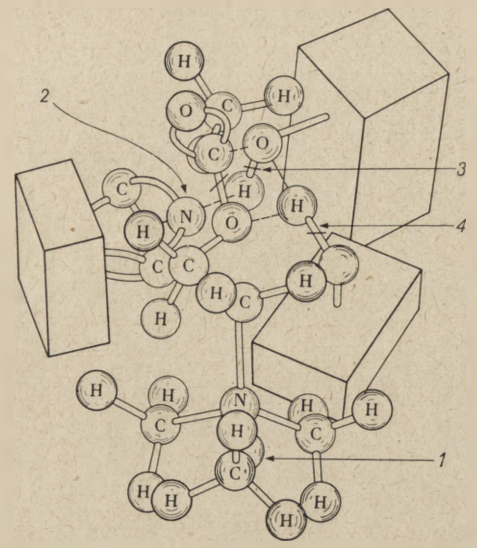


Rys. 2. Model grup funkcyjnych centrum aktywnego esterazy acetylocholinowej wg Krupki i Laidlera (38)

1 — podcentrum anionowe, 2 — grupa zasadowa (azot pierścienia imidazolowego), 3 — grupa wodorotlenowa seryny, 4 — grupa kwaśna

Na ogół przyjmuje się, że forma reaktywna seryny tkwi już w centrum aktywnym przed zadziałaniem substratu, lecz przeciw takiemu poglądowi wysuwane są zarzuty. Trudno wyjaśnić dlaczego czynna grupa seryny czekałaby na substrat lub inhibitor, a nie brała udziału w jakichś reakcjach ubocznych. W związku z tym wysunięto ostatnio nową hipo-

http://rcin.org.pl



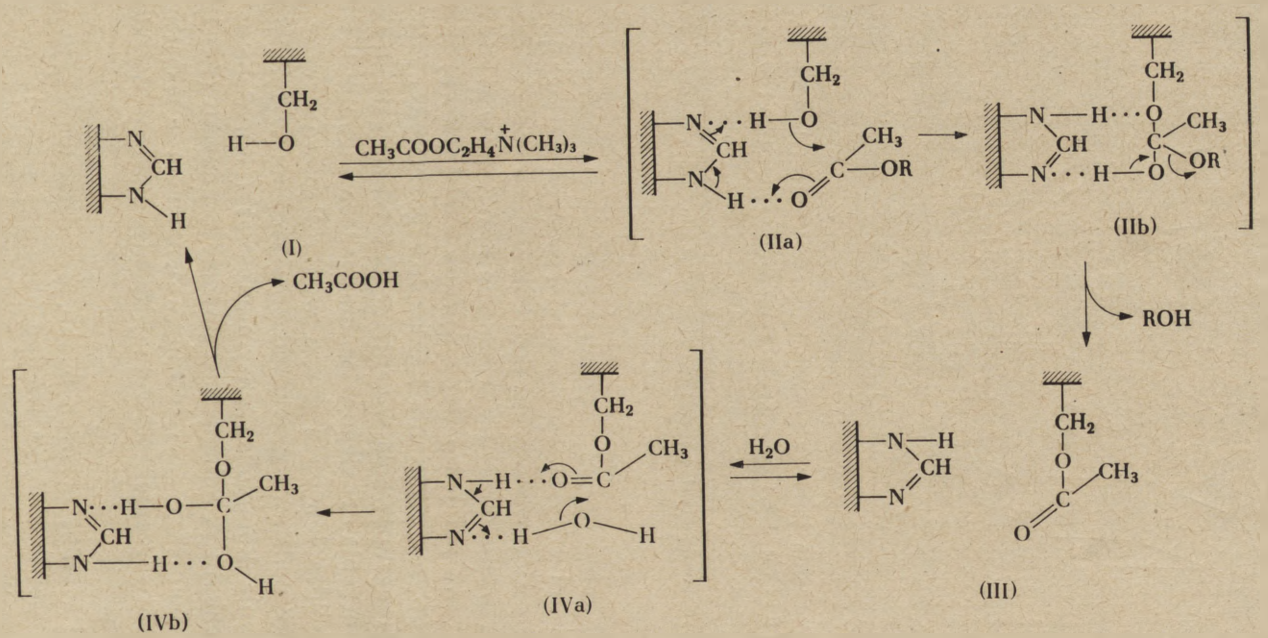
Rys. 3. Model połączenia esterazy acetylocholinowej z acetylocholiną wg K r u p k i i L a i d l e r a (38); oznaczenia grup funkcyjnych jak w rys. 2

Linie przerywane oznaczają przyciąganie elektrostatyczne oraz wiązania wytworzone podczas acetylacji. Pomiędzy atomem azotu imidazolowego a atomem węgla grupy karbonylowej zachodzi również przyciąganie elektrostatyczne. Trzy wiązania, które uległy rozerwaniu, zaznaczono przekreśleniem

tezę (10), w założeniu której przyjmuje się, że acetylocholina adsorbując się na powierzchni enzymu bierze udział w jego aktywacji, przy czym adsorpcja byłaby kierowana przez podcentrum anionowe enzymu. Według tej hipotezy, przedstawionej na schemacie 6, najpierw wytworzyłoby się wiązanie wodorowe pomiędzy tlenem grupy karbonylowej acetylocholiny a azotem iminowym pierścienia imidazolowego histydyny (IIa). Prowadziłoby to do przegrupowania w centrum aktywnym esterazy acetylocholinowej i wytworzenia drugiego wiązania wodorowego między aktywowanym azotem imidazolowym a grupą wodorotlenową seryny (IIa). Zjawisko to byłoby podstawą przekształcenia enzymu w formę aktywowaną i wytworzenia kompleksu enzym-substrat (IIb). Schemat ilustruje dalsze etapy reakcji: powstanie acetylowanego enzymu (III) i pośredniego połączenia pomiędzy acetylowanym enzymem a cząsteczką wody (IVa—IVb) i odtworzenie pierwotnej formy enzymu dzięki eliminacji kwasu octowego.

Reasumując wyniki licznych badań, przedstawionych tu w ogólnym zarysie, można powiedzieć, że według obecnego poglądu w czasie enzymatycznej hydrolizy acetylocholiny tworzy się jako związek pośredni bardzo labilny enzym acylowany przez substrat w centrum estrowym przy grupie wodorotlenowej seryny, natomiast sprawa przyczyn reaktywności tej grupy nadal jest dyskutowana.

http://rcin.org.pl



Schemat 6. Hydroliza acetylocholiny przez esterazę acetylocholinową wg hipotezy Breskina i Rozengarta (10). Objaśnienia w tekście.

http://rcin.org.pl

Jaka jest główna rola esterazy acetylocholinowej *in vivo*? Zagadnienie to, podobnie jak i w przypadku wielu innych enzymów, nie jest łatwe do rozwiązania. Wiadomo dobrze, że zdolność katalityczna oczyszczonych preparatów enzymatycznych *in vitro* nie przesądza, czy *in vivo* enzym ten nie może wykazywać jeszcze innej funkcji. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że rola esterazy acetylocholinowej nie ogranicza się do hydrolizy acetylocholiny przy transmisji nerwowo-mięśniowej. Nachmansohn (45, 46) i jego szkoła przyjmują, że esteraza acetylocholinowa związana jest również z przewodnictwem nerwowym, jednakże pogląd ten jest odosobniony i zwalczany przez wielu neurofizjologów i neurochemików, jak Feldberg (25), Hebb (30), Koelle (37). Występowanie esterazy acetylocholinowej w błonie czerwonych krwinek i w szeregu narządów czy tkanek (skóra płazów, skrzela krabów, macica itd.) nasuwało wielu badaczom przypuszczenie, że rola tego enzymu związana jest z przepuszczalnością błon.

Wykonano szereg doświadczeń, w których po zastosowaniu inhibitorów esterazy acetylocholinowej obserwowano zakłócenie procesu przepuszczalności błon. Wnioskowano stąd, że stało się to na skutek zablokowania czynności tego enzymu. Jednakże stosowane stężenie inhibitorów były tak duże, że obniżenie przepuszczalności dla jonów Na^+ mogłoby być również tłumaczone niespecyficznym działaniem inhibitorów, podobnym jak np. działanie narkotyków.

Na rolę acetylocholiny i esterazy acetylocholinowej w zjawiskach aktywnego transportu Na^+ i dodatnio naładowanych cząsteczek organicznych poprzez cykl kwasu fosfatydowego wskazują prace Hokin i Hokin (32). Sugerowany jest także udział esterazy acetylocholinowej w procesach transacylacji (17).

Jednakże należy podkreślić, że poza układem nerwowym, gdzie w znacznym stopniu została wyjaśniona rola acetylocholiny i enzymów ją syntetyzujących oraz rozkładających, znaczenie esterazy acetylocholinowej pomimo jej rozpowszechnienia nie jest dotychczas poznane.

LITERATURA

1. Albertson P. A., Hanzon V., Toschi H., *J. Ultrastructure Res.* **2**, 366 (1959).
2. Aldridge W. N., Johnson M. H., *Biochem. J.* **73**, 270 (1959).
3. Auditore J. V., Rama Sastry B. V., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 506 (1964).
4. Augustinsson K. B., *Acta physiol. scand.* **15**, Suppl. 52 (1948).
5. Augustinsson K. B., *Arch. Biochem.* **23**, 111 (1949).
6. Augustinsson K. B., Methods of biochemical Analysis, tom V., red. D. Glick, New York 1957, str. 43.
7. Augustinsson K. B., The Enzymes, tom IV, red. P. Boyer, H. Lardy K. Myrbäck, New York 1960, str. 521.

http://rcin.org.pl

8. Augustinsson K. B., Hndb. Exp. Pharmakol., tom XV, red. G. B. Koelle, Berlin 1963, str. 89.
9. Bernsohn J., Barron K. D., Hess A. R., *Nature* **195**, 285 (1962).
10. Breskin A. P., Rozengart E. V., *Nature* **205**, 388 (1965).
11. Brik I. L., Jakowlew W. A., *Biochimija* **27**, 993 (1962).
12. Brzin M., Zajicek J., *Nature* **181**, 625 (1958).
13. Cavanagh J. B., Thompson R. H. S., Webster G. R., *Quart. J. Exp. Physiol.* **39**, 185 (1954).
14. Chadwick L. E., Hndb. Exp. Pharmakol., tom XV, red. G. B. Koelle, Berlin 1963, str. 741.
15. Chary R., Jayot J., Bocquet P., *Bull. Acad. Vétér. France* **32**, 225 (1959).
16. Chaudhuri D. K., *Ann. Biochem. Exp. Med.* **6**, 91 (1946) cyt. wg 8.
17. Cohen J. A., Oosterbaan R. A., Hndb. Exp. Pharmakol. tom XV, red. G. B. Koelle, Berlin 1963, str. 299.
18. Cohen J. A., Warringa M. G. P. J., *Biochim, Biophys. Acta* **10**, 195 (1953).
19. Cohen J. A., Warringa M. G. P. J., *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 52 (1953).
20. Davies D. R., Green A. L., Advances in Enzymology, tom XX red. F. F. Nord, New York 1958, str. 283.
21. Dauterman W. C., Talens A., van Asperen K., *J. Insect Physiol.* **8**, 1 (1962).
22. De Robertis E., Pellegrino de Iraldi A., Rodriguez de Lores Arnaiz G., Salganicoff L., *J. Neurochem.* **9**, 23 (1962).
23. Dixon M. i Webb E. C., Enzymes, Londyn 1964.
24. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. jr., Featherstone R. M., *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
25. Feldberg W., Mechanism of the Nervous System, red. D. Richter, New York 1957, str. 493.
26. Friess S. L., Baldridge H. D., *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 3269 (1957).
27. Giacobini E., *Acta physiol. scand.* **45**, Suppl. 156 (1959).
28. Hanzon V., Toschi G., *Exp. Cell Res.* **16**, 256 (1959).
29. Hardegg W. Die Kinetik der Cholinesterasen. Physiol. Institut, Univ. Heidelberg 1958.
30. Hebb C. O., Hndb. Exp. Pharmakol. tom XV, red G. B. Koelle, Berlin 1963, str. 55.
31. Hestrin S., *J. Biol. Chem.* **180**, 249 (1949).
32. Hokin L. E., Hokin M. R., *Inst. Rev. Neurobiol.* **2**, 99 (1960) cyt. wg 37.
33. Holmstedt B., Toschi G., *Acta physiol. scand.* **47**, 280 (1959).
34. Holmstedt B., *Acta physiol. scand.* **40**, 322 (1957).
35. Karczmar A. G., Hndb. Exper. Pharmakol., tom XV, red. G. B., Koelle, Berlin 1963, str. 129.
36. Koelle G. B., *J. Pharmacol.* **114**, 167 (1955).
37. Koelle G. B., Hndb. Exp. Pharmakol., tom XV, red. G. B. Koelle, Berlin 1963, str. 187.
38. Krupka R. M., Laidler K. J., *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 1458 (1961).
39. Lawler H. C., *Feder. Proc.* **19**, 337 (1960).
40. Lawler H. C., *J. Biol. Chem.* **236**, 2296 (1961).
41. Lubińska L., Niemierko S., Oderfeld B., Szwarc L., *J. Neurochem.* **10**, 25 (1963).
42. Mendel B., Mundell D. B., Rudney H., *Biochem. J.* **37**, 473 (1943).
43. Meyer A., Wilbrandt W., *Helv. physiol. Acta* **12**, 206 (1954).
44. Michel H. O., Krop S., *J. Biol. Chem.* **190**, 119 (1951).
45. Nachmansohn D., Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity, New York 1959.

http://rcin.org.pl

46. Nachmansohn D., Hndb. Exp. Pharmakol. tom XV, red. G. B. Koelle, Berlin 1963, str. 701.
47. Nathan P., Apprison M. H., *Feder. Proc.* **14**, 106 (1955).
48. Ostrowski K., Barnard E. A., Stocka Z., Dowrzynkiewicz Z., *Exp. Cell Res.* **31**, 89 (1963).
49. Rothenberg M. A., Nachmansohn D., *J. Biol. Chem.* **168**, 223 (1947).
50. Russell J., Barrnett M. D., *J. Cell. Biol.* **12**, 247 (1962).
51. Schaffer N. K., May S. C., jr., Summerson W. H., *J. Biol. Chem.* **202**, 67 (1957).
52. Serlin I., Fluke D. J., *J. Biol. Chem.* **223**, 727 (1956).
53. Tewari H. B., Bourne G. H., *Exp. Cell Res.* **21**, 245 (1960).
54. Torack R. M., Barrnett R. J., *Exp. Neurol.* 6, 224 (1962).
55. Whittaker V. P., *Biochem. J.* **72**, 694 (1959).
56. Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kirkland R. J. A., *Biochem. J.* **90**, 293 (1964).
57. Wilson I. B., *Neurology* **8**, Suppl. 1, 41 (1958).
58. Wilson I. B., The Enzymes, tom IV, red. P. Boyer, H. Lardy i K. Myrbäck, New York 1960, str. 501.
59. Wilson I. B., Harrison M. A., *J. Biol. Chem.* **236**, 2292 (1961).
60. Zeller E. A., Bissegger A., *Helv. Chim. Acta* **26**, 1619 (1943).
61. Zittle C. A., DellMonica E. S., Custer J. H., Krikorian R., *Arch. Biochem.* **56**, 469 (1955).

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOCHEMII

TOM XI 1965 ZESZYT 3

*JANINA KWIATKOWSKA**

Procesy transkrypcji i translacji informacji genetycznej**

The Transscription and Translation Processes of the Genetic Code

The recent viewes on the problems of the genetic information and its transscription and translation processes are presented.

Odtwarzanie cząsteczek białka o niezmiennej sekwencji aminokwasowej wymaga precyzyjnego przekazywania informacji. Zagadnienie informacji w biosyntezie białka obejmuje nie tylko sposób jej zapisu w materiale przekazywanym genetycznie, ale i przeniesienie tego zapisu do układu syntetyzującego w cytoplazmie, oraz prawidłowe jego odczytanie. Wszystkie bowiem etapy tego procesu są równie istotne, a błąd w którymkolwiek z nich da w wyniku zmienione, częstokroć nieczynne funkcjonalnie białko.

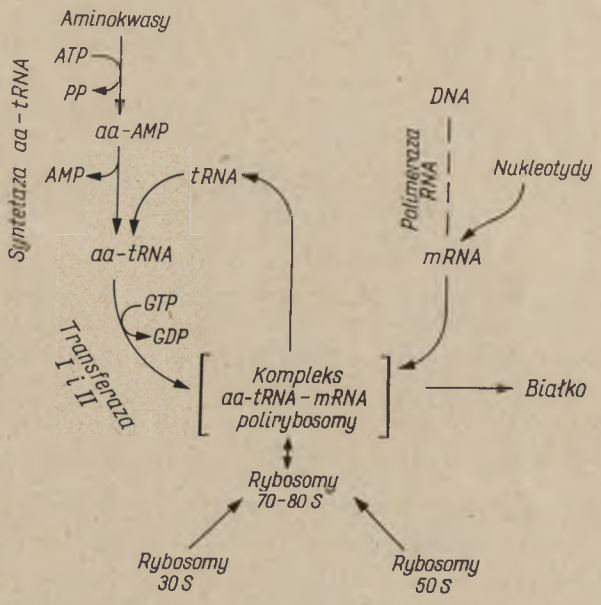
W badaniach nad tym zagadnieniem nastąpił w ciągu ostatnich lat znaczny postęp. Wyniki ich pozwalają uznać za ustalony ogólny schemat syntezy białka, chociaż wiele jeszcze pozostaje do wyjaśnienia w poszczególnych jego etapach. Schemat ten przedstawiony jest na rys. 1.

Zapis informacji, określający budowę białek zawarty jest w cząsteczkach DNA chromosomów (genach), jako odpowiednia sekwencja nukleotydów i przekazywany jest przy podziale komórki. Zapis ten zostaje następnie przeniesiony na cząsteczkę RNA informacyjnego (mRNA), powstającą na matrycy odpowiedniego DNA i posiadającą komplementarny do jego łańcucha układ nukleotydów. Proces ten nosi nazwę transkrypcji. Odczytanie kodu i przetłumaczenie go na język aminokwasów, a więc etap zwany translacją, zachodzi w kompleksie utworzonym przez połączenie informacyjnego RNA z polirybosomami i niosącymi aminokwasy cząsteczkami tRNA. W trakcie translacji aminokwasy łączą się w łańcuch polipeptydowy o sekwencji zgodnej z zapisem kodu w mRNA. Gdy

* Dr. st. asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu.

** Wykaz używanych skrótów: mRNA — informacyjny RNA; tRNA — przenoszący, „transfer" RNA (dawna nazwa: rozpuszczalny, sRNA); aa-tRNA — aminoacylo-tRNA; U — nukleotyd urydylowy; A — nukleotyd adenylowy; G — nukleotyd guanylowy; C — nukleotyd cytydylowy; rT — nukleotyd rybotymidylowy.

http://rcin.org.pl



Rys. 1. Schemat biosyntezy białka

łańcuch ten jest w pełni zakończony, następuje oderwanie się gotowej cząsteczki białka z jednoczesnym uwolnieniem tRNA i jednego monomeru z grupy polirybosomów.

I. Transkrypcja

Jak już wspomniano, mianem transkrypcji określa się przeniesienie informacji z DNA na informacyjny RNA.

1. Synteza i rozpad informacyjnego RNA

Rola informacyjnego RNA w przekazywaniu informacji z jądra komórki do cytoplazmy zbadana i uznana została niedawno. Cechą charakterystyczną i odróżniającą mRNA od innych kwasów rybonukleinowych jest jego niezwykle szybka biosynteza. Powstawanie mRNA obserwuje się już w ciągu pierwszych sekund po dodaniu nukleotydów do komórek lub odtworzonych układów syntetyzujących białko.

Obecność szybko powstającego RNA w komórkach pałeczki okrężnicy infekowanych przez fag T_2 zauważona była wprawdzie jeszcze w 1953 r. (29), nie przypisywano jednak temu faktowi należytego znaczenia. Dopiero Volkin i Astrachan zbadali skład nukleotydowy tego RNA, stwierdzając, że różni się on zasadniczo od składu kwasów rybonukleino-

http://rcin.org.pl

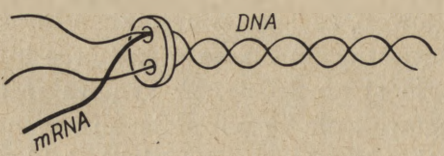
wych nieinfekowanych komórek *Escherichia coli*, przypomina natomiast DNA faga (67). W 1960 roku ustalono w pracowni Watsona, że ów RNA ma ciężar cząsteczkowy stosunkowo niewielki, nie zostaje wbudowany w rybosomy i nie jest prekursorem rybosomalnego RNA (46). Jednocześnie z Watsonem Jacob i Monod wykazali istnienie podobnego RNA w komórkach *E. coli*, infekowanych fagiem T_4. Nie wbudowując się w rybosomy komórki infekowanej, szybko syntetyzowany RNA łączy się jednak z nimi, tworząc matrycę dla budowy białka faga w komórce gospodarza (5). Z tego względu nazwali oni ów nowo poznany RNA „*messenger RNA*" i postulowali, że jest on nośnikiem informacji między DNA faga a układem syntetyzującym białko w komórce infekowanej (34). Następnym krokiem było stwierdzenie, że synteza mRNA nie jest cechą właściwą infekcji fagowej, ale że powstaje on i w normalnych, nieinfekowanych komórkach. Watson wydzielił taki mRNA z komórek *E. coli* i stwierdził, że przy stężeniu jonów Mg^{2+} równym 10^{-2} M ma on zdolność łączenia się z rybosomami, odrywa się natomiast od nich przy spadku stężenia magnezu do 10^{-4} M. Informacyjny mRNA jest bardziej wrażliwy na działanie rybonukleazy niż rybosomalny (25). Stosując technikę frakcjonowania kwasów rybonukleinowych przez wirowanie w gradiencie stężenia sacharozy, znaleziono w wielu bakteriach, a także w komórkach zwierzęcych frakcje RNA charakteryzujące się niezmiernie szybkim wbudowywaniem piętnowanych nukleotydów. Wyodrębniono je między innymi z komórek wątroby szczura i kurczęcia, retikulocytów, komórek HeLa (11, 12, 20, 53).

Informacyjny RNA pobudza syntezę białka i jest niezbędnym składnikiem układów tej syntezy zarówno w normalnych, jak i infekowanych fagami komórkach. Szybki rozpad mRNA był — jak ustalił Nirenberg — główną przyczyną, dla której nie udawało się dawniej uzyskiwać syntezy białka w układach bezkomórkowych (42). Obecnie trudność ta została całkowicie przezwyciężona i dzięki możności stosowania układów z dodawanymi mRNA lub sztucznie otrzymywanymi polinukleotydami udaje się badać syntezę białka *in vitro*.

Obok szybkości syntezy oraz pobudzania wbudowywania aminokwasów w łańcuch polipeptydowy, dalszą istotną cechą bakteryjnych i zwierzęcych mRNA jest ich komplementarność względem DNA. Tak więc każdemu nukleotydowi adenylowemu w cząsteczce DNA odpowiada w RNA nukleotyd urydylowy, guanylowemu — cytydylowy, tymidylowemu — adenylowy i cytydylowemu — guanylowy. Komplementarność ta uwarunkowana jest procesem syntezy mRNA. Jak się wydaje na podstawie badań nad tworzeniem hybrydów DNA-RNA, synteza mRNA zachodzi w komórkach głównie pod wpływem polimerazy Kornberga (DNA *dependent* RNA *polymerase*), a nie fosforylazy polinukleotydowej. Materiałem wyjściowym są więc trójfosfonukleotydy, nakładające się na

http://rcin.org.pl

rozkręcony łańcuch DNA i łączące się w sekwencję komplementarną do niego. Butler przedstawia ten proces bardzo obrazowo, opierając się na wynikach badań elektrono-mikroskopowych, przeprowadzonych na chromosomach w trakcie syntezy RNA. Jego zdaniem enzym stanowi rodzaj obracającej się tarczy, przez otwory której przechodzą nici DNA. Wskutek obrotu enzymu nici te rozkręcają się, odsłaniając sekwencję nukleotydową, stającą się matrycą dla powstającego RNA (7). Schemat syntezy mRNA przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Synteza mRNA wg Butlera (7)

Jako produkt przejściowy powstaje hybryd DNA-RNA. Hybrydy takie udaje się wydzielić z komórek, a także otrzymywać sztucznie. Są one odporne na działanie rybonukleazy. Hybrydy uwalniają następnie RNA oraz rodzimy, niezmieniony DNA (19, 55). Synteza mRNA zachodzi w jądrze, po czym zostaje on przeniesiony do protoplazmy (30, 32).

Wyniki większości badań, przeprowadzonych na różnych fagach (T_4, SP_8 i in.), pozwalają wnioskować, że synteza mRNA zachodzi komplementarnie do jednej tylko nici DNA (40). Ponieważ jednak w komórkach bakteryjnych, infekowanych fagiem T_2, stwierdzono obecność dwu mRNA komplementarnych względem siebie, nie jest wykluczona możliwość, że oba łańcuchy DNA mogą być w pewnych przypadkach matrycą dla mRNA (18). Niezależnie jednak od tego, czy jeden tylko, czy oba łańcuchy DNA są primerem, konieczna jest obecność obydwu. Synteza mRNA zachodzi znacznie szybciej i aktywniej w obecności rodzimego, dwułańcuchowego DNA, niż na zdenaturowanej, pojedynczej nici (33). Aktywność w syntezie białka wykazują wyłącznie informacyjne RNA, syntetyzowane na matrycy dwułańcuchowego DNA (60). Przypuszcza się, że duże znaczenie ma struktura wtórna DNA, stąd konieczność obecności obu łańcuchów.

Synteza mRNA znajduje się pod kontrolą hormonów. Wydaje się, że wpływ ich na syntezę białka polega właśnie na regulowaniu przez nie powstawanie informacyjnych RNA w komórkach. Synteza mRNA ulega przyśpieszeniu i znacznemu wzmożeniu pod wpływem insuliny, tyroksyny, estrogenów, kortyzolu i hormonu wzrostu (35, 36, 64). Pobudzanie to jest w przypadku kortyzolu hamowane przez aktynomycynę, co świadczy o działaniu tego hormonu na wczesne etapy syntezy mRNA. Aktynomycyna zapobiega bowiem tworzeniu hybrydu DNA-RNA, łącząc się z cząsteczką DNA (24).

http://rcin.org.pl

Wyniki pierwszych badań nad mRNA sugerowały, że na równi z szybkością syntezy charakteryzuje go niezwykle szybki rozpad. Pogląd ten ulegał jednak zmianie w miarę tego, jak wydzielano mRNA z tkanek zwierzęcych. O ile bowiem bakteryjne mRNA rozpadają się w ciągu kilku minut po syntezie, to czas życia mRNA z komórek zwierzęcych wynosi kilka godzin. Z tkanek takich jak soczewka oka, tarczyca, retikulocyty i in. wydzielono trwałe mRNA, wykazujące aktywność po 24 i więcej godzinach. Wiąże się to przypuszczalnie ze specyfiką tych tkanek, a mianowicie produkcją dużych ilości swoistego białka, krótkim okresem życia komórki, utratą jądra lub zmianami zachodzącymi w nim wkrótce po okresie intensywnej syntezy (52).

W świetle ostatnich badań zmieniły się również zapatrywania na kwestię wielkości cząsteczek mRNA. W odróżnieniu od rybosomalnego, informacyjny RNA uważany był za związek stosunkowo niskocząsteczkowy, o stałej sedymentacji 12-14 *S*. Obecnie jednak wiadomo, że w bakteriach istnieją bardzo duże cząsteczki mRNA, kodujące kilka lub kilkanaście białek, zgodnie z teorią: jeden operon — jeden mRNA. Teoria operonu bakteryjnego zakłada, że geny determinujące syntezę białek związanych funkcjonalnie tworzą odrębne zespoły — operony. Funkcja operonu regulowana jest przez jeden wspólny operator. W obrębie operonu poszczególne geny ułożone są liniowo, w ustalonej kolejności, zaczynając od genu operatorowego. W operonie przemiany laktozy znajdują się trzy geny określające syntezę trzech enzymów tej przemiany, w operonie syntezy histydyny — dziesięć genów, w operonie syntezy leucyny — cztery geny itd. Wyniki badań genetycznych nad zjawiskami polarności, modulacji i represji koordynowanej sugerowały, że na matrycy całego operonu syntetyzuje się jeden informacyjny RNA. Pośrednie dowody na to znalazły swoje potwierdzenie, gdy izolowano duże mRNA o cechach jednorodności, powstałe na matrycy operonu histydyny i laktozy (26, 41).

2. Zapis kodu w informacyjnym RNA

Możliwość eksperymentowania *in vitro* na wydzielonych układach z zastosowaniem wydzielonych z komórek mRNA, a zwłaszcza sztucznie otrzymywanych polinukleotydów, w zestawieniu z danymi otrzymywanymi *in vivo*, pozwoliła rozwiązać w znacznym stopniu problem frapujący genetyków i biochemików od 10 lat — a mianowicie problem kodu genetycznego. Zagadnienie to było już poruszane w *Postępach Biochemii* w 1963 roku (70). Z tego względu obecnie podane będą tylko nowe osiągnięcia i poglądy w tej dziedzinie.

Wygłoszona w 1961 r. teoria kodu Cricka potwierdzona została szeregiem wyników badań, umożliwionych rozwojem techniki badań.

http://rcin.org.pl

Cztery główne postulaty tej teorii zakładają, że kod jest trójkowy, zdegenerowany, i niezachodzący na siebie i odczytywany zawsze z pewnego określonego punktu, podobnie jak pismo (13).

Zgodnie z teorią trójkową, każdy z 20 aminokwasów wchodzących w skład białka kodowany jest przez układ trzech nukleotydów cząsteczki mRNA. Triplety te, jak już powiedziano, są komplementarne do tripletów wchodzących w skład DNA. Układ trzech nukleotydów jest tą minimalną ilością, przy której kombinacja czterech elementów, wchodzących w skład RNA (A, G, C, U) może zapewnić informację odnośnie sekwencji 20 aminokwasów. Słuszność teorii tripletowej potwierdziły wyniki badań nad mutantami fagowymi, w których przez dodanie barwników akrydynowych udaje się wbudować lub usunąć jeden nukleotyd w cząsteczce niosącej informację. Powoduje to zmiany w fenotypie, znikające dopiero wtedy, gdy połączy się trzy mutanty z dodaną lub usuniętą zasadą. Istnienie kodu trójkowego, przy zastosowaniu czterech elementów stwarza możliwość 64 układów, a więc pewnego „nadmiaru" informacji. Jeden aminokwas może być wtedy kodowany przez dwa, trzy i więcej tripletów. Taki kod nosi nazwę zdegenerowanego. Dawne poglądy Gamowa, który zakładał istnienie tylko 20 kombinacji czterech nukleotydów (bez uwzględnienia zmian kolejności ułożenia), a także Cricka, eliminującego z kodu pewne sekwencje nukleotydów i pozostawiającego 20 „sensownych" tripletów nie zdały egzaminu przy konfrontacji z wynikami doświadczeń. Natomiast wyniki badań Nirenberga i Ochoa, ustalające skład poszczególnych tripletów determinujących wbudowywanie aminokwasów w układach bezkomórkowych (tabl. 1) świadczą bezwzględnie na korzyść kodu zdegenerowanego.

Obecnie znanych jest już 46 z 64 możliwych tripletów kodujących poszczególne aminokwasy. Dotychczas jednak udało się tylko dla niewielu tripletów ustalić ich właściwą sekwencję. Przyczyną tego jest niemożność syntetyzowania kopolimerów nukleotydowych o ustalonej kolejności. O ile więc wyniki badań z zastosowaniem homopolinukleotydów (poli-U, poli-A, poli-C, kodujące odpowiednio wbudowywanie fenyloalaniny, lizyny i proliny), traktowane mogą być jednoznacznie, przy kopolimerach w większości przypadków jest możliwość różnej interpretacji budowy tripletu. Kolejność zasad ustalona jest w triplecie kodującym tyrozynę. Przeprowadzając syntezę kopolimeru przy pomocy fosforylazy na matrycy AU, oraz AAU, ustalono, że wbudowywanie tyrozyny zachodzi przy sekwencji AUU (68). Dla cysteiny ustalono kolejność GUU.

Niektórzy badacze skłonni są uważać, że kod jest częściowo zdegenerowany, to znaczy, że nie wszystkie układy tripletów występują w przyrodzie. Eck (15) natomiast zakłada, że wszystkie 64 triplety są możliwe i „sensowne", z tym, że da się wśród nich wydzielić symetryczny układ 32 par tripletów. Poszczególne aminokwasy określane są przez

http://rcin.org.pl

Tablica 1

Skład tripletów kodujących poszczególne aminokwasy

Aminokwasy	Triplety w mRNA*
Alanina	CCG, CUG, CAG
Arginina	GCC, GUC, GAA
Asparagina	CAA, UAA, CUA
Asparaginowy kwas	GUA, GCA
Cysteina	**GUU**, GCU
Fenyloalanina	**UUU**, UUC
Glutamina	ACA, UAC
Glutaminowy kwas	GAA, AUG
Glicyna	UGG, AGG, CGG
Histydyna	ACC, AUC
Izoleucyna	UAU, UAA, CAU
Leucyna	UAU, UGU, UUC, CCU
Lizyna	AUA, ACA, **AAA**, AAG
Metionina	UGA
Prolina	CUC, **CCC**, CAC, CGC
Seryna	CUU, CCU, ACG, UCG
Treonina	UCA, ACA, CCA
Tryptofan	UGG
Tyrozyna	**AUU**, ACU
Walina	UUG

* Triplety o ustalonej sekwencji zaznaczone tłustym drukiem.

parę takich tripletów, niektóre zaś nawet przez dwie, lub trzy pary. W każdej parze dwa nukleotydy są identyczne, trzeci zaś jest zawsze w obu przypadkach albo puryną, albo pirymidyną. Na przykład tryptofan determinowany jest przez GGU i GAU, lizyna przez AAA i AGA, glicyna przez GAG i GGG, oraz GCG i GUG. Zestawienie danych odnośnie znanych 46 tripletów czyni teorię Ecka dość przekonującą, wymaga ona jednak wielu jeszcze potwierdzień (15).

W kodzie trójkowym istnieje możliwość, że jest on zachodzący na siebie, to znaczy, że każdy nukleotyd jest wspólny dla trzech tripletów, a sąsiadujące ze sobą aminokwasy mają dwie wspólne zasady w mRNA. Obecnie pogląd taki został całkowicie odrzucony i kod uznany jest za niezachodzący na siebie. Poszczególne triplety kodujące aminokwasy następują w łańcuchu polinukleotydowym kolejno po sobie. Świadczą o tym mutacje punktowe, w których zmiana jednej zasady nukleotydu wywołuje zmianę wbudowania jednego tylko, a nie trzech aminokwasów, a także porównanie składu aminokwasowego białek różnych gatunków zwierząt. Białka te, na przykład insulina, różnią się częstokroć jedynie jednym aminokwasem w sekwencji.

Skoro triplety ułożone są w mRNA w sposób ciągły — a nie dało się

http://rcin.org.pl

ustalić jakichś „przecinkowych" nukleotydów — czytanie kodu zaczynać się musi w jednym określonym miejscu, w przeciwnym bowiem przypadku cały kod byłby mylnie tłumaczony. To założenie potwierdzone jest przez doświadczenia z mutantami. Dodanie lub odjęcie nukleotydu powoduje zmianę odczytywania wszystkich następnych tripletów w genie. Połączenie mutacji o dodanym nukleotydzie z mutacją o usuniętym nukleotydzie powoduje zniesienie mutacji.

Nirenberg przypisuje pewne znaczenie w zapoczątkowywaniu czytania kodu pozycji grupy fosforanowej w końcowym nukleotydzie. Używając trójtripletowych nukleotydów jako mRNA stwierdził on, że prawidłowe wbudowywanie aminokwasów następuje przy położeniu końcowej grupy fosforanowej w pozycji 5′. Przy położeniu w pozycji 3′ lub braku końcowej grupy fosforanowej determinowanie aminokwasu jest wybitnie upośledzone i może nastąpić zmiana „sensownego" słowa kodu w „bezsensowne" (43).

O ile interpunkcja między poszczególnymi słowami kodu wydaje się nie istnieć, przypuszcza się, że przy dużych mRNA kodujących kilka enzymów dla całego operonu konieczne jest zaznaczenie końca odrębnych łańcuchów polipeptydowych. Zakłada się, że rolę „przecinków" mogą spełniać tzw. „rzadkie" zasady w nukleotydach — na przykład pochodne metylowe, bądź też „nonsensowne" triplety. Jak dotąd brak jednak konkretnych faktów potwierdzających którąś z tych hipotez.

Zasadą teorii kodu jest determinowanie przez określony jego wyraz tylko jednego aminokwasu. Toteż ogromne poruszenie wywołał fakt, że poli-U w nieobecności fenyloalaniny i w specjalnych warunkach (przy niskiej temperaturze i zmniejszonym stężeniu jonów Mg^{2+}) może wbudowywać leucynę, a także tyrozynę i izoleucynę. Tłumaczy się to jednak tym, że w takich warunkach zdolność kompleksotwórcza mRNA i tRNA wzrasta tak silnie, iż może zajść „pomyłka" w odczytywaniu kodu przez tRNA. Ponieważ trzy z czterech znanych tripletów kodujących leucynę mają po dwa U w swym składzie, leucynowe tRNA mogą „pomyłkowo" tworzyć kompleks z UUU w cząsteczce mRNA, determinującym fenyloalaninę. Wbudowywanie tyrozyny i izoleucyny przez UUU zachodzi znacznie rzadziej — prawdopodobieństwo pomyłki jest mniejsze, gdyż tylko dwa triplety dla tyrozyny i jeden dla izoleucyny mają po dwa U (61).

Na podstawie dotychczasowych badań uważa się, że kod jest w wysokim stopniu uniwersalny. Stosując sztuczne polinukleotydy w układach bezkomórkowych wątroby, retikulocytów i innych tkanek zwierzęcych wykazano, że większość oznaczeń kodowych jest taka sama jak u *E. coli* (3, 73).

Informacja genetyczna zawarta jest w układzie nukleotydów mRNA, nie bez znaczenia jednak przy jej przekazywaniu jest i jego struktura

http://rcin.org.pl

wtórna. Informacyjny RNA jest pojedynczym, rozciągniętym łańcuchem polinukleotydowym. Wszystkie zasady są przypuszczalnie umieszczone po jednej stronie, co ułatwia połączenie z komplementarnymi zasadami tRNA za pomocą wiązań wodorowych. Długość jednego tripletu w mRNA wynosi 20 Å, a więc tyle, ile przekrój spirali w tRNA (79). Rozciągnięta struktura mRNA konieczna jest zarówno dla tworzenia kompleksu z tRNA, jak i z rybosomami (47, 63). O znaczeniu struktury wtórnej świadczą badania nad kodującym fenyloalaninę kwasem polirybotymidylowym. Dzięki obecności grup metylowych kwas ten posiada spiralną strukturę wtórną, którą traci w temperaturze ponad 45° (62). W temperaturze pokojowej poli-rT pobudza w słabym stopniu wbudowywanie fenyloalaniny, natomiast jego aktywność wzrasta znacznie w temperaturze 45°. Natomiast poli-U, który nie posiada struktury wtórnej, działa energicznie już w niskich temperaturach (61). Nirenberg wykazał również, że poli-U traci zdolność kodowania w obecności poli-A, ponieważ tworzy z nim kompleks o zwiniętej strukturze wtórnej (44).

II. Translacja

Jak już wspomniano, translacja, to jest odczytanie kodu i przetłumaczenie go na język aminokwasów, zachodzi w kompleksie utworzonym przez połączenie informacyjnego RNA z polirybosomami i niosącymi aminokwasy cząsteczkami tRNA.

1. Kompleksy informacyjnego RNA z rybosomami

Odczytywanie znaków kodu z cząsteczki mRNA staje się możliwe wtedy, gdy tworzy ona kompleks z rybosomami. Rybosomy są to cząsteczki nukleoproteidów o stałej sedymentacji 70-80 *S*. Stosując frakcjonowanie za pomocą wirowania w gradiencie sacharozy wyodrębniono rybosomy tej wielkości z protoplazmy i jądra komórek zwierzęcych oraz bakteryjnych (49, 51, 77). Rybosomy bakteryjne mają przeważnie nieco niższą masę cząsteczkową niż zwierzęce. Przy niskich stężeniach Mg^{2+} rybosomy rozpadają się na mniejsze podjednostki, o stałych sedymentacji 30 *S* i 50 *S* u bakterii, oraz 30 *S* i 50 *S*, bądź też 40 *S* i 60 *S* u ssaków. Zwiększenie stężenia magnezu wywołuje łączenie się tych podjednostek z powrotem w rybosomy o 70-80 *S* (65). Podjednostki składają się z kwasu rybonukleinowego i białka. Z cząsteczek 30 *S* otrzymano RNA sedymentujący z 16 *S*, a z cząsteczek 50 *S* — z 23 *S* (27). Zdaniem Watsona RNA w cząsteczkach 30 *S* tworzy jeden łańcuch o ciężarze cząsteczkowym $5{,}5 \times 10^5$, w cząsteczkach 50 *S* znajdują się natomiast dwa

http://rcin.org.pl

łańcuchy o łącznym ciężarze cząsteczkowym $1{,}1 \times 10^6$ (71). Langridge na podstawie badań dyfrakcji rentgenowskiej uważa, że RNA rybosomów składa się z 4-5 równolegle ułożonych łańcuchów o podwójnej spirali, rozdzielonych odcinkami bez struktury spiralnej (37). Spirin i Kisielew stwierdzili, że przy umieszczeniu cząsteczek 30 *S* i 50 *S* w środowisku bez jonów Mg^{2+} następuje odwracalne rozfałdowanie zwiniętych łańcuchów RNA bez ich degradacji. Zdaniem tych autorów obie cząsteczki zbudowane są z pojedynczego łańcucha polinukleotydowego. Cząsteczka 30 *S* jest płaskim tworem, złożonym z 4 skrętów łańcucha, zaś 50 *S* — cylindrycznym, powstałym wskutek zwinięcia łańcucha w 10 rzędów. Przy połączeniu obu cząsteczek kształt ich zmienia się, części zewnętrzne, nieprzylegające do siebie stają się stożkowate. Wydaje się, że rybosomy bardzo łatwo i elastycznie zmieniają swą konformację, co ma duże znaczenie dla ich funkcji (56).

Wstępne badania nad strukturą białka rybosomów wskazują, że w skład ich wchodzi 20 różnych łańcuchów polipeptydowych, dających się rozdzielić elektroforetycznie (71). Ilość i sposób ułożenia tych łańcuchów w poszczególnych cząsteczkach nie są jeszcze znane. Do cząsteczki 30 *S* przyłączona jest rybonukleaza, znajdująca się w nieczynnej formie (54).

Wydzielając rybosomy z komórek w trakcie syntezy białka z zachowaniem odpowiednio wysokiego stężenia jonów magnezu udaje się wyodrębnić oprócz frakcji 70-80 *S*, szereg innych, o wyższych stałych sedymentacji (od 100-400 *S*). Obecność takich frakcji stwierdzono w komórkach *E. coli*, wątroby szczurzej, retikulocytach, komórkach HeLa i in. (2, 66, 69, 77). Ponieważ przy niższym stężeniu jonów Mg^{2+} frakcje te znikają z komórek, z jednoczesnym wzrostem frakcji 70-80 *S*, nasuwał się wniosek, że w odpowiednich warunkach rybosomy łączą się tworząc agregaty. Przypuszczenia te potwierdzone zostały zdjęciami elektrono-mikroskopowymi, w których wyraźnie widać łączenie się monomerów rybosomów w agregaty po 2, 3, 4, 5, 8 i więcej (58, 77). Zespoły monomerów nazwano polirybosomami lub ergosomami.

Czynnikiem powodującym powstawanie polirybosomów i utrzymującym monomery w agregacie jest połączenie rybosomów z mRNA. Potwierdzają to doświadczenia z aktynomycyną — antybiotykiem, powodującym zahamowanie syntezy i rozpad mRNA. Po iniekcji aktynomycyny polirybosomy komórek wątroby rozpadają się na monomery (59).

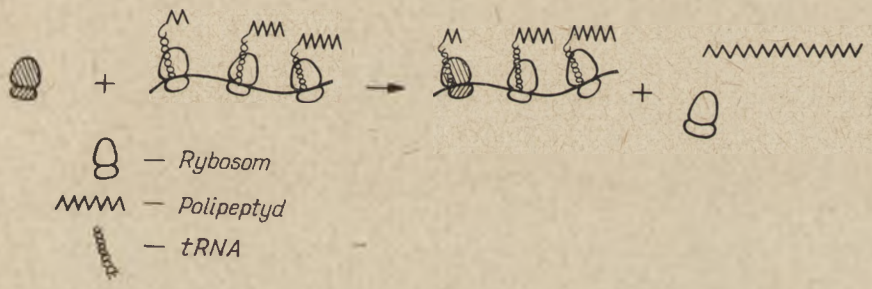
Zgodnie z panującym obecnie poglądem zadaniem polirybosomów jest stworzenie odpowiedniej, trójwymiarowej powierzchni, po której może się przesuwać mRNA, odsłaniając kolejno wyrazy kodu dla odczytywania przez tRNA, a tym samym spełniać swą funkcję matrycy.

W retikulocytach za najaktywniejsze uważano agregaty z 5 monomerów (21). Ponieważ przypuszczano, że rybosomy połączone są na mRNA

http://rcin.org.pl

liniowo, ilość ta wydawała się maksymalną, możliwą przy długości łańcucha mRNA 1500 Å i odległości centrów dwu rybosomów 300 Å. Zdjęcia elektrono-mikroskopowe wykazały jednak, że rybosomy mogą być ułożone w podwójny rząd. Badając wbudowywanie piętnowanych aminokwasów w białko w obecności polirybosomów różnej wielkości Noll, Staehelin i Wettstein ustalili, że w komórkach wątroby zdolność włączania leucyny wzrasta liniowo wraz z wzrostem ilości monomerów w polirybosomach od 2 do 8 i ustala się przy 10 (45). Największą aktywność w syntezie hemoglobiny posiadają polirybosomy złożone z 8-10 monomerów (6). W komórkach *E. coli* znaleziono agregaty z 11, w HeLa — z 40 rybosomów (58, 77). Jak wynika z badań kinetycznych, monomery i niższe agregaty nie są całkowicie nieczynne. Początkowo obserwuje się wbudowywanie aminokwasów z ich udziałem, aktywność ich jednak wyczerpuje się bardzo szybko, a zachowują ją jedynie wyższe polirybosomy (45).

Ponieważ w komórkach w trakcie syntezy białka znajdują się jednocześnie polirybosomy o różnej ilości jednostek, uważa się proces powstawania i rozpadu agregatu za ciągły, uwarunkowany kolejnymi etapami syntezy białka. Zgodnie z aktualną teorią „ruchomej taśmy" monomery łączą się z mRNA kolejno, od określonego końca. Informacyjny RNA przesuwa się przypuszczalnie w bruździe między cząsteczkami 30 *S* i 50 *S*. Po-



Rys. 3. Przyłączanie monomeru do polirybosomów wg Goodmana (23)

łączony on jest nietrwale z cząsteczkami 30 *S*. W miarę przesuwania, mRNA odsłania kolejno triplety kodujące poszczególne aminokwasy, wskutek czego następuje przyłączanie odpowiednich aa-tRNA do mRNA i cząsteczki 50 *S*. Stopniowo aminokwasy łączą się w łańcuch polipeptydowy. Gdy jest on zakończony, odrywa się od powierzchni rybosomów i jednocześnie odpada z polirybosomu monomer, z którym polipeptyd był związany. Do przeciwległego końca mRNA (a więc jego początku) przyłącza się następny monomer, na którym znów zapoczątkowuje się synteza (75). Proces ten jest schematycznie przedstawiony na rys. 3.

Goodman i Riche udowodnili, że w komórkach HeLa monomery mają zdolność przyłączania się do istniejącego już polirybosomu.

http://rcin.org.pl

Frakcjonując rybosomy na różnych etapach syntezy białka wykazali oni, że rosnący łańcuch polipeptydowy jest początkowo związany z frakcją zawierającą agregat, później — z monomerem, po czym znajduje się go w wolnej frakcji białkowej, nie związanej z rybosomami (23). Również i prace Bishopa z 1964 r. potwierdzają istnienie mechanizmu „przesuwającej się taśmy". Autor ten uważa jednak, że znaczna ilość monomerów znajdowana w układach *in vitro* jest częściowo artefaktem i wpływa na osłabienie syntezy w sztucznych układach. W komórkach bądź monomery uwalniają się w mniejszej ilości, bądź też są od razu włączane do polirybosomu (4).

Teoria „ruchomej taśmy" wyjaśnia zjawisko tzw. modulacji. Zauważono, że przy syntezie białek, determinowanych wspólnie przez jeden mRNA powstający na matrycy operonu, to białko, któremu odpowiada gen pierwszy po operatorze, syntetyzowane jest w znacznie większej ilości niż białka odpowiadające genom ułożonym za nim (78). Możliwe, że po syntezie pierwszego enzymu tylko część monomerów pozostaje związana z dalszym odcinkiem mRNA, gdzie odczytywane są następne białka, większość zaś rybosomów odrywa się z gotowym polipeptydem. Ponieważ przyłączanie monomeru i czytanie informacji następuje zawsze z jednego końca mRNA, pierwszy w kolejności enzym syntetyzowany jest przez wszystkie monomery, następne zaś tylko przez te, które nie odłączyły się od agregatu po syntezie poprzedniego białka. Im dalej od początku mRNA, tym mniej cząsteczek powstaje.

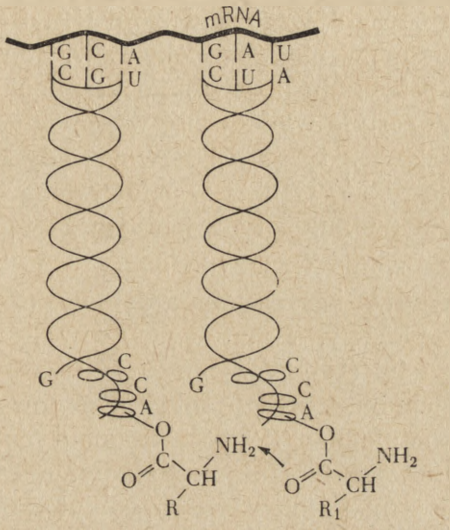
Kwestia sposobu połączenia mRNA z powierzchnią rybosomów jest dotychczas niewyjaśniona. Ze względu na bezspornie duże, jeśli nie decydujące znaczenie stężenia jonów Mg^{2+}, Watson wypowiada pogląd, że przy stężeniu magnezu równym 10^{-2} M, wszystkie grupy fosforanowe rybosomów są związane z Mg^{2+}. Jony Mg^{2+} tworzą mostki łączące powierzchnię rybosomów 30 *S* z mRNA, oraz 50 *S* z tRNA (71, 72). Santer wydzielił z powierzchni rybosomów kwas rybonukleinowy rozkładany przez rybonukleazę, nie pochodzący z rybosomów i różny od mRNA. Przypisuje mu udział w wiązaniu rybosomów z mRNA (50). Ponieważ puromycyna, pod działaniem której od rybosomu odrywa się polipeptyd i związany z nim tRNA, powoduje również rozpad agregatów i oderwanie mRNA, przypuszcza się, że wiązanie mRNA-rybosomy zachodzi z udziałem tRNA (6).

2. Funkcje przenoszącego RNA

Wyrazy kodu zapisane w mRNA odczytywane są przez aminokwasy za pośrednictwem RNA przenoszącego (tRNA), z którymi są związane. Cząsteczki tRNA są stosunkowo niewielkie, składają się z 60-80 nu-

http://rcin.org.pl

kleotydów. Badania dyfrakcji rentgenowskiej, które udało się przeprowadzić mimo trudności ze zorientowaniem cząsteczki, wykazują, że tRNA jest pojedynczym łańcuchem polinukleotydowym, owiniętym wokół siebie w ten sposób, że tworzy spiralę o trzech skokach. Spirala ta utrzymywana jest wiązaniami wodorowymi powstałymi między przyległymi, komplementarnymi zasadami. Na zgięciu spirali znajduje się triplet, odpowiedzialny za dekodowanie informacji z mRNA. Nie posiadając wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, może tworzyć je z komple-



Rys. 4. Odczytywanie kodu przez tRNA

mentarnym tripletem mRNA, łącząc się z nim za ich pomocą (76, 79). Zależnie więc od kolejności tripletów w mRNA będą kolejno przyłączane określone tRNA niosące aminokwasy, dzięki czemu aminokwasy te znajdą się na matrycy w odpowiedniej sekwencji. Rys. 4 przedstawia schematycznie budowę tRNA i sposób odczytywania kodu.

Przyłączanie aminokwasów do swoistych dla nich tRNA następuje uprzednio pod wpływem kompletu syntetaz aminoacylo-tRNA i ATP. Reakcja ta zachodzi w dwu etapach — pierwszym jest utworzenie kompleksu aktywnego aminokwasu (adenylatu aminokwasu) z enzymem, drugim — przeniesienie aminokwasu na tRNA. Syntetazy przyłączają aminokwasy wybiórczo do określonych tRNA. Wiązanie między resztą aminoacylową a tRNA jest typu estrowego i zachodzi między grupą karboksylową aminokwasu a hydroksylową rybozy końcowego nukleotydu tRNA. We wszystkich tRNA koniec łańcucha polinukleotydowego, do którego przyłącza się aminokwas ma sekwencję ACC. Aminokwas łączy się z nukleotydem adenylowym. Stosując różne metody frakcjonowania (kolumny z metyloalbuminą i in.), rozdzielono i izolowano poszczególne

http://rcin.org.pl

tRNA (1, 31). Dla niektórych znany jest już skład nukleotydowy i — częściowo, na pewnych odcinkach — sekwencja. Dla niektórych aminokwasów znaleziono po kilka łączących się z nimi tRNA, co jest konsekwentnym następstwem zdegenerowanego kodu. Wydzielono na przykład trzy tRNA przenoszące leucynę. Jeden z nich wbudowuje ją pod wpływem poli-UC, drugi — poli-UG, trzeci — poli-U (16, 74).

Dotychczas nie udało się ustalić, jaki odcinek łańcucha polinukleotydowego w tRNA stanowi o jego swoistości przy przyłączaniu aminokwasu. Przypuszcza się, że ośrodki określające tę swoistość są niezależne i różne od tripletu odczytującego kod z mRNA. Świadczą o tym wyniki badań nad wbudowywaniem aminokwasów, których cząsteczka uległa zmianie już po połączeniu z tRNA. Po utlenieniu tyrozylo-tRNA do DOPA-tRNA, DOPA zostaje wbudowany w hemoglobinę w miejscu normalnie zajmowanym przez tyrozynę. Również gdy cysteilo-tRNA przekształcono w alanylo-tRNA, alanina wbudowywana była na miejsce cysteiny, pod wpływem polinukleotydu kodującego tę ostatnią (8, 9).

Znaczne zainteresowanie wzbudziło odkrycie w składzie tRNA tzw. „rzadkich" nukleotydów, jak pseudourydylowy (*5'*-fosforan *5*-rybozylouracylu), rybotymidylowy, *2*-metyloguanylowy, *1*-metyloguanylowy, *2*-metyloadenylowy i in. (14). W serynowym tRNA nukleotydy te występują w sekwencjach: nukleotyd *1*-metyloguanylowy — *2*-metyloguanylowy, oraz *2,3*-dwumetyloguanylowy — pseudourydylowy (57). W tRNA walinowym, tyrozynowym i alaninowym powtarza się sekwencja: nukleotyd tymidylowy — pseudourydylowy — cytydylowy — guanylowy. Znaleziono w nich również nukleotyd *1,2*-dwumetyloguanylowy i *1*-metyloinozynowy (31).

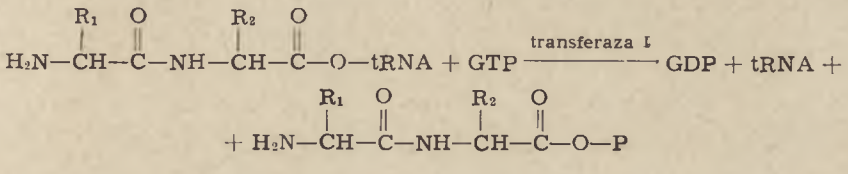
Grupy metylowe puryn i pirymidyn w tRNA pochodzą z S-adenozylometioniny w odróżnieniu od grupy metylowej tyminy w DNA, której prekursorem jest kwas metylenotetrahydrofoliowy (39). Enzymy metylujące tRNA odznaczają się swoistością; z *E. coli* wyodrębniono 8 takich enzymów, swoistych dla poszczególnych polinukleotydów, ulegających metylacji (22).

Pochodne metylowe mają zapewne określoną funkcję biologiczną, gdyż tRNA szczepów *E. coli*, hodowanych na pożywce bez metioniny, a więc ubogie w grupy metylowe, wbudowują o 25-30 % mniej aminokwasów, niż tRNA o normalnym składzie (38). Z doświadczeń Peterkofskiego wynika, że przyłączanie aminokwasów do tRNA nie jest upośledzone przy braku grup metylowych w tRNA. Sądząc z wstępnych wyników można przypuszczać, że rola „rzadkich" nukleotydów może być związana z przenoszeniem aminokwasów z aa-tRNA na łańcuch polipeptydowy i tworzeniem połączeń z rybosomami i mRNA (48).

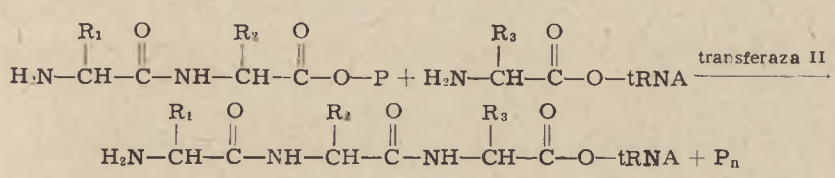
http://rcin.org.pl

3. Synteza polipeptydu

Jak już wspomniano, tworzenie polipeptydu i przenoszenie na jego łańcuch kolejnych aminokwasów zachodzi w kompleksie utworzonym z tRNA, polirybosomów i mRNA. Proces przeniesienia i przyłączenia aminokwasów katalizowany jest przez dwa enzymy: transferazę I i II; wymaga też obecności GTP oraz tzw. czynników A i B pochodzących z supernatantu po odwirowaniu RNA. Istnieje pogląd, że GTP odgrywa znaczną rolę zarówno przy przyłączaniu aminokwasów do polipeptydu, jak i przesuwaniu się mRNA przez agregat rybosomów. Zgodnie z nim przyłączanie aminokwasu zachodzi w dwu stadiach:



1.



2.

Przypuszcza się, że w pierwszym stadium transferaza I tworzy połączenie z powierzchnią rybosomu, i aa-tRNA dołączonym do mRNA. Pod wpływem GTP następuje wytwarzanie bezwodnika fosforanowego polipeptydu z odłączeniem tRNA (reakcja 1). Kosztem energii uwalnianej przy rozkładzie GTP następuje przesunięcie mRNA do następnego aminoacylo-tRNA, a usunięcie GDP i tRNA z kompleksu uwalnia miejsce na połączenie powierzchni rybosomu z transferazą II. Enzym ten katalizuje przyłączenie następnego aa-tRNA do łańcucha polipeptydowego (reakcja 2). Kolejne powtórzenie pierwszego i drugiego etapu powoduje narastanie polipeptydu do pełnej jego długości, kodowanej przez dany mRNA, po czym następuje oderwanie się gotowej cząsteczki polipeptydowej (45).

Prawidłowe odczytanie kodu genetycznego następuje w wyniku bezbłędnego funkcjonowania wszystkich elementów układu transkrypcji i translacji. W świetle ostatnich badań wydaje się, że układ znaków kodowych w DNA czy mRNA nie jest jedynym czynnikiem determinującym sekwencję aminokwasową, choć jest może najważniejszym. W sztucznych układach, składających się z poszczególnych składników, otrzymanych z różnych komórek, nie zawsze udaje się otrzymać polipeptydy, których należało oczekiwać ze względu na źródło czy skład mRNA (28).

Pewien wpływ na proces odczytywania kodu ma RNA rybosomalny. Wiadomo, że wiąże się on ze streptomycyną, przy czym następuje zmia-

http://rcin.org.pl

na konformacji i utrudnione jest połączenie z mRNA (17). Hamowanie syntezy białka przez ten antybiotyk jest więc zrozumiałe. Jak jednak stwierdzono, streptomycyna wywołuje wprawdzie silne upośledzenie wbudowywania fenyloalaniny pod wpływem poli-U ale jednocześnie wzmaga w znacznym stopniu wbudowywanie seryny, leucyny i izoleucyny — aminokwasów, nie kodowanych normalnie przez ten polinukleotyd.

Jak już wspomniano wyżej, czynniki podwyższające zdolność kompleksotwórczą tRNA mogą powodować również błędne odczytywanie kodu (61). Syntetazy aminoacylo-tRNA mogą też do pewnego stopnia wpływać na rodzaj wbudowywanego aminokwasu. Do wniosku takiego dochodzi Commoner na podstawie badań nad syntetazami pochodzącymi z różnych źródeł. Syntetaza fenyloalanylo-tRNA, wydzielona z *E. coli* przyłącza fenyloalaninę do jednego tylko, określonego tRNA z *E. coli*. Natomiast przy użyciu enzymu pochodzącego z *Neurospora crassa* obserwowano przyłączanie tego aminokwasu do drugiego jeszcze, nieswoistego adapteru. Pociąga to za sobą zmiany w sekwencji aminokwasowej syntetyzowanego białka. Zdaniem autora również i polimeraza DNA może wpływać na rodzaj budowanego białka (10).

Nie wykluczone jest, że i inne ogniwa procesu transkrypcji i translacji kodu wywierają wpływ na jego prawidłowe odczytywanie, a tym samym regulują i korygują do pewnego stopnia syntezę białka.

LITERATURA

1. Apgar J., Holley R. W., Merrill S. H., *J. Biol. Chem.* **237**, 796 (1962).
2. Arnstein H. R. V., *Biochem. J.* **81**, 24P (1961).
3. Arnstein H. R. V., Cox R., Hurt J., *Nature* **194**, 1042 (1962).
4. Bishop J. O., *Nature* **203**, 40 (1964).
5. Brenner S., Jacob F., Meselson M., *Nature* **190**, 576 (1961).
6. Burke E. R., Marks P. M., *J. Mol. Biol.* **9**, 439 (1964).
7. Butler J. A. V., *Nature* **199**, 68 (1963).
8. Chapeville F., Cartouzou G., Lissitzky S., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 486 (1963).
9. Chapeville F., Lipmann F., von Ehrenstein G., Weisblum B., Roy W. J., Benzer S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1086 (1962).
10. Commoner B., *Nature* **203**, 486 (1964).
11. Coolsma J. W., Ab G., Gruber M., VI Internatl. Congr. Biochem. New York, 1964, Abstr. 1, 49.
12. Cox R. A., Gould H. R., Arnstein H. R. V., VI Internatl. Congr. Biochem. New York 1964, Abstr. 1, 49.
13. Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., *Nature* **192**, 1227 (1961).
14. Dunn D. B., Smith J. D., Spahr P. F., *J. Mol. Biol.* **2** 113 (1960).
15. Eck R. V., *Science* **140**, 477 (1963).
16. von Ehrenstein G., Dais D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 81 (1963).
17. Engelberg H., Artman M., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 256 (1964).

http://rcin.org.pl

18. Geiduschek E. P., Moohr J. W., Weiss S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1078 (1962).
19. Geiduschek E. P., Nakamoto T., Weiss S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1405 (1961).
20. Georgiev G. P., Mantieva V. L., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 153 (1962).
21. Gierer A., *J. Mol. Biol.* **6**, 148 (1963).
22. Gold M., Hurwitz J., Anders M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 107 (1963).
23. Goodman H. M., Rich P. A., *Nature* **199**, 318 (1863).
24. Greengard O., Smith M. A., Acs G., *J. Biol. Chem.* **238**, 1548 (1963).
25. Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C. G., Risebrough R. W., Watson J. D., *Nature* **190**, 581 (1961).
26. Guttman B. S., Novick A., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 373 (1963).
27. Hall B., Doty P., *J. Mol. Biol.* **1**, 111 (1959).
28. Hendler R. W., *Science* **142**, 402 (1963).
29. Hershey A. D., Dixon J., Chase M., *J. Gen. Physiol.* **36**, 777 (1953).
30. Hiatt H. M., *J. Mol. Biol.* **5**, 217 (1962).
31. Holley R. W., Everett G. A., Madison J. T., Marquisee M., Zamir A., VI Internatl. Congr. Biochem. New York 1964, Abstr. 1, 9.
32. Hoyer B. H., McCarthy B. J., Bolton E. J., *Science* **140**, 1408 (1963).
33. Hurwitz J., Furth J. J., Anders M., Evans A., *J. Biol. Chem.* **237**, 3752 (1962).
34. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
35. Kidson Ch., Kirby K. S., *Nature* **203**, 599 (1964).
36. Korner A., *Biochim. J.* **92**, 449 (1964).
37. Langridge R., *Science* **140**, 1000 (1963).
38. Littauer U., VI Internatl. Congr. Biochem. New York 1964, Abstr. 1, 11.
39. Mandel L. R., Borek E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 138 (1961).
40. Marmur J., Greenspan C. M., *Science* **142**, 387 (1963).
41. Martin R. G., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 349 (1963).
42. Matthaei H., Nirenberg M. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 404 (1961).
43. Nirenberg M., Lederer P., *Science* **145**, 1399 (1964).
44. Nirenberg M. W., Matthaei H., Jones D., Martin R., Barondes S., *Fed. Proc.* **22**, 55 (1963).
45. Noll H., Staehelin T., Wettstein F. O., *Nature* **198**, 632 (1963).
46. Nomura M., Hall B., Spiegelman S., *J. Mol. Biol.* **2**, 306 (1960).
47. Ochoa S., VI Internatl. Congr. Biochem., New York 1964, Abstr. 1, 35.
48. Peterkofsky A., Jesensky C., Bank A., Mehler A. H., *J. Biol. Chem.* **239**, 2918 (1964).
49. Peterman M. L., Hamilton M. C., *J. Biol. Chem.* **224**, 725 (1957).
50. Santer M., *Science* **141**, 1049 (1963).
51. Schachman H. K., Pardee A. B., Stanier R. Y., *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 245 (1952).
52. Scott R. B., Bell E., *Science* **145**, 711 (1964).
53. Sherrer K., Darnell J. E., *Biochem, Biophys. Res. Comm.* **7**, 486 (1962).
54. Spahr P. F., Hollingworth B. R., *J. Biol. Chem.* **236**, 823 (1961).
55. Spiegelman S., *Fed. Proc.* **22**, 36 (1963).
56. Spirin A. S., Kisselev N. A., VI Internatl. Congr. Biochem. New York 1964, Abstr. 1, 32.
57. Staehelin T., *J. Mol. Biol.* **8**, 470 (1964).

http://rcin.org.pl

58. Staehelin T., Brinton C. C., Wettstein F. O., Noll E., *Nature* **199**, 865 (1963).
59. Staehelin T., Wettstein F. O., Noll H., *Science* **140**, 180 (1963).
60. Strelzoff E., Ryan F. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 471 (1962).
61. Szer W., Ochoa S., *J. Mol. Biol.* **8**, 823 (1964).
62. Szer W., Świerkowski M., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 87 (1963).
63. Takanami M., Okamoto T., *J. Mol. Biol.* **7**, 323 (1963).
64. Tata J. R., *Nature* **197**, 1167 (1963).
65. Tissieres A., Watson J. D., *Nature* **182**, 778 (1958).
66. Tissieres A., Watson J. D., Schlesinger D., Hollingworth B. R., *J. Mol. Biol.* **1**, 221 (1959).
67. Volkin E., Astrachan L., *Virology* **2**, 149 (1956).
68. Wahba A. J., Basilio C., Speyer J. F., Lengyel P., Miller R. S., Ochoa S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1683 (1962).
69. Warner J. R., Rich A., Hall C. E., *Science* **138**, 1399 (1962).
70. Wartak J., *Post. Biochem.* **9**, 367 (1963).
71. Watson J. D., *Science* **140**, 17 (1963).
72. Watson J. D., VI Internatl. Congr. Biochem. New York 1964, Abstr. 1, 29.
73. Weinstein I., Sager R., Fresco J., *Fed. Proc.* **22**, 664 (1963).
74. Weissblum B., Benzer S., Holley R. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1449 (1962).
75. Wettstein F. O., Staehelin T., Noll H., *Nature* **197**, 430 (1963).
76. Wilkins M. H. F., *Science* **140**, 941 (1963).
77. Winckelmans D., Hill M., Errera M., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 52 (1964).
78. Zabin I., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 431 (1963).
79. Zubay G., *Science* **140**, 1092 (1963).

http://rcin.org.pl

P O S T Ę P Y B I O C H E M I I

TOM XI 1965 ZESZYT 3

*ZDZISŁAW WOJCIECHOWSKI**

Fitochrom

Phytochrome

The properties and function of phytochrome — a protein participating in the photocontrol of growth and development of plants are reviewed.

Odkryty niedawno w tkankach wielu roślin niebieski chromoproteid — fitochrom jest, jak wykazały liczne prace, ważnym składnikiem aparatu kierującego fotomorfogenezą, to jest kontrolującego szereg zależnych od światła procesów związanych ze wzrostem i rozwojem roślin. Do procesów tych należą: kwitnienie, kiełkowanie nasion, wydłużanie łodygi, rozwój plastydów, ruchy nastyczne liści, ruchy fototaktyczne chloroplastów. Istnieją dane, że fitochrom uczestniczy również w biosyntezie antocyjanin i chlorofilu oraz metabolizmie tłuszczów w komórkach roślinnych.

Prace fizjologiczne, których następstwem było odkrycie fitochromu, prowadzone były głównie w *Plant Industry Station* w Beltsville (Stany Zjednoczone) przez Borthwicka, Hendricksa, Downsa i Siegelmana począwszy od lat czterdziestych bieżącego stulecia (3, 4, 9, 18, 19). Wymieniona grupa badaczy, jeszcze przed wyizolowaniem fitochromu z tkanek roślinnych i zbadaniem *in vitro* jego właściwości, postulowała powszechną obecność w świecie roślinnym światłoczułego barwnika biorącego udział w licznych, zależnych od światła procesach zachodzących w roślinach. Przypuszczenia te wynikały z porównania widm czynnościowych różnych, zależnych od światła reakcji fizjologicznych, takich jak: fotoperiodyczna indukcja kwitnienia, kiełkowanie nasion, przeciwdziałanie wypłonieniu itp. Stwierdzenie w wielu przypadkach aktywności światła czerwonego i hamującego efektu dalekiej czerwieni nasuwało wniosek, że procesy te sterowane są przez bliżej nieznany czynnik istniejący w dwóch formach przekształcających się w siebie wzajemnie pod wpływem światła (17, 18, 19). Jedna z form tego czynnika, posiadająca maksimum absorpcji przy 660 mμ (F_{660}), przechodzi

* Mgr, asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

http://rcin.org.pl

w formę o maksimum absorpcji przy 730 mμ (F_{730}) pod wpływem promieniowania czerwonego, przy czym maksymalny efekt posiada światło o długości fali 660 mμ. Odwrotna przemiana, tj. przejście formy F_{730} w formę F_{660}, wywoływane jest przez daleką czerwień, przy czym maksymalny efekt wykazuje światło o długości fali 730 mμ, lub też zachodzi (chociaż znacznie wolniej) w ciemności (schemat 1) (6).

$$F_{660} \underset{730\ m\mu}{\overset{660\ m\mu}{\rightleftharpoons}} F_{730} \xrightarrow{\text{w ciemności}} F_{660}$$

Schemat 1. Przekształcenia form fitochromu. Przy strzałkach podane są długości fal światła najbardziej efektywnego dla przemiany.

Zakres absorpcji światła wskazywał, że czynnik ten, który nazwano fitochromem, jest najprawdopodobniej niebieski lub niebieskozielony.

I. Własności

Zakres pochłaniania światła stanowi istotną trudność bezpośredniego wykazania obecności fitochromu w tkankach roślin. Ze względu na wysoką absorpcję chlorofilu w zakresie czerwieni bezpośrednie pomiary spektrofotometryczne możliwe były jedynie w tkankach roślin albinotycznych, etiolowanych i niektórych owocach. Natomiast rośliny albinotyczne i etiolowane, zawierające najwyżej bardzo nieznaczną ilość chlorofilu, nie wykazują widocznego niebieskiego zabarwienia, które przypisywano fitochromowi na podstawie widm czynnościowych.

Dopiero w 1959 roku udało się Butlerowi, Norrisowi, Siegelmanowi i Hendricksowi przy pomocy specjalnie skonstruowanego spektrofotometru o wysokiej czułości wykazać obecność fitochromu w materiale roślinnym (8). Zastosowana metoda spektrofotometrii różnicowej okazała się szczególnie pomocna w badaniu fitochromu. Polegała ona na pomiarze zmian w różnicach absorpcji materiału przed i po fotokonwersji zawartego w nim barwnika z jednej formy w drugą — czyli wartości $(E) = (F_{660} - F_{730})_{660} - (F_{660} - F_{730})_{730}$, gdzie pierwsza pozycja odpowiada różnicy po naświetleniu światłem o długości fali 660 mμ, druga — różnicy po naświetleniu światłem o długości fali 730 mμ. Metodą tą wykazano obecność fitochromu w tkankach 7-dniowych siewek rzepy rosnących w ciemności, a następnie w kiełkach wielu roślin, m.in. kukurydzy, jęczmienia, sorga, pszenicy, ryżu, owsa, różnych odmian fasoli (8) oraz w tkankach etiolowanego grochu (2). Materiałem do badań były wodne, zasadowe ekstrakty z tkanek etiolowanych roślin lub z kiełków. Ekstrakty te zawierały fitochrom wykazujący zdolność do fotoodwracalnego przechodzenia z jednej formy w drugą.

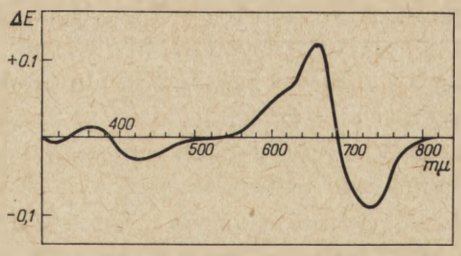
http://rcin.org.pl

Bliższe badania wykazały, że fitochrom wykazuje własności białek. Można go wysolić z roztworu siarczanem amonu łącznie z całą frakcją białkową. Czynniki denaturujące białka, jak ogrzewanie do 60°, działanie kwasami, 4 M roztworem mocznika lub trawienie trypsyną, powodują utratę zdolności do fotokonwersji. Zdolność ta nie zostaje jednak utracona w wyniku dializy, co wskazuje na trwałe przyłączenie chromoforu do cząsteczki białka (8).

Izolowanie i oczyszczanie fitochromu można przeprowadzić metodami powszechnie stosowanymi w preparatyce białek. Jakkolwiek rośliny etiolowane stanowią, ze względu na nieznaczną ilość chlorofilu zawartego w ich tkankach, najdogodniejszy materiał do wyodrębniania fitochromu, w 1962 roku udało się izolować go również z roślin zielonych, m.in. z liści szpinaku (24).

Standardowa metoda otrzymywania preparatów fitochromu polega na homogenizacji zamrożonych tkanek etiolowanego jęczmienia, owsa lub kukurydzy w temperaturze — 40° i ekstrakcji roztworem buforowym o *pH* 8,5, który zawiera 0,5 % *2*-merkaptoetanolu lub innego czynnika z wolnymi grupami -SH. Uzyskany ekstrakt, po usunięciu pozostałości komórek, poddaje się ultrafiltracji, filtracji na *Sephadex* G-50, a następnie adsorbuje się fitochrom na hydroksyloapatycie. Z eluatu usuwa się resztę białek towarzyszących przez wytrącanie siarczanem amonu i filtrację na *Sephadex* G-200 (33, 34, 35). Otrzymane w ten sposób wzbogacone roztwory fitochromu mają niebieską barwę i wykazują odwracalną fotokonwersję charakterystyczną dla tego barwnika.

Widmo różnicowe fitochromu z etiolowanej kukurydzy podane jest na rysunku 1.



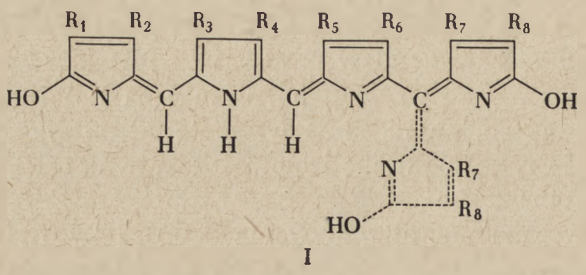
Rys. 1. Widmo różnicowe fitochromu (F_{660} — F_{730}) z kukurydzy (20)

Budowa chromoforu fitochromu nie została dotąd ustalona. Zakres absorpcji dla przenoszenia elektronowego wskazuje na obecność w nim co najmniej dziesięciu sprzężonych wiązań podwójnych w prawdopodobnie płaskim układzie. Widmo absorpcyjne fitochromu w zakresie 300-700 mμ jest bardzo zbliżone do widma allofikocyjaniny — barwnika wyodrębnionego z licznych glonów (20).

Grupą prostetyczną allofikocyjaniny jest bilidien, co nasuwa przy-

http://rcin.org.pl

puszczenie, że chromofor fitochromu jest bilidienem lub bilitrienem. Związki tego typu mają możliwość licznych izomeryzacji. Nie jest wykluczone, że fotokonwersja jednej formy fitochromu w drugą związana jest z izomeryzacją *cis-trans*, jak to ma miejsce w przypadku barwnika wzrokowego, rodopsyny. Dwie formy bilitrienu: *cis-cis-cis* i *cis-cis-trans* (linie przerywane) przedstawia wzór I.



I

Oprócz przegrupowań *cis-trans* istnieje jeszcze inna możliwość izomeryzacji — a mianowicie przemiana laktam-laktym w końcowych pierścieniach pirolowych (15, 35).

Jak już zaznaczono, czynniki denaturujące białka niszczą zdolność do fotokonwersji fitochromu. Wskazuje to wyraźnie na zależność molekularnej konfiguracji chromoforu od związanego z nim białka (35). Ekstrakt zawierający fitochrom wykazuje częściową fotokonwersję przy $-40°$, lecz traci ją przy $-100°$. Po rozmrożeniu roztworu zdolność do fotokonwersji zostaje przywrócona (16). Kinetyka fotokonwersji fitochromu jest pierwszego rzędu zarówno dla fototransformacji F_{660} w F_{730}, jak i F_{730} w F_{660}. Wyizolowany fitochrom nie wymaga dla fotoodwracalności przemiany jednej formy w drugą żadnego kofaktora. Wskazuje to wyraźnie na monomolekularny charakter fotoreakcji. Zachodząca w ciemności przemiana F_{730} w F_{660} ma jednak prawdopodobnie zróżnicowaną kinetykę (7).

Brak dotychczas dokładnych danych odnośnie lokalizacji układu fitochromowego w komórkach roślinnych. Zdaniem Bocka i Haupta, którzy przeprowadzali badania ruchów fototaktycznych chloroplastów u *Mougeotia* przy zastosowaniu wiązek o niewielkich przekrojach czerwonego światła — fotoreceptor, tj. fitochrom jest zlokalizowany raczej w cytoplazmie niż w chloroplastach (1).

II. Rola biologiczna

Jak już wspomniano, przypisuje się układowi fitochromowemu udział w kontroli wielu procesów związanych z rozwojem roślin. Jedyną jak dotychczas metodą identyfikowania zależnych od układu fitochromowe-

http://rcin.org.pl

go przemian jest badanie ich widm czynnościowych. Obecność charakterystycznego dla systemu fitochromowego antagonizmu czerwień — daleka czerwień świadczy o kierującej roli fitochromu w danym procesie.

1. Kiełkowanie nasion

Wpływ światła na kiełkowanie nasion jest powszechnie znany. Prace Flinta i McAlistera (11) z 1935 roku wykazały, że światło czerwone wywołuje kiełkowanie nasion sałaty, podczas gdy światło o dłuższych falach z pogranicza czerwieni i podczerwieni hamuje kiełkowanie. Nasiona sałaty przechowywane w ciemności nie kiełkują, podczas gdy umieszczone na świetle kiełkujm w 90-100 %. W 1962 roku Borthwick, Hendricks, Parker, Toole i Toole przeprowadzili szczegółowe badania tego zjawiska. Sporządzono widmo czynnościowe naświetlając nasiona światłem o różnych długościach fal i mierząc energię konieczną do wywołania 50 % kiełkowania. Wykazano, że najbardziej aktywne było światło czerwone w zakresie 650-660 mμ, jednakże stymulujący efekt światła czerwonego był znoszony przez następne naświetlenie daleką czerwienią, przy czym maksymalny efekt hamujący miało światło o długości fal 730 mμ. Układ czerwień — daleka czerwień jest całkowicie odwracalny. Jeżeli nasiona sałaty podda się serii przemiennych naświetlań czerwienią i daleką czerwienią, efekt uzależniony jest od rodzaju światła użytego na końcu. Podobnie jak nasiona sałaty, zachowują się nasiona licznych innych roślin (13, 39) i zarodniki paproci (26).

2. Zjawiska fotoperiodyczne

Widma czynnościowe wykazały, że układ fitochromowy kontroluje kwitnienie zarówno roślin „długiego dnia" (5), jak i „krótkiego dnia" (31).

Rośliny wystawione na działanie fotoperiodu krótki dzień — długa noc i naświetlone krótko w pobliżu środka okresu nocnego zachowują się tak, jak gdyby znajdowały się pod działaniem fotoperiodu krótka noc — długi dzień. Oznacza to, że u roślin „krótkiego dnia" kwitnienie jest hamowane, podczas gdy u roślin „długiego dnia" — indukowane. Światło czerwone o długości fali 660 mμ jest również w tym przypadku, tak jak i w procesie kiełkowania najbardziej aktywne, podczas gdy daleka czerwień z maksimum przy długości fali około 730 mμ znosi działanie czerwieni (15).

Na podstawie tych wyników wydaje się prawdopodobne, że kwitnienie roślin jest określone przez odpowiedni stosunek stężeń obu form fitochromu (35).

http://rcin.org.pl

3. Rozwój plastydów

Proplastydy roślin hodowanych w ciemności przekształcają się na świetle w chloroplasty. Zmianom strukturalnym towarzyszy wzrost stężenia chlorofilu. Proces syntezy chlorofilu może zostać przyspieszony, jeżeli podda się liście roślin rosnących w ciemności krótkiemu naświetlaniu światłem czerwonym na kilka godzin przed umieszczeniem ich na świetle o pełnym zakresie długości fal. Maksymalny efekt daje światło o długości fali 660 mμ, natomiast światło niebieskie jest zupełnie nieczynne. Należy zaznaczyć, że widmo czynnościowe przemiany protochlorofilu w chlorofil posiada maksima zarówno w czerwonej, jak i w niebieskiej części widma (23). Jak wykazali Price i Klein, daleka czerwień odwraca efekt naświetlania czerwienią (32).

Wydaje się, że ruchy fototaktyczne chloroplastów są również indukowane przez system fitochromowy (1, 14). Przypuszcza się również, że fitochrom bierze udział w specyficznej reakcji chloroplastów — kurczeniu się pod wpływem światła do 50-80 % pierwotnej objętości (22).

III. Funkcja biochemiczna

Ostateczna odpowiedź na pytanie, czy fitochrom jest enzymem, czy też hormonem tego typu co auksyny lub gibereliny — nie jest obecnie możliwa.

Różnorodność procesów kontrolowanych przez układ fitochromowy skłania ku wnioskowi o jego hormonalnym charakterze. Uniwersalność działania fitochromu można jednak również wyjaśnić zakładając, że jest to enzym katalizujący jakąś ważną a nieznaną dotychczas reakcję chemiczną, wspólną dla wielu różnych dróg metabolicznych.

1. Biosynteza antocyjanin

Najpoważniejszym dowodem przemawiającym za enzymatycznym charakterem fitochromu jest jego udział w fotokontroli syntezy antocyjanin.

Biosynteza barwników antocyjaninowych zachodzi jedynie na świetle. Widma czynnościowe wykonane dla siewek sorga (10), czerwonej kapusty (36) i gorczycy (27) wskazują na konieczność dla syntezy antocyjanin dwóch fotoreakcji, z których jedna ma widmo czynnościowe przemiany F_{660} w F_{730} (10, 36). F_{730} kontroluje więc jeden z etapów syntezy antocyjanin.

Jak stwierdzili Siegelman i Hendricks (37, 38), w ciemności skórka jabłka umieszczona w roztworze sacharozy wytwarza aldehyd octowy i etanol. Naświetlenie czerwienią hamuje powstawanie tych

http://rcin.org.pl

związków a przyspiesza syntezę antocyjanin. Wyniki te sugerują, że reakcja katalizowana przez aktywną formę fitochromu czyli F_{730}, związana jest z przemianą jakiegoś dwu- lub trójwęglowego związku, na przykład pirogronianu lub octanu. Związek ten, w ciemności zużywany do syntezy etanolu, wykorzystywany jest na świetle — przy udziale systemu fitochromowego — do syntezy antocyjanin.

Zdaniem Siegelmana i Hendricksa fitochrom prawdopodobnie katalizuje reakcję związaną z syntezą lub ze zużyciem acetylo-koenzymu A (35).

Centralna pozycja acetylo-koenzymu A w metabolizmie jest obecnie dobrze znana. Zachodzące podczas kiełkowania uruchomienie rezerw tłuszczowych i uaktywnienie procesów oddechowych jest ściśle związane z powstawaniem i zużywaniem acetylo-koenzymu A. Wiadomo, że jest on prekursorem jednostki C_6, czyli układu floroglucynolowego, który w wyniku kondensacji z jednostką C_6-C_3 (kwas prefenowy) daje charakterystyczny dla flawonoidów układ C_6-C_3-C_6 (30).

2. Kontrola kwitnienia

Biochemia procesu kwitnienia jest słabo poznana. Przyjmuje się powszechnie, że kwitnienie odbywa się pod kontrolą hormonu, zwanego florigenem. Nie jest wykluczone, że jest on związkiem sterydowym (35). Zmiany jakościowe steroli obserwowane u niektórych roślin w okresie kwitnienia (25) i hamowanie kwitnienia przez inhibitory syntezy steroli (40) przemawiają na korzyść tego poglądu. Możliwe więc, że udział fitochromu w kontroli kwitnienia odbywa się poprzez kierowanie zużyciem acetylo-koenzymu A do syntezy hormonu kwitnienia (35).

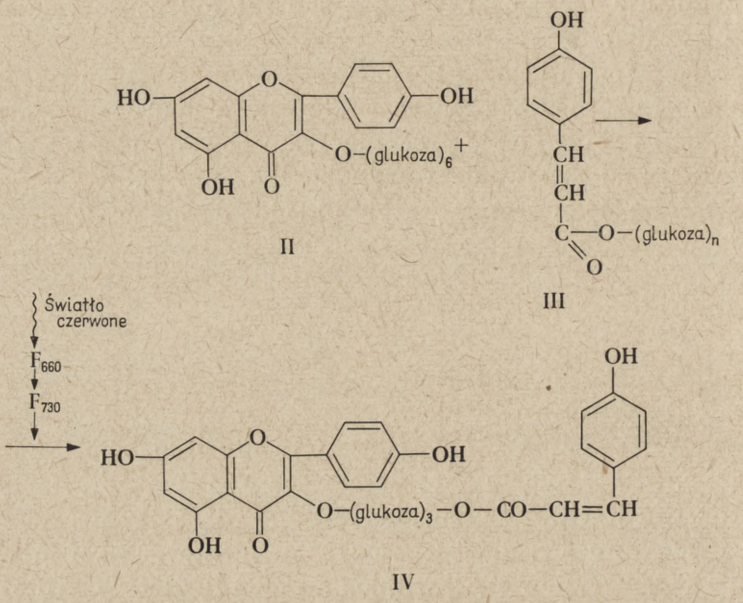
3. Kontrola auksyn

Różnorodność działania fitochromu dałaby się wyjaśnić przy założeniu, że bierze on udział w kontroli auksyn. Otóż istnieją dane sugerujące taką możliwość. Jak wykazali Hillman i Galston (21), aktywność oksydazy kwasu indolilooctowego w pąkach etiolowanego grochu spada po naświetleniu światłem czerwonym (640 mμ). Efekt ten zostaje odwrócony przez daleką czerwień, przy czym najsilniejszą zdolność hamowania ma światło o długości fali 730 mμ. Tak więc widma czynnościowe wpływu światła na aktywność tego enzymu są charakterystyczne dla udziału układu fitochromowego.

Mumford, Smith i Castle (28), poszukując przyczyn spadku aktywności oksydazy kwasu indolilooctowego, wykazali, że naświetlenie etiolowanego grochu światłem czerwonym powoduje wzrost zawartości

http://rcin.org.pl

flawonoidu dającego w wyniku hydrolizy kampferol, glukozę i kwas 4-hydroksycynamonowy. Flawonoid ten jest silnym inhibitorem oksydazy kwasu indolilooctowego. Występuje on również w roślinach rosnących w ciemności, jednak w znacznie mniejszej ilości. Bliższe badania flawonoidów znajdujących się w pąkach grochu rzuciły nieco światła na mechanizm regulacji aktywności kwasu indolilooctowego (schemat 2) (29). Okazało się, że ekstrakty z pąków grochu rosnącego w ciemności



Schemat 2. Kierowane przez fitochrom przemiany flawonoidów w pąkach grochu (objaśnienia w tekście)

zawierają głównie flawonoid, który najprawdopodobniej jest 3-(heksaglukozylo)kampferolem (II) i niewielką ilość flawonoidu zidentyfikowanego jako 3-(4-hydroksycynamoilotrójglukozylo)kampferol (IV). Naświetlenie światłem czerwonym etiolowanych roślin powoduje 2—3-krotny wzrost zawartości ostatniego związku (29). Chromatograficzne badanie ekstraktów z pąków grochu rosnącego w ciemności wykazało również obecność bliżej niezidentyfikowanych estrów glukozy i kwasu 4-hydroksycynamonowego (III), które znane są jako doskonałe kofaktory oksydazy kwasu indolilooctowego (12).

Zdaniem wymienionych autorów, spadek aktywności oksydazy kwasu indolilooctowego po naświetleniu światłem czerwonym związany jest z przemianami flawonoidów, a mianowicie czerwone światło wywołuje reakcję wymiany pomiędzy heksaglukozydem kampferolu (II) i estrami glukozy i kwasu 4-hydroksycynamonowego (III) z powstaniem 3-(4-hydroksycynamoilotrójglukozylo)kampferolu (IV). Tak więc spadek aktywności oksydazy kwasu indolilooctowego związany byłby z wyelimino-

http://rcin.org.pl

waniem kofaktora (estry glukozy i kwasu cynamonowego) i powstaniem inhibitora (*3*-(*4*-hydroksycynamoilotrójglukozylo)-kampferol). Udział fitochromu w tej reakcji jest wysoce prawdopodobny (29).

Jakkolwiek pełne wyjaśnienie budowy, własności i sposobu działania fitochromu wymaga jeszcze szerokich badań, niemniej jednak jego wielostronny udział w kierowaniu wzrostem i rozwojem roślin nie ulega wątpliwości. Z przytoczonych przykładów udziału układu fitochromowego w różnych zależnych od światła procesach fizjologicznych wynika wniosek, że fitochrom jest ważnym składnikiem mechanizmu, który — poprzez zmiany metabolizmu — umożliwia odpowiednią reakcję na zmiany warunków oświetlenia, tak istotnych dla fotosyntetyzujących organizmów roślinnych.

LITERATURA

1. Bock G., Haupt W., *Planta* **57**, 518 (1961).
2. Bonner B. A., *Plant Physiol.* **35**, xxxii (1960).
3. Borthwick H. A., Hendricks S. B., *Science* **132**, 1223 (1960).
4. Borthwick H. A., Hendricks S. B., Parker M. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **38**, 929 (1952).
5. Borthwick H. A., Hendricks S. B., Parker M. W., *Bot. Gaz.* **110**, 103 (1948).
6. Borthwick H. A., Hendricks S. B., Parker M. W., Toole E. H., Toole V. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **38**, 662 (1952).
7. Butler W. L., Proceedings of the 3-rd International Congress on Photobiology, red. B. Ch. Christensen i B. Buchmann, Amsterdam 1961, str. 569.
8. Butler W. L., Norris K. H., Siegelman H. W., Hendricks S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 1703 (1959).
9. Downs R. J., *Plant Physiol.* **31**, 279 (1956).
10. Downs R. J., Siegelman H. W., *Plant Physiol.* **38**, 25 (1963).
11. Flint L. H., McAlister E. D., *Smithsonian. Misc. Pub.* **99**, 5 (1935).
12. Gortner W. A., Kent M. J., Sutherland G. K., *Nature* **181**, 630 (1958).
13. Grant Lipp A. E., Ballard L. A. T., *Austr. J. Biol. Sci.* **16**, 572 (1963).
14. Haupt W., Thiele R., *Planta* **56**, 388 (1961).
15. Hendricks S. B., Photophysiology, tom. I, red. A. C. Giese, New York 1964, str. 317.
16. Hendricks S. B., Comparative Effects of Radiation, red. M. Burton, J. C. Kirby-Smith, J. L. Magee, New York-London 1960, str. 22.
17. Hendricks S. B., Borthwick H. A., *Bot. Gaz.* **120**, 187 (1959).
18. Hendricks S. B., Borthwick H. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 344 (1959).
19. Hendricks S. B., Borthwick H. A., Downs R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **42**, 19 (1956).
20. Hendricks S. B., Butler W. L., Siegelman H. W., *J. Phys. Chem.* **66**, 2550 (1962).
21. Hillman W. S., Galston A. W., *Plant Physiol.* **32**, 129 (1957).
22. Izawa S., Itoh M., Shibata K., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 349 (1963).

http://rcin.org.pl

23. Koski V. M., French C. S., Smith J. H. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **31**, 1 (1951).
24. Lane H. C., Siegelman H. W., Butler W. L., Firer E. M., *Plant Physiol.* **38**, 414 (1962).
25. Marker R. E., Wagner R. B., Ulshafer P. R., Wittbecker E., Goldsmith D. P. J., Ruof C. H., *J. Am. Chem Soc.* **65**, 1199 (1943).
26. Mohr H., *Planta* **46**, 534 (1956).
27. Mohr H., *Planta* **46**, 389 (1957).
28. Mumford F. E., Smith D. H., Castle J. E., *Plant Physiol.* **36**, 752 (1961).
29. Mumford F. E., Smith D. H., Heytler P. G., *Biochem. J.* **91**, 517 (1964).
30. Neisch A. C., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **10**. 55, (1960).
31. Parker M. W., Hendricks S. B., Borthwick H. A., *Bot. Gaz.* **108**, 242 (1946).
32. Price L., Klein W. H., *Plant Physiol.* **36**, 733 (1961).
33. Siegelman H. W., Firer E. M., *Anal. Biochem.* **3**, 434 (1962).
34. Siegelman H. W., Firer E. M., Butler W. L., Hendricks S. B., *Plant Physiol.* **36** (Suppl.), xlii (1961).
35. Siegelman H. W., Hendricks S. B., *Adv. Enzymol.* **26**, 1 (1964).
36. Siegelman H. W., Hendricks S. B., *Plant Physiol.* **32**, 393 (1957).
37. Siegelman H. W., Hendricks S. B., *Plant Physiol.* **33**, 409 (1958).
38. Siegelman H. W., Hendricks S. B., *Plant Physiol.* **33**, 185 (1958).
39. Toole E. H., Toole V. K., Hendricks S. B., Borthwick H. A., *Proc. Intern. Seed Test Assoc.*, Copenhagen **22**, 1 (1956).
40. Zeevaart J. A. D., Environmental Control of Plant Growth, red. L. T. Evans, New York 1963, str. 289.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOCHEMII
TOM XI 1965 ZESZYT 3

*ANDRZEJ Z. BUDZYŃSKI**

Współczesne poglądy na czynnik stabilizujący fibrynę (FSF)

Modern views on fibrin stabilizing factor (FSF)

The problem of the clot stabilisation under the action of FSF in the third phase of blood coagulation is reviewed from the biochemical point of view. Some properties of desmofibrin are presented.

Utrzymanie krwi w łożu naczyniowym w stanie ciekłym zabezpieczone jest równowagą układów enzymatycznych, przyspieszających lub hamujących aktywację protrombiny. Przesunięcie równowagi w kierunku nagromadzenia się aktywatorów protrombiny prowadzi do zwiększonego wytwarzania trombiny uruchamiającej proces hemostazy — konwersję fibrynogenu w fibrynę. Konwersja ta zachodzi w trzech fazach różniących się wyraźnie pod względem reakcji chemicznych i zjawisk fizycznych wywołanych działaniem trombiny na fibrynogen (schemat 1).

$$\text{Fibrynogen} \xrightarrow{\text{trombina}} \text{monomer fibryny} + \text{fibrynopeptydy} \qquad 1.$$

$$\text{Monomer fibryny} \rightleftarrows \text{polimer fibryny} \qquad 2.$$

$$\text{Polimer fibryny} \longrightarrow \text{desmofibryna} \qquad 3.$$

Schemat 1. Reakcje zachodzące w czasie przemiany fibrynogenu w desmofibrynę

Reakcja 1 opisuje ograniczoną proteolizę fibrynogenu wywołaną działaniem trombiny. Odszczepienie silnie elektroujemnych fibrynopeptydów umożliwia utworzonemu monomerowi fibryny samorzutną polimeryzację przedstawioną w reakcji 2. Chociaż w tym etapie powstaje już widoczny skrzep, procesy chemiczne odbywają się nadal. Ostatnia faza 3 obejmuje stabilizację, czyli procesy związane z wytwarzaniem poprzecznych wiązań kowalencyjnych pomiędzy liniowymi polimerami fibryny. W rezultacie powstaje fibryna o usztywnionej przestrzennej sieci, nazwana przez Buluka i Małofiejewa (5) desmofibryną; termin ten będzie stosowany w niniejszym artykule.

* Dr, sam. prac. nauk. — badawczy Zakładu Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych w Warszawie.

http://rcin.org.pl

Dwie pierwsze fazy krzepnięcia, tzn. ograniczona proteoliza fibrynogenu oraz polimeryzacja monomeru fibryny są dosyć dobrze poznane i scharakteryzowane. Natomiast badania nad fazą stabilizacji rozwinęły się dopiero w ostatnich latach i brak jeszcze zgodności poglądów dotyczących mechanizmu reakcji. Wydaje się jednak, że układ ten stanowić może dobry model doświadczalny do badań nad przekształcaniem się rozpuszczalnych białek włóknistych w nierozpuszczalne złogi.

Zjawisko stabilizacji fibryny zostało odkryte w toku obserwacji nad rozpuszczalnością skrzepów. Stwierdzono, że w przeciwieństwie do skrzepów utworzonych z osocza, skrzepy otrzymywane z oczyszczonego fibrynogenu i trombiny rozpuszczają się w środowisku słabo kwaśnym względnie słabo zasadowym (47), a ponadto w roztworach: mocznika (20, 31), kwasu jednochlorooctowego (32), chlorku litu, bromku litu, bromku sodu i jodku sodu (13, 52), chlorowodorku guanidyny (52), soli kwasów żółciowych (15), soli sodowej siarczanu dodecylu lub bromku cetylo-trójmetylo-amoniowego (29), w wodnych emulsjach fosfatydylo-inozytolu i fosfatydylo-seryny (46) oraz w roztworze heparyny o niskiej sile jonowej (54).

Chociaż w obecnej chwili brakuje jednoznacznego tłumaczenia jakie typy wiązań biorą udział w wytwarzaniu polimeru z monomeru fibryny (reakcja 2), szereg danych wskazuje na to, że istotną rolę odgrywają wiązania wodorowe powstające pomiędzy resztami histydylowymi i tyrozylowymi sąsiadujących cząsteczek monomeru. W reakcji „koniec do końca" tworzy się liniowy polimer. Solubilizacja skrzepów w wymienionych roztworach byłaby wyrazem zrywania wiązań wodorowych wskutek konkurującego działania środowiska. Usunięcie z roztworu substancji solubilizującej powoduje na ogół powtórne pojawienie się skrzepu. Badając zjawisko rozpuszczania i pojawiania się skrzepu, Laki i Lorand (20) wykazali w 1948 roku, że dodanie do oczyszczonego fibrynogenu niewielkiej ilości osocza i jonów wapnia wystarcza, aby wytworzony po dodaniu trombiny skrzep uczynić nierozpuszczalny w większości wyżej wyszczególnionych roztworów. Zawarty w osoczu czynnik odpowiedzialny za to zjawisko określono jako stabilizator fibryny.

Surowica nie zawiera stabilizatora fibryny. Czynnik ten jest obecny przede wszystkim w osoczu ludzi i zwierząt. Własności stabilizowania fibryny przez autolizaty płytek krwi, wykazał Buluk (4) w 1955 roku, a w dwa lata później potwierdził Luscher (42). Czynność stabilizującą zaobserwowano także w mózgu, nerce, wątrobie, płucach oraz mięśniach myszy i szczura (55), a nawet w cyklostomach (36), co sugeruje szerokie rozpowszechnienie w przyrodzie substancji stabilizujących fibrynę.

W piśmiennictwie spotyka się kilka synonimów nazwy czynnika stabilizującego: Laki i Lorand nazwali go stabilizatorem fibryny (20), Shulman — czynnikiem surowiczym (51), inni autorzy (12, 22, 24) —

http://rcin.org.pl

czynnikiem LL (tzn. czynnikiem Laki—Lorand). Loewy i współpracownicy (26, 27, 28, 29) posługują się nazwą fibrynaza, wreszcie Lorand od 1950 roku używa konsekwentnie symbolu FSF (*fibrin stabilizing factor*). Ponieważ ostatnie określenie jest obecnie najczęściej stosowane, będzie także używane w niniejszym artykule. W 1963 roku FSF sklasyfikowany został w międzynarodowej nomenklaturze czynników krzepnięcia pod numerem XIII.

I. Oznaczanie, otrzymywanie i własności

Tekst, na podstawie którego można oznaczać aktywność FSF w pełnej krwi, w osoczu lub w oczyszczonych frakcjach jest bardzo prosty i polega na ocenie szybkości rozpuszczania się lub stopnia rozpuszczalności skrzepu w 5 M roztworze mocznika lub w 1 %-owym kwasie jednochlorooctowym. Szczególnie dogodny jest drugi roztwór, w którym solubilizacja niestabilizowanego skrzepu odbywa się znacznie szybciej aniżej w pierwszym. W pół godziny po skrzepnięciu pełnej krwi lub rekalcynowanego osocza dodaje się równą objętość 2 %-owego kwasu jednochlorooctowego i następnego dnia sprawdza się czy skrzep uległ rozpuszczeniu, czy też pozostał nierozpuszczony.

Dokładniejsze oznaczenie miana FSF w osoczu lub innym materiale zawierającym ten czynnik można wykonać metodą Loewy'ego i współpracowników (26), która nadaje się również do oznaczeń rutynowych. Z badanego materiału przygotowuje się serię rozcieńczeń, stosując do rozcieńczania 0,01 M roztwór cysteiny. Następnie dodaje się roztworu fibrynogenu nie zawierającego FSF i całość wykrzepia trombiną z dodatkiem chlorku wapnia. Brak FSF w fibrynogenie substratowym ustala się na podstawie braku stabilizacji fibryny wytworzonej pod działaniem trombiny bez dodatku osocza. Próbki inkubuje się w temperaturze pokojowej, dodaje 2 %-owego kwasu octowego i ustala się wizualnie, przy którym rozcieńczeniu znajdują się jeszcze resztki nierozpuszczonego skrzepu. Najwyższe rozcieńczenie badanego materiału, przy którym jeszcze pozostaje nierozpuszczony skrzep, określa się jako zawierające 1 jednostkę FSF w ml. Normalne ludzkie osocze mianowane według tej metody zawiera około 20 jednostek FSF w ml.

Buluk i współpracownicy (8) zaproponowali modyfikację metody Loewy'ego i współpracowników polegającą na orientacyjnym mianowaniu przy użyciu serii kolejnych dwukrotnych rozcieńczeń badanej próby i drugim bardziej precyzyjnym oznaczaniu już tylko w wąskim przedziale stężeń. Lorand (36) oraz Laki i Chandrasekhar (22) wprowadzili spektrofotometryczne oznaczenie w ultrafiolecie ilości rozpuszczalnego materiału białkowego w desmofibrynie, co zwiększyło znacznie czułość metody oznaczania FSF.

http://rcin.org.pl

Badanie powstawania desmofibryny jest, przynajmniej dotychczas, jedynym kryterium doświadczalnym umożliwiającym oznaczenie zawartości FSF w badanym materiale. Stwierdzono co prawda, że w porównaniu z fibryną niestabilizowaną desmofibryna ma większą wytrzymałość na rozciąganie (12, 32), lecz ze względu na kłopotliwą technikę pomiarową sposób ten nie został wykorzystany do ilościowego oznaczania FSF. Zaobserwowano także, że desmofibryna trudniej ulega solubilizacji wskutek proteolitycznego działania plazminy niż fibryna niestabilizowana (2, 3, 38, 55), jednakże test ten jest zbyt mało czuły dla celów analizy ilościowej FSF.

Już podczas pierwszych prób oczyszczania FSF zaobserwowano wielkie podobieństwo jego fizykochemicznych właściwości do właściwości fibrynogenu; FSF ma nieco większą masę cząsteczkową i nieco mniejszą asymetrię cząsteczki w porównaniu z fibrynogenem. Szczególnie niekorzystne dla preparatyki FSF jest jego współstrącanie się z fibrynogenem, jak również gromadzenie się podczas sączenia osocza przez kolumny zawierające *Sephadex* G-200 we frakcji zawierającej fibrynogen (23). W związku z tym poszukiwania prowadzono w dwóch kierunkach zmierzających z jednej strony do izolowania możliwie wysokooczyszczonego FSF, a z drugiej strony do otrzymania fibrynogenu całkowicie pozbawionego tego czynnika.

Opracowano kilka metod izolowania oczyszczonego FSF (25, 26, 33, 35); najlepszy preparat, oczyszczony około 8000 razy uzyskał Loewy i współpracownicy (26) za pomocą frakcjonowanego wysalania siarczanem amonu, a następnie chromatografii na DEAE-celulozie. Autorzy ci opisali także sposób otrzymywania fibrynogenu ludzkiego pozbawionego FSF, polegający na kilkakrotnym strącaniu siarczanem amonu w różnym *pH* (26). Sposób otrzymywania fibrynogenu bez FSF w wyniku chromatografii kolumnowej na DEAE-celulozie podali Lorand i Jacobsen (35) oraz Finlayson i Mosesson (14). Swigert, Koppel i Olwin (53) stosując *p*-chlorortęciobenzoesan inaktywowali FSF zawarty w preparatach fibrynogenu. Buluk (6) otrzymał monomer fibryny pozbawiony FSF stosując inkubację w 40%-owym roztworze mocznika.

Jeszcze zanim udało się oczyścić FSF, poznano już niektóre jego własności. Ulega on nieodwracalnej inaktywacji w temperaturze 56°, w środowisku o *pH* poniżej 5,0, w 8 M roztworze mocznika, podczas liofilizacji, a odwracalnej w obecności inhibitorów grup sulfhydrylowych. Aktywność FSF znika z roztworu po wykrzepieniu fibrynogenu trombiną wobec wapnia, jednak pewne działanie ochronne na roztwory FSF wywiera dodatek glicyny (28). Optimum działania FSF przypada na *pH* 7,6 i temperaturę 37° (6).

Loewy i współpracownicy (27) badając molekularne parametry FSF

http://rcin.org.pl

wykazali za pomocą immunodyfuzji w żelu oraz immunoelektroforezy, że rozcieńczenie jednorodnego preparatu, obniżenie *pH* lub też podwyższenie temperatury wywołuje pojawianie się nowych frakcji o mniejszej masie cząsteczkowej, co można tłumaczyć dysocjacją na podjednostki. Cysteina, a w mniejszym stopniu glicyna, alanina i arginina hamują dysocjację. Obraz FSF w mikroskopie elektronowym przedstawia cząsteczki o kształcie globularnym; ich masa cząsteczkowa wynosi około 350 000. Ponieważ masa cząsteczkowa podjednostki wynosi 110 000, nasuwa się wniosek, że natywny FSF składa się z trzech podjednostek. Podjednostki FSF nie mają własności stabilizacji fibryny.

Lorand (36) zaobserwował, że FSF w obecności cysteiny sedymentuje w ultrawirówce podobnie jak fibrynogen. Po usunięciu cysteiny zachodzi odwracalna agregacja, przy czym powstaje cały szereg ciężkich składników analogicznych do obserwowanych przy makroglobulinach szpiczaka. Jest to tym bardziej interesujące, że w makroglobulinemiach obserwuje się niedobór FSF.

Szczególną uwagę poświęcono zagadnieniu interakcji FSF z cysteiną, od dawna już bowiem zauważono, że cysteina wzmaga aktywność FSF w osoczu (tabl. 1).

Tablica 1

Wpływ cysteiny na aktywność FSF w osoczu (wg 8)

Pochodzenie materiału	Aktywność FSF w jednostkach Buluka	
	bez cysteiny	w obecności 0,025 M cysteiny
Człowiek	10	18
Wół	14	48
Królik	20	64
Świnia	24	28

Także inne związki zawierające wolne grupy sulfyhydrylowe np. zredukowany glutation (24), globina, hemoglobina (8), jak również *2,3*-dwumerkaptopropanol (53) aktywują FSF. Z drugiej strony inhibitory grup sulfhydrylowych, takie jak *p*-chlorortęciobenzoesan lub jodooctan (24, 53) oraz jony srebra (28) hamują aktywność FSF w tworzeniu desmofibryny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że hamowanie to ma charakter odwracalny i po potraktowaniu zinaktywowanych preparatów FSF cysteiną aktywność ponownie powraca. Powyższe obserwacje wyraźnie sugerują związek pomiędzy grupami SH i własnościami biologicznymi FSF. Istnieją przesłanki, że te grupy zostają uaktywnione podczas aktywacji FSF wywołanej działaniem trombiny.

Drugim czynnikiem stymulującym stabilizujące działanie FSF są jo-

http://rcin.org.pl

ny wapniowe. Wykazali to w 1955 roku Lorand i Dickenmann (34) stwierdzając, że skrzep otrzymany z fibrynogenu pod działaniem trombiny w nieobecności wapnia jest niestabilizowany. Jeżeli taki skrzep poddać dializie w 0,15 M roztworze NaCl, następnie zanurzyć w 1%-owym roztworze chlorku wapniowego następuje jego stabilizacja. Brak wapnia prowadzi do powstania fibryny rozpuszczalnej nawet w obecności cysteiny i trombiny. Bliższe badania (5, 19, 24, 56) wykazały, że jonów wapnia nie można zastąpić jonami magnezu, baru, kobaltu, cynku i żelaza dwuwartościowego podczas stabilizacji skrzepu, natomiast zastępuje go częściowo stront i mangan. Nie potrafimy jeszcze wyjaśnić różnic zachowania się kationów dwuwartościowych w katalizowanym przez FSF procesie stabilizacji skrzepu.

Trzecim współpartnerem koniecznym do aktywacji FSF jest trombina. Przekonywujących dowodów na niezbędny udział trombiny w stabilizacji skrzepów dostarczyli Buluk i współpracownicy (7) stosując w układzie doświadczalnym zamiast fibrynogenu — monomer fibryny. Wytworzenie skrzepu z fibrynogenu wymaga działania trombiny; natomiast przy wytwarzaniu z roztworu monomeru ominięta jest pierwsza faza konwersji fibrynogenu w fibrynę. Wykazano, że FSF nie stabilizuje skrzepu powstałego z monomeru fibryny i dopiero dodanie do tego układu trombiny umożliwia powstawanie desmofibryny. Dokładniejsze badania wykazały, że dla uaktywnienia FSF niezbędne jest uprzednie działanie trombiny na jego nieaktywny prekursor, przy czym ilość zaktywowanego FSF jest wprost proporcjonalna do miana działającej trombiny (6). W przypadku stabilizatora z hemolizatu krwinek istnieje optymalny stosunek między ilością FSF i trombiny dla utworzenia maksymalnej ilości desmofibryny i przy użyciu nadmiaru trombiny zmniejsza się aktywność stabilizatora (8). Ostatnio Lorand i Konishi (41) potwierdzili przypuszczenia, że w krwi krąży prekursor FSF, który dopiero pod działaniem trombiny ulega aktywacji.

II. Mechanizm działania

Badania nad FSF i desmofibryną przeprowadzono głównie stosując preparaty ludzkie lub wołowe i stąd interpretacja odnosi się tylko do tych preparatów. Należy bowiem pamiętać, że szybkość wytwarzania się desmofibryny jest rozmaita u różnych gatunków zwierząt. I tak np. skrzepy otrzymane z krwi ludzkiej lub wołowej stają się nierozpuszczalne w moczniku lub kwasach niemal natychmiast po pojawieniu się żelu fibryny, natomiast we krwi psa morskiego lub minoga formowanie nierozpuszczalnego skrzepu jest znacznie wolniejsze.

Wytwarzanie desmofibryny jest według Loewy'ego i współpracowników (26, 27, 28, 29) reakcją enzymatyczną. Na poparcie słuszności

http://rcin.org.pl

tej hipotezy podają oni następujące dowody doświadczalne. FSF nie łączy się z monomerem fibryny w stosunku stechiometrycznym, bowiem stosując własny wysoko oczyszczony preparat wykazali, że 1 mg FSF może wytworzyć około 11 000 mg desmofibryny. Ponadto można przeprowadzić nieustabilizowany skrzep fibryny w desmofibrynę, stosując inkubację w roztworze FSF, co świadczy przeciwko kopolimeryzacji FSF i monomeru fibryny.

Dla wyjaśnienia roli FSF w wytwarzaniu desmofibryny Lorand (36, 40) zaproponował dwie reakcje opisujące trzecią fazę (schemat 1) krzepnięcia krwi kręgowców:

$$\text{FSF} \xrightarrow[Ca^{2+}]{\text{trombina}} \text{FSF}^x \qquad \text{3a.}$$

$$\text{Polimer fibryny} \xrightarrow[Ca^{2+}]{\text{FSF}^x} \text{desmofibryna} \qquad \text{3b.}$$

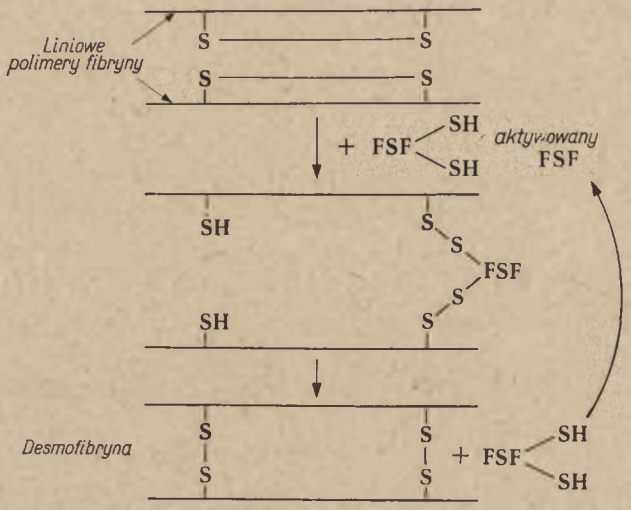
W pierwszej reakcji zachodzi wytworzenie się aktywnego czynnika (FSF*) z krążącego w krwi prekursora (FSF) w obecności trombiny i jonów wapnia. Reakcja 3b przedstawia wytworzenie się desmofibryny ze skrzepu fibryny pod działaniem aktywowanego czynnika stabilizującego w środowisku zawierającym jony wapnia. Nie potrafimy jeszcze jednoznacznie wytłumaczyć na czym polega aktywacja FSF przez trombinę, jak również na czym polega tworzenie desmofibryny.

Fakt, że skrzep niestabilizowanej fibryny rozpuszcza się w roztworach związków powodujących zrywanie mostków wodorowych w cząsteczkach białka wskazuje, że wiązania tego typu odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu struktury fibryny, złożonej z cząsteczek monomeru. Ponieważ desfmofibryna nie rozpuszcza się w takich warunkach, narzuca się stąd wniosek, że za zmniejszenie rozpuszczalności mogą być odpowiedzialne wiązania kowalencyjne powstałe między sąsiadującymi łańcuchami liniowych polimerów fibryny w wyniku działania FSF.

Rozważane są trzy hipotezy objaśniające mechanizm powstawania w sieci fibryny poprzecznych wiązań kowalencyjnych. Pierwsza z nich, Loewy'ego i Edsalla (24), chociaż najstarsza, przewija się także w pracach z ostatnich lat (8, 29). Autorzy ci wyszli z założenia, że źródłem reakcji zapoczątkowanej przez FSF jest seria wymian śródcząsteczkowych mostków dwusiarczkowych na mostki międzycząsteczkowe, które przyciągają ku sobie łańcuchy liniowych polimerów i wiążą silnie ze sobą wskutek wytworzenia poprzecznych wiązań kowalencyjnych (schemat 2). Wymianę tego typu obserwowano już w przypadku niektórych denaturowanych białek (16) i pewnych syntetycznych peptydów (48, 49).

W 1962 roku Lorand i współpracownicy (37) wysunęli hipotezę transpeptydacji na podstawie obserwacji, że demosfibryna zawiera mniejszą ilość N-końcowych reszt glicylowych i tyrozylowych w porównaniu z fibryną niestabilizowaną. Można więc wywnioskować, że część tych reszt została zużytkowana do wytworzenia międzycząsteczkowych wią-

http://rcin.org.pl



Schemat 2. Mechanizm wymiany mostków dwusiarczkowych

zań peptydowych, a zatem wiązań kowalencyjnych usztywniających strukturę skrzepu. Możliwe są dwa typy transpeptydacji, przedstawione na schemacie 3.

NH_2—Gli—A—CO—NH—B—COOH + NH_2—Gli—A—CO—NH—B—COOH

(I) NH_2—Gli—A—CO—NH—Gli—A—CO—NH—B—COOH + NH_2—B—COOH

(II) NH_2—Gli—A—CO—NH—B—CO—NH—Gli—A—CO—NH—B—COOH + H_2O

Schemat 3. Mechanizm transpeptydacji (wg 37) A i B — łańcuchy polipeptydowe

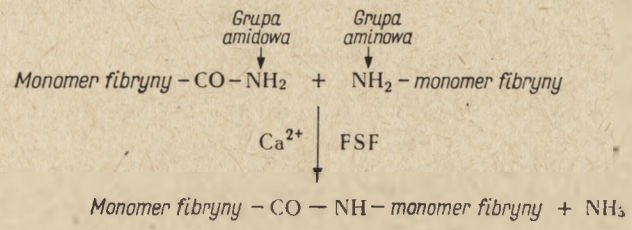
Bezpośrednim dowodem reakcji typu (I) byłoby znalezienie w roztworze, po usunięciu desmofibryny, fragmentu NH_2-B-COOH. Fragmentu takiego nie znaleziono, natomiast Loewy (30) poszukując peptydów w płynie pozostającym po usunięciu desmofibryny odkrył, że FSF katalizuje odszczepienie amoniaku od fibryny i zaproponował dla objaśnienia działania FSF mechanizm transamidacji (schemat 4).

W wyniku reakcji między grupą amidową glutaminy lub asparaginy, wbudowanych w jedną cząsteczkę monomeru z końcową grupą aminową drugiej powstałoby międzycząsteczkowe wiązanie peptydowe z równoczesnym uwolnieniem amoniaku.

Hipotezy transpeptydacji lub transamidacji popiera fakt hamowania ostatniego etapu stabilizacji przez szereg amin i ich pochodnych.

Trzecią hipotezę mechanizmu reakcji stabilizacji fibrynogenu przedstawili Laki i Chandrasekhar (9, 22) w 1963 roku. Stosując fibrynogen pozbawiony FSF zaobserwowali oni, że chociaż trombina wykrzepia ten preparat, to nie odszczepia od niego węglowodanów, a do-

http://rcin.org.pl



Schemat 4. Mechanizm transamidacji (wg 30)

piero dodanie do układu FSF powoduje przejście do roztworu około 15% kwasu sjalowego. Wykazali także wprost proporcjonalną zależność między ilością odszczepionego kwasu sjalowego od stabilizowanego skrzepu a ilością uformowanej desmofibryny. Na podstawie tych danych wysuwają wniosek, że odszczepianie kwasu sjalowego od fibrynogenu podczas krzepnięcia nie jest związane z działaniem trombiny, lecz że enzymem odszczepiającym oligosacharydy jest FSF. Fibrynogen pozbawiony kwasu sjalowego działaniem neuraminidazy nie wytwarza już desmofibryny. Autorzy określają terminem „wulkanizacji" wytwarzanie silnych wiązań pomiędzy cząsteczkami fibryny i sądzą, że odszczepienie węglowodanów umożliwia powstawanie wiązań stabilizujących.

Tak więc hipotezy działania mechanizmu FSF są dość różnorodne; każda z nich ma pewne dowody doświadczalne, brak jednak jeszcze pewnych danych, które pozwoliłyby przypisać słuszność jednej z nich.

Lorand i współpracownicy (10, 39, 40) odkryli całą grupę inhibitorów stabilizacji fibryny. Związki te w stężeniach milimolowych selektywnie hamują reakcję 3b nie wpływając równocześnie zakłócająco na przebieg pozostałych faz konwersji fibrynogenu w fibrynę. Najaktywniejszym inhibitorem okazał się ester metylowy glicyny, nieco mniejsze zdolności hamowania mają ester metylowy glicyloglicyny, amid glicyny oraz hydroksyloamina. Natomiast ester metylowy sarkozyny zupełnie nie hamuje wytwarzania desmofibryny, co wskazywałoby na to, że obecność wolnej grupy aminowej jest istotna do wywołania inhibicji.

III. Uwagi końcowe

W 1960 roku rozpoznano i opisano po raz pierwszy wrodzony niedobór FSF u dziecka (11), a w latach następnych doniesiono kilkakrotnie o przypadkach tego niedoboru (17, 18, 43, 44, 45, 50). Najbardziej charakterystycznym objawem niedoboru FSF i równocześnie najniebezpieczniejszym jest skaza krwotoczna, odróżniająca się od innych typów krwawień bardzo złym gojeniem ran. U noworodków występują w w 2 tygodnie po urodzeniu długotrwałe i uporczywe krwawienia z pępowiny, u dzieci starszych — ze skaleczeń i ran. Tygodniami trwa gojenie ran,

http://rcin.org.pl

formująca się ziarnina ma luźną strukturę, a pozostające blizny są rozległe i nieregularne. Całkowitą poprawę zdrowia chorego można osiągnąć przez transfuzję kilkudziesięciu mililitrów świeżej krwi. Liofilizowane osocze wywiera podobne działanie. Ze względu na krótki okres połowicznego zaniku FSF, wynoszący u człowieka od 3 do 4 dni, efekt leczniczy transfuzji jest raczej krótkotrwały. Niedobór FSF jest schorzeniem uwarunkowanym defektem genetycznym (11).

Gojenie się ran jest w wyraźny sposób zależne od FSF, na co wskazują obserwacje kliniczne. Ale również w hodowlach fibroblastów *in vitro* wykazano, że istnieje jakościowa i ilościowa zależność rozwoju komórek od obecności FSF (1). Fibroblasty rosną i rozmnażają się na desmofibrynie dobrze, natomiast przy braku FSF rozwój komórek jest upośledzony i zakłócona organizacja ich zbiorowiska. Dodanie FSF do pożywki normalizuje rozwój. Trudno jest wyjaśnić funkcję FSF w gojeniu ran. Można by spekulować, że czynnik ten bierze udział w wytwarzaniu odpornej mechanicznie i chemicznie sieci fibryny, wzdłuż której mogą rosnąć fibroblasty. Ale przeciwko takiej hipotezie świadczą przypadki całkowitej afibrynogenemii, w których mimo zupełnego braku fibrynogenu gojenie się skaleczeń odbywa się normalnie.

LITERATURA

1. Beck E., Duckert F., Ernst M., *Thromb. Diath. haemorrh.* **6**, 485 (1961).
2. Bickford Jr. A. F., Sokolow M., *Thromb. Diath. haemorrt.* **5**, 480 (1961).
3. Bidwell E., MacFarlane R. G., *Biochem. J.* **49**, XLII (1951).
4. Buluk K., *Polski Tyg. Lek.* **10**, 191 (1955).
5. Buluk K., Małofiejew M., *Roczniki AM* (Białystok) **1**, 159 (1955).
6. Buluk K., *Roczniki AM* (Białystok) **3**, 17 (1957).
7. Buluk K., Januszko T., Olbromski J., *Nature* **191**, 1093 (1961).
8. Buluk K., Januszko T., Olbromski J., Smrża M., Cudnik M., *Post. Hig. Med. Dośw.* **17**, 743 (1963).
9. Chandrasekhar N., Laki K., *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 392 (1964).
10. Doolittle R. F., Lorand L., *Biol. Bull.* **123**, 48* (1962).
11. Duckert F. H., Jung E., Shmerling D. H., *Thromb. Diath. haemorrh.* **5**, 179 (1960).
12. Ferry J. D., Miller M., Shulman S., *Arch. Biochem.* **34**, 425 (1951).
13. Ferry J. D., Miller M., Shulman S., Foster J. F., *Arch. Biochem.* **39**, 387 (1952).
14. Finlayson J. S., Mosesson M. W., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 415 (1964).
15. Fleming W. H., Norman P. S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **104**, 636 (1960).
16. Huggins C., Tapley D. R., Jensen E. V., *Nature* **167**, 592 (1951).
17. Ikkala E., Nevanlinna H. R., *Thromb. Diath. haemorrh.* **7**, 567 (1962).
18. Josso F., Prou-Wartelle O., Alagille D., Soulier J. P., *Nouv. Rev. Franc. Hematol.* **4**, 267 (1964).
19. Kopper P. H., *Nature* **198**, 493 (1963).
20. Laki K., Lorand L., *Science* **108**, 280 (1948).
21. Laki K., *Scientific Amer.* **206**, no 3, 60 (1962).

http://rcin.org.pl

22. Laki K., Chandrasekhar N., *Nature* **197**, 1267 (1963).
23. Lewis J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **116**, 120 (1964).
24. Loewy A. G., Edsall J. T., *J. Biol. Chem.* **211**, 829 (1954).
25. Loewy A. G., Veneziale C., Forman M., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 670 (1957).
26. Loewy A. G., Dunathan K., Kriel R., Wolfinger Jr. H. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 2625 (1961).
27. Loewy A. G., Dahlberg A., Dunathan K., Kriel R., Wolfinger Jr. H. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 2634 (1961).
28. Loewy A. G., Dunathan K., Gallant J. A., Gardner B., *J. Biol. Chem.* **236**, 2644 (1961).
29. Loewy A. G., Gallant J. A., Dunathan K., *J. Biol. Chem.* **236**, 2648 (1961).
30. Loewy A. G., w: Fibrinogen and Fibrin, Turnover of Clotting Factors, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1963, str. 109.
31. Lorand L., *Hung. Acta Physiol.* **1**, 192 (1948).
32. Lorand L., *Nature* **166**, 694 (1950).
33. Lorand L., *Physiol. Rev.* **30**, 742 (1954).
34. Lorand L., Dickenman R. C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **89**, 45 (1955).
35. Lorand L., Jacobsen A., *J. Biol. Chem.* **230**, 421 (1958).
36. Lorand L., w: Progress in Coagulation, Suppl. 1 do Vol. VII *Thromb. Diath. haemorrh.*, F. K. Schattauer, Verlag Stuttgart 1962, str. 238.
37. Lorand L., Konishi K., Jacobsen A., *Nature* **194**, 1148 (1962).
38. Lorand L., Jacobsen A., *Nature* **195**, 911 (1962).
39. Lorand L., Konishi K., Riggs S. K., Doolittle R. F., *Fed. Proc.* **22**, 442 (1963).
40. Lorand L., Doolittle R. F., Konishi K., Riggs S. K., *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 171 (1963).
41. Lorand L., Konishi K., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 58 (1964).
42. Lüscher E. F., *Schweiz. Med. Wschr.* **87**, 1220 (1957).
43. Mandelli F., *Med. Clin. Sper.* **13**, 175 (1963).
44. Masure R., *Hemostase* **3**, 119 (1963).
45. Ollendorff P., Amris C. J., 9-th Congr. Europ. Soc. Hematol. Lizbona 1963, Abstracts of Papers, str. 287.
46. Pappenhagen A. R., Olwin J. H., Koppel J. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **112**, 741 (1963).
47. Robbins K. C., *Amer. J. Physiol.* **142**, 581 (1944).
48. Ryle A. P., Sanger F., *Biochem. J.* **58**, V (1954).
49. Sanger F., *Nature* **171**, 1025 (1953).
50. Shmerling D. H., Jung E., Duckert F., *Helv. Paediat. Acta* **15**, 5, 471 (1960).
51. Shulman S., *Nature* **171**, 606 (1953).
52. Shulman S., Katz S., Ferry J. D., *J. Gen. Physiol.* **36**, 759 (1953).
53. Swigert S., Koppel J. L., Olwin J., H., *Nature* **198**, 797 (1963).
54. Triantaphyllopoulos D. C., Triantaphyllopoulos E., *Nature* **204**, 1096 (1964).
55. Tyler H. M., Lack C. H., *Nature* **202**, 1114 (1964).
56. Zucker M. B., w: Metal Binding in Medicine, J. B. Lippincott Comp., Philadelphia 1960, str. 137.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

P O S T Ę P Y B I O C H E M I I

TOM XI 1965 ZESZYT 3

*LIDIA PUŻYŃSKA**

Białka allosteryczne jako regulatory metabolizmu

The Allosteric Proteins as Metabolism Regulators

The actual views on the properties, action and biological significance of allosteric proteins are presented.

W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił znaczny postęp w badaniu mechanizmów regulacji i kontroli metabolizmu komórkowego. Większość poznanych łańcuchów — cyklów metabolicznych obejmuje ciąg reakcji i oddziaływań wzajemnych, w wielu jednak przypadkach rozdzielono składniki takich układów, co umożliwiło badanie reakcji kontrolujących. Okazało się, że we wszystkich zbadanych reakcjach kontrolujących bierze udział białko o specyficznej aktywności biologicznej i swoisty metabolit nie reagujący bezpośrednio z substratami lub produktami reakcji, lecz wywołujący wytworzenie się struktury przestrzennej warunkującej przyspieszenie lub hamowanie specyficznego procesu, kierowanego przez dane białko. Można przypuszczać, że pewne białka działające w krytycznych etapach metabolizmu są obdarzone swoistą funkcją regulowania i koordynacji w obrębie danego zespołu przemian i że za pośrednictwem tych białek dana przemiana biochemiczna kontrolowana jest przez metabolit, działający raczej jako fizjologiczny sygnał aniżeli jako chemicznie niezbędny składnik reakcji.

I. Zjawisko hamowania zwrotnego

Powszechnie stwierdzony jest fakt, że u bakterii niemal z reguły końcowy metabolit danego łańcucha przemian jest silnym i specyficznym inhibitorem swojej własnej syntezy. Także regułą jest, że tylko jeden enzym i to zazwyczaj pierwszy w danym łańcuchu metabolicznym jest odpowiedzialny za wystąpienie efektu hamowania przez produkt końcowy i że hamowanie to jest procesem odwracalnym. Zarówno enzymy

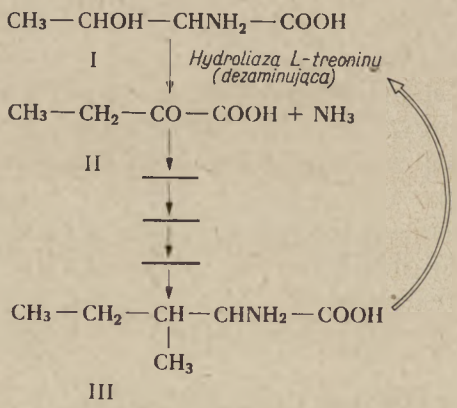
* Mgr. asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie.

http://rcin.org.pl

znajdujące się za enzymem regulującym nie są hamowane przez końcowy metabolit, jak i metabolity pośrednie nie hamują enzymu regulującego (40). Samoregulacja tego typu zwana hamowaniem zwrotnym po raz pierwszy odkryta została ponad 20 lat temu przez Dischego (10) w cyklu glikolitycznym. Autor ten stwierdził, że fosforylacja glukozy w erytrocytach hamowana jest przez fosfoglicerynian (10). Później stwierdzono występowanie hamowania zwrotnego w różnych łańcuchach przemian u mikroorganizmów, a ostatnio uzyskuje się coraz więcej dowodów, że zjawisko hamowania zwrotnego występuje również i u organizmów wyższych. Zablokowanie działania pierwszego enzymu danego łańcucha jest korzystne z tego względu, że efektywnie zapobiega nadmiernemu lub zbędnemu działaniu pozostałych enzymów tego ciągu, a więc i stratom energetycznym.

1. Hamowanie zwrotne hydroliazy L-treoniny (dezaminującej)

Jednym z dobrze poznanych układów charakteryzujących się hamowaniem zwrotnym, jest występujący w ekstraktach *Escherichia coli* układ pięciu enzymów niezbędnych do przekształcenia treoniny w izoleucynę, zachodzący zgodnie ze schematem 1 (8, 33, 48).



Schemat 1. Hamowanie zwrotne w przemianie L-treoniny w L-izoleucynę.
I — L-treonina, II — L-ketomaślan, III — L-izoleucyna. Kreski poziome oznaczają kolejne produkty pośrednie przemiany. Szeroka strzałka wskazuje sprzężenie zwrotne

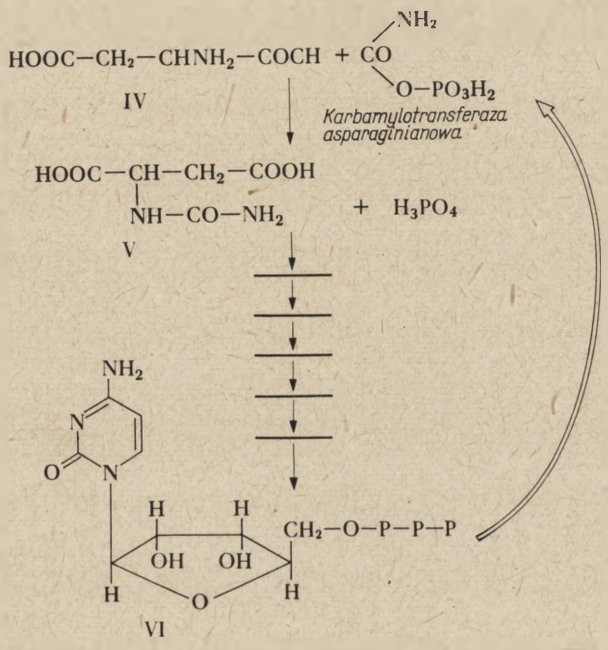
Stwierdzono, że dodanie izoleucyny do środowiska inkubacyjnego hamuje natychmiast i prawie kompletnie jej syntezę przez komórki bakteryjne. Przyczyną zahamowania syntezy izoleucyny przez nadmiar izoleucyny egzogennej jest zablokowanie pierwszego etapu reakcji, katalizowanego przez hydroliazę L-treoniny (dezaminującą), enzymu nadzwyczaj wrażliwego na ten aminokwas.

http://rcin.org.pl

2. Hamowanie zwrotne karbamylotransferazy asparaginianowej

W grupie enzymów katalizujących biosyntezę nukleotydów pirymidynowych, wydzielonych również z *E. coli* — pierwszy enzym łańcucha karbamylotransferaza asparaginianowa jest hamowana przez produkt końcowy łańcucha, tj. cytydynotrójfosforan (18) (schemat 2).

Hamowanie karbamylotransferazy asparaginianowej przez CTP, niezwykle ważne dla regulowania czynności dalszych enzymów łańcucha biosyntezy nukleotydów pirymidynowych wzbudziło ogromne zainteresowanie, bardzo usprawiedliwione, ponieważ posiadało cechy hamowania kompetycyjnego. Przyjęcie tego typu hamowania wydawało się jednak trudne, ponieważ inhibitor i substrat różnią się znacznie od siebie wielkością, kształtem i budową w przeciwieństwie do klasycznych kompetytorów podobnych strukturalnie do substratu.



Schemat 2. Hamowanie zwrotne w biosyntezie nukleotydów pirymidynowych.

IV — asparaginian, V — ureidobursztynian, VI — cytydynotrójfosforan, kreski poziome i szeroka strzałka jak w schemacie 1

Na podstawie badań z oczyszczoną karbamylotransferazą asparaginianową Gerhart i Pardee (18) wysunęli przypuszczenie, że enzym ten ma oddzielne centrum aktywne, w którym następuje wiązanie jego substratów: asparaginianu i karbamylofosforanu i oddzielne centrum inhibicji wiążące inhibitor enzymu, tj. cytydynotrójfosforan. Asparaginian i CTP mogą więc łączyć się z enzymem równocześnie każdy we

http://rcin.org.pl

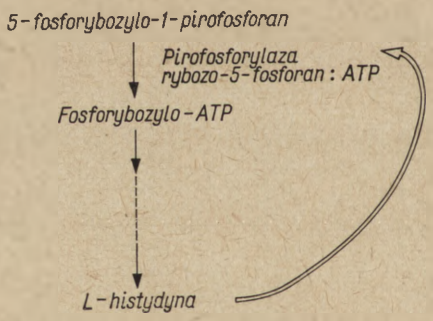
właściwym mu centrum i CTP hamuje aktywność karbamylotransferazy asparaginianowej na skutek znacznego zredukowania, ale nie kompletnego zniesienia jej powinowactwa do substratu.

Wydaje się, że hamowanie enzymu z korzyścią dla organizmu przez metabolit o zupełnie różnej budowie niż substrat wykształciło się drogą ewolucji. Na przykład karbamylotransferaza mogła katalizować na początku tylko właściwą sobie reakcję syntezy ureidobursztynianu i wiązać tylko substrat. Jej aktywność enzymatyczna nie była wówczas kontrolowana. Na skutek serii mutacji i selekcji enzym zyskał specjalne miejsce dla wiązania końcowego produktu łańcucha biosyntezy nukleotydów pirymidynowych w taki sposób, że osłabiało ono wiązanie substratu. Organizmy posiadające tak zmodyfikowany enzym mogą kontrolować biosyntezę tych nukleotydów i mają dzięki temu selektywną przewagę nad organizmami nie posiadającymi tej cechy.

Hamowanie karbamylotransferazy asparaginianowej przez CTP jest charakterystyczne dla *E. coli*. Jak wykazali Bresnick i Hitchings (4) w komórkach nowotworowych raka wysiękowego Ehrlicha enzym ten hamowany jest przez UMP.

3. Hamowanie zwrotne pirofosforylazy rybozo-5-fosforan:ATP

Hamowanie zwrotne stwierdzono również w łańcuchu biosyntezy histydyny u *Salmonella typhi murium* (schemat 3). Przez produkt końcowy L-histydynę hamowany jest enzym katalizujący pierwszy odwracalny etap jej biosyntezy, a mianowicie pirofosforylaza rybozo-5-fosforan: ATP (1, 36).

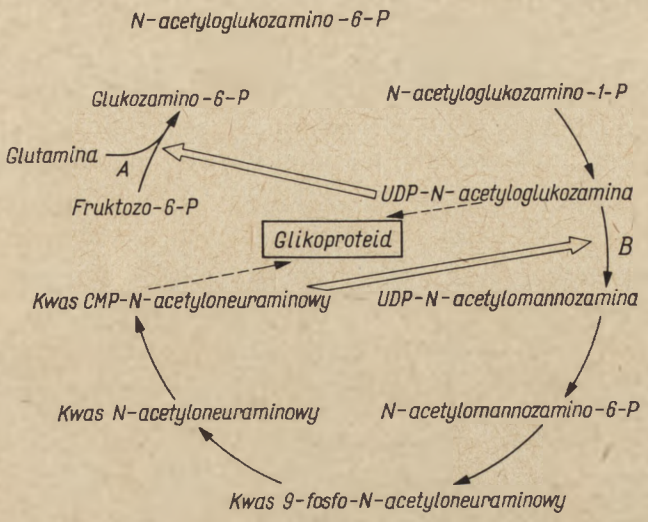


Schemat 3. Hamowanie zwrotne w biosyntezie histydyny.
Szeroka strzałka jak w schemacie 1.

4. Hamowanie zwrotne aminotransferazy glutamina:fruktozo-6-fosforan i epimerazy UDP-N-acetyloglukozaminy

Regulacji za pomocą hamowania zwrotnego podlega również biosynteza nukleotydów cukrowych w wątrobie szczurzej (27). Łańcuch reakcji, w wyniku których powstaje UDP-N-acetylo-D-glukozamina i kwas CMP-N-acetyloneuraminowy podany jest na schemacie 4.

http://rcin.org.pl



Schemat 4. Hamowanie zwrotne w biosyntezie nukleotydów cukrowych w wątrobie szczurzej (wg 27).

A — aminotranferaza glutamina:fruktozo-6-fosforan, B — epimeraza UDP-N-acetyloglukozaminy. Szerokie strzałki jak w schemacie 1.

Obydwa nukleotydy cukrowe stanowią formę aktywną, do której odpowiednie cukry muszą być przekształcane przed inkorporacją do glikoproteidów i innych makrocząsteczek. UDP-N-acetylo-D-glukozamina i kwas CMP-N-acetyloneuraminowy mogą więc być uważane za końcowe produkty łańcucha metabolicznego. Każdy z tych związków hamuje pierwszy regulujący enzym w łańcuchu własnej biosyntezy: UDP-N-acetyloglukozamina — aktywność aminotransferazy glutamina: fruktozo-6--fosforan, a kwas CMP-N-acetyloneuraminowy aktywność epimerazy UDP-N-acetyloglukozaminy.

Kinetyka hamowania przez UDP-N-acetyloglukozaminę jest kompetycyjna i hamowanie to jest bardzo swoiste — o bardziej zaznaczonej swoistości odnośnie części nukleotydowej cząsteczki aniżeli w stosunku do reszty cukrowej. Związek ten w stężeniu $7 \cdot 10^{-4}$ M nie wywiera hamującego wpływu na acetylotransferazę 6-fosforanu glukozaminy, drugi enzym na drodze własnej biosyntezy.

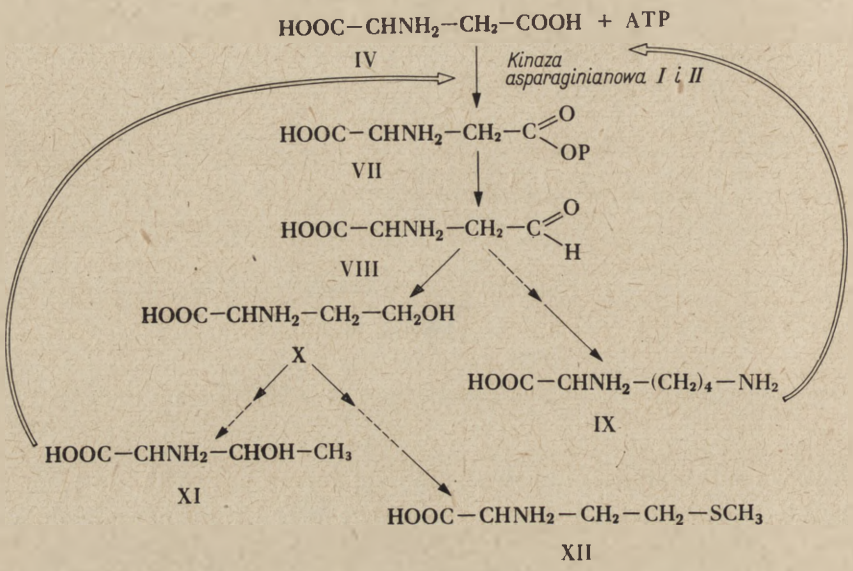
Stężenie kwasu CMP-N-acetyloneuraminowego niezbędne dla zahamowania aktywności epimerazy UDP-N-acetyloglukozaminy w 50%-ach jest 30 razy większe niż stężenie UDP-N-acetyloglukozaminy potrzebne do identycznego zahamowania właściwej aminotransferazy.

Sigmoidalny kształt krzywej inhibicji wywołanej przez kwas CMP--N-acetyloneuraminowy sugeruje, że powinowactwo enzymu do inhibitora zwiększa się w miarę wzrostu wysycenia nim enzymu. Autorzy stwierdzają, że taka sigmoidalna krzywa może być spowodowana wzajemnym oddziaływaniem podjednostek w cząsteczce enzymu.

http://rcin.org.pl

5. Hamowanie zwrotne kinazy asparaginianowej I i II

Jest rzeczą znaną rozgałęzianie się łańcucha metabolicznego począwszy od określonego metabolitu. I tak np. 4-fosfoasparaginian powstały z asparaginianu i ATP przy udziale kinazy asparaginianowej jest prekursorem trzech aminokwasów: treoniny lizyny i metioniny (schemat 5).



Schemat 5. Hamowanie zwrotne w biosyntezie lizyny, treoniny i metioniny.
IV — asparaginian, VII — 4-fosfoasparaginian, VIII — asparaginiano-β-semialdehyd, IX — lizyna, X — homoseryna, XI — treonina, XII — metionina. Szerokie strzałki jak w schemacie 1.

Kontrola tego ciągu reakcji przez mechanizm sprzężenia zwrotnego stwarzałaby sytuację niekorzystną, gdyż nadprodukcja jednego z aminokwasów prowadziłaby do zmniejszenia aktywności kinazy asparaginianowej i w następstwie do powstawania niedostatecznych ilości pozostałych dwu aminokwasów. Jednak jak wykazali Stadtman, Cohen i Robichon-Szulmajster (44) w badaniach na *E. coli* niebezpieczeństwo to zostaje usunięte dzięki obecności dwóch kinaz asparaginianowych, które są kontrolowane niezależnie przez L-lizynę i L-treoninę.

Jeden, względnie stabilny enzym — kinaza asparaginianowa I jest specyficznie hamowany przez L-lizynę i nie tworzy się, gdy komórki bakteryjne znajdą się w środowisku zawierającym ten aminokwas. Drugi, względnie niestabilny enzym — kinaza asparaginianowa II jest specyficznie hamowany przez L-treoninę, nie zależy natomiast od obecności lub nieobecności L-lizyny w środowisku.

4-fosfoasparaginian jest nie tylko prekursorem treoniny i lizyny, ale także i metioniny, wytwarzanej na drodze rozgałęzienia się łańcucha biosyntezy treoniny. Wspólnym prekursorem metioniny i treoniny jest ho-

http://rcin.org.pl

moseryna. A zatem w przypadku kompletnego zablokowania aktywności kinazy asparaginianowej II na skutek dodania egzogennej treoniny synteza metioniny nie powinna mieć miejsca. Badania wykazały jednak, że synteza metioniny zachodzi nawet w obecności wysokich stężeń lizyny i treoniny. Być może istnieje więc jeszcze trzecia, nieznana kinaza asparaginianowa, która odgrywa specyficzną rolę w syntezie metioniny, a jest niezależna od stężenia treoniny i lizyny. Istnienie dwu, a być może i trzech kinaz asparaginianowych u *E. coli* (typ *HfrC*) stanowi istotne wyjaśnienie zjawiska wielokrotności enzymów.

Istnienie więcej aniżeli jednego enzymu katalizującego tę samą reakcję biochemiczną stwierdzono i w szeregu innych przypadków. Na przykład wątroba zawiera dwie dehydrogenazy izocytrynianowe (26), komórki *E. coli* — dwie hydroliazy L-treoniny (dezaminujące) (47), *Aerobakter aerogenes* — dwa enzymy katalizujące syntezę acetylomleczanu (19), drożdże — dwie dehydrogenazy alkoholowe (11) i cztery dehydrogenazy mleczanowe (21), *Clostridium propionicum* — dwie pirofosfatazy nukleotydowe (5).

W 1964 roku Datta i Gest (9) badając aktywność kinazy asparaginianowej u fotosyntetyzujących bakterii *Rhodopseudomonas capsulatus* odkryli ciekawe zjawisko tzw. zgodnego hamowania zwrotnego *(Concerted feed-back inhibition).* Enzym ten — pierwszy w omówionym już rozgałęzionym łańcuchu metabolicznym jest u tych organizmów w minimalnym stopniu wrażliwy na obecność dodanych pojedynczo L-lizyny lub L-treoniny. L-lizyna powoduje niewielką stymulację aktywności enzymu, natomiast L-treonina hamuje reakcję enzymatyczną tylko w 10-15%. Dopiero kombinacja tych aminokwasów powoduje wyraźne zahamowanie aktywności kinazy asparaginianowej *Rhodopseudomonas capsulatus.* Datta i Gest uważają, że enzym ten ma dwa odrębne miejsca regulujące dla L-lizyny i L-treoniny, odległe od centrum katalitycznego wiążącego L-asparaginian.

Jednakże zgodne hamowanie aktywności enzymu przez L-treoninę i L-lizynę nie jest całkowite nawet wówczas, gdy aminokwasy te są obecne w stężeniu 10 mM. Pozostałą aktywność można przypisać enzymowi odwrażliwionemu na działanie tych inhibitorów, albo też trzeciemu rodzajowi kinazy asparaginianowej, umożliwiającemu, tak jak i u *E. coli,* syntezę metioniny w warunkach nadmiaru lizyny i treoniny.

Omówione zgodne hamowanie zwrotne jest odwracalne i niekompetycyjne w stosunku do substratu kinazy asparaginianowej, tj. do L-asparaginianu.

Wydaje się, że ten rodzaj hamowania występuje powszechnie w rozgałęzionych lub łączących się drogach metabolicznych.

http://rcin.org.pl

II. Efekt allosteryczny

Enzymy, w których połączenie z efektorem prowadzi do zmian aktywności katalitycznej określa się jako białka allosteryczne.

W odróżnieniu od izosterycznych inhibitorów, aktywnych w hamowaniu kompetycyjnym wprowadzono określenie inhibitor allosteryczny dla produktu końcowego, przestrzennie nie-pokrewnego substratowi, hamującego działanie pierwszego enzymu w danym łańcuchu przemian.

Działanie inhibitorów allosterycznych określano jako efekt allosteryczny. Pojęcie to zostało jednak rozszerzone w roku 1963 przez Monod, Changeux i Jacoba (39) i obecnie określa każdą zmianę w aktywności enzymu, która spowodowana jest selektywnym związaniem pewnej cząsteczki (efektora) w miejscu różnym od miejsca łączenia się enzymu z substratem. Zakłada się, że białka allosteryczne posiadają co najmniej dwa stereospecyficznie różne miejsca receptorowe. Jedno z nich wiąże substrat i jest centrum aktywnym odpowiedzialnym za biologiczną aktywność białka, drugie, zwane miejscem allosterycznym jest komplementarne do struktury efektora allosterycznego, wiążącego się z tym miejscem specyficznie i odwracalnie. Ponieważ allosteryczny efektor wiąże się w miejscu różnym od centrum aktywnego i nie uczestniczy w żadnym etapie reakcji katalizowanej przez enzym, nie potrzebuje wykazywać chemicznego czy metabolicznego powinowactwa do substratu. Monod i Jacob zaznaczają jednak, że działanie pewnych koenzymów może również wywoływać zmiany allosteryczne niezależnie od pełnienia przez te związki roli przenośników lub związków pośrednich.

Rys. 1. Trzy modele reakcji między substratem i efektorem (wg 39).

Ponieważ działanie efektorów allosterycznych polegać musi na utworzeniu stereospecyficznego kompleksu z enzymem, istotną sprawą jest powinowactwo centrum wiążącego substrat do centrum wiążącego efektor. Monod i Jacob podają trzy teoretyczne możliwe typy reakcji substrat-efektor przedstawione na rys. 1.

W typie 1 — miejsca wiążące substrat i efektor faktycznie pokrywają się ze sobą chociaż grupy lub atomy wiążące te związki nie są te same. Wówczas wiązanie substratu i efektora wyklucza się wzajemnie

http://rcin.org.pl

na skutek zawady przestrzennej *(steric hindrance)* i reakcja musi być ściśle kompetycyjna. Oznacza to, że obecność efektora wywołuje dysocjację połączenia enzym-substrat i krzywa hamowania jest asymptotyczna do 100% hamowania przy wysokim stężeniu efektora.

W typie II miejsca wiążące substrat i efektor leżą blisko siebie, tak że może wystąpić bezpośrednia reakcja wzajemna przyciągająca lub odpychająca. W tym przypadku efektor hamuje aktywność enzymu na skutek znacznego zredukowania, ale nie kompletnego zniesienia jego powinowactwa do substratu.

W typie III nie ma miejsca żadna reakcja bezpośrednia między substratem i efektorem. Dwa centra są kompletnie oddzielone i wpływ jednego na drugie odbywa się tylko za pośrednictwem białka przypuszczalnie przez przestrzenne zmiany przystosowawcze, które powstają w nim po związaniu swoistego efektora. Występuje wówczas hamowanie ściśle niekompetycyjne.

Ponieważ w kompleksach enzym-substrat i enzym-efektor występują dwa układy specyficznych grup, można spodziewać się istnienia dwóch rodzajów związków zdolnych do połączenia się z białkiem, a mianowicie: analogów substratu i analogów efektora. W przypadku układów przedstawionych modelem I analogi efektora, tak jak i analogi substratu powinny zachowywać się jak inhibitory ściśle kompetycyjne. W przypadku układów odpowiadających modelom II i III można spodziewać się istnienia dwóch różnych typów analogów efektora: 1) analogi zachowujące się tak jak naturalne allosteryczne efektory, 2) analogi, zdolne do przesunięcia allosterycznego efektora, a niezdolne do reakcji z substratem. Analogi drugiego typu powinny reaktywować zahamowany enzym i nie wywierać wpływu w nieobecności efektora.

Badając wpływ różnych analogów izoleucyny na aktywność hydroliazy L-treoniny (dezaminującej) zaobserwowano, że można je podzielić na wymienione dwa typy. Jak wykazał Changeux (8) norleucyna dodana w obecności izoleucyny przywraca wyraźnie aktywność hydroliazy L-treoniny (dezaminującej), natomiast L-leucyna zarówno hamuje enzym jak i współdziała z izoleucyną, gdy zostanie dodana w jej obecności. Wyniki te wykluczają model I i stanowią dowód, że hamujące działanie izoleucyny na hydroliazę L-treoniny (dezaminującą) chociaż kompetycyjne nie może być spowodowane nakładaniem się miejsc wiążących substrat i efektor. Wydaje się, że zarówno w przypadku niekompetycyjnego jak i kompetycyjnego hamowania przez efektor, najbardziej prawdopodobny biologicznie jest typ III. Efektor reakcji łącząc się z właściwym dlań miejscem enzymu wpływa za pośrednictwem białka enzymatycznego na zahamowanie funkcji centrum aktywnego enzymu. Hamowanie to jest wynikiem wysoko wyspecjalizowanej molekularnej struktury enzymu wrażliwego. W przypadku hydroliazy L-treoniny (dezaminują-

http://rcin.org.pl

cej) wyłoniły się zastrzeżenia w związku z tym, że substrat — treoninę, jak i efektor — izoleucynę można uważać za przestrzenne analogi ponieważ są α-aminokwasami. Jednakże *E. coli* syntetyzuje dwie różne hydroliazy L-treoniny (dezaminujące), z których jedna nie jest wrażliwa na hamowanie przez izoleucynę. Współistnienie u *E. coli* dwóch różnych kinaz asparaginianowych, katalizujących identyczne reakcje i hamowanych jedna przez L-treoninę, druga przez L-lizynę — stanowi wyraźny dowód, że wywołany efekt nie jest ściśle związany ze strukturą efektora, lecz uzależniony jest od struktury białka regulującego i zmian powstałych w nim po przyłączeniu efektora.

Należy podkreślić, że wrażliwość enzymów regulujących na hamujące metabolity końcowe łańcucha jest nadzwyczaj labilna, *in vitro* zanika ona w wyniku działania różnych czynników bez utraty, lub z minimalną utratą właściwej aktywności enzymu. Najprostszym wytłumaczeniem tego zjawiska byłoby niszczenie przez czynniki odwrażliwiające miejsca allosterycznego, interpretacja taka nie jest jednak zadowalająca, ponieważ nie tłumaczy powszechności tych zmian ani wyjątkowej labilności miejsca allosterycznego. Bardziej przekonujące jest przypuszczenie, że działanie metabolitu końcowego zależy raczej nie od integralności miejsca, z którym łączy się on z enzymem, ale od stanu agregacji, odpowiadającego enzymowi natywnemu. Odwrażliwienie mogłoby być więc następstwem przerwania lub wytworzenia wiązań pomiędzy podjednostkami. Nie wydaje się jednak, aby agregacja lub dezagregacja cząsteczek była we wszystkich przypadkach przyczyną hamowania aktywności przez efektory allosteryczne. Charakterystyczną również właściwością enzymów regulujących jest to, że po odwrażliwieniu krzywa wiązania substratu zmienia się z sigmoidalnej na hiperboliczną, co świadczy o usunięciu reakcji współdziałających występujących w cząsteczce enzymu wrażliwego.

Bardzo interesujący jest wpływ waliny na aktywność hydroliazy L-treoniny (dezaminującej). Przy małym stężeniu substratu aminokwas ten w nieobecności izoleucyny aktywuje reakcję przez zwiększenie powinowactwa enzymu do treoniny. Ponieważ walina jest analogiem izoleucyny, można było przypuszczać, że wiąże się ona w tym samym miejscu enzymu co izoleucyna. Jednak stosując różne stężenia izoleucyny stwierdzono, że walina zachowywała się jako częściowy jej konkurent, tzn. reaktywowała enzym w pewnym procencie, zależnym od stężenia izoleucyny (8). Wysnuto stąd wniosek, że hydroliaza L-treoniny (dezaminująca) posiada przynajmniej trzy różne miejsca: centrum aktywne dla treoniny, miejsce allosteryczne dla izoleucyny i centrum aktywacji dla waliny. Związanie izoleucyny daje w efekcie zmniejszenie powinowactwa do treoniny. Związanie waliny zwiększa powinowactwo do treoniny i ró-

http://rcin.org.pl

wnocześnie zmniejsza powinowactwo miejsca allosterycznego do izoleucyny.

Stwierdzenie, że związanie małej cząsteczki wywołuje rozległe zmiany w białku nie jest nowe. Już w latach 1958-1960 Koshland (28, 29) podkreślał ogromną rolę substratu w wywoływaniu przystosowawczych zmian w strukturze enzymu, niezbędnych dla wystąpienia jego funkcji katalitycznej. Autor ten postuluje istnienie w enzymie elastycznego centrum aktywnego, w którym substrat powoduje zmiany przystosowawcze prowadzące do odpowiedniego uszeregowania grup katalitycznych, podczas gdy nie-substrat zmian tych nie wywołuje. Tylko istnienie elastycznego, zdolnego do zmian centrum aktywnego pozwala enzymowi osiągnąć wysoki stopień specyficzności i tłumaczy zjawisko hamowania niekompetycyjnego i kolejnego absorbowania substratów na powierzchni enzymów. Hormonalne wpływy na enzymy odbywają się również przy udziale aktywnego elastycznego centrum (31).

III. Zmiany przystosowawcze białek organizmów wyższych

Odwracalne zmiany przystosowawcze na skutek związania regulującego metabolitu stwierdzono również dla szeregu białek organizmów wyższych, a między innymi w dehydrogenazie glutaminianowej z wątroby wołu, karboksylazie acetylo-CoA z tkanki tłuszczowej, fosforylazie b z mięśni i hemoglobinie.

Krystaliczna dehydrogenaza glutaminianowa z wątroby wołu ma masę cząsteczkową rzędu 10^6. Frieden (13) stwierdził w 1959 roku, że NADH wywołuje dysocjację białka do podjednostek o masie cząsteczkowej 250 000, a efektowi temu przeciwdziała ADP. Dysocjacja ta związana jest z efektem allosterycznym NADH, tj. łączeniem się z enzymem w miejscu odległym od miejsca łączenia NADH, w którym działa on jako koenzym (14). Dalsze prace tego autora (15, 16, 17) i szeregu innych (45, 50, 52, 53). wykazały, że wszystkie czynniki wywołujące dysocjację hamują, a czynniki asocjujące — zwiększają aktywność dehydrogenazy glutaminianowej. Estrogeny i tyroksyna jedne z najsilniejszych czynników powodujących dysocjację tego enzymu są bardzo aktywnymi inhibitorami, przy czym hamowaniu dehydrogenazy glutaminianowej towarzyszy aktywacja dehydrogenazy alaninowej (45, 53). Działanie aktywujące wywołują również trzy aminokwasy: leucyna, izoleucyna i metionina, które mogą być uważane za drugorzędowe substraty enzymu. Definicja allosterycznych efektorów zakładająca, że są to związki nie uczestniczące w reakcji, nie wyklucza jednak występowania tego samego związku równocześnie w charakterze „uczestnika" w reakcji i allosterycznego efektora, ale pod warunkiem, że te dwa udziały wyrażone są wiązaniem się z enzymem w dwóch różnych miejscach. Tomkins

http://rcin.org.pl

i Yielding (46) wykazali, że allosteryczny wpływ leucyny spowodowany jest przyłączeniem się jej do miejsca odległego od centrum aktywnego wiążącego substrat dehydrogenazy glutaminianowej. Oczywiste jest więc tu podobieństwo z karbamylotransferazą asparaginianową, hydroliazą L-treoniny (dezaminującą) czy innymi enzymami allosterycznymi mikroorganizmów.

Fizjologiczna interpretacja wrażliwości dehydrogenazy glutaminianowej na cały szereg różnorodnych czynników jest bardzo trudna i nie wiadomo jeszcze czy wszystkie metabolity, które działają na ten enzym *in vitro*, odgrywają jakąś istotną rolę *in vivo*. Wydaje się jednak, że efektory aktywujące bądź hamujące jego aktywność działają przede wszystkim przez wzbudzenie przystosowawczej zmiany przestrzennej w białku wyrażonej ewentualnie jego dysocjacją.

Inny enzym allosteryczny organizmów wyższych — karboksylaza acetylo-CoA katalizuje dwuetapową reakcję (schemat 6):

$$\text{Biotyna-E} + CO_2 + \text{ATP} \longrightarrow CO_2\text{-biotyna-E} + \text{ADP} + \text{P}$$

$$CO_2\text{-biotyna-E} + \text{acetylo-CoA} \longrightarrow \text{malonylo-CoA} + \text{biotyna-E}$$

$$\text{Sumarycznie: } CO_2 + \text{acetylo-CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{malonylo-CoA} + \text{ADP} + \text{P}$$

Schemat 6. Synteza malonylo-koenzymu A

Enzym ten jest aktywowany specyficznie cytrynianem, znanym aktywatorem biosyntezy kwasów tłuszczowych. (35, 49). Metabolit ten nie bierze udziału jednak w żadnym etapie reakcji katalizowanej przez karboksylazę acetylo-CoA. Fluorocytrynian jest tak samo aktywny jak cytrynian — podczas gdy inne związki pośrednie cyklu Krebsa z wyjątkiem fumaranu są słabo aktywne. Aktywacji towarzyszył wzrost stałej sedymentacji karboksylazy acetylo-CoA z 18 *S* do 43 *S*. Jest to prawdopodobnie spowodowane tworzeniem się aktywnego trimeru z nieaktywnych lub mało aktywnych monomerów.

Badając fosforylazę *b* z mięśni Cori i współpracownicy (6, 7) już w latach 1938-1943 wykazali, że jest ona niemal całkowicie nieaktywna w nieobecności 5′-AMP, zaś natychmiast i odwracalnie aktywowana po dodaniu tego nukleotydu. Obserwacje te znalazły potwierdzenie w pracach Krebsa, Fischera i Kenta w latach 1958-1962 (12, 24, 32). ADP, ATP i inne nukleotydy, z wyjątkiem IMP, nie wywierają wpływu na aktywność enzymu. Początkowo sądzono, że AMP gra rolę koenzymu, ale nie udało się wykazać jego uczestnictwa w reakcji.

Fosforylaza *b* może być przekształcona w formę czynną nie tylko pod wpływem AMP, lecz również przez fosforylację i równoczesną dimeryzację przy współudziale ATP i specyficznej kinazy. Mechanizm ten w przeciwieństwie do działania AMP jest nieodwracalny. Odwracalna przypuszczalnie niekowalentna reakcja pomiędzy allosterycznym efektorem (AMP) i enzymem przynajmniej w części naśladuje nieodwracalną

http://rcin.org.pl

fosforylację składającą się początkowo z reakcji typu kowalentnego, a następnie asocjacji podjednostek. Bezpośredni dowód, że aktywacja fosforylazy *b* przez AMP jest następstwem zmiany przystosowawczej powstałej w białku, otrzymano uzyskując w postaci krystalicznej dimer tego białka, związany z AMP (12, 24). Pozostaje jednak do wyjaśnienia, czy aktywacja enzymu wywołana jest bezpośrednio przyłączeniem nukleotydu, a dimeryzacja jest wtórnym wynikiem tego przyłączenia, czy też aktywująca zmiana wynika z samej dimeryzacji.

Najlepiej zbadanym, a także chyba najprostszym przykładem białka allosterycznego jest hemoglobina. Krzywa dysocjacji oksyhemoglobiny ma kształt sigmoidalny, który jest dowodem współdziałającego efektu miejsc wiążących tlen. Natomiast w przypadku mioglobiny krzywa dysocjacji jest izotermą, co wskazuje, że zachodzi tu prosta adsorpcja. Ta funkcjonalna różnica pomiędzy hemoglobiną i mioglobiną wynika z tego, że hemoglobina zbudowana jest z czterech podjednostek, a cząsteczka mioglobiny jest monomerem.

Hemoglobina podlega jeszcze innemu efektowi posiadającemu rolę regulującą, a mianowicie efektowi Bohra, który polega na tym, że obniżaniu *pH* (*in vivo* wzrostowi prężności CO_2) towarzyszy wzrost dysocjacji tlenu. Jak wykazał w 1947 roku W y m a n (51) efekt Bohra spowodowany jest rozładowaniem protonów na skutek związania tlenu. Początkowo (43) utożsamiano grupy kwaśne odpowiedzialne za wystąpienie tego efektu z resztami cysteiny, które biorą udział także w reakcji hem-hem, dalsze badania wykazały, że grupami tymi są reszty imidazolowe, przypuszczalnie współdziałające z grupami tiolowymi (2). W hemoglobinie H nie występuje efekt Bohra i reakcja hem-hem. Jest to szczególnie interesujące, ponieważ hemoglobina ta zawiera tylko łańcuchy, co sugeruje, że wzajemne oddziaływanie pomiędzy łańcuchami α-β gra ważną rolę w obydwu wymienionych efektach (3).

Przez długi czas uważano, że współdziałające wiązanie cząsteczek tlenu przez hemoglobinę jest następstwem bezpośrednich reakcji pomiędzy grupami hemu, gdyż sądzono, że grupy te znajdują się bardzo blisko siebie w cząsteczce białka. P e r u t z i współpracownicy w 1960 roku (42) wykazali jednak, że cztery grupy hemu są tak odległe od siebie, że wykluczona jest możliwość reakcji bezpośredniej, a zatem reakcja jest pośrednia i odbywa się za pośrednictwem białka podatnego na zmiany. Wiadomo, że oksyhemoglobina i hemoglobina zredukowana krystalizują w różnych formach (20). Ponadto Perutz wykazał, że odległość pomiędzy pewnymi grupami SH w cząsteczce hemoglobiny może przesunąć się o 19 % po połączeniu z tlenem. Dostarcza to bezpośredniego dowodu, że współdziałające wiązanie tlenu jest wynikiem powstania odwracalnej zmiany przystosowawczej w białku czyli przemiany allosterycznej pod

http://rcin.org.pl

wpływem efektora-tlenu. W przypadku hemoglobiny efektor i substrat są jedną i tą samą cząsteczką, jednakże funkcja tlenu jako substratu i jako allosterycznego efektora jest czynnościowo różna.

IV. Uwagi końcowe

Podstawową właściwością białek allosterycznych jako istotnych i charakterystycznych składników biochemicznych układów kontroli jest ich zdolność do natychmiastowej i odwracalnej reakcji na specyficzne „sygnały" chemiczne, efektory, które w pewnych przypadkach są ale częściej nie są pokrewne ich własnym substratom, koenzymom lub produktom. Substrat i efektor wiążą się w miejscach odległych i w ich oddziaływaniu na siebie pośredniczy białko, w którym następuje zmiana allosteryczna obejmująca pęknięcie, utworzenie lub zastąpienie wiązań pomiędzy podjednostkami. Po odkryciu przez Cori i wsp. (6, 7) przemian fosforylazy stwierdzono w ciągu ostatnich lat, że wiele białek, a w szczególności enzymów jest homo- albo heteropolimerami i ich aktywność zależy od właściwego połączenia podjednostek (34). W każdym takim białku nawet niewielka dezorientacja czy uporządkowanie podjednostek daje w efekcie utratę lub wzrost aktywności. Podane fakty dotyczące białek regulujących uzasadniają przypuszczenie, że allosteryczne przemiany wywołują często zmiany struktury czwartorzędowej.

Nawet w przypadku hemoglobiny rola tlenu (będącego zarówno efektorem jak i substratem) w wywoływaniu zmiany allosterycznej daleka jest od całkowitego zrozumienia. Pewne jest jednak, że związanie tlenu z hemem wywołuje w obrębie cząsteczki zmianę ładunku czyli powinowactwo do tlenu uwarunkowane jest wartością p*H*. Podobnie w większości układów efekt allosteryczny nie występuje, gdy zostaną dodane odczynniki atakujące pewne grupy kwaśne: tiolowe i imidazolowe, co także sugeruje, że grupy te odgrywają rolę w przemianie przestrzennej białka.

Efekt allosteryczny nie może być jednak przypisany wyłącznie czy przede wszystkim ładunkowi lub polarności samego efektora, a zależy on od rodzaju specyficznego połączenia jakie ten efektor tworzy z białkiem. W przypadku np. hydroliazy L-treoniny (dezaminującej) walina zwiększa a izoleucyna zmniejsza powinowactwo centrum aktywnego, chociaż obydwa aminokwasy noszą ten sam ładunek. Koshland (30) sugeruje, że w przypadkach, w których substrat wywołuje wykrywalne zmiany przystosowawcze w enzymie, efekt ten często może być interpretowany jako allosteryczna przemiana regulująca.

Niezwykle ważny jest problem hormonów jako efektorów allosterycznych. Zaskakująco mała jest liczba poznanych reakcji, w których biorą one udział jako związki reagujące, w przeciwieństwie do ogromnej liczby

http://rcin.org.pl

enzymów, na które działają. Monod, Changeux i Jacob (39) uważają, że fizjologiczne i chemiczne właściwości hormonów upoważniają do stwierdzenia, że w zasadzie (chociaż niekoniecznie zawsze) działają one jako allosteryczne efektory — każdy z nich zdolny do wywołania allosterycznego przemieszczenia w różnych białkach, głównie enzymatycznych, a także w represorach genetycznych. Niestety, dehydrogenaza glutaminianowa jest jednym z niewielu poznanych dotychczas enzymów, na które hormony działają jako allosteryczne efektory.

Monod, Changeux i Jacob (39) wysuwają również sugestię, że allosteryczne efektory biorą udział w specyficznej kontroli syntezy białka, w mechanizmach represji genetycznej. Układ ten na poziomie syntezy mRNA kontrolowany jest przez specyficzne czynniki — represory, które mają zdolność rozpoznawania i wybiórczego wiązania operatorowych inicjujących pierwszą transkrypcję informacji. Represory syntetyzowane są pod kontrolą wyspecjalizowanych genów regulatorowych. W większości, jeśli nie we wszystkich przypadkach, aktywność represora, a więc przypuszczalnie jego zdolność wiązania odpowiedniego operatora kontrolowana jest przez specyficzne związki o małym ciężarze cząsteczkowym. Związki te działają albo jako dodatnie efektory represji (korepresory) aktywujące represor i przez to blokujące syntezę mRNA i białka, a więc i enzymów będących w zakresie genu operatorowego, albo też jako negatywne efektory (związki indukujące) unieczynniające represor a pobudzające syntezę mRNA i białka (22, 38).

Do niedawna uważano, że represor jest raczej polirybonukleotydem niż białkiem (22, 41). Jednakże pośrednie dowody doświadczalne sugerują, że aktywny produkt genu regulatorowego jest białkiem obecnym w komórkach w ilościach minimalnych (23). Wskazują na to następujące dane:

1) stereospecyficzność reakcji jest ogromna (37),
2) reakcja jest natychmiastowa, odwracalna i kompletna (25),
3) genetyczno-biochemiczny dowód wskazuje, że prawdopodobnie pojedynczy makromolekularny składnik — represor jest odpowiedzialny za specyficzność tej reakcji (23, 39),
4) pojedyncze mutacje genu znoszą reakcję represor-efektor a zachowują powinowactwo represor-operator.

Fakty te można wytłumaczyć, jeżeli przyjąć, że represor jest białkiem allosterycznym posiadającym dwa miejsca: jedno wiążące operator, drugie (dodatnie lub ujemne) wiążące efektor. Hipoteza robocza przyjmuje, że w specyficznych efektach małych cząsteczek w aktywowaniu lub hamowaniu syntezy mRNA i białka na poziomie genetycznym pośredniczy allosteryczna zmiana represora.

Przemiana allosteryczna może więc być zasadniczą cechą wszystkich reakcji zachodzących pomiędzy białkiem a małymi cząsteczkami.

http://rcin.org.pl

LITERATURA

1. Ames B. N., Martin R. G., Garry B. J., *J. Biol. Chem.* **236**, 2019 (1961).
2. Benesh R., Benesh R. E., *J. Biol. Chem.* **236**, 405 (1961).
3. Benesh R. E., Ranney H. M., Benesh R., Smith G. M., *J. Biol. Chem.* **236**, 2926 (1961).
4. Bresnick E., Hitchings G. H., *Cancer Res.* **21**, 105 (1961).
5. Brown E. B., Jr., Stadtman E. R., *J. Biol. Chem.* **235**, 2928 (1960).
6. Cori G. T., Colowick S. P., Cori C. F., *J. Biol. Chem.* **123**, 381 (1938).
7. Cori G. T., Green A. A., *J. Biol. Chem.* **151**, 31 (1943).
8. Changeux J. P., *J. Mol. Biol.* **4**, 220 (1962).
9. Datta P., Gest H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1004 (1964).
10. Dische Z., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **23**, 1140 (1941)
11. Ebesuzaki K., Barron E. S. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 555 (1957).
12. Fischer E. H., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **231**, 65 (1958).
13. Frieden C., *J. Biol. Chem.* **234**, 809 (1959).
14. Frieden C., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 428 (1961).
15. Frieden C., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 484 (1962).
16. Frieden C., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 421 (1962).
17. Frieden C., *J. Biol. Chem.* **237**, 2396 (1962).
18. Gerhart J. C., Pardee A. B., *J. Biol. Chem.* **237**, 891 (1962).
19. Halpern Y. S., Umbarger H. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 3067 (1959).
20. Haurowitz F., *Z. Physiol. Chem.* **254**, 268 (1938).
21. Horowitz N. M., Fling M., *Genetics* **38**, 300 (1953).
22. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
23. Jacob F., Sussman R., Monod J., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **254**, 214 (1962).
24. Kent A. B., Krebs E. G., Fischer E. H., *J. Biol. Chem* **232**, 549 (1958).
25. Kepes A., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 293 (1963).
26. Kornberg A., Pricer W. E., Ir., *J. Biol. Chem.* **189**, 123 (1951).
27. Kornfeld S., Kornfeld R., Neufeld E. F., O'Brien P. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 371 (1964).
28. Koshland D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 98 (1958).
29. Koshland D. E., *Adv. Enzymol* **22**, 45 (1960).
30. Koshland D. E., Horizons in Biochemistry, Academic Press Inc., New York 1962, str. 265.
31. Koshland D. E. Jr., *Science* **142**, 1533 (1963).
32. Krebs E. G., Fischer E. H., *Adv. Enzymol.* **24**, 263 (1962).
33. Leavitt R. J., Umbarger H. E., *J. Biol. Chem.* **236**, 2486 (1961).
34. Lwoff A., Lwoff M., *J. Theoret. Biol.* **2**, 48 (1962).
35. Martin D. B., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **237**, 1787 (1962).
36. Martin R. G., *J. Biol. Chem.* **238**, 257 (1963).
37. Monod J., Cohen-Bazire G., Cohn M., *Biochim. Biophys. Acta* **7**, 585 (1951).
38. Monod J., Jacob F., Gros F., *Biochem. Soc. Symp.* **21**, 104 (1961).
39. Monod J., Changeux J. P., Jacob F., *J. Mol. Biol.* **6**, 306 (1963).
40. Moyed H. S., Umbarger H. E., *Physiol. Revs.* **42**, 444 (1962).
41. Pardee A. B., Prestidge L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 545 (1959).
42. Perutz M. F., Rossmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T., *Nature* **185**, 416 (1960).
43. Riggs A., *Nature* **183**, 1037 (1959).
44. Stadtman E. R., Cohen G. N., Le Bras G., de Robichon-Szulmajster H., *J. Biol. Chem.* **236**, 2033 (1961).

http://rcin.org.pl

45. Tomkins G. M., Yielding K. L., Curran J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 270 (1961).
46. Tomkins G. M., Yielding K. L., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 331 (1961).
47. Umbarger H. E., Brown B., *J. Bact.* **73**, 105 (1957).
48. Umbarger H. E., Brown B., *J. Biol. Chem.* **233**, 415 (1958).
49. Vagelos P. R., Alberts A. W., Martin D. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 4 (1962).
50. Wolff J., *J. Biol. Chem.* **237**, 230 (1962).
51. Wyman J., *Adv. Protein Chem.* **4**, 420 (1947).
52. Yielding K. L., Tomkins G. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1483 (1960).
53. Yielding K. L., Tomkins G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 327 (1962).

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

P O S T Ę P Y B I O C H E M I I

TOM XI 1965 ZESZYT 3

*JERZY KĄCZKOWSKI**

Budowa i własności glutenu pszennego

The Structure and Properties of Wheat Gluten

The revue on chemical constituents, methods of investigations and some theories about structure and biosynthesis of wheat gluten.

Zastosowanie pszenicy i żyta jako głównych zbóż przy produkcji pieczywa wynika z zawartości w ich mące szczególnej substancji białkowej, przemieszanej w bielmie z ziarnami skrobi. Substancja ta, zwana glutenem, zbudowana w 80-90 %-ach z białek, posiada rzadko spotykane wśród innych białek właściwości fizykochemiczne i mechaniczne jak elastyczność, lepkość, spoistość i plastyczność. Właściwościami tymi wyróżnia się przede wszystkim gluten pszenicy — bardziej niż pszenica rozpowszechnione u nas żyto zawiera gluten o gorszych własnościach strukturotwórczych. Pieczywo z mąki pszennej charakteryzuje się miękiszem gąbczastym i porowatym, dzięki zatrzymywaniu i równomiernemu rozłożeniu w miękiszu dwutlenku węgla wytworzonego w trakcie fermentacji ciasta.

Pierwsze wzmianki o uzyskaniu z mąki pszennej glutenu przez wymywanie oraz o niektórych jego właściwościach pochodzą z 1728 roku (4, 10), to znaczy od pionierskich prac B e c c c a r i. W XIX wieku wykazano, że jest to substancja zbudowana z dwóch rodzajów białka, jedno z nich jest rozpuszczalne, drugie — nierozpuszczalne w 70-80 %-owym etanolu. Frakcję rozpuszczalną w etanolu nazwano gliadyną, frakcję nierozpuszczalną — gluteniną.

Wyczerpujące i systematyczne badania nad glutenem podjął na przełomie XIX i XX wieku O s b o r n e (69). Wykazał on, że w glutenie zawarte jest ponad 80 % wszystkich białek mąki i że glutenina i gliadyna występują w nim w prawie równych ilościach. Glutenina stanowi zasadnicze białko, do którego są luźno przyłączone cząsteczki gliadyny i substancji niebiałkowych — cukrowców i tłuszczowców w trwały sposób związanych z białkiem. Pozostałe 20 % białek mąki — to według Osbor-

* Doc. dr, docent Katedry Biochemii SGGW w Warszawie.

http://rcin.org.pl

ne'a rozpuszczalne białka typu albumin i globulin, odmywające się łatwo wodą i nie wchodzące w skład kompleksu glutenowego.

W następnych latach dość ogólnikowa za czasów Osborne'a wiedza o glutenie została bardzo znacznie wzbogacona, dzięki wprowadzeniu do badań nowych technik jak analiza interferencyjna, spektroskopia, mikroskopia elektronowa i fluorescencyjna, elektroforeza, chromatografia, sączenie molekularne itp. Zwłaszcza metody elektroforezy bibułowej, swobodnej, w żelu skrobiowym i innych żelach oraz ostatnio immunoelektroforeza pozwoliły bliżej przebadać skład i własności substancji białkowych kompleksu glutenowego.

I. Skład chemiczny

Tak zwany gluten surowy, otrzymywany konwencjonalną metodą około 1-godzinnego odmywania ciasta pod bieżącą wodą przy równoczesnej mechanicznej obróbce, wykazuje dość różnorodny skład chemiczny. Zależy on zarówno od próby mąki, tj. wysokości przemiału oraz odmiany i warunków uprawy pszenicy, jak i od składu chemicznego wody płuczącej, czasu i sposobu wymywania oraz warunków suszenia. Zgodnie z danymi szeregu autorów (91) surowy gluten zawiera w przeliczeniu na suchą masę 72-90 % białka (w tym 40-50 % gliadyny, 35-40 % gluteniny, 3-7 % innych białek), 2-8 % tłuszczowców, 0,5-11,5 % cukrowców oraz 0,5-2,5 % soli mineralnych. Szereg cytowanych danych o wyjątkowo niskiej zawartości składników niebiałkowych, np. 0,01 % cukrowców (56), czy bardzo wysokiej zawartości białek, np. do 100 % (92) odnosi się do glutenu wydzielonego metodami chemicznymi, które powodują częściową denaturację białek, a tym samym możliwość odłączenia składników niebiałkowych. Dlatego przyjmuje się, że składniki niebiałkowe, które można usunąć z glutenu przez długotrwałe wymywanie w strumieniu wody wodociągowej nie wchodzą w skład kompleksu glutenowego, natomiast te, które w tych warunkach nie dadzą się usunąć są związane z uwodnionym kompleksem glutenowym bądź chemicznie, bądź adsorpcyjnie i stanowią części składowe kompleksu.

1. Sole mineralne

Zawartość soli mineralnych w glutenie waha się w granicach od 0,5 do 2,5 %. Najwięcej, bo ponad 50 % całej ilości jest jonu fosforanowego. Występuje również magnez, wapń i potas, nieco krzemianów oraz ślady licznych mikroelementów (86). Z zestawienia tego widać analogię do składu soli mineralnych w ziarnie, a ich ilość globalna w glutenie zależy przede wszystkim od wysokości przemiału mąki.

http://rcin.org.pl

Sole mineralne nie wykazują wpływu na jakość glutenu i są traktowane, jako domieszki przypadkowe, dobrze adsorbujące się na białkach glutenu z wyjątkiem być może pewnej ilości fosforanów, które wchodząc w skład fosfotłuszczowców uczestniczą w budowie kompleksu glutenowego.

2. Cukrowce

W surowym glutenie zawartość cukrowców może dochodzić do 11,5 %, z czego do 9 % przypada na skrobię, 0,5 % na błonnik i do 2 % na cukry proste — głównie glukozę. Skrobia i błonnik są składnikami przypadkowymi, gdyż udało się otrzymać preparaty nie zawierające ich, a wykazujące wszystkie właściwości glutenu (56).

Wielocukrowce są związane jedynie siłami adsorpcyjnymi i nie są niezbędne dla utrzymania właściwej struktury kompleksu glutenowego.

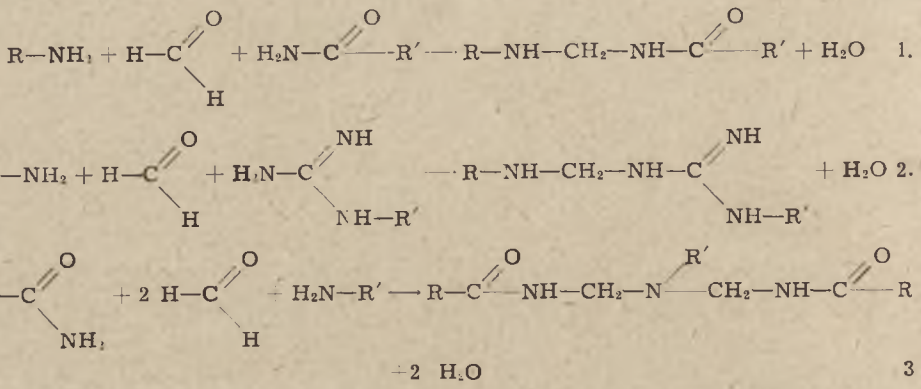
Cukry redukujące występują częściowo w postaci związanej siłami adsorpcyjnymi a częściowo są związane chemicznie z białkami glutenu, gdyż nawet oczyszczone preparaty frakcji białkowych (gliadyna) zawierają nieco tych związków (91, str. 28).

Wiadomo, że z cukrami redukującymi reagują grupy aminowe aminokwasów lub białek, powstają wówczas związki zwane melanoidynami, charakteryzujące się ciemnym zabarwieniem. Przemiana ta znana jako reakcja Maillarda (14) zachodzi często w produktach spożywczych, wywołując ciemną barwę i charakterystyczny aromat. Wykazano, że reakcja ta może zachodzić w czasie przygotowywania i pieczenia chleba żytniego i pszennego, nadając pieczywu charakterystyczne zabarwienie skórki oraz smak i aromat miąższu (1, 51, 52). Jakkolwiek reakcja Maillarda w niskiej temperaturze i przy małej wilgotności zachodzi bardzo powoli, wydaje się, że może mieć miejsce w warunkach przechowywania ziarna czy zarabiania ciasta. Ostatnio sądzi się, że proces ten ma duży wpływ na polepszenie się tych właściwości glutenu, które są zależne od sposobu połączenia poszczególnych łańcuchów peptydowych w przestrzennie określoną siatkę za pomocą poprzecznych wiązań lub mostków, między innymi mostków węglowodanowych. Istotnie znany jest fakt poprawiania się wartości wypiekowej po kilku miesiącach przechowywania mąki i okres potrzebny do osiągnięcia lepszych walorów strukturotwórczych, zwany bywa okresem dojrzewania mąki.

Fraenkel-Conrat i Olcott (28) w badaniach nad gliadyną i innymi białkami wykazali powstawanie mostków metylenowych między pierwszo- lub drugorzędowymi grupami aminowymi jednego łańcucha i pierwszorzędowymi grupami amidowymi lub guanidynowymi dru-

http://rcin.org.pl

giego, w wyniku reakcji z aldehydem mrówkowym. Sugeruje to, że reakcja przebiega zgodnie z równaniem 1, 2 lub 3.



Jakkolwiek pierwsze dwa typy wytworzonych połączeń znane są tylko dla prostych związków modelowych, powstanie połączenia trzeciego typu wykazano w gliadynie i zeinie. Można przypuszczać, że podobna reakcja zachodzi w mące przy udziale glukozy zamiast aldehydu mrówkowego, i że tego typu wiązania mogą mieć znaczenie dla polepszenia struktury kompleksu białkowego glutenu.

Pogląd ten znalazł pośrednie potwierdzenie w badaniach Hlynki i współpracowników (37, 38, 39) nad zmianami, zachodzącymi w czasie kilkumiesięcznego przechowywania mąki lub glutenu, zmieszanych z glukozą. Badacze ci wykazali, że po pewnym czasie część dodanej glukozy nie dawała się odmyć wodą, co sugerowało, że została chemicznie związana z białkiem. Autorzy wnioskują, że cukry proste w niewielkich ilościach wchodzą w skład siatki przestrzennej białek glutenu jako mostki między łańcuchami peptydowymi, a ilość tych mostków wpływa na właściwości mechaniczne i fizykochemiczne glutenu.

Podobnie Neukom i Deuel (67) dodając do mąki utleniane nadjodanem wielocukrowce uzyskali znaczne zwiększenie sprężystości glutenu i zwiększenie się wartości wypiekowej mąki.

3. Tłuszczowce

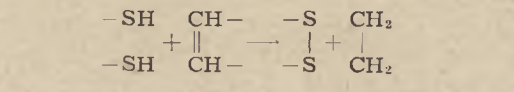
Zawartość tłuszczowców w surowym glutenie zależy w pierwszym rzędzie od materiału wyjściowego i od sposobu jego otrzymywania i waha się od 2 do 8 % suchej masy glutenu. Występują tu zarówno tłuszcze właściwe, jak fosfotłuszczowce, kwasy fosfatydowe i ich sole oraz wolne kwasy tłuszczowe. Część tych związków (20-30 %) może być usunięta z glutenu bezpośrednio eterem lub innymi rozpuszczalnikami tłuszczow-

http://rcin.org.pl

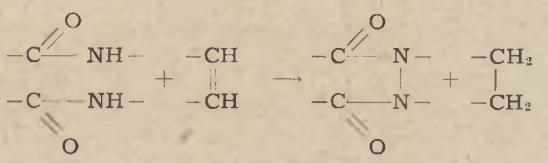
cowymi — frakcja ta określana jest jako tłuszczowce niezwiązane. Zasadnicza ilość jednak (ponad 70 %) stanowi frakcję tłuszczowców związanych i daje się usunąć wymienionymi rozpuszczalnikami dopiero po uprzednim potraktowaniu glutenu etanolem lub nasyconym wodą *n*-butanolem.

Badania mikroskopowe endospermy wykształcających się ziarn wykazały, że białka glutenu wytwarzają się w ścisłej łączności z tłuszczowcami stanowiącymi składnik błon cytoplazmatycznych (40).

Prowadzone przez wiele lat liczne badania nad wpływem dodatku różnych tłuszczowców do ciasta dawały nie jednoznaczne wyniki, wskazujące bądź na pogarszanie wartości wypiekowej (85, 87) bądź na jej poprawę (2, 21, 22, 58). Obecnie przyjmuje się, że jakość glutenu, a więc i wartość wypiekowa mąki zależy od powiązania w kompleks z białkiem nienasyconych kwasów tłuszczowych (5, 49, 77). Jakkolwiek nie potwierdzone dotychczas doświadczalnie, niemniej prawdopodobne wydaje się przypuszczenie W a k a r a (90), że umożliwiają one łączenie się łańcuchów polipeptydowych w wyniku utleniania grup tiolowych (równanie 4) lub iminowych (równanie 5):



4.



5

Szereg autorów (32, 35, 36, 89) uważa kompleks glutenowy za zbiór włókien białkowych powiązanych warstewkami fosfotłuszczowców, co ma wpływać dodatnio na plastyczność glutenu. Stwierdzono bowiem, że usunięcie tych związków z mąki lub surowego glutenu drogą ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami prowadzi do obniżenia właściwości mechanicznych (sprężystości, elastyczności, plastyczności i spoistości) glutenu, a tym samym do pogorszenia własności wypiekowych mąki. Badania rentgenograficzne (36) wskazywały również na udział fosfotłuszczowców w procesie pęcznienia białek glutenu. Inni autorzy (8, 50, 64) sądzą natomiast, że obecność fosfotłuszczowców nie jest konieczna do utrzymania charakterystycznych właściwości glutenu, a obniżenie jego własności mechanicznych po potraktowaniu rozpuszczalnikiem nie jest powodowane usunięciem fosfotłuszczowców lecz obecnością śladów stosowanego rozpuszczalnika.

Ostatnie badania B o u r d e t a i H e r a r d a (13) nad rozmieszczeniem fosforu w glutenie wydają się jednak potwierdzać istotne znaczenie lecytyn oraz bardziej złożonych tłuszczowców, zawierających galakto-

http://rcin.org.pl

zę i arabinozę dla struktury glutenu. Z badań tych wynika bowiem, że fosfor fosfotłuszczowców jest trwale związany z kompleksem glutenowym i stanowi 16-22 % zawartego w nim fosforu ogólnego.

4. Białka

Białka stanowiące 72-90 % suchej masy glutenu surowego są substancjami zasadniczymi kompleksu glutenowego.

Skład aminokwasowy białek glutenu badany był przez różnych autorów, a uzyskiwane wyniki wykazują nieraz znaczne rozbieżności, spowodowane pochodzeniem pszenicy, metodami wydzielania glutenu oraz metodami oznaczania. Duże rozbieżności wykazują również oznaczenia składu dwóch zasadniczych frakcji glutenu: gliadyny i gluteniny (10, 23, 73, 78, 83, 93). Tablica 1 podaje niektóre wyniki tych oznaczeń.

Tablica 1

Procentowy skład aminokwasowy glutenu, gluteniny i gliadyny

Aminokwas	Gluten		Glutenina		Gliadyna	
	wg 78	wg 75	wg 93	wg 10	wg 83	wg 10
Alanina	1,9	2,2	4,08	4,4	2,66	2,5
Arginina	3,6	4,7	1,89	4,7	3,83	3,2
Cysteina + cystyna	2,4	1,9	3,77	1,7	2,34	2,3
Fenyloalanina	4,8	5,4	3,25	2,0	3,00	2,5
Glicyna	3,1	3,5	3,14	1,0	6,86	1,0
Histydyna	2,1	2,3	4,71	1,8	2,96	2,1
Izoleucyna	3,9	4,6	7,33	6,0	11,53	6,0
Kwas glutaminowy	2,9	3,7	5,34	2,1	1,74	1,4
Kwas aparaginowy	31,2	35,5	37,38	27,2	32,29	46.0
Leucyna	6,1	7,6	6,60			
Lizyna	1,5	1,8	0,0	1,9	0,88	0,6
Metionina	1,4	1,9	0,84	0,0	0,31	2,3
Prolina	11,7	12,7	9,74	4,4	11,58	13,2
Seryna	0,0	4,7	3,87	0,7	7,26	0,1
Treonina	2,3	2,6	3,04	4,0	1,00	3,0
Tryptofan	1,0	1,1	0,0	1,8	0,74	0,9
Tyrozyna	3,7	3,1	5,68	5,1	1,41	3,1
Walina	3,8	4,7	5,76	1,0	2,46	3,0

Z przytoczonych danych widać, że w glutenie, jak również w jego frakcjach występuje najwięcej kwasu glutaminowego, ponadto sporo proliny, leucyny i izoleucyny. Tak znaczna ilość kwasu glutaminowego i proliny może prowadzić do deformacji spiralnej struktury łańcuchów

http://rcin.org.pl

polipeptydowych i wytworzenia się innego typu struktury wtórnej (72). Z tą deformacją mogą być związane szczególne cechy mechaniczne glutenu, przede wszystkim jego sprężystość. Kwas glutaminowy występuje w ponad 90 % w postaci glutaminy (6, 23).

Własności frakcji gliadynowej (40-50 %), odpowiadają własnościom prolamin, a frakcji gluteninowej (35-40 %) — własnościom glutelin. Frakcje te różnią się między sobą rozpuszczalnością i masą cząsteczkową. Pewna ilość (3-7 %) białek rozpuszczalnych typu albumin i globulin jest zatrzymana w kompleksie glutenowym za pomocą wiązań fizycznych i nie daje się odmyć wodą. Białka te są traktowane jako domieszki dwóch głównych frakcji, gdyż nie są składnikami niezbędnymi. Wyróżnienie frakcji gliadynowej i gluteninowej utrzymało się do obecnej chwili, jakkolwiek już od szeregu lat wiadomo, że nie są to jednorodne białka, lecz mieszaniny białek o zbliżonych własnościach.

Zasadniczym kryterium podziału na wymienione frakcje jest ich rozpuszczalność w 70 % etanolu (gliadyna), względnie nierozpuszczalność w tym rozpuszczalniku (glutenina) i na tej podstawie opiera się grupa metod stosowanych do dziś z różnymi modyfikacjami do wydzielania i oczyszczania gliadyny (69). Inne metody polegają bądź na rozpuszczaniu gliadyny w 0,07 M kwasie octowym (12), bądź też na traktowaniu surowego glutenu roztworem mocznika i wysoleniu gluteniny (20).

Zastosowanie elektroforezy umożliwiło dalszy rozdział białek glutenu na frakcje o różnej masie cząsteczkowej i różnej ruchliwości. W tym celu stosowano głównie elektroforezę swobodną (41, 42, 43, 46, 47), zaś do frakcjonowania i oczyszczania gliadyny elektroforezę w żelu skrobiowym (18, 26, 27, 30, 31, 43, 44, 45, 55, 96, 98) lub w innych żelach (54), elektroforezę bibułową (70) oraz elektroforezę ciągłą (99). Ostatnio P e n c e i N i m m o (75) zastosowali do badania białek glutenu immunoelektroforezę.

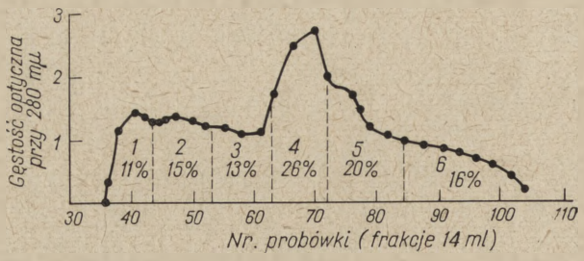
Innego typu metodą, pozwalającą na rozdział białek glutenu na poszczególne frakcje, jest chromatografia kolumnowa na modyfikowanych celulozach, szczególnie zaś na karboksymetylocelulozie — stosowana do białek zawieszonych lub rozpuszczonych w rozpuszczalnikach kwaśnych (32, 55, 82, 95), jak również na dwuetyloaminoetylocelulozie — stosowana do białek rozpuszczalnych w buforach słabo zasadowych (19, 32, 81). Wreszcie ostatnio wprowadzono do rozdzielania białek glutenu sączenie molekularne na *Sephadex* (76). Metoda ta pozwala na rozdzielenie mieszanin białek na frakcje różniące się masą cząsteczkową (44, 48, 94, 98) i nadaje się zwłaszcza do wstępnego rozdzielania.

Wyniki uzyskane w badaniach prowadzonych opisanymi metodami zależą od stosowanych warunków rozdziału. Ogólnie jednak stwierdzono, że zarówno frakcja gliadynowa, jak i gluteninowa składają się z co najmniej kilku białek. Rozdział glutenu na zmodyfikowanych celulozach

http://rcin.org.pl

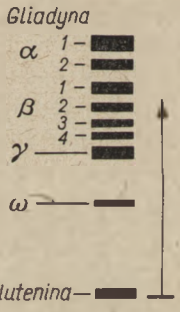
i przez sączenie molekularne dawał przeciętnie 6-7 frakcji (44, 55). Wyniki frakcjonowania białek glutenu na *Sephadex* G 75 podano na rys. 1.

Frakcja gliadynowa wykazuje w czasie elektroforezy znacznie większą ruchliwość od gluteninowej, zaznacza się to szczególnie w czasie elektroforezy w żelu skrobiowym, w którym frakcja gluteninowa nie wę-



Rys. 1. Obraz frakcjonowania białek glutenu na kolumnie z *Sephadex* G 75 za pomocą 0,05 M kwasu octowego (wg 44)

druje ze względu na wysoką masę cząsteczkową, mimo że posiada ładunek elektryczny. Jones i współpracownicy (41, 42, 43, 44) rozdzielili frakcję gliadynową w bloku skrobiowym na 4 podfrakcje oznaczone literami α, β, γ i ω. Najbardziej ruchliwe z nich frakcje α i β rozdzielają się dalej na podfrakcje (rysunek 2). Jak widać na rysunku w sumie uzyskano 8 prążków białkowych we frakcji gliadynowej oraz pozostającą na starcie frakcję gluteninową.



Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny w żelu skrobiowym białek glutenu zawieszonych w buforze mleczanowo-glinowym (wg 44)

Podobny rozdział białek glutenu za pomocą elektroforezy uzyskali również i inni autorzy (18, 25). Kamiński (45) uzyskał wprawdzie aż 12 prążków białkowych, jednakże część z nich mogła pochodzić od białek rozpuszczalnych typu albumin i globulin.

γ-gliadyna jest białkiem elektroforetyczie jednorodnym o masie cząsteczkowej 47 000 (42). Średnia masa cząsteczkowa frakcji α-gliadyny i β-gliadyny, które nie są białkami jednorodnymi wynosi odpowiednio 40 000 i 42 000.

Badania poszczególnych białek frakcji gliadynowej za pomocą immu-

http://rcin.org.pl

noelektroforezy (75) wykazały, że białka te nie mogą posiadać znacznych różnic strukturalnych, gdyż przy zastosowaniu przeciwciała wytworzonego po wstrzyknięciu królikowi którejkolwiek z podfrakcji, wszystkie one uległy wytrąceniu.

Frakcja gluteninowa zawiera niewielką ilość białka o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej wynoszącej około 50 000 (prawdopodobnie jest to nie dające się oddzielić białko frakcji gliadynowej), jednakże główna frakcja ma masę cząsteczkową rzędu 2-3 miliony (42). Wyliczenia wskazują, że i ta frakcja gluteniny nie jest jeszcze jednorodna i zawiera mniejsze cząsteczki — być może powstające w wyniku depolimeryzacji zachodzącej pod wpływem użytych rozpuszczalników.

Białka rozpuszczalne glutenu zostały również przebadane i scharakteryzowane. Wchodzące w ich skład albuminy rozdzielono na 6-11 podfrakcji (71, 74) o średniej masie cząsteczkowej 20 000, a globuliny — na 4 podfrakcje (α, β, γ, ϑ). Inne białka rozpuszczalne rozdzielono na 16 prążków (19), z których 4 można rozfrakcjonować dalej. Prawdopodobnie nie wszystkie białka rozpuszczalne są trwale związane w kompleksie glutenowym.

II. Struktura kompleksu

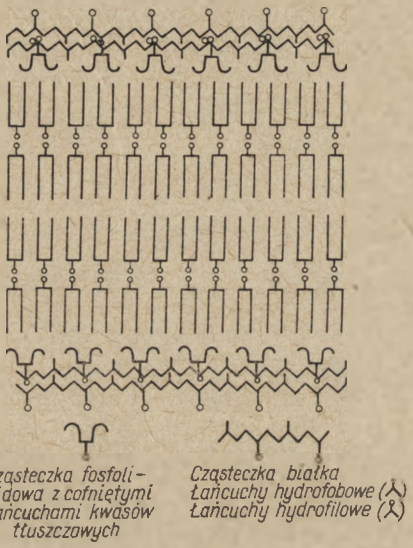
Szczególne właściwości mechaniczne kompleksu glutenowego przede wszystkim plastyczność i elastyczność, winny odpowiadać określonej strukturze wewnętrznej skomplikowanego zespołu związków wchodzących w skład tego kompleksu. Istnieje wiele różnych, mniej lub bardziej sprecyzowanych hipotez. Niektórzy autorzy traktują gluten jako kompleks dwóch zasadniczych białek: gliadyny i gluteniny, połączonych bądź siłami biegunowymi występującymi w zakresie *pH* między punktami izoelektrycznymi tych białek (15, 16), bądź siłami kohezji (88). Według innych jest on bezpostaciową masą gliadyny, w której równomiernie rozprzestrzenione są twarde płytki gluteniny (7), jednolitą masą złożoną z nieograniczonej ilości frakcji, zróżnicowanych stopniowo zmieniającymi się właściwościami i masą cząsteczkową (60), bądź wreszcie jednorodnym białkiem, zdolnym do dysocjowania na różnorodne fragmenty polipeptydowe (10, 11).

Hipotezę struktury kompleksu glutenowego, która najlepiej tłumaczy jego właściwości, a ponadto znalazła już częściowe potwierdzenie eksperymentalne, zaproponował Grosskreutz (33, 34, 66). Podstawę do tej hipotezy stanowią wyniki własnych badań tego autora nad mikrostrukturą kompleksu glutenowego prowadzonych metodami mikroskopii elektronowej i niskokątowej dyfrakcji promieni X, oraz wyniki prac innych autorów (79, 89).

http://rcin.org.pl

Według hipotezy Grosskreutza gluten wydzielony przez odmywanie (a więc uwodniony) składa się ze zbioru płytek białkowych, utworzonych z ściśle powiązanych łańcuchów polipeptydowych, które na skutek dużej zawartości kwasu glutaminowego i proliny mają zdeformowaną wtórną strukturę i tworzą przypadkowo pozwijane spirale. Hydrofilowe łańcuchy boczne tych spiral zwrócone są na zewnątrz — w kierunku warstwy cząsteczek wody hydratacyjnej i mogą tworzyć mostki wodorowe, łączące poszczególne spirale w płytki i poszczególne płytki między sobą za pośrednictwem cząsteczek wody.

Zgodnie z badaniem Stoeckeniusa (84) białka łatwo się łączą z fosfotłuszczowcami w kompleksy, które według Grosskreutza stanowią



Rys. 3. Struktura warstwy lipoproteinowej glutenu (wg 33)

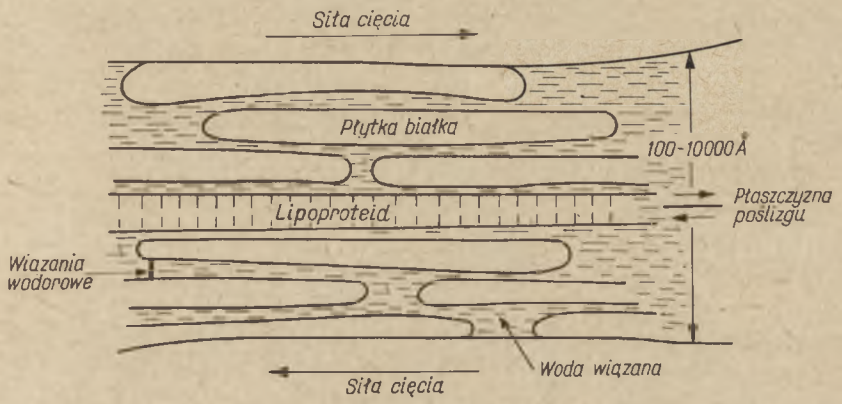
w strukturze glutenu jeden z zasadniczych elementów nadających mu właściwości plastyczne. Budowa takiego kompleksu fosfolipidowo-białkowego podana jest na rys. 3.

Z każdą z powierzchni fosfotłuszczowca połączone są co najmniej dwa łańcuchy polipeptydowe, przypuszczalnie za pośrednictwem grup zasadowych białek i fosforanowych fosfotłuszczowca. Liczne płytki białkowe wraz z cienkimi, bimolekularnymi warstewkami fosfolipidowo-białkowymi (które stanowią około 5 % masy glutenu) tworzą płaskie zespoły o grubości 100-10 000 Å widoczne pod mikroskopem elektronowym (rys. 4). Przekrój takiej warstwy podany jest na rys. 5.

Wkomponowane w uwodnione białko warstewki lipoproteinowe są uważane za powierzchnie poślizgu, dzięki którym masa glutenu może być znacznie odkształcana bez rozrywania wiązań między poszczególnymi płytkami białka. Wiązania te są mocniejsze od występujących między

http://rcin.org.pl

Rys. 4. Obraz powierzchni rozciągniętego, liofilizowanego glutenu w mikroskopie elektronowym (wg 33). Widoczne 3 warstwy płaszczyzny glutenu.



Rys. 5. Model przekroju poprzecznego struktury płaszczyznowej glutenu (wg 33)

fosfolipidowymi bimolekularnymi warstewkami „pseudo-wiązań", które po rozerwaniu mogą wytwarzać się ponownie w innych miejscach. Umożliwia to przesuwanie się płytek białkowych wzdłuż płaszczyzny poślizgu bez rozrywania wiązań między nimi, a więc bez zmiany kierunku ich ustawienia. Istotnie badania mechaniczne wykazały, że rozerwanie wiązań między płytkami białka następuje dopiero przy braku fosfotłuszczowców, bądź przy zbyt dużej sile odkształcającej. Z drugiej strony proponowany model wyjaśnia fakt, że przy zbyt dużej zawartości fosfotłuszczowców uzyskuje się gluten o zbyt dużej płynności.

Obok właściwości plastycznych gluten wykazuje również elastyczność czyli sprężystość, która według Grosskreutza zależy od szczególnego sposobu zwinięcia i pofałdowania spiral polipeptydowych o zdeformowanej strukturze.

Omówiona hipoteza nie wyjaśnia usytuowania poszczególnych frakcji białkowych w kompleksie i pewnym jej uzupełnieniem może być po-

http://rcin.org.pl

gląd Mereditha (65), który wyróżnia w strukturze glutenu cztery ugrupowania białek: A, B, C i D. Podstawą tej struktury jest ugrupowanie A — elastyczne, trójwymiarowe, żelujące białko szkieletowe (glutenina). Do niego są przyłączone pozostałe trzy typy białek i fosfotłuszczowce. Białka te, o różnym stopniu agregacji, pozostają w pewnym stanie równowagi z podstawową strukturą A, który zależy od takich czynników jak stan jonowy, oksydoredukcyjny, obecność soli itp. Największą zmienność pod wpływem tych czynników wykazuje typ B białka. Typ C stanowią białka niejonowe, odpowiedzialne za lepkość i niektóre inne cechy, np. uwadnianie, słabo ruchliwe w elektroforezie, zawierające dużo grup amidowych, a mało zasadowych w bocznych łańcuchach. Typy B i C to poszczególne frakcje gliadyny. Typ D białek — to najbardziej ruchliwe albuminy i globuliny, występujące w pewnych ilościach w kompleksie.

Hipoteza Grosskreutza wraz z uzupełnieniem Mereditha, jakkolwiek atrakcyjna i dobrze tłumacząca cechy mechaniczne glutenu, oparta jest na razie na dość skąpym materiale dowodowym i wymaga dalszego potwierdzenia, zwłaszcza, że jak wspomniano nie wszyscy autorzy uznają fosfotłuszczowce za niezbędne składniki struktury glutenu.

III. Uwagi końcowe

Na razie mało jest danych na temat tworzenia się kompleksu glutenowego w rozwijającym się ziarnie pszenicy. Na podstawie dawniejszych danych przypuszczano, że rodzime białka pszenicy nie są identyczne z kompleksem glutenowym, który rzekomo miał tworzyć się dopiero w trakcie uwalniania przy odmywaniu skrobi, czy zarabianiu ciasta. Obecnie jednak panuje przekonanie, że gluten wytwarza się w trakcie dojrzewania ziarna, w którym występuje w stanie nieuwodnionym, lecz nie różniącym się w sposób zasadniczy od odmytego, a następnie wtórnie wysuszonego glutenu. Dowodem tego są wyniki badań Hessa (35), który przeprowadził pomiary interferencji rentgenograficznej suchych i uwodnionych białek rodzimych i izolowanego glutenu, uzyskując podobne wyniki dla obu rodzajów białka.

Badania dynamiki nagromadzania się glutenu w trakcie dojrzewania ziarna wskazują, że już od samego początku nalewania ziarn odbywa się synteza kompleksu glutenowego, z równoczesnym wytwarzaniem frakcji gluteninowej i gliadynowej. Ostatnia wytwarza się z pewnym opóźnieniem, w związku z czym gluten we wcześniejszych stadiach dojrzałości wykazuje gorsze właściwości plastyczne oraz gorszą spoistość i lepkość (61, 90).

Ostatnio wysunięto hipotezę (97), że wysokocząsteczkowe białko glu-

http://rcin.org.pl

teniny powstaje przez połączenie się np. wiązaniami dwusiarczkowymi lub innymi licznych cząsteczek białek frakcji gliadynowej i być może frakcji rozpuszczalnej. Podstawą dla takiego przypuszczenia było stwierdzenie identycznej ruchliwości elektroforetycznej niskocząsteczkowych białek, powstałych przez depolimeryzację gluteniny w wyniku redukcji merkaptoetanolem, frakcji białek gliadyny oraz frakcji białek rozpuszczalnych. Jednakże pogląd ten tylko częściowo jest zgodny z wynikami szkoły australijskiej (29, 31, 17, 40), prowadzącej cytochemiczne badanie ultrastruktury rozwijającej się endospermy pszenicy z zastosowaniem mikroskopu elektronowego i fluorescencyjnego, techniki izotopowej oraz opisanych metod frakcjonowania i rozdzielania. Cytowani autorzy dochodzą do wniosku, że jedynie białka frakcji rozpuszczalnej można traktować jako prekursory gluteniny, gdyż jak wynika z rozkładu radioaktywności, tworzą się one równolegle z gluteniną, podczas gdy białka frakcji gliadynowej powstają w późniejszym okresie rozwoju ziarna (31). Natomiast badania cytochemiczne wykazały ścisły związek powstających tworów białkowych z substancjami lipoproteinowymi, co stanowi potwierdzenie opisanej uprzednio teorii fosfolipidowej struktury glutenu (34).

Badania biochemiczne nad biosyntezą białek glutenu są dopiero w zaczątku i raczej dotyczą syntezy nie kompleksu jako całości, lecz poszczególnych frakcji białkowych. Badania te prowadzone są głównie w pracowni Mc Connella (9, 62, 63) w Kanadzie z zastosowaniem związków znaczonych ^{14}C, oraz w pracowni Grahama w Australii (30) z zastosowaniem związków znaczonych ^{14}C i ^{35}S. Wyniki tych badań potwierdzają wniosek o wcześniejszej syntezie gluteniny i późniejszej gliadyny, a tym samym zaprzeczają przypuszczeniom o prekursorowym charakterze gliadyny w stosunku do gluteniny.

W zakończeniu należy zaznaczyć, że mimo ogromu pracy i dużego zainteresowania glutenem osiągnięte wyniki nie doprowadziły jeszcze do wyjaśnienia jego struktury, warunkującej jego właściwości. Potrzebne są nowe metody badań głównie fizyczne, jednakże ich szybki rozwój rokuje nadzieję na zbliżenie się do rozwiązania tych zagadnień w niedługim czasie.

LITERATURA

1. Auerman L. J., Kretowicz W. L., Alakrinskaja E. A., Bazarnowa W. M., Tokariewa P. P., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* 92, 131 (1953).
2. Auerman L. J., Zaparina E. A., Stiepanowa E. J., Fiedorowa G. S., *Piszcz. Technoł.* Wyp. 4, 74 (1958).
3. Auerman L. J., Docenko L. D., Puczkowa L. J., *Piszcz. Technoł.* Wyp. 1, 76 (1960).

http://rcin.org.pl

4. Bailey C. H., *Cereal Chem.* **18**, 555 (1941).
5. Barton-Wright E. C., *Cereal Chem.* **15**, 521 (1938).
6. Bechwith A. C., Wall J. S., Dimler R. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 319 (1963).
7. Berliner E., Koopmann J., *Ztschr. Ges. Mühlenwesen* **6**, 91 (1929).
8. Bhatti M. B., Mc Calla A. G., *Cereal Chem.* **35**, 240 (1958).
9. Bilinski E., Mc Connll W. B., *Cereal Chem.* **35**, 66 (1958).
10. Blish M. J., *Adv. Protein Chem.* **2**, 337 (1945).
11. Blish M. J., *Baker's Digest* **20**, 19 (1946).
12. Blish M. J., Sandstedt R. M., *Cereal Chem.* **3**, 144 (1926).
13. Bourdet A., Herard J., *Getreide u. Mehl* **12**, 16 (1962).
14. Braverman J. B. S., Introduction to the Biochemistry of Foods, Amsterdam, London, New York 1963, str. 303.
15. Bungenberg De Yong H. L., Klaar W. J., *Cereal Chem.* **8**, 439 (1931).
16. Bungenberg De Yong H. L., Klaar W. J., *Kolloid Ztschr.* **128**, 164 (1952).
17. Buttrose M. S., *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 305 (1963).
18. Cluskey J. E., Taylor N. W., Charley H., Senti F. R., *Cereal Chem.* **38**, 325 (1961).
19. Coates J. H., Simmonds D. H., *Cereal Chem.* **38**, 256 (1961).
20. Cook W. H., *Canad. J. Res.* **5**, 389 (1931).
21. Cookson M. A., Coppcock J. B., *J. Sci. Food Agric.* **7**, 72 (1956).
22. Coppcock J. B., Cookson M. A., Lancy D. H., Oxford D. W., *J. Sci. Food Agric.* **5**, 8 (1954).
23. Dimler R. J., *Baker's Digest* **37**, (1) 52 (1963).
24. El Gindy M. M., Burell R. C., Lamb C. A., *Brot u. Gebäck* **10**, 68 (1956).
25. Elton G. A. H., Ewart J. A. D., *Nature* **187**, 600 (1960).
26. Elton G. H. A., Ewart J. A. D., *J. Sci. Food Agric.* **13**, 62 (1962).
27. Elton G. A. H., Ewart J. A. D., *J. Sci. Food Agric.* **15**, 119 (1964).
28. Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S., *J. Amer. Chem. Soc.* **70**, 2673 (1948).
29. Grabar P., Beuhamou N., Doussart J., *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* **1**, 187 (1962).
30. Graham J. S. D., *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 342 (1963).
31. Graham J. S. D., Morton R. K., *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 356 (1963).
32. Graham J. S. D., Morton R. K., Simmonds D. H., *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 350 (1963).
33. Grosskreutz J. C., *Biochim Biophys. Acta* **38**, 400 (1960).
34. Grosskreutz J. C., *Cereal Chem.* **38**, 336 (1961).
35. Hess K., *Kolloid Ztschr.* **136**, 84 (1954).
36. Hess K., *Kolloid Ztschr.* **141**, 19 (1955).
37. Hlynka I., *Cereal Chem.* **26**, 307 (1949).
38. Hlynka I., Bass E. J., *Cereal Chem.* **26**, 513 (1949).
39. Hlynka I., Anderson J. A., *Cereal Chem.* **28**, 136 (1951).
40. Jennings A. C., Morton R. K., Palk B. A., *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 366 (1963).
41. Jones R. W., Taylor N. W., Senti F. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 363 (1959).
42. Jones R., W., Babcock G. E., Taylor N. W., Senti F. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 483 (1961).
43. Jones R. W., Dimler R .J., *Cereal Chem.* **39**, 336 (1962).
44. Jones R. W., Babcock G. E., Taylor N. W., Dimler R. J., *Cereal Chem.* **40**, 409 (1963).

http://rcin.org.pl

45. Kamiński E., *J.Sci. Food Agric.* **13**, 603 (1962).
46. Kelley J. J., Koenig V. L., *J. Sci. Food Agric.* **14**, 29 (1963).
47. Koenig V. L., *J.Sci. Food Agric.* **14**, 19 (1963).
48. Koenig V. L., Ogrins A., Trimbo H. B., Miller R. S., *J. Sci. Food Agric.* **15**, 492 (1964).
49. Koźmina N. P., *Izwiestia Tomskowo Intituta Technołogii Zierna i Muki* **2**, Wyp. 2 (1935).
50. Koźmina N. P., Naumowa A. T., *Trudy W. N. I. I. Z., Wyp.* **36**, 105 (1959).
51. Kretowicz W. L., Tokariewa P. P., *Biochimija* **13**, 608 (1948).
52. Kretowicz W. L., Tokariewa P. P., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **74**, 533 (1950).
53. Kriwołapow F. G., Stariczkowa W. E., *Piszczewaja Technoł.* Wyp. 1, 71 (1957).
54. Lee J. W., *Nature* **201**, 79 (1964).
55. Lee J. W., Tracey M. V., Winsor D. J., Wrigley C. W., Zentner H., *Austral. J. Biol. Sci.* **16**, 717 (1963).
56. Lusena C. V., *Cereal Chem.* **27**, 167 (1950).
57. Maes E., *Bull. L'Ecole Off. Meunerie Belge* **20**, 60 (1958).
58. Martin W. Mc K., Whitecomb W. C., *Cereal Chem.* **9**, 275 (1932).
59. Mc Caig J. D., Mc Calla A. G., *Canad. J. Res.* **19**, 163 (1941).
60. Mc Calla A. G., Gralen N., *Nature* **146**, 3689 (1940).
61. Mc Calla A. G., Rose R. C., *Canad. J. Res.* **12**, 346 (1935).
62. Mc Connell W. B., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 183 (1956).
63. Mc Connell W. B., *Canad. J. Biochem. Physiol.* **37**, 933 (1959).
64. Mecham D. K., Mohammad A., *Cereal Chem.* **32**, 405 (1955).
65. Meredith P., *Cereal Sci. Today* **9**, 27 (1964).
66. Meredith P., *Cereal Sci. Today* **9**, 33 (1964).
67. Neukom H., Deuel H., *Cereal Chem.* **35**, 220 (1958).
68. Neukom H., Kuendig W., Deuel H., *Cereal Sci. Today* **7**, 112 (1962).
69. Osborne T. B., The Proteins of the Wheat Kernel, Carnegie Inst. Wash. Publ. Nr 88 (1907).
70. Padmoyo M., Högl O., *Mitt. Lebensm. Hyg. Bern* **53**, 290 (1962).
71. Pence J. W., *Cereal Chem.* **30**, 328 (1953).
72. Pence J. W., *Cereal Sci. Today* **7**, 178 (1962).
73. Pence J. W., Mecham D. K., Elder A. H., Lewis J. C., Snell L. S. Olcott H. S., *Cereal Chem.* **27**, 335 (1950).
74. Pence J. W., Elder A. H., *Cereal Chem.* **30**, 275 (1953).
75. Pence J. W., Nimmo C. C., *Baker's Digest* **38**, (5) 38 (1964).
76. Popowicz J., *Post. Biochem.* **9**, 245 (1963).
77. Resnitschenko M. S., Popzowa A. J., *Die Mühlenlab.* **4**, (1934) cyt. wg 91.
78. Rice A. C., Ramstad P. E., *Cereal Chem.* **27**, 238 (1950).
79. Savary P., Flanzy J., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 414 (1957).
80. Schulerud A., *Brot u. Bebäck* **8**, 172 (1954).
81. Simmonds D. H., *Cereal Chem.* **40**, 110 (1963).
82. Sisakjan N. M., Markosjan L. S., *Biochimja* **24**, 1094 (1959).
83. Simmonds D. H., Winsor D. J. *Nature* **189**, 306 (1961).
84. Stoeckenius W. J., *Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 491 (1959).
85. Sullivan B., *Cereal Chem.* **17**, 661 (1940).
86. Sullivan B., Near C., *Ind. Engin. Chem.* **19**, 159 (1927).
87. Sullivan B., Near C., Foley G. H., *Cereal Chem.* **13**, 318 (1936).

http://rcin.org.pl

88. Szkłowskij I. F., *Trudy W. N. I. I. Z.* Wyp. 35, 112 (1957).
89. Traub W., Hutchinson J. B., Daniels D. G. H., *Nature* **179**, 769 (1957).
90. Wakar A. B., *Trudy W. N. I. I. Z.*, Wyp. 24, 40 (1952).
91. Wakar A. B., Klejkowina pszenicy, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskwa 1961.
92. Wakar A. B., Tołczinskaja E. S., Materiały naucznoj konferencji po Biochimji Zierna W. N. I. I. Z., Moskwa 1961, str. 13.
93. Waldschmidt-Leitz E., Mindemann R., *Ztschr. Physiol. Chem.* **308**, 257 (1957).
94. Whitaker J. R., *Analyt. Chem.* **35**, 1950 (1963).
95. Woychik J. H., Dimler R. J., Senti F. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 235 (1960).
96. Woychik J. H., Boundy J. A., Dimler R. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 477 (1961).
97. Woychik J. H., Huebner F. R., Dimler R. J., *Baker's Digest* **36**, (3) 78 (1962).
98. Wright W. B., Brown P. J., Bell A. W., *J. Sci. Food Agric.* **15**, 56 (1964).
99. Zentner H., *Chem. and Ind.*, str. 317 (1960).

http://rcin.org.pl

P O S T Ę P Y B I O C H E M I I

TOM XI 1965 ZESZYT 3

*WŁODZIMIERZ OSTROWSKI**

Metody elektroforezy pasmowej w zastosowaniu do biochemii**

The Zone Electrophoresis in Biochemistry

The lecture given at the Symposium on Electrophoresis, Gdańsk, 25—27 September 1964

Wydaje mi się, że możliwości metod elektroforetycznych nie zostały jeszcze dostatecznie poznane. Metoda elektroforezy w swoim założeniu jest bardzo prosta, a za jej pomocą można uzyskać niejednokrotnie doskonałe wyniki przy użyciu wprost prymitywnych urządzeń.

A. Tiselius

Elektroforeza jest doskonałą metodą izolowania i charakterystyki białek i innych substancji obdarzonych ładunkiem. Różna szybkość wędrowania jonów w polu elektrycznym jest uwarunkowana wypadkową ładunku i wymiarów cząsteczki. Elektroforeza przeprowadzana w stosownych warunkach pozwala określić punkt izoelektryczny amfolitu, jego ruchliwość i ilość, pozwala wyodrębnić go z mieszaniny, umożliwia studia w zakresie jednorodności i struktury jego cząsteczki oraz pozwala określić reakcje między cząsteczkami amfolitowymi lub cząsteczkami i jonami. Liczne białka, również krystaliczne, elektroforetycznie okazują się niejednorodne, jakkolwiek wykazują jednorodność przy badaniu innymi metodami. Przykładem może być dehydrogenaza alkoholowa z drożdży, która przy badaniu elektroforetycznym na żelu skrobiowym rozdziela się na kilkanaście frakcji, z których pięć ma własności izoenzymów (146), a w ultrawirówce wykazuje tylko jedno symetryczne pasmo. Zjawisko występowania izoenzymów obserwowane jest również w przypadku wielu innych enzymów (87, 106, 150).

I. Rozwój metod elektroforetycznych

Początek zastosowania pola elektrycznego do rozdziału substancji obdarzonych ładunkiem sięga schyłku ubiegłego stulecia. W 1886 roku

* Doc. dr, Kierownik Katedry Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie.

** Referat wygłoszony na I Ogólnopolskim Sympozjum Elektroforetycznym w Gdańsku, 25—27 września 1964 r.

http://rcin.org.pl

Lodge (83) w rurce wypełnionej żelem agarowym mierzył szybkość wędrowania różnych jonów pod wpływem pola elektrycznego. Whetham (148) w 1893 roku czyni obserwację, że obecność żelu agarowego w roztworze powoduje obniżenie szybkości wędrowania jonów. Następnie Picton i Linder (108) w 1897 roku rozdzielali barwniki w pionowej rurce wypełnionej elektrolitem i prawdopodobnie byli pierwszymi, którzy obserwowali wędrujące pasmo pod wpływem prądu w wolnym roztworze. Teoretyczne podstawy wędrowania jonów w polu elektrycznym opracowali Smoluchowski (132) i Helmholtz (55), a następnie rozwinęli Gouy (41) i Stern (134); szczegółowy przegląd tych zagadnień opracował Waksmundzki (145). Prace z zakresu elektrodializy prowadzone przez Adolfa i Pauly'ego (1), Blanka i Valko (12) oraz Verwey'a i Kruyta (143) w latach 1924-1933 miały bezpośredni wpływ na opracowanie nowoczesnego modelu aparatu do elektroforezy w wolnym roztworze oraz szeregu metod preparatywnego rozdziału koloidów i innych substancji obdarzonych ładunkiem, jak zagęszczanie izoelektryczne, elektrostratyfikacja, elektrodekantacja, elektroforeza konwekcyjna i inne.

W 1937 roku Arne Tiselius w Uppsali otwiera nową erę w dziedzinie analizy i preparatyki elektroforetycznej. Unowocześnia U-rurkę przez wprowadzenie urządzenia kompensującego przepływ roztworu w stosunku do wędrującego pasma, przez co cała objętość U-rurki zostaje wykorzystana dla rozdziału. Adaptuje następnie optyczny system Toeplera dla obserwacji bezbarwnych pasm rozdzielanej mieszaniny, co umożliwiło bezpośrednią wizualną kontrolę procesu frakcjonowania (140). W następnych latach zarówno U-rurka, jak i system optyczny aparatu Tiseliusa były coraz bardziej udoskonalane dzięki pracom Longsworth a (84), Svenssona (135) i innych, aż uzyskano nowoczesny przyrzyrząd o wysokiej zdolności rozdzielczej i precyzji uzyskiwanych wyników, dający wyraźny obraz rozdzielanych składników.

Z przeglądu historycznego rozwoju metod elektroforetycznych wynika, że początkowo rozdział przeprowadzano zazwyczaj w roztworze stabilizowanym zwykle żelem agarowym lub żelatyną. W następnym okresie wprowadzono rozdział w wolnym roztworze, umożliwiającym nieskrępowaną wędrówkę elektroforetyczną, którego szczytowym osiągnięciem było skonstruowanie aparatu do wolnej elektroforezy przez Tiseliusa. Współczesny rozwój metod rozdziału w polu elektrycznym powrócił do stabilizacji elektrolitu podstawowego, czyli elektroforezy w tzw. nośnikach, jak bibuła filtracyjna, skrobia, tworzywa sztuczne itp. Elektroforeza w środowiskach stabilizowanych stosowana jest głównie do izolowania elektroforetycznie jednorodnych frakcji, przy czym ich lokalizacja odbywa się zazwyczaj drogą nie bezpośrednią. Poszczególne frak-

http://rcin.org.pl

cje po rozdzieleniu są uwidaczniane w nośnikach metodami fizycznymi, chemicznymi lub biologicznymi. Elektroforeza w nośnikach może być przeprowadzana przy użyciu bardzo rozcieńczonych roztworów rozdzielanych substancji bez obawy zaburzenia granicy między frakcjami. Poszczególne frakcje mogą być wyizolowane ze stałego środowiska bez domieszek frakcji sąsiadujących.

W latach 1937-1939 König (74), a następnie König i Klobusitzky (67) przeprowadzili na bibule filtracyjnej wysyconej elektrolitem przewodzącym prąd rozdział toksyny jadu węża uzyskując kilka odrębnych frakcji. W 1939 roku Coolidge (21) konstruuje aparat w postaci kolumny wypełnionej proszkiem szklanym, w którym jednorazowo frakcjonuje białka zawarte w 2-ml próbie surowicy krwi ludzkiej. Jest to pierwsze doniesienie na temat elektroforezy kolumnowej, która została rozwinięta w latach pięćdziesiątych. W 1948 roku Haugaard i Kroner (53) równocześnie z rozdziałem chromatograficznym aminokwasów na bibule zastosowali pole elektryczne w kierunku prostopadłym do kierunku spływającego solwentu uzyskując znacznie lepsze wyniki niż przy użyciu tylko samej chromatografii. Praca ta była początkiem metod takich jak elektrochromatografia, rozdział dwukierunkowy, *fingerprinting* itp. W 1949 roku Svensson i Brattsten (138) opisali aparaturę do ciągłej elektroforezy, która w następnych latach została znacznie udoskonalona i zmodyfikowana przez Grassmanna (44), Durruma (27), Hanniga (50) i innych (65, 107, 118) i znana jest pod nazwą elektroforezy kurtynowej lub elektroforezy z ciągłym przepływem.

Ostatnie lata przyniosły nowe zdobycze w dziedzinie metod elektroforezy w nośnikach czy to przez wprowadzenie nowych materiałów stabilizujących o dużej zdolności rozdzielczej i niskiej reaktywności chemicznej, czy też przez opracowanie nowych urządzeń pozwalających dokładniej frakcjonować złożone mieszaniny na większą skalę. W dalszym ciągu obserwuje się rozwój metod elektroforetycznych, stosowanych do celów analitycznych i wyosabniania substancji wielkocząsteczkowych, jonów organicznych i nieorganicznych, związków kompleksowych, izotopów i do badań fizykochemicznych, jak oznaczanie ruchliwości elektroforetycznej, oznaczanie punktu izoelektrycznego lub ciężaru cząsteczkowego.

Technikę elektroforetyczną można podzielić w zależności od mechanizmu, warunków i wyników rozdziału w polu elektrycznym na elektroforezę w solnym roztworze, elektroforezę mikroskopową, elektroforezę pasmową, rozdział izoelektryczny i elektroforezę z ciągłym przepływem.

W elektroforezie w wolnym roztworze (*moving boundary*) na skutek różnej ruchliwości jeden rodzaj jonów zostaje przesunięty w inne miejsce kanału U-rurki, inne jony natomiast pozostają w obrębie słupa roz-

http://rcin.org.pl

tworu zawierającego badaną próbę. Przemieszczenie pasma mierzy się przez obserwację granicy zetknięcia się rozpuszczalnika i badanego roztworu. Występuje tu elektroosmoza oraz konwekcja cieczy.

Elektroforeza mikroskopowa wymaga prostego urządzenia i mikroskopu. Może być stosowana do rozdziału i badania ładunku wirusów, bakterii, komórek i innych cząstek polarnych widocznych w mikroskopie optycznym.

Technika elektroforezy pasmowej umożliwia całkowite oddzielenie poszczególnych składników mieszaniny w postaci odrębnych smug lub plam. Występuje tu zazwyczaj wpływ silnego efektu elektroosmotycznego, przepływu hydrodynamicznego, adsorpcji przez substancję stabilizującą elektrolit oraz innych czynników zaburzających i ograniczających ruchliwość elektroforetyczną. Nie występuje natomiast konwekcja cieczy.

Możemy rozróżnić trzy rodzaje czynników stabilizujących, antykonwekcyjnych:

1) elektroforeza w roztworze o zmiennym gradiencie gęstości (*density gradient electrophoresis*),

2) elektroforeza w poziomej obracającej się rurce ze stałą prędkością (*rotating horizontal capillary tube*),

3) elektroforeza w nośnikach o strukturze kapilarnej, porowatej, o własnościach gąbczastych, jak bibuła, skrobia, agar, poliakrylamid.

W rozdziale izoelektrycznym badana substancja wędruje pod wpływem pola w wytworzonym gradiencie *pH* i zatrzymuje się w miejscu, gdzie traci ładunek czyli w punkcie izoelektrycznym. Wędrówka w tym przypadku przebiega niezależnie od czasu. Rozdział przeprowadza się w wolnym roztworze stabilizowanym gradientem gęstości lub w nośnikach stałych. Niedogodnością rozdziału izoelektrycznego jest mała rozpuszczalność białek w punkcie izoelektrycznym oraz mała trwałość gradientu *pH*.

Elektroforeza z ciągłym przepływem stosowana jest głównie do preparatywnego wyosabniania substancji. Rozdział przeprowadza się na bibule i w innych nośnikach (elektroforeza kurtynowa), lub w wolnym roztworze z ograniczeniem dyfuzji przez odpowiednią konstrukcję aparatury (elektroforeza konwekcyjna, *forced flow electrophoresis*).

Nośnik, w którym przeprowadza się rozdział elektroforetyczny, musi być dostatecznie porowaty dla zatrzymania odpowiedniej ilości przewodzącego prąd elektrolitu i rozdzielanej mieszaniny. Idealny byłby taki nośnik, który nie zawiera zanieczyszczeń, nie adsorbuje rozdzielanych substancji, wykazuje minimalny efekt elektroosmotyczny i jest chemicznie nieczynny. Pojemność bibuły, zwłaszcza przy stosowaniu do celów preparatywnych jest bardzo mała, przeto wprowadzono cały szereg innych dogodniejszych materiałów, szczególnie do elektroforezy białek. Żel

http://rcin.org.pl

skrobiowy wprowadzony przez Smithiesa (129) cechuje się wyjątkowo dużą zdolnością rozdzielczą, co jest związane równocześnie z „molekularnym przesiewaniem" cząsteczek przez oka sieci żelu podczas wędrówki elektroforetycznej (130). Dodanie mocznika do żelu znacznie zwiększa jego zdolność rozdzielczą i technika ta znalazła zastosowanie w badaniach strukturalnych białek (29). Bardziej dogodnym środowiskiem jest żel poliakrylamidowy, który posiada równie dużą zdolność rozdzielczą jak żel skrobiowy, a równocześnie stanowi zupełnie obojętne środowisko, nie reagujące z większością odczynników chemicznych, jest kompletnie nierozpuszczalny i wolny od jakichkolwiek zanieczyszczeń (123). Acetylowanie celulozy umożliwia wyprodukowanie folii o bardzo dogodnych własnościach, zwłaszcza do celów analitycznych (68). Dla umożliwienia rozdziału niektórych mieszanin modyfikuje się nośniki przez wprowadzenie do nich charakterystycznych grup czynnych (61), względnie usunięcie niektórych składników nośnika jak np. przy otrzymywaniu agarozy z agaru (57). Badaną mieszaninę można wprowadzić uprzednio w połączenia z innymi substancjami dla uzyskania polarności cząsteczki (91) lub prowadzić rozdział w obecności detergentów (94), substancji zwiększających lepkość elektrolitu podstawowego (28) lub zmieniających jego stałą dielektryczną (79). Wszystkie te zabiegi mają na celu zwiększenie zdolności rozdzielczej środowiska i ułatwienie rozdzielenia złożonych mieszanin na większą ilość składników.

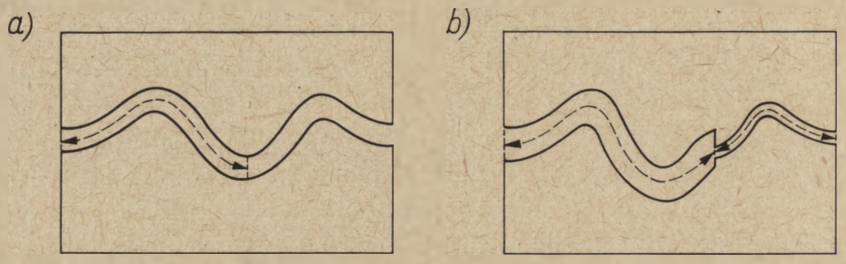
II. Wprowadzenie teoretyczne

Podczas elektroforezy na bibule i w innych środowiskach na cząsteczkę koloidu działają oprócz siły elektroforetycznej takie czynniki, jak przepływ elektroosmotyczny, dyfuzja, adsorpcja oraz hydrodynamiczny przepływ wody. Jest to wynik fizykochemicznych procesów w obrębie podstawowych faz tworzących dany układ oraz przepływu prądu. Będące w stałej współzależności fazy tworzą skomplikowany system, który znacznie trudniej jest ująć w określone prawidła niż elektroforezę w wolnym roztworze. Fazami tymi w sensie fizycznym są: bibuła lub inne środowisko stałe, rozpuszczalnik oraz gazowa, ciekła lub stała substancja rozpuszczona w rozpuszczalniku (elektrolit) (136). Ostatnia faza jest odpowiedzialna za przepływ prądu i wytwarzanie ciepła podczas elektroforezy.

Nie ma dotychczas ugruntowanej teorii zjawisk elektrokinetycznych zachodzących podczas elektroforezy w środowisku stabilizowanym. Jest kilka teorii ruchliwości elektroforetycznej w nośnikach, jak teoria „krętego kanalika" Kunkela i Tiseliusa (78), teoria „barierowa" Mc Donalda (90) oraz teoria Mecheboeufa i współpracowni-

http://rcin.org.pl

ków (85), ale żadna z nich nie pozwala na znalezienie jednoznacznego współczynnika, pozwalającego na porównanie wyników uzyskanych w różnych nośnikach z wynikami z wolnej elektroforezy. Najbardziej zgodne wyniki można uzyskać w oparciu o teorię Kunkela i Tiseliusa, ma ona jednak kilka niezupełnie ścisłych założeń, między innymi zakłada, że wszystkie kanaliki systemu kapilarnego bibuły filtracyjnej posiadają jednakowy przekrój poprzeczny (por. rys. 1a). Stwierdzono jednak doświadczalnie, że w bibule występuje różnorodność przekrojów kanalików wzdłuż ich przebiegu. Nagłe zwężenie kanalika na drodze wę-



Rys. 1. Model kanalika bibuły filtracyjnej: a) wg Kunkela i Tiseliusa (78), b) wg Boyacka i Giddingsa (17)

drówki cząsteczki powoduje znaczne obniżenie przewodnictwa i w odpowiednim stopniu ruchliwości elektroforetycznej. Boyack i Giddings (17) na podstawie wyników doświadczeń oraz stosując odpowiedni aparat matematyczny wykazali, że uwzględnienie efektu zwężenia i krętości kanalika, znacznie zbliża wyniki ruchliwości uzyskane za pomocą elektroforezy w nośnikach i w wolnym roztworze. Rys. 1b ilustruje schematycznie założenie modelu, który oprócz efektu krętości, uwzględnia efekt zwężenia kanalików (*constriction effect*).

Większość środowisk stosowanych jako nośniki do elektroforezy ma zdolność pęcznienia i przepuszczalności dla małych jonów i staje się przeto elektrycznymi przewodnikami w roztworach elektrolitów. Szczególne znaczenie posiada przepuszczalność włókien celulozowych bibuły filtracyjnej dla jonów elektrolitu podstawowego stosowanego do rozdziału. Ruchliwość naładowanych cząstek w środowiskach pęczniejących zależy według Giddingsa i Boyacka (35) od trzech czynników, które wpływają na wędrówkę elektroforetyczną i przy dokładnych obliczeniach nie mogą być pominięte. Czynnikami tymi są: a) krętość kanalika (*tortuosity*, T), b) efekt zwężenia kanalika (*constrictive factor*, C), oraz c) czynnik opóźniający jony (*ion retardation factor*, R), wyrażający interakcję migrantu z nośnikiem, czyli materiałem stabilizującym środowisko. Według Giddingsa i Boyacka wartość czynnika ograniczającego ruchliwość elektroforetyczną (*obstructive factor*, ξ), który jest propor-

http://rcin.org.pl

cjonalny do wartości współczynników T, C i R, można wyrazić wzorem 1.

$$\xi = CRT^{-2} \qquad 1.$$

Porównanie liczbowych wartości omawianych czynników C, R i T w zależności od stopnia napęcznienia włókien bibuły (X) przedstawia tablica 1. Jak widać, w miarę pęcznienia włókien celulozy (wartości od 0 do 3,0) czynnik ograniczający ruchliwość ξ progresywnie maleje. To samo odnosi się do czynnika R i T.

Tablica 1

Zależność wartości ograniczających ruchliwość na bibule od stopnia napęcznienia włókien celulozy (wg 35)

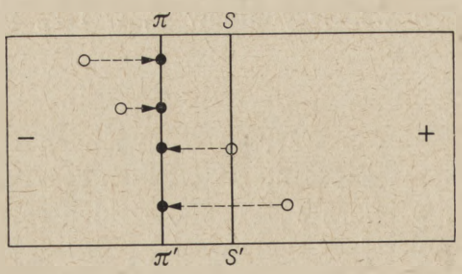
X	C	R	T^{-2}	ξ
0	0,932	1	0,848	0,790
0,5	0,910	0,927	0,795	0,671
1,0	0,909	0,898	0,777	0,635
1,5	0,929	0,847	0,756	0,595
2,0	0,941	0,836	0,748	0,588
2,5	0,952	0,825	0,744	0,584
3,0	0,977	0,814	0,740	0,588

Objaśnienie w tekście.

Teoria Boyacka i Giddingsa umożliwia kalkulację ruchliwości elektroforetycznej przy stosowaniu różnych środowisk porowatych złożonych z geometrycznie różnych micelli jak włókienka, kuleczki, sześciany lub cylindry. Wyniki uzyskiwane przy uwzględnieniu powyższych czynników ograniczających ruchliwość różnią się od obserwowanych o około 15 %.

Przy określaniu ruchliwości elektroforetycznej na bibule i w innych środowiskach porowatych muszą być ustalone takie parametry, jak stosunek wody do bibuły, ciśnienie w komorze oraz stałe natężenie pola. Kontrolowane warunki podczas doświadczenia mogą być uzyskane w odpowiednio zbudowanej komorze, której konstrukcję podali Bailay i Hackman (8). Praktyczny sposób określania ruchliwości elektroforetycznej w środowisku stabilizowanym polega na porównaniu w tych samych warunkach ruchliwości w nośniku substancji badanej i standardu o znanej ruchliwości w wolnym roztworze (141). Jeśli w miejsce jonu nałożyć na bibułę substancję obojętną, nie wędrującą w polu elektrycznym (dekstran, kafeina, *2:3:4:6*-tetrametylo-D-glukoza), to jej wędrówka z miejsca nałożenia będzie spowodowana elektroosmotycznym i hydrodynamicznym przepływem, jak to schematycznie ilustruje rysunek 2.

http://rcin.org.pl



Rys. 2. Wpływ elektroosmozy i przepływu hydrodynamicznego wody na położenie substancji niejonowej na pasku bibuły podczas elektroforezy
O — miejsce naniesienia substancji, ○ — umiejscowienie substancji po rozdziale elektroforetycznym, S-S' — geometryczny środek paska, π-π' — linia zerowego przepływu

Miejsce, w którym się znajdzie obojętna substancja po przerwaniu działania prądu określone linią π — π' i znajdujące się w odległości d_o od punktu nałożenia, nazywamy pasmem zerowej ruchliwości. Wartość d_o można wyliczyć z równania 2:

$$d_o = \frac{d_s - d_f\left(\frac{u_s}{u_f}\right)}{\left(1 - \frac{u_s}{u_f}\right)} \qquad 2.$$

gdzie d_s jest odległością od miejsca nałożenia na bibule wolno wędrującego, a d_f szybko wędrującego standardu, o odpowiedniej ruchliwości u_s i u_f w wolnym roztworze. Stąd ruchliwość u substancji nieznanej, która została przemieszczona od punktu nałożenia podczas elektroforezy na odległość d, będzie wyrażona równaniem 3.

$$u = u_f \frac{(d - d_o)}{(d_f - d_o)} \qquad 3.$$

Podstawiając do równania 3 wartość d_o z równania 2 otrzymamy równanie 4, pozwalające na porównanie badanej substancji równocześnie z dwoma standardami.

$$\frac{u}{u_f} = \frac{d - d_s + (d_f - d)\left(\frac{u_s}{u_f}\right)}{(d_f - d_s)} \qquad 4.$$

Przy bezwzględnym pomiarze ruchliwości w nośnikach niezbędna jest jednak znajomość d_o i współczynnika ograniczającego tę ruchliwość ξ, którego pojęcie zostało uprzednio zdefiniowane.

Możliwe jest również oznaczenie na bibule punktu izoelektrycznego amfolitu metodą porównania, przeprowadzając równoczesny rozdział w tych samych warunkach substancji badanej i standardu o znanym punkcie izoelektrycznym. Wówczas punkt izoelektryczny substancji badanej można wyliczyć z równania 5:

$$pI_x = pI_x\,(oz) - pI_1\,(oz) - pI_1 \qquad 5.$$

http://rcin.org.pl

gdzie: pI_x — punkt izoelektryczny substancji badanej, pI_i — punkt izoelektryczny substancji standardowej, pI_x(oz) i pI_i(oz) — punkty izoelektryczne substancji badanej i standardu oznaczone na podstawie elektroforezy na bibule lub w innym nośniku przy różnych wartościach *pH*. Należy zwrócić uwagę, że wszystkie przeprowadzane rozdziały muszą być wykonane dokładnie w tych samych warunkach natężenia pola, wilgotności, ciśnienia i temperatury.

III. Elektroforeza mikroskopowa komórek, wirusów i bakterii

Ruchliwość elektroforetyczna dużych cząstek biologicznych, jak komórki tkankowe i bakteryjne czy wirusy jest uwarunkowana ładunkiem powierzchni tych cząstek. Ponieważ powierzchnia komórek i dużych cząstek jest miejscem wielu procesów fizykochemicznych i biologicznych zachodzących przy ich zetknięciu się z otoczeniem, znajomość ładunku powierzchniowego i wpływ różnych czynników na jego wielkość ma istotne znaczenie dla śledzenia tych procesów. Składniki otoczki komórek tj. białka, lipidy, polisacharydy i kwasy nukleinowe mają różną zdolność do wytwarzania ładunków ujemnych, toteż przy zmianie wzajemnego stosunku tych substancji zmieniać się będzie wartość ogólna ładunków elektrycznych i związana z tym ruchliwość elektroforetyczna. Z tego względu pomiędzy komórkami prawidłowymi i patologicznymi, lub potraktowanymi enzymami (np. neuraminidazą, po związaniu z przeciwciałem) należy oczekiwać różnic w ładunkach powierzchniowych. Aparatura do pomiaru tych różnic i przebieg doświadczenia są stosunkowo proste. W warunkach niemal każdego laboratorium można przeprowadzać doświadczenia w zakresie zmian toczących się na powierzchni komórek, dużych wirusów, mitochondriów i innych cząstek. Elektroforeza mikroskopowa w połączeniu z mikroskopią elektronową daje nowe możliwości przy badaniu struktur i stanu fizykochemicznego powierzchni komórek, bakterii i wirusów.

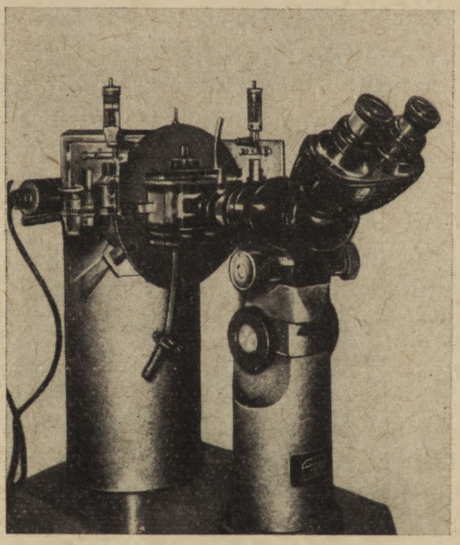
Przy założeniu, że komórka lub cząstka ma kształt sferyczny można obliczyć ujemny ładunek powierzchni stosując równanie 6 (19) zgodnie z teorią Smoluchowskiego, Henry'ego i Debye-Huckla dla cząstek o promieniu większym niż 1 mμ:

$$u\eta = \sigma \frac{1}{K} + r_i; \qquad u = \frac{\sigma}{\eta} \frac{1}{K} + r_i \qquad 6.$$

gdzie: u — ruchliwość elektroforetyczna w $cm^2/V/sek$, η — lepkość roztworu w poisach, σ — gęstość ładunku na powierzchni w jednostkach elektrostatycznych/cm^2 powierzchni, r_i — promień krzywizny powierzchni komórki, K — wartość funkcji Debye-Hückla w cm^{-1}, równa w wodzie i temp. 25° $0{,}327 \times 10^8 \sqrt{\mu}$; μ — siła jonowa.

http://rcin.org.pl

Erytrocyty większości gatunków zwierzęcych w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (*pH*, siła jonowa) wykazują anodową wędrówkę elektroforetyczną, gdyż mają ujemny ładunek na powierzchni (10). Liczne badania elektroforetyczne wykazały, że punkt izoelektryczny erytrocytów znajduje się przy *pH* około 2,0 (25). Działając na erytrocyty neuraminidazą obserwuje się spadek ruchliwości tych komórek i równoczesne usunięcie do 90 % kwasu neuraminowego erytrocytu (33). Sugeruje to, że ujemny ładunek powierzchni krwinki jest spowodowany głównie dysocjacją grup karboksylowych tego związku. Wyliczono, że między ilością cząsteczek kwasu neuraminowego na 1 μ^2 powierzchni erytrocytu a jego ruchliwością elektroforetyczną istnieje dla badanych gatunków zależność prostoliniowa. Neuraminidaza nie ma wpływu na ruchliwość elektroforetyczną prawidłowych komórek wątrobowych; wpływ ten zaznacza się, jeśli komórki są w okresie szybkiego wzrostu podczas proliferacji po częściowej hepatektomii i jest zupełnie wyraźny dla komórek rakowych tego narządu (2). Chemiczna analiza wykazała, że z komórek rakowych neuraminidaza odszczepia znacznie szybciej kwas neuraminowy niż z komórek normalnych. Należy przypuszczać, że jest to związane z daleko idącą zmianą struktury powierzchni komórki rakowej w porównaniu z komórką prawidłową.



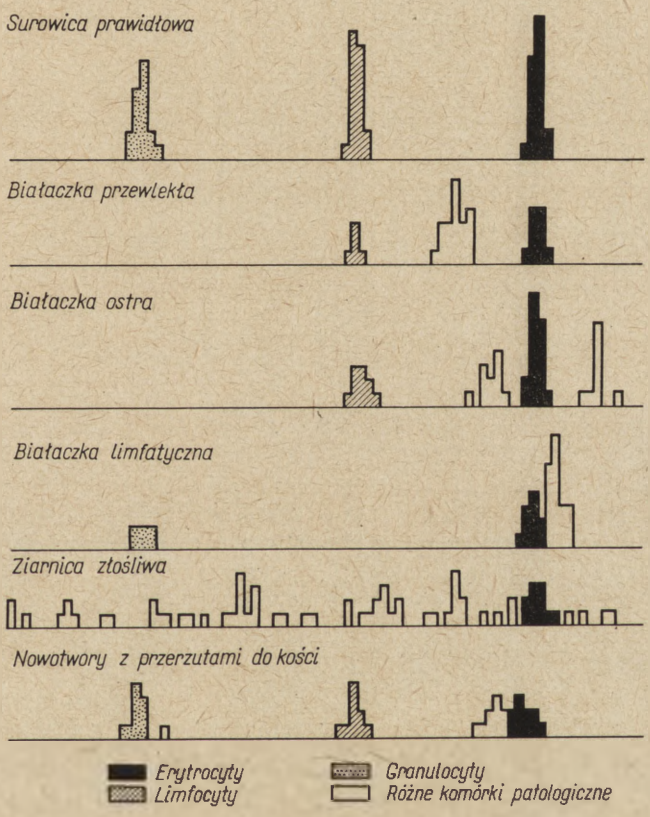
Rys. 3. Aparat do elektroforezy mikroskopowej f-my *Zeiss* (wg 124)

Badanie ruchliwości elektroforetycznej komórek krwi w różnych stanach patologicznych jest praktycznym zastosowaniem elektroforezy mikroskopowej. Ruhenstroth-Bauer, Fuhrmann, Ganzer, Kubler i Rueff (124) przebadali za pomocą aparatu specjalnie do

http://rcin.org.pl

tego celu skonstruowanego (rys. 3) około 700 prób krwi ludzi chorych, znajdując zasadnicze różnice w hemocytoferogramach w zależności od rodzaju schorzenia.

Rysunek 4 przedstawia schematycznie zebrane wyniki wspomnianych autorów. Widać, że np. przy mielozach erytrocyty i limfocyty nie ulegają zaburzeniu, natomiast nie występują granolocyty, a w miejsce ich pojawiają się inne elementy morfotyczne wędrujące szybciej niż granulocyty w polu elektrycznym. W przypadkach limfadenozy ładunki erytrocytów i granulocytów nie ulegają zmianie, natomiast brak frakcji odpowiadającej limfocytom (rząd 4), a występuje frakcja patologicznych



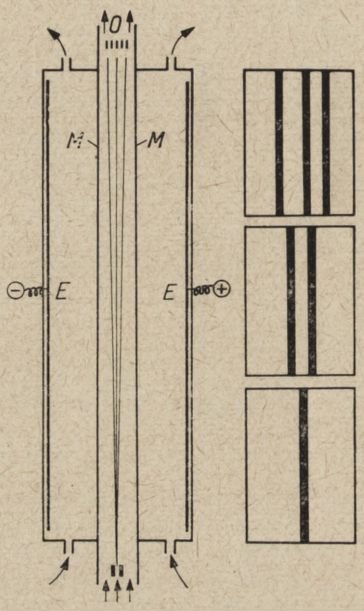
Rys. 4. Hemocytoferogramy komórek krwi normalnej i patologicznej (wg 124)

ciałek białych wędrujących przed erytrocytami. Obraz ruchliwości elektroforetycznej krwinek w przypadku ziarnicy złośliwej (rząd 5) znacznie różni się od obrazu krwinek normalnych i ulega tylko nieznacznej zmianie podczas remisji lub podczas leczenia kortyzonem (124).

http://rcin.org.pl

IV. Elektroforeza pasmowa w wolnym roztworze

Pasmowy rozdział elektroforetyczny z równoczesnym ciągłym przepływem roztworu bez stabilizacji elektrolitu ma szereg cech korzystnych i znalazł ostatnio duże praktyczne zastosowanie. Rozdział elektroforetyczny w wolno przepływającej warstewce buforu w nieobecności nośnika przeprowadzili po raz pierwszy w 1958 roku Barrollier, Watzke i Gibian (9). W tym samym roku Dobry i Finn (26) skon-



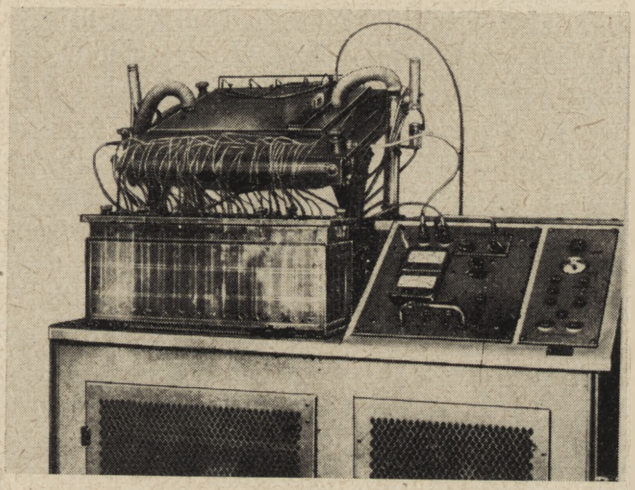
Rys. 5. Schemat aparatu do elektroforezy pasmowej w nieobecności nośnika (wg 26): E — elektrody, M — przegrody półprzepuszczalne.
Obok: przykład rozdziału mieszaniny trzech barwników (fuksyna zasadowa, błękit bromotymolowy, błękit bromofenolowy), obserwowanego na trzech różnych wysokościach kolumny

struowali aparat, za pomocą którego przy zachowaniu odpowiednich warunków można uzyskać rozdział pasmowy. Przyrząd zbudowany jest z pionowej prostokątnej rury o rozmiarach około 120 × 7,5 × 5 cm (rys. 5), której centralna przestrzeń jest oddzielona od przestrzeni elektrodowych za pomocą porowatych przegród z tworzywa termoplastycznego. Od dołu ku górze kolumny przepływa powoli roztwór elektrolitu o dużej lepkości z dodatkiem dekstranu lub metylocelulozy, co zapobiega mieszaniu się pasm. Prostopadle do przepływającego buforu działa pole elektryczne. Badana mieszanina wprowadzona przez kanał I w centralnej części kolumny jest pchana ku górze i rozdzielana pod wpływem pola. Szczyt kolumny jest zakończony serią odrębnych kanalików, poprzez które odprowadzane są rozdzielone frakcje. Schemat aparatu i przykład rozdziału mieszaniny trzech barwników przedstawiony jest sche-

http://rcin.org.pl

matycznie na rysunku 5. Jak widać u szczytu kolumny mieszanina jest rozdzielona na trzy odrębne frakcje.

Hannig (51) posługując się zasadą ciągłego dwukierunkowego rozdziału na bibule oraz zasadą beznośnikowego frakcjonowania w pionowej rurze, opisaną przez Dobry'ego i Finna, skonstruował automatyczne urządzenie, w którym bibułę zastąpił cienką warstewką roztworu elektrolitu płynącego powoli między dwiema płytami szklanymi *(free diffusion electrophoresis)*. Komora elektroforetyczna zbudowana jest z dwu



Rys. 6. Aparat Hanniga do ciągłej elektroforezy pasmowej w wolnym roztworze (wg 51)

płyt szklanych, oddalonych od siebie o 0,5 mm, chłodzonych z zewnątrz i ustawionych poziomo (51) lub w nowszej wersji pionowo (52). Prostopadle do kierunku spływu filmu buforu jest ustawione pole elektryczne w postaci platynowych elektrod, opłukiwanych elektrolitem, oddzielonych od filmu za pomocą półprzepuszczalnych przegród. Rozdzielana mieszanina doprowadzana jest ciągle przez otwór w górnej płycie, natomiast otrzymane frakcje odbierane są za pomocą systemu kanalików, jak to widać na rysunku 6. Przepływ buforu w szczelinie między płytami i elektrolitu opłukującego elektrody oraz dopływ rozdzielanej mieszaniny regulowany jest za pomocą zsynchronizowanego systemu pomp. W aparacie Hanniga można rozdzielić w ciągu doby próbę zawierającą około 10 g suchej masy białka, stosując napięcie około 2500 V w temperaturze 3-5°. Za pomocą opisanego urządzenia przeprowadzono również frakcjonowanie komórek krwi i homogenatu wątroby, izolowanie komórek nowotworowych itp. W preparatyce biochemicznej służy ono do otrzymywania czystych elektroforetycznie białek na dużą skalę.

Oryginalnym sposobem rozdziału pasmowego w wolnym roztworze jest metoda opisana przez Hjértena (56). Elektroforezę przeprowa-

http://rcin.org.pl

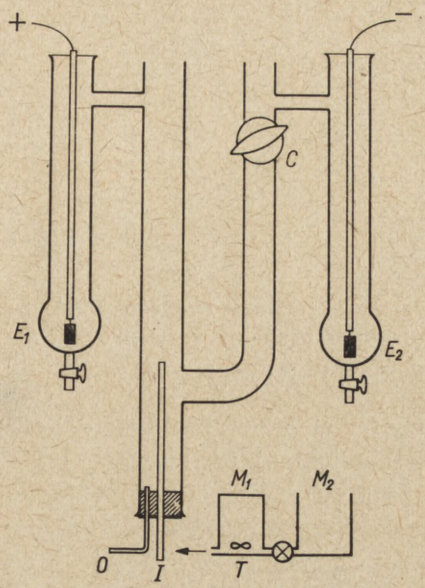
dza się w poziomej rurze, która obraca się powoli wraz z naczyniami elektrodowymi wokół swej długiej osi. Na skutek obrotu ruchy konwekcyjne we wszystkich możliwych kierunkach w obrębie słupa cieczy w rurze są niemal wyeliminowane. Celem zniesienia elektroosmozy i wywołanych nią zaburzeń rozdziału, przed doświadczeniem rurę przemywa się roztworem metylocelulozy. Rozdzielone frakcje można łatwo analizować za pomocą urządzeń optycznych zarówno w świetle widzialnym, jak i pozafiołkowym. Można również dla celów preparatywnych zebrać frakcje za pomocą kolektora frakcji jak przy elektroforezie kolumnowej. Stosując tę aparaturę można dokładnie określić ruchliwość elektroforetyczną badanej substancji, używając — w odróżnieniu od wolnej elektroforezy — bardzo drobnych ilości badanego materiału.

W elektroforezie z gradientem gęstości *(density gradient electrophoresis)* stabilność hydrodynamiczną uzyskuje się przez stopniowy wzrost gęstości roztworu idąc od góry ku dołowi kolumny. Zmianę gradientu gęstości wzdłuż kolumny uzyskuje się przez wprowadzenie wzrastających stężeń roztworu sacharozy, glicerolu, glikolu etylenowego lub ciężkiej wody. Równomierny gradient gęstości zapobiega termicznej konwekcji roztworu i elektroosmotycznemu przepływowi. Po rozdzieleniu mieszaniny na frakcje nie zachodzi ich wzajemne mieszanie się w ciągu dostatecznie długiego czasu. Pozwala to na oddzielne zebranie frakcji przy opróżnianiu kolumny z pomocą kolektora frakcji. Teoretyczne podstawy elektroforezy z gradientem gęstości, zakres stosowalności i osiągnięcia uzyskane za pomocą tej metody są wyczerpująco omówione w referatach Svenssona (137), Cramera i Svenssona (22) oraz Kolina (70).

Aparatura stosowana przez poszczególnych autorów dla rozdziału białek, wirusów i barwników składa się z pionowej kolumny z bocznym ramieniem, połączonej z naczyniami elektrodowymi. W dnie kolumny wmontowane są dwie kapilary, które służą do wprowadzenia buforu i wytworzenia gradientu oraz do wprowadzenia próby i opróżnienia kolumny.

Schemat takiego aparatu przedstawia rysunek 7. Kolumnę wypełnia się najpierw stosownym buforem powyżej ramion łączących kolumnę z naczyniami elektrodowymi, następnie przez kapilarę 0 wprowadza się roztwór buforu z sacharozą (40-60%) do poziomu szczytu rurki I. Po zamknięciu kurka C rozpoczyna się przygotowanie gradientu za pomocą mieszalnika M_1 i M_2, wprowadzając powoli roztwór przez kapilarę I. Naczynie M_1 zawiera bufor bez sacharozy, naczynie M_2 — z odpowiednią ilością sacharozy. Po uruchomieniu mieszadła T, wkrapla się powoli bufor z M_2 do M_1 i przez kapilarę I do kolumny. Bufor M_1 zawarty początkowo w kolumnie zostaje wyparty poprzez naczynie elektrodowe E_1. Po przygotowaniu gradientu i wyrównaniu poziomów w obu naczyniach elektro-

http://rcin.org.pl

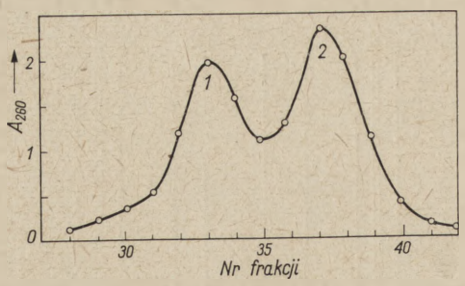


Rys. 7. Prosty aparat do elektroforezy w zmiennym gradiencie gęstości
Objaśnienie w tekście.

dowych, otwiera się kurek C i przez kapilarę I wprowadza się badaną próbę za pomocą strzykawki. Roztwór próby zawiera tak dobrane stężenie sacharozy, aby po wstrzyknięciu znalazła się na wybranej wysokości kolumny. Po kilkunastominutowym wyrównaniu się gradientów próby i kolumny, włącza się prąd z zasilacza. Podczas działania prądu mieszanina rozdziela się na odrębne smugi, których odległość zależy od początkowej grubości warstwy wprowadzonej próby, od względnej ruchliwości jonów i od długości kolumny. Kolumnę można następnie opróżnić przez kapilarę I zbierając dowolnej objętości frakcje do probówek i analizować za pomocą stosownych metod. W przypadku barwnych substancji rozdzielone smugi można fotografować za pomocą jednego ze sposobów podanego przez Kolina (70). Wprowadzając w próbie substancję odniesienia o znanej ruchliwości elektroforetycznej można określić ruchliwość poszczególnych smug rozdzielonej mieszaniny. W przypadku rozdziału białek i wirusów dogodnymi substancjami odniesienia są: albumina barwiona błękitem bromofenolowym, hemoglobina, względnie czerwień fenolowa (22).

Shack i Bynum (127) stosując metodę Svenssona (139) rozdzielili w gradiencie sacharozy natywny DNA grasicy od zdenaturowanego. Na rysunku 8 widać, że DNA zdenaturowany w około 50% przez ogrzanie, działanie kwasu lub zasady, rozdziela się przy *pH* 7,0 na dwie frakcje. Analiza chemiczna wykazała, że natywny DNA miał większą zawartość guaniny i cytozyny niż DNA zdenaturowany. Za pomocą elektroforezy w gradiencie sacharozy rozdzielono również nukleoproteidy (64).

http://rcin.org.pl

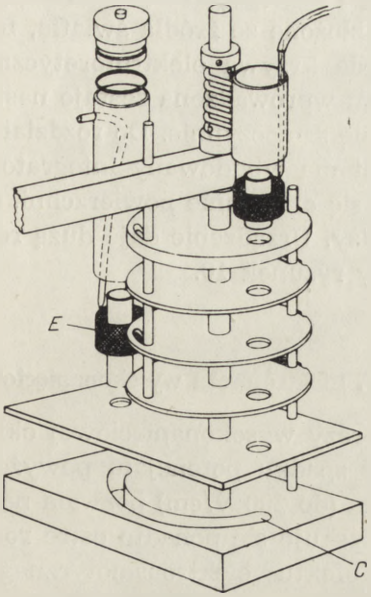


Rys. 8. Rozdział natywnego i zdenaturowanego DNA za pomocą elektroforezy w zmiennym gradiencie sacharozy (wg 127)
1 — natywny, 2 — zdenaturowany

Aparatura skonstruowana przez Mela (92) składa się z prostokątnej płaskiej komory, oddzielonej od naczyń elektrodowych za pomocą przegród półprzepuszczalnych. Wlot i wylot komory zaopatrzony jest w jednakową ilość wąskich kanalików, przez które z jednej strony wtłaczany jest bufor za pomocą pompy, z drugiej — wypływa z komory do zbiorników. Próba rozdzielanej mieszaniny wprowadzana jest ciągle za pomocą jednego z kanalików, a ponieważ wlot i wylot komory stanowi stały układ hydrodynamiczny roztwór próby przepływa poziomo w postaci ostrej smugi. Pod wpływem pola elektrycznego działającego prostopadle, poszczególne frakcje zostają oddzielone i wprowadzone do odrębnych odbieralników. Dla większej stabilności roztworu w komorze dodaje się do roztworów wprowadzanych wzrastające ilości sacharozy zwiększając lepkość cieczy. Przepływ może być dowolnie regulowany w dużym zakresie, dostosowując warunki do potrzeb analitycznych lub preparatywnych. Za pomocą opisanego urządzenia możliwe jest zarówno śledzenie powstającego produktu reakcji, jak i jego wyizolowanie. Ma to duże znaczenie przy badaniu układów: enzym — substrat, antygen — przeciwciało, kwas nukleinowy — białko itp. Przedstawiona metoda w założeniu jest podobna do metody Grassmanna i Hübnera (45), w której podobny efekt uzyskuje się za pomocą ciągłej elektroforezy bibułowej.

Dla ułatwienia rozdziału preparatywnego w gradiencie sacharozy Choules i Ballentine (20) skonstruowali prosty aparat, w którym kolumna składa się z dwunastu płytek z perspeksu ułożonych jedna na drugiej i posiadających ekscentrycznie umieszczone otwory o średnicy 2 cm. Półkolisty kanał C (rys. 9) zapewnia kontakt między naczyniami elektrodowymi E, tworząc razem z segmentowanym kanałem kształt U-rurki. Przed zestawieniem pionowego kanału powierzchnie płytek pokrywa się warstewką smaru, co zapobiega wyciekaniu roztworu z kolumny. Po wypełnieniu kanału buforem zawierającym odpowiednie stężenie sacharozy, w otworze szczytowej płytki umieszcza się roztwór badanej mieszaniny. Po ukończeniu rozdziału poszczególne płytki idąc od

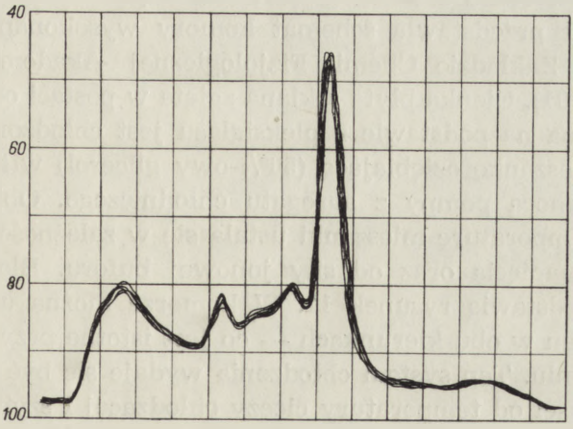
http://rcin.org.pl



Rys. 9. Aparat do preparatywnej elektroforezy w zmiennym gradiencie wg Choules i Ballentine (20)
Objaśnienia w tekście.

góry odcina się od głównego kanału przez przesunięcie i zawarte w zagłębieniach płytek frakcje wyciąga się pipetą.

Stosując stabilizację elektrolitu zmiennym gradientem sacharozy Lerner (81) opracował automatyczny aparat do rutynowej analizy elektroforetycznej białek. Naczyńko kwarcowe posiadające wbudowane elektrody jest automatycznie wypełniane buforem z równoczesnym wytworzeniem gradientu gęstości, następnie mechaniczny podawacz umiesz-



Rys. 10. Rozdział surowicy w automatycznym aparacie Lernera, powtórzony 14-krotnie (wg 81)

http://rcin.org.pl

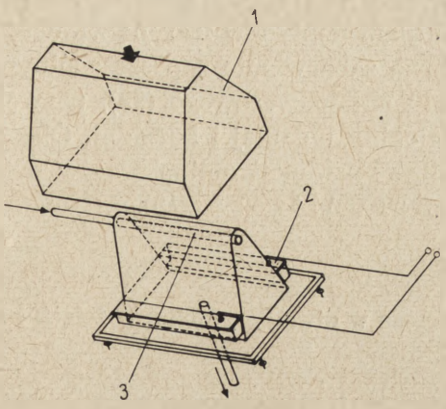
cza w naczyńku próbę i następuje włączenie się prądu. Podczas rozdziału urządzenie piszące złożone ze źródła światła, fotopowielacza i aparatu samopiszącego wykreśla krzywą elektroforetyczną. Czas rozdziału wynosi 20 minut, po czym wprowadzona zostaje następna próba do naczyńka i proces powtarza się samoczynnie. Do rozdziału potrzeba 0,2 ml surowicy. Ponieważ aparat ma wbudowany integrator, pod krzywą elektroforetyczną otrzymuje się określenie powierzchni, co znacznie skraca czas pełnej ilościowej analizy. Urządzenie daje dużą rozdzielczość i powtarzalność, o czym świadczy rysunek 10.

V. Elektroforeza wysokonapięciowa

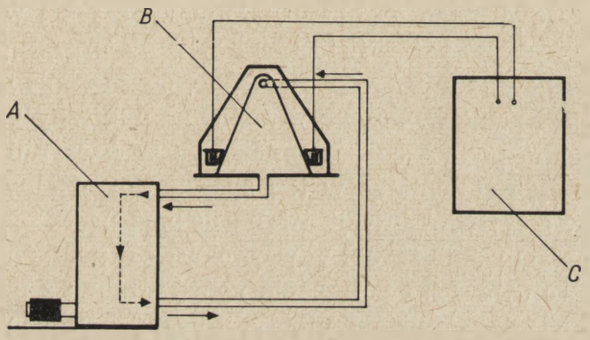
Pojęciem elektroforezy wysokonapięciowej określa się rozdział w polu elektrycznym przy spadku potencjału powyżej 20/V/cm. Stosowanie pola o wysokim spadku (do 200 V/cm) pozwala na znaczne skrócenie czasu frakcjonowania, uzyskuje się ponadto ostre rozdzielenie smug z uwagi na ograniczenie efektu elektroosmotycznego, hydrodynamicznego przepływu buforu oraz dyfuzji. Zastosowanie wysokiego napięcia wymaga specjalnego urządzenia chłodniczego do odprowadzania dużych ilości wywiązującego się ciepła i zabezpieczenie paska bibuły przed nierównomiernym wyparowywaniem wody. Trudności te były w różny sposób rozwiązywane przez poszczególnych autorów zajmujących się tym problemem, przez konstrukcję odpowiednich urządzeń z różnymi systemami chłodzenia (47, 93, 147, 149). Badania przeprowadzone przez Prusika i Keila (117) pozwoliły na skonstruowanie aparatury utrzymującej stałą i dowolną temperaturę przy napięciu do 120 V/cm. Autorzy ci wykazali przydatność tej aparatury do dokładnego oznaczania ruchliwości elektroforetycznej na bibule oraz uzyskiwali dużą rozdzielczość przy rozdzielaniu mieszanin o bliskich wartościach *pK*.

Rysunek 11 przedstawia schemat komory wysokonapięciowej skonstruowanej w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie (101). Cienka płyta szklana zgięta w postaci odwróconej litery V i osadzona na podstawie z pleksiglasu jest chłodzona przez ciągle spływającą mieszankę oziębiającą (50%-owy glicerol) wtłaczaną do rozpylacza za pomocą pompy z agregatu chłodniczego. Obieg cieczy jest zamknięty i temperaturę mieszanki ustala się w zależności od wysokości przyłożonego napięcia oraz od siły jonowej buforu. Blokowy schemat aparatury przedstawia rysunek 12. W komorze można umieścić arkusz bibuły Whatman w obu kierunkach — co jest istotne przy dwukierunkowym rozdzielaniu. Ten system chłodzenia wydaje się być bardzo wydajny i w zależności od temperatury cieczy chłodzącej i szybkości jej przepływu można stosować wysokie spadki potencjału, nawet powyżej 100 V/cm.

http://rcin.org.pl



Rys. 11. Schemat komory do wysokonapięciowej elektroforezy, skonstruowanej w Zakładzie Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie
1 — pokrywa, 2 — wanny z elekrodami, 3 — rozpylacz do cieczy chłodzącej. Strzałki wskazują kierunek przepływu płynu chłodzącego



Rys. 12. Schemat blokowy aparatury do elektroforezy wysokonapięciowej
A — agregat chłodniczy ze zbiornikiem wyrównawczym temperatury, B — komora elektroforetyczna w przekroju poprzecznym, C — zasilacz wysokiego napięcia

Elektroforeza wysokonapięciowa peptydów połączona z chromatografią znalazła ostatnio szerokie zastosowanie w analizie struktury białek. Metodę pod nazwą *fingerprint* (odbitka bliźniacza) wprowadził Ingram (60), następnie rozwinął Rushizky i Knight (125) oraz Anfinsen (4). Postępowanie to polega na porównaniu składu peptydowego dwu blisko siebie stojących białek, po ich uprzedniej hydrolizie enzymatycznej trypsyną i chymotrypsyną, przez przeprowadzenie elektroforetycznego rozdziału mieszaniny peptydów w jednym kierunku, a chromatograficznego — w drugim. Po wybarwieniu na bibule peptydów z jednego białka porównuje się ich przestrzenne rozmieszczenie z analogicznie rozdzieloną próbą drugiego. Stosując metodę *fingerprint* Ingram (60) ustalił specyficzne różnice w budowie chemicznej hemoglobin ludzkich, a Anfinsen i współpracownicy (4) wykazali różnice w strukturze rybonukleazy pochodzącej od różnych gatunków.

http://rcin.org.pl

Ostatnio Krawczyk (75) wprowadził dalszą modyfikację polegającą na barwieniu plam peptydów izatyną zamiast ninhydryny. Ponieważ izatyna daje różne zabarwienie z poszczególnymi peptydami w zależności od ich składu aminokwasowego (99), pozwoliło to na odróżnienie peptydów hemoglobiny ludzkiej i końskiej. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami analizy sekwencji aminokwasów obu hemoglobin, przeprowadzonej przez Braunitzera (18).

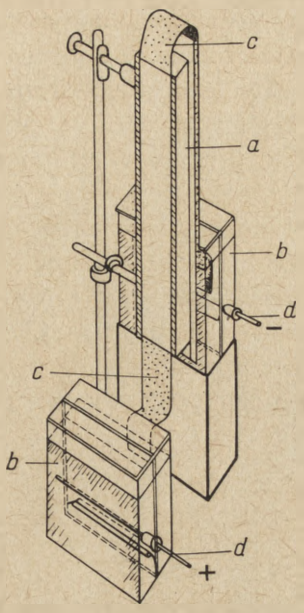
VI. Elektroforeza w otwartym bloku, w żelach i na kolumnie

1. Elektroforeza w bloku

Blok skrobiowy można stosować zarówno do elektroforezy dla celów analitycznych, jak i preparatywnych. Rozdzielone frakcje łatwo wyeluować z pociętego bloku i oddzielić skrobię przez wirowanie. Podczas rozdziału elektroforetycznego na bloku skrobiowym, jak i w innych środowiskach stałych obserwuje się stosunkowo silny przepływ elektroosmotyczny od bieguna dodatniego do ujemnego, co znacznie obniża zdolność rozdzielczą tych nośników. Przepływ elektroosmotyczny można w dużym stopniu ograniczyć podnosząc poziom buforu w naczyniu elektrodowym po stronie katody i zmieniając w ten sposób warunki hydrodynamiczne w bloku. Efekt elektrodekantacji można usunąć przez pionowe ustawienie bloku, tj. upakowanie skrobi w prostokątnym podłużnym pudle ustawionym pionowo (rys. 13) i połączenie końców bloku z naczyniami elektrodowymi za pomocą pasków bibuły. Przy prowadzeniu doświadczenia przez dłuższy czas, a zwłaszcza przy dużym poborze prądu, niezbędne jest chłodzenie bloku oraz wymiana buforu w naczyniach elektrodowych. W tym celu opisano odpowiednie urządzenie z chłodzeniem oraz z możliwością wymiany buforów w naczyniach elektrodowych podczas trwania elektroforezy (105).

Oprócz skrobi, przy technice otwartego bloku stosowane są i inne nierozpuszczalne substancje, jak chlorek poliwinylu, proszek szklany, *Sephadex*, gąbka gumowa lub piana z tworzywa sztucznego. Szczególnie dogodnym materiałem okazał się *Pevikon C-870* (kopolimer chlorku winylu i octanu winylu), który nie wykazuje adsorpcji w stosunku do białek i daje dobre wyniki przy frakcjonowaniu glikoproteidów (96). Stosowano również mieszaninę: hydrolizowana skrobia: *Pevikon* w stosunku 1 : 12, uzyskując środowisko o dużej zdolności rozdzielczej (15). Blok skrobiowy jest używany do frakcjonowania i oczyszczania najrozmaitszych substancji jak lipoproteidy (77), enzymy (23, 73, 151), białka mitochondriów i mikrosomów (11, 32), oraz kwasy nukleinowe komórek zwierzęcych (38) i mikroorganizmów (39).

http://rcin.org.pl



Rys. 13. Aparat do elektroforezy w pionowym bloku skrobiowym (wg 13)
a — blok, b — naczynia elektrodowe, c — łączniki z bibuły, d — elektrody węglowe

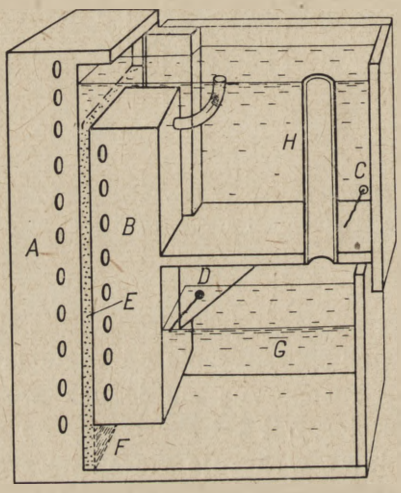
2. Elektroforeza w żelach

Żel krzemianowy i agarowy jako środowisko do elektroforetycznego rozdziału były stosowane sporadycznie od wielu lat. Znaczny rozwój tej techniki elektroforezy rozpoczyna się jednak wówczas, kiedy Smithies w 1955 roku zastosował żel skrobiowy do rozdziału białek surowicy (129). Żel skrobiowy wykazuje szereg korzystnych cech w odróżnieniu od innych nośników; przede wszystkim ma dużą zdolność rozdzielczą, co przypisuje się równoczesnemu przesiewaniu molekularnemu cząsteczek podczas rozdziału (130). Dalszy rozwój elektroforezy w żelach jest związany z wprowadzeniem syntetycznego żelu poliakrylamidowego (123), który posiada równie dużą rozdzielczość jak żel skrobiowy, a jednocześnie jest chemicznie obojętny, zupełnie nierozpuszczalny i wolny od jakichkolwiek zanieczyszczeń. W 1961 roku Hjérten (57) wprowadził do immunoelektroforezy i elektroforezy kolumnowej białek żel agarozowy. Agar izolowany głównie z czerwonych glonów zawiera dwa polisacharydy: agarozę i agaropektynę. Agaropektyna ma grupy kwasowe siarczanowe i karboksylowe, natomiast agaroza nie ma reszt polarnych, będąc polimerem na przemian występujących reszt *3,6*-anhydro-L-galaktozy i D-galaktozy (57). Stąd agaroza wykazuje znacznie mniejsze własności adsorpcyjne i niższy efekt elektroosmotyczny w porównaniu z agarem, przy wyższej zdolności rozdzielczej (126). Wydzielenie agarozy polega na acetylacji handlowego agaru, ekstrakcji rozpuszczalnej zacetylowanej agarozy i deacetylacji wodorotlenkiem potasu (57).

http://rcin.org.pl

Folia z octanu celulozy, wprowadzona przed kilku laty przez K o h n a (68) jako nośnik do elektroforezy i immunoelektroforezy białek i ich sympleksów, może być również przygotowana jako żel mikroporowaty (*Colab Lab. Inc.*, Chicago Heights, I ll.), w postaci pasków o grubości do 10 mm. Taki żel staje się przezroczysty po podgrzaniu, całkowicie się rozpuszcza w niewielkiej objętości acetonu i nie absorbuje światła powyżej 250 mμ. Żel z octanu celulozy może być zmieszany ze sproszkowanymi jonitami, skrobią nierozpuszczalną lub proszkiem celulozowym w dowolnym stosunku; otrzymuje się w ten sposób środowiska o specjalnym przeznaczeniu w pracy laboratoryjnej.

Urządzenia niezbędne dla przeprowadzenia elektroforezy w żelach są na ogół bardzo proste i mogą mieć ułożenie poziome lub pionowe. Roz-



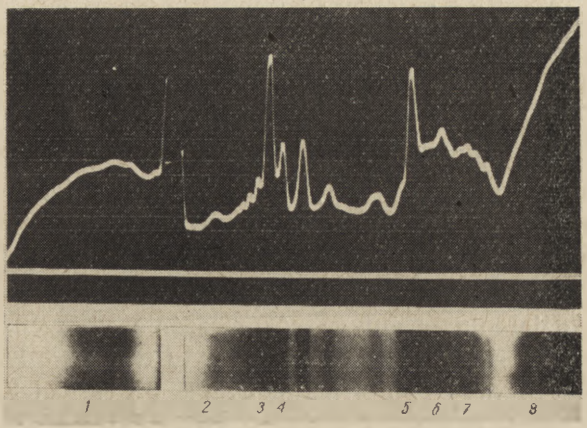
Rys. 14. Przekrój aparatu do pionowej elektroforezy w żelu (123a).
A — zewnętrzna płytka, B — wewnętrzna płytka chłodząca, C — górna elektroda, D — dolna elektroda, E — warstwa żelu między płytkami chłodzącymi, F — gąbka na której spoczywa żel, G — poziom buforu w naczyniach elektrodowych, H — rurka przelewu buforu.

dział poziomy można przeprowadzić w każdej komorze typu poziomego, w której ustawia się płytkę lub tacę wypełnioną żelem. Przy pionowym ułożeniu bloku (rys. 14) nie obserwuje się efektu elektrodekantacji podczas wsiąkania próby do grubej warstwy żelu, a przepływ elektroosmotyczny można zmniejszyć przez podniesienie naczynia z katodą (13). Opisano również urządzenie do rozdziału elektroforetycznego w żelu agarowym, skrobiowym lub poliakrylamidowym na skalę mikro (24). Do rozdziału wystarcza około 0,1 μl próby i czas doświadczenia nie przekracza 30 minut.

Wybarwione frakcje w warstwie żelu można bezpośrednio fotometrować przy użyciu odpowiednich densytometrów (152). Żel agarowy i poliakrylamidowy są z natury przezroczyste, natomiast żel skrobiowy musi być najpierw „prześwietlony". W tym celu pasek żelu zanurza się

http://rcin.org.pl

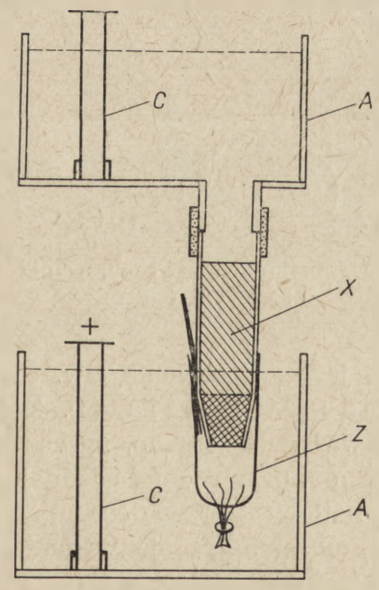
w 10%-owym kwasie octowym i gotuje przez 30-60 sekund; po oziębieniu paski obsusza się z nadmiaru wody i fotometruje (144). Żel skrobiowy moczony przez noc w roztworze: woda-glicerol-kwas octowy (5 : 5 : 1 obj.) staje się przezroczysty (46) (por. rys. 14a).



Rys. 14a. Rozdział surowicy ludzkiej na żelu skrobiowym. Surowica zawierała hemoglobinę, haptoglobiny typu 2-2 oraz transferynę typu C. Krzywą elektroforezy uzyskano za pomocą elektronowego mikrodensytometru po prześwietleniu żelu glicerolem (wg 130)

1 — γ-globuliny, 2 — wysokocząsteczkowy β-lipoproteid. 3 — $B\alpha_2$-globulina, 4 — kompleksy Hb-haptoglobina, 5 — transferyna C, 6 — Hb, 7 — frakcje poalbuminowe, 8 — albuminy.

Odzyskanie białka lub innych substancji z żelu jest procesem trudnym ze względu na rozpuszczalność w wodzie żelu agarowego i skrobio-



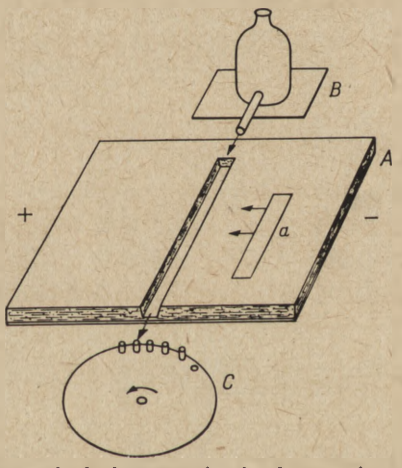
Rys. 15. Schemat aparatu do elektroforetycznego eluowania białka z żelu (wg 82)

A — naczynia elektrodowe, C — elektrody węglowe, Z — worek dializacyjny, w którym gromadzi się eluowane białko, X — skrawek żelu.

http://rcin.org.pl

wego, które dotychczas są najczęściej używane jako nośniki. Stosowano w tym celu trawienie skrobi amylazą (114), zamrażanie i odmrażanie skrawków żelu, dializę w polu odśrodkowym oraz elektrodializę. Elektrodializa daje najlepsze wyniki — urządzenia do tego celu opisali Gordon (40) oraz Lewis i Clark (82).

Rys. 15 przedstawia proste urządzenie, za pomocą którego można eluować białka z żelu. Roztwór białka zbiera się w woreczku dializacyjnym zanurzonym w buforze naczynia elektrodowego. Oryginalną technikę eluowania frakcji białkowych z pasków żelu opisał Raymond (122) nazywając ją elektroforezą eluacyjnokonwekcyjną *(elution convection electrophoresis)*. Po rozdzieleniu mieszaniny białek pasek żelu umieszcza się w odpowiedniej komorze, w której wytwarza się pole elektryczne o spadku potencjału 25 V przy 200-500 mA. Wszystkie frakcje białkowe pod wpływem działania prądu są równocześnie wypychane z żelu do warstewki buforu przylegającej do nośnika. W warstwie buforu zachodzi zagęszczenie białka przez elektrokonwekcję. Po 3 godzinach działania prądu frakcje są wyeluowane i zagęszczone do stężenia wyjściowego w próbie.



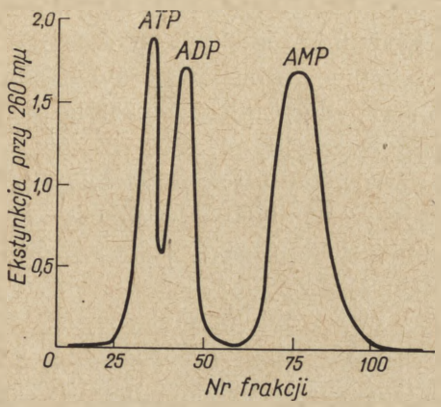
Rys. 16. Schemat ciągłego frakcjonowania i eluowania na płytce z żelem agarozowym (wg 6)
A — płytka szklana z żelem, a — miejsce nałożenia próby, B — bufor, C — kolektor frakcji.

Bardziej praktyczne jest zastosowanie tzw. ciągłego rozdziału opisanego przez Avrameasa i Uriela (6). Zasadę metody ilustruje rysunek 16. W grubej warstwie żelu np. agarozowego wycina się dwie szczeliny o szerokości 5 mm, przy czym do jednej, bliższej katody wlewa się badaną mieszaninę, natomiast przez drugą przepływa roztwór buforu z szybkością około 1,5 ml/min. Frakcje wędrujące w kierunku anody natrafiają na szczelinę z przepływającym buforem i zbierane są za pomocą kolektora frakcji.

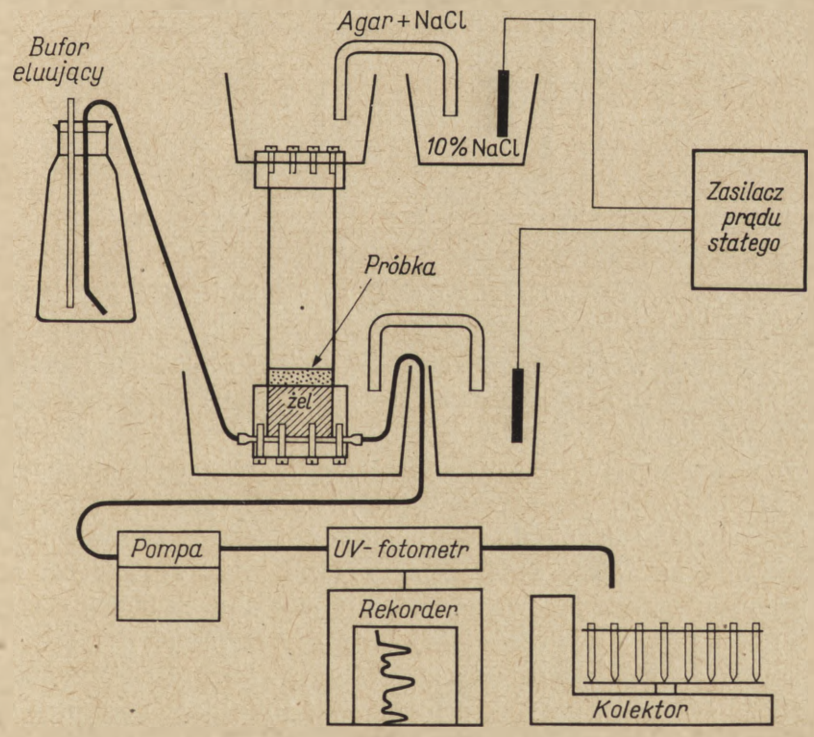
Rysunek 17 ilustruje przykład preparatywnego rozdziału mieszaniny

http://rcin.org.pl

nukleotydów adeninowych przy *pH* 4,8 w 0,8%-owym żelu agarozowym. Podobną zasadę zastosowano do eluowania rozdzielonych frakcji z żelu ustawionego w postaci pionowej kolumny (85a, 95, 120) (rysunek 18). Powolny strumień buforu przepływając przez szczelinę w środku kolumny przechodzi następnie przez optyczny detektor białka (pomiar absorpcji



Rys. 17. Rozdział nukleotydów adeninowych za pomocą ciągłego frakcjonowania i eluowania na płytce z żelem agarozowym

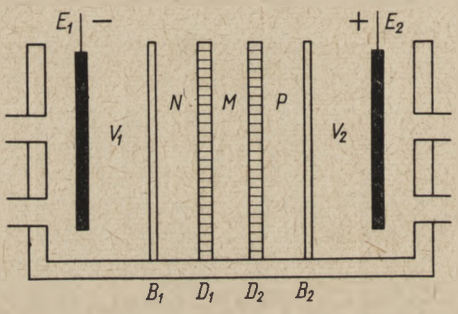


Rys. 18. Schematyczny diagram urządzenia do preparatywnej elektroforezy na żelu. Gruba linia wskazuje drogę przepływu buforu poprzez poszczególne elementy aparatury (wg 85 a)

http://rcin.org.pl

przy 280 mμ) z automatycznym zapisem, a następnie zostaje rozdzielony do probówek kolektora frakcji. Urządzenie może służyć zarówno do rozdziału analitycznego, jak i preparatywnego.

Innym przykładem elektroforezy preparatywnej jest tzw. technika „barierowa", która jest połączeniem elektroforezy w żelu i elektrodekantacji. Zasadę takiego rozdziału opisali najpierw Hahn i Tiselius (49), w 1942 roku, a następnie rozwinęli ją Vande Woude i Davis (142). Rysunek 19 przedstawia schemat stosowanego do tego celu aparatu. Przestrzenie V_1 i V_2 stanowią pomieszczenia dla elektrod E_1 i E_2, B_1 i B_2 są przegrodami półprzepuszczalnymi, a D_1 i D_2 przegrodami wykonanymi z żelu skrobiowego, agarowego lub syntetycznego (grubości około 3 mm), przepuszczalne dla białek i innych dużych cząsteczek. Przestrzenie V_1, V_2, M, N i P wypełnia się buforem, zaś roztwór białka umieszcza się w przestrzeni M, pomiędzy dwoma przepuszczalnymi przegrodami z żelu. Białka, wędrując pod wpływem pola elektrycznego i przepływu elektroosmotycznego przechodzą przez przegrodę D_1 i D_2 i zagęszczają się w przestrzeniach N (katodowa) lub P (anodowa) pomiędzy dwoma rodzajami przegród.



Rys. 19. Schemat aparatu do elektroforezy barierowej (wg 142)
Objaśnienia w tekście.

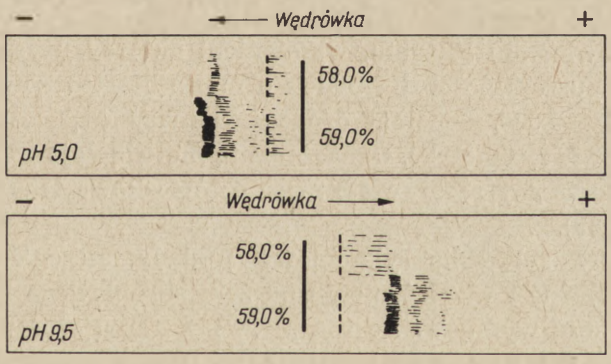
Elektroforeza w żelach, zwłaszcza w żelu skrobiowym i poliakrylamidowym umożliwiła w znacznym stopniu rozdział i badanie grup białek pokrewnych, których występowanie w wielu przypadkach jest uwarunkowane genetycznie. Na uwagę zasługuje rozdział hemoglobin (63) i haptoglobin (131), izoenzymów (146), oraz wykrycie polimorfizmu α- i β-globulin (5). Dodanie do żelu mocznika, jak to zastosował Poulik (116) pozwala na dalsze zwiększenie rozdzielczości środowiska zwłaszcza w przypadku frakcjonowania podjednostek dużych białek (14), histonów (89) oraz produktów częściowej hydrolizy białek (88).

Niskoprocentowy żel agarowy zmieszany z różnymi adsorbentami jak *Hyflo super cel,* celit, proszek celulozowy i inne daje korzystne środowiska w technice, zwanej cienkowarstwową elektroforezą *(thin layer electrophoresis),* zastosowanej do rozdziału enzymów tkankowych (103) oraz białek surowicy (102). Do 0,2% agaru w stosownym buforze dodaje

http://rcin.org.pl

się 1-5% danego adsorbenta i po przygotowaniu emulsji mieszaninę wylewa się na płytkę szklaną. Po ukończeniu elektroforezy i wysuszeniu emulsji, rozdzielone frakcje barwi się i bezpośrednio fotometruje na płytce (102). Należy zaznaczyć, że ilościowy skład frakcji zmienia się wraz ze wzrostem stężenia adsorbenta w żelu, co jest spowodowane zarówno adsorpcją niektórych białek, jak i efektem barierowym. Cienkowarstwowa elektroforeza daje szereg korzyści jak to, że znosi się efekt elektrodekantacji podczas wsiąkania próby w warstwę żelu, można stosować wyższe spadki potencjału i dobry rozdział uzyskuje się w czasie około 2 godzin. Zjawiska hydrodynamiczne zachodzące podczas elektroforezy cienkowarstwowej w komorach wilgotnych opisał Kowalczyk (72).

Johansson i Rymo (62) do dwukierunkowego rozdziału białek surowicy wprowadzili żel dekstranowy, *Sephadex G-200*. Płytkę szklaną o rozmiarach 30 × 30 cm pokrywa się 0,5 mm warstewką żelu w stosownym buforze i po nałożeniu próby, w jednym kierunku przeprowadza się rozdział polegający na molekularnej filtracji, w drugim — rozdział pod wpływem pola elektrycznego. Autorzy metody otrzymywali co najmniej 12 frakcji z surowicy ludzkiej i zawsze znajdowali frakcję przedalbuminową. Należy również wspomnieć, że płytki szklane pokryte warstewką żelu dekstranowego mogą służyć do przybliżonego określenia masy cząsteczkowej rozdzielanych białek (3).

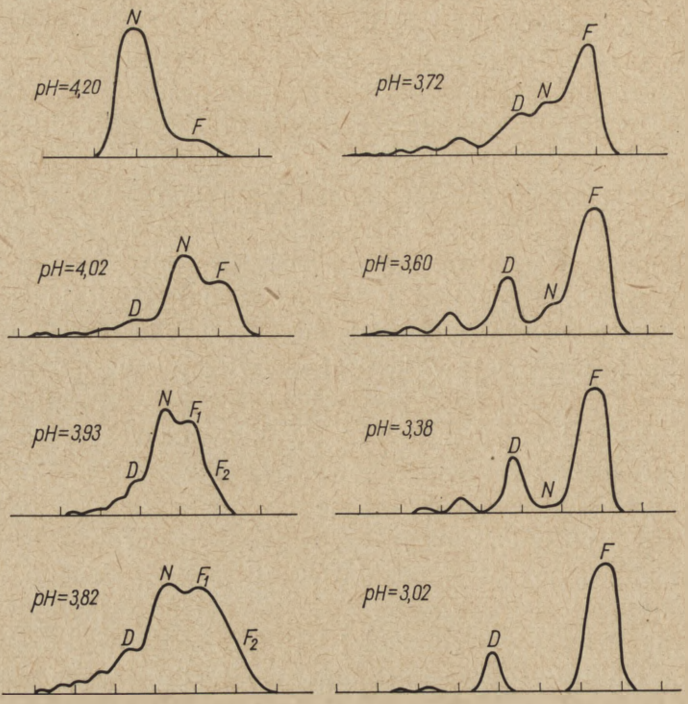


Rys. 20. Elektrodializa prolaktyny przy *pH* 5,0 i 9,5 przez przegrody dializacyjne o niejednakowych porach (wg 109)

Liczby wskazują procentowe stężenie $ZnCl_2$ użytego do przygotowania porów w przegrodach półprzepuszczalnych

Pierce i Free (109) wykorzystali elektroforezę w żelu skrobiowym do przybliżonego określania masy cząsteczkowej białek. Metoda polega na stwierdzeniu czy badane białko przechodzi podczas wędrówki elektroforetycznej przez błonę o określonych porach, ustawioną prostopadle do kierunku wędrówki cząsteczek w żelu. Przepuszczalność błon dializacyjnych kalibruje się uprzednio za pomocą białka o znanej masie

http://rcin.org.pl



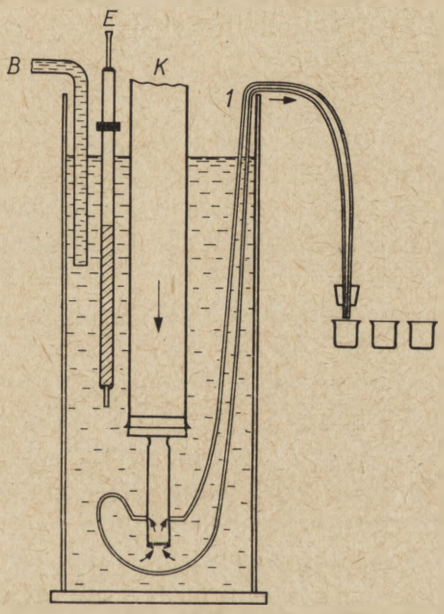
Rys. 21. Krzywe mikrodensytometryczne frakcjonowania albuminy surowicy bydlęcej w żelu poliakrylamidowym (wg 133)

cząsteczkowej. Przez traktowanie błon dializacyjnych roztworem chlorku cynku o odpowiednim stężeniu, wymienieni autorzy uzyskali przegrody o różnej przepuszczalności dla białek o masie cząsteczkowej w zakresie od 10 000 do 100 000. Schemat oznaczania masy cząsteczkowej prolaktyny przedstawia rysunek 20. Oznaczenie tą metodą daje wartość 20 000—25 000, podczas gdy rzeczywista masa cząsteczkowa tego hormonu wynosi 24 000 (109).

Syntetyczny żel poliakrylamidowy posiada szczególnie korzystne własności optyczne i w odróżnieniu od żelu skrobiowego zapewnia dużą reproduktywność wyników. Po raz pierwszy został wprowadzony przez Raymonda i Weintrauba (123) pod nazwą cyanogum 41, a obecnie stosuje się w tzw. technice elektroforezy dyskowej *(disk electrophoresis)*, stanowiącej jedną z najczulszych metod kontroli jednorodności białek. Rozdział przeprowadza się zazwyczaj w pionowej rurce szklanej wypełnionej żelem, stąd otrzymane frakcje posiadają kształt krążków (dysków) o grubości około 0,1 mm. Do analizy tą metodą wystarcza 0,01 μg białka, a czas rozdziału wynosi zaledwie 30 minut. Przykładem wysokiej zdolności rozdzielczej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym jest możność śledzenia wewnątrzcząsteczkowych przemian w cząsteczce albuminy surowicy krwi. W 1958 roku Foster i Aoki (34) stwierdzili, że albumina surowicy bydlęcej przy *pH* około 4 ulega wewnętrznej

http://rcin.org.pl

izomeryzacji na skutek zmiany stałych jonizacji grup karboksylowych, co manifestuje się wystąpieniem dwóch pasm podczas elektroforezy tego białka w środowisku kwaśnym. Ta przemiana zwana przemianą N-F (forma N przyjmując 3 protony przechodzi w formę F i odwrotnie) była następnie szczegółowo badana przez Sogami i Fostera (133) za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Autorzy ci stwierdzili, że albumina surowicy ludzkiej i bydlęcej w środowisku kwaśnym dzieli się na 8 do 10 frakcji, gdyż część białka występuje zawsze w postaci dimeru i wyższych polimerów. Rysunek 21 przedstawia krzywe rozdziału albuminy surowicy bydlęcej w 0,1 M NaCl przy różnych wartościach *pH* i występowanie poszczególnych form białka w zależności od stopnia wewnątrzcząsteczkowej transformacji.



Rys. 22. Schemat kolumny z równoczesnym eluowaniem rozdzielanych frakcji (wg 115)
K — kolumna z nośnikiem, E — elektroda,, B — doprowadzenie buforu.

Elektroforeza na żelu agarowym była dla Grabara i Williamsa (42, 43) punktem wyjścia do opracowania nowej metody fizykochemicznej badania białek, zwanej immunoelektroforezą. Metoda polega na elektroforetycznym rozdzieleniu mieszaniny antygenów w płytce żelu agarowego i przeprowadzeniu reakcji z przeciwciałem na tej samej płytce. Przez dyfuzję przeciwciał i antygenów wytwarzają się charakterystyczne smugi precypitacyjne, w ilości zależnej od ilości układów antygen-przeciwciało. Linie precypitacyjne można barwić stosownymi barwnikami białkowymi oraz analizować ich ilość i przebieg. Identyfikacja składników białkowych mieszaniny za pomocą immunoelektroforezy po-

http://rcin.org.pl

lega więc na określaniu ruchliwości elektroforetycznej i specyficzności antygenowej tych białek. Metoda immunoelektroforezy jest dziś powszechnie stosowana dla kontroli czystości białek, służy ponadto do badania ich własności, struktury (43) oraz do badań genetycznych (43). Opisano różne modyfikacje metody Grabara znane jako immunoosmoforeza (121), radioimmunoelektroforeza (153) oraz aglutynoelektroforeza (104). Ostatnia metoda służy do rozdziału i wykrywania przeciwciał. Na przykład surowicę zawierającą przeciwciała aglutynujące krwinki czerwone rozdziela się na bibule, następnie wilgotny zwinięty pasek zanurza się jednym brzegiem w zawiesinie erytrocytów, które w tym przypadku są antygenem. Erytrocyty dyfundują ku górnemu brzegowi paska, ale w miejscu gdzie znajduje się aglutynina zachodzi aglutynacja krwinek i zahamowanie dyfuzji. Po wysuszeniu i wybarwieniu paska obserwuje się charakterystyczne załamanie linii dyfuzji erytrocytów.

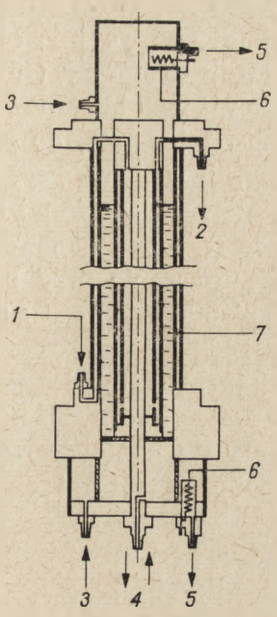
3. Elektroforeza kolumnowa

Metoda elektroforezy kolumnowej otrzymała swe podstawy teoretyczne i znalazła najpierw zastosowanie praktyczne w pracowni Tiseliusa i jego współpracowników. Może być stosowana do frakcjonowania bardzo drobnych ilości materiału w celach analitycznych, jak i na bardzo dużą skalę do celów preparatywnych, co zależy jedynie od rozmiarów i konstrukcji aparatury. Po ukończeniu elektroforezy odcinek kolumny z nośnikiem odłącza się od aparatu i rozdzielone frakcje eluuje buforem techniką stosowaną w chromatografii kolumnowej. Porath i współpracownicy (115) opisali kolumnę, z której można eluować frakcje już podczas elektroforezy (rysunek 22).

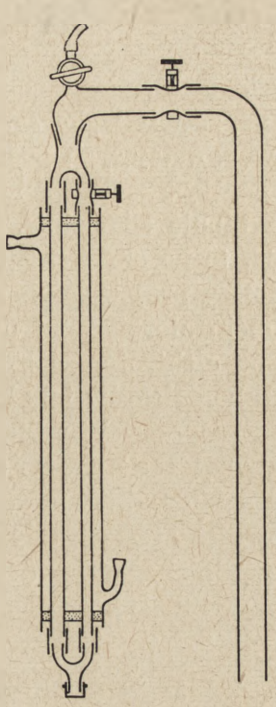
Porath (113) opracował również model automatycznej kolumny pozwalającej na frakcjonowanie 200-ml prób o zawartości 20 g suchej masy białka. Kolumna składa się z czterech rur polimetakrylanowych ustawionych koncentrycznie (rysunek 23). Łożysko adsorbenta chłodzone jest od zewnątrz i od wewnątrz wodą tłoczoną za pomocą pomp. Elektrody platynowe umieszczone są w naczyniach elektrodowych na obu końcach kolumny i są opłukiwane ciągle przepływającym buforem. Dzięki specjalnemu systemowi eluującemu poszczególne frakcje wypłukuje się podczas trwania elektroforezy. Podobne urządzenie na mniejszą skalę opisali Hochstrasser, Skeggs, Lentz i Kann (59).

Elektroforezę kolumnową stosowano do frakcjonowania aminokwasów (112), izoenzymów enolazy drożdży (86), do oczyszczania licznych enzymów (7, 37, 54) oraz frakcjonowania białek tkankowych (36). Żel agarozowy wprowadzony przez Hjértena (58) jako zawiesina 0,1—0,3%-owa jest ostatnio coraz częściej stosowany w technice elektro-

http://rcin.org.pl



Rys. 23. Przekrój kolumny Poratha (113) do rozdziału na dużą skalę
1 — wlot, 2 — wylot płynu chłodzącego, 3 — wlot cyrkulującego buforu w naczyniach elektrodowych, 4 — wlot i wylot buforu eluującego, 6 — elektrody, 7 — przestrzeń rozdzielcza wypełniona nośnikiem.



Rys. 24. Przekrój kolumny Hjertena do elektroforezy w zawiesinie żelu agarozowego (58)

forezy kolumnowej. W tym celu używa się kolumnę o konstrukcji podanej na rysunku 24. Po rozdzieleniu badanej mieszaniny, kolumnę opróżnia się przez wypchnięcie buforem całej jej zawartości do probówek kolektora. Agarozę usuwa się ze środowiska przez wirowanie przy szybkości 10 000 obr/min.

Russel, Levitt i Polson (126) zastosowali żel agarozowy w technice tzw. „ograniczonej elektroforezy" *(restricted electrophoresis)*. Kolumnę zbudowaną z kilku krótkich segmentów wypełniano żelem agarozowym o wzrastającym stężeniu od 0,5-10%. W segmencie o najniższym stężeniu żelu umieszczano próby różnych wirusów i poddawano elektroforezie. Autorzy wykazali, że wirusy zależnie od masy cząsteczkowej i rozmiarów cząsteczki koncentrują się podczas elektroforezy w segmentach kolumny o różnym stężeniu żelu. Wydaje się, że metoda może być szeroko wykorzystana przy oczyszczaniu substancji wielkocząsteczkowych.

http://rcin.org.pl

VII. Inne techniki elektroforetyczne

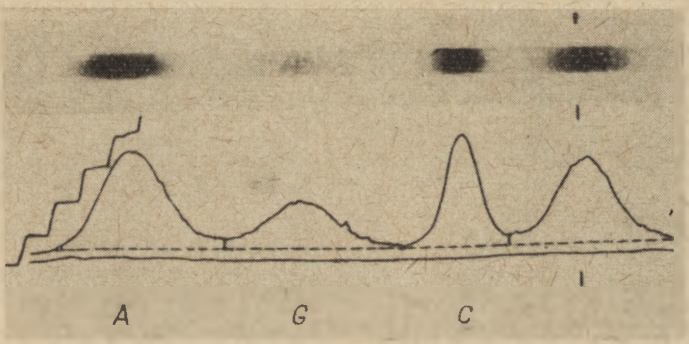
Ciągła elektroforeza bibułowa tzw. kurtynowa odpowiednio zmodyfikowana, została wykorzystana do badania połączeń addycyjnych i kompleksów powstających podczas samego procesu elektroforezy (45). Jeśli dwie reagujące ze sobą substancje, wędrujące do różnych biegunów umieścić na bibule oddzielnie, każdą z nich daleko od bieguna, do którego wędruje, to po określonym czasie elektroforezy, drogi ich skrzyżują się i w miejscu przecięcia się pasm powstaje nowy związek, o innej ruchliwości elektroforetycznej niż związki wyjściowe (rysunek 25). Technika ta zwana elektroforezą skrzyżowania ma duże znaczenie przy badaniu różnych kompleksów jak: kwas nukleinowy — białko, enzym — substrat, antygen — przeciciało, białko — barwnik itp. Elektroforezę skrzyżowania rozwinął N a k a m u r a i współpracownicy (97, 98) stosując ją głównie do badania aktywnych centrów enzymów proteolitycznych. Znalazła ona również zastosowanie w badaniu tworzenia się kompleksów antybiotyków z heparyną (48), lipidów z γ-globulinami (119) i enzymów z inhibitorami (16).

Rys. 25. Skrzyżowanie frakcji podczas ciągłego rozdziału na bibule (wg 45)
Po lewej — brak nowego kompleksu, po prawej — tworzy się i oddziela nowa frakcja

Na szczególną uwagę zasługuje ultramikrometoda elektroforetycznej analizy składników polinukleotydów, którą opisał i zastosował Edström (30, 31, 128). Rozdział hydrolizatu RNA lub DNA, wyosobnionych z pojedynczych komórek przeprowadza się na odpowiednio przygotowanych włóknach celulozy, przy czym do analizy wystarcza 0,2 mμg kwasu nukleinowego. Po rozdzieleniu mieszaniny, włókna celulozowe fotografuje się przy 257 mμ oraz wykreśla za pomocą mikrodensytometru krzywe stężeniowe dla celów ilościowych. Rysunek 26 przedstawia przykładowo rozdział zasad i nukleotydów RNA drożdżowego na włóknie celulozowym po powiększeniu 275-krotnym. Na uwagę zasługuje ostry przejrzysty rozdział, zapewniający znaczną dokładność wyników.

http://rcin.org.pl

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie wpływem rozpuszczalników niewodnych na własności fizykochemiczne i biologiczne białek i enzymów. Niewiele jednak wiadomo o ładunku elektrycznym cząstek koloidowych i innych substancji polarnych w środowisku niewodnym i o zachowaniu się ich w tym środowisku pod wpływem pola elektrycznego. Pohl (110, 111) badając wpływ niejednorodnego pola elektrycznego na ruchliwość mikroskopowych cząstek stałych przeprowadził rozdział drobin polimerów sztucznych w roztworach rozpuszczalników organicznych słabo przewodzących prąd. Wędrówka jest uwarunkowana wówczas mo-



Rys. 26. Mikroelektroforetyczny rozdział zasad i nukleotydów RNA na włóknie celulozowym (wg 31)
U góry zdjęcie włókna przy 257 mμ (powiększenie 275-krotne), u dołu krzywa mikrodensytometryczna, A — adenina, G — guanina, C — kwas cyhydylowy, u — kwas urydylowy

mentem dipolowym cząstek, stałym lub indukowanym. Jeśli pole elektryczne jest niejednorodne, wówczas jeden biegun dipola będzie znajdował się w słabszym polu niż drugi i w efekcie dipol będzie przyciągany w kierunku największej intensywności pola. Ten ruch drobin spowodowany przez efekt polaryzacyjny w niejednorodnym polu elektrycznym nazwano „dielektroforezą" (110). Stałe pole elektryczne w środowisku bezwodnym stosowano do frakcjonowania barwników (100), oraz aminokwasów i peptydów (76). Bliższe dane na temat rozwijającej się metody dielektroforezy i jej praktycznego zastosowania znajdują się w referacie Kentzera i Kowalczyka (66). Podejmowano również próby nad zastosowaniem równocześnie pola elektrycznego i magnetycznego do rozdziałów różnych mieszanin (69). Technika zwana „elektromagnetoforezą" wykorzystuje różnice w przewodnictwie elektrycznym i przenikliwości magnetycznej lub dielektrycznej badanych cząstek i otaczającego je roztworu (80). Metoda stosowana była do frakcjonowania komórek, izomerów optycznych i różnych zawiesin (71).

http://rcin.org.pl

LITERATURA

1. Adolf M., Pauli W., *Biochem. Z.* **152**, 360 (1924).
2. Ambrose E. J., James A. M., Lowick J. H. B., *Nature* **177**, 576 (1956).
3. Andrews P., *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
4. Anfinsen C. B., Aquist S. E. G., Cooke J. P., *Jönsson B., J. Biol. Chem.* **234**, 1118 (1959).
5. Ashton G. C., *Nature* **181**, 849 (1958).
6. Avrameas S., Uriel J., *Nature* **202**, 1005 (1964).
7. Baich A., Wolfe R. G., Reithel F., *J. Biol. Chem.* **235**, 3130 (1960).
8. Bailey S. W., Hackman R. H., *J. Chromatogr.* **8**, 52 (1962).
9. Barrollier J., Watzke E., Gibian H., *Z. Naturforsch.* **13b**, 754 (1958).
10. Bateman J. B., Zellner A., David M. S., Mc Caffrey P. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 384 (1956).
11. Berezowskaja N. N., *Biochimija* **23**, 125 (1958).
12. Blank F., Valko E., *Biochem. Z.* **195**, 220 (1928).
13. Bloemendal H., Zone Electrophoresis in Blocks and Columns, Elsevier, Amsterdam, 1963.
14. Bloemendal H., Jondkind J. F., Wisse J. H., *Chem. Weekbl.* **58**, 501 (1962).
15. Bocci V., *J. Chromatogr.* **11**, 515 (1963).
16. Borkowska-Madecka J., Deptuch A. *J. Chromatogr.* **13**, 251 (1964).
17. Boyack J. R., Giddings J. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 16 (1963).
18. Braunitzer G., Matsuda G., *Z. physiol. Chem.* **325**, 91 (1961).
19. Brinton C. C., Lauffer M. A., w: Electrophoresis, red. M. Bier, Acad. Press., New York 1959, str. 427.
20. Choules G. L., Ballentine R., *Anal. Biochem.* **2**, 59 (1961).
21. Coolidge T. B., *J. Biol. Chem.* **127**, 551 (1939).
22. Cramer R., Svensson H., *Experientia* **17**, 49 (1961).
23. Crimm F. L., Doherty D. G., *J. Biol. Chem.* **236**, 1980 (1961).
24. Daams J. H., *J. Chromatogr.* **10**, 450 (1963).
25. Dawson R. M. C., Hemington N., Lindsey D., *Biochem. J.* **77**, 226 (1960).
26. Dobry R., Finn R. K., *Science* **127**, 697 (1958).
27. Durrum E. L., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4877 (1951).
28. Durrum E. L., *J. Colloid. Sci.* **6**, 274 (1951).
29. Edelman G. M., Poulik M. D., *Fed. Proc.* **20**, 387 (1961).
30. Edström J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 361 (1953).
31. Edström J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 399 (1964).
32. Elson D., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 207 (1958); **36**, 362 (1959).
33. Eylae E. H., Brody O. V., Oncley J. L., *Fed. Proc.* **20**, 62 (1961).
34. Foster J. F., Aoki K., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1117 (1958).
35. Giddings J. C., Boyack J. R., *Anal. Chem.* **36**, 1229 (1964).
36. Glomset J., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 439 (1959).
37. Glomset J., Porath J., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 1 (1960).
38. Goldthwait D. A., *J. Biol. Chem.* **234**, 3245 (1959).
39. Goldthwait D. A., Starr I. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 2025 (1960).
40. Gordon A. H., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 23 (1960).
41. Gouy G., Ann. Phys. **7**, 129 (1917); *Z. physik. Chem.* **163**, 378 (1933).
42. Grabar P., *Adv. Protein Chem.* **13**, 1 (1958).
43. Grabar P., Burtin P., Analyse immuno-electrophoretique, Masson a. Cie, Paris 1960.

http://rcin.org.pl

44. Grassmann W., Hannig K., *Naturwiss.* **37**, 397 (1950).
45. Grassmann W., Hubner L., *Naturwiss.* **40**, 272 (1953).
46. Gratzer W. B., Beaven G. H., *Clin. Chim. Acta* **5**, 577 (1960).
47. Gross D., *J. Chromatogr.* **5**, 194 (1961); *Nature* **178**, 29 (1956).
48. Gubernieva L. M., Silaev A. B., *Biochimija* **29**, 831 (1964).
49. Hahn L., Tiselius A., *Biochem. Z.* **514**, 336 (1942).
50. Hannig K., *Z. physiol. Chem.* **311**, 63 (1958).
51. Hannig K., *Z. anal. Chem.* **181**, 244 (1960).
52. Hannig K., *Z. physiol. Chem.* **338**, 211 (1964).
53. Haugaard G., Kroner T. D., *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 2135 (1948).
54. Heilbrom E., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 222 (1962).
55. Helmholtz H., *Ann. Phys.* **7**, 437 (1879).
56. Hjerten S., *Ark. Kemi* **13**, 151 (1958).
57. Hjerten S., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 514 (1961).
58. Hjerten S., *J .Chromatogr.* **12**, 510 (1963).
59. Hochstrasser H., Skeggs L. T., Lentz K. E., Kann J. R., *Anal. Biochem.* **6**, 13 (1963).
60. Ingram V. M., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 539 (1958).
61. Jermyn A. M., Thomas R., *Nature* **172**, 728 (1953).
62. Johansson B. G., Rymo L., Acta Chem. Scand. **18**, 217 (1964).
63. Jovin T., Chrambach A., Naughton M. A., *Anal. Biochem.* **9**, 351 (1964).
64. Kadoya M., Mitsui H., Takagi Y., Otaka E., Suzuki H., Osawa S. *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 36 (1964).
65. Karler A., Brown C. L., Kirk P. L., *Microchim. Acta* **11**, 1585 (1956).
66. Kentzer L., Kowalczyk J., *Wiad. Chem.* **18**, 709 (1964).
67. Klobusitzky D., König P., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.* **192**, 271 (1939).
68. Kohn J., *Biochem. J.* **65**, 9 (1957).
69. Kolin A., *Science* **117**, 134 (1953).
70. Kolin A., w: Methods of Biochemical Analysis, red. D. Glick, tom. 6, New York 1958, str. 259.
71. Kowalczyk J., Pompowski T., *Wiad. Chem.* **15**, 107 (1961).
72. Kowalczyk J., *J. Chromatogr.* **14**, 411 (1964).
73. Kozuwlewa O. B., Chung-Yen W., *Biochimija* **24**, 550 (1959).
74. König P., *Actas e trabalhos Congr. Sul-Amer. Chim.* (*Rio de Janeiro*) **2**, 334 (1937).
75. Krawczyk A., *Bull. Acad. Polon. Sci.* Cl. II, **10**, 87 (1962).
76. Krawczyk A., Praca doktorska, Akad. Med., Kraków 1963.
77. Kunkel H. G., Slater R. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **80**, 42 (1952).
78. Kunkel H. G., Tiselius A., *J. Gen. Physiol.* **35**, 89 (1951).
79. Lederer M., *Nature* **167**, 864 (1951).
80. Leenov D., Kolin A., *J. Chem. Phys.* **22**, 683 (1954).
81. Lerner H., Protides of Biological Fluids, Elsevier, Amsterdam 1964, str. 341.
82. Lewis U. J., Clark M. O., *Anal. Biochem.* **6**, 303 (1963).
83. Lodge O., *Brit. Assoc. Adv. Sci. Rept.* **56**, 389 (1886).
84. Longsworth L. G., Mc Innes D. A., *Chem. Revs.* **24**, 271 (1939).
85. Macheboeuf M., Rebeyrotte P., Dubert J. M., Brumerie M., Bull. Soc. Chim. Biol. **35**, 334 (1953); **35**, 346 (1953).
85a. Maizel J. V., Ann N. Y. Acad. Sci. **121**, 382 (1964).
86. Malmström B. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 58 (1957).
87. Markert C. L., Appella E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 678 (1961).

http://rcin.org.pl

88. Markus G., Protides of Biological Fluids, Elsevier, Amsterdam 1964, str. 37.
89. Mc Allister H., Wan Y. C., Irvin J. L., *Anal. Biochem.* **5**, 321 (1963).
90. Mc Donald H. J., Ionography: electrophoresis in stabilized media, The Year Book Publ. Inc, Chicago 1954.
91. Mc Kinley W. P., *Science* **121**, 139 (1955).
92. Mel H. C., *Science* **132**, 1255 (1960).
93. Michl H., *J. Chromatogr.* **1**, 93 (1958).
94. Mora R., Rebeyrotte P., Polonovski J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **37**, 957 (1955).
95. Murray K., *Anal. Biochem.* **3**, 415 (1962).
96. Müller-Eberhard H. J., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **12**, 33 (1960).
97. Nakamura S., Takeo K., Tanaka K., Ueta T., *Z. physiol. Chem.* **318**, 115 (1960).
98. Nakamura S., Takeo K., Sasaki I., *Z. physiol. Chem.* **334**, 95 (1963).
98. Noworytko J., Sarnecka-Keller M., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 91 (1955).
100. Oehme F., Rauschenbach I., *Chem. Technik* **8**, 21 (1956).
101. Ostrowski W., Krawczyk A., *w druku.*
102. Ostrowski W., Krawczyk A., Galos-Biczowa B., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 649 (1956).
103. Ostrowski W., Tsugita A., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 68 (1961).
104. Ostrowski W., Stypułkowski C., *Clin. Chim. Acta* **6**, 254 (1961).
105. Paigen K., *Anal. Chem.* **28**, 284 (1956).
106. Paul J., Fottrell P. F., *Ann. N. Y., Acad. Sci.* **94**, 68 (1961).
107. Peeters H., Vuylsteke P., Noë R., *J. Chromatogr.* **2**, 308 (1959).
108. Picton H., Linder S. E., *J. Chem. Soc.* **71**, 568 (1897).
109. Pierce J. G., Free C. A., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 437 (1961).
110. Pohl H. A., *J. Appl. Phys.* **29**, 1182 (1958).
111. Pohl H. A., Phymale C. E., *J. Electrochem. Soc.* **107**, 390 (1960).
112. Porath J., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 151 (1956).
113. Porath J., *Ark. Kemi* **11**, 259 (1957).
114. Porath J., Flodin P., *Nature* **183**, 1657 (1959).
115. Porath J., Lindner E. B., Jerstedt S., *Nature* **182**, 744 (1958).
116. Poulik M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 390 (1960).
117. Prusik Z., Keil B., *Collection Czechoslov. Chem Commun.* **25**, 2049 (1960).
118. Pučar Z., *Croat. Chem. Acta* **28**, 195 (1956).
119. Pučar Z., Keller M., Petek M., *Z. physiol. Chem.* **309**, 43 (1957).
120. Racusen D., Calvanico N., *Anal. Biochem. Z.* **7**, 62 (1964).
121. Ragetli H. W. J., Weintraub M., *Science* **144**, 1023 (1964).
122. Raymond S., *Science* **146**, 406 (1964).
123. Raymond S., Weintraub L., *Science* **130**, 711 (1959).
123a. Raymond S., Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 350 (1964).
124. Ruhenstroth-Bauer G., Fuhrmann G. F., Ganzer E., Kubler W., Rueff F., *Naturwiss.* **49**, 363 (1962).
125. Rushizky G. W., Knight C. A., Roberts W. K., Dekker C. A., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 674 (1962); **55**, 664 (1962).
126. Russell B., Levitt J., Polson A., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 622 (1964).
127. Shack J., Bynum B. S., *J. Biol. Chem.* **239**, 2602 (1964).

http://rcin.org.pl

128. Sierakowska H., Edström J. E., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 497 (1964).
129. Smithies O., *Biochem. J.* **61**, 629 (1955).
130. Smithies O., *Adv. Protein Chem.* **14**, 65 (1959).
131. Smithies O., Walker W. F., *Nature* **178**, 694 (1956).
132. Smoluchowski M., *Bull. Acad. Sci., Kraków*, 1903; *Z. physik. Chem.* **92**, 129 (1918).
133. Sogami M., Foster J. F., *J. Biol. Chem.* **237**, 2514 (1962).
134. Stern O., *Z. Elektrochem.* **30**, 508 (1924).
135. Svensson H., *Ark. Kem. Mineral. Geol.* **22A**, nr 10 (1946).
136. Svensson H., w: Paper Electrophoresis, Ciba Found. Symp., Churchill, London 1956, str. 86.
137. Svensson H., w: Analytical Methods of Protein Chemistry, red. P. Alexander i R. J. Block, Pergamon Press, London 1960, tom I, str. 195.
138. Svensson H., Brattsten I., *Ark. Kemi* **1**, 401 (1949).
139. Svensson H., Valmet E., *Sci. Tools* **2**, 11 (1955); **5**, 37 (1958).
140. Tiselius A., *Trans Faraday Soc.* **33**, 524 (1937); *Biochem. J.* **31**, 313 (1937); *Kolloid Z.* **85**, 129 (1938).
141. Trautman R., w: Comprehensive Biochemistry, red. M. Florkin i E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam 1963, tom VII, cz. I, str. 107.
142. Vande Woude G. F., Davis F. F., *Anal. Biochem.* **6**, 240 (1963).
143. Verwey E. J. W., Kruyt H. R., *Z. physik. Chem.* **167A**, 149 (1933).
144. Vesselinovitch S. D., *Nature* **182**, 665 (1958).
145. Waksmundzki A., *Wiad. Chem.* **6**, 479 (1952).
146. Watts D. C., Donninger C., *Anal. Biochem.* **3**, 489 (1962).
147. Werner G., Westphal O., *Angew. Chem.* **67**, 251 (1955).
148. Whetham W. C. D., *Phil. Mag.* **38**, 392 (1849).
149. Wieland T., Pfleiderer G., *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955).
150. Wieme R. J., van Maercke Y., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 898 (1961).
151. Wilkinson J. S., Williams V. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 80 (1961).
152. Williams R. C., Ruffin R. S., Berry E. R., *Anal. Biochem.* **8**, 293 (1964).
153. Yagi Y., Maier P., Pressman D., *J. Immunol.* **89**, 763 (1962).

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

P O S T Ę P Y B I O C H E M I I

TOM XI 1965 ZESZYT 3

RECENZJE

Recenzja książki T. L. V. Ulbrichta

Ulbricht: T. L. V. *PURINES, PYRIMIDINES AND NUCLEOTIDES and the Chemistry of the Nucleic Acids*, Vol. XXV of „*A Course in Organic Chemistry, Advanced Section*" (Sir Robert Robinson ed.), Pergamon Press, Oxford, England. 1964; vii + 79 str., cena 12s 6d.

Na tę niewielką książeczkę składa się 5 rozdziałów poświęconych chemii składowych elementów kwasów nukleinowych: puryn i pirymidyn, ich nukleozydów i nukleotydów, a także ich biologicznych i syntetycznych analogów. Przeznaczona jest dla zaawansowanych już studentów ostatniego roku chemii organicznej, jako wprowadzenie, poprzedzające bardziej ogólne zajęcia w zakresie związków heterocyklicznych i związków występujących w przyrodzie.

Pierwszy rozdział przedstawia w ogólnym zarysie chemię puryn i pirymidyn. Drugi opisuje podstawowe metody syntezy tych związków i szeregu ich analogów. Trzeci dotyczy najważniejszych metod stosowanych przy syntezie nukleozydów i ich analogów, oraz sposobów określania struktury tych związków. Tematem czwartego rozdziału jest synteza i budowa nukleotydów, a założeniem rozdziału końcowego jest możliwie czytelne streszczenie, w szczupłych ramach 9-ciu stron, chemii i funkcji naturalnych kwasów nukleinowych.

Opisy wielu metod syntezy, z konieczności bardzo pobieżne, zostały trafnie uzupełnione szeregiem schematów obrazujących ich przebieg. Natomiast, ze względu na bardzo rozległą literaturę tej dziedziny, niezbyt korzystne dla zainteresowanego tematem czytelnika może się okazać zbytnie, nawet jak na tak mały wprowadzający tomik, ograniczenie odnośników bibliograficznych — do kilku zaledwie w każdym rozdziale.

Warto może zatrzymać się nad jedną czy dwiema sprawami mniejszej już wagi. Zdanie ze strony 67, że „specyficzne wiązania wodorowe między puryną i pirymidyną zespalają dwa spiralne łańcuchy nukleotydowe....." wymaga, jak obecnie wiadomo, pewnej rewizji. Choć rzeczywiście wiązania wodorowe w parach zasad łańcucha DNA grają główną rolę w ukształtowaniu spirali obu łańcuchów nukleotydowych, to przecież jednak istnieje niemało danych doświadczalnych wskazujących na stosunkowo mały wpływ tych wiązań na trwałość spirali, która zależy głównie od innych czynników. Sprawa ta stała się właśnie ostatnio przedmiotem rozległych badań.

Niezbyt ścisłe, a nawet mogące wprowadzić w błąd kogoś niezorientowanego, jest stwierdzenie, że 5-fluorodezoksyurydyny „... używa się do leczenia niektórych nowotworów" (strona 51), gdyż takie sformułowanie sugeruje uzyskanie jakichś korzystnych wyników w tej dziedzinie, co, jak na razie, stanowczo nie jest zgodne z prawdą. Na tej samej stronie wspomniano o hamującym wpływie 5-jododezoksyurydyny na wirusy opryszczki i ospy; znaczenie tego odkrycia zasługuje w pełni na podkreślenie, gdyż tym razem próby kliniczne okazały się rzeczywiście bardzo obiecujące.

http://rcin.org.pl

Również na tej samej 51 stronie pisze autor, że „bromo- i w mniejszym stopniu 5-jodopochodne (uracylu) wchodzą u bakterii na miejsce tymidyny w cząsteczce DNA, nie wywołując w tych organizmach zmian poza wzrostem ilości mutacji". Jest to oczywiście uproszczenie, które jednak posunięte zostało zbyt daleko; w rzeczywistości bowiem u organizmów wymagających dla swojego wzrostu tyminy i tymidyny, zastąpienie ich przez 5-bromoanalogi doprowadza do szeregu poważnych zmian, a między innymi także do śmierci tych organizmów.

Autor, jak się to często spotyka, wspomina (we wstępie do rozdziału pierwszego) o zamieszaniu spowodowanym istnieniem dwóch różnych systemów oznaczania kolejności atomów w pierścieniu pirymidynowym. Można mu szczerze współczuć z powodu tych trudności przy opracowywaniu materiałów. Dziwnym się wydaje, że taka ogromnie niedogodna sytuacja nie znalazła dotąd właściwego rozwiązania.

Ogólnie biorąc należy przypuszczać, że omówiona pozycja będzie pożyteczna dla chemików, którzy zaczynają zgłębiać dziedzinę chemii kwasów nukleinowych, jak i innych pragnących jedynie zapoznać się ogólnie z tą tematyką. Może się też ona okazać wartościowa dla biochemików interesujących się wykorzystaniem takich analogów pochodnych kwasów nukleinowych, jak antymetabolity, koenzymy nukleotydów, czy tp. Dodać jeszcze należy, że w stosunku do przeciętnych cen zachodnio europejskich książek naukowych, tomik ten jest stosunkowo tani i w związku z tym łatwo dostępny dla indywidualnego odbiorcy.

D. Shugar

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOCHEMII

TOM XI 1965 ZESZYT 3

AUTOREFERATY PRAC HABILITACYJNYCH I DOKTORSKICH

Badania nad ubichinonem i jego funkcją biologiczną

LUDMIŁA SZARKOWSKA

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Recenzenci: prof. dr I. CHMIELEWSKA, prof. dr G. BAGDASARIAN, prof. dr T. KORZYBSKI

Uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie z dnia 19. XII. 1963 r. nadająca stopień naukowy docenta biologii

Praca obejmuje badania nad występowaniem ubichinonu oraz nad jego oksydoredukcją w układach izolowanych i w całych mitochondriach.

U owadów oprócz homologu ubichinonu Q_9, który jak przypuszczano jest charakterystyczny dla tych zwierząt, znaleziono także homolog Q_{10}, uważany za typowy dla zwierząt i roślin wyższych. Q_{10} znaleziono również u innego przedstawiciela zwierząt niższych — ślimaka *Helix pomatia*. Uzyskane wyniki łącznie z wynikami innych autorów wskazują, że rodzaj homologu nie może być uważany za kryterium taksonomiczne w rozwoju filogenetycznym.

Ubichinon w mitochondriach zwierząt wyższych występuje w dużym nadmiarze w stosunku do cytochromów *a* i *b*. Największą ilość ubichinonu spośród badanych tkanek posiadają mitochondria serca szczura i mięśni piersiowych gołębia, najmniejszą zaś — nerek i wątroby szczura. Ilości pośrednie znaleziono w mitochondriach mięśni szkieletowych szczura i mięśni skrzydłowych szarańczy.

Wykazano, że ubichinon ulega redukcji w obecności izolowanego preparatu dehydrogenazy bursztynianowej. Ponieważ redukcja jest niewrażliwa na antymycynę A, więc cytochrom *b* nie bierze w niej udziału. Redukcja ubichinonu przez bursztynian jest hamowana przez benzo- i naftochinony.

Ubichinon stymuluje redukcję żelazicyjanku, katalizowaną przez dehydrogenazę bursztynianową. Przenoszenie elektronów ze zredukowanego ubichinonu na żelazicyjanek może zachodzić nieenzymatycznie. W badaniach z żelazicyjankiem jako sztucznym akceptorem elektronów ubichinon jest ogniwem pośrednim.

Opracowano ultra-mikrometodę, pozwalającą oznaczyć w mitochondriach kilkadziesiąt razy mniejsze ilości ubichinonu niż przy pomocy znanych dotąd mikrometod. Metodą tą można oznaczyć zarówno formę utlenioną, jak i zredukowaną

http://rcin.org.pl

ubichinonu. Umożliwiło to badania oksydoredukcji ubichinonu w mitochondriach równolegle dwiema metodami: bezpośrednio za pomocą spektrofotometru „double beam" i pośrednio analizując ekstrakty.

W mitochondriach serca szczura, posiadających kontrolę oddechową, tylko bursztynian redukuje w „steady stałe" ubichinion w około 90%. Inne substraty jak jabłczan, α-ketoglutaran, β-hydroksymaślan, kapronian + jabłczan i glicero-*1*-fosforan nie wywierają wpływu na stan oksydoredukcyjny ubichinonu.

Mitochondrialny ubichinon jest w obecności cyjanku redukowany przez glicero-*1*-fosforan. Ponieważ mitochondrialna dehydrogenaza glicero-*1*-fosforanu, podobnie jak dehydrogenaza bursztynianowa i oksydoreduktaza NADH: ubichinon, jest flawoproteidem zawierającym żelazo, można sądzić, że ubichinon jest ogólnie akceptorem dla dehydrogenaz żelazoflawoproteidowych.

Zmiany stopnia redukcji ubichinonu w mitochondriach po dodaniu cyjanku lub antymycyny A, oznaczone bezpośrednio za pomocą spektrofotometru „double beam" i na podstawie analiz ekstraktów są zgodne. Przy przejściu mitochondriów ze stanu aktywnego do kontrolowanego obserwowano bezpośrednio spektrofotometrycznie zmiany absorpcji, odpowiadające redukcji 90% ubichinonu zawartego w mitochondriach, analiza zaś ekstraktów nie wykazywała praktycznie żadnych zmian. Dyskutowano przyczyny tych niezgodności.

Przedyskutowano rolę biologiczną ubichinonu oraz omówiono sugestie dotyczące ewentualnej roli ubichinonu w oksydacyjnej fosforylacji.

Praca została opublikowana pt. „Badania nad ubichinonem i jego funkcją biologiczną" w Monografiach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1964 r.

Badania nad specjalnością transaminaz

LEOKADIA JAROSZEWICZ

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Promotor: doc. dr med. Stefan NIEWIAROWSKI

Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego AM w Lublinie nadająca stopień naukowy doktora farmacji z dnia 23 września 1964 r.

Opracowano metodę preparatyki amonitransferazy asparaginowej z mięśnia sercowego świni. Metoda ta polega na ogrzewaniu homogenatu z tego mięśnia, frakcjonowaniu siarczanem amonu i frakcjonowaniu na kolumnie zawierającej *Alumina C* lub *Sephadex G-100*. Przeprowadzono badania elektroforetyczne oczyszczonych preparatów posługując się metodą elektroforezy bibułowej i elektroforezy na żelu skrobiowym. W elektroforezie na żelu skrobiowym stwierdzono obecność trzech frakcji białkowych, zaś w elektroforezie bibułowej w *pH* 5,4 i 8,6 obecność jednej frakcji białkowej o ruchliwości elektroforetycznej odpowiadającej globulinom.

Stosując metodę chromatograficzną zbadano aktywność transaminującą pierwotnego wyciągu oraz preparatów uzyskanych na poszczególnych etapach oczyszczania w stosunku do 14 aminokwasów. Stwierdzono, że wszystkie aminokwasy z wyjątkiem glicyny, argininy i lizyny ulegały transaminacji przez nieoczyszczony

http://rcin.org.pl

preparat. Ogrzanie preparatu enzymatycznego wywoływało utratę aktywności w stosunku do waliny, leucyny i izoleucyny, dwukrotny wzrost aktywności w stosunku do kwasu asparaginowego i brak zmiany aktywności w stosunku do alaniny. Po wysoleniu preparatu siarczanem amonu wzrastała w znacznym stopniu aktywność w stosunku do metioniny, fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu. Preparat przepuszczony przez kolumnę z żelem glinowym wykazywał aktywność tylko w stosunku do kwasu asparaginowego oraz ślady aktywności w stosunku do tryptofanu i tyrozyny.

Na podstawie wykonanych badań wysunięto przypuszczenie, że w wyciągu mięśnia sercowego świni istnieją przynajmniej cztery różne aminotransferazy: 1) aminotransferaza asparaginianowa, 2) aminotransferaza alaninowa, którą można oddzielić od aminotransferazy asparaginianowej na kolumnie z żelem glinowym, 3) aminotransferaza ciepłochwiejna, aktywna w stosunku do następujących aminokwasów: waliny, leucyny, izoleucyny, 4) aminotransferaza aktywna w stosunku do metioniny, histydyny, fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu, aktywująca się w czasie wytrącania siarczanem amonu.

Badania porównawcze poziomu niektórych składników układu krzepnięcia i fibrynolizy w różnych odcinkach układu krążenia u psa

KRZYSZTOF WOROWSKI

Pracę wykonano w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Promotor: doc. dr med. Stefan NIEWIAROWSKI

Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Białymstoku nadająca stopień naukowy doktora medycyny z dnia 16 marca 1965 r.

Aktualny poziom składników krzepnięcia krwi i fibrynolizy, podobnie jak i poziom innych białek osocza jest wypadkową dwóch procesów: biosyntezy i katabolizmu. Ewentualne różnice w poziomie tych składników w krwi pochodzącej z różnych odcinków układu krążenia mogą być spowodowane zwiększeniem poziomu w krwi opuszczającej narząd, w którym zachodzi biosynteza i szybkim zużywaniem się ich w krwi krążącej. Zarówno metabolizm składników układu krzepnięcia i fibrynolizy w ustroju, jak i mechanizmy regulujące ten proces nie są dostatecznie poznane.

Lasch i Roka wykazali wyższy poziom protrombiny w krwi żyły wątrobowej niż w krwi żyły wrotnej i odwrotny stosunek poziomów czynnika VII. Buluk i współpracownicy stwierdzili wyższą aktywność fibrynolityczną krwi żyły nerkowej niż krwi tętnicy nerkowej i wykazali, że około 94% wytwarzanej przez nerkę urokinazy wydzielane jest do krążenia, a tylko około 6% do moczu.

Celem niniejszej pracy były badania porównawcze poziomu niektórych składników układu krzepnięcia krwi i fibrynolizy w różnych odcinkach układu krążenia u psa. Stwierdzono znaczną aktywację układu fibrynolitycznego w krwi żyły nerkowej u psa i podjęto próbę ustalenia czy wydzielana przez nerkę urokinaza odgrywa rolę w katabolizmie plazminogenu i fibrynogenu. Przeprowadzono szczegółowe badania nad występowaniem produktów rozpadu fibrynogenu — antytrombiny VI, w krążeniu w warunkach fizjologicznych. Wykonano oznaczenia poziomu

http://rcin.org.pl

fibrynogenu, protrombiny, czynnika V, VII, VIII, IX, XI i XII, plazminogenu, antyplazminy oraz zbadano czas trombinowy, aktywność antytrombiny VI i aktywność fibrynolityczną euglobulin w osoczu krwi żył powierzchownych kończyn, żyły wrotnej, żyły wątrobowej, żyły płucnej, tętnicy płucnej i żyły nerkowej u psa.

Nie wykazano istotnych różnic w poziomie badanych substancji w osoczu krwi żył powierzchownych kończyn, żyły wrotnej, żyły wątrobowej, żyły płucnej i tętnicy płucnej. Jedynie poziom fibrynogenu i protrombiny był nieco wyższy w osoczu krwi żyły wątrobowej niż w osoczu krwi żyły wrotnej. Stwierdzono natomiast znaczne skrócenie czasu fibrynolizy euglobulin osocza krwi żyły nerkowej, niższy poziom plazminogenu, antyplazminy i fibrynogenu oraz wyższą aktywność antytrombiny VI w tej krwi.

Zbadano ponadto wpływ zatrucia psów chlorkiem rtęci — substancją stosunkowo swoiście uszkadzającą nerki — na poziom poszczególnych składników układu krzepnięcia i fibrynolizy i stwierdzono zahamowanie aktywności fibrynolitycznej, znaczny wzrost poziomu plazminogenu, fibrynogenu i czynnika VIII oraz spadek aktywności antytrombinowej.

Wysunięto przypuszczenie, że wzrost aktywności fibrynolitycznej, spadek poziomu plazminogenu, antyplazminy i fibrynogenu oraz pojawienie się aktywności antytrombinowej w krwi żyły nerkowej jest wynikiem działania urokinazy w tym odcinku krążenia. Natomiast wzrost poziomu plazminogenu, fibrynogenu, czynnika VIII, zahamowanie aktywności fibrynolitycznej i spadek aktywności antytrombinowej u psów zatrutych chlorkiem rtęciowym może być skutkiem upośledzenia wytwarzania urokinazy przez nerkę.

Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę urokinazy — aktywatora plazminogenu produkowanego przez nerkę — w regulacji fibrynolizy krwi krążącej oraz w katabolizmie plazminogenu i fibrynogenu *in vivo*. Dowodzą także, że produkty rozpadu fibrynogenu (antytrombina VI) są naturalnymi inhibitorami krzepnięcia krwi występującymi w warunkach fizjologicznych.

Praca została częściowo opublikowana w *Thromb. Diath. Haem.* **12**, 87 (1964) i *Bull. Acad. Polon. Sci.* **12**, 433 (1964).

http://rcin.org.pl

P O S T Ę P Y B I O C H E M I I

TOM XI 1965 ZESZYT 3

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Międzynarodowe sympozjum chemii klinicznej poświęcone diagnostyce enzymologicznej schorzeń wątroby Warszawa, 27-28. XI. 1964

W dniach 27-28. XI. 1964 r. odbyło się w Warszawie Międzynarodowe Sympozjum Chemii Klinicznej poświęcone diagnostyce enzymologicznej schorzeń wątroby. Sympozjum zostało zorganizowane pod patronatem Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej przez Katedrę Diagnostyki Laboratoryjnej Studium Doskonalenia Lekarzy i przy współudziale Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej. W Sympozjum wzięło udział około 250 osób, w tym około 100 osób z zagranicy, reprezentujących wszystkie kraje socjalistyczne. Obrady toczyły się w języku angielskim i niemieckim. Otwarcia Sympozjum dokonał prof. E. R u ż y ł ł o, który następnie przewodniczył obradom.

Na Sympozjum wygłoszono trzy następujące referaty wiodące: doc. S. K r u ś (Warszawa) mówił o ultrastrukturze komórki wątrobowej zmienionej chorobowo, prof. I. H o ř e j s i (CSSR) — o układach enzymatycznych w komórce wątrobowej i zmianach ich aktywności w warunkach patologicznych, prof. B. H a l i k o w s k i — o zaburzeniach enzymatycznych w wątrobie we wrodzonych wadach metabolicznych.

Poza referatami wiodącymi przedstawiono szereg krótkich doniesień zarówno z ośrodków krajowych, jak i zagranicznych. Spośród delegacji radzieckiej M. E. S i e m i e d i a j e w a omówiła zmiany ultrastruktury komórki wątrobowej w niektórych rodzajach zwyrodnienia białkowego, a Ch. Ch. M a n s u r o w sprzężone wyniki niektórych prób enzymatycznych i białkowych w różnych schorzeniach wątroby.

Interesujący był komunikat S. D a n a (Węgry). Autor omówił diagnostyczną wartość oznaczania enzymów w przewlekłym zapaleniu wątroby, zaznaczając, że aktywność enzymów w tej jednostce chorobowej może być prawidłowa, lekko podwyższona lub wysoka, oraz że obecnie tylko biopsja pozwala na ustalenie charakteru i stopnia zmian histologicznych miąższu wątroby. Zwrócił on wraz z współpracownikami szczególną uwagę na znaczenie wyników następujących badań nad zdolnością adaptacji enzymatycznej wątroby u zwierząt przy ostrym i przewlekłym uszkodzeniu wątroby: wpływu częściowego lub całkowitego zahamowania przepływu żółci na poziom aldolazy, transaminazy i polipeptydazy w surowicy, kontrolnych badań enzymatycznych u ludzi z otoczenia chorych na nagminne zapalenie wątroby, chromatograficznego oznaczania działania polipeptydazy surowiczej w ostrym i przewlekłym uszkodzeniu wątroby i w żółtaczce mechanicznej.

Członkowie delegacji z NRD przedstawili następujące doniesienia: N. H a s c h e n: „Enzymy proteolityczne w surowicy w schorzeniach wątroby"; R. S c h e u e r-K a r p i n, Ch. G o l k a: „Zmiany aktywności GOT, GPT, alkalicznej fosfatazy i esterazy cholinowej jako wskaźnik diagnostyczny w schorzeniach wątroby";

http://rcin.org.pl

H. Petzold: „Enzymy tkankowe w wątrobie przy ostrym zapaleniu wątroby i jego następstwach"; W. Teichmann: „Aktywność transaminaz w surowicy w nagminnym zapaleniu wątroby w zależności od wieku chorego"; R. Ziegenbein: „Izoenzymy przy przerzutach nowotworowych do wątroby".

V. Kulbanek, J. Kroupa, Z. Zazworka i J. Kamaryt (CSSR) zreferowali interesujące wyniki oznaczania aktywności OCT, oznaczania izoenzymów LDH, MDH i GOT, oraz zastosowania elektroforezy enzymów w biochemii klinicznej.

K. Schubarov z Bułgarii omówił oznaczanie enzymów w surowicy przy nagminnym zapaleniu wątroby, stanowiącym powikłanie w gruźlicy płuc, cukrzycy i chorobach krwi.

Z ośrodków krajowych przedstawiono szereg bardzo interesujących doniesień. Między innymi J. Krawczyński i współpracownicy (Warszawa) podali wyniki badań nad zmianą aktywności dezaminazy adenozyny w nagminnym zapaleniu wątroby oraz mówili o swych pracach związanych z diagnostyką enzymologiczną nagminnego zapalenia wątroby. H. Krawczyńska i E. Wałajtys (Warszawa) donieśli o wynikach badań nad aktywnością OCT w chorobie reumatycznej u dzieci. P. Boroń i A. Rudkowski (Białystok) zreferowali pracę nad różnicowaniem chorób żółciowych i trzustki na podstawie testów enzymatycznych ze szczególnym uwzględnieniem gammaglutamylo — transpeptydazy. S. Łukasik, E. Szczeklik, M. Orłowski i T. Świderski (Wrocław) mówili o swych pracach poświęconych metodyce oznaczania takich enzymów jak oksydaza benzydynowa, fruktokinaza wątrobowa, dehydrogenaza sorbitolu i dehydrogenaza kwasu jabłkowego.

Konferencja okrągłego stołu. W czasie Sympozjum odbyła się konferencja okrągłego stołu na temat „Testy enzymatyczne w diagnostyce schorzeń wątroby", którą prowadził prof. J. Krawczyński (Warszawa). Celem konferencji było zwrócenie uwagi na praktyczne wykorzystanie oznaczeń enzymatycznych przez klinicystów.

Pierwszy zabrał głos doc. J. Kokot (Katowice), który omówił teoretyczne podstawy enzymatycznych testów w schorzeniach wątroby, przypominając krótko o anatomii i fizjologii wątroby, o budowie komórki wątrobowej oraz topografii enzymów. Przypomniał o tym, że enzymy cytoplazmatyczne komórek zjawiają się we krwi już przy nieznacznym uszkodzeniu błon komórkowych, natomiast enzymy związane z organellami, jak siateczką endoplazmatyczną, rybosomami czy mitochondriami, pojawiają się w stanach ciężkiego uszkodzenia komórek miąższowych. Wzrost aktywności enzymów wskaźnikowych we krwi wskazuje na rozkład struktur komórki wątrobowej; wzrost aktywności enzymów wydalniczych krwi — na zamknięcie przewodów żółciowych; natomiast obniżenie aktywności enzymów wydzielniczych — na zaburzenia funkcji syntezy komórki wątrobowej. Doc. Kokot uważa, że próby czynnościowe wątroby powinny być zastąpione przez badania elektroforetyczne białek, natomiast test BSP poleca jako bardzo wartościowy.

Dr Tomaszewski i mgr Grajnert (Warszawa) omówili wiele ubocznych czynników wpływających na wynik oznaczania aktywności enzymów, np. czas trwania ucisku żyły, czas przechowywania surowicy, hemolizę, wpływ leków, dobór właściwej metody, warunki fizyczne i chemiczne reakcji, rozcieńczenia itp.

Prof. E. Wilkoszewski (Warszawa w swej wypowiedzi zwrócił uwagę na to, że u niemowląt i dzieci zdrowych aktywność enzymów wskaźnikowych jest większa niż u osób dorosłych. Fakt ten ma znaczenie, zwłaszcza w interpretowaniu wyników niewiele odbiegających od normy. Duże znaczenie diagnostyczne posiada oznaczanie aminotransferaz, ponieważ bardzo często schorzenia wątroby u dzieci przebiegają bezobjawowo.

http://rcin.org.pl

Prof. S. Kubicki (Warszawa) i doc. Z. Chojecki (Warszawa) wskazali na dużą użyteczność kliniczną badań enzymatycznych w rozpoznawaniu chorób wątroby. Prof. Kubicki uważa, że w odniesieniu do ostrego zapalenia wątroby aktywność aminotransferaz najlepiej ze wszystkich prób czynnościowych odzwierciedla dynamikę schorzenia i stan rozlanej martwicy wątroby i to niezależnie od etiologii. Aktywność aminotransferazy alaninowej przekracza przeważnie aktywność aminotransferazy asparaginianowej, a jedynie w przypadku nałożenia się ostrej infekcji wirusowej na przewlekłe uszkodzenie wątroby stosunek tych aktywności może być odwrotny. Doc. Chojecki podkreśla fakt, że testy enzymów takich jak aminotransferazy, fosfataza alkaliczna i aldolaza ułatwiają w dużym stopniu różnicowania żółtaczek, a zwłaszcza mechanicznej i miąższowej.

Prof. Krawczyński w zakończeniu podsumował stan obecny badań i przedstawił perspektywy najbliższej przyszłości. Stwierdził on mianowicie, że obecne tendencje tworzenia konstelacji testowych są słuszne, choć nie rokują bardziej wnikliwego wejrzenia w wydajność poszczególnych cykli metabolicznych. Obecne metody bezpośredniego badania cykli metabolicznych w materiale punkcyjnym z uwagi na skomplikowaną technikę ultramikroanalityczną są niedostępne dla pracowni rutynowych. Cel ten będzie można osiągnąć na drodze rozfrakcjonowania enzymów na swoiste dla poszczególnych narządów izoenzymy, których oznaczanie staje się już stopniowo postępowaniem rutynowym. Niewątpliwą przyszłość diagnostyczną przedstawiają próby z enzymami adaptacyjnymi, np. pirolazą tryptofanową, co może prowadzić do podjęcia enzymatycznych prób obciążeniowych. Również prace nad inhibitorami mogą dostarczyć wiele nowych możliwości diagnostycznych. Jednakże zdaniem prof. Krawczyńskiego nie należy w praktyce przeceniać znaczenia diagnostycznego wskaźników laboratoryjnych — ostateczne rozpoznanie powinno polegać na konfrontacji diagnostycznych badań laboratoryjnych z badaniami klinicznymi.

Oficjalnego zakończenia Sympozjum dokonał prof. Krawczyński wyrażając nadzieję, że zapoczątkuje ono ściślejsze kontakty przedstawicieli krajów socjalistycznych w zakresie diagnostyki laboratoryjnej. W czasie Sympozjum odbyło się też III posiedzenie Komitetu porozumiewawczego Towarzystw Diagnostyczno-Laboratoryjnych Krajów socjalistycznych. Organizacja Sympozjum była wzorowa i spotkała się z uznaniem wszystkich uczestników.

M. Trzaski, J. Woytowicz

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

KOMUNIKAT KOMISJI ANALITYCZNEJ KOMITETU NAUK CHEMICZNYCH POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Dnia 15 grudnia 1964 r. została powołana *Podkomisja Analizy Tłuszczów przy Komisji Analitycznej Komitetu Nauk Chemicznych Polskiej Akademii Nauk.*

Jedną z form działalności Podkomisji jest organizowanie konwersatoriów na których będą referowane i dyskutowane zagadnienia z dziedziny analizy tłuszczów. Pierwsze konwersatorium odbędzie się w dniach 24 i 25 września br.

Podkomisja zamierza nawiązać kontakt ze wszystkimi ośrodkami zajmującymi się analizą tłuszczów, w związku z czym prosi o przesyłanie swoich adresów do Przewodniczącej Podkomisji doc. dr Haliny G r y n b e r g Warszawa 86, ul. Rydygiera 8, Instytut Chemii Ogólnej.

Przewodniczący Komisji Analitycznej
Prof. dr W. Kemula

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

SPIS TREŚCI

S. Niemierko — Występowanie i własności esterazy acetylocholinowej . 247
J. Kwiatkowska — Procesy transkrypcji i translacji informacji genetycznej 267
Z. Wojciechowski — Fitochrom. 285
A. Z. Budzyński — Współczesne poglądy na czynnik stabilizujący fibrynę (FSF) 295
L. Pużyńska — Białka allosteryczne jako regulatory metabolizmu . . 307
J. Kączkowski — Budowa i własności glutenu pszennego 325
W. Ostrowski — Metody elektroforezy pasmowej w zastosowaniu do biochemii 341
Recenzja książki T. L. V. Ulbrichta *(D. Shugar)* 379
Badania nad ubichinonem i jego funkcją biologiczną *(L. Szarkowska)* . . 381
Badania nad specyficznością transaminaz *(L. Jaroszewicz)* 382
Badania porównawcze poziomu niektórych składników układu krzepnięcia i fibrynolizy w różnych odcinkach układu krążenia u psa *(K. Worowski)* 383
Międzynarodowe Sympozjum Chemii Klinicznej Poświęcone Diagnostyce Enzymologicznej Schorzeń Wątroby *(M. Trzaski, J. Woytowicz)* . . 385

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOCHEMII

August 1965

ARTICLES IN POLISH

Volume 11 **Number 3**

S. Niemierko — Distribution and Characteristics of Acetylcholin Esterase (Dep. Biochem., Inst. Expl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . 247
J. Kwiatkowska — The Transscription and Translation Processes of the Genetic Code (Dep. Physiol. Chem., School Med., Warszawa) . 267
Z. Wojciechowski — Phytochrome (Dep. Biochem., Univ., Warszawa) 285
A. Z. Budzyński — Modern Views on Fibrin Stabilizing Factor (FSF) (Inst. Nuclear Res., Warszawa) 295
L. Pużyńska — The Allosteric Proteins as Metabolism Regulators (Dep. Physiol. Chem., School Med., Warszawa) 307
J. Kączkowski — The Structure and Properties of Wheat Gluten (Dep. Biochem., Centr. College Agricult., Warszawa) 325
W. Ostrowski — The Zone Electrophoresis in Biochemistry (Dep. Physiol. Chem., School Med., Kraków) 341
Chronicle

http://rcin.org.pl

INFORMACJE I WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

1. *Postępy Biochemii* publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postępach Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach.

2. Prace należy przesyłać do Redakcji w 2 egzemplarzach maszynopisu i wszelkich załączników. Powinny one odpowiadać podanym dalej wskazówkom.

Nieodpowiednio przygotowane maszynopisy lub załączniki nie będą rozpatrywane przez Redakcję i będą odsyłane Autorom.

3. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie z podwójną interlinią, z marginesem około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej stronie, oraz z numeracją stron. W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek.

4. Na pierwszej stronie maszynopisu należy zamieścić tylko informacje w następującej kolejności: imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy (w języku polskim i angielskim), omówienie tematu pracy (w języku angielskim), stopnie i tytuły naukowe autorów wraz z nazwami placówek naukowych.

Imiona należy podawać w pełnym brzmieniu. Przy każdym nazwisku powinien znajdować się odsyłacz gwiazdkowy do notki, tj. *, ** itd. (bez nawiasu).

Omówienie tematu pracy może obejmować najwyżej 5 wierszy maszynopisu. Przekład na język angielski może być dokonany w redakcji i w tym przypadku należy pozostawić wolne miejsce w maszynopisie, zaś na oddzielnej kartce dołączyć polski tekst omówienia.

Na dole pierwszej strony maszynopisu należy zamieścić notki oznaczone odsyłaczami gwiazdkowymi (jak przy nazwiskach). Tekst notki powinien być podany następująco: * Dr, adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w ...

5. Właściwy tekst pracy rozpoczyna się od drugiej strony maszynopisu. W przypadku podziału tekstu na rozdziały i podrozdziały należy ich tytuły oznaczyć odpowiednio numeracją rzymską I., II. itd. oraz arabską 1., 2. itd. Tekstowe tytuły (tj. nie wydzielone z tekstu) nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków ani schematów. W tych przypadkach należy pozostawić wolny wiersz maszynopisu w żądanym miejscu i odpowiednio oznaczyć, Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1.

Ta sama wskazówka odnosi się do pojedynczych wzorów chemicznych i innych. Żądane miejsce w wolnym wierszu zaznacza się wówczas odpowiednim numerem w nawiasach, do którego należy odwołać się po odpowiednim słowie tekstu, np. kwas glutaminowy (I).

Odwoływanie się w tekście do notek wyjaśniających może być stosowane tylko w wyjątkowych przypadkach.

http://rcin.org.pl

6. Cytowaną literaturę należy wypisać oddzielnie na ostatniej stronie (stronach) maszynopisu, wymieniając pozycje w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopism, tom (podkreślony), stronica i rok wydania (w nawiasach), np. 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793 (1953). Należy wymienić nazwiska wszystkich współautorów w kolejności podanej w oryginalnej pracy.

Wykaz stosowanych skrótów czasopism podają *Post. Biochem.* 7 601 (1961).

Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora, tytuł dzieła, miejsce i rok wydania, np. Przyłęcki S. J., Podręcznik chemii fizjologicznej, Łódź 1947. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tom i nazwiska wydawców (redaktorów) dzieła po tytule oraz na końcu — stronice, np. Schneider W. C., Methods in Enzymology, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York 1957, str. 680.

Powoływanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej pozycji w nawiasach, np. (10).

7. Załączniki do pracy obejmują tablice, rysunki, schematy, wzory itp. Wszystkie powinny być oznaczone u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablice należy dołączyć na oddzielnych kartkach. Każda z nich powinna być oznaczona z prawej strony u góry kolejnym numerem arabskim, np. Tablica 1, oraz posiadać nagłówek opisujący jej treść, sens tablic powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu pracy, a każda rubryka — zaopatrzona w odpowiedni tytuł.

8. Wszelkie rysunki, wykresy i fotografie należy dołączyć do maszynopisu w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Wszystkie te załączniki należy oznaczyć jako rysunki i zaopatrzyć u dołu kolejnym numerem arabskim z podaniem właściwego ustawienia, np. Rys. 1 (dół).

Podpisy pod rysunki powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Po tytule należy podać odpowiednio objaśnienia lub uwagę (objaśnienia w tekście).

9. Schematy reakcji i pojedyncze wzory należy zamieścić na oddzielnej kartce (kartkach). Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, powinny być bardzo wyraźnie naniesione czarnym tuszem.

Schematy należy oznaczyć u dołu kolejnym numerem arabskim, np. Schemat 1, oraz właściwym podpisem (tytuł i objaśnienia).

Pojedyncze wzory powinny posiadać numery rzymskie zgodne z numeracją w tekście.

10. Redakcja zastrzega sobie możność dokonania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się Autorowi egzemplarz pracy dla dokonania poprawek; drugi — pozostaje w aktach redakcji.

11. Autora obowiązuje korekta autorska, którą należy zwracać redakcji w ciągu 3 dni. Korektę należy wykonać kolorowym (nie czerwonym) ołówkiem.

Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor.

12. Artykuły są honorowane według ustalonych stawek. Autorzy otrzymują 25 bezpłatnych odbitek pracy. Żądanie większej ilości odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie przy zwrocie korekty autorskiej.

http://rcin.org.pl