

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

**1973**

**tom 19**

**nr 2**

**KWARTALNIK**

PSTBAH 19(2)  
169-340 (1973)

<http://rcin.org.pl>

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

*Forma maszynopisu.* Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

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

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z POMOCĄ FINANSOWĄ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 3  
tom XIX  
zeszyt 2

KWARTALNIK  
PSTBAH 19(2) 169-340 (1973)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE  
<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

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

Komitet Redakcyjny  
Redaktor — Zofia Lassota  
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

### Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
Warszawa, ul. Freta 16

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1973

Nakład 2180 (2043+137)	Oddano do składania 3.II.1973 r.
Ark. wyd. 12,75, druk. 10,75	Podpisano do druku w maju 1973 r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono w czerwcu 1973 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 231/73 R-12

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA



ANDRZEJ KAHL \*

## Receptory hormonów sterydowych Receptors of Steroid Hormones

Properties of cytoplasmic and nuclear receptors of various steroid hormones are reviewed. The role of these receptors in the intracellular transport of steroid hormones and in regulation of gene expression in target cells is discussed.

Przyjmuje się, że działanie większości hormonów można wyjaśnić ich wpływem na ekspresję genów w odpowiednich komórkach. Wpływ ten może być realizowany dwoma sposobami:

1) bezpośrednio — gdy sam hormon wchodzi w fizyczno-chemiczny kontakt z chromatyną tkanek docelowych,

2) pośrednio — gdy miejscem działania hormonu jest zewnętrzna strona błony komórkowej, w której powstaje wówczas określony sygnał chemiczny przenoszony do wnętrza komórki. Takim sygnałem jest np. zmiana stężenia cAMP (54), co poprzez kilka etapów pośrednich doprowadza ostatecznie do zmian w chromatynie.

Wpływ pośredni wywierają przede wszystkim hormony o budowie peptydowej, natomiast hormony sterydowe działają bezpośrednio, co jest konsekwencją ich wnikania do wnętrza komórek docelowych. W procesie tym, a także w następnych etapach działania hormonów sterydowych — decydującą rolę odgrywają swoiste białka receptorowe.

Badania w tej dziedzinie stały się możliwe dzięki zastosowaniu hormonów sterydowych znakowanych trytem (36, 49). W doświadczeniach *in vivo* (wstrzykiwanie zwierzętom radioaktywnych hormonów) a także *in vitro* (inkubacja różnych tkanek z hormonami) ujawniły się znaczne różnice narządowe w wychwytywaniu i zatrzymywaniu hormonów. Różnice

---

\* Lek. med., mgr biochemii, doktorant Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda, Wrocław; Zakład Radiobiologii, Instytut Onkologii im. Curie-Skłodowskiej, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan, H — hormon sterydowy, R — receptor tego hormonu w tkankach docelowych, Rc — R wyizolowany z cytosolu komórek docelowych, Rn — R wyizolowany z jąder komórek docelowych, HR, HRc, HRn — kompleksy hormonów sterydowych z odpowiednimi receptorami, NH — niehistonowe białka chromatyny, DHT — dwuhydrotęstosteron, COL — hydrokortyzon (kortyzol), FSH — follikulostymulina (hormon dojrzewania pęcherzyków jajnika).

te można zinterpretować przyjmując, że w tkankach docelowych (ściślej — w hialoplazmie, czyli w cytosolu komórek docelowych) występują białka o znacznym powinowactwie do odpowiednich hormonów sterydowych. W ten sposób powstała hipoteza wewnątrzkomórkowych receptorów hormonalnych.

Białka o dużym powinowactwie do hormonów sterydowych występują także pozakomórkowo. W osoczu człowieka stwierdza się na przykład globuliny wiążące swoiście testosteron i estradiol (TeBG, SBP) (22,75), globulinę wiążącą kortykosterydy (CBG) (108); w osoczu ciężarnej świnki morskiej znajduje się białko wiążące progesteron (PBP) (77). Białka te są jednak różne od wewnątrzkomórkowych receptorów i mają na ogół nieco mniejsze powinowactwo do hormonów. Niejednokrotnie poważnie utrudniają one badania nad wewnątrzkomórkowymi receptorami (76), gdyż homogenaty tkanek docelowych dla hormonów sterydowych przyrządza się najczęściej bez uprzedniej perfuzji narządów. Obecność zatem białek osocza w mieszaninach inkubacyjnych stosowanych do badania wewnątrzkomórkowych receptorów poważnie obciąża większość wyników i jest jednym z podstawowych zastrzeżeń wobec naszych sądów o cytoplazmatycznych receptorach. Nie ma dotychczas dowodów na przechodzenie *in vivo* wspomnianych globulin osocza do wnętrza komórek docelowych dla odpowiednich hormonów sterydowych, ani receptorów cytoplazmatycznych — do krwi. Wewnątrz- i pozakomórkowe białka o dużym powinowactwie do hormonów sterydowych należą zatem — pod względem pochodzenia — do dwóch zupełnie odrębnych układów, rozdzielonych błoną komórkową. Rola białek osocza polega więc na przetransportowaniu hormonów sterydowych i przekazywaniu ich wewnątrzkomórkowym receptorom w cytosolu komórek docelowych. Dalszy transport — do chromatyny — odbywa się przy udziale receptorów wewnątrzkomórkowych.

## I. Własności wewnątrzkomórkowych receptorów

### 1. Własności fizykochemiczne

Hormony sterydowe (H) nie wiążą się kowalencyjnie ze swymi receptorami (R) (5). Oddziaływanie  $H + R \rightleftharpoons HR$  ma naturę adsorpcji drobnocząsteczkowego związku (H) przez swoiste i występujące w ograniczonej liczbie miejsca wiążące w drobinie wielkocząsteczkowego receptora. Proces ten prowadzi do wytwarzania wiązań hydrofobowych, które stabilizują kompleks HR. Przyłączony steryd powoduje zmianę konformacji swego receptora i właśnie to wyzwala dalsze etapy biologicznej aktywności hormonu (między innymi jego transport do jądra komórkowego). Zawsze jednak udaje się oddysocjować steryd w niezmienionej postaci z kompleksu HR metodą długotrwałej dializy, długotrwałego wytrząsania z nadmiarem



innego adsorbenta, metodą ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (denaturującymi zazwyczaj receptor) lub metodą wymiany z kompetycyjnymi inhibitorami tworzenia kompleksu (wypieranie znakowanego hormonu hormonem nieznakowanym, syntetycznym związkiem niesterydowym, o biologicznej aktywności badanego sterydu, lub antyhormonem\* (7, 41, 42, 104, 133).

Wszystkie badane dotąd receptory hormonów sterydowych są kwaśnymi białkami. Ich inaktywację połączoną z uwolnieniem związanych sterydów można uzyskać przez podgrzanie (98, 99) działanie detergentów, proteaz (5, 42, 98) oraz związków blokujących grupy -SH (100, 112), które jak się wydaje są niezbędne do utrzymywania biologicznej aktywności receptorów. Nukleazy nie niszczą kompleksów HR, ani wolnych receptorów (5, 42, 98, 99), co wskazuje na brak w ich cząsteczkach fragmentów polinukleotydowych. Nie ma dotychczas danych, czy inne, niebiałkowe komponenty (lipidy, węglowodany) wchodzi w skład cząsteczki receptorów. Wydaje się istotny udział niektórych jonów np.  $Zn^{++}$  w tworzeniu kompleksów HR (28).

Stałe sedymentacji  $R_c$  i  $HR_c$  w gradiencie sacharozy zależą wybitnie od siły jonowej. W nieobecności soli mają najczęściej wartości w granicach 7-9S; w 0,3M KCl są dwukrotnie mniejsze (około 4S). Odwracalna i zależna od siły jonowej zmiana  $8S \rightleftharpoons 4S$  (lub 5S) jest wspólną cechą wszystkich receptorów cytosolu, niezależną od gatunku zwierzęcia i hormonu sterydowego ( $R_c$  estradiolu) w macicy (29, 41, 42, 53, 63),  $R_c$  progesteronu w jajowodzie (5, 93, 96, 114) i w macicy (5, 141),  $R_c$  DHT w gruczole krokowym (5, 31, 33, 65),  $R_c$  COL w wątrobie i w tkance limfatycznej (5, 107). Takie zachowanie się receptorów wskazuje na ich podjednostkową budowę i możliwości asocjacji lub dysocjacji podjednostek. Na zjawiska te mają wpływ kationy dwuwartościowe (14). Ostatnie badania wskazują na nierównocенność podjednostek receptorów (31, 95). Podjednostkową budowę receptorów potwierdzają również spostrzeżenia, że w granicach stężeń KCl od 0,1M do 0,3M ujawnia się znaczny polimorfizm profilów sedymentacyjnych receptorów w gradiencie sacharozy (5). Ta okoliczność zadecydowała, że nie znamy dotąd rzeczywistego stopnia zasocjowania receptorów *in vivo*.

Z fizyko-chemicznego punktu widzenia receptor musi przejawiać dwie cechy w stosunku do hormonu; duże powinowactwo i małą pojemność wiązania (5, 41, 42). Miarą powinowactwa jest stała dysocjacji ( $K_d$ ) lub jej odwrotność — stała asocjacji ( $K_a$ ) kompleksu HR. Stałe te zależą w dużym stopniu od temperatury (maleją z jej wzrostem), siły jonowej i  $pH$ . Ze względu na labilność receptorów i obecność proteaz wspomniane stałe

---

\* nazwa może wprowadzać w błąd; w przypadku hormonów sterydowych jest stosowana dla związków syntetycznych znoszących działanie hormonu (nie dla przeciwciał).

oznacza się zwykle w temperaturze 4°C przy „fizjologicznych” wartościach dwóch pozostałych parametrów. Wszystkie poznane dotąd receptory cytoplazmatyczne mają w tych warunkach  $K_d$  w granicach  $10^{-9}$ — $10^{-11}$ M dla odpowiednich hormonów. Stałe te są przeto o kilka rzędów wielkości niższe od stałych Michaelisa, które wyrażają powinowactwo enzymów do substratów (4); to obrazuje, o ile większe jest powinowactwo receptora do hormonu, niż enzymu do substratu. Dzięki niskim stałym dysocjacji rozpad kompleksów HR *in vitro* zachodzi tak wolno, że można je wyizolować, gdy inne, nieswoiste kompleksy już się rozpadły. *In vivo* zaś dzięki wielkiemu powinowactwu receptory „wychwytyją” hormony obecne w bardzo niskich stężeniach ( $10^{-9}$ — $10^{-12}$ M), umożliwiając ich retencję w komórkach i powodując, że praktycznie cała pula hormonów sterydowych występuje w postaci skompleksowanej jako HR. To zaś zapewnia najbardziej oszczędną gospodarkę hormonami wewnątrz komórki.

Receptory w jądrach komórek docelowych mają prawdopodobnie jeszcze niższe stałe dysocjacji (5). Ten naturalny, wzrastający gradient powinowactwa osiąga szczyt w niektórych miejscach chromatyny, wyznacza drogę poruszania się hormonu sterydowego od osocza do jądra komórki docelowej i skraca czas potrzebny do jej przebycia.

Drugą wspomnianą cechą receptorów jest mała pojemność wiązania hormonów, co jest wynikiem obecności ściśle określonej i bardzo małej liczby miejsc wiążących hormon w cząsteczce receptora (zwykle od 1 do kilku) (5, 141). W doświadczeniach *in vitro* (inkubacja z różnymi stężeniami H) cecha ta warunkuje nasycenie układu hormonem, czyli występowanie *plateau* na wykresie zależności stężenia hormonu związanego w kompleksie (HR) od stężenia wolnego hormonu. Jeżeli w warunkach równowagi oznaczyć (5, 141):

[B] = stężenie związanego hormonu,

[U] = stężenie niezwiązanego hormonu,

[N] = całkowite stężenie miejsc wiążących we wszystkich cząsteczkach receptora,

[P] = stężenia białka,

$K_d$  = stała dysocjacji kompleksu HR,

$n$  = liczba miejsc wiążących hormon w 1 cząsteczce receptora, to:

$$[B] = \frac{[N] \cdot [U]}{K_d + [U]}$$

Jeżeli przyjmuje się, że w badanym układzie nie ma innych białek poza receptorem, to można napisać:  $[N] = n \cdot [P]$  oraz

$$[B] = \frac{n \cdot [P] \cdot [U]}{K_d + [U]}$$

Wzór ten wiąże dwa podstawowe parametry oddziaływania w układzie hormon—receptor: stałą dysocjacji (miarę powinowactwa) i liczbę miejsc



wiązących (miarę pojemności). Wyraża on równocześnie funkcję  $[B] = f_{([U])}$ , która w tym przypadku ma kształt hiperboli. Prostoliniowość

uzyskuje się w wyniku następujących przekształceń:  $\frac{1}{[B]} = f_{\left(\frac{1}{[U]}\right)}$  (me-

toda Lineweavera - Burka) (4, 110) lub  $\frac{[B]}{[U]} = f_{([B])}$  (metoda

Scatcharda) (110). Metody te są powszechnie stosowane w celu graficznego wyznaczania  $K_d$  i liczby miejsc wiążących. Wartości  $[N]$  mierzone *in vitro* dla oczyszczonych układów o wysokim powinowactwie zależą od  $[P]$  (128); inne parametry doświadczenia pozostają bez wpływu, jak się można spodziewać z teoretycznego związku  $[N]$  z liczbą miejsc wiążących hormon w 1 cząsteczce receptora ( $n$ ). Nasylenie populacji receptorów w tkankach docelowych *in vivo* następuje zazwyczaj przy stężeniach hormonów nieco wyższych od stężeń fizjologicznych. Dzięki temu jest możliwe — w razie potrzeby — wprowadzenie dodatkowej ilości hormonów w jego biologicznej czynnej postaci (HR) do komórki docelowej. Zjawisko nasycenia populacji receptorów stanowi natomiast naturalne ograniczenie ilości aktywnego hormonu w komórce. Wprawdzie po podaniu zwierzęciu dużych dawek hormonów stwierdza się ich nienormalnie wysokie poziomy w cytosolu komórek docelowych, jednak te dodatkowe ilości hormonów są wówczas związane nieswoiście z niereceptorowymi białkami (41, 42). Kompleksy takie łatwo dysocjują i w ten sposób nadmiar hormonu może być szybko usunięty z komórek.

## 2. Własności biologiczne

Z biologicznego punktu widzenia na szczególną uwagę zasługuje sprawa swoistości receptorów, którą należy rozpatrywać w dwóch aspektach: tkankowym i hormonalnym. Tkankowa swoistość przejawia się występowaniem receptorów dla określonych hormonów sterydowych tylko w tkankach docelowych dla tych hormonów. Dzięki temu tkanki te mogą wychwytywać i zatrzymywać swoiste dla siebie hormony. Tak więc w narządach płciowych żeńskich występują receptory dla estradiolu i progesteronu, w męskich — dla dwuhydrotestosteronu. Dzięki temu narządy te mogą ulegać rozrostowi, przerostowi a także innym zmianom pod wpływem wspomnianych hormonów. Indukcje enzymatyczne pod wpływem glikokortykoidów w wątrobie, a także wybitny, kataboliczny wpływ wspomnianych hormonów na limfocyty są także uwarunkowane obecnością receptorów w tych tkankach. Tak więc tkankowa swoistość receptorów jest wyrazem przystosowania niektórych tkanek do reagowania na określone hormony. Zaobserwowanie znacznego wychwytywania estradiolu przez niektóre okolice podwzgórza (17, 56, 57), które nie jest narządem docelowym dla estrogenów, ma związek z udziałem podwzgórza w regu-

lacji wydzielania FSH przez przysadkę mózgową; wydzielanie to zaś jest kontrolowane przez poziom estrogenów we krwi (17, 57). Zatem występowanie receptorów estradiolu w podwzgórzu odzwierciedla wpływ tego hormonu na czynność podwzgórza.

Swoistość hormonalna — czyli swoistość interakcji konkretnego receptora z określonym hormonem — przejawia się w ten sposób, że o miejsca wiążące w cząsteczce receptora mogą konkurować tylko 3 grupy związków: właściwy hormon sterydowy, związki syntetyczne (niekoniecznie sterydy) o biologicznym działaniu tego hormonu i związki syntetyczne wybiórczo blokujące jego aktywność biologiczną (antyhormony). Ta swoistość interakcji hormon—receptor występuje zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (5, 41, 62)  $17\beta$ -estradiol związany z receptorem cytosolu macicy nie jest wypierany z połączenia przez COL, ani testosteron (41, 88, 135). Również  $17\alpha$ -estradiol nie wypiera z kompleksu HRc naturalnego,  $17\beta$ -izomeru, co sugeruje, że omawiana interakcja hormonu z receptorem jest stereoswoista (41, 135). Z preparatów syntetycznych tylko dwuetylostilbestrol (5, 41, 135) (niesterydowy związek o silnym działaniu estrogenowym) oraz antyestrogeny (*clomiphene*, *nafodizine*) (26, 51, 79, 132, 134) wykazują znaczne powinowactwo do receptorów estrogenowych. Podobny typ swoistości wykazują receptory androgenowe cytosolu prostaty, receptory glikokortykoidowe i inne.

Zwraca uwagę fakt, że sterydowa budowa nie jest warunkiem koniecznym, aby analog hormonu mógł swoicie reagować ze swoim receptorem. Jeżeli założyć że hormony sterydowe i ich niesterydowe analogi lub antyhormony mają powinowactwo do tych samych miejsc wiążących w receptorach, to trzeba przyjąć, że nie cała cząsteczka ligandu determinuje swoistość wiązania, lecz że ta determinanta jest zlokalizowana we fragmencie cząsteczki (dotąd nieznanym). Innym rozwiązaniem „paradoksu swoistości” jest przyjęcie poglądu, że wzór kreskowy związku chemicznego nie odzwierciedla tych rysów cząsteczki, które dla swoistych interakcji z receptorem są najbardziej istotne.

Wytwarzanie kompleksów HRc w cytosolu komórek docelowych jest najwcześniejszym etapem działania wszystkich hormonów sterydowych. *In vitro* proces ten nie zależy od temperatury w granicach  $0^{\circ}$ — $38^{\circ}\text{C}$  (5, 41, 42). Następnym, wspólnym dla wszystkich hormonów sterydowych etapem jest przeniesienie kompleksu HRc do jąder komórek docelowych (5, 41, 42, 52, 61, 69, 71, 124, 127). Po podaniu zwierzęciu znakowanego hormonu obserwuje się — po okresie szczytowego wyznakowania cytoplazmy komórek docelowych — stopniowe obniżanie się radioaktywności w cytosolu i równoczesny jej wzrost we frakcji jądrowej. Proces ten można odtworzyć *in vitro* inkubując najpierw cytosol komórek docelowych z hormonem (powstawanie kompleksu HRc), a następnie dodając frakcję jądrową tkanki docelowej. Przenoszenie kompleksu HRc do jąder jest w tych warunkach zależne od temperatury (t. optymalna  $30$ — $38^{\circ}\text{C}$ ) (5, 41, 42) i praw-



dopodobnie od związków bogatoenergetycznych. Integralność błon jądrowych nie jest koniecznym warunkiem transportu kompleksów HRC: inkubacja wyznakowanego hormonem cytosolu z chromatyną prowadzi również do wychwytywania hormonu (124), pod warunkiem, że chromatyne pochodzi z tkanek docelowych dla badanego hormonu (33, 85, 96, 124, 125). Wychwytywanie i retencja kompleksu HRC przez jądra komórkowe jest zatem procesem w równej mierze swoistym tkankowo, co wychwytywanie hormonu z osocza przez cytosol komórek docelowych; (o niektórych wątpliwościach wspomnę przy omawianiu receptorów estrogennych).

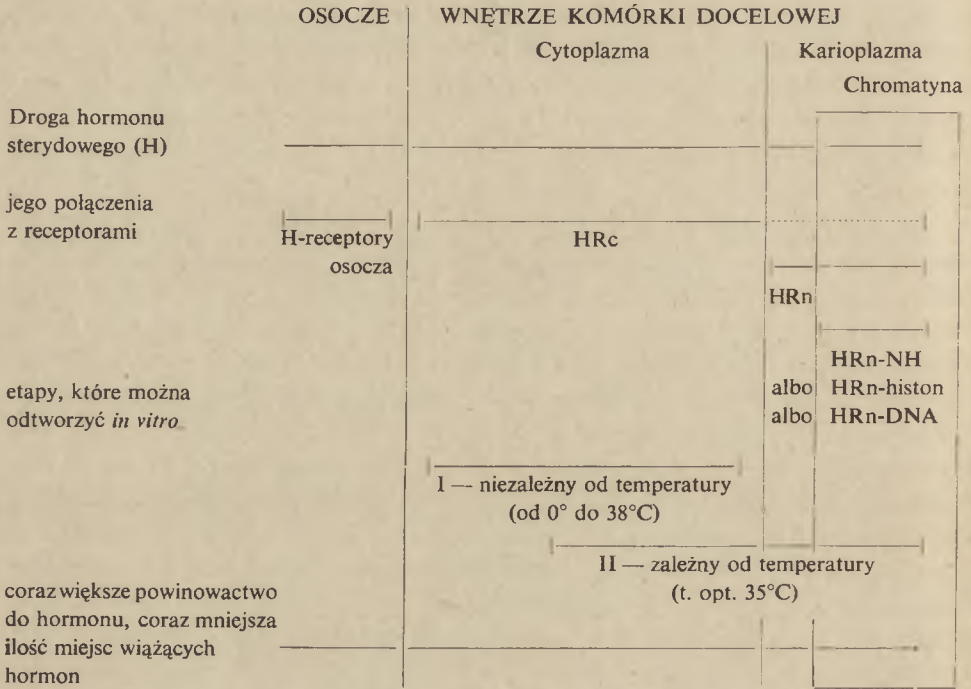
Z jąder komórkowych preinkubowanych z radioaktywnymi kompleksami HRC *in vitro* (lub *in vivo* — po podaniu zwierzętom radioaktywnych hormonów sterydowych) można wyekstrahować 0,4M roztworem KCl nowe połączenia hormonów z białkami — tzw. kompleksy jądrowe (HRn). Mają one zależnie od hormonu stałe sedymentacji 4-5S w gradiencie sacharozy (5, 41, 42). Konieczność stosowania wysokich sił jonowych wskazuje, że kompleksy te są mocno związane z chromatyną (24, 42, 60). Nie ma przekonujących dowodów w sprawie pochodzenia białkowej komponenty połączeń HRn. Zwykło się ją nazywać receptorem jądrowym (Rn), aczkolwiek białko to pochodzi prawdopodobnie z cytoplazmy i może być po prostu podjednostką receptora cytoplazmatycznego zdysocjowanego pod wpływem wysokiej siły jonowej. Pogląd ten potwierdzają spostrzeżenia, że kompleksy HRn (identycznie jak HRC) są odporne na RNazę i DNazę, a niszczone przez proteazy. O ile nie ma obecnie wątpliwości, że kompleks HRC odpowiada bodaj w przybliżeniu biologicznie aktywnej, wewnątrzkomórkowej postaci hormonu sterydowego, o tyle wyizolowany kompleks HRn jest prawdopodobnie artefaktem powstającym z powodu zastosowania нефизjologicznych warunków; (przy „fizjologicznych” siłach jonowych nie udaje się wyizolować połączeń HRn z jąder komórkowych).

## II. Przenoszenie hormonów sterydowych do miejsc wiążących w chromatynie

Droga przenoszenia hormonu sterydowego z krwi do chromatyny tkanek docelowych (schemat 1) obejmuje kilka etapów, z których dwa udało się odtworzyć *in vitro*, w homogenatach. Na szczególną uwagę zasługuje przekraczanie dwóch ważnych błon biologicznych: komórkowej (tu następuje zmiana receptora) i jądrowej (receptor prawdopodobnie nie ulega zmianie, lecz jedna z jego podjednostek jest razem z hormonem przenoszona do wnętrza jądra). Nie natrafiłem w dostępnym mi piśmiennictwie na pracę o mechanizmach międzyreceptorowego przekazywania hormonów sterydowych przez błony komórkowe.



Pierwszym, w pełni odtworzonym w układzie pozakomórkowym, etapem przenoszenia hormonów sterydowych jest powstawanie kompleksów HRc (inkubacja cytosolu tkanek docelowych z odpowiednimi hormona-



**Schemat 1.** Droga przenoszenia hormonu sterydowego z krwi do miejsc wiążących w chromatynie komórek docelowych. Oznaczenia: H — hormon sterydowy, Rc — receptor cytoplazmatyczny, Rn — receptor jądrowy, NH — niehistonowe chromatyny.

mi — etap niezależny od temperatury, niezupełnie identyczny z procesami *in vivo*, gdyż inkubuje się wolny hormon, a nie jego połączenia z receptorami osocza). Drugim etapem jest zależne od temperatury przenoszenie kompleksów HRc do jąder komórek docelowych (5, 41, 42, 52, 61, 69, 71, 124).

Nasze dotychczasowe wiadomości o interakcji przeniesionych kompleksów z chromatyną są niepełne. Wątpliwości nasuwają się już przy próbie zidentyfikowania tego składnika chromatyny, który przyłącza kompleksy HRc (lub HRn). Składnik ten powinien odpowiadać za tkankową swoistość wiązania HRn przez jądra komórkowe, a równocześnie musi mieć takie własności fizykochemiczne, aby wiązanie to było możliwe. Z pierwszego warunku wynika, że najlepszym kandydatem są kwaśne białka (niehistonowe) odpowiedzialne w myśl przyjmowanych obecnie poglądów za tkankowo swoistą restrykcję matrycowej aktywności chromatyny (97, 120). Białka te mogą równocześnie same powodować represję i znosić represję zależną od histonów (47, 97). Ponieważ jednak cytoplaz-

matyczne receptory hormonów sterydowych są same kwaśnymi białkami (122, 123), przeto bezpośrednie wiązanie ich ze wspomnianym kwaśnym składnikiem chromatyny jest mało prawdopodobne. Aby zatem pogodzić fizykochemiczne własności receptorów z tkankową swoistością miejsc wiążących w chromatynie, należałoby przyjąć, że pewna frakcja kwaśnych białek chromatyny — to właśnie cytoplazmatyczne receptory hormonów sterydowych (lub niektóre podjednostki tych receptorów). Pogląd ten wyraża m.in. O' Malley (122) opierając się na podobieństwie różnych cech fizykochemicznych Rc i Rn progesteronu w jajowodzie kurczęcia. Z poglądu tego wynika jednocześnie identyczność jądrowych receptorów z receptorami cytoplazmatycznymi (lub przynajmniej identyczność niektórych podjednostek Rc i Rn). Dotychczas brak jednak przekonujących dowodów, czy jest to ogólna reguła dla wszystkich hormonów sterydowych. Zastrzeżenie to nie umniejsza jednak atrakcyjności hipotezy, że niektóre kwaśne białka cytoplazmatyczne (Rc) zmienione swoicie pod wpływem hormonów wydzielanych przez inne tkanki biorą bezpośredni udział w regulacji aktywności genów w komórkach docelowych dla tych hormonów.

Drugim sposobem pogodzenia fizykochemicznych własności Rc z tkankową swoistością miejsc wiążących hormony w chromatynie jest przyjęcie, że powstają tu bardziej złożone kompleksy, np.: HRn-histon-białko niehistonowe-DNA (białka niehistonowe mogą się łączyć bezpośrednio z DNA) (47), w których pewna rola przypadłaby ponadto kationom dwuwartościowym. Takich połączeń dotychczas nie wyizolowano, lecz pośrednie dowody wskazują, że DNA i wspomniane jony biorą udział w wychwytywaniu kompleksów HRc przez chromatynę i w stabilizowaniu nowych połączeń.

Wiadomo na przykład, że DNaza w niskich siłach jonowych i w nieobecności  $Mg^{++}$  uwalnia z jąder komórkowych macicy kompleks  $17\beta$ -estradiol—Rn (46). Dodanie  $Mg^{++}$  lub  $Co^{++}$  do inkubatu zapobiega temu uwalnianiu (46, 88, 98). Kompleks  $17\beta$ -estradiol—Rn nie powstaje *in vitro*, jeżeli jądra komórkowe macicy preinkubować z DNazą (83). Nawet sam niezdenaturowany DNA ma zdolność tworzenia połączeń z kompleksami estradiol—Rc (84). Oczywiście nie można tu mówić o jakiegokolwiek tkankowej swoistości wiązania zresztą nawet natywny DNA. *E.coli* wiąże kompleks estradiol—Rc (84), co wskazuje, że wiązanie to nie zależy od obecności jakichś swoistych dla ssaków sekwencji nukleotydowych. Mimo tych wszystkich zastrzeżeń opisane zjawisko odzwierciedla jakiś fakt biologiczny *in vivo*, gdyż sam receptor Rc ma znacznie mniejsze powinowactwo do DNA w nieobecności hormonu, zachowanie dwuniciowej struktury DNA jest koniecznym warunkiem wspomnianej interakcji, a RNA nie ma zdolności łączenia się z kompleksem estradiol—Rc. Zjawiska te nie mają chyba nic wspólnego z łączeniem się wolnych hormonów sterydowych z DNA *in vitro* (118, 136). W takich interakcjach biorą udział wyłącznie



jednociowe DNA lub RNA (21, 37, 38) i nie przypuszcza się, że podobne procesy zachodzą *in vivo* (83).

Łączenie się hormonów sterydowych z chromatyną tkanek docelowych kryje zatem jeszcze wiele zagadek. Możliwe, że składniki chromatyny wiążące kompleksy HRn są różne w zależności od hormonów i nie ma jednolitego, wspólnego dla wszystkich hormonów sterydowych mechanizmu interakcji HRn z chromatyną. Należy także pamiętać, że nie ma dotąd bezpośrednich dowodów, czym właściwie są izolowane receptory jądrowe (Rn). Przytaczany pogląd, że stanowią one przegrupowane podjednostki receptorów cytoplazmatycznych (Rc) opiera się wyłącznie na dowodach pośrednich. Nie jest więc wykluczone, że w chromatynie odbywa się przekazywanie hormonów z kompleksu HRc na nowe białko. W ten sposób znikłaby wspomniana trudność w tłumaczeniu łączenia kompleksu estradiol—Rn z kwaśnymi białkami chromatyny.

Powinowactwo miejsc wiążących hormony sterydowe do tych hormonów wzrasta, gdy rozpatruje się poszczególne receptory w kierunku od osocza do chromatyny tkanek docelowych. Równocześnie obniża się ilość miejsc wiążących hormon. W chromatynie tkanek docelowych jest ona tak mała, że do ich wysycenia w jednym jądrze komórkowym wystarcza prawdopodobnie kilkanaście cząsteczek hormonu sterydowego (5). Jest to ilość porównywalna z ilościami cząsteczek induktora, lub korepresora, które muszą dotrzeć do wnętrza pojedynczej komórki bakteryjnej, aby wywołać w niej zmiany w szybkości transkrypcji odpowiednich odcinków genomu.

### III. Przegląd receptorów hormonów sterydowych

Badania nad poszczególnymi receptorami rozwijały się w różnych kierunkach, zależnie od rodzaju hormonu sterydowego. Kierunki te dotyczyły mechanizmów oddziaływania hormonów z chromatyną (R 17 $\beta$ -estradiolu i progesteronu), udziału receptorów w indukcjach enzymatycznych (R glikokortykoidów) i w syntezie białek stanowiących najwcześniejszą, swoistą odpowiedź komórki docelowej na hormon (R 17 $\beta$ -estradiolu), wpływu kinaz białkowych zależnych od cAMP na biologiczną aktywność receptorów (R 17 $\beta$ -estradiolu), roli receptorów w realizowaniu biochemicznych i morfologicznych cech fenotypu płciowego (R androgenów), a także zmian w występowaniu i własnościach receptorów w tkankach docelowych dotkniętych procesem nowotworowym (R 17 $\beta$ -estradiolu). Niezależnie od wymienionych różnic w podejściu do problemu biologicznej roli receptorów ostro zarysowuje się nierównomierne zaawansowanie naszej wiedzy o podstawowych, fizykochemicznych własnościach poszczególnych receptorów.

Niewątpliwie najlepiej poznano receptory estrogenów. Z tego powodu wspominałem je już kilkakrotnie w celu zilustrowania podstawowych



własności receptorów. W tym rozdziale poszczególne receptory będą rozpatrywane głównie z punktu widzenia wyżej wymienionych kierunków badań. Na zakończenie zaś wspomnę o ligandynie — zagadkowym białku wewnątrzkomórkowym, które aczkolwiek nie jest receptorem hormonów sterydowych w przyjętym tego słowa znaczeniu, to jednak ma duże powinowactwo do tych hormonów i z powodu powszechności występowania w różnych tkankach może znacznie utrudniać badania nad receptorami.

### 1. Receptory estradiolu

Trytowany  $17\beta$ -estradiol jest swoicie wychwytywany *in vivo* i *in vitro* przez macicę (5, 41, 42, 100, 135), pochwę (5, 41, 42), ciało żółte jajnika (64), przednią część podwzgórza (17, 56, 57, 58, 74), przedni płat przysadki mózgowej (55, 57, 74), przez normalny gruczoł mleczny (48) i niektóre jego raki (11, 12, 73, 78, 109). Z przytoczonego zestawienia wynika, że jeżeli rzeczywiście wewnątrzkomórkowe receptory odgrywają podstawową rolę w wychwytywaniu estradiolu, to są one obecne w tych tkankach, które ulegają charakterystycznym zmianom pod wpływem tego hormonu oraz w tych, które zawierają ośrodki sprzężeń zwrotnych regulujących wydzielanie gonadotropin i estrogenów.

Estradiol nie ulega zmianom chemicznym po związaniu go przez receptory cytoplazmatyczne (46, 50, 126); nie wiadomo, czy naturalne metabolity estradiolu — estron i estriol — reagują z jego receptorami, ani czy zmieniają ich powinowactwo do estradiolu. Polimorfizm cytoplazmatycznych miejsc wiążących ujawnia się w tkankach nowotworowych. W rakach gruczołu mlecznego podbudzanych do wzrostu przez estradiol występują receptory o dużym ( $K_d = 10^{-10}M$ ) i mniejszym ( $K_d = 10^{-7}M$ ) powinowactwie do estradiolu (30, 60, 73). W nowotworach, które utraciły zdolność do reagowania na ten hormon, znikają receptory o dużym powinowactwie (73). To spostrzeżenie może wskazywać na jeden z ogólnych mechanizmów utraty hormonozależności podczas progresji nowotworów.

Estradiol nie jest induktorem syntezy swego receptora cytoplazmatycznego w macicy dojrzewającej samicy szczura. Pojawienie się i nagromadzenie Rc następuje, zanim jajniki rozpoczną wydzielanie estrogenów (20)\*. Zatem rozwój macicy aż do osiągnięcia stanu pełnej reaktywności na estrogeny jest jej autonomiczną cechą.

---

\* Wiarygodność tego spostrzeżenia (zgodnego zresztą z intuicyjnym odczuciem niezależności rozwoju narządu od hormonu, na który narząd ten odpowiada dopiero wówczas, gdy osiągnie pełną dojrzałość) jest podważona przez fakt, że autorzy oznaczali Rc metodą adsorpcji kompleksu estradiol—Rc na sproszkowanym szkle. Metoda ta (19) neguje jakąkolwiek swoistość transportu kompleksów HRc *in vitro*, co jest sprzeczne z obecnie przyjmowanymi poglądami.

Pochłanianie estradiolu z cytoplazmy przez jądra komórek docelowych ma w świetle obecnych danych wszystkie cechy swoistości tkankowej (15, 46, 96, 124). Wprawdzie wcześniejsze prace sugerowały możliwość wybiórczej adsorpcji kompleksów estradiol—Rc przez jądra komórkowe tkanek niedocelowych *in vitro*, a nawet na sproszkowanym szkle lub aluminium (19). W ten sposób tkankowa swoistość transportu estradiolu do jąder komórek docelowych miałyby być wyznaczana wyłącznie przez receptory cytoplazmatyczne. W świetle obecnych danych pogląd ten nie daje się utrzymać i prawdopodobnie jest wynikiem jakichś błędów metodycznych w przeprowadzaniu doświadczeń.

Transport estradiolu z cytoplazmy do jąder komórek docelowych przebiega z rozpadem cytoplazmatycznego kompleksu 8S. Z jąder komórkowych (52, 53, 115) i chromatyny (115) macicy można wyizolować w 0,4M KCl połączenie estradiol—Rn o stałej sedymentacji 5S. Jest godne uwagi, że cytoplazmatyczny kompleks estradiol—Rc (8S) można w środowiskach o wysokiej sile jonowej rozłożyć na podjednostkę 5S wiążącą estradiol (29, 63) i podjednostkę 4S pozbawioną zdolności wiązania hormonu (53). Podczas inkubacji podjednostki 4S z cytosolem macicy udaje się ją przekształcić w podjednostkę 5S, która może wówczas przyłączać estradiol (13). Sugeruje to, że w skład podjednostki 5S wchodzi podjednostka 4S i jakieś dodatkowe białko, które warunkuje zdolność przyłączania estradiolu. Wyniki te przemawiają ponadto za pochodzeniem jądrowego receptora estradiolu z receptora cytoplazmatycznego.

Wychwytywanie cytoplazmatycznych połączeń estradiolu przez jądra komórkowe macicy jest *in vitro* zależne od temperatury i składa się z dwóch procesów — swoistego i nieswoistego (85). Pierwszy zależy od ciepłochwijnego, swoistego tkankowo czynnika i prowadzi do powstawania dwóch wspomnianych podjednostek (estradiol 5S i 4S). Preinkubacja jąder komórkowych w temperaturze 40—60°C eliminuje opisane zjawisko. Drugi proces jest tkankowo nieswoisty, niewrażliwy na temperaturę (adsorpcja kompleksu estradiol—Rc nawet wzrasta po uprzednim ogrzaniu mieszaniny inkubacyjnej do 60°C) i nie prowadzi do powstawania podjednostek 5S i 4S. Możliwe, że właśnie ta nieswoista adsorpcja połączeń estradiolu z receptorem cytoplazmatycznym na jądrach komórkowych doprowadziła do sformułowania wspomnianej, błędnej hipotezy o braku tkankowej swoistości transportu kompleksów estradiol—Rc.

Ostatnie badania wskazują, że prawie 1/3 część estradiolu pochłoniętego przez jądra komórkowe można wyizolować w postaci kompleksu 5S z jąderkami (3). Pojawienie się estradiolu w jąderkach zbiega się w czasie z wybitnym wzrostem aktywności jąderkowej polimerazy RNA (polimeraza A czyli I), co sugeruje, że enzym ten może być aktywowany *in situ* przez kompleks estradiol—Rn (3, 103). Wspomniana polimeraza jest niewrażliwa na  $\alpha$ -amanitynę i może działać *in vitro* w środowiskach o niskiej sile jonowej (w przeciwieństwie do polimerazy zlokalizowanej w nukleo-



plazmie tzw. polimerazy B czyli II) (18, 34, 102). Produkt polimerazy I — to głównie RNA typu rybosomalnego (102). Aktywacja tej polimerazy przez estradiol jest prawdopodobnie przyczyną znacznego wzrostu syntezy rRNA w macicy po podaniu estradiolu kastrowanym szczurom (10, 45). Wzrost syntezy rRNA w tkankach docelowych po podaniu odpowiednich hormonów sterydowych jest powszechnym zjawiskiem (129).

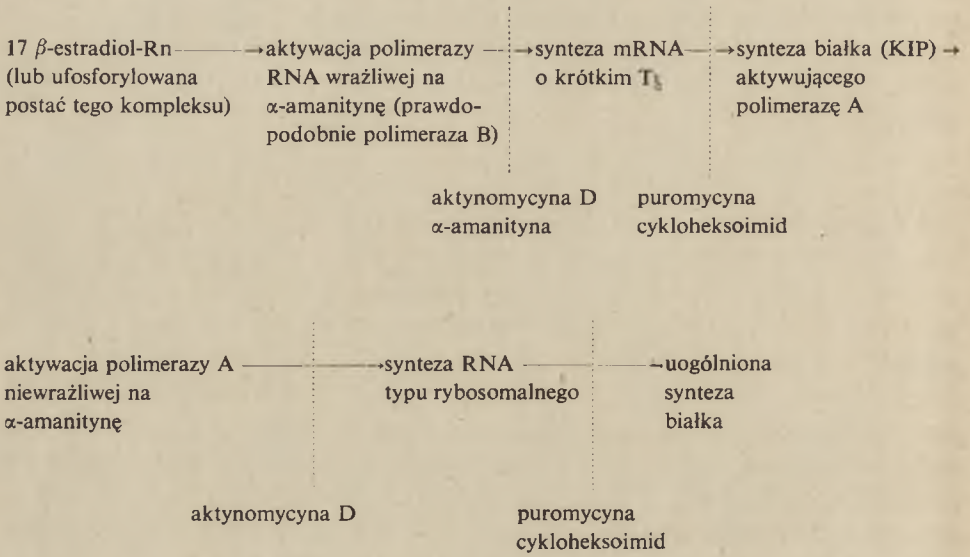
Koniecznym warunkiem zaktywowania jąderkowej polimerazy przez estradiol jest utrzymanie ciągłej syntezy RNA i białka, gdyż zarówno aktynomycyna D, jak puromycyna i cykloheksomid hamują zaktywowanie tej polimerazy *in vivo* i *in vitro* (40, 103). Wykorzystując 2 podstawowe różnice we własnościach polimerazy jąderkowej (A) i pozająderkowej (B), mianowicie różną wrażliwość na  $\alpha$ -amanitynę i różną zależność od siły jonowej środowiska, udało się *in vitro* ustalić, że synteza RNA niezbędna do zaktywowania polimerazy jąderkowej (A) przez estradiol jest wrażliwa na  $\alpha$ -amanitynę. Zaktywowanie to nie występuje również, jeżeli inkubację przeprowadza się w wysokich siłach jonowych (16, 102, 103). Z tego wynika, że białkowy czynnik aktywujący polimerazę jąderkową (A) jest syntetyzowany na informacyjnym RNA powstającym przy udziale innej polimerazy (prawdopodobnie polimeraza B) oraz, że czynnik ten nie działa w środowiskach o wysokiej sile jonowej. Owym czynnikiem może być jakiś szczególny składnik chromatyny lub polimerazy RNA, czynny tylko w odpowiedniej sile jonowej (6, 18). Z badań nad hamującym wpływem cykloheksomidu na aktywację polimerazy A w macicy wynika, że  $T_{1/2}$  opisanego czynnika białkowego jest rzędu 15 minut (76); podobny jest okres półtrwania mRNA, na którym ów czynnik powstaje (6).

Nowe światło na funkcjonowanie przedstawionego mechanizmu działania estradiolu w macicy rzucają badania nad wpływem kinaz białkowych zależnych od cAMP na aktywację polimeraz RNA (3). Kompleks estradiol—Rn (5S) po ufosforylowaniu *in vitro* przez wspomniane kinazy aktywuje znacznie silniej polimerazę A, w porównaniu z kompleksem nieufosforylowanym. Spostrzeżenie to zasługuje na szczególną uwagę, gdyż do chwili obecnej bardzo mało wiadomo o powiązaniach między hormonami sterydowymi i układami efektorowymi zależnymi od cAMP. W oparciu o przytoczone dane można zaproponować następującą kolejność wydarzeń wyzwalanych w macicy przez estradiol (schemat 2).

Wydaje się, że najbardziej istotnym momentem w przytoczonym schemacie jest pośrednictwo pewnych krótko żyjących białek w działaniu kompleksu estradiol—Rn. Ich pojawienie się wyprzedza uogólnioną syntezę RNA i białek pod wpływem estradiolu. Jeż we wcześniejszych pracach można doszukać się wzmianek o tych szczególnych białkach o bardzo krótkich  $T_{1/2}$  (23, 72, 89, 130, 131), jednak dopiero w ubiegłym roku wskazano ich miejsce wśród innych przemian zapoczątkowanych przez estradiol. Dla omawianych białek proponowano nazwy: *Key Intermediary Proteins* (KIP) lub *Induced Proteins* (IP). Nazwy te podkreślają kluczowe



znaczenie tych białek w działaniu estradiolu oraz fakt, że są one indukowane przez kompleks HRn (39, 87, 139). Krótki okres życia KIP i ich informacyjnych kwasów rybonukleinowych wskazuje, że działanie tych białek może być szybko włączane i wyłączane.



Schemat 2. Kolejność wydarzeń wyzwalanych w macicy przez estradiol; wskazano miejsca działania różnych inhibitorów.

## 2. Receptory progesteronu

Większość danych o receptorach tego hormonu dostarczyły prace O' Malleya i wsp. nad układem: progesteron (jajowód kurczęcia) (93, 94, 96, 121, 122, 125). Receptory progesteronu badano również w macicy owcy i szczura (76, 141). Badania nad Rc progesteronu w macicy są utrudnione z powodu obecności w tym narządzie wewnątrzkomórkowego białka podobnego do globuliny wiążącej kortykosterydy (CBG) osocza. Białko to ma duże powinowactwo do progesteronu, lecz jest nieidentyczne z jego Rc (76).

Cytoplazmatyczne receptory progesteronu wiążą *in vitro* również metabolit tego hormonu — 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dion (5). Połączenie progesteronu z jego receptorem o stałej sedymentacji 8S ma prawdopodobnie postać: Rc—progesteron—Rc (141). Wyizolowany Rc 8S z jajowodu kurczęcia jest kwaśnym białkiem, które łatwo dysocjuje na 2 podjednostki (A i B) o stałych sedymentacji około 4S (95, 112, 114). Udało się je rozdzielić na kolumnach z DEAE—celulozy i oczyścić kilkaset razy. Obie podjednostki mają identyczne miejsca wiążące progesteron (na podstawie badań kinetycznych), lecz różnią się stabilnością w środowiskach o niskich siłach jo-

nowych, zwłaszcza w nieobecności 1-tioglicerolu (bardziej trwała jest podjednostka B). Nie stwierdza się przemiany  $A \rightarrow B$  (112). Ostatnie badania wskazują, że zdolność wiązania się z chromatyną ma tylko podjednostka B (95).

Liczba miejsc wiążących progesteron w cytosolu jajowodu kurczęcia znacznie wzrasta po wstrzyknięciu dwuetylostilbestrolu (DES), zależy zatem od stopnia dojrzałości tego narządu (94). DES nie zmienia jednak kinetyki wiązania progesteronu przez „nowe” miejsca wiążące. Estrogeny zatem biorą udział w indukcji Rc progesteronu i w ten sposób wywołują w tkankach docelowych zdolność reagowania na progesteron.

Dla receptorów progesteronu zgromadzono największą ilość danych o identyczności Rc i Rn (96, 122). W chromatynie jajowodu kurczęcia stwierdzono obecność pewnej szczególnej frakcji kwaśnych białek (tzw. frakcja AP<sub>3</sub>), która zawiera miejsca wiążące dla progesteronu (95) i jest prawdopodobnie identyczna ze wspomnianą podjednostką B receptora cytoplazmatycznego, lub przynajmniej zawiera tę podjednostkę. Doświadczenia nad chromatyną wybiórczo pozbawioną niektórych składników, a także nad sztucznymi hybrydami chromatynowymi, w których poszczególne składniki pochodziły z różnych tkanek (95, 119, 125), wskazują, że przyłączenie radioaktywnego progesteronu jest możliwe tylko wtedy, gdy kwaśne białka pochodzą z chromatyny tkanek docelowych dla progesteronu. Chromatyna niezróżnicowanego jajowodu wiąże kompleks progesteron Rc znacznie silniej, niż chromatyna tkanek niedocelowych. Wynika stąd, że obecność w chromatynie miejsc wiążących wspomniany kompleks nie zależy od uzyskania przez jajowód dojrzałości pod wpływem estrogenów (95). Miejsca te pojawiają się we wcześniejszych etapach organogenezy jajowodu. Trudno zatem pogodzić ze sobą trzy następujące fakty: 1) zależność indukcji Rc progesteronu od estrogenów, 2) brak wpływu estrogenów na pojawianie się jądrowych miejsc wiążących progesteron i 3) identyczność Rc i Rn progesteronu. Występująca tu niezgodność sugeruje, że w skład wspomnianej frakcji AP<sub>3</sub> wchodzi — oprócz podjednostki B cytoplazmatycznego receptora progesteronu — jakieś inne, tkankowo swoiste białko, którego pojawienie się nie zależy od obecności estrogenów, lecz jest autonomiczną cechą jajowodu.

### 3. Receptory androgenów

Najlepiej poznano receptory androgenowe prostaty i pęcherzyków nasiennych szczura (31, 33, 66). Obecność tych receptorów stwierdzono również w bliższych kanalikach krętych nerki myszy (90, 92) (kanaliki te — pochodne przewodów Wolfa — są tkanką docelową dla androgenów). Wymienione narządy wychwytyują testosteron — główny pozakomórkowy androgen. W porównaniu z receptorami innych hormonów sterydowych



receptory androgenów odróżniają się wybitnym polimorfizmem profilów sedymentacyjnych (66) oraz tym, że bardzo słabo wiążą testosteron, a mają wielkie powinowactwo do jego wewnątrzkomórkowych metabolitów: 5 $\alpha$ -dwuhydrotestosteronu (DHT) i 5 $\alpha$ -androstandiolu (15, 31, 91). Metabolity te powstają w tkankach docelowych dla androgenów pod wpływem enzymów, które są różne od omawianych receptorów (70, 138). W nerce myszy 5 $\alpha$ -androstandiol jest biologicznie aktywną postacią androgenów w cytoplazmie, a DHT — w jądrach komórkowych (25, 91). W doświadczeniach *in vitro* DHT może jednak łączyć się zarówno z Rc, jak z Rn narządów docelowych.

Cytoplazmatyczne receptory androgenowe prostaty i pęcherzyków nasiennych mają stałe sedymentacji w granicach od 3S do 9S, zależnie od metody preparatyki. Rc prostaty udało się rozfrakcjonować na 2 podjednostki —  $\alpha$ (I) i  $\beta$ (II) o stałych sedymentacji 3—3,5S. Obie podjednostki łączą się z DHT, lecz hormonalna swoistość składnika  $\beta$  wobec DHT jest większa, niż składnika  $\alpha$  (31, 33, 65). Badając szereg hormonów, które coraz silniej konkurują z DHT o miejsca wiążące w podjednostce  $\beta$ , można zauważyć, że przyłączane mogą być tylko te sterydy, które mają szkielet 5 $\alpha$ -androstanu i związane z nim grupy: 3-ketonową i 17 $\beta$ -hydroksylową (66). Tylko podjednostka  $\beta$  przenosi DHT do chromatyny prostaty (31, 65). Kompleks DHT z podjednostką  $\alpha$  nie tylko nie wiąże się z chromatyną, ale nawet hamuje przyłączanie analogicznego kompleksu z podjednostką  $\beta$  (66). Możliwe, że opisane zjawisko odzwierciedla mechanizm regulacji wprowadzania kompleksów DHT—Rc do jąder komórkowych prostaty.

Jądrowy receptor androgenowy prostaty jest prawdopodobnie połączoną z chromatyną podjednostką  $\beta$  receptora cytoplazmatycznego. Ponieważ sama podjednostka  $\beta$  nie wiąże się z chromatyną, można przypuszczać, że działanie DHT sprowadza się do wywołania takich zmian konformacji podjednostki  $\beta$ , które umożliwiają to wiązanie. Ilość przeniesionych cząsteczek DHT do jednego jądra komórkowego prostaty jest rzędu 2000 w stanie nasycenia, z czego w regulacji aktywności matrycowej chromatyny uczestniczy ich prawdopodobnie jeszcze mniej (2, 31, 32).

Łączenie kompleksów DHT—podjednostka  $\beta$  ze składnikami chromatyny *in vitro* wymaga obecności białek niehistonowych i niezdenaturowanego DNA, lub innych polinukleotydów o zachowanej strukturze II-rzędowej (np. rRNA) (137). Wskazuje to, że zatrzymywanie kompleksów DHT—Rn przez jądra komórkowe jest zależne od wytwarzania kilkakrotnie już wspomnianych, wieloskładnikowych połączeń.

Szczęśliwy zbieg okoliczności sprawił, że do badania biologicznej roli receptorów androgenowych można zastosować zdobycze genetyki. Istnieje bowiem dobrze znane zaburzenie prawidłowego rozwoju fenotypu męskiego zwane zespołem femizującym jąder (Tfm syndrom). Zespół ten — opisany u człowieka, u różnych zwierząt laboratoryjnych, m.in. u myszy — charakteryzuje się obecnością w jamie brzusznej jąder o prawie niezmie-



nionej czynności dokrewnej, żeńskim fenotypem zewnętrznym i męską płcią chromosomalną (XY). Zaslugą S. Ohno i wsp. (25, 39, 90, 134) jest spostrzeżenie, że u myszek z zespołem Tfm powinowactwo cytoplazmatycznych receptorów androgenowych w bliższych kanalikach krętych nerki do DHT jest wybitnie obniżone. W doświadczeniach *in vitro* nie udaje się uzyskać *plateau* wyznakowania cytosolu nerki, nawet gdy inkubuje się go z bardzo dużymi stężeniami trytowanego DHT. Mutacja Tfm (sprzężona z chromosomem X) powoduje zatem wytwarzanie zmienionych Rc androgenowych, co z kolei warunkuje niemożność transportu DHT do jąder komórkowych i w konsekwencji — niewrażliwość tkanek docelowych na androgeny.

W bliższych kanalikach krętych nerki normalnej myszy 5 $\alpha$ -androstandiol jest induktorem — na etapie translacji — 2 enzymów:  $\beta$ -glikuronidazy i dehydrogenazy alkoholowej (90). Indukcja ta polega na uwalnianiu informacyjnych RNA dla wymienionych enzymów spod wpływu białkowego represora cytoplazmatycznego. Te procesy są zaburzone u mutantów Tfm; jest to jednym z dowodów, że wspomniany represor translacji może być identyczny z jakąś podjednostką Rc androgenów. Działanie 5 $\alpha$ -androstandiolu polega zatem u normalnych zwierząt na wywołaniu takich zmian w cząsteczce swego receptora cytoplazmatycznego, że receptor ten traci powinowactwo do informacyjnych RNA wspomnianych enzymów i może być wychwytywany przez jądra komórkowe. Objawia się to odblokowaniem syntezy  $\beta$ -glikuronidazy i dehydrogenazy alkoholowej oraz zaktywowaniem jądrowej polimerazy RNA (90), co z kolei prowadzi do uogólnionej syntezy rRNA (i białka) i manifestuje się jako rozrost tkanki docelowej. U mutantów Tfm wszystkie te procesy są zablokowane na skutek utraty powinowactwa Rc do 5 $\alpha$ -androstandiolu.

#### 4. Receptory glikokortykoidów

Działanie kataboliczne odróżnia glikokortykoidy od hormonów sterydowych wymienianych w poprzednich podrozdziałach. Mimo tej różnicy w końcowym efekcie metabolicznym, pośrednictwo wewnątrzkomórkowych receptorów jest wspólnym elementem mechanizmu działania glikokortykoidów i innych hormonów sterydowych.

Niewiele jest prac nad izolowaniem, oczyszczaniem i charakterystyką receptorów glikokortykoidowych. Jedną z przyczyn jest wybitna nietrwałość tych receptorów (9, 111), co znacznie utrudnia ich preparatykę. Wiadomości o omawianych receptorach pochodzą głównie z analizy kinetyki działania glikokortykoidów w komórkach docelowych — przede wszystkim z analizy tych reakcji komórki, które są bezpośrednio sprzężone z działaniem kompleksów glikokortykoid—Rc. Ta odpowiedź komórki — to indukcje enzymatyczne (aminotransferaza tyrozynowa w hepatocytach)

(107), synteza glutaminowa w siatkówce (16) oraz zablokowanie fosforylacji glukozy w tkance limfatycznej (81, 82). Następnej grupy dowodów na udział receptorów w działaniu glikokortykoidów dostarcza analiza kinetyki pochłaniania tych hormonów przez tkanki docelowe.

Tak więc wiadomości o receptorach glikokortykoidowych pochodzą przede wszystkim z danych pośrednich i na tej podstawie można mówić o obecności tych receptorów w wątrobie i w różnych wątrobiakach (43, 107), w siatkówce (16), w limfocytach i tymocytach (9, 81, 82, 140), w leukocytach (116), w fibroblastach (44) oraz w tych liniach komórkowych chłoniaka, które reagują zmianami wstecznymi na kortyzol (8).

Wyizolowano Rc glikokortykoidowy z fibroblastów myszy. Jest on słabo kwaśnym białkiem o stałej sedymentacji 5,5S; jest prawdopodobnie lipoproteidem (44) wrażliwym na fosfolipazy A i C, nie wiadomo jednak czy komponenta lipidowa nie jest zanieczyszczeniem. Receptor ten tworzy kompleks z kortyzolem i acetonidem triamcinolonu. Ten syntetyczny glikokortykoid, podobnie jak deksametazon, ma znacznie większe powinowactwo do wszystkich receptorów glikokortykoidowych, niż kortyzol (COL). Z prac nad kinetyką indukcji aminotransferazy tyrozynowej pod wpływem różnych sterydów w hodowlach wątrobiaków *in vitro* (107) wynika, że receptory glikokortykoidowe są allosterycznymi białkami, które mogą występować w 2 postaciach — aktywnej i nieaktywnej, pozostających ze sobą w równowadze. Rola sterydów sprowadza się do przesuwania tej równowagi w kierunku tworzenia postaci aktywnej.

Najwcześniejszym efektem metabolicznym kortyzolu w tkance limfatycznej jest zahamowanie fosforylacji glukozy do glukozo-6-fosforanu (80, 81, 82). Zasluguje na uwagę spostrzeżenie, że wystąpienie tego zjawiska jest poprzedzone przez etap wrażliwy na aktynomycynę D, co wskazuje, że niezaburzona synteza RNA jest koniecznym warunkiem działania COL. Wprawdzie inne prace wskazują na obniżenie aktywności rozpuszczalnej polimerazy RNA w grasicy pod wpływem glikokortykoidów (81, 86), nie przeczy to jednak, że synteza jakiejś szczególnej frakcji RNA jest niezbędna do ujawnienia pierwszych efektów COL w tkance limfatycznej. Frakcja ta może być informacyjnym RNA dla wspomnianych poprzednio kluczowych białek (KIP). Rolę syntezy RNA w działaniu glikokortykoidów potwierdzają ponadto spostrzeżenia, że jąderkowa polimeraza RNA w wątrobie jest *in vitro* aktywowana przez COL (106). Udział etapu wrażliwego na aktynomycynę stwierdzono również przy badaniu działania aldosteronu na pęcherz moczowy ropuchy i nerkę szczura (27, 105, 113).

W cytosolu wątroby szczura stwierdza się obecność conajmniej czterech białek, które wiążą COL (117), a także inne, anionowe metabolity sterydów. Jedno z nich — tzw. *Corticosteroid Binder I* — jest identycznie z białkiem wiążącym kowalencyjnie związki rakotwórcze (59) (m.in. 3-metylocholanren, barwniki azowe). Białko to nazwano ligandyną. Aczkolwiek nie jest ono receptorem hormonów sterydowych w powszechnie przyjętym



znaczeniu, wspominam o nim przy omawianiu receptorów glikokortykoidowych, gdyż jest ono najlepiej scharakteryzowanym fizyko-chemicznie składnikiem cytosolu wątroby wiążącym COL. Ligandyna występuje w wątrobie, w nerce, w śluzówce jelit i prawdopodobnie również w innych tkankach (67). Jest zasadowym białkiem ( $pH_i = 9,3$ ), wiąże niekowalencyjnie kortyzol, metabolity estradiolu i inne związki anionowe (m.in. bilirubinę). Rola ligandyny polega więc na odtruwaniu komórek przez wychwytywanie i unieczynnianie produktów przemiany sterydów i związków rakotwórczych.

#### IV. Uwagi końcowe

Teoria wewnątrzkomórkowych receptorów hormonów sterydowych ukazuje wspólny mechanizm transportu i działania hormonów w komórkach docelowych. Transport ten odbywa się przy udziale swoistych, kwaśnych białek cytoplazmatycznych, przy czym ich obecność w komórce nie zależy od indukcyjnego wpływu hormonów sterydowych, lecz jest autonomiczną cechą komórki — wyrazem jej ewolucyjnego przystosowania do reagowania na określony hormon. Omawiana teoria ograniczyła rolę hormonów; sprowadziła ją do faktu, że hormon wywołuje taką zmianę w swoistym białku cytoplazmy, że białko to uzyskuje zdolność wchodzenia do wnętrza jądra komórkowego. Cały zatem mechanizm działania hormonów sterydowych (a ściślej mówiąc — działania ich receptorów) jest przygotowany przez komórkę docelową, a rola hormonu polega tylko na włączeniu tego mechanizmu przez jedną reakcję — zmianę konformacji R<sub>c</sub>.

Z chwilą przeniesienia kompleksu HR<sub>c</sub> do jądra komórkowego i zaktywowania jąderkowej polimerazy RNA kończy się bezpośredni udział hormonu sterydowego, a rozpoczyna się synteza krótko żyjących mRNA i KIP (etap wrażliwy na aktynomycynę D i  $\alpha$ -amanitynę). Jest godne uwagi, że etap ten jest również jednym z najwcześniejszych ogniw w przemianach wyzwalanych przez sterydy kataboliczne. O etapie tym wiadomo jednak bardzo mało.

Tak ujęty mechanizm działania hormonów sterydowych uderza swoją prostotą (90), podobnie jak mechanizm działania innych hormonów przez cAMP (54). Ta prostota zmniejsza ryzyko popełnienia błędu w odbieraniu i realizowaniu przez komórkę informacji dostarczanej przez hormon.

#### LITERATURA

1. Alberti K. G. M. M., Sharp G. W. G., *Biochim. Biophys. Acta* **192**, 335 (1969).
2. Anderson K. M., Liao S., *Nature* **219**, 277 (1968).



3. Arnaud M., Beziat Y., Borgna J. L., Guilleux J. C., Mousse-ron-Canet M., *Biochim. Biophys. Acta* **254**, 241 (1971).
4. Barman T. E., *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1969, tom 1, str. 7.
5. Baulieu E.-E., Alberga A., Jung J., Lebau M.-C., Mercier-Bodard Ch., Milgrom E., Raynaud J.-P., Raynaud-Jammet C., Rochefort H., Troung H., Robel P., *Rec. Progr. Horm. Res.* **27**, 351 (1971).
6. Baulieu E.-E., Alberga A., Raynaud-Jammet C., Wira C. R., *Nature, New Biology* **236**, 236 (1972).
7. Baulieu E.-E., Raynaud J.-P., *Europ. J. Biochem.* **13**, 293 (1970).
8. Baxter J. D., Harris A. W., Tomkins G. M., Cohn M., *Science* **171**, 3967 (1971).
9. Bell P. A., Munck A., *Biochem. J.* **126**, 11P (1972).
10. Billing R. J., Barbiroli B., Smellie R. M. S., *Biochem. J.* **109**, 705 (1968).
11. Brauensberg H., Irvine W. P., James V. H. T., *Brit. J. Cancer* **21**, 714 (1967).
12. Brauensberg H., James V. H. T., *Brit. J. Cancer* **21**, 703 (1967).
13. Brecher J. P., Numata M., DeSombre E. R., Jensen E. V., *Fed. Am. Soc. Exptl. Biol.* **29**, 249 (1970).
14. Brecher P., Pasquina A., Woitz H. H., *Endocrinology* **85**, 612 (1969).
15. Brecher P., Vigersky R., Woitz H. S., Woitz H. H., *Steroids* **10**, 635 (1967).
16. Chader G. J., Reif-Lehrer L., *Biochim. Biophys. Acta* **264**, 186 (1972).
17. Chader G. J., Vilee C. A., *Biochem. J.* **118**, 93 (1970).
18. Chesterton C. J., Butterworth P. H. W., *FEBS Letters* **15**, 181 (1971).
19. Clark J. H., Gorski J., *Biochim. Biophys. Acta* **192**, 508 (1969).
20. Clark J. H., Gorski J., *Science* **169**, 76 (1970).
21. Cohen P., Kidson C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **63**, 468 (1969).
22. Corvol P. L., Chrambach A., Rodbar D., Bardin C. W., *J. Biol. Chem.* **246**, 3435 (1971).
23. DeAngelo A. B., Gorski J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **66**, 693 (1970).
24. DeSombre E. R., Hurst D., Kawashima T., Jungblut P. W., Jensen E. V., *Fed. Proc.* **26**, 536 (1967).
25. Dofuku R., Tettenborn U., Ohno S., *Nature, New Biology* **234**, 259 (1971).
26. Duncan G. W., Lyster S. C., Clark J. H., Lednicer D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **112**, 439 (1963).
27. Edelman J. S., Fimoguari G. C., *Rec. Progr. Horm. Res.* **24**, 1 (1968).
28. Emanuel M. B., Oakey R. E., *Nature* **223**, 66 (1969).
29. Erdos T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 338 (1968).
30. Erdos T., Best-Belpomme M., Bessada R., *Anal. Biochem.* **37**, 244 (1970).
31. Fang S., Anderson K. M., Liao S., *J. Biol. Chem.* **244**, 6584 (1969).
32. Fang S., Liao S., *Mol. Pharmacol.* **5**, 428 (1969).
33. Fang S., Liao S., *J. Biol. Chem.* **246**, 16 (1971).
34. Fiume L., Wieland Th., *FEBS Letters* **8**, 1 (1970).
35. Gehring U., Tomkins G. M., Ohno S., *Nature New Biology* **232**, 106 (1971).
36. Glasscock R. F., Hoekstra W. G., *Biochem. J.* **72**, 673 (1959).
37. Goldberg M., Atchley W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 17 (1964).

38. Goldberg M., Atchley W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **55**, 989 (1966).
39. Gorski J., DeAngelo A. B., Barnea A., *Excerpta Med. Int. Congr. Series* Nr 219, 426 (1970).
40. Gorski J., Noteboom W. D., Nicolette J. A., *J. Cell. Comp. Physiol.* **66**, (Suppl. 1), 91 (1965).
41. Gorski J., Shyamala G., Toft D. w *Fundamental Concepts in Drug — Receptor Interactions*, Academic Press Inc., New York 1970, str. 215.
42. Gorski J., Toft D., Shyamala G., Smith D., Notides A., *Rec. Progr. Horm. Res.* **24**, 45 (1968).
43. Granner D. K., Hayashi S., Thompson E. B., Tomkins G. M., *J. Mol. Biol.* **25**, 291 (1968).
44. Hackney J. F., Pratt W. B., *Biochemistry* **10**, 3002 (1971).
45. Hamilton T. H., Widnell C. C., Tata J. R., *J. Biol. Chem.* **243**, 408 (1968).
46. Harris G. S., *Nature, New Biology* **231**, 246 (1971).
47. Huang P. C., *Progr. in Biophys. and Mol. Biol.* **23**, 103 (1971).
48. Jensen E. V., DeSombre E. R., Jungblut P. W. w *Endogenous Factors Influencing Host — Tumor Balance*, red. Wissler R. W., Dao T. L., Wood S. (Jr.), Chicago University Press, Chicago 1967, str. 15.
49. Jensen E. V., Jacobson H. I. w *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer*, red. Pincus G., Vollmer E. P., Academic Press, New York, 1960, str. 161.
50. Jensen E. V., Jacobson H. I., *Rec. Progr. in Horm. Res.* **18**, 387 (1962).
51. Jensen E. V., Jacobson H. I., Flesher J. W., Saha N. N., Gupta G. M., Smith S., Colucci V., Shiplacoff D., Neumann H. G., DeSombre E. R., Jungblut P. W. w *Steroid Dynamics*, red. Nakao T., Pincus G., Tait J., Academic Press, New York, London 1966, str. 133.
52. Jensen E. V., Suzuki T., Kawashima T., Stumpf E. W., Jungblut P. W., DeSombre E. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **59**, 632 (1968).
53. Jensen E. V., Suzuki T., Numata M., Smith S., DeSombre E. R., *Steroids* **13**, 417 (1969).
54. Jost J.-P., Rickenberg H. V., *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 741 (1971).
55. Kahawanago I., Heinrichs W. L., Herrmann W. L., *Nature* **223**, 313 (1969).
56. Kato J., *Acta Endocrinol.* **63**, 577 (1970).
57. Kato J., *Acta Endocrinol.* **64**, 687 (1970).
58. Kato J., Villet C. A., *Endocrinology* **80**, 1133 (1967).
59. Ketterer B., *Biochem. J.* **126**, 3P (1972).
60. King R. J. B., Gordon J., Steggle A. W., *Biochem. J.* **114**, 649 (1969).
61. King R. J. B., Inman D. R., *J. Endocrinol.* **35**, XXVI (1966).
62. Korenman S. G., *J. Clin. Endocr. Metabol.* **28**, 127 (1968).
63. Korenman S. G., Ramnath R. B., Rao B. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **61**, 1028 (1968).
64. Lee Ch., Keyes P. L., Jacobson H. I., *Science* **173**, 1032 (1971).
65. Liao S., Fang S., *Vitamins and Hormones* **27**, 18 (1969).
66. Liao S., Tymoczko J. L., Liang T., Anderson K. M., Fang S., *Adv. Biosci.* **7**, 156 (1971).
67. Litwack G., Ketterer B., Arias I. M., *Nature* **234**, 466 (1971).
68. Ludens J. H., Fanestil D. D., *Biochim. Biophys. Acta* **244**, 360 (1971).
69. Mainwaring W. I. P., *J. Endocrinol.* **44**, 323 (1969).
70. Mainwaring W. I. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 192 (1970).
71. Maurer H. R., Chalkley G. R., *J. Mol. Biol.* **27**, 431 (1967).

72. Mayol R. F., Thayer S. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **66**, 693 (1970).
73. McGuire W. L., Julian J. A., *Cancer Res.* **31**, 1440 (1971).
74. McGuire W. L., Lisk R. D., *Fed. Proc.* **28**, 382 (701 Abstr.), (1969).
75. Mercier-Bodard C., Alfsen A., Baulieu E.-E., *Acta Endocrinol.* **64**, (Suppl. 147), 204 (1970).
76. Milgrom E., Baulieu E.-E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 723 (1970).
77. Milgrom E., Baulieu E.-E., *Endocrinology* **87**, 276 (1970).
78. Mobbs B. G., *Endocrinology* **36**, 409 (1966).
79. Mohla S., Prasad M. R. N., *Acta Endocrinol.* **62**, 489 (1969).
80. Mosher K. M., Young D. A., Munck A., *J. Biol. Chem.* **246**, 654 (1971).
81. Munck A., *J. Biol. Chem.* **243**, 1039 (1968).
82. Munck A., Brinck-Johnsen T., *Excerpta Med. Int. Congr. Series* **132**, 472 (1966).
83. Musliner T. A., Chader G. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 933 (1971).
84. Musliner T. A., Chader G. J., *Biochim. Biophys. Acta* **262**, 256 (1970).
85. Musliner T. A., Chader G. J., Villet C. A., *Biochemistry* **9**, 4448 (1970).
86. Nakagawa S., White A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 239 (1971).
87. Nicolette J. A., Mueller G. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**, 851 (1966).
88. Noteboom W. D., Gorski J., *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 559 (1965).
89. Notides A., Gorski J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **56**, 230 (1966).
90. Ohno S., *Nature* **234**, 134 (1971).
91. Ohno S., Dofuku R., Tettenborn U., *Clin. Genet.* **2**, 1 (1971).
92. Ohno S., Stenius C., Christian L., Harris C., Ively C., *Biochem. Genet.* **4**, 565 (1970).
93. O'Malley B. W., McGuire W. L., Kohler P. O., Korenman S. G., *Rec. Progr. Horm. Res.* **25**, 105 (1969).
94. O'Malley B. W., Sherman M. R., Toft D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **67**, 501 (1970).
95. O'Malley B. W., Spelsberg T. C., Schrader W. T., Chytil F., Steggle A. W., *Nature* **235**, 141 (1972).
96. O'Malley B. W., Toft D., Sherman M. R., *J. Biol. Chem.* **246**, 1117 (1971).
97. Paul J., XXV Symp. of the Soc. for Exptl. Biol., red. Davies D. D., Balls M., Cambridge University Press, str. 117, (1971).
98. Puca G. A., Bresciani F., *Nature* **218**, 967 (1968).
99. Puca G. A., Bresciani F., *Nature* **223**, 745 (1969).
100. Puca G. A., Bresciani F., Proc. IV. Meet. Internat. Study Group Steroid Hormones, North-Holland, Publishing company, Amsterdam, 1969.
101. Puca G. A., Bresciani F., *Nature* **225**, 1251 (1970).
102. Raynaud-Jammet C., Biéri F., Baulieu E.-E., *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 355 (1971).
103. Raynaud-Jammet C., Catelli M. G., Baulieu E.-E., *FEBS Letters* **22**, 93 (1972).
104. Rochefort H., Capony F., *FEBS Letters* **20**, 11 (1972).
105. Rousseau G., Crabbé J., *Eur. J. Biochem.* **25**, 550 (1972).
106. Sajdel E. M., Jacob S. T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 239 (1971).
107. Samuels H. H., Tomkins G. M., *J. Mol. Biol.* **52**, 57 (1970).
108. Sandberg A. A., Rosenthal H., Schneider W. R., Slaunwhite W. R. w Steroid Dynamics, red. Pincus G., Tait J. F., Nakao T., Aca-



- demic Press, New York, 1969, str. 1.
109. Sanders S., Attramadal A., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **74**, 169 (1968).
  110. Scatchard G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660 (1949).
  111. Schaumburg B. P., *Biochim. Biophys. Acta* **261**, 219 (1972).
  112. Schrader W. T., O'Malley B. W., *J. Biol. Chem.* **247**, 51 (1972).
  113. Sharp G. W. C., Komack C. L., *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 66 (1971).
  114. Sherman M. R., Corvol P. L., O'Malley B. W., *Biol. Chem.* **245**, 6085 (1970).
  115. Shyamala G., Gorski J., *J. Biol. Chem.* **244**, 1097 (1969).
  116. Simonson B., *Acta Endocrinol.* **67**, 634 (1971).
  117. Singer S., Litwack G., *Cancer Res.* **31**, 1364 (1971).
  118. Speichinger J. P., Barker K. L., *Steroids* **14**, 132 (1969).
  119. Spelsberg T. C., Hnilica L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **228**, 212 (1971).
  120. Spelsberg T. C., Hnilica L. S., Ansevin A. T., *Biochim. Biophys. Acta* **228**, 550 (1971).
  121. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W., *Biochim. Biophys. Acta* **254**, 129 (1971).
  122. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W., *J. Biol. Chem.* **246**, 4188 (1971).
  123. Steggles A. W., King R. J. B., *Biochem. J.* **118**, 695 (1970).
  124. Steggles A. W., Spelsberg T. C., Glasser S. R., O'Malley B. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1479 (1971).
  125. Steggles A. W., Spelsberg T. C., O'Malley B. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 20 (1971).
  126. Stone G. M., Baggett B., *Steroids* **5**, 809 (1965).
  127. Swaneck E. G., Chu L. L. H., Edelman J. S., *J. Biol. Chem.* **245**, 5382 (1970).
  128. Tait J. F., Burstein S., w The Hormones, red. Pincus G., Thimann K. V., Astwood E. B., Academic Press, New York, 1964, tom 5, str. 441.
  129. Tata J. R., *Nature* **219**, 331 (1968).
  130. Teng Ch.-S., Hamilton T. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **63**, 465 (1969).
  131. Teng Ch.-S., Hamilton T. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 1231 (1970).
  132. Terenius L., *Acta Endocrinol.* **64**, 47 (1970).
  133. Terenius L., *Acta Endocrinol.* **66**, 431 (1971).
  134. Tettenborn U., Dofuku R., Ohno S., *Nature, New Biology* **234**, 37 (1971).
  135. Toft D., Gorski J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1574 (1966).
  136. Ts'o P. O. P., Lu P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **51**, 17 (1964).
  137. Tymoczko J. L., Liao S., *Biochim. Biophys. Acta* **252**, 607 (1971).
  138. Unhjem O., *Acta Endocrinol.* **65**, 525 (1970).
  139. Wira C. R., Baulieu E.-E., *C. R. Acad. Sci. Paris* **273**, 218 (1971).
  140. Wira C. R., Munck A., *J. Biol. Chem.* **245**, 3430 (1970).
  141. Zimmering P. E., Kahn I., Lieberman S., *Biochemistry* **9**, 2498 (1970).



ANDRZEJ RABCZENKO \*

## Konformacja nukleozydów

### Conformation of Nucleosides

Waga problemu określenia konformacji biologicznie czynnych związków nie wymaga obszernych komentarzy. Bez szerokiej wiedzy o strukturze przestrzennej cząsteczek trudno rozwijać teorie, dotyczące funkcjonowania poszczególnych etapów biosyntezy — katalizy, asocjacji, tworzenia form przejściowych itp. Jednocześnie określenie, choćby w sposób przybliżony, konformacji związków mających znaczenie w funkcjonowaniu organizmów, jest niezwykle twórcze, jak można to obserwować na przykładzie hipotezy Cricka i Watsona o strukturze przestrzennej natywnego DNA. W każdym bądź razie, nie sięgając aż tak głęboko, do autorów wyróżnionych nagrodą Nobla, problemy oddziaływania enzym-substrat czekają na określenie konformacji zarówno enzymu jak i substratu.

Poniższy przegląd ma w swoim założeniu zebranie danych o metodach pozwalających na określenie konformacji oraz przedstawienie niektórych wyników eksperymentalnych wraz z ich interpretacją. Punkt ciężkości celowo przeniesiony jest na metodykę i potencjalne możliwości poszczególnych technik, ponieważ wyniki są jak dotychczas ilościowe, a wiele z nich interpretowanych jest w sposób spekulatywny, a częstokroć błędny. Niemniej jednak, prawdopodobnie w niedługim czasie przy ciągłym udoskonalaniu metod badawczych, ta dosyć chaotyczna dyskusja o strukturze przestrzennej zamieni się w konkretne wnioski.

Istnieje bardzo dużo metod, którymi można się posługiwać, żeby określić konformację, czy wzajemne ułożenie cząsteczek (na przykład tworzenie fotodimerów zasad pirymidynowych może w niektórych przypadkach być źródłem danych o wzajemnej ich orientacji) jednak podstawowymi użytecznymi technikami są: rentgenografia, magnetyczny rezonans jądrowy, badanie aktywności optycznej oraz metody chemii kwantowej.

---

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



## I. Nomenklatura

Opis konformacji nukleozydu, czy nukleotydu sprowadza się do określenia wzajemnego ustawienia wszystkich atomów składowych cząsteczki w przestrzeni. W tym celu wystarczy podać odległości międzyatomowe oraz kąty pomiędzy wiązaniami. Definicje i opis kątów konformacyjnych nukleozydów i nukleotydów określają rysunek 1 i tablica 1.

Oznaczenia i definicje kątów konformacyjnych w stereochemii pochodnych kwasów nukleinowych

A — kąt wokół wiązania...

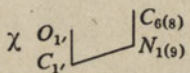
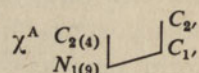
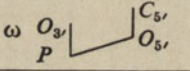
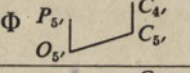
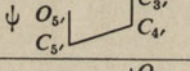
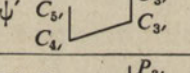
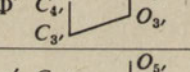
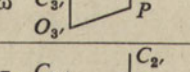
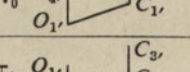
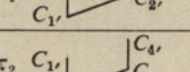
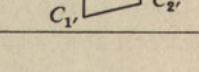
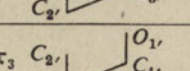
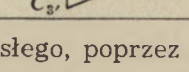
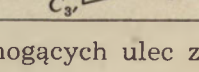
B — nomenklatura według Sundaralingama (144)

C — nomenklatura używana przez grupę Sasisekhara (78)

D — nomenklatura Arnotta (14) będąca w zgodzie z B

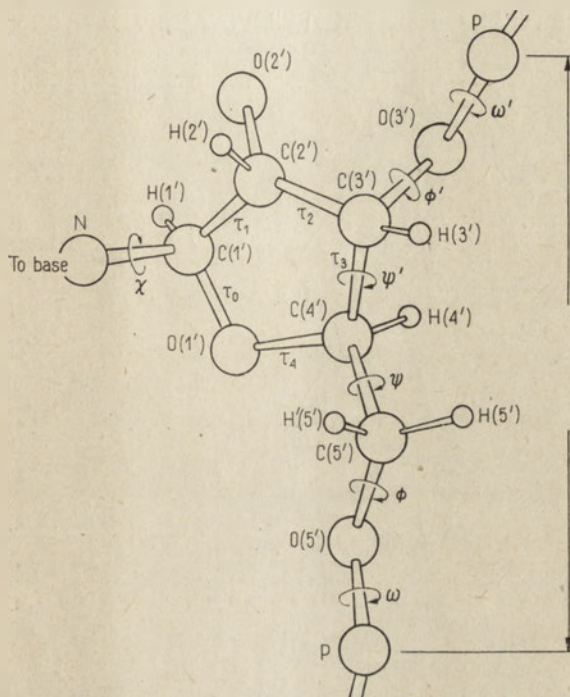
E — nomenklatura Arnotta (14) różniąca się niż w B

Oznaczenia w nawiasach dotyczą pochodnych purynowych

A	B	C	D	E
$C_1-N$	$\chi$ 	$\chi$		$\chi^A$ 
$P-O_{3'}$	$\omega$ 	$\psi$	$\psi$	
$O_{5'}-C_{5'}$	$\Phi$ 	$\theta^1$	$\theta$	
$C_{5'}-C_{4'}$	$\psi$ 	$\theta^2$	$\xi$	
$C_{4'}-C_{3'}$	$\psi'$ 		$\sigma$	
$C_{3'}-O_{3'}$	$\Phi'$ 	$\theta^3$	$\omega$	
$O_{3'}-P$	$\omega'$ 	$\Phi$	$\Phi$	
$O_{1'}-C_{1'}$	$\tau_0$ 			
$C_{1'}-C_{2'}$	$\tau_1$ 			$\sigma'''$ 
$C_{2'}-C_{3'}$	$\tau_2$ 		$\sigma''$	
$C_{3'}-C_{4'}$	$\tau_3$ 			$\sigma'$ 

Oprócz cpisu ścisłego, poprzez podanie wartości mogących ulec zmianie kątów, często stosuje się opis konformacji nukleozydów półilościowy — osobno określa się konformację cukru, osobno wzajemną orientację zasady i cukru. Istnieją dwie metody określania konformacji cukru:

pierwsza polega na wskazaniu atomu wychodzącego z płaszczyzny wytyczonej przez pozostałe atomy pierścienia furanozowego (Jardetzky — (62, 63)). W przypadku jeżeli ten atom leży po tej samej stronie płaszczyz-

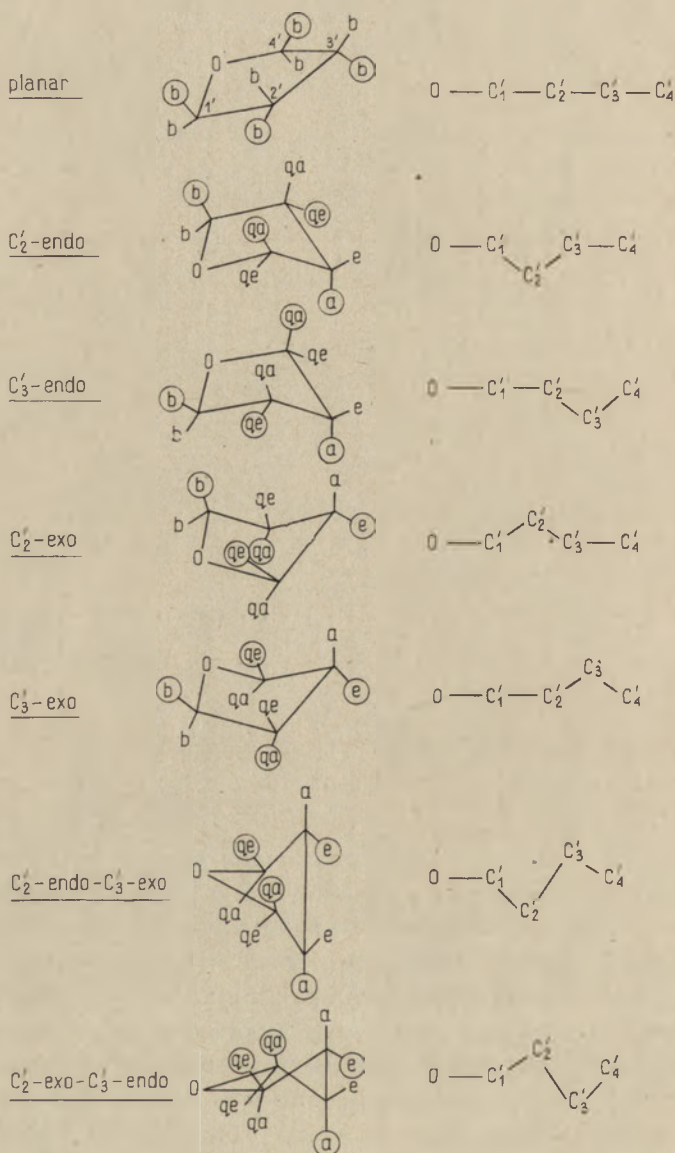


Rys. 1. Opis kątów konformacyjnych w rybozie według nomenklatury Sundaralingama (125).

ny co atom  $C5'$  dodajemy określenie *-endo*, gdy po przeciwnej — *-exo*. Na rysunku 2 przedstawione są pewne szczególne konformacje rybofuranozy. Przez *a*, *e*, *qa*, *qe*, i *b* oznaczone są odpowiednio typy wiązań: aksjalne, ekwatorialne, *quasi*aksjalne, *quasi*ekwatorialne i wiązanie leżące na dwusiecznej kąta między wiązaniem aksjalnym i ekwatorialnym (definicje pojęć według (39)), kółkami zaznaczone są protony; w tabelicy 2 podane są wartości kątów dwusiecznych pomiędzy poszczególnymi typami wiązań sąsiadujących ze sobą; w tabelicy 3 podane są wartości kątów dwusiecznych pomiędzy sąsiadującymi (wicynalnymi) protonami dla różnych konformacji pierścienia furanozowego w rybo i dezoksy nukleozydach.

Drugi sposób opisu konformacji cukru (Sundaralingam, Jensen (146)) zdefiniowany jest na rysunku 3 — wskazane jądro wychyliła się około  $0,5 \text{ \AA}$  z płaszczyzny wytyczonej przez jądra  $C1'$ ;  $O4'$ ;  $C4'$ ; jednocześnie pozostałe jądro wychyliła się na przeciwną stronę płaszczyzny o około  $0,1 \text{ \AA}$ . Oba opisy nie korelują ze sobą — na przykład „ $C2'$ -endo”

według tej drugiej nomenklatury nie ma swojego odpowiednika w zapisie według J a r d e t z k y (62), gdyż 2'-endo, 3'-exo oznacza, że wielkość wychylenia atomów węgla C2' i C3' z płaszczyzny wytyczonej przez C1',



**Rys. 2.** Opis konformacji pierścienia furanozowego rybozy i 2'-dezoksyrybozy według J a r d e t z k y (51).

O4', C4' jest podobna, podczas gdy „C2'-endo” według (146) mówi, jak już wspomniałem, o pięciokrotnie większym wychyleniu C2' niż C3'.



Tablica 2

Wartości kątów obliczone na podstawie modelu Dreydinga (63) dla możliwych kombinacji wiązań w pięcioczłonowym pierścieniu

	Kąt		Kąt		Kąt
<i>a-a</i>	180	<i>b-b (trans)</i>	120	<i>e-e</i>	60
<i>a-qa</i>	165	<i>b-b (cis)</i>	0	<i>e-a (trans)</i>	120
<i>a-qe</i>	45	<i>b-qa (trans)</i>	135	<i>e-a (cis)</i>	60
		<i>b-qa (cis)</i>	15	<i>e-qa</i>	45
		<i>b-qe (trans)</i>	150	<i>e-qe</i>	75
		<i>b-qe (cis)</i>	15		

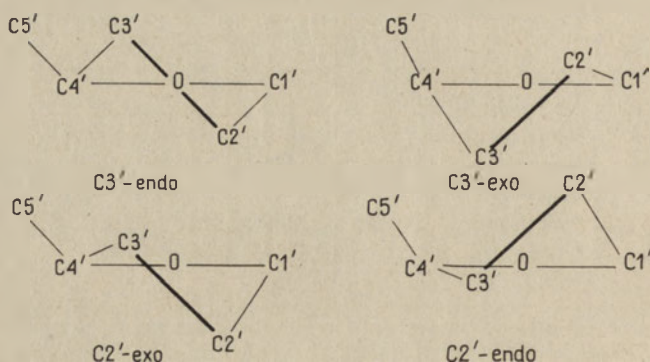
Tablica 3

Dwuścienne kąty dla różnych konformacji 2'-dezoksyrzybozy w nukleozydach (nazwy konformacji według rys. 3 (63, 136))

Konformacja	<i>H1'-2'</i>	<i>H1'-2''</i>	<i>H2'-3'</i>	<i>H2''-3'</i>	<i>H3'-4'</i>
Płaska	120		0		120
<i>1'-endo</i>	75	45	15	135	120
<i>1'-exo</i>	165	45	15	105	120
<i>2'-endo</i>	165	45	15	75	105
<i>2'-exo</i>	75	45	45	165	135
<i>3'-endo</i>	105	15	45	165	165
<i>3'-exo</i>	135	15	45	75	75
<i>4'-endo</i>	120	0	15	105	75
<i>4'-exo</i>	120	0	15	135	165
<i>0-endo</i>	135	15	0	120	135
<i>0-exo</i>	105	15	0	120	105
<i>1'-endo, 2'-exo</i>	60	60	45	165	135
<i>1'-exo, 2'-endo</i>	180	60	45	75	105
<i>1'-endo, 0-exo</i>	75	45	15	135	105
<i>1'-exo, 0-endo</i>	165	45	15	105	135
<i>2'-endo, 3'-exo</i>	165	45	60	60	75
<i>2'-exo, 3'-endo</i>	75	45	60	180	165
<i>3'-endo, 4'-exo</i>	105	15	45	165	180
<i>3'-exo, 4'-endo</i>	135	15	45	75	60
<i>4'-endo, 0-exo</i>	105	15	15	105	75
<i>4'-exo, 0-endo</i>	135	15	15	135	165

Wzajemna orientacja zasady azotowej i cukru opisana jest przez podanie wartości lub zakresu zmian kąta konformacyjnego na wiązaniu glikozydowym. Ogólnie mówimy, że konformacja nukleozydu jest *syn*, jeżeli grupa karbonylowa pirymidyny lub sześcioczłonowy pierścień puryny jest ponad pierścieniem cukru. Alternatywą jest konformacja *anti*. Zakładając określenie kąta glikozydowego  $\chi$  według Sundaralingama

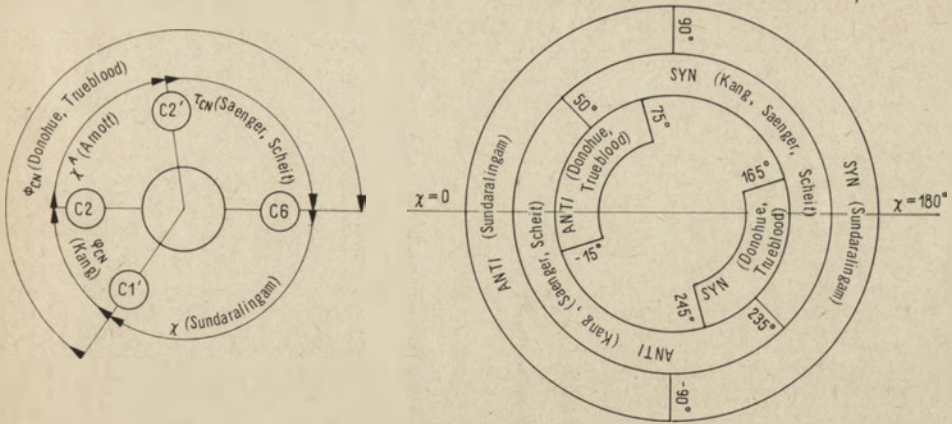
(144), to znaczy jako kąta między wiązaniami  $O4'$ ,  $C1'$ ,  $N1(9)$ ,  $C6(8)$  (w nawiasach dane dla puryn), spotykamy się w literaturze z następującymi definicjami określania *syn* i *anti*:



Rys. 3. Opis konformacji pierścienia furanozowego według Sundaralingama, Jensena (146).

- 1) Donohue, Trueblood (26) *anti* —  $-15$  —  $+75^\circ$ ; *syn* —  $-105$  —  $-195^\circ$  (kąta glikozydowy określony w tej pracy  $\Phi_{CN} = -\chi$ ).
- 2) Sundaralingam (144) *anti* —  $0$  —  $\pm 90^\circ$ ; *syn* —  $180$  —  $\pm 90^\circ$ . Sundaralingam oparł się na notacji Klyne i Preloga (69), przy czym zakres kątów dla *syn* według Klyne i Preloga odpowiada zakresowi *anti* u Sundaralingama.
- 3) Saenger i Scheit (119) proponują używanie kąta glikozydowego  $\tau_{CN}$  pomiędzy wiązaniami  $C2'$ ,  $C1'$ ,  $N1(9)$ ,  $C6(8)$  oraz zgodnie z (69) określenie *anti* dla zakresu kątów od  $0$  do  $-180^\circ$  natomiast dla *syn* od  $0$  do  $+180^\circ$ . Ta definicja pokrywa się z określeniem Donohue, Trueblood (26).
- 4) Kang (66) proponuje zakres dla *syn* (według definicji  $\chi_{CN}$  Sundaralingama (144)) od  $62$  do  $-180^\circ$  dla *anti* pozostały. Kang opiera się na teoretycznie obliczonych barierach potencjału, miałyby to być podział naturalny.
- 5) Arnott (3, 4) używa jeszcze innej definicji kąta glikozydowego  $\chi'_{CN}$  pomiędzy wiązaniami  $C2'$ ,  $C1'$ ,  $N1(9)$ ,  $C2(4)$ . W tej definicji kąta glikozydowy według Sundaralingama (144, 146) jest równy  $\chi_{CN} \approx \chi' - 63^\circ$ . Według tego autora określenie *syn* jest gdy kąt  $\chi'$  jest około  $300^\circ$  *anti* gdy około  $90^\circ$ .

Na rysunku 4 zestawione są poszczególne notacje i definicje *anti* oraz *syn*. W dalszej części pracy będę używał nomenklatury *syn* — *anti* Sundaralingama i wtedy przy opisie konformacji cukru będę pisał  $C3'$ -*exo*,  $C3'$ -*endo* i odpowiednio  $C2'$  (rysunek 3), natomiast jeżeli będzie opuszczone oznaczenie węgla —  $2'$ -*exo*,  $3'$ -*endo* itp., będzie to nomenklatura według Jardetzkoy (rysunek 2).



Rys. 4. Definicja kąta glikozydowego oraz definicja pojęcia *syn* i *anti* według różnych autorów.

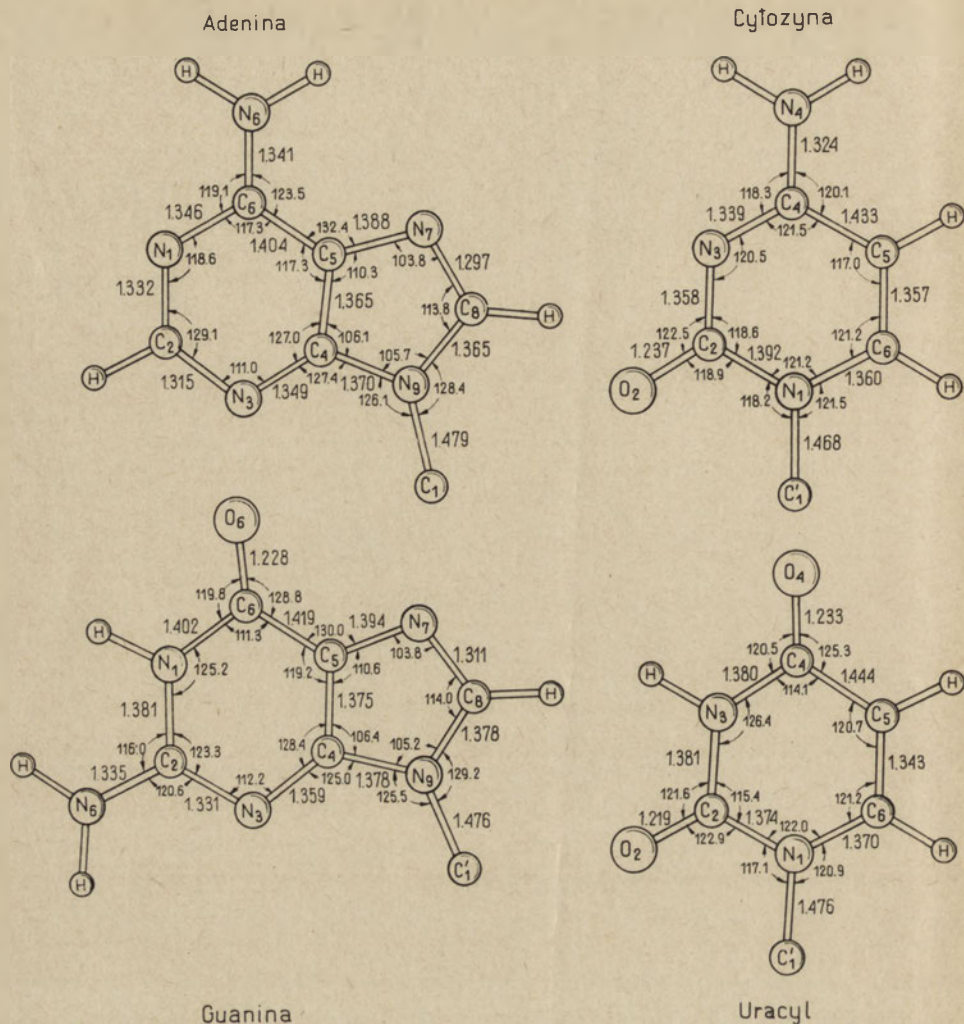
## II. Rentgenografia

W oparciu o wyniki metody obracanego kryształu (22, 149) otrzymujemy dane o gęstości elektronów w elementarnej komórce badanego kryształu. Na tej podstawie możemy określić położenia poszczególnych atomów, a tym samym konformację danej cząsteczki w kryształach. Przebadano strukturę krystalograficzną około 50 kryształów nukleozydów i nukleotydów. Liczba ta pozwala już na pewne uogólnienia. Przede wszystkim możemy podać z dużą dokładnością odległości między atomami oraz pewne kąty konformacyjne (rysunek 5).

Dokładność metody krystalograficznej może zilustrować porównanie oznaczeń tych samych związków przez niezależne grupy badaczy w różnych ośrodkach. Na przykład zbadano 2,4-dwutiourydyne.  $\text{H}_2\text{O}$  w Getyndze (NRF) (Saenger, Suck (120)) i w Madison (USA) (Lin, Sundaralingam (87)). Parametry sieci mierzone z dokładnością około 0,002 Å różniły się od siebie o około 0,01 Å, odległości między jądrami mierzone z dokładnością średnio 0,002 Å różniły się od siebie o 0,01–0,02 Å, kąty różniły się od siebie w granicach podanego błędu. Drugim przykładem może być badany rentgenograficznie kwas 5'-fosfo, 2'-dezoksycytydylowy (Viswamitra, Reddy, Lin, Sundaralingam (162)) przy czym dwóch pierwszych autorów było z ośrodka w Bangalor (Indie). Oznaczenia w Bangalor i Madison wykonywane były niezależnie i opublikowane wyniki również różniły się od siebie bardziej niż wynikałoby to z błędów pomiaru.

W tabelicy 4 zestawione są wartości kątów konformacyjnych przebadanych nukleozydów i nukleotydów. Dane zostały częściowo zaczerpnięte z przeglądowych artykułów (4, 144, 163). Na podstawie danych Sunda-

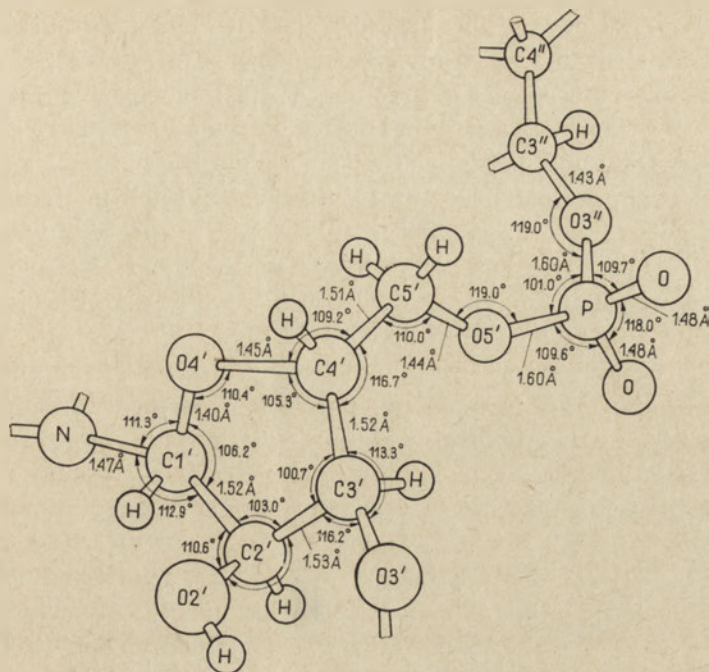




**Rys. 5. a.** Odległości między jądrami i kąty konformacyjne dla zasad azotowych. Wartości średnie na podstawie wielu pomiarów (141).

ralingam (144) i Arnott (3) usiłowali sformułować pewne ogólne reguły, dotyczące zależności między konfiguracją a konformacją. Stwierdzili oni, że nukleozydy i nukleotydy na ogół występują w ciele stałym w konformacji *anti*, oraz że najczęściej występującymi konformacjami pierścienia rybozy są *C2'-endo* i *C3'-endo*. Nie można jednak powiązać zmian konformacji z na przykład, zmianą podstawnika na węglu 2' — konformacja pierścienia furanozowego nie zależy w sposób widoczny od tego czy mamy do czynienia z rybozą czy 2'-dezoksyrybozą.

Z punktu widzenia biologii molekularnej metoda obracanego kryształu



Rys. 5.b. Odległości między jądrami i kąty płaskie dla rybozy według (4).

ma poważny mankament — jej wyników nie można w sposób prosty odnieść do cząsteczek w roztworach, gdyż konformacje w ciele stałym i roztworze mogą się zasadniczo różnić. Na przykład 4-tiourydyna w kryształach ma konformację *syn* (119), natomiast w wodnym roztworze *anti* (53, 134). Różnica w konformacji cząsteczek ma miejsce dlatego, że w kryształach o strukturze przestrzennej cząsteczki decyduje warunek minimum energii kryształu jako całości, natomiast w roztworze na konformację oprócz sił wewnątrzcząsteczkowych ma wpływ układ energetyczny — cząsteczka — rozpuszczalnik.

### III. Teoria

Badania rentgenograficzne dostarczają danych dotyczących odległości pomiędzy atomami składowymi cząsteczek w kryształach; przy przejściu cząsteczki z ciała stałego do roztworu jej konformacja może ulec zmianie, natomiast odległości międzyatomowe nie zmieniają się w mierzalny sposób.

Budując przestrzenny model cząsteczki, w którym każde jądro otoczone będzie sztywną kulą o promieniu Van der Waalsa właściwym dla danego

jądra otrzymamy pewną ilość informacji, które mogą wykluczyć niektóre przestrzenne struktury jako niedozwolone ze względów sterycznych. Na takiej zasadzie opierają się obliczenia Hashmeyera i Richa (47), Sasisekharana, Lakshminarayanana i Ramachandran (123) czy też Lakshminarayanana i Sasisekharana (77). Wyników tych prac nie będę tutaj cytować, gdyż ich użyteczność w porównaniu z bardziej zaawansowanymi pracami teoretycznymi jest niewielka. Otrzymane tą drogą dane nie odbiegają daleko od informacji uzyskanych z obserwacji modeli atomowych (Leybolda, Courtois czy Coreya - Paulinga - Koltuna (CPK)).

Dalszym krokiem teorii były numeryczne obliczenia energii potencjalnej poszczególnych konformacji w oparciu o wyjściowe funkcje opisujące wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania: niewiązające (Van der Waalsa), elektrostatyczne (kulombowskie) i torsyjne (związane z obrotem wokół wiązań) itp. Obliczenia takie zostały rozwinięte dla polipeptydów (przegląd: Scheraga (130), Ramachandran, Sasisekharan (108)). W dziedzinie kwasów nukleinowych — dużo bardziej skomplikowanych strukturalnie — badania takie podjęło zaledwie kilka ośrodków: Sasisekharana (78, 79, 112, 124), Wilson, Rahman (169), Coen, Kerckx (17).

Prace Lakshminarayanana i Sasisekharana (78, 79) opierały się na następujących założeniach dotyczących składowych energii potencjalnej cząsteczki:

### 1. Oddziaływanie niewiązające (Van der Waalsa)

Przybliżone są przez potencjał Lennarda-Jonesa:

$$V_{nb} = -Ar^{-6} + Br^{-12}$$

gdzie  $r$  jest odległością pomiędzy oddziałującymi atomami; wartość parametru  $A$  zależy od atomów oddziałujących;  $B$  zależy od  $A$  oraz od sumy promieni Van der Waalsa  $R$  oddziałującej pary. Używane przez Sasisekharana promienie Van der Waalsa  $R$  podane są w tablicy 5.

### 2. Oddziaływania elektrostatyczne

Rozpatruje się je w przybliżeniu monopolowym, umieszczając punktoładunki na atomach oddziałujących ze sobą. Matematyczny opis tych oddziaływań wyraża wzór Coulomba:

$$V_{es} = 332,0 e_1 e_2 / Dr$$



Zestawienie niektórych danych rentgenograficznych dla kryształów nukleozydów i nukleotydów

Związek	Klasy krystalograficzna	Konformacja rybozy	$\chi^A$	$\chi$	$\sigma'$	$\tau_3$	$\sigma''$ ( $\tau_3$ )	$\sigma'''$	$\tau_1$	$\tau_0$	$\Phi(0)$	$\psi(\xi)$	$\psi'(\sigma)$
1	2	3	4		5		6	7		8	9	10	11
reszta urydynowa w adenozyne 2',5'-fosforylowym kwasie (128)	P2 <sub>1</sub>	C3'-endo	71,6	4,9	203,1	324,5	38,2	92,1	331,5	6,9	169,9	59,9	83,8
kwas cyklo 3',5'-fosforydowy	P2 <sub>1</sub>	C3'-endo	119,0*	56,0									
sól trójetyloamonowa (18)	P2 <sub>1</sub>	C3'-endo	145,0*	72,0									
kwas 5'-fosforydowy sól barowa (129)	C222 <sub>1</sub>	C2'-endo	108,5	43,0	259,8	23,8	327,0	149,9	31,4	344,2	176,0	55,2	145,0
tymidyna (153, 175)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C3'-exo	102,7	39,0	273,0	33,0	323,0	147,2	28,0	-7		172,8	156,2
kwas 5'-fosfotymidowy sól wapniowa (155)	P2 <sub>1</sub>	C3'-endo 2'-endo	104,0	42,5	204,0	325,1	31,2	101,8	343,4	356,1	204,3	75,3	81,3
rybozo-tymina (56)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2			29,4									
dwuhydro-tymidyna (73)		C3'-exo		70,0									
3'-0-acetylo-4-tiotymidyna (121)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>		-63,7	139,0									
cytydyna (35)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C3'-endo	78,2	18,4	204,6	325,3	37,4	91,8	332,0	6,2	271,3	47,1	83,0
kwas 3'-fosfocytydowy (12)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo	98,2	39,3	266,0	27,9	322,5	151,6	34,6	342,4	189,2	45,2	151,2
kwas 3'-fosfocytydowy (145)	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C2'-endo	109,5	41,8	266,7	28,1	321,1	154,1	36,6	340,2	251,8	43,8	152,0
dezoksycytydyny HCl (55)		C3'-endo	0,0										
2-tiocytydyna.2H <sub>2</sub> O (88)	P1	3'-endo		20,3		-35,3	37,1		-26,8	4,9			
kwas 5'-fosfo-2'-dezoksycytydowy (162)		3'-exo		-5,9		32,6	-26,9	12,0	(11,7)	8,8			
				(-6,1)		(31,1)	(-25,)			(7,9)			
kwas cyklo 2',3'-fosfocytydowy (19)	P2 <sub>1</sub>	— płaska 4'-endo		253 242									
5-bromo-2'-dezoksycytydyna w kompleksie z dezoksyguanozyną (46)	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C2'-endo	123,0*	58,7		15,8	328		36,7	331,9	60,8	185,4	
urydyna (36)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo C3'-endo		16,8 23,8									
5-bromourydyna (57)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo	119,0*	56,0		318,9	38,2		338,7	356,2		51,9	146,7
5-bromo-2'-dezoksyurydyna (57)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo	106,0*	47,2		14,6	326,9		41,0	326,6		166,7	142,4
5-F-2'-dezoksyurydyna (41)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C2'-endo	130,5	59,0	270,4		318,7	153,9			230,2	291,8	154,3
5-J-2'-dezoksyurydyna (15)	P1	C2'-endo		63,3		18,7	326,9		38,1	332,1			146,6
5-Br-2'-dezoksyurydyna kompleks z adenozyzną (45)	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C3'-endo		20,0									
5-Br-urydyna kompleks z DMSO (58)		C2'-endo		63,0		331,0	40,0		323,1				
4-tiourydyna (119)	C2	C2'-endo		87,1	319,4		33,1	345,1		348,7		65,7	75,7
2,4-dwutiourydyna.H <sub>2</sub> O (87, 120)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	3C'-endo		18,0	-156,5	36,8	36,9	94,7	-24,7	-1,9		41,3	155,7
				(19,5)									
2'-dezoksyurydyna (107)	P2 <sub>1</sub>	2'-endo		28									
		2'-endo		24									
$\alpha$ -pseudourydyna.H <sub>2</sub> O (116)	P2 <sub>1</sub>	2'-exo		3,2									
5,6-dwuhydrourydyna (141)													
5-Br-spongourydyna (154)	P2 <sub>1</sub>			anti									
adenozyne w kompleksie z 5-Br-dezoksyurydyną (45)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C3'-endo	74,5	12,4	207,5	323,1	38,5	90,5	331,3	5,0		40,9	84,1
kwas 5'-fosfoadenylowy.H <sub>2</sub> O (75)	P2 <sub>1</sub>	C3'-endo	88,5	25,7	199,9	320,0	42,1	107,6	330,2	4,8	177,2	40,0	75,5
2'-dezoksyadenozyna.H <sub>2</sub> O (166)	P2 <sub>1</sub>	C3'-exo	65,3	10,9	270,8	33,6	325,6	142,0	23,9	257,8	193,2	186,9	156,4
											166,8		
kwas 3'-fosfoadenylowy.2H <sub>2</sub> O (143)	P2 <sub>1</sub>	C3'-endo		3,8	322,4		34,6		340,9	149,5	171,2	356,6	83,8
reszta adenylowa w adenozyne 2',5'-fosforylowym kwasie (128)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo		54,6		20,2	322,2		43,5	329,5		45,3	148,4
kwas cyklo 3',5'-fosfoadenylowy.H <sub>2</sub> O (165)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	4'-exo	50,0	258,0									
8-bromoadenozyna (157)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo		-120,0									
3'-0-acetylo-adenozyna (111)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C2'-endo		-135,0									
$\alpha$ -2'-amino-2'-dezoksyadenozyna.H <sub>2</sub> O (14)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C3'-exo		300,2									
jodek 5'-metyloamoniowy 5'-dezoksyadenozyny. H <sub>2</sub> O (117)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo C3'-exo		218,8		31,4	323,1		30,9	348,5		158,3	158,3
inozyna (14, 152)	P2 <sub>1</sub>	C2'-endo C2'-endo		121,1 49,0									
kwas 5'-fosfoinozylowy sól sodowa.7 H <sub>2</sub> O (110)	C222 <sub>1</sub>	C2'-endo		41,0									
kwas 5'-fosfoinozylowy sól dwusodowa (101)	C222 <sub>1</sub>	C2'-endo		43,0									
kwas 5'-fosfoinozylowy sól barowa (101)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C2'-endo		46,0									
		C2'-endo		34,0									
6-tioinozyna (127)		2'-endo		-135									
		2'-endo		-216									
guanozyna (14)	P2 <sub>1</sub>	2'-endo		122,5									
		2'-endo		46,6									
dezoksyguanozyna w kompleksie z 5-Br-2'-dezoksytydyną (46)	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	2'-endo		211,3		20,2	329		30,6	342,4			
8-bromoguanazyne (13, 147)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	2'-endo		-130									
formycyna.HBr (74)		2'-endo		211									

Tablica 5

Wartości sum promieni Van der Waalsa dla oddziaływujących ze sobą par atomów (według 79)  
(r — ryboza, b — zasada, a — amino)

Para	R (Å)
<i>C<sub>r</sub>...C<sub>r</sub></i>	3,40
<i>C<sub>r</sub>...N<sub>b</sub></i>	3,25
<i>C<sub>r</sub>...O<sub>r</sub></i>	3,22
<i>C<sub>r</sub>...P</i>	3,50
<i>C<sub>r</sub>...H</i>	2,90
<i>C<sub>r</sub>...C<sub>b</sub></i>	3,40
<i>C<sub>r</sub>...N<sub>a</sub></i>	3,25
<i>C<sub>r</sub>...O<sub>b</sub></i>	3,22
<i>N<sub>b</sub>...O<sub>r</sub></i>	3,07
<i>N<sub>b</sub>...P</i>	3,35
<i>N<sub>b</sub>...H</i>	2,75
<i>O<sub>r</sub>...O<sub>r</sub></i>	3,04
<i>O<sub>r</sub>...P</i>	3,32
<i>O<sub>r</sub>...H</i>	2,72
<i>O<sub>r</sub>...C<sub>b</sub></i>	3,22
<i>O<sub>r</sub>...N<sub>a</sub></i>	3,07
<i>O<sub>r</sub>...O<sub>b</sub></i>	3,04
<i>P ...P</i>	3,60
<i>P ...H</i>	3,00
<i>P ...C<sub>b</sub></i>	3,50
<i>P ...N<sub>a</sub></i>	3,35
<i>P ...O<sub>b</sub></i>	3,32
<i>H ...H</i>	2,80
<i>H ...C<sub>b</sub></i>	2,90
<i>H ...N<sub>a</sub></i>	2,75
<i>H ...O<sub>b</sub></i>	2,72

gdzie  $e_1$ ,  $e_2$  ładunki na oddziałujących atomach 1 i 2,  $r$  odległość pomiędzy nimi,  $D$  stała dielektryczna. Ładunki  $e_1$  i  $e_2$  określone są przez obliczony metodami chemii kwantowej rozkład gęstości elektronowej  $\sigma$  i  $\pi$ . Problemem jest wybór wielkości stałej dielektrycznej, która w zależności od autora waha się od 2 do 4 Brant i Flory przyjęli = 3,5 (11), Scott i Scheraga = 4,0 (125). W badaniach Sasisekhara na przyjęto  $D = 4,0$ .

### 3. Oddziaływania torsyjne

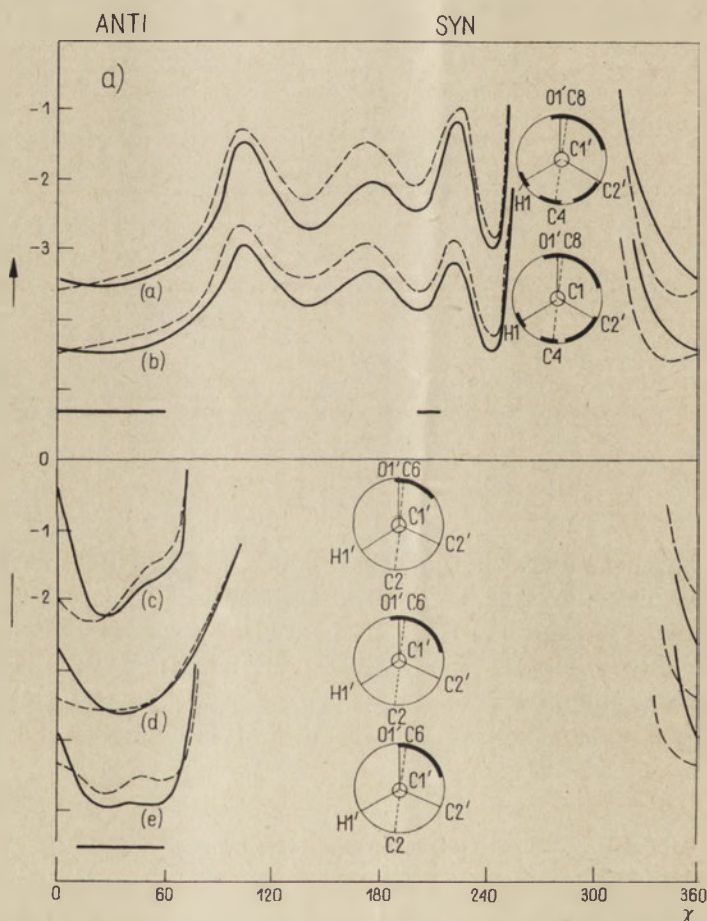
Obrót fragmentów cząsteczki wokół wiązań powoduje zmianę energii oddziaływania w wyniku zbliżenia lub oddalania podstawników. Przy obrocie wokół wiązania C—C energię tę opisuje wzór:

$$V_t = V_o/2(1 + \cos 3\Theta)$$

gdzie  $\Theta$  jest kątem konformacyjnym; dla nukleozydów mógłby to być kąt  $\Phi$ , czy  $\Psi$ ,  $\Phi'$  (tablica 1).

W prostych obliczeniach zakłada się, że  $V_0 = 0$ , zgodnie z L a k s h m i n a r a y a n a n a, S a s i s e k h a r a n (78, 79), którzy wykazali, że podstawowym członem energii danej konformacji są oddziaływania niewiążące.

Najbardziej dyskusyjną jest postać funkcji potencjału dla oddziaływań niewiążących (168) — C o e n i K e r c k x (17) przyjęli w obliczeniach potencjał Buckinghama postaci  $V_{nb} = A \exp(-Br) - C/r^6$  gdzie A, B, C są to stałe; stosowanie potencjału Lennarda-Jonesa zostało też skrytykowane przez L i f s o n a (86), który badając konformację cykloheksanu stwierdził, że najlepszym, dającym wyniki zgodne z eksperymentem jest potencjał kryształu  $A/r^9 + B/r^6$ . W każdym bądź razie, abstrahując od dyskusji nad kształtem funkcji potencjalnych oraz sensownością podobnych obliczeń, w wyniku zastosowania ich do konkretnych problemów otrzy-



**Rys. 6.** Zależność sumy energii potencjalnej pochodzącej z oddziaływań

a. Konformacja pierścienia furanozowego —  $C3'$ -*exo*.

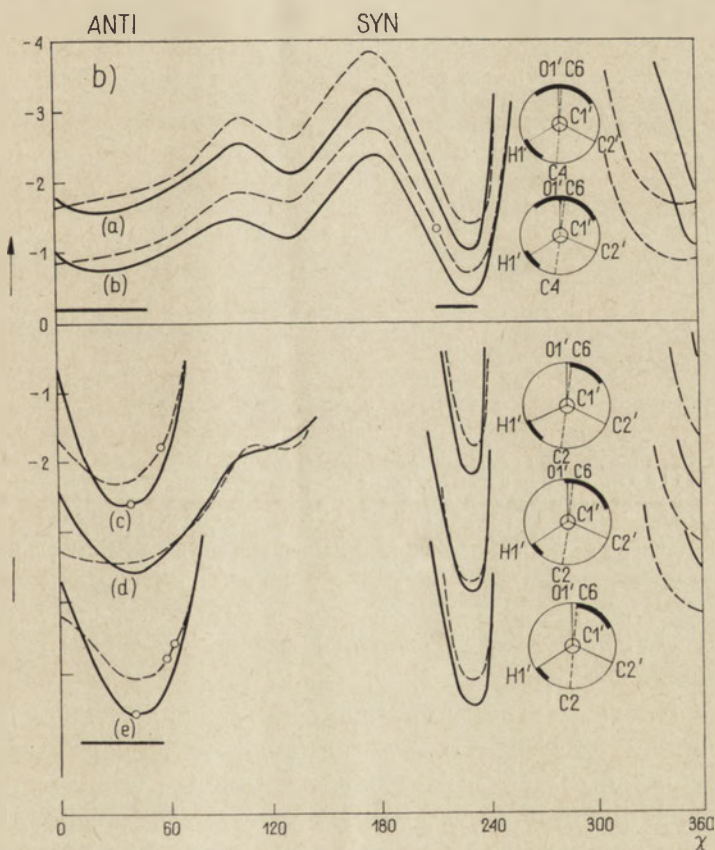
a) adenina, b) guanina, c) cytozyna, d) tymina, e) uracyl; linia ciągła — ryboza, przerywana — deozyryboza; d) i e) przesunięte są względem c) odpowiednio o jedną i dwie jednostki.



mano interesujące dane o energii konformacji pokazane przykładowo na rysunku 6 (patrz str. 206 i 207).

Ostatnio ukazały się prace Berthod, Pullman (6) i Kang (66), w których energia potencjalna nukleozydów została określona metodami chemii kwantowej. Nie zagłębiając się w założenia teoretyczne stosowanych obliczeń, na rysunku 7 przedstawiono porównawczo wyniki.

Jak widać z przedstawionych faktów do wyników teoretycznych należy podchodzić z rezerwą. W tym przypadku teoria spełnia jedynie rolę opisu matematycznego wyników doświadczeń — w zależności od stosowanego sposobu obliczeń otrzymujemy różną wysokość barier potencjalnych między konformacją *syn* a *anti* oraz różny kształt dołów potencjału. Trzeba jeszcze jedno podkreślić — obliczenia przeprowadzane są dla swobodnych cząsteczek w próżni, więc jeżeli nawet ściśle odpowiadałyby rzeczywistości, mielibyśmy tutaj problem podobny jak przy metodzie krystalo-



niewiązujących i elektrostatycznych od kąta glikozydowego;

**b.** Konformacja pierścienia furanozowego —  $C2'$ -endo.

wana — — — — 2'-dezoksyryboza. Krzywa b) przesunięta jest od a) o jedną jednostkę; krzywe



### 1. Konformacja pentozy

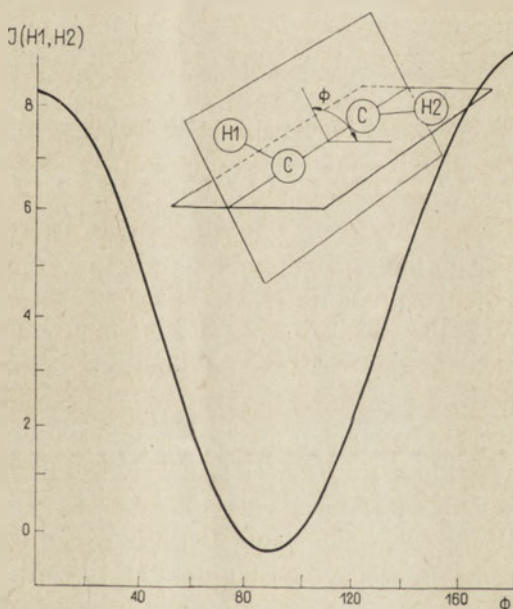
Nukleozydy wydają się być szczególnie dogodnymi cząsteczkami, dla analizy konformacji z pomocą PMR. Na rysunku 2 widzimy obwiedzione kółkami protony w pierścieniu rybozy. Znając zależność stałej sprzężenia od dwuściennego kąta pomiędzy wicynalnymi protonami, określając je otrzymujemy w sposób bezpośredni bezwzględną konformację rybozy w roztworze.

Pierwszą próbą określenia zależności między kątem dwuściennym a stałą sprzężenia była relacja K a r p l u s a (1959) (67) (rys. 8):

$$\begin{aligned} J/H_{1,H2} &= 8,5 \cos^2 \Phi - 0,28 && \text{dla kątów } 0 \leq \Phi \leq 90^\circ \\ &= 9,5 \cos^2 \Phi - 0,28 && \text{dla kątów } 90 \leq \Phi \leq 180^\circ \end{aligned}$$

albo inaczej  $J(H_1, H_2) = 4,22 - 0,5 \cos \Phi + 4,5 \cos^2 \Phi$

gdzie  $J$  — stała sprzężenia,  $H_1, H_2$  — wicynalne protony,  $\Phi$  — kąt dwuścienny.



Rys. 8. Zależność Karplusa łącząca kąt dwuścienny między wicynalnymi protonami  $H_1$  i  $H_2$  a eksperymentalną stałą sprzężenia.

Teoria K a r p l u s a opracowana na gruncie metod chemii kwantowej doczekała się natychmiast szeregu modyfikacji (1, 81, 84) korelujących ją z empirycznie określonymi kątami i stałymi sprzężenia w modelowych związkach (na przykład L e n z, H e s c h e n (81) pomnożyli prawą stronę równania przez 1,09). Według oceny H a l l a (40), ponieważ stwierdzono szereg odchyżeń od krzywej K a r p l u s a (np. 80, 167), teoria nie jest



na tyle dobra, żeby używać ją bez zastrzeżeń; zresztą sam Karplus (68) podkreśla przybliżony charakter swojego wzoru.

Sternhell (142) proponuje następującą procedurę:

1. Należy zbudować, korzystając z modeli Dreidinga, modele wszystkich możliwych konformacji i następnie pomierzyć odpowiednie dwusienne kąty.
2. Skonfrontować zmierzone kąty z otrzymanymi stałymi sprzężenia poprzez krzywe typu Karplusa:

$$J = J^0 \cos^2 \Phi - C \quad \text{dla } 0^\circ \leq \Phi \leq 90^\circ$$

$$J = J^{180} \cos^2 \Phi - C \quad \text{dla } 90^\circ \leq \Phi \leq 180^\circ$$

dla ekstremalnych wartości  $J^0$  i  $J^{180}$  rozważanej struktury. Przy nie więcej niż jednym silnie elektroujemnym podstawniku, te ekstremalne wartości mogą być  $J^0 = 8$  i  $J^{180} = 12$  oraz  $J^0 = 12$  i  $J^{180} = 16$  Hz ( $C \approx 0,3$ ). Na ogół tylko jeden zbiór „teoretycznych” stałych sprzężenia zgadza się z eksperymentem.

Powyższy schemat postępowania jest właściwy dla układów o jednej wyróżnionej konformacji, przy czym Sternhell uważa, że można go stosować dla cztero- i pięcio-członowych pierścieni z ostrożnością bowiem ocena kątów na podstawie modeli jest trudna.

W przypadku związków, które istnieją w kilku szybko w siebie przechodzących konformacjach — stałe sprzężenia są wartościami średnimi i ich wielkość zależy od rozkładu populacji konformerów.

Oprócz kłopotów związanych z przypisaniem znalezionych stałych sprzężenia odpowiednim konformacjom, trudności występują również przy eksperymentalnym ich oznaczaniu. Na rysunku 9 zaprezentowano przykładowo widmo PMR dla dezoksycytydyny (106). Struktura tego widma na pierwszy rzut oka wydaje się skomplikowana, jednak można ją jak widać rozwikłać drogą analizy pierwszego rzędu. Trzeba jednak podkreślić, że pokazane widmo pochodzi z przyrządu o częstości podstawowej 220 MHz, których znajduje się w świecie zaledwie kilkanaście, natomiast przy mniejszej częstości podstawowej (100, 60 MHz) struktura widma znacznie się komplikuje ze względu na mniejsze jego rozciągnięcie.

W widmach dezoksynukleozydów tryplet  $H1'$  początkowo (82) interpretowany tak jak na rysunku 11, w późniejszych pracach (62, 104, 113, 136) został zinterpretowany jako wynik silnego sprzężenia  $H1'$  z jednym z dwóch protonów  $H2'$  oraz słabego sprzężenia z pozostałym. Jeżeli istnieje mała różnica przesunięć chemicznych pomiędzy protonami  $H2'$  i  $H2''$  może powstać tak zwane sprzężenia wirtualne — zamiast oczekiwanego dubletu w widmie pojawia się tryplet. Jednak na podstawie widm 220 MHz (106) można dojść do wniosku, że dla dezoksyurydyny i dezoksycytydyny ten wypadek nie ma miejsca — już przy zastosowaniu analizy pierwszego rzędu można określić wszystkie stałe sprzężenia i przesunięcia chemiczne protonów.

W wyniku stosowania aparatów 220 MHz można bardziej precyzyjnie ustalić strukturę widma i określić stałe sprzężeń, jednak nie jest to równoznaczne z łatwością w określeniu konformacji. Tablica 6 i 7 zestawia otrzymane z widm PMR stałe sprzężenia dla różnych nukleozydów, ale tylko w nielicznych wypadkach można podać określoną na podstawie zależności typu Karplusa konformację pentozy z zastrzeżeniami, o których była mowa. Wydaje się, że można ją określić dla pochodnych 2',3'-0-izopropylideno (3'-endo, 2'-endo (106)). Dla innych pochodnych autorzy prac (9, 52) dochodzą do wniosku, że istnieje dosyć szeroka populacja równocennych konformacji.

Tablica 6

Wartości stałych sprzężenia dla wicynalnych protonów pierścienia rybofuranozowego w przebadanych rybonukleozydach

	$J(H1', H2')$	$J(H2', H3')$	$J(H3', H4')$
Urydyna (9, 105)	4,5 (4,4)	5,0 (5,3)	5,2 (5,5)
Rybozylotymina (105)	4,8	5,0	5,2
Cytydyna (105)	3,8	4,8	6,4
4-tio urydyna (53)	3,9	5,4	5,6
$\beta$ -pseudourydyna (52)	5,0	5,0	5,2
$\alpha$ -pseudourydyna (37)	3,3	4,2	7,9
Ortydyna (49)	3,6	6,3	7,0
rybozyd kwasu $\beta$ -cyjanuronowego (27)	3,9	6,4	6,6
2'-dezoksy 2'-fluorourydyna (23)	2,0	4,6	8,0
3'-dezoksy 3'-fluorourydyna (23)	4,0	2,0	2,0
2'-fosfo adenozyzna (63)	6,0	5,2	3,4
5'-fosfo adenozyzna (33, 122a)	5,3	4,8	3,8
2', 3', 5'-trój-0-metylourydyna (105)	3,5	5,4	5,6
2', 3', 5'-trój-0-metylocytydyna (105)	3,0	5,0	7,0
2', 3'-0-izopropylidenourydyna (105)	2,2	6,0	3,7
2', 3'-0-izopropylidenocytydyna (105)	2,3	6,6	4,0
2', 3', 5'-trój-0-etylocytydyna (105)	2,8	5,0	7,2
5, 6-dwuhydrourydyna (24a)	6,3	6,0	3,6
metylo- $\beta$ -D-rybofuranaza (w $CDCl_3$ ) (85)	0,8	4,9	6,3

Tablica 7

Wartości stałych sprzężenia dla wicynalnych protonów pierścienia furanozowego w przebadanych dezoksynukleozydach

	$J(H1', H2')$	$J(H1', H2'')$	$J(H3', H2')$	$J(H3', H2'')$	$J(H3', H4')$
2'-dezoksycytydyna (106)	6,4	6,8	4,8	6,8	3,6
2'-dezoksyurydyna (106)	6,4	6,8	4,0	6,8	3,6
Tymidyna (82, 106)	średnia 6,8	7,0	4,8	5,0	4,0
$\alpha$ -tymidyna (82)	3,8	7,2	4,0	7,0	
3'-fosfo, 2'-dezoksyadenozyna (32a)	8,1	6,0	6,3	2,9	

W chwili obecnej metoda PMR doskonale nadaje się do wykrywania zmian konformacji wskutek działania czynników zewnętrznych na podstawie wyznaczenia stałej sprzężenia  $J(H1', H2')$ . Stwierdzono tą drogą zmiany konformacji pentozy wskutek podwyższania temperatury (51), pod wpływem zwiększenia stężenia soli (104) lub zmiany  $pH$  (24), w wyniku oddziaływania z komplementarnymi zasadami (132).

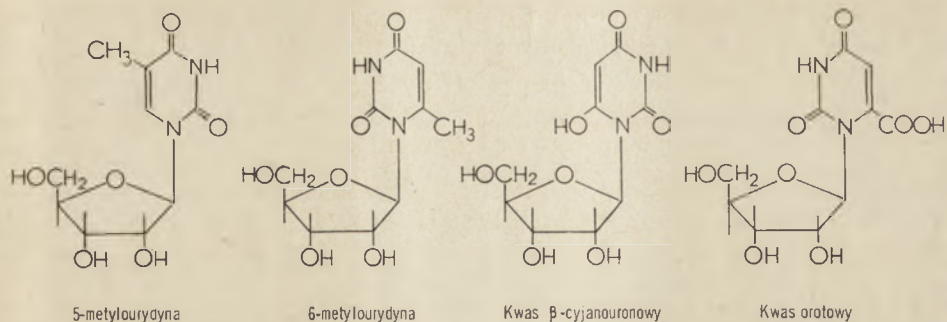
## 2. Konformacja na węglu glikozydowym

Ostatnio ukazały się prace, w których za pomocą PMR określono czy nukleozyd znajduje się w konformacji *syn*, czy *anti*. Problem ten nie doczekał się rozwiązania teoretycznego, to znaczy, że nie ma danych ani formuł wiążących kąt  $\chi_{CN}$  z widmem PMR. Można jedynie wyciągać wnioski jakościowe — *syn* czy *anti* — inaczej — czy grupa 2-keto w pirymidynach lub azot  $N_{(3)}$  w purynowych nukleozydach jest nad czy poza pierścieniem pentozy.

Stwierdzono (133), że podstawienie nukleozydu grupą fosforanową w pozycji 5' powoduje specyficzne odsłanianie protonu  $H8$  w purynach lub protonu  $H6$  w pirymidynowych nukleozydach o około 0,2 ppm; nie następuje natomiast odsłanianie  $H2$  w purynowych lub  $H5$  w pirymidynowych nukleozydach. Odsłanianie jest większe w  $pD$  7,4 kiedy grupa fosforanowa ma ładunek  $-2$ , zmniejsza się w  $pD$  5,9 kiedy ma ładunek  $-1$ . Autorzy tej pracy wnioskujeją, że jest to skutek oddziaływania  $H8$  lub odpowiednio w pirymidynach  $H6$  z grupą fosforanową, jest to zarazem dowód, że badane nukleozydo-5'-monofosforany znajdują się w konformacji *anti*.

Podobne obserwacje poczynili inni autorzy (16, 33, 37, 52, 53, 156). Ogólnie, z prac tych wynika, że wszystkie znane nukleozydy znajdują się w roztworze w konformacji *anti*. Wyjątek stanowią nukleozydy pirymidynowe podstawione w pozycji 6 — Schweizer, Witkowski, Robins (134) badali porównawczo 5-metylourydyne, 6-metylourydyne, 5-metylocytydyne, 6-metylocytydyne i 6-oxocytydyne (schemat 1). Z badań na modelach atomowych oraz na podstawie pomiarów aktywności optycznej (95) można wnioskować, że 6-metylonukleozydy powinny mieć konformację *syn*. W istocie, w cytowanej pracy stwierdzono znaczne odsłanianie protonów  $H2'$  (0,5—0,6 ppm) i  $H3'$  (0,15—0,2 ppm) w 6-metylo pochodnych, przy czym wartości tych przesunięć niewiele różniły się od wartości dla 6-oxocytydyny (podobnie dla rybozydu kwasu  $\beta$ -cyjanurowego (27)). Wnioskowano zatem, że odsłanianie spowodowane jest oddziaływaniem grupy 2-keto z protonami  $H2'$  i  $H3'$  w konformacji *syn* (dla 6-oxo pochodnej protony te muszą oddziaływać z grupą keto w konformacji *syn* i *anti*). Na podobnych przesłankach oparł się Hruska (49), który potwierdził konformację *syn* dla orotydyny (schemat 1).





Ostatnio, grupa autorów — Barry, North, Glasel, Williams i Xavier (5) opublikowała pracę, w której określiła konformację nukleotydów — 5'-fosfo-adenozyny i tymidyny na podstawie zmiany przesunięć chemicznych niektórych protonów, wskutek dodania do roztworu jonów paramagnetycznych, lantanowców: europu (III), neodymu (III), gadolinu (III) czy innych (103a). Przy założeniu, że jony te oddziałują przede wszystkim z grupą fosforanową i przy przyjęciu kształtu funkcji związanych z oddziaływaniem i odległością grupy fosforanowej względem poszczególnych protonów, ograniczono zbiór możliwych konformacji do kilku. Autorzy tej pracy „wierzą, że ta metoda będzie przydatna do określenia strukturalnych własności w roztworze dużej liczby cząsteczek, interesujących z punktu widzenia biofizyki”.

### V. Jądrowy efekt Overhausera (NOE)

Jądrowy efekt Overhausera (NOE) jest jednym z efektów powstałych wskutek podwójnego napromieniowywania próbki w polu magnetycznym, a mianowicie następuje zmiana całkowitego natężenia linii absorpcyjnej jednego protonu w widmie PMR pod wpływem napromieniowywania badanej substancji falą o częstotliwości odpowiadającej absorpcji innego protonu. Wielkość zmiany jest zależna od  $1/r^6$  gdzie  $r$  jest odległością od oddziałujących ze sobą protonów, napromieniowywanym i obserwowanym. Ze względu na istnienie tej zależności można wykorzystać NOE do określenia konformacji i struktury cząsteczek organicznych (2).

NOE wydawałoby się szczególnie przydatne do określenia konformacji „*syn-anti*” w nukleozydach. Badania takie zostały przeprowadzone przez Hart i Davis (42, 43), Schirmer, Noggle, Davis, Hart (131). Interpretacja wyników pozwala na wysnucie wniosków odnośnie konformacji „*syn-anti*” odmiennych niż według dotychczasowych metod. Opublikowano dane z badań nad guanozyną, 3,5'-cykloguanozyną i ich 2',3'-izopropylowymi pochodnymi. Ostatnio ukazały się dane dotyczące urydyny i cytydyny oraz ich izopropylowych pochodnych (44), które wska-

zują, że w roztworach wodnych mamy duży procent zawartości konformerów „syn” obok „anti”. Tablica 8 zestawia wyniki Harta i Davisa wraz z procentową zawartością przeciwnych sobie konformerów. Jednak, mimo dość przekonujących argumentów przytoczonych przez autorów i jednocześnie rzeczników powyższej metody, wydaje się, że należy jeszcze poczekać na potwierdzenie wniosków uzyskanych tą drogą przy pomocy innych metod (szczególnie, że Hart i Davies (44) popełnili kilka istotnych błędów metodycznych — współczynniki ekstynkcji nukleozydów odbiegają od ich wartości literaturowych).

Tablica 8

Zestawienie wyników badań metodą jądrowego efektu Overhausera

Dokładność oznaczeń — 4%

	Proton naświetl.	Proton obserw.	%	
2', 3'-izopropylideno- 3', 5'-cykloguanozyna (43)	H8	H1'	26	100% <i>syn</i>
	H1'	H8	39	
	H2' i H3'	H8	1	
2', 3'-izopropylideno- adenozyna (43)	H1'	H8	23	<i>przewaga syn</i>
	H2'	H8	9	
	H3'	H8	3	
	H5' i H5''	H8	4	
2', 3'-izopropylideno- guanozyna (43)	H1'	H2	0	<i>równowaga syn, anti</i>
	H8	H1'	20	
	H1'	H8	12	
	H2' i H3'	H8	12	
	H5' i H5''	H8	10	
	H4'	H8	2	
Cytydyna (44)	H1'	H6	11	<i>równowaga syn, anti</i>
	H2'	H6	13	
	H3'	H6	8	
	H5'	H6	0	
2', 3'-izopropylideno- cytydyna (44)	H1'	H6	24	<i>przewaga syn</i>
	H2'	H6	4	
	H3'	H6	5	
	H5'	H6	0	
Urydyna (44)	H1'	H6	6	<i>przewaga anti</i>
	H2', 3', 4'	H6	18	
	H5'	H6	14	
2', 3'-izopropylideno- urydyna (44)	H1'	H6	19	<i>przewaga syn</i>
	H2'	H6	10	
	H3'	H6	4	
	H5'	H6	0	

## VI. Aktywność optyczna

Od czasu odkryć Pasteura wiemy, że czynność optyczna wiąże się ze strukturą przestrzenną cząsteczki. W ostatnim dziesięcioleciu w wyniku ulepszenia spektropolarymetrów i konstrukcji dichrografów kołowych zainteresowanie tą dziedziną gwałtownie wzrosło (7, 20, 21, 25, 90, 137, 161, 171). Wzrost zainteresowania był też częściowo spowodowany sukcesami, jakie osiągnęła ta metoda, w badaniu struktury przestrzennej ważnej biologicznie grupy związków — steroidów (np. 137, 161) oraz białek (64, 171).

W chemii cukrów od 1909 r. istniała reguła Hudsona (54), która wiązała wartość skręcalności właściwej dla linii D sodu ich pierścieniowej formy z konfiguracją na węglu glikozydowym. Ta właśnie reguła upadła jako pierwsza w przypadku nukleozydów (29, 83), gdyż okazało się, że mimo konfiguracji  $\beta$  — nukleozydy pirymidynowe mają skręcalność dodatnią, czyli przeciwną do przewidywanej. W trakcie upowszechniania metody ORD i CD w pracowniach biochemicznych i chemicznych, zajmujących się kwasami nukleinowymi przebadano bardzo dużą ilość nukleozydów i nukleotydów (na rysunku 13 pokazano krzywe CD podstawowych nukleozydów) oraz ich analogów (tablica 9). Prace poszczególnych grup badaczy rozwijały się w kierunku określenia odpowiedniej reguły łączącej czynność optyczną z konformacją lub konfiguracją cząsteczki nukleozydu.

Grupa Ulbrichta (29—31, 114, 115, 158—160) w oparciu o pomiary skręcalności (ORD) dużej grupy związków zawierającej cyklopirymidynowe pochodne nukleozydów (nr: 134, 185, 187, 188 — tablica 9) wyprowadziła regułę wiążącą znak efektu Cottona z konformacją dla pirymidynowych nukleozydów (31). Reguła ta została następnie zmodyfikowana przez Rogersa i Ulbrichta (144). Wielkość i znak efektu Cottona purynowych nukleozydów nie został ujęty w ścisłą regułę (30), wiadomo jedynie, że w ogólności jest on ujemny i według Rogersa i Ulbrichta (115) zależy w pierwszym rzędzie od wartości kąta glikozydowego.

Efekt Cottona zależy od dwóch, sprzężonych ze sobą czynników:

1. od chromoforu, a więc od wartości indukowanego momentu elektrycznego przez zaabsorbowaną falę świetlną oraz jego zorientowania w cząsteczce (32, 126, 150, 151);

2. od budowy całej cząsteczki — czyli inaczej od asymetrycznego zaburzenia indukowanego momentu dipolowego.

Obrazowo można przedstawić ten problem jako zagadnienie indukowanego dipola elektrycznego umieszczonego w polu potencjału pochodzącego od reszty cząsteczki.

W przypadku nukleozydów, chromoforem jest zasada azotowa, częścią zaburzającą reszta cukrowa i trzeba tu szczególnie podkreślić, że na efekt Cottona będzie wpływać nie tylko zmiana konformacji cząsteczki ale również równie istotna jest zmiana struktury elektronowej chromoforu —



prowadząca do zmiany widma elektronowego lub kierunku indukowanego momentu dipolowego. Rogers i Ulbricht (114) za podstawę do opracowywania widm ORD nukleozydów przyjęli widma cyklo nukleozydów (nr: 184, 185, 187, 188 tablica 9) o sztywnej konformacji, ale o zupełnie zmienionym chromoforze (zamiast grupy 2-keto mamy grupę 2-oksy). Wobec takich zmian struktury elektronowej cząsteczki zmiany efektu Cottona tłumaczyć zmianą chromoforu. Porównanie widm CD z widmem 2-etoksyurydyny (nr 190, tablica 9) nie prowadzi do jednoznacznych wniosków, być może znaczny wpływ mają powstałe w cyklo-nukleozydach napięcia pierścienia. Zmiany w widmie absorpcyjnym (29, 95) wydają się taką interpretację potwierdzać (rys. 14). Innym tłumaczeniem zmian efektu Cottona w cyklo-nukleozydach jest sugestia S n a t z k e' g o (138), że dużą rolę odgrywa tutaj dodatkowy pierścień, który tworzy drugą sferę (138, 139) nie istniejącą w oryginalnych glikozydach.

Równoległymi badaniami do grupy Ulbrichta zajmuje się grupa badaczy z Salt Lake City, którzy także próbują znaleźć zależność między konformacją a kołowym dichroizmem nukleozydów. Są to Daniel S. Miles i Henry Eyring, wraz z zespołem chemików organicznych Rolanda K. Robinsa (59, 91—99). Autorzy ci dysponują ogromnym zbiorem w różny sposób zmodyfikowanych nukleozydów (tablica 9). Grupa ta podchodzi bardzo rozsądnie do zagadnienia — oprócz korelacji czysto empirycznych próbuje obliczyć wartość efektu Cottona na gruncie teorii Kuhna-Kirkwoda-Tinoco (32, 150). Jednak ci autorzy nie mogą w chwili obecnej przedstawić ścisłej lub mniej ścisłej korelacji między strukturą a efektem Cottona; podana przez nich empiryczna zależność (95) wielkości natężenia długofalowego pasma CD od kąta na wiązaniu glikozydowym  $\chi_{CN}$  opiera się jedynie na ujemnej sile skręcalności długofalowego pasma kołowego dichroizmu dla 6-metylocytydyny i 6-metylouracydyny „zamrożonych” ze względów sterycznych w konformacji *syn* w porównaniu z dodatnią siłą skręcalności dla cytydyny i urydyny (schemat 1). Inne argumenty są bardzo dyskusyjne.

Grupa z Salt Lake City porównuje różnie podstawione purynowe nukleozydy w pozycji 8 (nr: 159—169 — tablica 9), zwiększając w ten sposób zawartość sterycznie prawdopodobnego konformenu *syn* (99). Systematycznie przebadano: serię pirymidynowych nukleozydów z modyfikacjami pierścienia furanozowego (94, 95), z analogami zasad pirymidynowych jako chromoforami (91, 98) oraz cyklo pochodne nukleozydów pirymidynowych (91) i purynowych (59, 93) jako substancje modelowe do sprawdzenia teorii (tablica 9).

Oprócz wymienionych powyżej najpoważniejszych serii prac jest w literaturze szereg ciekawych przyczynków do problemu korelacji struktury z widmem CD, na przykład: Guschlbauer, Courtois (38) stwierdzili, że w kwaśnym środowisku guanozyna jest w konformacji *syn* (co potwierdzają również inni autorzy (99)).

Nishimura, Shimizu, Iwai (102) przebadali około 40 anomerów pochodnych uracylu, cytozyny, tyminy i adenozyiny z prawie wszystkimi możliwymi modyfikacjami pentozy (ryboza, arabinoza, lyksoza, ksyloza, L i D,  $\alpha$  i  $\beta$ ) i na tej podstawie stwierdzili, że zmiana podstawnika „z dołu do góry” w pozycji 2' (przejście ryboza-arabinoza) najsilniej zwiększa efekt Cottona, taka sama zamiana na węglu 3' wpływa mniej, natomiast zamiana na węglu 4' pierścienia pentozy ma wpływ nieznaczny. Wyniki Nishimury i wsp. pokrywają się z danymi Emersona i wsp. (31) oraz Milesa i wsp. (95, 96), także dodatkowe fakty nad podstawianym grupami metylowymi pierścieniem furanozy (93, 96, 97) (nr: 13, 14, 18, 130, 131 — tablica 9) są zgodne z tą prawidłowością.

Klee i Mudd (70) zarejestrowali krzywe ORD dla serii nukleozydów adeninowych podstawianych różnymi podstawnikami w pozycji 5' (nr 121—126, tablica 9) i stwierdzili, że następuje odwrócenie efektu Cottona przy podstawieniu w 5' grupy tioalkilo. Tę obserwację potwierdzają wyniki grupy z Salt Lake City (97).

Rabczenko, Jankowski, Kuśmierk i Shugar (105) stwierdzili znaczny wzrost efektu Cottona przy podstawianiu grupami metylowymi czy etylowymi grup hydroksylowych rybozy (nr: 84—95, tablica 9), przy czym porównali to z konformacją rybozy usztywnioną przez grupę 2',3'-izopropylidenową — ta ostatnia pochodna ma mniejszy efekt Cottona w porównaniu z rybo. Grupy metylowe przez steryczne oddziaływanie zmieniają rozkład populacji konformerów.

Grupa Witkopa (71, 72, 76, 82) prowadzi szerokie badania nad pochodnymi dwuhydro nukleozydów i fotoproduktów nukleozydów (nr 92—102, tablica 9). W tym przypadku na podstawie pomiarów aktywności optycznej można było określić bezwzględną konformację niektórych związków.

Ciekawym zagadnieniem jest zmiana własności optycznych niektórych nukleozydów w innych niż wodne rozpuszczalniki. Reprezentatywnym przykładem są tutaj pochodne cytozyny — w szeregu prac (Helene Dozou (48), Morita, Nagakura (100), Wróbel, Rabczenko, Shugar (170), Johnson, Vipond, Gird (65), Litońska, Berens, Wierzchowski (89)) stwierdzono zmianę widma elektro nowego w wyniku podwyższenia temperatury wodnych roztworów cytydyny i innych pochodnych cytozyny oraz zmianę widma w stosunku do roztworów wodnych w rozpuszczalnikach takich jak dioksan, dwumetyloformamid.

Johnson i współpracownicy (65) przypisali te zmiany wiązaniom wodorowym, które mają inny charakter w aprotycznych rozpuszczalnikach. W świetle takiej interpretacji ciekawym wydaje się spostrzeżenie Milesa i wsp. (95, 96), że zmiana rozpuszczalnika drastycznie wpływa na zmianę krzywej CD izopropylideno cytydyny czy też 6-metylo pochodnych cytydyny. Dla niektórych przypadków mały dodatek wody w roz-



puszczalniku powoduje odtworzenie się widma jakie otrzymujemy dla roztworu wodnego, co można wiązać z wynikami Litońska i wsp. (89) w podobnych warunkach w absorpcji UV. Miles i wsp. (96) przypisywali obserwowane efekty różnicy konformacji w roztworze wodnym i niewodnym, ale prostszym znacznie tłumaczeniem jest, że zmiany efektu Cottona spowodowane są przemieszczaniem się lub zwiększaniem czy zmniejszaniem indukowanych momentów przejść (co odbija się też w widmie absorpcyjnym) spowodowanych wiązaniami wodorowymi lub też efektem dielektrycznym (65, 89). Taka interpretacja znacznie osłabia wnioskowanie dotyczące zależności między kątem na wiązaniu glikozydowym a siłą skręcalności, podane w formie krzywej przez Milesa i wsp. (96).

Na zakończenie, ze względu na historyczne znaczenie, należy wspomnieć o pierwszych krzywych ORD zarejestrowanych przez Yanga i Samejimą (172) w 1963 roku oraz o pracy Yanga, Samejimy i Sarkara (174), w której autorzy zestawiają widma ORD wszystkich podstawowych nukleozydów i nukleotydów rybo- i 2'-dezoksy-. Pomiary te mają jednak niewielką dokładność i dlatego też nie cytowałem ich w tablicy 9.

Wydaje się, że mimo zależności aktywności optycznej od dużego zespołu czynników, przez badanie odpowiednich związków modelowych i wraz z ulepszeniem aparatury uda się znaleźć bezpośrednią korelację między widmem CD a konformacją tak, że na podstawie widma można będzie przewidzieć przynajmniej jakościowo konformację cząsteczki (przeгляд: (10, 151, 173)). Jednocześnie rozwój teorii łączących aktywność optyczną z konformacją cząsteczki nukleozydu (32, 126, 148) być może uściślił empiryczne reguły.

## VII. Uwagi końcowe

W przeglądzie tym nie omówiono wszystkich technik stosowanych przy badaniu konformacji nukleozydów. Nie wspomniano na przykład o stosowaniu widm w podczerwieni (103) ani też o pomiarach absorpcji ultradźwięków w roztworach nukleozydów (109) ze względu na małą użyteczność (jak w przypadku pierwszej metody) albo też ze względu na ograniczoną stosowalność (jak w przypadku drugiej). Nie opisano również metody jądrowego rezonansu magnetycznego  $^{13}\text{C}$  ani metody pomiaru momentów dipolowych gdyż do badania konformacji nukleozydów zastosowano je w roku 1972.

Określenie przestrzennej struktury nukleozydu nie jest sprawą łatwą. Postęp w badaniach nad konformacją jest ściśle związany z postępem badań podstawowych nad udoskonaleniem poszczególnych technik badaw-



zych. Wydaje się, że w przyszłości szczególną rolę będzie zajmowała technika rezonansu magnetycznego o wysokiej częstotliwości podstawowej — 220 MHz czy 300 MHz oraz technika podwójnego rezonansu magnetycznego z tym powiązana. Badania tą metodą, przy dysponowaniu odpowiednim zestawem modelowych związków o sztywnej strukturze w celu określenia empirycznych, rzetelnych zależności pozwolą na precyzyjne określenie zarówno konformacji pierścienia rybofuranozowego, jak też i określenie kąta glikozydowego.

Z pewnością doskonałym uzupełnieniem badań NMR będą badania aktywności optycznej ze względu na ich prostotę i możliwość pracy w większym zakresie stężeń. Zjawiska aktywności optycznej, mimo że zależą w bardziej uwikłany sposób od konformacji, zawierają w sobie duże potencjalne możliwości przy określaniu konformacji, szczególnie przy ocenie oddziaływań między zasadami azotowymi zmieniającymi jakościowo i ilościowo aktywność optyczną cząsteczki.

#### LITERATURA

1. Abraham R. J., Hall L. D., Hough L., McLachlan K. A., *J. Chem. Soc.*, 3699 (1962).
2. Anet F. A. L., Bourn A. J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5250 (1965).
3. Arnott S., Hukins D. W. L., *Nature* **224**, 886 (1969).
4. Arnott S., *Progr. Bioph. and Mol. Biol.* **21**, 267 (1970).
5. Barry C. D., North A. C. T., Glasel J. A., Williams R. J. P., Xavier A. V., *Nature* **232**, 236 (1971).
6. Berthod H., Pullman B., *Biochim. Biophys. Acta* **232**, 595; **246**, 359 (1971).
7. Bentley R., *Molecular Asymmetry in Biology*, vol. 1, Acad. Press New York, London 1969.
8. Bible R. H. Jr., *Interpretation of NMR Spectra*, Plenum Press, New York 1965.
9. Blackburn D. J., Grey A. A., Smith I. C. P., Hruska F. E., *Can. J. Chem.* **48**, 2866 (1970).
10. Brahms J., Brahms S., w *Biological Macromolecules*, wyd. Timasheff, G. D. Fasman, tom 4, str. 191 (1970).
11. Brant D. A., Flory P. J., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 663 (1965).
12. Bugg C. E., Marsh R. E., *J. Mol. Biol.* **25**, 67 (1967).
13. Bugg C. E., Thewalt U., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 623 (1969).
14. Bugg C. E., Thewalt U., Marsh R. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 436 (1968).
15. Camerman N., Trotter J., *Acta Cryst.* **18**, 203 (1965).
16. Chan S. I., Nelson J. H., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 168 (1969).
17. De Coen J. L., Kerckx J., *FEBS Letters* **11**, 241 (1970).
18. Coulter C. L., *Science* **159**, 888 (1968).
19. Coulter C. L., Greaves M. L., *Science* **169**, 1097 (1970).
20. Crabbé P., *An Introduction to the Chiroptical Methods in Chemistry*, de Impresos Offsali-G, S. A., Mexico 1971.
21. Crabbe P., *Optical Rotatory Dispersion in Organic Chemistry*, Holden-Day, San Francisco, 1965.

22. Cullity B. D., *Podstawy dyfrakcji promieni rentgenowskich*, PWN, Warszawa 1964.
23. Cushley R. J., Codington J. F., Fox J. J., *Can. J. Biochem.* **46**, 1131 (1968).
24. Danyluk S. S., Hruska F. E., *Biochemistry* **7**, 1038 (1968).
- 24a. Deslauriers R., Lapper R. D., Smith I. C. P., *Can. J. Biochem.* **49**, 1279 (1971).
25. Djerassi C., *Optical Rotatory Dispersion: Applications to Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 1960.
26. Donohue J., Trueblood K. N., *J. Mol. Biol.* **2**, 263 (1960).
27. Dugas H., Blackburn B. J., Robins M. K., Robins R. K., Deslauriers R., Smith I. C. P., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 3468 (1971).
28. Dyer J. R., *Spektroskopia absorpcyjna w chemii organicznej*, PWN, Warszawa 1967.
29. Emerson T. R., Ulbricht T. L. V., *Chem. Ind.*, str. 2129 (1964).
30. Emerson T. R., Swan R. J., Ulbricht T. L. V., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **22**, 505 (1966).
31. Emerson T. R., Swan R. J., Ulbricht T. L. V., *Biochemistry* **6**, 843 (1967).
32. Eyring H., Liu H. C., Caldwell D., *Chem. Rev.* **68**, 525 (1968).
- 32a. Fang K. N., Kondo N. S., Miller P. S., Ts'o P. O. P., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 6647 (1971).
33. Feldman I., Agarwal R. P., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7329 (1968).
34. Fraser-Reid B., Radatus B., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 6343 (1971).
35. Furberg S., Peterson C. S., Romming Ch., *Acta Cryst.* **18**, 313 (1965).
36. Green E. A., Shiono R., Rosenstein R. D., Abraham D. J., *Chem. Commun.* str. 53 (1971).
37. Grey A. A., Smith I. C. P., Hruska F. E., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 1765 (1971).
38. Guschlbauer W., Courtois Y., *FEBS Letters* **1**, 183 (1968).
39. Hallas G., *Stereochemia związków organicznych*, PWN, Warszawa 1971.
40. Hall L. D., *Adv. Carbohydr. Chem.* **19**, 51 (1964).
41. Harris R. D., McIntyre W. M., *Biophys. J.* **4**, 203 (1964).
42. Hart P. A., Davis J. P., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **34**, 733 (1969).
43. Hart P. A., Davis J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 512 (1969).
44. Hart P. A., Davis J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 753 (1971).
45. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., *Acta Cryst.* **18**, 525 (1965).
46. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., *Acta Cryst.* **19**, 125 (1965).
47. Haschemeyer A. E. V., Rich A., *J. Mol. Biol.* **27**, 369 (1967).
48. Helen C., Dozou J. L., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **259**, 3385, 4853, 4387 (1964).
49. Hruska F. E., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 1795 (1971).
50. Hruska F. E., *Can. J. Chem.* **49**, 2111 (1971).
51. Hruska F. E., Danyluk S. S., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3266 (1968).
52. Hruska F. E., Grey A. A., Smith I. C. P., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4088 (1970).
53. Hruska F. E., Ogilvie K. K., Smith A. A., Wayborn H., *Can. J. Chem.* **49**, 2449 (1971).
54. Hudson C. S., *Adv. Carbohydr. Chem.* **3**, 1 (1948).
55. Hunt D. J., Subramanian E., *Acta Cryst.*, **B26**, 303 (1970).
56. Hunt D. J., Subramanian E., *Acta Cryst.* **B25**, 2144 (1969).

57. Iball J., Morgan C. H., Wilson H. R., *Proc. Roy. Soc. (London)* **A295**, 320 (1966).
58. Iball J., Morgan C. H., Wilson H. R., *Proc. Roy. Soc. (London)* **A302**, 225 (1968).
59. Inskeep W. H., Miles D. W., Eyring H., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3866 (1970).
60. Jackman L. M., Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w chemii organicznej, PWN, Warszawa 1962.
61. Jardetzky Ch. D., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 229 (1960).
62. Jardetzky Ch. D., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 2919 (1961).
63. Jardetzky Ch. D., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 62 (1962).
64. Jirgensons, Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1969.
65. Johnson W. C., Vipond P. M., Girod J. C., *Biopolymers* **10**, 923 (1971).
66. Kang S., *J. Mol. Biol.* **58**, 297 (1971).
67. Karplus M., *J. Chem. Phys.* **30**, 11 (1959).
68. Karplus M., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2870 (1963).
69. Klyne W., Prelog V., *Experientia* **16**, 521 (1960).
70. Klee W. A., Mudd S. H., *Biochemistry* **6**, 988 (1967).
71. Kondo Y., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 764 (1968).
72. Kondo Y., Fourriery J. L., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 3527 (1971).
73. Konnert J., Karle I. L., Karle J., *Acta Cryst.* **B26**, 770 (1970).
74. Koyama G., Maeda K., Umezawa H., Zitaka Y., *Tetrahedron Letters* **6**, 597 (1966).
75. Kraut J., Jensen L. H., *Acta Cryst.* **16**, 79 (1963).
76. Kunieda T., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 7751 (1969).
77. Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V., *Biochim. Biophys. Acta* **204**, 49 (1970).
78. Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V., *Biopolymers* **8**, 475 (1969).
79. Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V., *Biopolymers* **8**, 489 (1969).
80. Laszlo P., von Schleyer P. R., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2709 (1963).
81. Lentz R. W., Heshen J. P., *J. Polymer. Sci.* **51**, 247 (1961).
82. Lemieux R. U., *Can. J. Chem.* **39**, 116 (1961).
83. Lemieux R. U., Hoffer M., *Can. J. Chem.* **39**, 110 (1961).
84. Lemieux R. U., Stevens J. D., Fraser R. R., *Can. J. Chem.* **40**, 1955 (1962).
85. Lemieux R. U., Nagarajam R., *Can. J. Chem.* **42**, 1270 (1964).
86. Lifson S., I European Bioph. Congress, Baden near Vienna, Austria 14—17.IX.
87. Lin G. H.-Y., Sundaralingam M., *Acta Cryst.* **B27**, 961 (1971).
88. Lin G. H.-Y., Sundaralingam M., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 1235 (1971).
89. Litońska E., Berens K., Wierzchowski K. L., w druku.
90. Mason S. F., *Quart. Rev.* **17**, 20 (1963).
91. Miles D. W., Hahn S. J., Robins R. K., Robins M. J., Eyring H., *J. Phys. Chem.* **72**, 1483 (1968).
92. Miles D. W., Inskeep W. H., Robins M. J., Winkley M. W., Robins R. K., Eyring H., *Int. J. Quant. Chem.* **3**, 129 (1969).
93. Miles D. W., Inskeep W. H., Robins M. J., Winkley M. W., Robins R. K., Eyring H., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3872 (1970).



94. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 824 (1969).
95. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 831 (1969).
96. Miles D. W., Robins M. J., Robins R. K., Eyring H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **62**, 22 (1969).
97. Miles D. W., Robins R. K., Eyring H., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **57**, 1138 (1967).
98. Miles D. W., Robins R. K., Eyring H., *J. Phys. Chem.* **71**, 3931 (1967).
99. Miles D. W., Townsend L. B., Robins M. J., Robins R. K., Inskeep W. H., Eyring H., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, (1971).
100. Morita H., Nagakura S., *Theoret. Chim. Acta (Berl.)* **11**, 279 (1968).
101. Nagashima N., Litaka Y., *Acta Cryst.* **B24**, 1136 (1968).
102. Nishimura T., Shimizu B., Iwai I., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 221 (1968).
103. Pitha J., *Biochemistry* **9**, 3678 (1970).
- 103a. Pohl L., *Kontakte (Merck)*, str. 17 (1972).
104. Prestegard J. H., Chan S. I., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2843 (1969).
105. Rabczenko A., Jankowski K., Kuśmierk J., Shugar D., w opracowaniu.
106. Rabczenko A., Jankowski K., Shugar D., w opracowaniu.
107. Rahman A., Wilson H. R., *Nature* **232**, 333 (1971).
108. Ramachandran G. N., Sasisekharan V., *Adv. Prot. Chem.* **23**, 283 (1968).
109. Rhodes L. M., Schimmel P. R., *Biochemistry* **10**, 4426 (1971).
110. Rao S. T., Sundaralingam M., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1210 (1969).
111. Rao S. T., Sundaralingam M., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4963 (1970).
112. Renugloparakrishnan V., Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V., *Biopolymers* **10**, 1159 (1971).
113. Robins M. J., Robins R. K., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4934 (1965).
114. Rogers G. T., Ulbricht T. L. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 414 (1970).
115. Rogers G. T., Ulbricht T. L. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 419 (1970).
- 115a. Rogers G. T., Ulbricht T. L. V., *Europ. J. Biochem.* **22**, 457 (1971).
116. Rohrer D. C., Sundaralingam M., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4950 (1970).
117. Rohrer D. C., Sundaralingam M., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4956 (1970).
118. Saenger W., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 3035 (1971).
119. Saenger W., Scheit K. H., *J. Mol. Biol.* **50**, 153 (1970).
120. Saenger W., Suck D., *Acta Cryst.* **B27**, 1178 (1971).
121. Saenger W., Suck D., Scheit K. H., *FEBS Letters* **5**, 262 (1969).
122. Samejima T., Kita M., Iris M., *J. Biochem. (Tokyo)* **65**, 305 (1969).
- 122a. Sarma R. H., Kaplan N. O., *Biochemistry* **9**, 557 (1970).
123. Sasisekharan V., Lakshminarayanan A. V., Ramachandran G. N., w *Conformation of Biopolymers Tom 2*, wyd. Academic Press, London 1967, str. 641.
124. Sasisekharan V., Lakshminarayanan A. V., *Biopolymers* **8**, 489, (1969).
125. Scott R. A., Scheraga H. A., *J. Chem. Phys.* **45**, 2091 (1966).
126. Schellmann, *Accounts for Chemical Res.* **1**, 144 (1968).
127. Schefter E., *J. Pharm. Sci.* **57**, 1157 (1968).
128. Schefter E., Barlow M., Sparks R., Trueblood K. N., *J. Am.*

- Chem. Soc.* **63**, 37 (1964), *Acta Cryst.*, **B25**, 895 (1969).
129. Schefter E., Trueblood K. N., *Acta Cryst.* **18**, 1067 (1965).
  130. Scheraga H. A., *Adv. Phys. Chem.* **6**, 103 (1968).
  131. Schrirmer R. E., Noggle J. H., Davis J. P., Hart P. A., *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3266 (1970).
  132. Schweizer M. P., Chan S. I., Ts'o P. O. P., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5241 (1965).
  133. Schweizer M. P., Broom A. D., Ts'o P. O. P., Hollis D. P., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1042 (1968).
  134. Schweizer M. P., Witkowski J. T., Robins R. K., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 277 (1971).
  135. Seeman N. C., Sussman J. L., Berman H. M., Kim S. H., *Nature (N. B.)* **233**, 90 (1971).
  136. Smith M., Jardetzky Ch. D., *J. Mol. Spectr.* **28**, 70 (1968).
  137. Snatzke G. (wyd.), *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, Heyden and Son Ltd., London 1967.
  138. Snatzke G., Kajtar M., Werner-Zamojska F., w *Advanced Institute on ORD and CD*, September 5—18, 1971, Tirrenia (Pisa) Włochy.
  139. Snatzke G., Kajtar M., Werner-Zamojska F., *XXIIIrd International Congress of Pure and Applied Chemistry*, **7**, 117 (1971).
  140. Silverstein R. M., Bassler G. C., *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, PWN, Warszawa 1970.
  141. Suck D., Saenger W., *Acta Cryst.* **B28**, (1972).
  142. Sternhell S., *Quart. Rev.* **23**, 236 (1969).
  143. Sundaralingam M., *Acta Cryst.* **21**, 495 (1966).
  144. Sundaralingam M., *Biopolymers* **7**, 821 (1969).
  145. Sundaralingam M., Jensen L. H., *J. Mol. Biol.* **13**, 914 (1965).
  146. Sundaralingam M., Jensen L. H., *J. Mol. Biol.* **13**, 930 (1966).
  147. Tavale S. S., Sobell H. M., *J. Mol. Biol.* **48**, 109 (1970).
  148. Teng N. N. H., Itzkowitz M. S., Tinoco I., Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 6257 (1971).
  149. Tichy M., *Post. Biochem.* **18**, 3 (1972).
  150. Tinoco I., Jr. *Adv. Chem. Phys.* **4**, 113 (1964).
  151. Tinoco I., Jr., Cantor Ch. R., *Methods Biochem. Anal.* **18**, 81 (1970).
  152. Tollin P., Munns A. R. I., *Nature* **222**, 1170 (1969).
  153. Tollin P., Wilson H. R., Young D. W., *Nature* **217**, 1148 (1968).
  154. Tougaard P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 961 (1969).
  155. Trueblood K. N., Horn P., Luzzati V., *Acta Cryst.* **14**, 965 (1961).
  156. Ts'o P. O. P., Kondo N. S., Schweitzer M. P., Hollis D. P., *Biochemistry* **8**, 997 (1969).
  157. Ueda T., Hishino H., *Chem. Pharm. Bull.* **17**, 920 (1969).
  158. Ulbricht T. L. V., Jennings J. P., Scopes P. M., Klyne W., *Tetr. Letters* 695 (1964).
  159. Ulbricht T. L. V., Emerson T. R., Swan R. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 643 (1965).
  160. Ulbricht T. L. V., Emerson T. R., Swan R. J., *Tetr. Letters* 1561, (1966).
  161. Velluz L., Legrand M., Groshean M., *Optical Circular Dichroism, Principles, Measurements and Applications*, Verlag Chemie GMBH, Weinheim/Bergstr., Academic Press New York, London 1965; tłum. ros. *Opticzieskoj krugowoj dichroizm*, MIR, Moskwa 1967.
  162. Vismavitra M. A., Reddy B. S., Lin G. H.-Y., Sundaralingam M.,

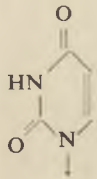
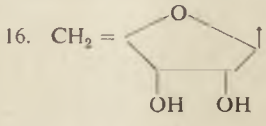
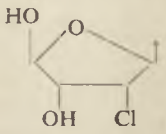
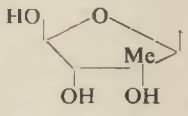
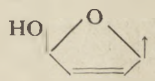
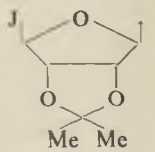
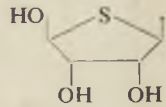
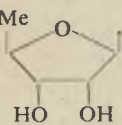
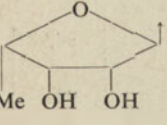
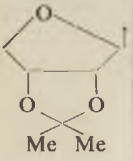
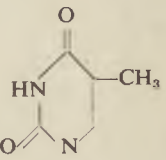
- J. Am. Chem. Soc.* **93**, 1235 (1971).
163. Voet D., Rich A., *Prog. Nuc. Acid. Res. and Mol. Biol.* **10**, 183 (1970).
  164. Ward D. C., Reich E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **61**, 1494 (1968).
  165. Watenpaugh K., Dow J., Jensen L. H., Furberg S., *Science* **159**, 206 (1968).
  166. Watson D. G., Sutor D. J., Tollin P., *Acta Cryst.* **19**, 111 (1965).
  167. Williamson K. L., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 516 (1963).
  168. Williams J. E., Stang P. J., Von Schleyer P. R., *Ann. Rev. Phys. Chem.* **19**, 531 (1968).
  169. Wilson H. R., Rahman A., *J. Mol. Biol.* **56**, 129 (1971).
  170. Wróbel A., Rabczenko A., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **17**, 339 (1970).
  171. Yang J. T., w *A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry*, wyd. Alexander P., Lundgren H. P., Pergamon Press, London, Edinburgh 1969, vol. 5, str. 23.
  172. Yang J. T., Samejima T., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 4039 (1963).
  173. Yang J. T., Samejima, *Prog. Nuc. Acid. Res. and Mol. Biol.* **9**, 223 (1969).
  174. Yang J. T., Samejima T., Sarkar P. K., *Biopolymers* **4**, 623 (1966).
  175. Young D. W., Tollin P., Wilson H. R., *Acta Cryst.* **B25**, 1423 (1969).

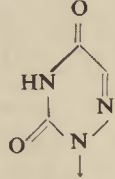
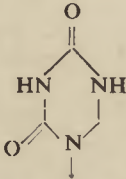
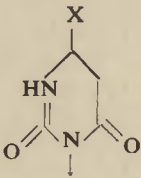
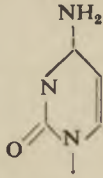
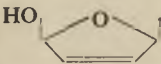
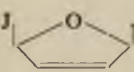
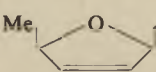
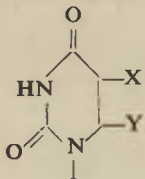
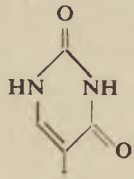


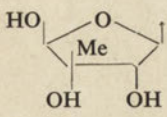
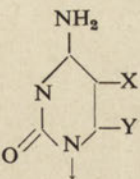
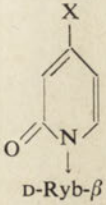
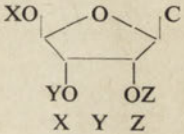
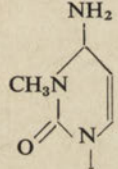
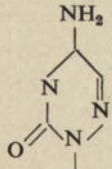
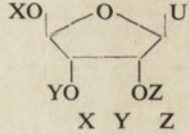
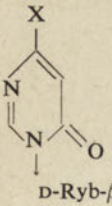
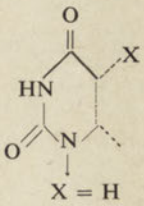
Zestaw nukleozdów i ich pochodnych dla których zarejestrowano krzywe CD lub ORD

Skróty używane w tej tablicy:

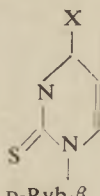
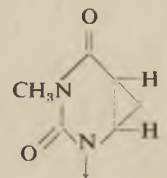
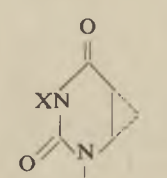
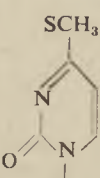
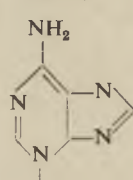
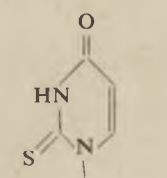
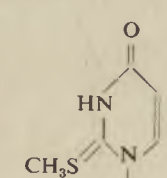
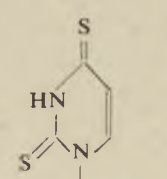
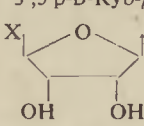
Ryb — ryboza; dRyb — 2'-dezoksyryboza; Ara — arabinoza; Lyks — lyksoza; Ksyl — ksyloza; p — grupa fosforanowa; Me — grupa metylowa; Pr — grupa propionylowa; Ac — grupa acetylowa; i — grupa 2',3'-0-izopropylidenują

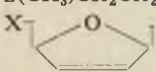
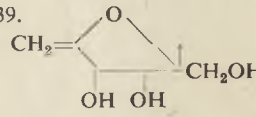
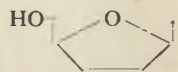
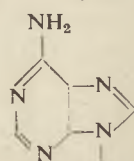
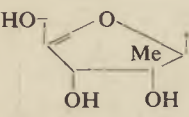
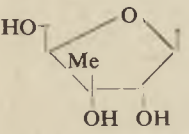
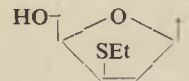
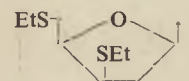
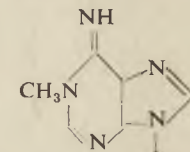
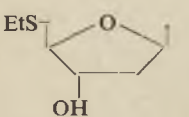
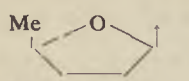
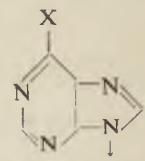
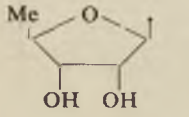
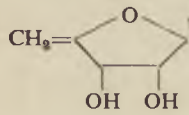
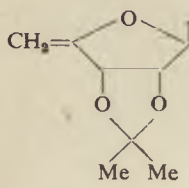
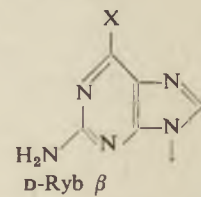
	CD	ORD		CD	ORD
			16. 	93	
1. D-Ryb-β	93,97	102	17. 	93	
2. D-Ryb-α		102			
3. D-dRyb-β	97		18. 	93	
4. D-Ara-β	93	102			
5. D-Ara-α	93	102	19. 	93	
6. D-Lyks-β	93	102			
7. D-Lyks-α	93	102	20. 	93	
8. 5'p-D-Ryb-β	93	102			
9. 5'p-D-Ryb-α	93	102	21. 	93	
10. 5'p-L-Ryb-β	93	102			
11. 5'p-L-Ryb-α	93	102			
12. 2',3',5'trój Ac-D-Ryb-α		31			
13. 	97				
14. 	97				
15. 	93		22. D-Ryb-α		102
			23. D-Ryb-β		102
					

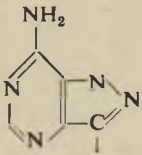
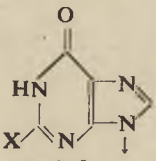
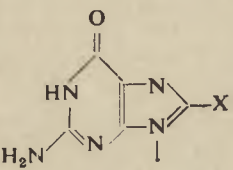
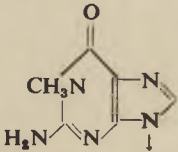
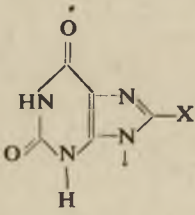
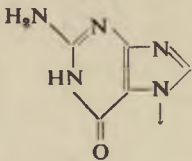
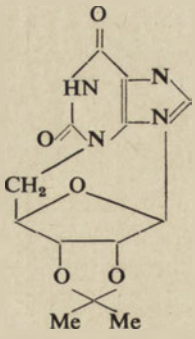
	CD	ORD		CD	ORD
24. D-Ara- $\alpha$		102	48. D-Ryb- $\alpha$		31
25. D-Ara- $\beta$		102	49. D-Ryb- $\beta$		31
26. L-Ara- $\alpha$		102			
27. D-Lyks- $\alpha$		102			
28. D-Lyks- $\beta$		102	50. D-Ryb- $\beta$	93	31
29. L-Lyks- $\alpha$		102	50a. D-Ara- $\beta$	115a	115a
30. L-Ksyl- $\alpha$		102			
31. 5'-p-D-Ryb- $\alpha$		102			
32. 5'-p-D-Ryb- $\beta$		102	51. D-Ryb- $\beta$	93	
33. 5'-p-L-Ryb- $\alpha$		102			
34. 5'-p-L-Ryb- $\beta$		102			
35. D-dRyb- $\alpha$		31	52. X = H	97	31
36. D-dRyb- $\beta$	93,97	31,94	53. X = CH <sub>3</sub>	97	31
37. 5'-p-D-dRyb- $\beta$		31			
38. 5'-p-D-dRyb- $\alpha$		31			
39. 	93	31	54. D-Ryb- $\beta$	94,98	31,94
40. 	93				102
41. 	93		55. D-Ryb- $\alpha$	93	102
42. D-rybopiranozylo- $\alpha$		31	56. D-Ara- $\alpha$	98	
43. D-rybopiranozylo- $\beta$		31	57. D-dRyb- $\beta$	92	31
			58. D-dRyb- $\alpha$		31
Y = H; X = CH <sub>2</sub> OH			59. i-D-Ryb- $\beta$	98	
44. D-dRyb- $\beta$		31	60. 5'-p-D-Ryb- $\beta$		31,102
45. D-dRyb- $\alpha$		31	61. 3'-p-D-Ryb- $\beta$		31
Y = CH <sub>3</sub> ; X = CH <sub>3</sub>			62. 2'-p-D-Ryb- $\beta$		31
46. D-Ryb- $\beta$			63. 5'-p-D-Ryb- $\alpha$		102
Y = CH <sub>3</sub> ; X = H	93,97		64. 3'-p-D-Ryb- $\alpha$		31
47. D-Ryb- $\beta$	97				
					

		CD	ORD			CD	ORD
65.		93		77.	X = H	92	
				78.	X = NH <sub>2</sub>	92	
	X = H; Y = CH <sub>3</sub>						
66.	D-Ryb-β	93,98		79.	X = H	92	
67.	D-dRyb-β	92,93,98		80.	X = OH	92	
68.	D-dRyb-α	93,98		81.	X = OCH <sub>3</sub>	92	
	X = H				i-D-Ryb-β		
69.	D-dRyb-β	98		82.	X = OH	92	
70.	X = Br	98			D-Ara-β		
71.	X = CH <sub>2</sub> OH		31	83.	X = NH <sub>2</sub>	92	
	X = H; Y = OH						
72.	D-Ryb-β	98	31	84.	Me Me Me	105	
73.	D-Ryb-β	98		85.	H Me Me	105	
				86.	H H Me	105	
74.	D-Ryb-β	98		87.	H Me H	105	
				88.	Me H H	105	
75.	D-dRyb-β		31	89.	Et Et Et	105	
76.	D-Ryb-α		31				
				90.	Me Me Me	105	
	D-Ryb-β			91.	H Me Me	105	
				92.	H H Me	105	
	D-Ryb-β			93.	H Me H	105	
	X = H			94.	Me H H	105	
				95.	Et Et Et	105	

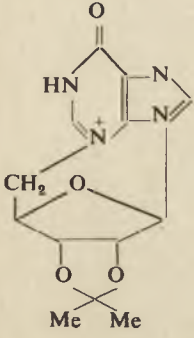
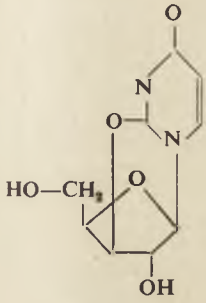
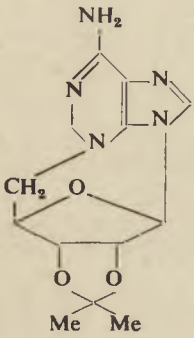
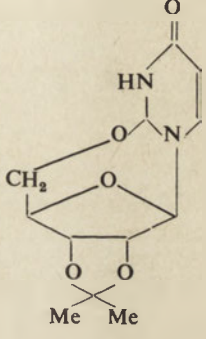
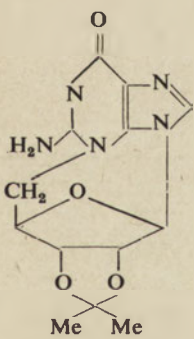
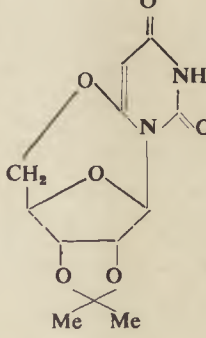
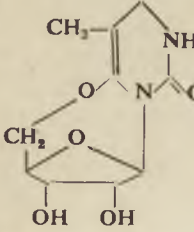
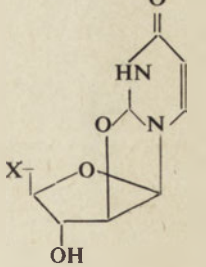


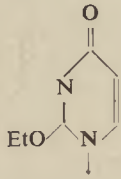
	CD	ORD		CD	ORD
96. D-Ryb- $\beta$		122	105. D-Ryb- $\beta$	157	157
96a. 5'-p-D-Ryb- $\beta$		122			
97. 2',3'-p-D-Ryb- $\beta$		122			
X-CH <sub>3</sub>					
98. D-dRyb- $\beta$		71			
99. H		71			
			106. X = NH <sub>2</sub>	157	157
			107. X = NHCH <sub>3</sub>	157	157
100. D-Ryb- $\beta$		76	108. X = N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	157	157
					
101. X = CH <sub>3</sub>		76	109. D-Ryb- $\beta$	157	157
102. X = H		76			
			110. D-Ryb- $\beta$	94,96	102
			111. D-Ryb- $\alpha$		102
103. D-Ryb- $\beta$	157	157	112. D-dRyb- $\alpha\beta$		91
			113. 5'-p-D-Ryb- $\beta$		102
			114. 5'-p-D-Ryb- $\alpha$		102
104. D-Ryb- $\beta$	157	157	115. 5'-p-D-dRyb- $\beta$		91
			116. 5'-Ac-D-Ryb- $\beta$		91
			117. 5'-Pr-D-Ryb- $\beta$		91
			118. i-D-Ryb- $\beta$		70-91
			119. 2'-p-D-Ryb- $\beta$		70
			120. 3',5'-p-D-Ryb- $\beta$		70
					
			121. (D,L)-S <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> )		
			CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CH(NH <sub>3</sub> ).		
			COO <sup>-</sup>		70
			122. (D,L)-SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH-		
			-(NH <sub>3</sub> )COO <sup>-</sup>		70

	CD	ORD		CD	ORD
123. SCH <sub>3</sub>		70			
125. S <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		70			
126. S(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NA <sub>3</sub> <sup>+</sup>		70	139.		91
X = 					
127. OH	96	91	140.		91
128. CH <sub>3</sub>		91			
129. SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		91			
130. 	96		141. D-Ryb-β		102
131. 	96		142. D-Ryb-α		102
132. 	96		143. D-Ryb-β	96	
133. 	96				
134. 	96		144. D-Ryb-β		31
135. 		91			
136. 		91	D-Ryb-β		
137. 	96	91	X =	96	95
138. 	96		145. H	96	95
			146. Cl	96	
			147. OCH <sub>3</sub>	96	
			148. N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	96	
			D-dRyb-α		
			149. X = CH <sub>3</sub>	96	
					
			D-Ryb β		

	CD	ORD		CD	ORD
150. X = NH <sub>2</sub>	99				
151. X = N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	99				
					
152. D-Ryb-β		164	d-Ryb-β X =		
			171. NHCH <sub>3</sub>	99	
X = H			172. N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	99	
153. D-Ryb-β	99	95	173. NHOH	99	
154. D-dRyb-β	99		174. H		95
155. D-dRyb-α	99		d-dRyb-β		
156. L-dRyb-α	99		175. X = NHCH <sub>3</sub>	99	
157. 2',3',5'trój-Ac-D- -Ryb-β	99		d-dRyb-α		
158. i-D-Ryb-β			176. X = NHCH <sub>3</sub>	99	
D-Ryb-β	99				
X =			177. D-dRyb-β	99	
159. NH <sub>2</sub>	99	95			
160. OH	99	95	D-Ryb-β		
161. Br	99	95	178. X = H	99	
162. C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	99		179. X = Br	99	
163. J	99				
164. N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	99				
165. NHEt	99				
166. NHOH	99				
167. NHCH <sub>3</sub>	99				
D-dRyb-β					
X =					
168. Br	99				
169. C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	99				
			180. 	94,95	92
170. D-Ryb-β	99				



	CD	ORD		CD	ORD	
181.		94,95	92	185.		31
182.		95		186.		59,93
183.		95		187.		59,97
184.		31				

	CD	ORD		CD	ORD
188. X = OH	97	31			
189. X = Br		31			
					
190. i-D-Ryb-		31			

## Inhibitory rybonukleaz

### Inhibitors of Ribonucleases

Naturally occurring inhibitors and the others factors affecting ribonucleases activity are reviewed.

Rybonukleazy wewnątrzkomórkowe różnią się właściwościami fizykochemicznymi i mechanizmem działania. W badaniach homogenatów zwierzęcych stwierdza się dwa optima aktywności rybonukleazowej, jedno w zakresie kwaśnym, w  $pH$  5,2—5,8 i drugie w zakresie zasadowym, od  $pH$  7,8—8,7. Rahman (1966) stwierdził w wątrobie szczura obecność rybonukleazy o optimum  $pH$  w zakresie 9,0—9,5. Barđoń i Rzecki (1966) wykazali obecność rybonukleazy o optimum  $pH$  w zakresie obojętnym. Rybonukleazy zasadowe są odporne na ogrzewanie i kwasy, kwaśne natomiast są wrażliwe. Aktywność kwaśnych rybonukleaz jest w wielu tkankach kilkakrotnie wyższa niż zasadowych. Kwaśna rybonukleaza znajduje się wraz z innymi hydrolazami we frakcji lizosomalnej. Rybonukleaza zasadowa występuje zarówno w strukturach subkomórkowych jak i we frakcji cytoplazmatycznej i pozostaje w kontakcie z cytoplazmatycznym RNA.

Rybonukleazy zasadowe są hamowane przez naturalny cytoplazmatyczny inhibitor, który nie wpływa na aktywność rybonukleaz kwaśnych. Występowanie białkowego inhibitora wykazano ostatnio u wielu gatunków zwierząt. Z powodu nadmiaru inhibitora zasadowa rybonukleaza występuje we frakcji cytoplazmatycznej w formie utajonej, w kompleksie z inhibitorem i oznaczenie jej aktywności jest możliwe jedynie w obecności odczynników inaktywujących inhibitor. Wyjątek w grupie zasadowych rybonukleaz stanowi rybonukleaza stwierdzona przez R a h m a n a (1967), we wszystkich frakcjach sedymentujących. W odróżnieniu od pozostałych zasadowych rybonukleaz jest ciepło- i kwasochwiejna i nie jest hamowana przez naturalny cytoplazmatyczny inhibitor.

Nukleotydy, wielkocząsteczkowe polianiony i liczne inne związki organiczne hamują aktywność rybonukleaz.

\* Dr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław.



## I. Naturalny wewnątrzkomórkowy inhibitor

Pirotte i Desreux (1952) pierwsi zaobserwowali w wątrobie świnki morskiej występowanie inhibitora. Następnie Roth (1956) wykazał obecność inhibitora w homogenatach wątroby i innych organach szczura. Najwyższe stężenie inhibitora znalazł w mózgu, wątrobie i płucach, najmniejsze w surowicy i mięśniach. Zawartość inhibitora w tych samych tkankach, u różnych szczurów wahała się, w szerokich granicach. Roth (1962) stwierdził, że supernatant 60 000xg z homogenatów wątroby różnych ssaków hamuje aktywność rybonukleazy trzustkowej. Wątroby szczura i myszy zawierają zbliżone ilości inhibitora, wątroba chomika zawiera znacznie mniej, a wątroba świnki morskiej jedną trzecią ilości znajdującej się w wątrobie szczura. Kraft i Shortman (1970a) wykazali wysoką aktywność inhibitora w wątrobach szczura, myszy, oposa i żmiji. Zasadowa rybonukleaza występuje w wątrobie tych gatunków w formie nieaktywnej. W wątrobie kurczęcia i żaby aktywność inhibitora jest niska, a aktywność rybonukleazy wysoka.

### 1. Metody preparacji i oczyszczenia inhibitora

Roth (1956) pierwszy rozdzielił kompleks rybonukleazy z inhibitorem. Zastosował wysalanie siarczanem amonowym i absorpcję na żelu fosforanowo—wapniowym. Wydzielił on i 10-krotnie oczyścił inhibitor z 44% wydajnością (Roth, 1958a). Inhibitor przechowywany w 0° tracił gwałtownie aktywność.

Shortman (1961) poświęcił wiele uwagi badaniom inhibitora z wątroby szczura. Supernatant z homogenatów wątroby (60 000xg) poddawał chromatografii na DEAE—celulozie i następnie na fosforanie wapnia. Uzyskał preparat inhibitora 6000-krotnie oczyszczony, trwały w temp. od 0—4°, z wydajnością 20%. Homogenizowanie wątroby szczura w 0,25M sacharozie dawało trwalsze i aktywniejsze preparaty, niż homogenizowanie w wodzie. Dializa do wody i rozcieńczanie wodą prowadziły do częściowej inaktywacji inhibitora.

Gribnau i wsp. (1969 i 1970a) do izolacji inhibitora z wątroby szczura zastosowali frakcjonowanie siarczanem amonu, chromatografię na DEAE—*Sephadex* A-50 i filtrację żelową na *Sephadex* G-100. Preparaty inhibitora zachowywały jednak tylko 10% aktywności.

### 2. Właściwości

Roth (1958a) i Shortman (1962a), stwierdzili, że inhibitor z wątroby szczura hamuje krystaliczną rybonukleazę z trzustki bydlęcej i zasadowe rybonukleazy ssaków, nie hamuje natomiast zasadowej rybonukleazy

T<sub>1</sub> z grzybów, zbliżonej właściwościami do rybonukleazy trzustkowej. Hamuje zasadową rybonukleazę z wątroby szczura, nie hamuje lub bardzo słabo kwaśną rybonukleazę z wątroby. Kraft i Shortman (1970a) nie stwierdzili zdecydowanej gatunkowej swoistości inhibitora z wątroby szczura. Inhibitor ten jest termolabilny, nie dializuje, inaktywuje się odczynnikami wiążącymi grupy -SH, takimi jak Pb<sup>++</sup> i chlorortęcio-benzoosan, w stężeniu  $4 \times 10^{-4} M$  (Roth — 1958a, Shortman — 1961, Gribnau i wsp. — 1970b) oraz przez działanie kwasu siarkowego (Roth 1958a). Inhibitor poddany działaniu tych czynników tracił aktywność po 24 godz. W badaniach Shortmana (1962) cysteina, EDTA i fosforany częściowo znoszą wpływ chlorortęciobenzošanu. Działanie Pb<sup>++</sup> znosiły cysteina i siarkowodór.

Możliwość odwracania inaktywacji spowodowanej przez odczynniki wiążące grupy -SH sugeruje, że wolne grupy -SH są istotne dla aktywności inhibitora. Tworzenie dwusiarczkowych wiązań między rybonukleazą i inhibitorem jest jednak niemożliwe, ponieważ rybonukleaza nie posiada wolnych grup -SH. Grupy -SH inhibitora mogą mieć znaczenie w tworzeniu jego drugorzędowej struktury (Roth, 1958b).

Oczyszczone preparaty inhibitora okazały się nietrwałe, nawet przy przechowywaniu w -20° i po zliofilizowaniu, w obecności 10% dekstranu. Najtrwalsze preparaty inhibitora uzyskuje się strącając go w 70% nasycenia siarczanem amonu i przechowując w -20°. Gribnau i wsp. (1969 i 1970a) stosowali z powodzeniem dwutiotreitol i EDTA do stabilizacji inhibitora. Roth (1958a) zastosował do stabilizacji inhibitora zredukowany glutation w stężeniu 1mg/ml. Aktywność inhibitora zmieniała się w zależności od stosowanego buforu i siły jonowej. Najlepszy dla oznaczeń aktywności inhibitora jest bufor fosforanowy o niskiej sile jonowej (Roth, 1962). Ciężar cząsteczkowy inhibitora jest zbliżony do ciężaru cząsteczkowego rybonukleazy. Za białkową naturą inhibitora przemawiają: obecność białka w oczyszczonych preparatach, inaktywacja odczynnikami wiążącymi grupy sulfhydrylowe, termolabilność, duży ciężar cząsteczkowy, trawienie papainą (Shortman 1961), trypsyną i pronazą (Gribnau, 1970b). Inaktywacja nadjodanem i niskimi stężeniami lizozymu przemawia za naturą glikoproteidową inhibitora (Shortman, 1961). Berns i wsp. (1971) wykazali w oczyszczonych preparatach inhibitora aktywność leucylo-aminopeptydazy.

Inhibitor i rybonukleaza tworzą trwałe kompleksy. Gribnau i wsp. (1970b) donoszą, że silny wpływ na tworzenie tego kompleksu wywiera pH i stężenie jonów Mg<sup>++</sup>. Optimum działania inhibitora jest zgodne z optimum RN-azy trzustkowej i przypada na pH 7,0—8,0. Działanie inhibitora znosi protamina (Shortman 1962a).

Inhibitor o właściwościach zbliżonych do inhibitora z wątroby szczura wykazano również w homogenatach z nadnerczy szczura (Girija i Srenivasan — 1960 i Imrie i Hutchison — 1965), oraz z wą-



troby świnki morskiej we frakcji supernatantu 105 000xg (Shortman—1961, Sirakov i Kochakian—1969). W nadnerczach szczura znaczna część inhibitora występuje w stanie wolnym, przewyższając ilość związanej z nim RN-azy.

Girija i Srenivasan (1966) stosując wysalanie siarczanem amonu, absorbcję na żelu fosforanowo—wapniowym i chromatografię na DEAE—celulozie uzyskali 500-krotne oczyszczenie inhibitora z nadnerczy szczura. Podobnie jak inhibitor z wątroby nie dializuje i jest termolabilny.

Sirakov i Kochakian (1969) przedstawili prostą metodę oczyszczania inhibitora z homogenatów wątroby świnki morskiej. Inhibitor wysalał się z frakcji supernatantu 105 000xg między 0—40% nasycenia siarczanem amonu. Poddany sączeniu na żelu *Sephadex* G-100 daje dwa szczyty o aktywności inhibitora. Jeden ze szczytów wykazuje również aktywność rybonukleazową. Inhibitor był nietrwały. W temp. 4° tracił w ciągu 12 godz. 50% aktywności. Aktywność inhibitora nie zmieniała się przy podwyższeniu temp. do 50°, lecz gwałtownie malała w temp. 60°. Fosforany w wysokim stężeniu inaktywują inhibitor. Ochronny wpływ na inhibitor z wątroby świnki morskiej wywiera glicyna. Stabilizuje jego aktywność w 4° w buforze fosforanowym i chroni przed niszczącym wpływem mocznika.

### 3. Występowanie

Roth i Bachmurski (1957) zbadali układ RN-azy i jej inhibitora w serii jaj i sperm zwierząt morskich. Największe stężenie inhibitora wykazali w jajach i spermie *Chaetopterus*.

Rost i wsp. (1959) opisali inhibitor rybonukleazy w erytrocytach ssaków, różny od inhibitora z wątroby szczura. Priess i Zillig (1967) stosując wysalanie siarczanem amonu oczyścili 100-krotnie inhibitor z króliczych retikulocytów. Inhibitor z reticulocytów hamuje niekompetytywnie RN-azę trzustkową, nie hamuje natomiast RN-azy z *Escherichia coli* i RN-azy T<sub>1</sub>. Jest to prawdopodobnie białko o ciężarze cząsteczkowym między  $5 \times 10^4$  i  $1 \times 10^5$ . Obecność podobnych inhibitorów wykazali autorzy w erytrocytach królika, świnki i owcy, lecz nie wykazali ich u bydła.

Kraft i Shortman (1970b) donoszą o występowaniu naturalnego inhibitora w ludzkich i szcurzych erytrocytach oraz w limfocytach szczura. Poziom inhibitora w erytocytach jest wyższy u zwierząt starych, natomiast poziom jego w limfocytach spada w miarę starzenia się zwierzęcia, co pozwala obserwować wzrost stężenia zasadowej RN-azy. Ci sami autorzy nie stwierdzili obecności inhibitora w limfocytach i fagocytach ludzkich.

Burka (1968) donosi o hamowaniu RN-azy erytrocytów przez heminę. Hemina znacznie słabiej hamuje RN-azę trzustkową.



Dickman i wsp. (1960) w obrazie chromatograficznym fosforanowych ekstraktów trzustki myszy i wołu zauważyli dodatkowy szczyt, który nie występował w przypadku ekstrakcji tych trzustek 0,25N kwasem siarkowym. Szczyt ten może zawierać rybonukleazę związaną z jakimś kwaśnym materiałem, o naturze inhibitora RN-azy.

Bardoń i Pamuła (1969) donoszą o występowaniu naturalnego inhibitora RN-azy w łożysku ludzkim. Inhibitor ten można było usunąć z kompleksów z zasadową RN-azą łożyska przez działanie kwasem sulfosalicylowym. Inhibitor nie ekstrahuje się tym kwasem lub jest przez kwas niszczoney.

Maskos i wsp. (1971) zaobserwowali obecność inhibitora rybonukleazy w białkach ekstrahujących się z mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego kwasem trójchlorooctowym lub sulfosalicylowym.

Brenheimer i Steele (1955) donoszą o występowaniu inhibitora RN-azy w liściach bzu lilaka. Inhibitor ten okazał się termostabilną dializującą substancją, a więc różną od inhibitora z wątroby szczura. Podobną substancję zaobserwowali również w liściach ligustru. Inhibitor z liści bzu hamował rybonukleazę trzustkową, rybonukleazę z *Asclepias* i *Lathyrus*.

Jedynym lepiej poznanym białkowym inhibitorem rybonukleazy w świecie drobnoustrojów jest inhibitor z *Bacillus subtilis*. Smeaton i Elliot (1967) wyizolowali i 1000-krotnie oczyścili inhibitor z kultur tych bakterii. Oczyszczony inhibitor jest stabilny w szerokim zakresie pH.

Najczystsze preparaty inhibitora zawierają 35% kwasu glutaminowego i asparaginowego i 18% glukozyaminy. Ciężar cząsteczkowy wynosi 12 500, a więc jest niewiele wyższy od ciężaru cząsteczkowego RN-azy z *Bacillus subtilis*. Inhibitor trawi się całkowicie pepsyną i trypsyną, wolniej proteazą z *B.subtilis*, nie ulega natomiast zupełnie wpływowi trypsyny, chymotrypsyny, RN-azy trzustkowej, DN-azy i neuraminidazy. W przeciwieństwie do inhibitora z wątroby szczura (Breslow i Girotti, 1966) nie inaktywuje się nadjodanem, odczynnikami wiążącymi grupy -SH oraz wysokimi stężeniami soli. Jest termostabilny. Bakteryjny inhibitor rybonukleazy hamuje wyłącznie rybonukleazę wydzielaną na zewnątrz komórki, nie hamuje RN-azy trzustkowej oraz RN-azy T<sub>1</sub> z *Aspergillus oryzae*. Autorzy wykazali, że inhibitor gromadzi się w komórce bakteryjnej, a intensywność jego produkcji jest równa intensywności produkcji RN-azy wydzielanej na zewnątrz komórki. Zdaniem autorów enzym i inhibitor tworzą kompleks. Mało prawdopodobne jest aby tworzenie kompleksu polegało jedynie na interakcji jonowej, ponieważ dodanie w nadmiarze siarczanu protaminy nie wpływa na hamowanie. Bakteryjny inhibitor podobny jest więc do białkowego inhibitora ssaków, ale jego kompleks z enzymem różni się stabilnością.

#### 4. Rola naturalnego inhibitora

Układ wewnątrzkomórkowych rybonukleaz i ich naturalnego inhibitora spełnia ważną rolę w kontroli i regulacji metabolizmu kwasów nukleinowych oraz w syntezie białka w komórce. Dla wyjaśnienia tej funkcji badano zachowanie się inhibitora w różnych stanach fizjologicznych zwierzęcia.

Shortman (1962b) badał aktywność inhibitora w wątrobie szczura regenerującej po częściowej hepatektomii. Wykazał on, że w 48 godzinie po hepatektomii aktywność inhibitora wzrasta o 140%. Wzrost stężenia inhibitora poprzedza wzrost ilości RNA. Analogiczną sytuację spotyka się w nadnerczach szczura, gdzie Imrie i Hutchison (1965) zaobserwowali po podaniu ACTH gwałtowny wzrost zawartości inhibitora. Podaniu ACTH towarzyszyło obniżenie szybkości rozkładu RNA równoległe z obniżeniem aktywności RN-azowej.

Z ostatnich prac wynika, że stosunek inhibitor—zasadowa RN-aza jest wysoki w tkankach charakteryzujących się wysokim poziomem RNA. Stosunek ten maleje wtedy, gdy spada synteza białka lub nasilają się procesy kataboliczne (Kraft i Shortman, 1970).

Jacobson i Webb (1952), Barron (1953), Groth (1956) i Brody (1957) wykazali bezpośrednią zależność między aktywnością rybonukleazową, a tempem podziałów komórkowych. W skrajnie szybko rozmnażającej się tkance jaką jest wątrobiak Novikoffa, aktywność inhibitora jest niższa niż u normalnego zwierzęcia, natomiast w innych wątrobiakach aktywność inhibitora wzrasta o 200% (Roth, 1962). Mózg i wątroba, zawierające najwyższą ilość inhibitora charakteryzują się małą liczbą podziałów komórkowych.

Kontrolowanie poziomu komórkowego RNA i pośrednio syntezy białka rozważa się na poziomie aktywności genu polimerazy RNA, lub syntezy nukleotydów. Kraft i Shortman (1970b), potwierdzili przypuszczenia, że kontrola degradacji RNA może odbywać się przez regulację aktywności rybonukleazowej. Polisomy izolowane z szeregu tkanek są nietrwałe w obecności endogennej RN-azy.

Berns i wsp. (1971), Bont i wsp. (1965) oraz Blobel i Potter (1966) zastosowali inhibitor rybonukleazy z wątroby szczura jako czynnik ochronny w uzyskiwaniu nienaruszonych polisomów i podjednostek rybosomowych. Roth (1962) zakłada możliwość wiązania inhibitora z mikrosomami i przypuszczalnie rybosomami, a jego rolę wiąże z przemianą RNA, szczególnie t-RNA i m-RNA.

Kraft i Shortman (1970b), zbadali i porównali poziom RN-azy i jej inhibitora w komórkach. W wyniku swych badań wnioskuje, że zachodzi zależność między poziomem cytoplazmatycznego RNA, aktywnością RN-azy i jej inhibitora. Badając limfocyty ludzkiej krwi obwodowej stwierdzili, że charakteryzują się one niskim poziomem cytoplazmatycz-



nego RNA oraz względnie niską syntezą białka i RNA. Limfocyty nie zawierają inhibitora i ich zasadowa RN-aza występuje w wolnym aktywnym stanie. W limfocytach stymulowanych fitohemaglutyniną nasilają się procesy biosyntezy RNA i białka oraz pojawia się inhibitor rybonukleazy.

Rola inhibitora może polegać również na inaktywowaniu rybonukleaz, które dyfundują z mitochondriów lub lizosomów do cytoplazmy. Smeaton i Elliot (1967) przypisują taką funkcję inhibitorowi u *Bacillus subtilis*.

## II. Jony metali

Wielu autorów zajmuje się badaniem wpływu jonów metali na aktywność rybonukleaz. Wyniki otrzymane przy zastosowaniu rybonukleazy trzustkowej i innych rybonukleaz tkankowych różnią się znacznie. Największe różnice obserwuje się w badaniach surowych homogenatów tkankowych. Najlepiej zbadano rybonukleazę z trzustki bydłowej i z wątroby szczura. Odmienne wyniki otrzymuje się badając tę samą RN-azę z zastosowaniem różnych preparatów RNA.

Eichel (1962), Shortman (1962), Wojnar i Roth (1964) wyjaśnili różnice występujące w oznaczaniu poziomu rybonukleazy i jej cytoplazmatycznego inhibitora. Okazało się, że handlowe preparaty RNA są w różnym stopniu zanieczyszczone jonami metali. Autorzy zidentyfikowali metale i sprawdzili ich wpływ na rybonukleazę i jej cytoplazmatyczny inhibitor. Spośród wykazanych w RNA metali, miedź i cynk znoszą działanie inhibitora już w bardzo małych stężeniach, podczas gdy do zainaktywowania rybonukleazy konieczne są znacznie wyższe stężenia. Efekt inhibitora wykazano dla prawie wszystkich dwuwartościowych kationów. Wyniki badań do 1961 roku zebrali Anfinsen i White w „The Enzymes” tom V.

Najbardziej sprzeczne dane dotyczą wpływu kationów  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$ . O jonach  $\text{Mg}^{++}$  wiadomo, że hamują, aktywują, lub nie mają wpływu na aktywność rybonukleazy. Jon  $\text{Ca}^{++}$  wymienia się jako inhibitor, lub pozostający bez wpływu. Ogólnie przyjęto, że jony  $\text{Mg}^{++}$  hamują rybonukleazy zasadowe (Roth—1954, Rahman—1966, Bardoń—1967), zwiększają natomiast aktywność rybonukleaz kwaśnych (Zenzian, 1967).

Morril i wsp. (1969) zbadali wpływ jonów wapnia i magnezu na enzymatyczną degradację wysokopolimeryzowanego RNA drożdżowego, w warunkach doświadczalnych zbliżonych do panujących wewnątrz komórki (pH 7,2, stężenie jonów od 0,01mM do 10,0mM, zbliżone stężenie kationów jednowartościowych i stężenie RNA). Jony  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$  okazały się kompetytywnymi inhibitorami rybonukleazy. Jon  $\text{Ca}^{++}$  hamuje 50 razy silniej niż jon  $\text{Mg}^{++}$ .



Enzymatyczna degradacja RNA może być hamowana przez fizjologiczny poziom  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$  w wielu komórkach i tkankach. Ochronna rola  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$  wiąże się z odkryciem dużych ilości tych metali, szczególnie  $\text{Ca}^{++}$  w RNA izolowanym z różnych źródeł. Małe różnice w ilości jonu wapnia związanego z RNA mogą dawać znaczne zmiany w jego enzymatycznej degradacji. Aktywność RN-azowa w komórce może zależeć natomiast nie tylko od poziomu jonów wapnia i magnezu, lecz również od zdolności reagowania tych jonów z innymi składnikami komórki, np. fosfolipidami i DNA.

Nishimura i Novelli (1963) zaobserwowali hamowanie trawienia t-RNA przez rybonukleazę trzuskową i rybonukleazę z *Bacillus subtilis*, w obecności 10mM  $\text{Mg}^{++}$ . Przy zastosowaniu wysokopolimeryzowanego RNA obserwowali tylko 50% hamowania. Potwierdza to wyniki otrzymane przez Morrill i wsp. (1969), że jony wapnia lepiej chronią t-RNA.

Skrajnie różne wyniki działania jonów dwuwartościowych uzyskali Takahashi i wsp. (1967) i Eichhorn i wsp. (1969). Pierwsi stosując jako substrat 2',3'-cytydynomonofosforan i benzylo-3'-fosforan stwierdzili hamowanie rybonukleazy A przez  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  i  $\text{Hg}^{++}$ , w pH 7, przy stężeniu jonów  $10^{-4}$  do  $10^{-3}$ M. Przy tym stężeniu jon  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mn}^{++}$  wykazywały słaby wpływ.

Eichhorn i wsp. (1969) stosując jako substrat RNA w pH 5 i stężenie jonu  $10^{-4}$ M, stwierdzili aktywację rybonukleazy jonami  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$  i  $\text{Ni}^{++}$ . Przy wzrastającym stężeniu obserwowali oni hamujący wpływ dla wszystkich badanych jonów. Stwierdzili również, że niezależnie od użytego jonu, aktywacja reakcji następuje przy stężeniu jonu około  $10^{-4}$ M. Stężenie jonu metalu hamujące hydrolizę zależy od użytego metalu i wynosi  $10^{-3}$ M dla  $\text{Cu}^{++}$ , do około  $10^{-1}$ M dla  $\text{Mn}^{++}$ . Wszystkie badane przez nich dwuwartościowe kationy w stężeniu  $10^{-5}$ M, nie wpływały na aktywność enzymu. Wraz ze wzrostem stężenia kationu wzrastała aktywność enzymu, aż do osiągnięcia optimum stężenia kationu, powyżej którego aktywność enzymu maleje, aż do jego kompletnej inaktywacji.

Autorzy tłumaczą to zjawisko istnieniem w cząsteczce enzymu dwóch miejsc wiążących metal: „aktywującego” i „hamującego”. Przyłączenie metalu do jednego z nich aktywuje, a do drugiego hamuje enzym. Przy niskich stężeniach metalu zajmowane jest pierwsze z miejsc, a przy wyższych drugie. O naturze tych miejsc wiadomo jednak mało.

Aktywacja i inhibicja reakcji enzym—substrat może zależeć również od interakcji metalu z substratem. Znana jest hydroliza RNA w nieobecności RN-azy katalizowana przez przyłączenie dwuwartościowych jonów metalu do fosforanów (Eichhorn i Shin—1968, Huff i wsp.—1964). Jony metalu wiążą się w dwóch miejscach z cząsteczką kwasu nukleinowego, a mianowicie z grupą fosforanową i zasadami azotowymi. Niskie stężenia jonów faworyzują wiązanie fosforu, wyższe natomiast

wiązanie zasad. Nieenzymatyczna degradacja RNA powodowana wiązaniem jonów metali z fosforanami jest hamowana przez wiązanie jonów metali z zasadami. Wiązanie jonów dwuwartościowych z RNA i DNA może wynikać ze zniszczenia międzynukleotydowych wiązań wodorowych i rozfaldowania cząsteczki (Eichhorn i Shin — 1968, Hiai — 1965).

Breslow i Girotti (1966), Girotti i Breslow (1968a i 1968b) badając interakcję trzustkowej RN-azy A z jonami  $Zn^{++}$  i  $Cu^{++}$ , w obecności i nieobecności kwasu cytydylowego, próbowali określić miejsca, w których cząsteczka rybonukleazy wiąże te jony. Istnieje pięć miejsc w łańcuchu RN-azy, które mogą wiązać metal. Cztery z tych miejsc (oznaczone doświadczalnie) zawierają jeden z czterech imidazoli rybonukleazy i azot sąsiedniego wiązania peptydowego. Piąte miejsce to N-końcowy aminokwas (Girotti i Breslow, 1970).

W obecności kwasu cytydylowego wiązanie  $Cu^{++}$  i  $Zn^{++}$  jest silniejsze. Breslow i Girotti (1970) badali również wpływ kwasu 2'-CMP i 3'-CMP na wiązanie jonów miedzi z rybonukleazą oraz wpływ tych jonów na wiązanie rybonukleazy z 2'-CMP i 3'-CMP. Wiązanie 2'-CMP z rybonukleazą osłabia jej zdolność do wiązania jonów miedzi i na odwrót wiązanie jonów miedzi zmniejsza jej czułość na 2'-CMP, co wynika z konkurencji między 2'-CMP, a  $Cu^{++}$  o najsilniej wiążące miejsce w rybonukleazie. Wiązanie 3'-CMP z rybonukleazą zwiększa jej wrażliwość na działanie  $Cu^{++}$ , podobnie przyłączenie miedzi do rybonukleazy zwiększa jej wrażliwość na 3'-CMP. Analiza wiązania  $Cu^{++}$  z kompleksem 3'-CMP — RN-aza wskazuje na kooperatywną interakcję między dwoma miejscami wiążącymi  $Cu^{++}$  i kompleksem 3'-CMP — RN-aza. Jedno z tych miejsc może wiązać grupy fosforanowe 3'-CMP. Badania NMR potwierdziły udział His—12 i His—119. Inhibicję RN-azy spowodowaną wiązaniem jonów metali z His—12 i His—119 opisali również Eichhorn i wsp. (1969).

### III. Wielkocząsteczkowe polianiony

Sekine i wsp. (1969) stwierdzili, że DNA grasicowy hamuje kompetywnie aktywność trzustkowej RN-azy, przy czym zdenaturowany DNA łączy się z RN-azą w stosunku 100 razy wyższym niż natywny DNA. W niskiej sile jonowej RN-aza tworzy rozpuszczalny kompleks z DNA w szerokim zakresie  $pH$ . W niskich wartościach  $pH$  powstają kompleksy nierozpuszczalne. Wpływ  $pH$  na tworzenie kompleksów świadczy o kulombowskim oddziaływaniu między RN-azą i DNA. Kompleks rozpuszczalny tworzy się w warunkach, w których rybonukleaza ma tylko kilka ładunków dodatnich. W niskich wartościach  $pH$ , gdzie istnieje możliwość większej ilości dodatnich ładunków kompleks staje się nierozpuszczalny. Zdenaturowany DNA z grasicy cielęcej, mleczka łososia lub faga  $P_{22}$  hamuje o wiele silniej oczyszczoną RN-azę I z *Salomonella typhimurium*



w obecności poliA, lub poliU, niż rodzimy. Do całkowitego zahamowania trzeba około 20 do 40 razy mniej DNA zdenaturowanego niż rodzimego. Hamowanie jest odwracalne w obecności 0,2M KCl. RN-aza z *Salmonella typhimurium* jest czulsza na działanie zdenaturowanego DNA niż RN-aza trzustkowa. Stopień hamowania RN-azy zdenaturowanym DNA z grasicy zależy od substratu i jest niski, gdy jako substratu używa się t-RNA lub RNA (Mukhopadhyay i Burma, 1969).

Roth (1953), Zöllner i Fellig (1953), Vanderdrische (1956) oraz Houck (1957) badali hamowanie RN-azy przez anionowe polimery takie jak heparyna i fosforan polifloretyny. Autorzy ci uważają, że związki te zachowują się jak kompetytywne inhibitory rybonukleazy. W przypadku heparyny konkurencja zachodzi między sulfonowymi grupami heparyny i zdysocjowanymi drugorzędowymi grupami fosforanowymi kwasu nukleinowego (Zöllner i Fellig, 1953). Wykazano, że heparyna hamuje obie fazy działania RN-azy trzustkowej na RNA tj. fazę gwałtownego rozszczepienia fosfodwuestrowych wiązań z utworzeniem 2',3'-cyklicznych nukleozydofosforanów i fazę drugą wolniejszą, hydrolizy 2',3'-fosfodwuestrowych wiązań z utworzeniem kwasów 3'-nukleozydofosforowych. Vanderdrische (1956) zaobserwował, że etap drugi jest hamowany silniej. Hummel i wsp. (1958) donoszą o hamowaniu przez fosforan poliksenylu hydrolizy 2',3'-cyklicznego fosforanu, rybonukleazą trzustkową. Hamowania nie zaobserwowali przy zastosowaniu jako substratu RNA. Vanderdrische (1956) donosi również, że polianiony są efektywniejszymi inhibitorami wobec 2',3'-cyklicznych fosforanów niż wobec RNA. Hamujący wpływ polianionu znosi dodanie polikationu (Brenfeld, 1965). Dodanie poli-L-ornityny znosi działanie kwasu poli-L-asparaginowego (Vanderdrische — 1956, Modesti i wsp. — 1963). Działanie heparyny i siarczanów poliglukozowych znosi dodanie protaminy. W badaniach Rotha (1953), Vanderdrische (1956), De Lamirande (1953) heparyna hamowała 4 razy słabiej RN-azy zasadowe, niż kwaśne. Roth (1953) obserwował hamowanie rybonukleazy przez treburon, syntetyczny kwas poligalakturonowy.

#### IV. Nukleotydy

Davis i Allen (1955) stwierdzili, że nukleotydy pirymidynowe silniej hamują enzym niż nukleotydy purynowe. Jako substrat zastosowali 2',3'-cytydynofosforan. Adenozyno-2'-fosforan hamował silniej niż adenozyno-5'-fosforan. Urydyna i uracyl nie wpływały na aktywność rybonukleazy.

Hummel i wsp. (1958) zaobserwowali konkurencyjne hamowanie enzymatycznej hydrolizy cyklicznego cytydynofosforanu przez kwas 2'-



cytydylowy, nie zaobserwowali natomiast hamowania hydrolizy kwasu nukleinowego z drożdży.

Yamasaaki i wsp. (1970a, 1970b) obserwowali silne hamowanie RN-azy z *B.subtilis* przez niskie stężenia ATP i dATP. Hamowanie to jest silniejsze w pH 7, niż w pH 5,7. 10mM ATP hamuje oczyszczoną RN-azę z *B.subtilis* w 90% (Yamasaaki i wsp., 1970a). ADP, GTP i GDP są mniej efektywnymi inhibitorami RN-azy z *B.subtilis*. Hamowanie rybonukleazy przez ATP może wynikać ze zmian w konformacji enzymu, wywołanych przez elektrostatyczny efektor. ATP może spełniać rolę naturalnego regulatora aktywności wewnątrzkomórkowej rybonukleazy. W zbyt wysokich stężeniach również substrat hamuje działanie rybonukleazy. Hamujący wpływ substratu, można znieść przez podwyższenie siły jonowej środowiska. Wzrost siły jonowej i pH środowiska powoduje dysocjację grup kwaśnych w RNA (Edeloch i Coleman, 1956).

Aktywność rybonukleazy zależy od stopnia dysocjacji RNA. Hamowanie substratem wynika z wiązania słabo zdysocjowanego RNA z enzymem. Tłumaczy to wpływ siły jonowej na hamowanie rybonukleazy przez substrat. Dickman i wsp. (1956) podkreślają istotne znaczenie dokładnego określenia siły jonowej, dla otrzymywania powtarzalnych wyników, przy oznaczaniu aktywności rybonukleazowej oraz jej aktywatorów i inhibitorów.

Dickman i Ring (1958) ustalili maksimum aktywności enzymu wobec RNA jako substratu, przy sile jonowej 0,1, a wobec substratów syntetycznych przy sile jonowej 0,35.

Aktywność rybonukleaz hamują ponadto odczynniki utleniające, odczynniki redukujące i kompleksujące, odczynniki wiążące grupy -SH i wiele innych związków organicznych. RN-aza z *B.subtilis* jest wrażliwa na działanie EDTA (Yamasaaki i wsp. — 1970a, Lazarius i Sherbaurum — 1967). Zasadowa RN-aza o optimum pH 9,5 jest silnie hamowana przez EDTA. Hamowanie spowodowane EDTA można znieść odpowiednimi stężeniami jonów  $Mg^{++}$  i  $Mn^{++}$  (Rahman — 1966). EDTA, glicyna i histydyna aktywują zasadową rybonukleazę z trzustki bydłowej (Dickman i wsp. — 1954). Aktywujący wpływ EDTA może wynikać z kompleksowania dwuwartościowych kationów, które zanieczyszczają handlowe preparaty RNA i hamują aktywność rybonukleazy.

Roth (1953) donosi o hamowaniu RN-azy przez 2-aminobenzimidazol. Benzimidazol i 5,6-dwumetylobenzimidazol powodowały w jego doświadczeniach wzrost aktywności rybonukleazowej. Masart i wsp. (1947) obserwowali hamowanie RN-azy przez akrydynę i inne zasadowe barwniki. Inhibitorami RN-azy są również antybiotyki: penicylina (Gerotti, 1949), streptomycyna (Massart i wsp., 1948). Gerotti (1949) obserwował również aktywujący wpływ penicyliny na enzym. W doświadczeniach Dickmana i wsp. (1956) anionowe detergenty hamują, kationo-

we stymulują, a niejonowe pozostają bez wpływu na aktywność enzymu. Zasadowa rybonukleaza o optimum działania w  $pH$  9,5, dla wykazania maksymalnej aktywności wymaga natomiast obecności niejonowego detergentu Tritonu X-100 (Rahman, 1966).

Pani Profesor dr Wandzie Mejbaum-Katzenellenbogen serdecznie dziękuję za konsultacje i pomoc okazaną mi w czasie przygotowywania i opracowywania zbranego materiału do druku.

#### LITERATURA

1. Anfinsen C. B., White F. H., w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., Academic Press, New York 1961, tom V, str. 95.
2. Bardoń A., *Post. Biochem.* **13**, 389 (1967).
3. Bardoń A., Pamuła Z., Hilar M., *Acta Biochim. Pol.* **16**, 19 (1969).
4. Bardoń A., Rzeczycki W., *Acta Biochim. Pol.* **12**, 217 (1966).
5. Barron E. S. G., *Texas Rep. Biol. Med.* **11**, 653 (1953).
6. Berns A. J., Zweers A., Gribnau A. A. M., Bloemendal H., *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 62 (1971).
7. Blobel G., Potter V. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **155**, 1283 (1966).
8. Bont W. S., Rozelman G., Bloemendal H., *Biochem. J.* **95**, 15C (1965).
9. Brenfeld P., w *Metabolic Inhibitors*, Academic Press, London, New York 1965, tom XII, str. 437.
10. Breslow E., Girotti A. W., *J. Biol. Chem.* **241**, 5651 (1966).
11. Breslow E., Girotti A. W., *J. Biol. Chem.* **245**, 1527 (1970).
12. Brenheimer A. W., Steele J. M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**, 123 (1955).
13. Brody S., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 216 (1957).
14. Burka E. R., *Science* **162**, 1287 (1968).
15. Cerotii G., *Nature* **163**, 874 (1949).
16. Davis F., Allen F., *J. Biol. Chem.* **217**, 13 (1955).
17. De Lamirande G., Allard C., De Costa C. M., Cantero A., *Science* **119**, 351 (1954).
18. Dickman S. R., Aroskar J. P., Kropf R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 539 (1956).
19. Dickman S. R., Kropf R., B., Aroskar J. P., Abst. Ann. Chem. Soc., 126<sup>th</sup> Meeting, New York 1954.
20. Dickman S. R., Morrill G. A., Trupin K. M., *J. Biol. Chem.* **235**, 169 (1960).
21. Dickman S. R., Ring B., *J. Biol. Chem.* **231**, 741 (1958).
22. Edeloch H., Coleman J., *J. Biol. Chem.* **219**, 351 (1956).
23. Eichel H. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **109**, 804 (1962).
24. Eichhorn G. L., Clark P., Tarien E., *J. Biol. Chem.* **244**, 937 (1969).
25. Eichhorn G. L., Shin Y. A., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 7323 (1968).
26. Giriha N. S., Srenivasan A., *Biochem. J.* **98**, 562 (1966).
27. Gribnau A. A. M., Schoenmakers J. G. G., Bloemendal H., *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 48 (1969).
28. Gribnau A. A. M., Schoenmakers J. G. G., Kraaikamp M., Bloemendal H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 1064 (1970a).
29. Gribnau A. A. M., Schoenmakers J., Kraaikamp M., Hilak M., Bloemendal H., *Biochim. Biophys. Acta* **224**, 55 (1970b).
30. Girotti A. W., Breslow E., *J. Biol. Chem.* **243**, 26 (1968a).
31. Girotti A. W., Breslow E., *J. Biol. Chem.* **243**, 216 (1968b).

32. Girotti A. W., Breslow E., *J. Biol. Chem.* **245**, 3066 (1970).
33. Groth D. P., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 18 (1956).
34. Henrikson R. L., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **238**, 2421 (1963).
35. Hiai S., *J. Mol. Biol.* **11**, 672 (1965).
36. Houck J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 649 (1957).
37. Huff J. W., Sastry K. S., Gordon M. P., Wacker W. E. C., *Biochemistry* **3**, 501 (1964).
38. Hummel J. P., Flores M., Nelson G., *J. Biol. Chem.* **233**, 717 (1958).
39. Imrie R. C., Hutchison W. C., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 106 (1965).
40. Jacobson W., Webb M., *Exp. Cell. Res.* **3**, 163 (1952).
41. Kraft N., Shortman K., *Austr. Biol. Sci.* **23**, 175 (1970a).
42. Kraft N., Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **217**, 164 (1970b).
43. Lazarus L. K., Scherbaum O. H., *Biochim. Biophys. Acta* **142**, 368 (1967).
44. Maskos Ch., Kozubek A., Łomako W., Materiały IX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 1971, str. 58.
45. Massart L., Paeters G., Vanhoucke A., *Experientia* **3**, 494 (1947).
46. Massart L., Peeters G., Lagrain A., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **76**, 72 (1948).
47. Modest E. J., Poley G. E., Farber S., w *Metabolic Inhibitors*, Academic Press, London, New York 1963, t. I, str. 75.
48. Morrill G. A., Reiss N. M., *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 43 (1969).
49. Mukhopadhyay A. K., Burma D. P., *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 232 (1969).
50. Nelson C. A., Hummel J. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 3173 (1961).
51. Nishimura S., Novelli G. D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 161 (1963).
52. Pirotte M., Desreux V., *Bull. Soc. Chim. Belg.* **61**, 167 (1952).
53. Priess H., Zillig W., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **384**, 817 (1967).
54. Rahman Y. E., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 470 (1966).
55. Rahman Y. E., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 477 (1967).
56. Rost G., Hahn H., Vierck G., *Acta Biol. Med. Germ.* **3**, 276 (1959).
57. Roth J. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **44**, 265 (1953).
58. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **208**, 181 (1954).
59. Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 34 (1956).
60. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **231**, 1085 (1958a).
61. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **231**, 1097 (1958b).
62. Roth J. S., Bachmurski D., *Biol. Bull.* **113**, 332 (1957).
63. Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 903 (1962).
64. Sekine H., Nakano E., Sakaguchi K., *Biochim. Biophys. Acta* **174**, 202 (1969).
65. Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 37 (1961).
66. Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 88 (1962a).
67. Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 50 (1962b).
68. Sirakov L. M., Kochakian C. D., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 572 (1969).
69. Smeaton J. R., Elliot W. H., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 547 (1967).
70. Takahashi T., Imrie M., Ukita T., *J. Biochem.* **61**, 669 (1967).
71. Wojnar R. J., Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 17 (1964).
72. Vanderdrische L., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 347 (1956).
73. Yamasaki M., Yoshida K., Arima K., *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 463 (1970a).
74. Yamasaki M., Arima K., *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 475 (1970b).
75. Zendzian E. N., Barnard E. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 669 (1967).
76. Zöllner N., Fellig J., *Am. J. Physiol.* **173**, 233 (1953).





STEFAN KALBARCZYK \*

## Niektóre hipotezy dotyczące mechanizmu działania egzogenicznego, zwierzęcego DNA na ssaki

### Some Hypotheses Concerning the Mechanism of Action of Exogenous Animal DNA on Mammals

The following hypotheses are discussed: 1) extraintestinally introduced DNA is utilized as a matrix; 2) its fragments are used for repairing the damaged recipient DNA; 3) fragments of the administered biopolymer disturb the replication by integrating with endogenous DNA; 4) micromolecular products of disintegration of exogenous DNA stimulate the synthesis of acceptor DNA; 5) the administered biopolymer acts as a protecting agent; 6) exogenous DNA, by reacting with histones or other inhibitors of matrix activity of recipient DNA favours the derepression of the latter.

#### I. Wstęp

Liczne badania wskazują, że wysokopolimeryzowany DNA, pochodzenia zwierzęcego, wprowadzony do hodowli komórek, albo podany pozajelitowo ssakom może być zaabsorbowany przez komórki w postaci wielkocząsteczkowej (9, 31, 33, 39, 41, 53).

Zaobserwowano, że u zwierząt, napromienionych śmiertelnymi dawkami promieni X lub gamma — które otrzymały pozajelitowo wysokopolimeryzowany DNA — procesy: syntezy kwasów nukleinowych (6, 8, 20), proliferacji (25, 31, 43, 46) oraz różnicowania się (3, 46) komórek są pobudzone, odnowa tkanek przebiega szybciej (19, 41, 47, 49), następuje poprawa składu krwi obwodowej (13, 46, 47) i śmiertelność zwierząt obniża się (21) w porównaniu z kontrolą.

Badania wykonane na napromienionych hodowlach różnych komórek zwierzęcych (27, 41, 55), dostarczyły informacji potwierdzających dane uzyskane *in vivo*.

W normalnych organizmach ssaków, po dootrzewnowym wprowadzeniu DNA, stwierdzono m.in.: pobudzenie fagocytarnej aktywności układu siateczkowo—śródbłonkowego (5), zwiększenie częstości aberacji chromo-

\* Doktor nauk przyrodniczych, Warszawa.

somowych (18, 26) oraz podwyższenie syntezy DNA (20). To ostatnie zjawisko zaobserwowano również w doświadczeniach wykonanych na izolowanych jądrach komórkowych (45).

Wykazano również, że w hodowlach komórek ssaków egzogeniczny DNA powoduje fenotypowe ekspresje genetyczne (10, 30) oraz transformacje (33, 53).

Istnieją też dane świadczące, że obcy DNA hamuje rozwój złośliwych nowotworów (12, 44).

Materiał informacyjny, dotyczący wpływu na ssaki wprowadzonego pozajelitowo, zwierzęcego DNA jest już dość obszerny. Jednakże mechanizm działania tego biopolimeru nie został poznany.

## II. Wykorzystanie egzogenicznego DNA do naprawy uszkodzonego DNA biorcy oraz jako matrycy

Stosunkowo najwięcej danych o skutkach działania egzogenicznego, zwierzęcego DNA na ssaki uzyskano w badaniach napromienionych organizmów lub hodowli komórek. Dane te mają duże znaczenie dla medycyny, ponieważ wskazują, że wprowadzony z zewnątrz DNA może pobudzać procesy odnowy tkanek w których nastąpiło zniszczenie, jak również zahamowanie czynności, lub inne zaburzenia aparatu genetycznego różnego rodzaju komórek.

Pierwsza hipoteza, dotycząca mechanizmu działania egzogenicznego DNA na napromienione organizmy została opracowana przez K a n a z i r a i wsp. (22—24, 41). Według tej hipotezy fragmenty podanego biopolimeru, o odpowiedniej sekwencji zasad, mogą zastępować uszkodzone przez promieniowanie odcinki cząsteczek DNA biorcy. W ten sposób następowałaby naprawa aparatu genetycznego komórek stanowiąca pierwszy etap w pobudzaniu procesów odnowy tkanek.

Hipoteza ta, określona później mianem „genetycznej rekombinacji” (41), opiera się przede wszystkim na doświadczeniach P a n j e v a c a (40), K a n a z i r a (24, 41) i ich współpracowników. W doświadczeniach tych zaobserwowano, że po dootrzewnowym podaniu szczurom, napromienionym dawkami 700, 800 i 850 R promieni X, wysokopolimeryzowanego, allogenicznego, natywnego DNA z wątroby i śledziony śmiertelność zwierząt ulega obniżeniu. Również ciężar ich ciała i zawartość kwasów nukleinowych w śledzionach są większe niż u napromienionych zwierząt kontrolnych. W tych samych doświadczeniach allogeniczny DNA z jąder, ksenogeniczny, zdenaturowany i zdegradowany przez nukleazy DNA oraz zasady purynowe i pirymidynowe okazały się nieskuteczne.

Według hipotezy „genetycznej rekombinacji” działanie egzogenicznego DNA jest swoiste, zależne od jego pochodzenia i sekwencji zasad w cząsteczkach.



Do poglądu tego skłaniają się również Libinzon i wsp. (31, 32). Wprowadzając normalnym i napromienionym szczurom dootrzewnowo allogeniczny DNA, znaczone promieniotwórczym fosforem —  $P^{32}$ , badacze ci wykonali obszerne obserwacje dotyczące wykorzystania podanego biopolimeru w różnych narządach biorców (31). Doświadczenia te wskazują, że w pierwszych kilku, lub kilkunastu godzinach (zależnie od narządu) znaczna część zaabsorbowanego w tkankach obcego DNA występuje w postaci wysokopolimeryzowanej. Ulega on stopniowej depolimeryzacji, a produkty rozpadu są wykorzystywane do syntezy endogenicznych kwasów nukleinowych.

W szpiku napromienionych szczurów, które otrzymały DNA zaobserwowano, w porównaniu z napromienionymi zwierzętami kontrolnymi, podwyższenie aktywności mitotycznej w okresie do 24 godzin po podaniu biopolimeru, a następnie znaczne zwiększenie liczby komórek (31). Należy podkreślić, że pobudzenie proliferacji komórek zaznaczyło się tylko we wczesnym okresie po wprowadzeniu allogenicznego preparatu, a więc wówczas gdy obcy DNA występował w tkankach w postaci wielkocząsteczkowej. Natomiast w późniejszym okresie, gdy zaabsorbowany biopolimer uległ degradacji, aktywność mitotyczna była zbliżona do kontroli, lub nawet niższa. Te dane, według Libinzon i wsp. (31) wskazują, że „czynnikiem działającym” był wielkocząsteczkowy DNA, a nie oligo-, lub mononukleotydy.

Libinzon i wsp. (32) zaobserwowali również, że obniżenie śmiertelności napromienionych zwierząt jest tym znaczniejsze im większy jest ciężar cząsteczkowy wprowadzonego pozajelitowo, allogenicznego DNA. Badacze ci sądzą, że wpływ na organizmy wywierają przede wszystkim natywne DNA i jego większe fragmenty. Przy tym podany biopolimer jest wykorzystany w komórkach biorcy nie tylko do naprawy aparatu genetycznego, lecz również jako matryca. Brak istotnego wpływu zdegradowanego DNA można wyjaśnić tym, że przy rozpadzie cząsteczek obcego biopolimeru zostają uszkodzone aktywne biologicznie odcinki tych cząsteczek. „Fragmenty nie zawierające informacji nie mogą już służyć jako matryca, lub zastępować uszkodzonych odcinków DNA biorcy” (32).

Na możliwość zastępowania uszkodzonych odcinków DNA komórkowego przez komplementarne odcinki egzogenicznego biopolimeru wskazują doświadczenia Ayada i Foa (2) wykonane na napromienionych hodowlach komórek limfoidalnych.

Badania przeprowadzone *in vitro* przez Szybalską i Szybalskiego (53) oraz Majumadara i Bosego (33), w których wykazano, że wprowadzony z zewnątrz, zwierzęcy DNA działa na komórki ssaków jako czynnik transformujący, świadczą o jego matrycowej aktywności.

Jednakże w licznych doświadczeniach, wykonanych *in vivo*, uzyskano informacje świadczące, że wykorzystanie obcego, zwierzęcego DNA do

naprawy uszkodzonego aparatu genetycznego, lub jako matrycy w komórkach biorcy, jeżeli nawet występuje w organizmach ssaków, to nie odgrywa większej roli w pobudzaniu procesów odnowy tkanek. Mianowicie Bańkowski (4), Gołba (13), Mendecki (36), Savković (50), Wilczok (54) wykazali, że nie tylko allogeniczny, ale również ksenogeniczny, zwierzęcy, wysokopolimeryzowany DNA w podobnym stopniu obniżają śmiertelność napromienionych myszy i szczurów. Gołba i wsp. (13) zaobserwowali również, że u tych ostatnich zwierząt, pod wpływem obcogatunkowego biopolimeru, następuje poprawa składu krwi obwodowej. Według danych Karpfela i wsp. (25) ksenogeniczny DNA podobnie pobudza aktywność mitotyczną szpiku napromienionych myszy, jak — syngeniczny. Ponadto Rogaczewa i wsp. (47) wykazali ostatnio znaczną skuteczność DNA z grasicy cielęcej zarówno w obniżaniu śmiertelności, jak i w pobudzaniu procesów odnowy tkanek napromienionych psów. Te dane przemawiają oczywiście przeciwko zależności działania podanego biopolimeru od sekwencji zasad w jego cząsteczkach.

Na szczególną uwagę zasługują dokładne doświadczenia Wilczoka i Mendeckiego (54) oraz Mendeckiego i wsp. (36) wykonane na napromienionych szczurach. Badacze podawali zwierzętom dootrzewnowo ściśle scharakteryzowane preparaty DNA z grasicy cielęcej, wątrób i śledzion szczurów, spermy łososia i śledzia oraz komórek raka Ehrlicha. Preparaty te miały różny ciężar cząsteczkowy i różną postać (DNA: wysokopolimeryzowany natywny, wysokopolimeryzowany zdenaturowany i renaturowany, zdegradowany chemicznie oraz zdepolimeryzowany przez dezoksyrybonukleazy). Wszystkie napromienione szczury kontrolne padały w czasie krótszym niż 30 dni. Natomiast część zwierząt, które otrzymały wysokopolimeryzowany DNA, przeżyła ten okres. Stwierdzono, że po podaniu preparatów, o ciężarach cząsteczkowych od  $1 \times 10^8$  do  $8 \times 10^8$ , procent przeżywających zwierząt zwiększył się wraz z wzrostem ciężaru cząsteczkowego wprowadzanego biopolimeru. Efekt ten nie zależał, ani od pochodzenia, ani od postaci egzogenicznego DNA. Natomiast preparaty zdegradowanego DNA nie zmniejszały śmiertelności szczurów.

W tych doświadczeniach zatem decydujące znaczenie miał wysoki ciężar cząsteczkowy obcego biopolimeru, a swoistość jego działania, w zależności od pochodzenia, nie zaznaczyła się. Ponadto należy podkreślić, że badania Mazurika i wsp. (34) wykazały, iż po dootrzewnowym podaniu napromienionym szczurom zdegradowanego DNA — o ciężarze cząsteczkowym  $2 \times 10^8$  — i stosunkowo znacznie zanieczyszczonego białkiem (13%), średni czas życia zwierząt ulega skróceniu.

Wydaje się prawdopodobne, że zaobserwowane przez niektórych badaczy różnice w przeżywalności napromienionych ssaków (31, 40) i w procesach odnowy tkanek (3, 19), które zaznaczyły się po pozajelitowym wprowadzeniu zwierzęcego DNA różnego pochodzenia, należy przypisać



nie tyle odmiennej sekwencji zasad w jego cząsteczkach, ile przede wszystkim różnicom w ciężarach cząsteczkowych zaabsorbowanego przez komórki biorców biopolimeru i być może również — różnicom w czystości jego preparatów.

### III. Egzogeniczny DNA jako czynnik zakłócający replikację DNA biorcey

Janković-Stejin i wsp. (18) stwierdzili, że allogeniczny, wielcząsteczkowy DNA, podany dootrzewnowo normalnym szczurom, podwyższa częstość aberacji chromosomowych w szpiku.

Šlotová (51) zaobserwowała również, że zwierzęcy DNA zwiększa liczbę aberacji w napromienionych merystematycznych komórkach *Vicia faba*.

Zwiększenie liczby aberacji, głównie typu chromatydowego, stwierdzili też Karpfel i Šlotová (26) w szpiku normalnych myszy po dootrzewnowym podaniu wysokopolimeryzowanego kseno- i allogenicznego DNA, jak również syngenicznego DNA z jąder, nerek i mózgu. Przy tym ksenogeniczne preparaty były wydajniejsze w wywoływaniu aberacji, niż allo- i syngeniczne. Natomiast syngeniczny DNA ze śledziony, ksenogeniczny DNA, enzymatyczne hydrolizaty DNA, poszczególne nukleotydy i histony nie wywierały wpływu na częstość aberacji.

Na podstawie tych danych Karpfel i Šlotová (26) doszli do wniosku, że egzogeniczny DNA działa „w pewnym stopniu w sposób biologiczny”. Badacze przypuszczają, że zwiększenie liczby aberacji jest skutkiem oddziaływania obcego biopolimeru z DNA chromosomowym, w trakcie którego większe fragmenty egzogenicznego preparatu zakłócają procesy replikacji DNA biorcey. Obcy DNA może, według Karpfela i Šlotovej, wywoływać również mikrodelecje, które dają efekty genetyczne. „Ten mechanizm wydaje się odpowiedzialny za powstawanie mutacji u muszek owocowych po aplikacji DNA”.

Hipoteza Karpfela i Šlotovej, podobnie jak omówione poprzednio hipotezy Kanazira (22—24, 41) i Libinzon (31, 32), wskazuje więc na swoistość działania egzogenicznego, zwierzęcego DNA.

Ponadto należy podkreślić, że hipoteza Karpfela i Šlotovej wskazuje na zależność efektu wprowadzonego z zewnątrz DNA od fazy cyklu rozwojowego komórek—biorców w trakcie której obcy biopolimer występuje na terenie jąder komórkowych. Zakłócenie replikacji następowaloby wówczas, gdy większe fragmenty egzogenicznego DNA oddziaływały z DNA komórek znajdujących się w stadium S (26). W tym stadium oswobodzony od histonów DNA biorcey byłby dostępny dla reakcji z podanym biopolimerem.



W tkankach, w których przebiega intensywne synteza DNA, jak np. w szpiku, zakłócający replikację wpływ egzogenicznego DNA zaznaczałby się stosunkowo silnie wobec znacznego prawdopodobieństwa występowania obcego biopolimeru w komórkach znajdujących się w stadium S. Być może, iż jest to jedna z przyczyn wybiórczego hamowania złośliwych nowotworów przez obcy, zwierzęcy DNA.

Podwyższenie aberacji zwiększa procesy rozpadu komórek w tkankach i z tego powodu przypuszczalnie następuje pobudzenie fagocytarnej aktywności układu siateczkowo—śródbłonkowego, które zaobserwowali Bańkowski i wsp. (5) w 5 i 12 dni po dootrzewnowym podaniu normalnym szczurom DNA z grasicy cięłej.

Należy podkreślić, że podwyższenie aberacji chromosomowych i fagocytarnej aktywności układu siateczkowo—śródbłonkowego, a więc uszkadzające działanie, stwierdzono u normalnych zwierząt po dawkach DNA zbliżonych do tych, przy których następuje pobudzenie procesów odnowy tkanek i obniżenie śmiertelności napromienionych organizmów. To pozwala sądzić, że egzogeniczny DNA może oddziaływać na organizmy według różnych mechanizmów.

#### IV. Wpływ drobnocząsteczkowych produktów rozpadu egzogenicznego DNA

Hipotezy Kanazira (22—24, 41), Libinzon (31, 32) oraz Karpfela i Šlotovej (26) wskazują na wpływ wysokopolimeryzowanych cząsteczek egzogenicznego DNA. Natomiast Petrović (41), na podstawie doświadczeń wykonanych na napromienionych hodowlach fibroblastów, opracował hipotezę dotyczącą działania drobnocząsteczkowych produktów rozpadu DNA — nukleotydów i nukleozydów.

Według obserwacji tego badacza syngeniczny i ksenogeniczny DNA oraz produkty ich enzymatycznej degradacji w podobnym stopniu obniżają śmiertelność napromienionych komórek (41) i podwyższają syntezę DNA (42), jak dezoksyrybonukleotydy i dezoksyrybonukleozydy. Jednakże te drobnocząsteczkowe składniki DNA działają tylko wówczas, gdy wprowadza się do hodowli komórek cztery podstawowe dezoksyrybonukleotydy, lub dezoksyrybonukleozydy w równocząsteczkowym stosunku.

Petrović (41) sądzi, że niekontrolowane i niezrównoważone podwyższenie puli prekursorów DNA, obserwowane po napromienieniu, może być jednym z istotnych czynników zaburzenia procesów syntezy DNA w organizmach. Po podaniu czterech podstawowych składników DNA, lub wysokopolimeryzowanego DNA i następnie po jego enzymatycznej degradacji może się ustalać odpowiednia równowaga w puli prekursorów

wewnątrz komórek i w ich środowisku. W ten sposób podane preparaty wywierałyby normalizujący wpływ na syntezę DNA w organizmach.

Przeciwno istotnemu znaczeniu w organizmach mechanizmu zaproponowanego przez Petroviča przemawiają wspomniane poprzednio doświadczenia wykonane *in vivo* przez: Panjevaca (40), Kanazira (22, 24), Libinzon (31), Wilczoka (54), Mendeckiego (36), Mazurika (34), świadczące, że zdegradowany DNA nie jest skuteczny w pobudzaniu procesów odnowy tkanek i obniżaniu śmiertelności napromienionych zwierząt.

Ponadto Mazurik i wsp. (35), oznaczając stężenie poli- i monodezoksyrybonukleotydów, tymidyny, dezoksyurydyny oraz DNA w śledzionach napromienionych szczurów, uzyskali ostatnio dane wskazujące, że obniżenie śmiertelności zwierząt pod wpływem allogenicznego DNA nie jest związane z uzupełnieniem puli prekursorów syntezy DNA u biorców przez drobnocząsteczkowe produkty rozpadu wprowadzonego pozajelitowo biopolimeru.

Istnieją też obserwacje przeprowadzone *in vitro*, potwierdzające informacje, że procesy odnowy są pobudzane przez wielkocząsteczkowy DNA (27, 55), a produkty jego degradacji nie są skuteczne (55).

Należy ponadto podkreślić, że badania Hilla (15) wykazały, iż w komórkach fibroblastów, w przeciwieństwie do innych rodzajów komórek — np. limfocytów, obcy DNA jest szczególnie szybko degradowany przez enzymy i nie nagromadza się w jądrach komórkowych, tak jak w jądrach limfocytów. Z tego powodu zapewne wprowadzony przez Petroviča do hodowli fibroblastów wielkocząsteczkowy DNA działał tak, jak DNA zdegradowany, nukleotydy i nukleozydy. Poza tym efekt zwiększenia przeżywalności komórek fibroblastów, zaobserwowany w doświadczeniach Petroviča (41), był znikomy. Natomiast pod wpływem wielkocząsteczkowego DNA podanego napromienionym zwierzętom Libinzon i wsp. (31), Rogaczewa (46) oraz Rewina i Lemberg (43) stwierdzili znaczne zwiększenie liczby komórek w szpiku, śledzionach i jelitach cienkich.

Z przytoczonych wyżej względów hipoteza Petroviča (41), oparta na obserwacji hodowli napromienionych fibroblastów, nie ma większego znaczenia w wyjaśnianiu mechanizmu działania egzogenicznego DNA jako czynnika pobudzającego procesy odnowy w napromienionych organizmach.

Wydaje się również mało prawdopodobne, aby w normalnych organizmach ssaków — w których zwykłym źródłem drobnocząsteczkowych produktów rozpadu egzogenicznego DNA są pokarmy — podwyższenie puli tych produktów, po podaniu egzogenicznego DNA, stanowiło skuteczny czynnik pobudzający procesy odnowy tkanek.



## V. Hipotezy dotyczące ochronnego działania egzogenicznego DNA

S m e t s oraz K u z i n przedstawili hipotezy wskazujące na ochronne działanie egzogenicznego DNA.

Według S m e t s a (52) obcy wysokopolimeryzowany DNA, po wniknięciu do komórek w napromienionych organizmach, stanowiąc substrat dla dezoksyrybonukleaz — których aktywność znacznie wzrasta wskutek napromienienia — w sposób konkurencyjny chroni DNA biorcy. Byłoby to zjawisko „wychwytu enzymów”.

Natomiast K u z i n (28) przypuszcza, że występujące w komórkach swobodne cząsteczki obcego DNA, lub produkty jego rozpadu wychwytyją tzw. „pierwotne radiotoksyny” (PRT), jak np.: *o*-fenole, semichinony i nadtenki nienasyconych kwasów tłuszczowych, których ilość zwiększa się po napromienieniu. W ten sposób podany biopolimer chroniłby DNA biorcy przed uszkadzającym działaniem PRT.

Jeśliby egzogeniczny DNA działał w organizmach głównie jako czynnik ochronny, wówczas powinny wyraźnie zaznaczyć się różnice w efektach w zależności od terminu wprowadzenia biopolimeru. Podanie bezpośrednio przed napromienieniem, albo niezwłocznie po nim powinno być skuteczniejsze niż w późniejszym terminie, kiedy dezoksyrybonukleazy lub PRT uszkodzą już aparat genetyczny znacznej ilości komórek i nastąpi rozpad wielu z nich. Jednakże Libinzon i wsp. (31, 32) stwierdzili, że nie ma istotnej różnicy w obniżeniu śmiertelności zwierząt jeżeli DNA podaje się jednorazowo bezpośrednio przed napromienieniem organizmów lub w okresie od 10 minut do 24 godzin po ich napromienieniu. Badania Rewiny i Lemberga, Libinzon i wsp. oraz Rogaczewej wykazały też, że allogeniczny DNA wprowadzony dootrzewnowo szczurom zarówno bezpośrednio (43), jak i w 24 godziny po ich napromienieniu (31, 46) nie powoduje obniżenia ilości ginących komórek w jelitach cienkich (43), szpiku (31, 46) i śledzionach (46). Zwiększenie liczby komórek w narządach następuje dopiero po pobudzeniu, pod wpływem podanego biopolimeru, aktywności mitotycznej. Przy czym podwyższenie liczby komórek jest z tą aktywnością w późniejszym okresie skorelowane (31, 43).

Według Rewiny i Lemberga (43) obcy DNA „nie wpływa na obniżenie uszkodzeń popromiennych, lecz znacznie nasila zaczynającą się reprodukcję komórek i wskutek tego obniża ubytek całej ich populacji”.

R y s i n a (48) nie zaobserwowała wpływu egzogenicznego DNA na aktywność dezoksyrybonukleaz w różnych narządach napromienionych szczurów w ciągu 3 dni po dootrzewnowym podaniu biopolimeru. Preparaty wprowadzano w 3 godziny przed lub bezpośrednio po napromienieniu zwierząt.

Ponadto należy podkreślić, że pobudzenie syntezy DNA, które obserwuje się u normalnych i napromienionych zwierząt pod wpływem obcego



biopolimeru (20), nie jest poprzedzone istotnym zwiększeniem zawartości DNA w narządach biorcy (20, 35, 48). Te dane, jak również przytoczone poprzednio obserwacje Libinzon i wsp. (31), Rewiny i Lemberga (43), Rogaczewej (46) i Rysinej (48) przemawiają przeciwko hipotezom Smetsa (52) i Kuzina (28) o ochronnym działaniu egzogenicznego, zwierzęcego DNA na aparat genetyczny komórek w organizmach ssaków.

## VI. Egzogeniczny DNA jako czynnik sprzyjający derepresji DNA biorcy

W szczegółowych badaniach wykonanych na myszach, Ledoux i wsp. (29) uzyskali dane wskazujące, że egzogeniczny DNA, wprowadzony pozajelitowo, przenika szybko w różnych narządach do jąder komórkowych w postaci wielkocząsteczkowej.

Podany dożylnie biopolimer znika wcześniej z krwi bez uprzedniej degradacji do składników rozpuszczalnych w kwasach i lokalizuje się w różnych narządach. Po upływie 60 minut od chwili wprowadzenia DNA, nie stwierdza się już jego obecności w krwi. W tym czasie rozpadowi do drobnocząsteczkowych składników ulega stosunkowo niewielka część zaabsorbowanego w narządach obcego biopolimeru (29).

Za wczesnym występowaniem w postaci wielkocząsteczkowej stosunkowo znacznej części zaabsorbowanego DNA, przemawiają również wspomniane poprzednio obserwacje Libinzon i wsp. (31).

Na przenikanie syn-, allo- i ksenogenicznego DNA w postaci wielkocząsteczkowej do jąder komórek ssaków wskazują liczne dane uzyskane w badaniach wykonanych *in vitro* (2, 15, 33, 39, 41).

Jednocześnie na szczególną uwagę zasługuje fakt, że syn- i allogeniczny DNA wykazują podobną skuteczność w pobudzaniu procesów odnowy tkanek, jak — ksenogeniczny. Przy tym duże znaczenie ma wysoki ciężar cząsteczkowy obcego biopolimeru oraz czystość jego preparatów.

Można zatem przypuszczać, że ważną rolę w działaniu na organizmy ssaków odgrywają nie tyle właściwości egzogenicznego, zwierzęcego DNA wynikające z określonej sekwencji zasad, ile jego właściwości jako wielkocząsteczkowej substancji o charakterze anionu.

DNA wykazuje szczególne powinowactwo do polikationów — histonów. W komórkach histony występują przede wszystkim w miejscach lokalizacji DNA (16).

Wiele obserwacji przemawia za tym, że histony działają jako nieswoiste represory matrycowej aktywności DNA. Natomiast występujące w chromatynie polianiony, jak np. kwaśne białka, osłabiają hamujący transkrypcję wpływ histonów (37).

Istnieją też dane świadczące, że polianiony, które w normalnych warunkach nie występują w chromatynie, jak kwas poliakrylowy i siarczan polietylenu, wiążąc histony działają również skutecznie jako czynniki derepresyjne (1).

W świetle tych informacji wydaje się prawdopodobne, że egzogeniczny, zwierzęcy DNA, po przeniknięciu w postaci wielkocząsteczkowej do jąder komórkowych w różnych narządach ssaków, reaguje jako polianion z polikationami histonami i osłabia ich represyjne działanie na DNA-matrycę biorcy. Sprzyjałoby to nie tylko procesom transkrypcji, ale również replikacji DNA w wielu tkankach. Wiadomo bowiem, że w komórkach wstępujących w stadium S, DNA jest uwalniany od histonów.

W ten sposób egzogeniczny DNA oddziaływałby jako nieswoisty czynnik pobudzający przede wszystkim syntezę kwasów nukleinowych, a skutki jego interakcji z histonami zależałyby od rodzaju komórek biorcy, a w szczególności w zdolnych do podziału komórkach — również od fazy ich cyklu życiowego ( $G_1$ , S,  $G_2$ , M), w której zaabsorbowany polianion występowałby w jądrach.

Za istotnym znaczeniem sugerowanego „odblokowującego” mechanizmu działania wprowadzonego pozajelitowo, zwierzęcego DNA na ssaki przemawiają następujące dane:

1. Czynnikiem pobudzającym procesy odnowy tkanek i obniżającym śmiertelność napromienionych zwierząt jest wielkocząsteczkowy, egzogeniczny DNA, a drobnocząsteczkowe produkty jego rozpadu nie są skuteczne (22, 24, 31, 32, 34, 35, 36, 40, 54).

2. Egzogeniczny DNA działa jako czynnik stymulujący różne czynności komórek, np.: syntezę kwasów nukleinowych (6, 8, 20, 35), proliferację (19, 25, 31, 43, 46, 47) i różnicowanie się (3, 13, 46, 47). Natomiast ochronny wpływ podanego biopolimeru, lub produktów jego rozpadu na aparat genetyczny komórek nie zaznacza się (20, 31, 32, 43, 46, 48).

3. Nie stwierdzono swoistości gatunkowej histonów, a DNA eukariontów wiąże się ze wszystkimi frakcjami histonów bez względu na swoje pochodzenie (16, 37). Również w pobudzaniu procesów odnowy i obniżaniu śmiertelności napromienionych zwierząt przez egzogeniczny DNA, jego pochodzenie nie ma istotnego znaczenia (4, 13, 25, 36, 47, 50, 54). Natomiast wykorzystanie i efekty tego biopolimeru zależne są od rodzaju tkanek i komórek biorcy (7, 17, 20, 29, 31, 46).

4. Histony wywierają hamujący wpływ zarówno na syntezę RNA, jak i — DNA (16, 37), a egzogeniczny DNA pobudza syntezę obu tych kwasów nukleinowych w różnych tkankach zwierząt (6, 8, 20, 35, 41).

Podwyższenie syntezy kwasów nukleinowych, pod wpływem obcego DNA, może być oczywiście również skutkiem wiązania przez podany biopolimer nie tylko histonów, ale i innych represorów matrycowej aktywności DNA biorcy. Egzogeniczny DNA bowiem obniża śmiertelność napromienionych bakterii (23). Jednakże u eukariontów interakcji obcego

DNA z histonami należałoby przypisać szczególne znaczenie, ze względu na informacje wskazujące na podstawową rolę histonów jako represorów matrycowej aktywności DNA (16, 37).

Istnieją ponadto dane, że histony są inhibitorami nie tylko matrycowej aktywności DNA w jądrach, lecz również wielu innych procesów w komórkach (16), np. syntezy ATP w mitochondriach (1).

W konsekwencji oddziaływania egzogenicznego DNA z histonami następowałaby stymulacja różnych czynności tkanek i całych układów biorcy, a między innymi centralnego układu nerwowego oraz hormonalnego. W ten sposób podany biopolimer stanowiłby czynnik pobudzający cały organizm. Istotnie wiele badań wskazuje na takie totalne działanie wprowadzonego do organizmu DNA (3, 5, 21, 31, 41, 43, 46, 47).

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że nie tylko wprowadzony z zewnątrz DNA, ale również wielkocząsteczkowy RNA, podany pozajelitowo, obniża śmiertelność napromienionych ssaków (32, 41). Wydaje się, że RNA jest nawet skuteczniejszy. Przy tym należy wspomnieć, że ksenogeniczny, wysokopolimeryzowany RNA, w przeciwieństwie do DNA, nie podwyższa liczby aberacji chromosomowych w tkankach zwierząt (26).

Według danych F r e n s t e r a (11) ważnym czynnikiem oswabadzającym w komórkach DNA-matrycę od histonów jest RNA. Być może, iż nie tylko wprowadzony do organizmu DNA, lecz również egzogeniczny RNA — jako polianion — sprzyja derepresji DNA biorcy, a przy tym RNA nie zakłóca procesów replikacji (26). Jeśli tak jest rzeczywiście, wówczas byłoby interesujące zastosowanie wysokopolimeryzowanych kwasów nukleinowych, a szczególnie RNA, w badaniach gerontologicznych. Wiadomo bowiem, że starzenie się komórek jest m.in. związane z zablokowaniem DNA-matrycy (56). Jeśliby nawet blokada ta, w której istotną rolę według danych H a h n a (14) odgrywają histony, była w niektórych komórkach nieodwracalna, wówczas aktywacja przez podany biopolimer innych komórek, szczególnie w centralnym układzie nerwowym, mogłaby sprzyjać pobudzaniu procesów odnowy i revitalizacji. Egzogeniczny kwas nukleinowy spełniałby w tym wypadku rolę czynnika bodźcowego. Należy wspomnieć, że istnieją obserwacje wskazujące na lecznicze działanie egzogenicznych kwasów nukleinowych w przypadkach zaburzeń czynności centralnego układu nerwowego, dystrofii mięśni i w stanach ogólnego wyczerpania organizmów (38).

## VII. Zakończenie

Oddziaływanie wprowadzonego z zewnątrz, zwierzęcego DNA na organizmy ssaków wydaje się procesem szczególnie złożonym i obecny stan badań w tej dziedzinie należy uznać za początkowe ich stadium.



Nie podjęto dotychczas systematycznych badań mechanizmu działania egzogenicznego DNA. Przedstawione hipotezy opierają się przede wszystkim na przeprowadzonych *in vivo* i *in vitro* obserwacjach ogólnych efektów oddziaływania tego biopolimeru na komórki, tkanki lub organizmy. Hipotezy te mają zatem jedynie charakter roboczy, wytyczający ewentualne kierunki przyszłych badań.

Istnieją dane przemawiające przeciwko istotnemu znaczeniu działania egzogenicznego DNA w organizmach jako elementu wykorzystywanego do naprawy uszkodzonych odcinków DNA biorcy oraz jako matrycy, lub źródła prekursorów syntezy endogenicznego DNA. Nie zaznacza się też ochronny wpływ podanego biopolimeru. Jednakże nie ma obecnie podstaw do stwierdzenia, że którykolwiek z tych mechanizmów nie występuje wogóle w organizmach ssaków. Na przykład, doświadczenia *in vitro*, w których wykazano transformujący wpływ zwierzęcego DNA na komórki, wskazują na możliwość pewnej zależności działania tego biopolimeru na ssaki od sekwencji zasad w jego cząsteczkach.

Na szczególną uwagę zasługują dane świadczące, że egzogeniczny DNA z jednej strony zakłóca procesy replikacji DNA w niektórych komórkach organizmów, przy czym zaznacza się zależność efektu od pochodzenia podanego preparatu; a z drugiej strony bez względu na swoje pochodzenie zwierzęcy, wysokopolimeryzowany DNA znacznie nasila procesy odnowy tkanek, w których aparat genetyczny różnego rodzaju komórek został uszkodzony.

W świetle uzyskanych dotychczas informacji należałoby przyjąć, że wielkocząsteczkowy, zwierzęcy DNA, wprowadzany pozajelitowo ssakom, oddziałuje na ich organizmy nie według jednego, lecz według kilku odrębnych mechanizmów, a zaobserwowane ogólne efekty stanowią ich wypadkową. Przy czym wydaje się prawdopodobne, że ważną rolę odgrywa działanie egzogenicznego DNA jako czynnika sprzyjającego derepresji DNA biorcy.

#### LITERATURA

1. Allfrey V., Mirsky A., w Biosintez białka i jego regulacja (pierew. s ang.). Izdat. Mir, Moskwa 1967, str. 318.
2. Ayad S. R., Fox M., *Intern. J. Rad. Biol.* **15**, 445 (1969).
3. Babuszkina A. G., *Radiobiologia* **11**, 510 (1971).
4. Bańkowski Z., Polowiec Z., Wilczok T., Pamiętnik III Zjazdu Naukowego Pol. T-wa Anatomopatol., Białystok 1964. *Suppl. Patol. Pol.* **1**, 451 (1965).
5. Bańkowski Z., Polowiec Z., Stęplewski Z., Pamiętniki III Zjazdu Naukowego Pol. T-wa Anatomopatol. Białystok, 1964, *Suppl. Patol. Pol.* **1**, 457 (1965).
6. Bećarević A., Janković V., Petrović S., Kanazir D., Jovicki G., *Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **13**, 35 (1962).

7. Bećarević A., Petrović S., Janković V., Kanazir D., *Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 211 (1966).
8. Bećarević A., Milosēvić M., Kanazir D., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966, *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 159 (1967).
9. Chorąży M., *Post. Mikrobiol.* **7**, 267 (1968).
10. Fox M., Fox B. W., Ayad S. R., *Nature* **222**, 1086 (1969).
11. Frenster J. H., w *The Cell Nucleus Metabolism Radiosensitivity*. London 1966, str. 27.
12. Glick J. L., *Cancer Res.* **27**, 175 (1967).
13. Gołba S., Gołba M., Wilczok T., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966, *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 11 (1967).
14. Hahn H. P., *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* **24**, 272 (1969).
15. Hill M., Proc. Intern. Symp., Herceg Novi 1966. *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 55 (1967).
16. Hofsztejn L. W., *Usp. Biol. Chim.* **12**, 72 (1971).
17. Hudnik-Plevnik T. A., Glišin V. R., Simić M. M., *Nature* **184**, 1818 (1967).
18. Janković-Stejin V., Kanazir D., Bećarević A., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966, *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 115 (1967).
19. Jurášková V., Drážil V., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966, *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 121 (1967).
20. Kalbarczyk S., „Wpływ allogenicznego DNA na inkorporację C<sup>14</sup>-tymidyny do DNA w niektórych narządach szczurów”. Dysertacja doktorska. Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa 1971.
21. Kalbarczyk S. *Kosmos ser. A*, **21**, 601, (1972).
22. Kanazir D., Panjevac B., Čećuk O., Ristić G., Krajinčanić B., *Rad. Res.* **9**, 137 (1958).
23. Kanazir D., Čećuk O., Krajinčanić B., Hudnik C. A., *Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **9**, 133 (1959).
24. Kanazir D., Bećarević A., Panjevac B., Simić M. M., Ristić G., *Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **9**, 145 (1959).
25. Karpfel Z., Šlotová J., Paleček E., *Comptes Rendus de Séances de la Soc. Biol.* **157**, 447 (1962).
26. Karpfel Z., Šlotová J., Symp. on the Mutational Process. Genetic Variations in Somatic Cells. Proc. Symp. Prague 1965, Academic Prague 1966, str. 127.
27. Krim M., Wilczok T., Bendisch A., *Fed. Proc.* **24**, 3, (1965).
28. Kuzin A. M., *Strukturno-metabolicszkaja Hipoteza w Radiobiologii*, Izdat. Nauka, Moskwa 1970.
29. Ledoux L., Charles P., Huart R., Srögl M., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966. *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 45 (1967).
30. Ledoux L., Huart R., *J. Mol. Biol.* **43**, 243 (1969).
31. Libinzon R. E., Konstantinowa W. W., Popowa T. G., Rogaczewa S. A., *Radiobiologia* **3**, 456 (1963).
32. Libinzon R. E., Rogaczewa S. A., Rusinowa G. G., *Radiobiologia* **7**, 455 (1967).
33. Majumadar A., Bose S. K., *Brit. J. Cancer* **22**, 603 (1968).
34. Mazurik W. K., Bryksina L. E., Podgorodniczenko W. K., *Biochimija* **33**, 953 (1968).
35. Mazurik W. K., Podgorodniczenko W. K., Bryksina L. E., *Radiobiologia* **12**, 40 (1972).
36. Mendecki J., Wilczok T., Neumann H., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966. *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 103 (1967).

37. Mjølberg A. A., w *Chimija bielka*. Izdat. Leningradzkowo Uniwersiteta, Leningrad 1971, cz. 2, str. 62.
38. Neumann M., *Conc. Med.* **86**, 5747 (1964).
39. Ostroszenko W. A., Lawrentiew G. A., *Molekul. Biol.* **2**, 498 (1968).
40. Panjevac B., Ristić G., Kanazir D., Proc. 2nd. United Nations Intern. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva 1958, United Nations, Geneva 1958, **23**, str. 64.
41. Petrović D., *Current Topics in Radiation Research*, North — Holland Publishing Company, Amsterdam 1968, **4**, str. 251.
42. Petrović D., *Intern. J. Rad. Biol.* **18**, 243 (1970).
43. Rewina W. S., Lemberg W. K., *Radiobiologia* **11**, 362 (1971).
44. Robins A. B., Taylor D. M., *Nature* **217**, 1228 (1968).
45. Robyt J. F., French D., *J. Biol. Chem.* **245**, 3917 (1970).
46. Rogaczewa S. A., w „Zaszczita i Wostanowlenie pri Łucziewych Powriezdienijach”. Akad. Nauk SSSR. Izdat. Nauka, Moskwa 1966, str. 269.
47. Rogaczewa S. A., Łuzanowa O. B., Kiyżuk K. N., Szarowa E., G., Libinzon R. E., *Radiobiologia* **11**, 106 (1971).
48. Rysina T. N., *Radiobiologia* **12**, 349 (1972).
49. Savković N., Kačaki J., Hajduković S., *Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 57 (1966).
50. Savković N., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966, *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 97 (1967).
51. Slotová J., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1966, *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 77 (1967).
52. Smets L. A., Proc. Intern. Symp. Herceg Novi 1967, *Suppl. Bull. Boris Kidrič Inst. Nucl. Sci.* **17**, 65 (1967).
53. Szybalska E. W., Szybalski W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **48**, 2026 (1962).
54. Wilczok T., Mendecki J., *Intern. J. Rad. Biol.* **9**, 201 (1965).
55. Wilczok T., Radiobiological Symp. and Fifth Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology, Spindlerův Mlýn Bendřichov 1967. *Studia Biophysica*, Berlin 1967, str. 247.
56. Wiliecznik M. M., *Molekuljarnyje Mechanizmy Starienija*. Akad. Nauk SSSR. Izdat. Nauka, Moskwa 1970.



TERESA LASKOWSKA-KLITA \*

## Oksydaza cytochromowa, budowa i funkcja Cytochrome Oxidase, Structure and Function

The present state of research on the composition, structure and function of cytochrome oxidase are reviewed.

Oksydaza cytochromowa (E.C. 1.9.3.1) jest enzymem terminalnym w cyklu przemian tlenowych, o bardzo wysokim powinowactwie do tlenu, występującym powszechnie. Enzym ten jest jedyną oksydazą powiązaną bezpośrednio z systemem dostarczającym energii komórce, z oksydacyjną fosforylacją.

Oksydaza cytochromowa jest lipoproteidem strukturalnie związanym z wewnętrzną błoną mitochondrionu, zawierającym układ hemowy i miedź. Długi łańcuch alkilowy ( $C_{17}H_{31}O$ ) dołączony do pierścienia porfirynowego nadaje grupie prostetycznej lipidowy charakter, niezależnie od reszty fosfolipidowej dołączonej do części białkowej enzymu. Poza łańcuchem alkilowym układ hemu a zawiera grupę formylową i hydroksylową oraz być może grupę ketonową. Grupa prostetyczna łączy się z częścią białkową enzymu poprzez histydynę.

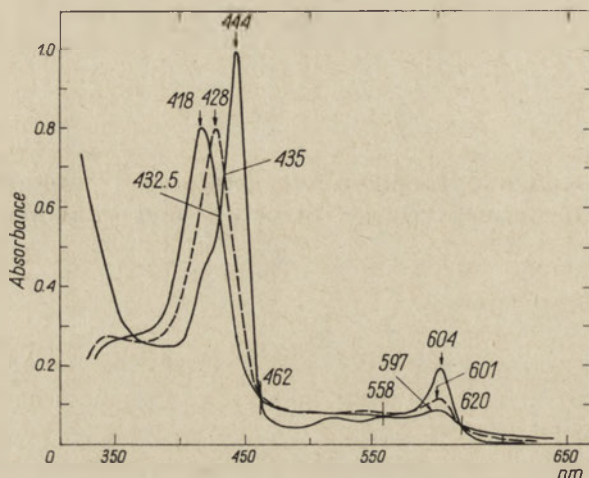
### I. Cytochrom $a$ i cytochrom $a_3$

Oksydaza cytochromowa charakteryzuje się obecnością dwóch maksimumów absorpcji. Maksimum  $\alpha$  w 605nm oraz w formie utlenionej enzymu maksimum  $\gamma$  — w 418nm. Redukcja powoduje przesunięcie maksimum  $\gamma$ , zwanego też prążkiem Soreta, do 440nm oraz wzrost absorpcji w 605nm. Trzecią, spektralnie odróżnialną postacią enzymu jest powstająca ze zredukowanej, w wyniku gwałtownego nasycenia roztworu tlenem, oksydaza utlenowana. Ma ona przesuniętą pozycję prążka Soreta do 428nm, a absorpcja w maksimum  $\alpha$  jest pośrednia między postacią utlenioną i zredukowaną (rysunek 1). Zredukowana i utleniona oksydaza to dwie formy enzymu związane bezpośrednio z aktywnością, utlenowana natomiast nie

\* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Biofarmacji, Akademia Medyczna, Warszawa

bierze udziału w reakcji i prawdopodobnie nie powstaje w procesie utleniania zredukowanego cytochromu c.

Dwa układy hemowe wchodzące w skład cząsteczki enzymu wykazują różną reaktywność wobec tlenu, reduktantów oraz inhibitorów. Tylko

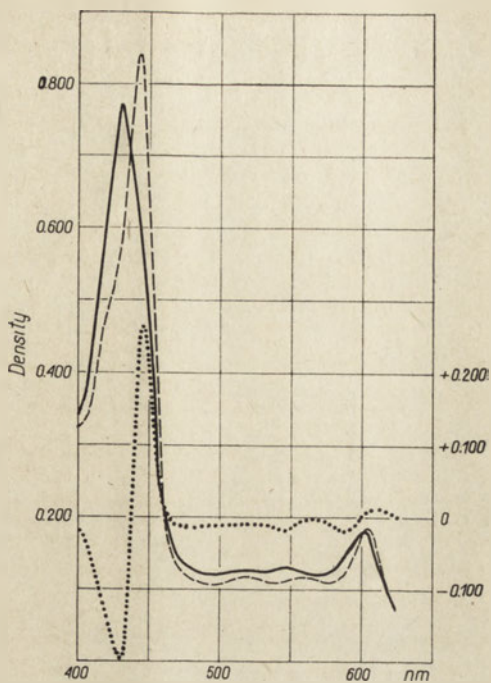


**Rys. 1.** Widmo absorpcyjne zredukowanej (max 604 i 444 nm) utlenionej (max 597 i 418 nm) i utlenowanej (max 601 i 428 nm) oksydazy cytochromowej (wg 53).

jeden z nich, przypisywany cytochromowi  $a_3$ , reaguje z tlenem, tlenkiem węgla, natomiast drugi hem, należący prawdopodobnie do cytochromu  $a$ , jest inertny. Przypuszczenie, że w enzymie obecne są dwa cytochromy,  $a$  i  $a_3$ , oparte jest głównie na obserwacjach widm w obecności różnych inhibitorów. Na podstawie analizy widma pochodnej tlenkowęgłowej zredukowanej oksydazy przyjmuje się, że cytochrom  $a$  jest odpowiedzialny za 72% absorpcji w 605nm oraz 28% absorpcji prążka Soreta. Przesunięcie prążka Soreta z 440nm do 430nm oraz pojawienie się ramienia w 590nm przy maksimum  $a$ , związane ma być z obecnością komponenty nie reagującej z tlenkiem węgla, czyli z cytochromem  $a$ , natomiast pozycja maksimumów charakteryzuje widmo fotochemicznie czynnej, tlenkowęgłowej pochodnej oksydazy (rysunek 2).

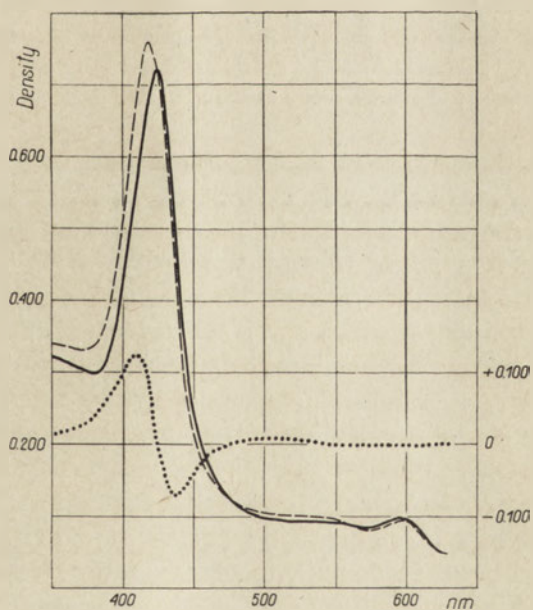
Ilość tlenku węgla związana przez cząsteczkę enzymu (cząsteczkę hemu) wynosi 1:2, co pozwala przypuszczać, że cytochromy  $a$  i  $a_3$  występują w ilościach ekwimolarnych, a zatem zgodnych z teorią o równomolarnych ilościach cytochromów tworzących układ cytochromowy (9).

Przyłączenie cyjanku do utlenionej i zredukowanej oksydazy nie przedstawia trudności (rysunek 3, 4). Natomiast połączona z cyjankiem, utleniona oksydaza nie ulega pełnej redukcji. Część nie ulegająca redukcji jest uważana za cytochrom  $a_3$ , zaś cytochrom  $a$  nie łączący się z inhibitorem ulega redukcji szybko i łatwo. Redukcja enzymu zredukowanym substra-



**Rys. 2.** Wpływ tlenku węgla na widmo zredukowanej oksydazy cytochromowej (wg 110)

--- forma zredukowana, — forma zredukowana + CO, ... widmo różnicowe

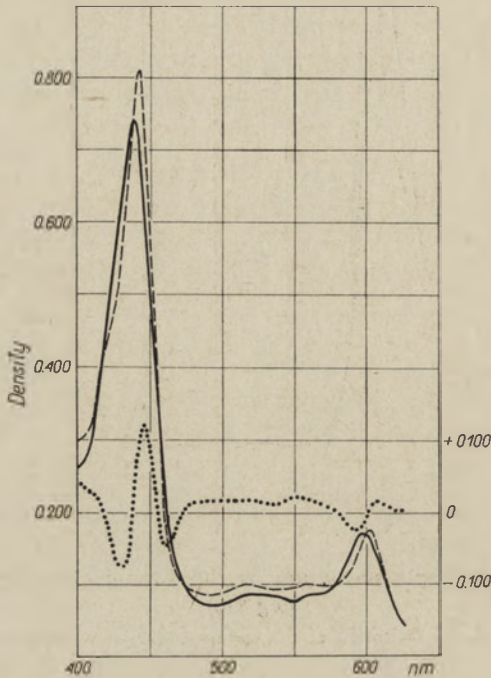


**Rys. 3.** Wpływ NaCN na widmo absorpcyjne utlenionej oksydazy (wg 110).

--- forma utleniona, — forma utleniona + NaCN, ... widmo różnicowe.



tem jest dwufazowa (53, 55). Przyjmuje się, że pierwsza bardzo szybka faza związana jest z redukcją cytochromu  $a$ , zaś druga bardzo wolna jest redukcją cytochromu  $a_3$ .



**Rys. 4.** Wpływ NaCN na widmo absorpcyjne zredukowanej oksydazy cytochromowej (wg 110)

--- forma zredukowana, — forma zredukowana + NaCN, ... widmo różnicowe

Jeśliby udało się rozdzielić te dwa cytochromy, wtedy za oksydazę cytochromową można by uważać cytochrom  $a_3$ , zaś cytochrom  $a$  byłby substratem dla enzymu i ostatnim członem łańcucha oddechowego. Jednakże dotąd wszelkie próby rozdzielania kończyły się niepowodzeniem. Również wszystkie interakcje między cytochromem  $a$  i  $a_3$  wydają się bardziej złożone niż między enzymem i substratem. Nie istnieją dowody wskazujące na strukturalną różnicę między grupami prostetycznymi enzymu. Różną aktywność chemiczną najprościej byłoby przypisać różnym typom przyłączania dwóch hemów do różnej części tego samego białka, lub też do dwóch cząsteczek białkowych.

Brak różnic strukturalnych, niejednoznaczne różnice kinetyczne oraz niepowodzenia przy licznych próbach rozdzielania cytochromu  $a$  i  $a_3$  skłoniły do wysunięcia alternatywnej hipotezy budowy oksydazy. Koncepcja jednostkowej budowy enzymu (77, 78, 98, 114, 115) zakłada polimeryzację identycznych podjednostek złożonych ze strukturalnie takich samych układów hemowych i jednego tylko rodzaju białka. Zwolennicy tej hypo-

tezy uważają za nieprawdopodobne występowanie cytochromów  $a$  i  $a_3$  w układzie oksydazy cytochromowej. Dlaczego bowiem jest niemożliwe rozdzielenie tylko dwóch cytochromów mimo rozdzielenia innych? Czy tłumaczyć obserwowaną dla oksydazy tylko jedną wartość potencjału oksydoredukcyjnego i to zarówno dla oksydazy rozpuszczonej jak i związanej ze strukturą mitochondrionu (2, 41, 111)? Zawartość równomolarnych ilości miedzi w stosunku do hemu w preparatach enzymu może nie tylko zmieniać reaktywność hemu, lecz również widmo enzymu oraz wrażliwość na inhibitory. Nie da się również wykluczyć wpływu na widmo i własności enzymu jego utlenowanej postaci, chociaż jej budowa i funkcja jest do tej pory niewyjaśniona. W wielu pracowniach (74, 81) natomiast obserwowano polimeryczną formę enzymu, która depolimeryzuje do charakteryzującego się bardzo wysoką aktywnością dimeru oraz monomeru (57, 81, 116) w pełni aktywnego enzymatycznie i zachowującego wszystkie własności oksydazy. Interesującym przyczynkiem do połączenia teorii dualistycznej z jednostkową jest sugestia o allosterycznym charakterze oksydazy cytochromowej (70). Początkowa reakcja jednego hemu ( $a_3$ ) zmieniać może allosterycznie reaktywność drugiego ( $a$ ), co może być przyczyną niezwykłych reakcji enzymu.

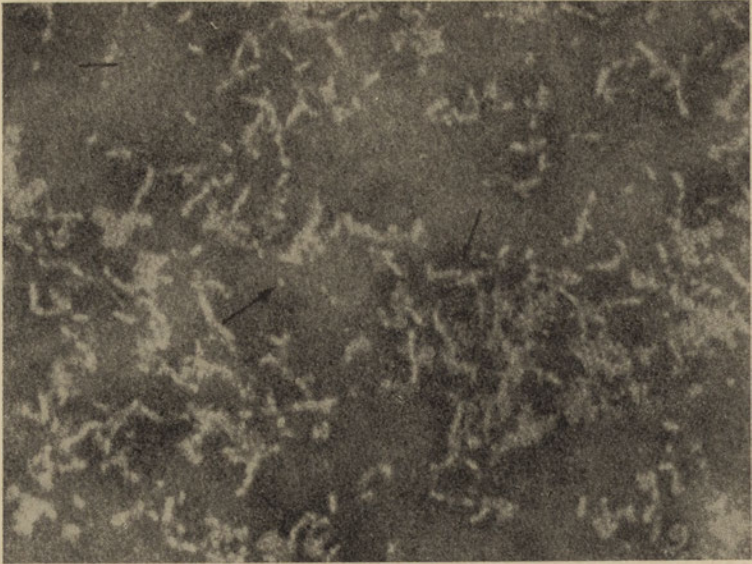
## II. Charakterystyka białka enzymu

Oksydaza cytochromowa istnieje w kilku stanach molekularnych zależnych od zawartości fosfolipidów, siły jonowej oraz obecności detergentów w preparatach enzymu (11, 93). Z dotychczasowych prac wynika, że w niejonowych detergentach typu Tween roztwór jest monodispersyjny o dużym stopniu agregacji cząsteczek, natomiast w dezoksycholanie sodu polidispersyjny (96, 98). W nieobecności lipidów i detergentów enzym występuje w postaci nieaktywnych kulistych agregatów o średnicy 90 Å. Dodanie fosfolipidów powoduje dyspersję enzymu do takich form cząsteczkowych, w których konfiguracja zapewnia ekspozycję wszystkich grup prostetycznych niezbędnych do reakcji. Tworzy się wtedy struktura błoniasta wielkości 50—55 Å (rysunek 5 i 6) (12, 13).

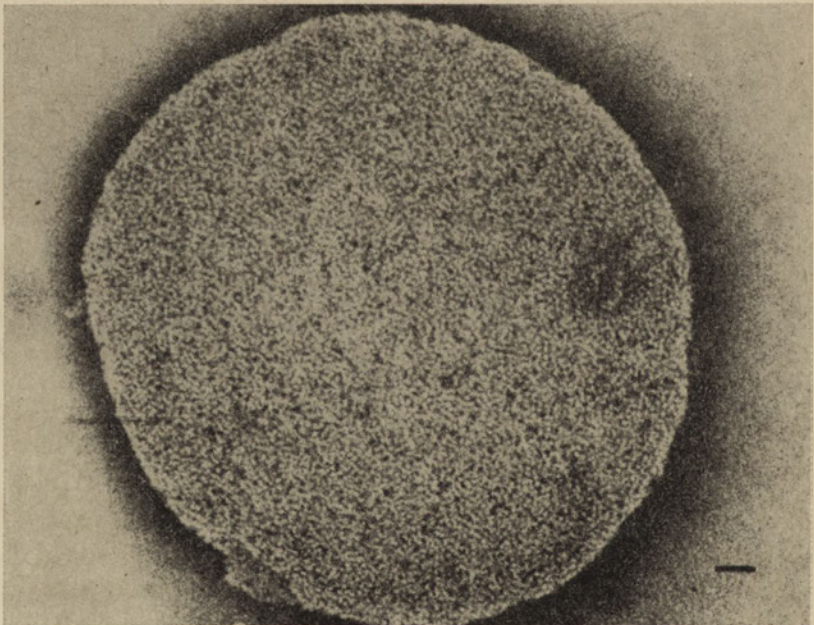
Lipidy, stanowiące 20—30% masy dołączone są do białka wiązaniem jonowym, prawdopodobnie do lizyny lub argininy (1, 34). Brak wpływu fosfolipazy A na enzym sugeruje, że zarówno kwasy tłuszczowe jak i pozostała część cząsteczki tłuszczu otoczona jest hydrofobowymi grupami białka (1).

Dotychczas wykonano cztery oznaczenia ciężaru cząsteczkowego natywnej oksydazy z serca wołu. Takemori (96, 98) otrzymał wartość 530 000 dla preparatu Okunuki (74) w 0,25% Emasol'u z wartości  $S_{20,w} = 21,9 \times 10^{-13}$  sek,  $D_{20,w} = 3,58 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>sek<sup>-1</sup> i  $V = 0,72$  ml  $\times$  g<sup>-1</sup>. Minimalny ciężar cząsteczkowy wyliczony z zawartości żelaza wyniósł 100 000





**Rys. 5.** Preparat oksydazy cytochromowej po usunięciu lipidów (wg 13). Zawiera 1,5 mg Tritonu X-100/mg białka. Barwienie negatywne. Powiększenie 103 000 razy, marker 1500 Å.



**Rys. 6.** Preparat oksydazy cytochromowej pozbawionej lipidów (wg 13) Zawiera 1,5 mg Tritonu X-100/mg białka po dodaniu 23% fosfolipidów. Barwienie negatywne, powiększenie 103 000 razy. Marker 500 Å.



sugerując pentameryczną postać enzymu. Średnią wartość około 298 000 (lub 230 000 po odjęciu lipidów) uzyskał Tzagoloff i wsp. (102). W obecności 4—6M mocznika ciężar cząsteczkowy obniżał się do około 100 000. Wyliczony z zawartości hemu średni ciężar wynosił 124 000, co wskazywałoby na dimeryczną postać enzymu. Ostatnio Love, Chan i Stotz (10, 57) oznaczyli, że ciężar oksydazy preparowanej metodą Yonetani (125) wynosi w przybliżeniu 200 000. Dimer ten w obecności niejonowego buforu i w alkalicznym pH dysocjuje do monomeru o masie 100 000. Forma monomeryczna wykazuje około 90% aktywności dimeru, charakteryzuje się normalnym widmem absorpcyjnym oraz wiąże CO w ilości dwukrotnie większej w porównaniu z dimerem. Podejmowane były również próby zmierzające do rozbicia polimerycznej formy enzymu przez zastosowanie związków depolimeryzujących. Minimalny ciężar cząsteczkowy wynoszący 72 000 uzyskał Criddle i Bock (16) w obecności 0,002M siarczanu dodecyłu sodu. Preparat ten był mieszaniną 85% monomeru i 15% dimeru. Orii i Okunuki (81), działając na enzym o masie 530 000 w Tween'ie — siarczanem dodecyłu sodu obserwowali w ultrawirówce cząsteczki 16S i 5,7S. Wartości stałych sedymentacji odpowiadają masie cząsteczkowej 290 000 (dimer) i 67 000 (połowa monomeru). Wainio i wsp. (116) stwierdzili, że oksydaza cytochromowa w dezoksycholanie sodu ma stałą sedymentacji  $S_{20,w} = 8,4 \times 10^{-13}$ sek, a stałą dyfuzji  $D_{20,w} = 3,21 \times 10^{-7}$ cm<sup>2</sup>sek<sup>-1</sup>, co odpowiada ciężarowi cząsteczkowemu 210 000. Zastąpienie dezoksycholanu sodu Tween'em powodowało agregację oksydazy do cząsteczek 16,5S. Autorzy oznaczyli z zawartości żelaza minimalny ciężar cząsteczkowy równy 110 000, zaś z analizy aminokwasów 85 000. Wydaje się zatem, że w roztworach soli kwasów żółciowych oksydaza występuje w formie dimerycznej.

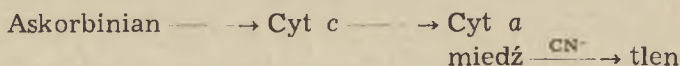
Analizę składu aminokwasowego wysoko oczyszczonego enzymu wykonał Matsubara i wsp. (60), oraz Wainio i wsp. (116). Po usunięciu lipidów, w cząsteczce o masie 93 000, znaleziono 820 reszt aminokwasowych: Lys<sub>39</sub>, His<sub>30</sub>, Arg<sub>30-31</sub>, Try<sub>30</sub>, Asp<sub>58-61</sub>, Trp<sub>52-53</sub>, Ser<sub>53-55</sub>, Glu<sub>59-60</sub>, Pro<sub>46</sub>, Gli<sub>58-59</sub>, Ala<sub>60-64</sub>, Cys<sub>7</sub>, Val<sub>49-52</sub>, Met<sub>35</sub>, Ileu<sub>43</sub>, Leu<sub>86-88</sub>, Tyr<sub>32-33</sub>, Fen<sub>46-47</sub>, (NH<sub>2</sub>)<sub>56</sub>. Zawartość lizyny i argininy przewyższa ilość aminokwasów kwaśnych mimo że punkt izoelektryczny oksydazy jest w pH 4—5 (98). Zawartość leucyny jest bardzo wysoka (88 reszt). Wśród 7 reszt cysteiny przypuszcza się obecność co najmniej dwóch mostków S—S, aktywność oksydazy jest bowiem odwracalnie hamowana przez związki tiolowe (14, 15). Kirschbaum i Wainio (45) obserwowali zwiększenie przez EDTA liczby grup tiolowych reagujących z nitroprusydkiem sodu z 2 do 4, lecz późniejsze badania Okunuki (80, 103) wykazały reakcję 6 grup-SH z pCMB (p-chlorortęciobenzoesan) bez zmiany aktywności enzymu. Natomiast siódma grupa reaguje tylko w obecności siarczanu dodecyłu sodu przy równoczesnym uwolnieniu znacznych ilości miedzi z utratą ak-

tywności. Być może grupy tiolowe odpowiedzialne są za utrzymanie miedzi w cząsteczce enzymu.

### III. Miedź i jej rola

Obecność miedzi w preparatach oksydazy cytochromowej obserwowali już Keilin w latach trzydziestych (45). Początkowo przypuszczano, że jest ona niezbędna w procesie biosyntezy układu hemowego, nie sądzono by brała udział w transporcie elektronów (26, 48). Wainio pracując nad oksydazą serca wołu, ekstrahowaną dezoksychohanem sodu zwrócił uwagę na utrzymujący się w pobliżu jednościosunek hemu do miedzi w czasie oczyszczania (112, 113, 114). Wynik ten potwierdzono w innych pracowniach (4, 5, 76, 86, 97, 107, 108, 109, 127) i przyjmuje się obecnie, że w aktywnej oksydazie cytochromowej dwa atomy miedzi towarzyszą dwóm układom hemowym (5, 66, 81).

Utrata aktywności enzymu obserwowana przy próbie usunięcia miedzi, sugeruje jej udział w transporcie elektronów, lecz dowody na to są wręcz znikome (38, 39, 58, 94, 112). Wszystkie inhibitory oraz związki wiążące miedź są również czynnikami wpływającymi na układ hemowy. Nie obserwuje się nigdy redukcji tylko hemu lub tylko miedzi. Czynniki redukujące hem, wśród nich również cytochrom *c* (redukowany wodorem w obecności platyny) redukują również miedź (82). Interesujące wyniki uzyskali Beinert i wsp. (3) stosując do badania stanu oksydoredukcyjnego miedzi i jej roli w oksydazie, metodę elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Typowe widmo EPR dla mitochondriów i cząsteczek submitochondrialnych staje się bardziej intensywne podczas oczyszczania oksydazy, zanika jednak po redukcji enzymu. Widmo EPR jednowartościowej miedzi nie istnieje z powodu diamagnetycznego stanu jonu, stąd też badanie enzymu zredukowanego jest pośrednie. Nie obserwowano również zmian widma EPR natywnej miedzi w obecności chelatorów: EDTA i BCS (metasiarczan 4,7-dwuhydroksy-1, 10-fenantroliny). Autorzy przypuszczają, że stan oksydoredukcyjny miedzi jest paraleny do stanu hemu oraz, że co najmniej dwa atomy miedzi są tak blisko siebie, że może zachodzić między nimi reakcja wymiany. Nie udaje się jednak uzyskać redukcji substratem całej miedzi związanej z enzymem. Zwykle około 15% pozostaje w formie utlenionej. Najbardziej kompletna i gwałtowna redukcja zachodzi w anaerobowych warunkach w obecności cyjanku i azydku. Zanika też widmo EPR oksydazy. Interesującym jest brak zdolności do reutlenia w obecności tych inhibitorów. Griffiths i Wharton (39) proponują schemat, w którym miedź mogłaby bezpośrednio wchodzić w reakcję z tlenem:

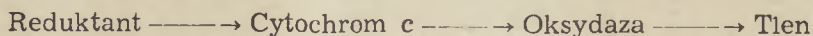




Analogicznie do innych miedzioproteidów, jak plastocjanina, oksydaza askorbinianowa, ceruloplazmina, lakaza, również oksydaza cytochromowa posiada w okolicy 830 nm maksimum absorpcji (37, 39). Absorpcja ta zanika po redukcji enzymu oraz pod wpływem mocznika, BCS oraz po usunięciu miedzi przez dializę wobec stężonych roztworów cyjanku (31, 72, 117). Jednak jedynym dowodem przemawiającym za tym, że istotnie miedź jest odpowiedzialna za tę absorpcję byłaby reinkorporacja miedzi po uprzednim jej usunięciu. W 1966 roku *Nair i Mason* (71, 73) usunęły 50% miedzi posługując się BCS. Utraconą aktywność enzymatyczną odzyskiwano w obecności soli miedziowych. Jednakże *Beinert i wsp.* (7) wykazali ostatnio, że BCS nie usuwa natywnej miedzi z oksydazy cytochromowej. Wyniki analizy chemicznej *Naira i Masona* obarczone są błędem, uzyskano je bowiem w obecności dużych stężeń chelatora, interferującego w oznaczeniach. Obniżenie aktywności enzymatycznej po BCS zależy zdaniem *Beinerta i wsp.* od tzw. „efektu BCS” (58). Wydaje się, że BCS zapobiega dezagregacji enzymu do maksymalnie aktywnych jednostek (cytochrom *a*, cytochrom *a<sub>3</sub>*, dwa miedzioproteidy). Jon miedziawy zapobiega i znosi „efekt BCS”.

#### IV. Utlenianie cytochromu c

Oksydaza cytochromowa jest enzymem katalizującym utlenianie zredukowanego cytochromu c przez cząsteczkę tlenu. Kinetykę tej reakcji można obserwować bądź spektrofotometrycznie, przez zanikanie zredukowanego cytochromu c w warunkach aerobowych, bądź też mierząc manometrycznie zużycie tlenu. Ponieważ zużycie tlenu przy stechiometrycznych ilościach cytochromu c byłoby niesłychanie małe, dodaje się czynnik redukujący, który nieenzymatycznie utrzymuje cytochrom c w formie zredukowanej. Zatem:

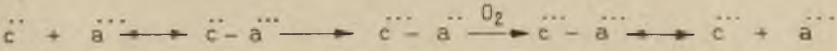


W tych warunkach cytochrom c pełni funkcję katalizatora, a zużycie tlenu jest ekwiwalentne do ilości utlenionego reduktanta.

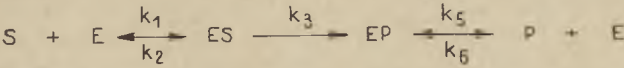
Z pierwszych obserwacji *Keilina* (42), a następnie *Stotza* (92) wynikało, że rozpuszczalny, dodany do preparatów z mięśnia sercowego cytochrom c tworzy z oksydazą aktywny kompleks ES. Szybkość zużycia tlenu jako funkcja stężenia cytochromu c jest krzywą hiperboliczną, z której można wyliczyć wartość stałej Michaelisa  $K_m$  (84, 85, 118, 126). Spektrofotometrycznie oznaczana aktywność oksydazy jest reakcją I rzędu w odniesieniu do zredukowanego cytochromu c, nawet w jego bardzo wysokich stężeniach. Jednakże stała szybkość reakcji spada ze wzrostem stężenia substratu. *Smith i Conrad* (88), *Minnaert* (65) sugerują obecność intermediatów reakcji. Może być kilka mechanizmów odpowie-



działalnych za ten rodzaj kinetyki utleniania cytochromu c przez oksydazę. Większość (106) autorów przychyliła się do zaproponowanego przez Minnerta (65) następującego schematu reakcji:



albo:



Jeżeli  $k_1 = k_6$  i  $k_2 = k_5$ , wtedy

$$v = \frac{k_1 k_2 k_3 (S) e}{k_1 (k_2 + k_3) (P + S) + k_2 (k_2 + k_3)}$$

Stała Michaelisa  $K_m$  dla  $(P + S) = k_2 / k_1$  i szybkość maksymalna

$$\text{dla } (P + S) = \infty, \text{ równa się } \frac{k_2 k_3 e}{(k_2 + k_3) (1 + f)}$$

**Schemat 1.** Mechanizm utleniania zredukowanego cytochromu c przez oksydazę cytochromową (wg 65).

$\overset{\cdot\cdot\cdot}{c}$ , S — zredukowany cytochrom c = substrat;  $\overset{\cdot\cdot\cdot}{c}$  — utleniony cytochrom c = produkt;  $\overset{\cdot\cdot\cdot}{a}$  — utleniona oksydaza cytochromowa;  $\overset{\cdot\cdot\cdot}{a}$  — zredukowana oksydaza cytochromowa, v — szybkość reakcji, K — stała szybkości reakcji, c — całkowite stężenie enzymu, f = PI/SJ.

Zakłada się tu istnienie stechiometrycznych kompleksów między enzymem a utlenionym substratem. Szybkość utleniania kompleksu ES jest proporcjonalna do jego stężenia. Mechanizm ten wymaga jednakowego powinowactwa oksydazy do utlenionego i zredukowanego cytochromu c, co jest w zgodzie z założeniem, że wartościowość żelaza cytochromu c nie ma wpływu na jego elektrostatyczne powinowactwo do enzymu (24, 89), to znaczy, że stała asocjacji i dysocjacji kompleksu cytochromu c z oksydazą nie zmienia się ze zmianą wartościowości żelaza hemowego cytochromu c.

Tworzenie kompleksu ES wykazał K u b o y a m a (46, 47), rozdzielając substraty i produkty reakcji na Sephadexie, O r i i (79), poprzez kinetykę utleniania askorbinianu i redukcję cytochromu c oraz wykazując udział cytochromu c w precypitacji oksydazy w roztworze o małej sile jonowej. Nicholls (68) stwierdził tworzenie stechiometrycznego kompleksu między cytochromem c i enzymem, w którym molarny stosunek związanego cytochromu c do hemu wynosił 1:1. Stałe dysocjacji tego kompleksu w różnych stężeniach soli są takie same jak wyliczone z wartości  $K_m$  dla reakcji oksydazy z cytochromem c, w różnych wartościach siły jonowej. Istotnie, wartości  $K_m$  wzrastają ze wzrastającym stężeniem kationów, co może wynikać z kompetycji między substratem a kationami w roztworze o miejsce na enzymie. Tego typu kompetycję obserwował E s t a b r o o k (22, 23), przy czym kationy o wyższej wartościowości wykazują tu większą

reaktywność. Badanie kinetyki utleniania w różnych stężeniach kationów wykazało, że przy spadającej sile jonowej maksymalna szybkość reakcji po osiągnięciu najwyższej wartości spada i ustala się, chociaż  $K_m$  obniża się nadal.

Badanie kinetyki utleniania cytochromu c przy zastosowaniu spektrofotometru rejestrującego przebieg reakcji w tysięcznych częściach sekundy (27, 28) wykazało, że po gwałtownym utlenieniu jednego mola cytochromu c przez mol hemu oksydazy, szybkość reakcji spada tak znacznie, że można już oznaczenia prowadzić w zwykłym spektrofotometrze. Być może szybkość dysocjacji wytworzonego kompleksu ES jest czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji, bądź też zredukowany cytochrom c zastępuje w kompleksie białko utlenionego enzymu (29, 30). Rolę hamującą może też tu odgrywać zasadowy charakter białka cytochromu c, chociaż silnie zasadowe gwanidynowe pochodne oksydazy, są tak samo aktywne jak białko natywne i też wykazują wrażliwość na wzrastające stężenia cytochromu c (98). Jednakże obserwowano szybsze utlenianie kwaśnego cytochromu c z *Thiobacillus* niż zasadowego z *Chlorobium* w obecności oksydazy ssaków (122). Nie wydaje się również prawdopodobne, by hamujące własności kompleksu ES zależały od reakcji grup  $\epsilon$ -aminowych cytochromu c z kwaśnymi resztami fosfolipidów, dołączonych do białka oksydazy. Trójnitrofenylacja  $\epsilon$ -aminowych grup cytochromu c powoduje bowiem tylko 50% utraty własności hamujących cytochromu c, zaś cytochrom c częściowo acetylowany jest w pełni aktywny jako inhibitor (99). Przypuszczalnie w reakcji tej współdziałają zarówno zasadowe jak i hydrofobowe grupy substratu i enzymu. Nicholls (69) przypuszcza, że miejsca wiązania endogennego i egzogennego cytochromu c do oksydazy są różne. Endogenny cytochrom łączyłby się z miejscem wysokiego powinowactwa, zaś egzogeny, nienormalnie przyłączony mógłby być odpowiedzialny za inhibicję przez wzrastające stężenia substratu (17, 87, 90, 91).

Ostatnio Buren i wsp. (106) obserwując odwrotną proporcjonalność aktywności molekularnej ( $v:e$ ) do stężenia oczyszczanego enzymu sugerują obecność inhibitora w preparacie, tworzącego nieaktywne kompleksy z E, ES, EP, o takiej samej wartości stałej inhibicji  $K_i$ . Natomiast Mason i Ganapathy (58) wzrost aktywności molekularnej zależny od rozcieńczenia enzymu przypisują dezagregacji oksydazy do takich form molekularnych, których aktywność enzymatyczna jest najwyższa.

Zwrócić tu należy również uwagę na rolę fosfolipidów, które ułatwiają reakcję między cytochromem c i oksydazą (13a). Dopóki jedna z komponent jest połączona z lipidami, reakcja przebiega z szybkością maksymalną. Jednakże zarówno budowa jak i własności katalityczne obydwu hemoproteinów zależą od obecności fosfolipidów. Połączony z lipidami cytochrom c może istnieć w dwóch formach molekularnych, nieaktywnej zagregowanej i aktywnej micelarnej. Własności katalityczne determinują nie tylko obecność lipidów, lecz również ich orientacja na cząsteczce białka. Oksy-



daza cytochromowa pozbawiona lipidów traci częściowo zdolność interakcji z kompleksem: lipidy—cytochrom c. Jeśli lipidy występują w połączeniu z cytochromem c i oksydazą, aktywność jest większa, niż gdy tylko z jednym ze składników reakcji. Utrzymują właściwą konfigurację samej oksydazy cytochromowej.

## V. Reakcja z tlenem

W reakcji zredukowanej oksydazy cytochromowej z tlenem powstaje w zależności od warunków utleniona, bądź też różniąca się od niej widmem absorpcyjnym utlenowana forma enzymu. Greenwood i Gibson (36) przyjmując za jednostkę kooperatywną oksydazy cytochrom  $a$ , cytochrom  $a_3$  i dwa atomy miedzi, uważają, że cząsteczka tlenu dyfunduje w głąb enzymu dając dwie cząsteczki wody, przy czym proces chemiczny musi być złożony co najmniej z czterech reakcji: dyfuzja tlenu ( $1 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{sek}^{-1}$ ), reakcja z cytochromem  $a_3$  ( $3 \times 10^{-4} \text{sek}^{-1}$ ), następnie reakcja z miedzią ( $7 \times 10^3 \text{sek}^{-1}$ ) oraz z cytochromem  $a$  ( $7 \times 10^2 \text{sek}^{-1}$ ). W procesie tym występują prawdopodobnie więcej niż cztery reakcje, lecz trudne są do uchwycenia, bowiem półokres trwania jest krótszy niż 10  $\mu\text{sek}$ .

Z prac Whartona i wsp. (119) wynikało, że gwałtowna reakcja zredukowanej oksydazy z tlenem prowadzi najpierw do formy utlenionej enzymu, z której powstawać mogłaby utlenowana. Podważało to hipotezę, że utlenowany enzym mógłby być formą pośrednią w reakcji katalizowanej przez oksydazę (55, 56). Wyniki Gilmore i wsp. (33) uzyskane przez obserwację zmian absorpcji jednocześnie w 428 nm i 418 nm wykazały, że czynnikiem limitującym powstawanie utlenionej lub utlenowanej oksydazy podczas reakcji zredukowanego enzymu z tlenem jest stężenie tlenu. Przy dużym i gwałtownym dostępie tlenu powstaje głównie utlenowany enzym, przy niewielkim stężeniu utleniony. Lemberg i Cutler (56) obserwowali utlenianie więcej niż dwóch cytochromów c (w przeliczeniu na mol hemu) przez utlenowaną oksydazę cytochromową, co tłumaczą większą jej aktywnością w porównaniu z enzymem utlenionym, spowodowaną być może jej konformacją. Utlenowany enzym jest nie-trwały i samorzutnie (około 20 min.) przechodzi w utleniony. Utlenowana oksydaza nie jest połączeniem analogicznym do oksyhemoglobiny (8), lecz jej budowa nie jest znana. Miedź prawdopodobnie występuje tu w postaci utlenionej, nie obserwowano bowiem zmian w wielkości absorpcji przypisywanej miedzi w 830 nm (32, 54). Widmo rezonansu paramagnetycznego elektronów było takie samo jak enzymu utlenionego (6, 110). Charakteryzuje się obecnością maksimum w 603 nm i przesunięciem prążka Soreta do 428 nm (Rys. 1) (18, 75). W obecności dwutlenku sodu ulega redukcji szybko i łatwo i w przeciwieństwie do utlenionej oksydazy reakcja ta jest jednofazowa (19, 20, 53), nie jest natomiast zredukowana przez NADH

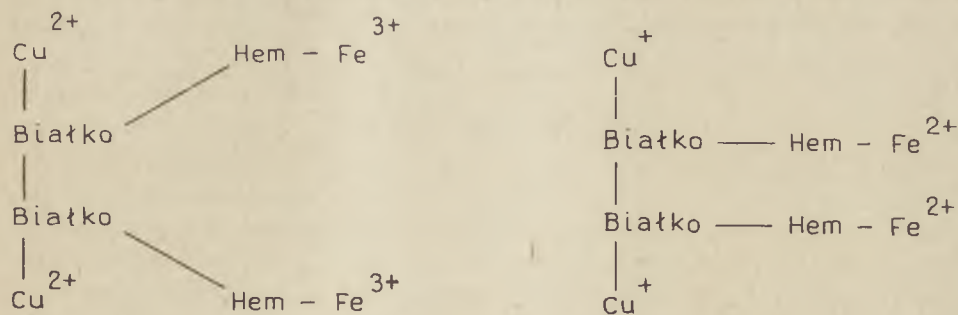


i metasiarczan fenazy (100). Początkowe sugestie, że utlenowany enzym może mieć budowę podobną do nadtlenu oparte były na obserwacji powstawania tej formy w obecności  $50\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  (35, 51). Kataliza zapobiega powstawaniu utlenowanej oksydazy, a dodana powoduje jej rozkład (50). Jednakże dalsze badania wykluczyły tę hipotezę (53). Zwraca uwagę podobieństwo utlenowanej oksydazy do związku III peroksydazy chrzantu, ale budowa również tego związku jest niewyjaśniona (123, 124). Utlenowana oksydaza mogłaby być mieszaniną  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , zawierać żelazo na wyższym stopniu utlenienia, zawierać konformacyjnie zmienione białko w otoczeniu układu hemowego. Nie wyklucza się również zmian stanu oksydoredukcyjnego grup na białku innych niż żelazo i miedź, a wpływających na widmo enzymu.

## VI. Konformacja oksydazy cytochromowej

Z badań nad cytochromem c i innymi hemoproteidami wiemy, że geometryczna relacja grupy prostetycznej i apoenzymu zależy od stanu wartościowości żelaza hemowego, od interakcji między układami hemowymi oraz od zmian konformacyjnych (21, 59, 61, 63, 121). Analiza widm dyspersji rotacji optycznej (ORD) wykazała zmiany symetrii grupy prostetycznej cytochromu c związane z procesem oksydoredukcyjnym. Budowa przestrzenna utlenionego i zredukowanego cytochromu jest różna, a nawet podczas oksydoredukcyjnych następują zmiany w ligandach dołączonych do żelaza.

Badaniem konformacji oksydazy cytochromowej zajmowali się Schellman, King, Myer (62, 83), Urry i wsp. (104). Szczególnie interesującą wydaje się obserwacja, (104), że układy hemowe w utlenionej oksydazie są odległe od siebie o 10–15 Å, podczas gdy w formie zredukowanej mogą być strukturalnie zbliżone (Schemat 2).



Oksydaza utleniona

Oksydaza zredukowana

**Schemat 2.** Utleniona i zredukowana oksydaza cytochromowa (wg 104)

Strukturalne zbliżenie może być potrzebne do transportu elektronów przez układ oksydazy. Reagująca cząsteczka tlenu mogłaby dyfundować do określonego miejsca na enzymie, gdzie dwa układy hemowe i dwa atomy miedzi przenoszą cztery elektrony jednocześnie, lub w bardzo gwałtownej reakcji kaskadowej. Podczas utleniania cząsteczka mogłaby się otwierać i jon oksylowy reagując z protonami wytwarzać wodę dyfundującą na zewnątrz. Ostatnio (64), sugeruje się jednak brak zbliżenia strukturalnego między układami hemowymi również w formie zredukowanej enzymu, co podważa tę hipotezę.

Analiza widm dichroizmu kołowego wykazała wysoki stopień symetrii otoczenia układu hemowego, charakteryzujący zredukowany enzym w przeciwieństwie do utlenionego. Przypuszcza się, że zmianom wartościowości żelaza towarzyszą zmiany innych czynników determinujących symetrię, jak wymiana między białkiem a grupą prostetyczną, rodzaj grup dołączonych w pozycji 5 i 6 żelaza oraz konfiguracja samej grupy prostetycznej. Na tę ostatnią duży wpływ ma rodzaj detergentu zastosowanego do izolowania enzymu oraz przechowywanie preparatu. W części białkowej enzymu przyjmuje się obecność formy spiralnej oraz struktury  $\beta$  (64, 101). Obserwuje się tu różnice między utlenioną a zredukowaną oksydazą. W utlenionym enzymie forma spiralna stanowi 39%, a w zredukowanym 44%. Dołączenie inhibitorów, jak tlenek węgla lub cyjanek również powoduje zmiany w organizacji łańcucha polipeptydowego. Zmiany konformacji grupy prostetycznej dotyczą głównie zredukowanej oksydazy, utleniona jest względnie stabilna. Co może być zatem czynnikiem powodującym zmienną pozycję prążka Soreta w widmie absorpcyjnym utlenionego enzymu, obserwowaną przez wielu autorów (20, 25, 36, 74, 125)? *M u i j s e r s* i wsp. (67) odróżniają co najmniej trzy formy utlenionego enzymu: (a), z prążkiem Soreta w 424nm (stabilizowana przez tlen); (b), w 420nm (trwała w nieobecności tlenu); (c), w 418nm (uznana przez *L e m b e r g a* i *K i n g a* (44, 49) za normalną utlenioną oksydazę). Autorzy uważają je za konformacyjnie różne.

## VII. Uwagi końcowe

Oksydaza cytochromowa zajmuje unikalną pozycję jako enzym końcowy w układzie przenoszącym elektrony w mitochondriach. Od wielu lat w centrum zainteresowania biochemików leży wzajemny stosunek budowy enzymu do jego funkcji. Jednakże pomimo intensywnych badań nasze wiadomości są fragmentaryczne. Jeden cytochrom czy dwa, stan molekularny cząsteczki, funkcja lipidów i miedzi, mechanizm działania — wszystkie te problemy oczekują wyjaśnienia. Rozwój nowoczesnych metod fizykochemicznych w przypadku oksydazy cytochromowej jest warunkiem niezbędnym do dalszego postępu badań.

## LITERATURA

1. Awasthi Y. C., Chuang T., Keenan T., Crane F., *Biochim. Biophys. Acta* **226**, 42 (1971).
2. Ball E., *Biochem. Z.* **295**, 593 (1955).
3. Beinert H., Griffiths D., Wharton D., Sands R., *J. Biol. Chem.* **237**, 2337 (1962).
4. Beinert H., Palmer G., w Oxidases and related redox systems, red. King T., Mason H., Morrison M., Willey, New York, 1965, str. 567.
5. Beinert H., w Copper in biological systems, red. Peisach J., Aisen P., Blumberg W., Academic Press, New York, 1966, str. 213.
6. Beinert H., Van Gelder B., Hansen R., w Symposium on cytochromes, Osaka, 1967, Structures and function of cytochromes, red. Okunuki K., Kamen M., Sekuzu I., University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, str. 141.
7. Beinert H., Hartzell Ch., Van Gelder B., Ganapathy K., Mason H., Wharton D., *J. Biol. Chem.* **245**, 225 (1970).
8. Caughey W., McCoy S., w Copper in biological systems, red. Peisach J., Aisen P., Blumberg W., Academic Press, New York, 1966, str. 271.
9. Chance B., Williams G., *Advances in Enzymology* **17**, 65 (1956).
10. Chan S., Love B., Stotz E., *J. Biol. Chem.* **245**, 6669 (1970).
11. Chuang T., Awasthi J., Crane F., *Proc. Ind. Acad. Sci.* **79** (1969).
12. Chuang T., Sun F., Crane F., *Fed. Proc.* **29**, 540 (1970).
13. Chuang T., Sun F., Crane F., *J. Bioenergetics* **1**, 227 (1970).
14. Cooperstein S., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 343 (1963).
15. Cooperstein S., *J. Biol. Chem.* **238**, 3606 (1963).
16. Criddle R., Bock R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 138 (1959).
17. Davies H., Smith L., Wasserman A., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 238 (1964).
18. Davison A., Wainio W., *Fed. Proc.* **23**, 323 (1964).
19. Davison A., PhD Thesis, Rutgers — The State University, 1964.
20. Davison A., Wainio W., *J. Biol. Chem.* **243**, 5023 (1968).
21. Drucker H., Campbell L., Woody R., *Biochemistry* **9**, 1519 (1970).
22. Estabrook R., *Fed. Proc.* **18**, 223 (1959).
23. Estabrook R., w Haematin Enzymes, red. Falk J., Lemberg R., Morton R., Pergamon, London, 1961, str. 276.
24. Estabrook R., w Proc. Symp. Haematin Enzymes, Cranberra, London, 1962, str. 189.
25. Fowler L., Richardson S., Hatefi Y., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 170 (1962).
26. Gallagher C., Judah J., Rees K., *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* **145**, 195 (1956).
27. Gibson Q., Greenwood C., *Biochem. J.* **86**, 541 (1963).
28. Gibson Q., Greenwood C., *J. Biol. Chem.* **239**, 586 (1964).
29. Gibson Q., Greenwood C., *J. Biol. Chem.* **240**, Pc 957 (1965).
30. Gibson Q., Greenwood C., Wharton D., Palmer G., *J. Biol. Chem.* **240**, 888 (1965).
31. Gibson Q., Greenwood C., *J. Biol. Chem.* **240**, 2694 (1965).
32. Gilmour M., *Fed. Proc.* **26**, 1107 (1967).
33. Gilmour M., Lemberg R., Chance B., *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 37 (1969).
34. Gilmour M., Wainio W., doniesienie prywatne, 1970.
35. Greenwood C., *Biochem. J.* **86**, 535 (1963).
36. Greenwood C., Gibson Q., *J. Biol. Chem.* **242**, 1782 (1967).



37. Griffiths D., Wharton D., *J. Biol. Chem.* **236**, 1850 (1961).
38. Griffiths D., Wharton D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 199 (1961).
39. Griffiths D., Wharton D., *J. Biol. Chem.* **236**, 1857 (1961).
40. Holzwarth G., Dotty P., *J. Amer. Chem. Soc.* **87**, 218 (1965).
41. Horie S., Morrison M., *J. Biol. Chem.* **239**, 1438 (1964).
42. Keilin D., Hartree E., *Proc. Roy. Soc., London, Ser. B*, 171 (1938).
43. Keilin D., Hartree E., *Proc. Roy. Soc., London, Ser. B*, **127**, 167 (1939).
44. King T., w Hemes and Hemoproteins, red. Chance B., Estabrook R., Yonetani T., Academic Press, New York, 1966, str. 495.
45. Kirschbaum J., Wainio W., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 643 (1966).
46. Kuboyama M., Takemori S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 534 (1962).
47. Kuboyama M., Takemori S., King T., *Fed. Proc.* **22**, 2542 (1963).
48. Lemberg R., Newton N., Clarke L., *Aus. J. Expt. Biol. Med. Sci.* **40**, 367 (1962).
49. Lemberg R., w Hemes and Hemoproteins, red. Chance B., Estabrook R., Yonetani T., Academic Press, New York, 1966, str. 477.
50. Lemberg R., Mansley G., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 19 (1966).
51. Lemberg R., Gilmour M., Stanbury J., *Fed. Proc.* **25**, 2582 (1966).
52. Lemberg R., Stanbury J., *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 37 (1967).
53. Lemberg R., Gilmour M., *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 500 (1967).
54. Lemberg R., Gilmour M., w Structures and function of cytochromes, red. Okunuki K., Kamen M., Sekuzu I., Tokyo University Press, Tokyo, 1968, str. 54.
55. Lemberg R., *Physiol. Rev.* **49**, 48 (1969).
56. Lemberg R., Cutler M., *Biochim. Biophys. Acta* **197**, 1 (1970).
57. Love B., Chan S., Stotz E., *J. Biol. Chem.* **245**, 6664 (1970).
58. Mason H., Ganapathy K., *J. Biol. Chem.* **245**, 230 (1970).
59. Margoliash E., Schejter A., w Advances in Protein Chemistry, Academic Press, New York, 1966, str. 21.
60. Matsubara H., Orii J., Okunuki K., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 61 (1965).
61. Myer Y., *J. Biol. Chem.* **243**, 2115 (1968).
62. Myer Y., King T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**, 170 (1969).
63. Myer Y., *Biochim. Biophys. Acta* **214**, 94 (1970).
64. Myer Y., *J. Biol. Chem.* **246**, 1241 (1971).
65. Minnaert K., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 23 (1961).
66. Morrison M., Horie S., Mason H., *J. Biol. Chem.* **238**, 2220 (1963).
67. Muijsers A., Tiesjema R., Van Gelder B., *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 481 (1971).
68. Nicholls P., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 25 (1964).
69. Nicholls P., w Oxidases and related redox systems, red. King T., Mason H., Morrison M., Wiley, New York, 1965, str. 764.
70. Nicholls P., w Structures and function of cytochromes, red. Okunuki K., Kamen M., Sekuzu I., University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, str. 76.
71. Nair P., Mason H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 12 (1966).
72. Nair P., Mason H., *Fed. Proc.* **26**, 1106 (1967).
73. Nair P., Mason H., *J. Biol. Chem.* **242**, 1406 (1967).
74. Okunuki K., Sekuzu I., Yonetani Y., Takemori S., *J. Biochem. (Tokyo)*, **45**, 847 (1958).
75. Okunuki K., Hagihara B., Sekuzu I., Horio T., w Enzyme Chemistry, University Tokyo Press, Tokyo, 1958, str. 264.

76. Okunuki K., w *Oxidases*, red. Hayashi I., Academic Press, New York, 1962, str. 409.
77. Okunuki K., w *Comprehensive Biochemistry, Biological Oxidation*, red. Florkin M., Stotz E., Elsevier, 1966, str. 232.
78. Okunuki K., Sekuzu I., Orii T., Tsudzuki T., Matsubara Y., w *Structures and function of cytochromes*, red. Okunuki K., Kamen M., Sekuzu I., University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, str. 351.
79. Orii T., Sekuzu I., Okunuki K., *J. Biochem. (Tokyo)* **51**, 204 (1962).
80. Orii Y., Tsudzuki T., Okunuki K., *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 373 (1965).
81. Orii Y., Okunuki K., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 388 (1967).
82. Sands R., Beinert H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1**, 175 (1959).
83. Schellman J., King T., w *Hemes and Hemoproteins*, red. Chance B., Estabrook R., Yonetani T., Academic Press, New York, 1967, str. 507.
84. Slater E., *Biochem. J.* **44**, 305 (1949).
85. Slater E., *Biochem. J.* **45**, 1 (1949).
86. Slater E., Van Gelder B., Minnaert K., w *Oxidases and related redox systems*, red. King T., Mason H., Morrison J., Willey, New York, 1965, str. 667.
87. Smith L., *J. Biol. Chem.* **215**, 833 (1955).
88. Smith L., Conrad H., *Arch. Biochem. Biophys.* **63**, 403 (1956).
89. Smith L., Conrad H., *Proc. Symp. Haematin Enzymes*, Cranberra, London, 1962, str. 220.
90. Smith L., Camerino P., *Biochemistry* **2**, 1432 (1963).
91. Smith L., Minnaert K., *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 1 (1965).
92. Stotz E., Altschul A., Hogness T., *J. Biol. Chem.* **124**, 745 (1938).
93. Sun F., Prezbindowski K., Crane F., Jacobs E., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 804 (1968).
94. Takemori S., *J. Biochem. (Tokyo)*, **47**, 382 (1960).
95. Takemori S., Sekuzu I., Okunuki K., *J. Biochem. (Tokyo)* **48**, 569 (1960).
96. Takemori S., Sekuzu I., Okunuki K., *Nature* **188**, 593 (1960).
97. Takemori S., Sekuzu I., Okunuki K., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 159 (1960).
98. Takemori S., Sekuzu I., Okunuki K., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 464 (1961).
99. Takemori S., King T., *J. Biol. Chem.* **240**, 504 (1965).
100. Tjesjema R., Muijsers A., Blokzijl M., Van Gelder B., Slater E., w *Probes for membrane structures and function*, red. Chance B., Yonetani T., Mildwan A., Academic Press, New York, 1971, str. 601.
101. Towned R., Kumosinski T., Timasheff S., Fasman G., Davidson B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 163 (1966).
102. Tzagoloff A., Yang P., Wharton D., Rieske J., *Biochim. Biophys. Acta*, **96**, 11 (1965).
103. Tsudzuki T., Orii Y., Okunuki K., *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 37 (1967).
104. Urry D., Wainio W., Grebner D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 625 (1967).
105. Urry D., Van Gelder B., w *Structures and function of cytochromes*, red. Okunuki K., Kamen M., Sekuzu I., University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, str. 210.
106. Van Buuren K., Van Gelder B., Eggelte T., *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 468 (1971).
107. Van Gelder B., Slater E., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 663 (1963).
108. Van Gelder B., Muijsers A., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 405 (1964).

109. Van Gelder B., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 36 (1966).
110. Van Gelder B., Orme-Johnson R., Hansen E., Beinert H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 1073 (1967).
111. Wainio W., *J. Biol. Chem.* **216**, 593 (1955).
112. Wainio W., Van der Wende C., Shimp N., *J. Biol. Chem.* **234**, 2433 (1959).
113. Wainio W., w Haematin enzymes, red. Falk J., Lemberg R., Morton R., Pergamon Press, London, 1961, str. 281.
114. Wainio W., w Oxidases and related redox systems, red. King T., Mason H., Morrison M., Wiley, New York, 1965, str. 622.
115. Wainio W., Grebner D., O'Farrell H., w Structures and function of cytochromes, red. Okunuki K., Sekuzu I., University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, str. 66.
116. Wainio W., Laskowska-Klita T., Rossman J., Grebner D., *Arch. Biochem. Biophys.* (w druku).
117. Wharton D., Tzagoloff A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 121 (1963).
118. Wharton D., Griffiths D., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 103 (1962).
119. Wharton D., Gibson Q., w Symposium on cytochromes, Osaka 1967, Structure and function of cytochromes, red. Okunuki K., Kamen M., Sekuzu I., University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, str. 235.
120. Wharton D., Gibson Q., *J. Biol. Chem.* **243**, 702 (1968).
121. Willick G., Schonbaum G., Kay C., *Biochemistry* **8**, 3729 (1969).
122. Yamanaka T., Okunuki K., w Structures and function of cytochromes, red. Okunuki K., Kamen M., Sekuzu I., University of Tokyo Press, Tokyo, 1968, str. 309.
123. Yamazaki I., Yokota K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 249 (1965).
124. Yamazaki I., Yokota K., Takamura M., Hemes and hemoproteins, red. Chance B., Estabrook R., Yonetani T., Academic Press, New York, 1966, str. 119.
125. Yonetani T., *J. Biol. Chem.* **236**, 1680 (1961).
126. Yonetani T., *J. Biol. Chem.* **237**, 550 (1962).
127. Yonetani T., The Enzymes, red. Boyer P., Lardy H., Myrback K., New York, Academic Press, 1963, str. 43.



ROMAN TADEUSZ MARIAK \*, KRZYSZTOF WOROWSKI \*\*

## Wewnątrzkomórkowe peptydazy tkanek zwierzęcych

### Endocellular Peptidases of Animal Tissues

The classification, methods of isolation, physico—chemical properties and biological role of endocellular peptidases of animal tissue are described.

Enzymy proteolityczne występują powszechnie w organizmach zwierzęcych, roślinnych i drobnoustrojach. Jedne z nich działają na zewnątrz komórki (peptydazy egzocelularne), inne czynne są w jej wnętrzu (peptydazy endocelularne). Celem niniejszego opracowania są wyłącznie wewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne tkanek zwierzęcych. Aktywność proteolityczną komórek i tkanek wykazał po raz pierwszy w 1904 r. H e d i n (58). Zespół tych enzymów znany jest obecnie pod nazwą katepsyn. Po raz pierwszy terminem tym posłużyli się w 1928 roku W i l l s - t ä t e r i B a m a n n (158) dla kwaśnych proteaz ekstrahowanych wodą z różnych tkanek zwierzęcych. W stosowaniu terminu katepsyny nie ma pełnej zgody. Jedni autorzy zaliczają do nich wszystkie proteazy komórki, inni rezerwują to pojęcie jedynie dla kwaśnych wewnątrzkomórkowych proteaz. Endocelularne peptydazy budzą duże zainteresowanie nie tylko biochemików, ale również i wśród klinicyistów ze względu na ich funkcje fizjologiczne i rolę w patologii wielu schorzeń.

#### I. Podział i nomenklatura

Z tkanek zwierzęcych izolowano cały szereg różnych enzymów proteolitycznych i czynione były próby ich klasyfikacji. Jeden z proponowanych podziałów oparty jest na podobieństwie specyficzności peptydaz tkankowych do enzymów trawiennych: pepsyny, trypsyny i chymotrypsyny (37).

\* Lek. med., Zakład Biochemii, Instytut Fizjologiczno—Biochemiczny, Akademia Medyczna, Białystok

\*\* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Fizjologiczno—Biochemiczny, Akademia Medyczna, Białystok

Tablica 1.

Podział wewnątrzkomórkowych peptydaz

Grupa	Nazwa		Specyficzny substrat i optimum pH jego rozkładu
	Zalecana	Niezalecana	
Aminopeptydazy	Aminopeptydaza leucynowa*	Katepsyna III	L-leucyl-glicyna; 9,0 (134)
	Karboksy-peptydaza*	Katepsyna IV	Karbobenzoksy-L-glutamyl-L-tyrozyna; 3,0—4,0 (36,49)
	Katepsyna A	Katepsyna I	Hemoglobina; 3,5 (36) Karbobenzoksy-5-glutamyl-L-tyrozyna; 5,4 (66,67)
Dwupeptydazy	Hydrolaza tyrozyl-glicynowa*	Dwupeptydaza tyrozyl-glicynowa	Tyrozyl-glicyna; 7,3 (142)
	Katepsyna B	Katepsyna I trypsynopodobna	amid benzoilo-L-argininy; 5,0 (15,36)
Endopeptydazy	Katepsyna C	Katepsyna chymotrypsynopodobna	amid glicyl-L-tyrozyny; 5,1 (15,36,151)
	Katepsyna D	Katepsyna pepsynopodobna	hemoglobina; 3,6—3,8 (10,67).
	Katepsyna E	Katepsyna pepsynopodobna	albumina; 2,5 (93)

Egzopeptydazy

\*W tablicy podane są przykłady enzymów należących do tej grupy egzopeptydaz

Podstawą innego podziału są różnice w optimumch  $pH$  działania tych enzymów. Nie wydaje się on być najlepszym podziałem, gdyż optimum  $pH$  określonego enzymu zależy od użytego substratu i składu buforu.

Rozkład syntetycznych oligopeptydów przez wewnątrzkomórkowe proteazy stał się podstawą nowego podziału tych enzymów (39).

Według specyficzności substratowej oznaczono katepsyny wielkimi literami A, B i C (36, 42). Później wyizolowano z tkanek katepsyny, które nie hydrolizowały syntetycznych substratów rozkładanych przez katepsyny A, B i C i te oznaczono literami D i E. Klasyfikacja ta nie zakończyła problemu. Gdy zaczęto studiować specyficzność katepsyn za pomocą polipeptydów (104), oksydowanego łańcucha B insuliny (21, 77, 91, 92) i substratów białkowych (94) nie osiągnięto wyników zgodnych, z uzyskanymi na syntetycznych niskomolekularnych substratach.

Od 1961 roku przyjęty powszechnie jest podział enzymów, opracowany przez Komisję Enzymów Międzynarodowej Unii Biochemicznej (25). Według tego podziału peptydazy należą do trzeciej klasy enzymów. Spośród wyróżnionych w tej klasie podklas, czwarta obejmuje enzymy proteolityczne. W skład jej wchodzi następujące podpodklasy: hydrolazy  $\alpha$ -aminoacylopeptydowe (EC 3.4.1) czyli aminopeptydazy, hydrolazy peptydyloaminokwasów (EC 3.4.2) będące karboksypeptydazami, hydrolazy dwupeptydów (EC 3.4.2) i hydrolazy peptydylo-peptydów (EC 3.4.4). Trzy pierwsze podpodklasy obejmują egzopeptydazy, czwarta zaś endopeptydazy. Spośród endocelularnych proteaz opatrzonych terminem katepsyn tylko katepsyna A należy do egzopeptydaz. Natomiast pozostałe katepsyny B, C, D i E są endopeptydazami. Niektóre z katepsyn posiadają numery klasyfikacyjne (katepsyna C — EC 3.4.4.9; katepsyna D — EC 3.4.4.23).

W tablicy 1 podano podział endocelularnych peptydaz.

## II. Metody pomiaru aktywności endocelularnych peptydaz

Aktywność endocelularnych peptydaz oznacza się w homogenacie tkankowym, w izolowanej frakcji lizosomalnej otrzymanej metodą ultrawirowania i w różnych płynach biologicznych. Celem całkowitego uwolnienia enzymów z lizosomów homogenat traktuje się detergentami, np. Tritonem X—100, wodą destylowaną albo zamraża i odmraża kilkakrotnie.

Do wyznaczania optimum  $pH$  tkankowych proteaz używa się najczęściej zdenaturowanej hemoglobiny w buforze uniwersalnym Brittona i Robinsona. Niektóre z endocelularnych proteaz wymagają udziału aktywatorów lub stabilizatorów. Do oznaczania aktywności katepsyn o sulfhydrylowych centrach aktywnych dodaje się mieszaniny aktywującej, złożonej z aktywatora grupy -SH (np. cysteiny) i związku chelatującego metale ciężkie (np. EDTA). Istotnym przy pomiarze aktywności proteaz tkankowych jest dobór odpowiedniego substratu. Dotyczy on szczególnie pomiarów akty-



wności enzymów w materiale biologicznym zawierającym mieszaninę proteaz o różnej specyficzności substratowej i w różnych stosunkach ilościowych.

Najczęściej używanymi substratami są hemoglobina (4, 10) lub kazeina (24, 71), ale wydaje się, że najlepszym substratem są naturalne białka cytoplazmatyczne. Przy użyciu substratów białkowych oznacza się głównie katepsynę D. Produkty trawienia białka mierzy się wówczas przyrostem uwalnianej tyrozyny kwasorozpuszczalnej metodą kolorymetryczną (4, 95) lub spektrofotometrycznie przez pomiar absorpcji przy 280nm (87, 110).

Często do badania aktywności proteolitycznej proteaz używa się syntetycznych substratów, jak: peptydy, amidy, estry lub anilidy. Używając jako substratu peptydów, aktywność katepsynową ocenia się metodą ninhydrynową (51, 132). Rozkład amidów przez proteazy endocelularne prowadzi do uwolnienia amoniaku, który oznacza się w oparciu o metodę Conwaya (49, 72) lub za pomocą odczynnika Nesslera (130). Aktywność esterolityczną katepsyn śledzi się metodą miareczkową (49) lub potencjometrycznie (146). Przy stosowaniu syntetycznych chromogennych substratów, aktywność proteolityczną określa się kolorymetrycznie przez pomiar natężenia barwy produktów reakcji (26).

Aktywność transpeptydazową oznacza się przy użyciu jako substratów estrów lub amidów aminokwasów i hydroksyloaminy (72, 105).

Szczegółowe omówienie metod oznaczania aktywności enzymów proteolitycznych znajduje się w szeregu publikacjach (12, 64, 107, 160).

### III. Występowanie

Endocelularne proteazy mogą być uważane za składniki wszystkich tkanek zwierzęcych. Występują one w różnych narządach i tkankach: nerwach, wątrobie, śledzionie, płucach, mózgu (3, 8, 15, 88), a także w leukocytach (84), erytrocytach (106), płytkach krwi (14) oraz w płynach ustrojowych: surowicy krwi (65), płynie mózgowo-rdzeniowym (56), soku żółdkowym (144) i moczu (85). Przypuszcza się, że katepsyny występujące w płynach biologicznych pochodzą z rozpadających się komórek na skutek ich fizjologicznego zużycia się.

Katepsyny zlokalizowane są głównie w lizosomach komórkowych obok innych enzymów hydrolitycznych o kwaśnych optimumach  $pH$  (18), co uwiadcza tablica 2.

Obecność tych enzymów wykazano także we frakcji jądrowej (43, 118), mitochondrialnej (124) i mikrosomalnej (152, 159). Ich występowanie w tych podfrakcjach komórkowych spowodowane może być tym, że sedymentują one częściowo z lizosomami w czasie różnicowego wirowania i zanieczyszczają je (109).

Tablica 2.

Aktywność właściwa peptydaz lizosomalnych wątroby szczura (132)

E n z y m	m $\mu$ M rozłożonego substratu/min/mg białka	
	Homogenat wątroby	Lizosomy wątroby
Katepsyna A	15	120
Katepsyna B	4	30
Katepsyna C	50	700—1000
Katepsyna D	20	200 — 340
Dwupeptydaza tyrozyl-glicynowa	230	940

Tablica 3.

Aktywność proteolityczna niektórych tkanek szczura (109)

T k a n k a	% a k t y w n o ś c i			
	Katepsyna B	Katepsyna D	Neutralne proteazy	Leucynoamino-peptydaza
Nerka*	100	100	100	100
Wątroba	26	55	15	11
Trzustka	0	24	26	9
Szpik	0	7	15	4

\*Aktywność tkanki nerkowej przyjęto za 100%

Aktywność wewnątrzkomórkowych peptydaz jest różna w różnych tkankach (tablica 3).

Należy nadmienić, że aktywność mierzona *in vitro* na syntetycznych substratach nie musi być zgodna z aktywnością proteaz w żywych tkankach. Niska aktywność proteolityczna mięśni, mózgu, erytrocytów w porównaniu z wysoką aktywnością wątroby, nerki, śledziony może być spowodowana tym, że katepsyny różnych tkanek wykazują różną specyficzność substratową. Z tego względu wyniki badań uzyskane *in vitro* na wyodrębnionych katepsynach mogą nie odpowiadać procesom zachodzącym w organizmie. Duża aktywność proteolityczna śledziony wiąże się z likwidacją erytrocytów, rozpadających się w tym narządzie (54).

#### IV. Charakterystyka wewnątrzkomórkowych peptydaz

##### 1. Katepsyna A

Katepsyna A jest zdefiniowana jako wewnątrzkomórkowa proteaza rozszczepiająca syntetyczny substrat karbobenzoksy-L-glutamyl-L-tyrozy-

nę (Cbo-L-Glu-L-Tyr), którego używa się do oznaczania aktywności tego enzymu (37, 140). W miejscu tyrozyny może być także fenyloalanina (67). W karbobenzoksy-L-glutamyl-L-tyrozył-glicynie enzym ten rozrywa wiązanie glutamyl-tyrozynowe (96). Specyficzność oczyszczonych preparatów katepsyny A z różnych tkanek wykazuje różnice w działaniu na syntetyczne substraty i pod względem wrażliwości na aktywatory i inhibitory (67).

Iodice i wsp. (67) opracowali metodę izolacji i oczyszczania katepsyny A z mięśni kurcząt. Metoda ta polega na ekstrakcji enzymu za pomocą 2% KCl, wytrącaniu w punkcie izoelektrycznym, ogrzewaniu i traktowaniu siarczanem amonu oraz na chromatografii na DEAE—Sephadexie. Takie postępowanie pozwoliło na oddzielenie katepsyny A od D.

Logunov i Orekhovich (97) izolowali katepsynę A z wołowej śledziony. Zastosowanie przez tych autorów frakcjonowania etanolem, chromatografii na SE—Sephadexie i filtracji żelowej na Sephadexie G—200 pozwoliło na uzyskanie wysokooczyszczonego preparatu.

Katepsyna A izolowana z mięśnia jest bardziej stabilna niż z wątroby czy śledziony. Nieznane są aktywatory tego enzymu. Katepsyna A i karbo-sypeptydaza mają bardzo podobną specyficzność substratową, ale ta druga jest aktywowana grupami -SH, a katepsyna A nie (37, 51). Optimum pH katepsyny A wynosi 5,0—5,4. Nie hydrolizuje ona hemoglobiny, mioglobiny i albuminy surowicy (67), natomiast działa na glukagon (66).

## 2. Katepsyna B

Specyficznym substratem używanym do oznaczania aktywności katepsyny B jest nitroanilid benzoil-L-argininy (26). Enzym działa po aktywacji cysteiną i EDTA. Rozkłada również amid benzoil-L-argininy (113, 132). Wynika z tego, że specyficzność katepsyny B podobna jest do trypsyny. Nie rozkłada ona jednak amidu L-argininy i estru etylowego L-argininy (49), co wskazuje na bardziej ograniczone działanie katepsyny B. Nieoczyszczony preparat z wieprzowych nerek (52) rozkłada żelatynę i  $\beta$ -laktoglobulinę w pH 5,0, w obecności cysteiny. W badaniach nad specyficznością omawianego enzymu używano także, jako substratu, oksydowany łańcuch B insuliny. Wykazano (79), że katepsyna B i papaina w większości rozszczepiają te same wiązania peptydowe, ale często z różnicami ilościowymi.

Katepsyna B była wyizolowana i częściowo oczyszczona ze śledziony wołowej (49). Preparatyka polegała na wytrąceniu siarczanem amonu, chromatografii na Amberlicie IRC—50 oraz precypitacji etanolem i solami rtęci. Otrzymano enzym około 150—200 razy oczyszczony w porównaniu z materiałem wyjściowym, a wydajność metody wynosiła 8%. W innej metodzie otrzymano katepsynę B z acetonowego proszku z frakcji lizosomalno—mitochondrialnej cięcej wątroby (135). Preparat był oczyszczony



również około 200 razy. Jego ciężar cząsteczkowy oznaczono za pomocą sączenia molekularnego — wynosił 25 000—30 000.

Stwierdzono, że aktywność katepsyny B przy ogrzaniu do temperatury 52°C w ciągu 30 min., spada o 50% (52). Katepsyna B jest enzymem sulfhydrylowym, do których należą również roślinne proteazy papaina, ficyna i bromelina. Sekwencja aminokwasów miejsca aktywnego tych enzymów wykazuje duże podobieństwo (146). Aktywatorami katepsyny B jest cysteina, glutation,  $\beta$ -merkaptotoetylamina, 2,3-dwumerkaptopropranolol,  $\beta$ -merkaptotoetanol. Poznanymi inhibitorami są 0,001M jodoacetamid, p-chlorortęciobenzoesan (0,0001M). Fenylohydrazyna i hydroksyloamina wykazują także właściwości inhibicyjne w stosunku do katepsyny B, chociaż inhibicja ta jest znoszona przez cysteinę a dwuizopropylodifluorofosforan (DFP), dwunitrofenol i sojowy inhibitor trypsyny nie inhibują tego enzymu. Aktywność katepsyny B w ekstrakcie wątroby nie jest proporcjonalna do ilości enzymu (30, 109), co mogłoby wskazywać na obecność inhibitora w tym ekstrakcie. Katepsyny B występują w różnych formach molekularnych (112). Spośród nich stosunkowo dobrze poznane są formy molekularne katepsyny B1 (33).

### 3. Katepsyna C

Katepsyna C była badana intensywnie przez Plantę i wsp. (119, 120). Enzym ten w pH 5,0 hydrolizuje estry i amidy dwupeptydów a w pH 7—8 z amidów i estrów tworzy oligopeptydy (38, 73). W związku z tym katepsyna C uważana jest za dwupeptydylo aminopeptydazę (104), a inni autorzy określają ją jako dwupeptydylo-transferazę (105). Substratem polecanym do oznaczania aktywności katepsyny C jest  $\beta$ -naftyamid glicyl-L-argininy (104). Oczyszczony preparat katepsyny C nie działa na białka (117).

Preparaty katepsyny C uzyskane zostały z wołowej śledziony (20, 140) drogą frakcjonowania siarczanem amonu, działaniem podwyższonej temperatury i precypitacją etanolem lub acetonem w obecności soli cynku. W innej metodzie oczyszczania tego enzymu ze śledziony (105) białka ekstrahowano roztworem kwasu siarkowego, precypitowano następnie siarczanem amonu i w podwyższonej temperaturze oraz chromatografowano na Sephadexie G—200, DEAE—celulozie i CM—celulozie. Uzyskano enzym oczyszczony około 90 razy. Wyznaczony za pomocą ultrawierowania ciężar cząsteczkowy katepsyny C wynosi 200 000—210 000. Ciężar cząsteczkowy katepsyny C z wątroby jest także tego samego rzędu (104).

Przypuszcza się, że katepsyna C zbudowana jest z podjednostek (104), a na cząsteczkę przypada 8 grup -SH (105). Jest ona białkiem kwaśnym, którego punkt izoelektryczny leży w pH 5,4. W stanie nieoczyszczonym w środowisku kwaśnym przy pH 3,5 w temperaturze 65°C jest stabilna, natomiast oczyszczony enzym w tych samych warunkach jest termolabilny.

W 2M moczniku traci ona 65% swojej aktywności (60). Aktywatorami katepsyny C jest cysteina,  $\beta$ -merkaptoetylamina, 2,3-dwumerkaptopropanol, kwas tioglikolowy, cyjanki oraz aniony chlorkowe (46, 104), natomiast *p*-chlorortęciobenzoesan, jodoocetan i formaldehyd całkowicie ją inhibują. Omawiana wewnątrzkomórkowa peptydaza degraduje angiotenzynę II, ACTH, glukagon, sekretynę i oksydowany łańcuch B insuliny (102, 104) odszczepiając z tych peptydów kolejno fragmenty dwupeptydowe od N-końca. Katepsyna C działa na amidy i estry dwupeptydów z wolną grupą  $\alpha$ -aminową (lub  $\alpha$ -iminową) w pozycji N-terminalnej (40, 68, 119). Charakter N-końcowego aminokwasu nie jest obojętny, gdyż enzym wykazuje aktywność jedynie w przypadku obecności glicyny, L-alaniny, L-seryny na N-końcu. Maskowanie grupy aminowej końcowego aminokwasu czyni substrat niepodatnym na działanie katepsyny C (68, 151). Natomiast obecność na C-końcu aminokwasów hydrofobowych (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina lub leucyna) czyni substrat bardziej podatnym na jej działanie.

#### 4. Katepsyna D

Znanych jest szereg metod izolowania katepsyny D z różnych organów: z wołowej śledziony (78, 122), z króliczej śledziony i wątroby (92) i mięśni kury (67). Katepsyna D izolowana była również z lizosomów wątroby szczura (157). Po rozbiciu lizosomów wodą destylowaną frakcjonowano białka lizosomalne na Sephadexie G—75 i CM—Sephadexie.

Katepsyna D śledziony wołowej występuje w co najmniej 10 różnych formach molekularnych (122). Cztery różne frakcje:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  były izolowane wstępnie na DEAE—celulozie. Każda z tych frakcji, chromatografowana na CM—celulozie okazała się złożona:  $\alpha$  z 2 form,  $\beta$  z 3 form,  $\gamma$  z 2 form i  $\delta$  z 3 lub więcej form. Preparat izolowany ze śledziony wołowej posiada jako N-końcowy aminokwas glicynę (78, 81). Katepsyna D działa na syntetyczny substrat Gli-Fen-Leu-Gli-Fen.

Aktywność katepsyny D oznaczana jest przy użyciu zdenaturowanej mocznikiem hemoglobiny (4) lub kazeiny (103). Optimum *pH* przy rozkładzie hemoglobiny, zdenaturowanej kwasem solnym wynosi 2,8—3,0 natomiast przy hemoglobinie zdenaturowanej mocznikiem — 3,8 (10, 67). Ciężar cząsteczkowy tego enzymu wyizolowanego z wątroby królika, oznaczony na Sephadexie G—100, wynosi 50 000—52 000 (10), a z wątroby szczura — 50 000—60 000 (157). Należy nadmienić, że istnieją znaczne różnice w masie cząsteczkowej tego enzymu w zależności od pochodzenia tkankowego (11). Katepsyna D nie jest inhibowana metalami ciężkimi, odczynnikami blokującymi grupy -SH i inhibitorami proteaz serynowych. Inhibują ją natomiast N'-dwunitrofenylo-N-dwuazoacetylo-etylendwuamina (DDE) (157). Do swojej aktywności katepsyna D wymaga obecności jonów wapnia i magnezu. Specyficzność substratową katepsyny D badano na oksydowanym łańcuchu B insuliny (22, 122). Wykazuje ona podobieństwo do pep-

syny, ale zakres działania katepsyny D jest bardziej ograniczony. Badano także specyficzność tej proteazy za pomocą heksapeptydu Gli-Fen-Leu-Gli-Fen-Leu (74). Wykazano, że katepsyna D różni się specyficznością substratową od pepsyny. Rozrywa ona mianowicie w heksapeptydzie wiązanie między aminokwasem drugim i trzecim, pepsyna natomiast działa także na wiązanie między aminokwasem trzecim i czwartym, a także piątym i szóstym. Heksapeptyd zbudowany z D-aminokwasów nie jest hydrolizowany a nawet hamuje kompetencyjnie enzym. Cyklizacja peptydu złożonego z L-aminokwasów czyni go niewrażliwym na działanie katepsyny D i pepsyny, ale nie wykazuje on działania hamującego na te enzymy.

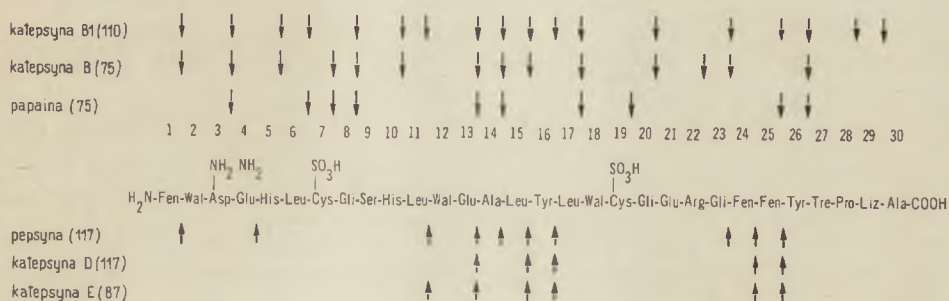
### 5. Katepsyna E

Lapresle i Webb (93) wyizolowali ze szpiku kostnego królika enzym, który nazwali katepsyną E. Rozkłada ona albuminę surowicy, która używana jest jako substrat do oznaczania jej aktywności, przy czym optimum  $pH$  wynosi 2,5 (93).

Aktywność tego enzymu oznacza się także na hemoglobinie denaturowanej kwasem solnym. Optimum  $pH$  katepsyny E przy rozkładzie hemoglobiny zdenaturowanej mocznikiem wynosi 3,5, a przy hemoglobinie zdenaturowanej kwasem solnym 2,5 (80). Cysteina nie zwiększa aktywności tego enzymu w  $pH$  2,5, natomiast obserwuje się wzrost aktywności w  $pH$  3,5—4,5.

Ogrzewanie do temperatury 60°C powoduje spadek aktywności enzymu o 80%, natomiast ogrzewanie do temperatury 80°C inaktywuje całkowicie enzym.

Katepsyna E nie jest inhibowana ani jodoocetanem, ani DFP, natomiast hamuje ją dwuazoacetyl-norleucyl-metylester (DANME) (80). Specyficzność tej proteazy jest niejasna. Nie rozkłada ona żadnych syntetycznych substratów rozszczepianych przez katepsynę A, B lub C. Z badań nad specyficznością tego enzymu prowadzonych na oksydowanym łańcuchu B insuliny wynika znaczne podobieństwo do katepsyny D (91), co przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Specyficzność katepsyn badana na oksydowanym łańcuchu B insuliny.



## 6. Inne wewnątrzkomórkowe peptydazy

Z poznanych aminopeptydaz najpowszechniej w tkankach zwierzęcych występuje leucynoaminopeptydaza (48). Homogenną leucynoaminopeptydazę wyizolowano z nerek wieprza (63). Ciężar cząsteczkowy tego enzymu wynosi około 300 000. Taką samą masę cząsteczkową podali już przedtem Smith i Spackman (134). Peptydaza ta rozszczepia różne peptydy i amidy aminokwasów, ale z różną szybkością. Najczęściej używanym syntetycznym substratem do oznaczania jej aktywności jest amid L-leucyny lub leucyl- $\beta$ -naftyloamid (48). Przy rozkładzie peptydów i amidów wymaga ten enzym w każdym przypadku wolnej grupy  $-NH_2$ . N-końcowym aminokwasem może być obok leucyny również fenyloalanina, tyrozyna, histydyna lub tryptofan. Leucynoaminopeptydaza wymaga do swojej aktywności jonów metali, które biorą udział w tworzeniu kompleksu enzym—substrat za pomocą wiązań chelatowych. Wykazano, że peptydaza ta zawiera cynk, który częściowo może być zastąpiony manganem (62). Na cząsteczkę tego enzymu przypada 1 atom cynku (61). Znajduje się on w aktywnym miejscu lub w jego pobliżu.

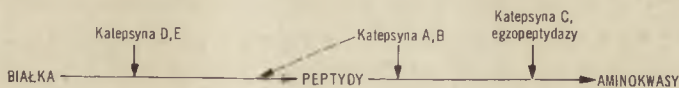
W śledzenie wykazano aktywność karboksypeptydazową o optimum  $pH$  3—4, inhibowaną jodoocetanem (37, 49). Nie otrzymano jednak wysokooczyszczonego preparatu tego enzymu. Karboksypeptydaza hydrolizuje te same substraty co katepsyna A, np. N-benzylokarboksyl-L-glutamyl-L-tyrozynę, ale ta ostatnia hydrolizuje wymienione substraty w  $pH$  5,5 i bez udziału grup  $-SH$ . Wykazano także podobieństwo omawianego enzymu do karboksypeptydazy z trzustki (51).

Z nerek wołu wyizolowano enzym, który nazwano karboksykatepsyną (111). Hydrolizuje ona syntetyczne substraty w obojętnym  $pH$ , np. benzoil-glicyl-L-fenylalanyl-L-prolinę w  $pH$  7,0—7,3. Karboksykatepsyna jest białkiem o punkcie izoelektrycznym równym 4. Wymaga do swej aktywności wolnej końcowej grupy karboksylowej w substracie. Substraty białkowe takie, jak: zdenaturowana hemoglobina, ludzka albumina, surowica, łańcuch B wołowej globiny czy oksydowany łańcuch B insuliny nie są przez nią rozszczepiane.

Obok peptydaz kwaśnych wykryto w wielu tkankach różne peptydazy obojętnym i zasadowym  $pH$ . Występują one między innymi w leukocytach (17, 123), tarczycy (69), skórze (32), wątrobie (47, 150), mięśniach (98) i mózgu (150). Paik i Lee (115) wyizolowali z nerek oraz innych narządów peptydazy hydrolizujące w  $pH$  8—9 specyficzne białka zasadowe protaminy i histony, podczas gdy albuminy i hemoglobina nie jest w ogóle rozkładana przez te enzymy. Wiele uwagi poświęca się również dwupeptydazom (117, 143) i trójpeptydazom (83, 117) izolowanym z różnych tkanek i narządów.

## V. Rola biologiczna

Powszechnie uważa się, że podstawową rolą endocelularnych proteaz jest katabolizm białek komórkowych (11, 12, 38, 73, 142). Endocelularne proteazy wspólnie z innymi enzymami hydrolitycznymi dokonują lizy komórek obumierających, w wyniku ich fizjologicznego zużycia się. Ponadto spełniają istotną rolę w autolizie pośmiertnej organizmów. Rozkład białka obumarłych tkanek i narządów do związków prostszych umożliwia przyswajanie ich przez inne organizmy, a tym samym powrót azotu białkowego do obiegu w przyrodzie. W żywych tkankach natomiast biorą udział w utrzymaniu stanu dynamicznej równowagi między białkami a produktami ich rozkładu. Metabolizm białek w tkance charakteryzuje biologiczny czas półtrwania ( $T/2$ ) białka (57). W tkankach gdzie czas półtrwania białka jest krótki, obserwuje się również dużą aktywność proteaz. Poszczególne katepsyny rozszczepiają wiązania peptydowe w różnym przedziale  $pH$ , które zwykle różni się od  $pH$  fizjologicznego. Hydrolizują one także wiązania estrowe i amidowe różnych związków chemicznych występujących w ustroju. Enzymy te w swojej czynności nawzajem się uzupełniają. Według Iodice i wsp. (67) mieszanina katepsyny A i D wykazuje dwa razy większą aktywność niż wynosi suma aktywności tych enzymów, badana oddzielnie. Katepsyna D ma przygotowywać substrat dla drugiego enzymu, czyli katepsyny A. Wykazano również podobne współdziałanie katepsyny A i C oraz B i D (3). Wyniki tych badań pozwalają wysunąć przypuszczenie, że białka hydrolizowane są najpierw przez katepsyny D i E. W rezultacie powstają peptydy obok nierozłożonych jeszcze białek, na które działają katepsyny A i B. Dalej rozpad peptydów prowadzi katepsyna C i szereg egzopeptydaz o różnej specyficzności (rysunek 2).



Rys. 2. Wieloetapowa hydroliza białek dokonywana przez endocelularne peptydazy.

Endocelularne proteazy mogą rozkładać także białka złożone. Wykazano ich udział przy uwalnianiu glikoproteidów z tkanki chrzęstnej (2, 90), zwłaszcza w chorobach degeneracyjnych (3). Atakują one głównie białka rozpuszczalne cytoplazmy, a w mniejszym stopniu białka strukturalne komórki. U niższych zwierząt katepsyny mają przede wszystkim charakter enzymów trawiennych. Organizmy te nie wytwarzają soków trawiennych a wchłaniają pokarm przez fagocytozę i trawią go wewnątrzkomórkowo.

Istotną rolę odgrywają lizosomalne hydrolazy krwinek białych, zwłaszcza granulocytów obojętnochłonnych w trawieniu bakterii wchłoniętych w procesie fagocytozy i pinocytozy (7, 59, 136).



Interesujące są badania udziału katepsyn w degeneracji ogona kijanki (71, 153). Podczas metamorfozy płazów zachodzi znaczna przebudowa tkanek, związana z niszczeniem licznych komórek spowodowanych działaniem enzymów lizosomalnych. Wraz z postępującym zanikiem ogona narasta progresywnie stężenia katepsyn.

Już sam fakt, że omawiane enzymy rozszczepiają białko komórkowe wskazuje na konieczność dobrej regulacji ich aktywności, a jakiegokolwiek zaburzenia tej regulacji uszkadzają w konsekwencji metabolizm komórki. Enzymy proteolityczne występują często w formie proenzymów, które są aktywowane za pomocą aktywatorów. Wykazano istnienie (31) nieaktywnego prekursora katepsyny D, aktywującego się w  $pH$  3,0. Szczególnie mało znane są naturalne inhibitory tych enzymów. Dotąd wykazano tylko inhibitor katepsyny B, który występuje w cytoplazmie komórki wątrobowej (30).

Na aktywność enzymów proteolitycznych ma wpływ konformacja cząsteczki enzymu. Wiadomym jest, że globularne białka wykazują wiele różnych form konformacyjnych, które są nawzajem w dynamicznej równowadze (100). Równowagę tę można przesuwac przez zmianę środowiska. Przy tym dochodzi w konsekwencji do zmiany szybkości rozszczepienia substratów białkowych. Natywne białka i peptydy są słabo trawione przez proteazy, natomiast denaturacja czyni je bardziej podatnymi na proteolizę (119).

Stwierdzono (9) uwalnianie ninhydryno—pozytywnych związków chemicznych (głównie aminokwasów) z ekstraktu mitochondriów szczura w czasie inkubacji. Dodanie ogrzewanego ekstraktu mitochondriów zwiększa szybkość pojawiania się i ilość tych związków. Ogrzewany ekstrakt jest dobrym substratem dla proteaz obecnych w ekstrakcie nieogrzewanym. Znany jest fakt, że obecność kwasów tłuszczowych zwiększa oporność niektórych białek na proteolizę. Wykazano, że wolne kwasy tłuszczowe chronią także mitochondria przed proteolizą (13, 133). Zmiana konformacji enzymów mitochondrialnych doprowadza do rozkojarzenia oksydacyjnej fosforylacji i czyni enzymy bardziej podatnymi na działanie proteaz (154, 155).

Należy również podkreślić, że na poziom endocelularnych proteaz wywierają wpływ niektóre hormony. Przy niskich poziomach gonadotropin przysadkowych, np. w zaawansowanej ciąży obserwuje się niskie wartości katepsyn, a podwyższony poziom tych hormonów idzie w parze z wysoką ich zawartością (125). Tyroksyna ma również zwiększać poziom katepsyn (101), podobnie jak kortyzon (89).

Katepsyny w środowisku kwaśnym katalizują rozpad wiązań peptydowych białek, a w środowisku bliskim obojętnego katalizują reakcje transpeptydacji i transamidacji (34, 35). Przy reakcjach transpeptydacyjnych katepsyny są specyficzne względem donora i akceptora acylu (41, 108). Stwierdzono, że częściowo oczyszczony preparat katepsyny C katalizuje



przy  $pH$  7,5 polimeryzację amidu glicyl-L-fenylalaniny, dającą w ostateczności słabo rozpuszczalny polipeptyd zawierający przeciętnie 4 jednostki glicyl-L-fenylalaninowe (73). Podobnie polimeryzacja amidu L-alaninyl-L-fenylalaniny prowadzi do powstania heksapeptydu, a z amidu glicyl-L-tyrozyny powstaje polipeptyd złożony przeciętnie z dziesięciu reszt aminokwasowych (38).

Katepsyna B również katalizuje reakcje transpeptydacji, ale gorzej niż katepsyna C lub papaina (23, 41). Enzymatyczna synteza wiązań peptydowych jest procesem endoergicznym, wymagającym dostarczenia energii w formie wysokoenergetycznych wiązań ATP. W badaniach *in vitro* wykazano, że przy 0,1 M stężeniu aminokwasów w mieszaninie reakcyjnej, katepsyny zamieniają na peptydy około 4—5% aminokwasów, ale tak wysokie stężenie aminokwasów w tkankach nie jest spotykane. Stwierdzono mianowicie, że stężenie to w żywych tkankach wynosi około  $10^{-3}M$  (147). Wobec powyższego rola biologiczna aktywności transpeptydazowej katepsyn wydaje się być wątpliwa. Endocelularne proteazy mają wpływ regulacyjny na różne systemy enzymatyczne poprzez rozkład i inaktywację enzymów (111). Ponadto aktywują one proenzymy na czynne enzymy dzięki ograniczonej proteolizie, np. katepsyna B aktywuje trypsynogen do trypsyny (50), podobnie jak trypsyna. Ważną funkcją proteaz jest tworzenie biologicznie czynnych peptydów, które powstają z nieaktywnych prekursorów (111). Przypuszcza się, że karboksykatepsyna bierze udział w powstawaniu angiotenzyny II z angiotenzyny I przez odszczepienie od łańcucha peptydowego dwóch aminokwasów C-końcowych. Katepsynie C przypisuje się rolę czynnika degradującego glukagon w wątrobie (102). Procesy biosyntezy i katabolizmu białek znajdują się w warunkach fizjologicznych w dynamicznej równowadze. Zaburzenia tej równowagi spotyka się w patologii.

Istotne znaczenie ma tu zachowanie prawidłowej przepuszczalności błony lizosomalnej uzależnionej od działania różnych labilizatorów i stabilizatorów (19, 156). Normalne warunki tlenowe hamują aktywność proteaz. W przypadku uszkodzenia komórki oraz po jej śmierci zmieniają się warunki środowiska, niedobór lub brak tlenu i obniżenie  $pH$  sprzyja uwalnianiu lizosomalnych enzymów i stwarza odpowiednie warunki do ich działania (44).

Podwyższenie aktywności endocelularnych proteaz obserwuje się w tkance mięśniowej w postępującej dystrofii (53, 116). Gutmann i wsp. (53, 138) badali aktywność katepsyn mięśni szkieletowych szczura i kury po odnerwieniu. W odnerwionym atroficznym mięśniu tych zwierząt wzrasta szybko aktywność katepsynowa i spada ilość białka.

Oznaczanie aktywności katepsyn przydatne jest w diagnostyce uszkodzeń wątroby. W zapaleniu wątroby podwyższenie aktywności katepsyn w surowicy obserwuje się już w okresie przedżółtaczkowym (65, 70).

Nie są to jednak próby swoiste dla uszkodzeń wątroby, gdyż zawartość

katepsyn może ulegać podwyższeniu w przewlekłym zapaleniu trzustki, gruźlicy płuc, często w zawale mięśnia sercowego i w przypadkach choroby wrzodowej (86).

W śluzówce żołądka i w soku żołądkowym wykryto katepsynę, która jest nieczynna w oddziaływaniu silnie kwaśnym. Można natomiast stwierdzić jej działanie przy  $pH$  ok. 3,5 (16). Szczególne znaczenie przypisywano temu enzymowi u noworodków oraz w tłumaczeniu istnienia czynności trawiennej żołądka przy niedokwaśności i powstawaniu wrzodów trawienych w tych warunkach. Obecność katepsyny w soku żołądkowym jest przez wielu autorów poddawana w wątpliwość w związku z wykryciem izoenzymów pepsyny (144, 148). Aktywność przypisywana katepsynie może zależeć od obecności w soku żołądkowym gastryksyny opisanej przez Richmonda i wsp. (126), która posiada optimum  $pH$  przy rozkładzie hemoglobiny równe 3,2. Z prac Tanga i Tanga (141) oraz Seiffersa i wsp. (129), którzy izolowali różne formy molekularne pepsynogenu wynika, że pepsynogen oznaczony liczbą I, po aktywacji przechodzi w aktywny enzym odpowiadający gastryksynie.

Stwierdzono, że katepsyny występują w większych ilościach w ścianie aorty niż w ścianie żyły głównej dolnej. Aktywność proteolityczna w ścianie naczynia żylnego wynosi tylko 20% aktywności spotykanej w ścianie aorty (82). Różnice w aktywności katepsyn oraz innych enzymów żył i tętnic uważa autor za przyczynę większych skłonności do zmian miażdżycowych tych ostatnich. Badano także proteolityczne enzymy gałki ocznej, tj. aktywność katepsyn (6) i leucynoaminopeptydazy (55). Ali (1) badał aktywność katepsyn w obumierającej chrząstce. Endocelularne proteazy biorą udział w katabolizmie przeciwciał (29, 45, 127). Według niektórych autorów pomiary aktywności wewnątrzkomórkowej proteaz mogą mieć znaczenie w ocenie przydatności tkanek i narządów w transplancjologii.

Enzymom lizosomalnym przypisuje się dużą rolę w patomechanizmie niektórych schorzeń (5, 21). Istnieje teoria karcinogenezy, w myśl której enzymy lizosomalne mają zaburzać metabolizm komórki (44). Wykazano (131, 137), że aktywność katepsyn młodych szybko rosnących komórek nowotworowych jest wyższa niż u starych. Wysoką aktywność proteolityczną wykazano także u szczurów z M-1-sarcoma (111). Z tkanki nowotworowej udało się autorom wyizolować dwie nowe katepsyny I i II.

Katepsyna I specyficzna była wyłącznie dla tkanki nowotworowej, natomiast podobny enzym do katepsyny II tkanki nowotworowej występował także w wątrobie. Były również prowadzone pomiary aktywności proteazowej w doświadczalnych nowotworach u zwierząt laboratoryjnych (75, 99) oraz podjęto próby izolowania tych enzymów (76).

Znaczenie katepsyn daje się odnotować także w przemyśle mięsnym (28, 128, 149). Enzymy te odgrywają istotną rolę w dojrzewaniu mięsa po uboju. Katepsyny dokonują częściowego rozkładu makrocząsteczek białko-



wych włókien mięśniowych. Dzięki tym procesom znacznie wzrasta strawność białek, czyli ich dostępność dla enzymów trawiennych przewodu pokarmowego, zwiększa się ilość białek rozpuszczalnych i następuje poprawa smaku na skutek uwalniania pewnej ilości wolnych aminokwasów i peptydów.

## VI. Zakończenie

Mimo znacznego postępu w poznaniu struktury chemicznej i roli fizjologicznej endocelularnych peptydaz wiele podstawowych problemów pozostaje do dziś nierozwiązanych. Mechanizm działania tych enzymów nie jest w pełni poznany. Wykazanie w centrach aktywnych endocelularnych proteaz grup karboksylowych (katepsyna D i E), sulfhydrylowych (katepsyna B i C) oraz kationów metali (karboksypeptydaza) pozwoliło na wysunięcie przypuszczenia o podobieństwie ich mechanizmu działania do trawiennych proteaz o analogicznych centrach aktywnych (80).

Wiele kontrowersji odnośnie działania endocelularnych proteaz budziło kwaśne optimum  $pH$  ich działania. Nie stanowią one jednak wyjątku wśród enzymów w tym względzie. Tak np. optimum  $pH$  kwaśnej fosfatazy wynosi 5, a optimum  $pH$  arginazy wynosi 10. Nie jest wykluczone, że w pewnych obszarach komórki  $pH$  może znacznie odbiegać od obojętnego. Nie poznano dotąd także inhibitorów katepsyn, za pomocą których można by było hamować te enzymy w komórce. Główną możliwością regulacji tych enzymów w komórce jest oddziaływanie na przepuszczalność błony lizosomalnej. W tym celu stosowane są różne związki chemiczne labilizujące lub stabilizujące błonę lizosomalną.

## LITERATURA

1. Ali S. Y., *Biochem. J.* **93**, 611 (1964).
2. Ali S. Y., Evans L., *Biochem. J.* **107**, 293 (1968).
3. Ali S. Y., Evans L., *Biochem. J.* **112**, 427 (1969).
4. Anson M. L., *J. Gen. Physiol.* **22**, 79, (1939).
5. Appel W., *Med. Welt.* **23**, 574 (1972).
6. Appelmans M., Michiels J., Missotteu L., *Biochem. Eye Symp.* 1966, red. M. U. Dardanne, S. Karger, Basel, Switzerland, 1968, str. 344.
7. Axline S., Cohn Z. A., *J. Exp. Med.* **131**, 1239 (1970).
8. Babson A. L., *Science* **123**, 1082 (1956).
9. Baird G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 293 (1964).
10. Barrett A. J., *Biochem. J.* **104**, 601 (1967).
11. Barrett A. J., w *Lysosomes in Biology and Pathology*, red. J. T. Dingle, H. B. Fell, Amsterdam, North—Holland Publishing Company, 1969, t. 2, str. 245.
12. Barrett A. J., Dingle J. T., *Tissue Proteinases*, North—Holland Publishing Company, Amsterdam, 1971.



13. Basford R. E., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 195 (1959).
14. Beese J., Farr W., Grüner E., Haschen R. J., *Klin. Wschr.* **44**, 1049 (1966).
15. Bouma J. M. V., Gruber M., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 545 (1964).
16. Buchs S., *Enzymologia* **16**, 193 (1953).
17. Davies P., Rita G. A., Krakauer K., Weissmann G., *Biochem. J.* **123**, 559 (1971).
18. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmanns F., *Biochem. J.* **60**, 604 (1955).
19. De Duve C., Wattiaux R., Wibo M., *Biochem. Pharmacol.* **9**, 97 (1962).
20. De la Haba G., Cammarata P. S., Timasheff S. N., *J. Biol. Chem.* **234**, 316 (1959).
21. Dingle J. T., Fell H. B., (red.) *Lysosomes in Biology and Pathology*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1969, tom 1, 2.
22. Dopheide T. A. A., Todd P. E. F., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 130 (1965).
23. Durell J., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **207**, 487 (1954).
24. Duspiva F., *Protoplasma* **32**, 211 (1939).
25. *Enzymy, nomenklatura i klasyfikacja*, PWN, Warszawa 1967.
26. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271 (1961).
27. Etherington D. J., Taylor W. H., *Clin. Sci.* **42**, 79 (1972).
28. Fasella P., Maggi E., Dazzi G., *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **21**, 665 (1968).
29. Fehr K., Lo Spalluta J., Ziff M., *J. Immunology* **105**, 973 (1970).
30. Finkensteat J. T., *Proc. Soc. Exptl. Biol.* **95**, 302 (1957).
31. Firfanova K. F., Orekhovich V. N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 911 (1971).
32. Fräki J. E., Hopsu-Havu V. K., *Arch. Derm. Forsch.* **242**, 329 (1972).
33. Franklin S. G., Mettrione R. M., *Biochem. J.* **127**, 207 (1972).
34. Fruton J. S., *Harvey Lectures* **56**, 64 (1955).
35. Fruton J. S., *Harvey Lectures* **51**, 64 (1957).
36. Fruton J. S., *The Enzymes*, red. P. P. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York, 1960, t. 4, str. 233.
37. Fruton J. S., Bergmann M., *J. Biol. Chem.* **130**, 19 (1939).
38. Fruton J. S., Hearn W. R., Ingram V. M., Wiggans O. D., Winitz M., *J. Biol. Chem.* **204**, 891 (1953).
39. Fruton J. S., Irving G. W., Bergmann M., *J. Biol. Chem.* **141**, 763 (1941).
40. Fruton J. S., Mycek M. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 11 (1965).
41. Fujii S., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **230**, 1 (1958).
42. Furland M., *Enzymologia* **31**, 9 (1966).
43. Furland M., Jericijo M., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 135 (1967).
44. Gajdos A., *Presse Med.* **74**, 981 (1966).
45. Ghetie V., Motas C., *Immunochemistry* **8**, 89 (1971).
46. Goerter J., Gruber M., *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 546 (1970).
47. Gray R. W., Arsenis C., Jeffay H., *Biochim. Biophys. Acta* **222**, 627 (1970).
48. Green M. N., Chung-Tson K., Bressler R., Seligman A. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **57**, 458 (1955).
49. Greenbaum L. M., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **226**, 173 (1957).
50. Greenbaum L. M., Hirshkovitz A., Shoichet J., *J. Biol. Chem.* **234**, 2885 (1959).
51. Greenbaum L. M., Sherman R., *J. Biol. Chem.* **237**, 1082 (1962).
52. Gutmann H. R., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **174**, 851 (1948).

53. Hajek J., Gutmann E., Syrový J., *Physiol. Bohemoslov.* **13**, 32 (1964).
54. Hang J., Meyer W., Walter J., *Klin. Wschr.* **43**, 49 (1965).
55. Hanson H., *Biochem. Eye Symp.* 1966, red. M. U. Dardanna, S. Karger, Basel, Switzerland, 1968, str. 325.
56. Hanzal F., Skaličková O., Viklický J., *Mozkomišni Mok*, S. Z. W. Praha 1963, str. 179 i 238.
57. Harkness R. D., Moralle B. E., *J. Physiol.* **132**, 502 (1956).
58. Hedin S. G., *J. Physiol.* **30**, 155 (1904).
59. Heffenberg R., Gordon A., Black E., Louis L., *Biochem. J.* **118**, 400 (1970).
60. Heinrich C. P., Fruton J. S., *Biochemistry* **7**, 3556 (1968).
61. Himmelhoch S. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 271 (1969).
62. Himmelhoch S. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 597 (1969).
63. Himmelhoch S. R., Peterson E. A., *Biochemistry* **7**, 2085 (1968).
64. Hoffman K. H., *Pharmazie* **23**, 679 (1968).
65. Homolka J., Soušek O., *Cas. Lek. Ces.* **101**, 234 (1962).
66. Iodice A. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 241 (1967).
67. Iodice A. A., Leong V., Weinstock I. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 477 (1966).
68. Izumiya N., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **218**, 59 (1956).
69. Jablonski P., McQuillan M. T., *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 454 (1967).
70. Janousek S., *Cas. Lek. Ces.* **98**, 206 (1953).
71. Jensen P. K., Lehmann F. E., Weber R., *Helv. Physiol. Acta*, **14**, 188 (1956).
72. Johnston R. B., Mycek M. J., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **185**, 629 (1950).
73. Jones M. E., Hearn W. R., Fried M., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **195**, 645 (1952).
74. Keilova H., Blaha K., Keil B., *Eur. J. Biochem.* **4**, 442 (1968).
75. Keilova H., Keil B., *Collec. Czech. Chem. Commun.* **27**, 2186 (1962).
76. Keilova H., Keil B., *Collec. Czech. Chem. Commun.* **27**, 2193 (1962).
77. Keilova H., Keil B., *Collec. Czech. Chem. Commun.* **29**, 2272 (1964).
78. Keilova H., Keil B., *Collec. Czech. Chem. Commun.* **33**, 131 (1968).
79. Keilova H., Keil B., *FEBS Letters* **4**, 295 (1969).
80. Keilova H., Lapresle C., *FEBS Letters* **9**, 348 (1970).
81. Keilova H., Markovic O., Keil B., *Collec. Czech. Chem. Commun.* **34**, 2154 (1964).
82. Kirk J., *Clin. Chem.* **10**, 301 (1964).
83. Kirschke H., Lasch J., Hanson H., *Hoppe—Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 1449 (1969).
84. Kopitar M., Kregar I., Lebez D., *Enzymologie* **41**, 9 (1971).
85. Kramar R., Lambrecht R., Raab W., *Wien. Klin. Wschr.* **82**, 410 (1970).
86. Krawczyński J. (red.) *Diagnostyka enzymologiczna w medycynie praktycznej*. PZWL, Warszawa 1970, str. 169.
87. Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **30**, 291 (1947).
88. Kurecki T., Toczko K., *Acta Physiol. Pol.* **22**, 4 (1971).
89. Kyaw A., Mellors A., *Canad. J. Biochem.* **50**, 20 (1972).
90. Lack C. H., Anderson A. J., Ali S. Y., *Nature* **191**, 1402 (1961).
91. Lapresle C., Rangel H., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 372 (1966).
92. Lapresle C., Webb T., *Biochem. J.* **76**, 538 (1960).
93. Lapresle C., Webb T., *Biochem. J.* **84**, 455 (1962).
94. Lebez D., Turh V., Kregav J., *Enzymologia* **34**, 344 (1968).

95. Libenson L., Jena M., *Arch. Biochem. Biophys.* **104**, 292, (1964).
96. Lichtenstein N. M., Fruton J. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 787 (1960).
97. Logunov A. J., Orekhovich V. N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1161 (1972).
98. Makinodau Y., Ikeda S., *Nippan Svisan Gakkaishi* **35**, 749 (1969).
99. Mariak T. R., Worowski K., Rzeczycki W., X Zjazd Pol. Tow. Bioch. Poznań 1972, streszczenie prac.
100. Markus G., *Proc. Am. Natl. Acad. Sci.* **54**, 253 (1965).
101. Mathies J. C., Palm L., Gaebler O. H., *Endocrinology* **49**, 571 (1951).
102. McDonald J. K., Callahan P. X., Zeitmann B. B., Ellis S., *J. Biol. Chem.* **244**, 6199 (1969).
103. McDonald C. E., Chen L. L., *Anal. Biochem.* **10**, 175 (1965).
104. McDonald J. K., Zeitman B. B., Reilly T. J., Ellis S., *J. Biol. Chem.* **244**, 2693 (1969).
105. Metrione R. M., Neves A. G., Fruton S., *Biochemistry* **5**, 1597 (1966).
106. Morrison W. L., Neurath H., *J. Biol. Chem.* **200**, 39 (1953).
107. Mycek M. J., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, London 1970, t. 19, str. 285—315.
108. Mycek M. J., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **226**, 165 (1957).
109. Nagel V., Willig F., *Naturwissenschaften* **51**, 115 (1964).
110. Northrop J. H., Kunitz M., Herriott R. M., *Crystalline Enzymes*, New York, Columbia University Press, str. 305.
111. Orekhovich V. N., *Ital. J. Biochem.* **17**, 241 (1968).
112. Otto K., *Hoppe—Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 482 (1967).
113. Otto K., *Hoppe—Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 1449 (1967).
114. Otto K., Bhakdi S., *Hoppe—Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 1577 (1969).
115. Paik W. K., Lee H. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 333 (1970).
116. Pennington R. J., *Proc. Ass. Clin. Biochem.* **2**, 17 (1962).
117. Peters T. J., *Biochem. J.* **120**, 195 (1970).
118. Phillips M. P., Johns E. W., *Biochem. J.* **72**, 538 (1959).
119. Planta R. J., Gorter J., Gruber M., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 551 (1964).
120. Planta R. J., Gruber M., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 443 (1961).
121. Planta R. J., Gruber M., *Anal. Biochem.* **5**, 360 (1963).
122. Press E. M., Porter R. R., Cebra J., *Biochem. J.* **74**, 501 (1960).
123. Prokopowicz J., *Badania nad enzymami fibrynolitycznymi i proteolitycznymi granulocytów ludzkich*. PWN, Warszawa, 1968.
124. Rademaker W., Soons J. B. J., *Biochem. Biophys. Acta* **24**, 451 (1957).
125. Reichert L. E., *Endocrinology* **71**, 838 (1962).
126. Richmond V., Tang J., Wolf S., Trucco R., Caputto R., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 453 (1958).
127. Riha I., *Cs. biol.* **3**, 343 (1954).
128. Salem H. M., El Nakkadi A. M., *J. Sci. Ind. Res.* **7**, 226 (1964).
129. Seiffers M. J., Segal H. L., Miller L. L., *Am. J. Physiol.* **205**, 1099 (1963).
130. Seligson D., Seligson H., *J. Lab. Clin. Med.* **38**, 324 (1951).
131. Shamberger R. J., *Biochem. J.* **111**, 375 (1969).
132. Shibko S., Tappel A. L., *Biochem. J.* **95**, 731 (1965).
133. Slater E. C., *Symp. Soc. Exp. Biol.* **10**, 110 (1957).
134. Smith E. L., Spackman D. H., *J. Biol. Chem.* **212**, 271 (1955).
135. Snellman O., *Biochem. J.* **114**, 673 (1969).
136. Stanton G. A., Zanzvil A. C., *J. Exp. Med.* **131**, 1239 (1970).



137. Sylven B., Malmgren H., *Acta Radiol. Suppl.* **154** (1957).
138. Syrový I., Häjek I., Gutmann E., *Physiol. Bohemoslov.* **15**, 7 (1966).
139. Szczeklik E. (red.) *Enzymologia kliniczna*, PZWL, Warszawa, 1967, str. 217.
140. Tallan H. H., Jones M. E., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **194**, 793 (1952).
141. Tang J., Tang K. I., *J. Biol. Chem.* **238**, 606 (1963).
142. Tappel A. L., w *Lysosomes in Biology and Pathology*, red. J. T. Dingle, H. B. Fell, Amsterdam, North-Holland, Publishing Company, 1969, t. 2, str. 207.
143. Tappel A. L., Beck C., Mahadevan S., Brightwell R., Mellors A., Nduaguba J., Dillard C., *Fed. Proc.* **26**, 797 (1967).
144. Taylor W. H., *Physiol. Rev.* **42**, 519 (1962).
145. Tesser G. J., Nivard R. J. F., Gruber M., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 303 (1964).
146. Tomášek V., Keilova H., *Celostatni Biochemické Dny*, Praha, 1971, III-2.
147. Tullen H. H., Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **211**, 927 (1954).
148. Turner M. D., Mangla J. C., Samloff J. M., Miller L. L., Segal H. L., *Biochem. J.* **116**, 397 (1970).
149. Uhlig H., *Naturwissenschaften* **57**, 261 (1970).
150. Umana R., *Anal. Biochem.* **26**, 430 (1968).
151. Voynick J. M., Fruton J. S., *Biochemistry* **7**, 40 (1968).
152. Wachsmuth E. D., Fritce J., Pffeiderer G., *Biochemistry* **5**, 169 (1966).
153. Weber R., *Experientia* **13**, 153 (1957).
154. Weinbach E. C., *Nature* **221**, 1016 (1969).
155. Weinbach E. C., Garbus J., *Biochem. J.* **106**, 711 (1968).
156. Weissman G., *Fed. Proc.* **23**, 1038 (1964).
157. Wiedermans B., Kirschke H., Ansorge S., *Abstracts of Commun. 7-th Meeting FEBS*, Varna 1971, str. 162.
158. Willstätter R., Bamann E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **180**, 127 (1928).
159. Wong-Leung, Yee Ling, *Biochem. J.* **10**, 5P (1968).
160. Worowski K., Mariak R. T., *Diagn. Lab.* (w druku).



## Ryfampina

### Rifampin

Actual views on the antibacterial and antiviral action of rifampin are presented.

Ryfampina jest związkiem syntetyzowanym z ryfamycyny SV, wytwarzanej przez *Streptomyces mediterraneus* (24). Ryfamycyny zawierają pierścień chromoforowy naftochinonowy lub naftohydrochinonowy oraz rozbudowaną część makrocykliczną. Pochodne ich mogą mieć podstawioną część makrocykliczną lub aromatyczną.

Ryfamycyny znane są od paru lat jako leki przeciwgruźlicze. Większość z nich była stosowana pozajelitowo. Poszukując leku doustnego zsyntetyzowano wiele nowych pochodnych ryfamycynowych, z których najskuteczniejszą okazała się pochodna metylopiperazynowa, zwana kolejno: ryfampicyna, rimactan, ryfampina. Lek ten hamuje wzrost bakterii gram-dodatnich przy niskich dawkach terapeutycznych. Ryfampina ochrania myszy przed zakażeniem gronkowcem już przy dawce 0,12mg/kg. Przy leczeniu gruźlicy aktywność ryfampiny znajduje się pomiędzy streptomycyną i izoniazydem (16).

Ryfampina została otrzymana na drodze kondensacji 3-formylo-ryfamycyny i 1-amino,4-metylo-piperazyny w czterohydrofuranie. Produkt krystalizuje z acetonu w postaci czerwonych płatków. Jest słabo rozpuszczalny w wodzie, dobrze w organicznych rozpuszczalnikach, odznacza się silną fotolabilnością (16).

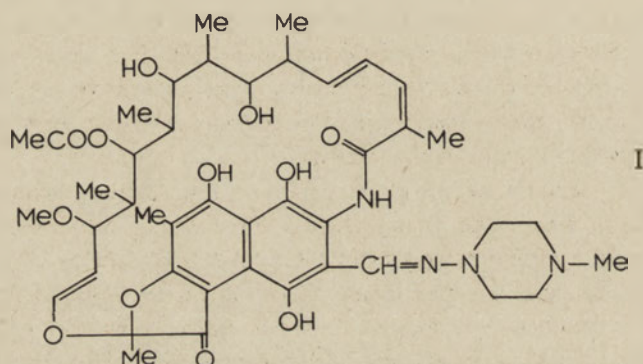
Ryfampina dodana do hodowli *Staphylococcus aureus* hamuje włączenie <sup>14</sup>C-uracylu przy stężeniu 1μg antybiotyku na ml zawiesiny bakteryjnej. Natomiast włączanie aminokwasów do białek *in vitro* nie jest hamowane przez ryfampinę. Nawet 400μg antybiotyku w 1ml mieszaniny inkubacyjnej nie hamuje włączania fenyloalaniny do białka w obecności poliU (12). A więc antybiotyk nie wpływa bezpośrednio na mechanizm biosyntezy białka. Stwierdzono natomiast, że ryfampina hamuje *in vitro* powstawanie kwasu rybonukleinowego na matrycy kwasu dezoksyrybonukleino-

\* Dr, Zakład Biosyntezy Białka, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.



wego. W charakterze matrycy użyto DNA z grasicy, polyd(A-T), polyd(G) i polyd(C). Stężenie antybiotyku  $2 \times 10^{-8} \text{M}$  wystarczało aby obniżyć o 50% włączanie uracylu do RNA, podczas gdy antybiotyk ten nawet w stężeniu  $0,8 \times 10^{-4} \text{M}$  nie obniżał syntezy DNA na matrycy DNA. Antybiotyki stosowane zwykle w celu zahamowania syntezy RNA, takie jak aktynomycyna lub chromomycyna są mniej specyficzne niż ryfampina, gdyż jednocześnie zatrzymują syntezę DNA. Przy tym stężenie ryfampiny hamujące syntezę RNA jest 10—100 razy niższe niż stężenie aktynomycyny (12).

Wehrli i Staehelin wykazali (32), że za hamowanie syntezy RNA odpowiedzialna jest część makrocykliczna cząsteczki ryfampiny. W części alifatycznej ryfampiny znajdują się trzy podwójne wiązania (I). Okazało się, że w miarę uwodnorodowywania tych wiązań maleje efekt hamowania syntezy RNA przez antybiotyk.



Przeprowadzono badania mające na celu umiejscowienie działania ryfampiny w reakcji syntezy kwasu rybonukleinowego na matrycy kwasu dezoksyrybonukleinowego. Stwierdzono, że ryfamycyny nie hamują syntezy RNA jeżeli są dodane po zapoczątkowaniu reakcji (25). A więc antybiotyk działa przed utworzeniem kompleksu inicjacyjnego, tj. kompleksu enzym—DNA. Aktywność bakteryjnej polimerazy RNA zależnej od DNA (EC 2.7.7.6.) hamowana jest *in vitro* przez bardzo niskie stężenie — poniżej  $1 \mu\text{g}$  w 1 ml mieszaniny inkubacyjnej (31). Jednak nawet wielokrotnie wyższe stężenia antybiotyku nie wpływają na aktywność polimerazy izolowanej z roślin (20) lub tkanek ssaków (31).

Bakteryjne polimerazy posiadają różną wrażliwość na antybiotyk. Wehrli i wsp. (30) porównywali wpływ wywierany przez ryfampinę na hodowle *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Wzrost *S. aureus* był hamowany przez 1000-krotnie niższe stężenie antybiotyku niż wzrost *E. coli*. Jednakże enzym wyizolowany ze *S. aureus* jest tylko 5—10 razy wrażliwszy niż enzym wyizolowany z *E. coli*. Odgrywa tu najprawdopodobniej rolę różnica w przepuszczalności ścian obu organizmów.

Stosując znakowaną węglem  $^{14}\text{C}$ -ryfampinę autorzy ci stwierdzili, że polimeraza RNA tworzy stabilny kompleks z antybiotykiem, czemu towarzyszy zanik aktywności enzymu (29). Polimeraza RNA natomiast wyizolowana ze szczepu niewrażliwego na antybiotyk nie tworzy kompleksu z ryfampiną i nie traci aktywności. Autorzy wyliczyli, że cząsteczka enzymu wrażliwego wiąże 1,5—6 cząsteczek antybiotyku. Rok później uściślili swoje wyniki, podając, że jedna cząsteczka enzymu wiąże jedną cząsteczkę antybiotyku (33). Ponieważ wiadomo, że ryfampina nie hamuje działalności polimerazy, która już rozpoczęła syntezę kwasu rybonukleinowego, można sądzić, że antybiotyk przyłącza się do innego miejsca na enzymie niż matryce kwasu dezoksyrybonukleinowego (25).

Polimeraza RNA z *E. coli* składa się z 4 rodzajów podjednostek:  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\sigma$ , które razem stanowią strukturę czynnego enzymu (28). R a b u s s a y i Zillig (22) wykazali, że ryfampina wiąże się z podjednostką  $\beta$  polimerazy RNA. Mutanty bakteryjne odporne na ryfampinę wykazują tolerancję dla różnych stężeń antybiotyku, co wskazuje, że mogą to być różne mutacje, zmieniające w niejednakowy sposób podjednostkę  $\beta$  polimerazy RNA (1).

Badano również wpływ ryfampiny na polimerazę RNA znajdującą się w mitochondriach. Mitochondrialny mechanizm biosyntezy białek jest podobny do bakteryjnego (23), można więc było sądzić, że wrażliwość mitochondriów na ryfampinę pozwoli wykazać, czy także enzymy biorące udział w syntezie RNA są podobne w mitochondriach i bakteriach. Wyniki badań nad wpływem antybiotyku na polimerazy mitochondrialne są niejednoznaczne. G a d a l e t a i w s p. (9) stwierdzili, że ryfampina hamuje aktywność enzymu znajdującego się w spęczniałych mitochondriach, natomiast nie działa na enzym w nienaruszonych mitochondriach. Ci sami autorzy podają, że enzym wyizolowany z mitochondriów wątroby szczura jest wrażliwy *in vitro* na działanie antybiotyku, natomiast W i n t e r s b e r g e r i W i n t e r s b e r g e r (35), pracując z enzymem również wyizolowanym z wątroby szczura, nie stwierdzili jego wrażliwości na działanie ryfampiny.

Wrażliwy na ryfampinę szczep *Escherichia coli*, hodowany w pożywce zawierającej 200  $\mu\text{g}$  ryfampiny na ml przez okres czasu przekraczający 30 minut, produkuje zmienione rybosomy, które sedymentują wolniej niż normalne rybosomy 70S. Zawierają one mniej białek i są wrażliwsze na działanie nukleaz (3). Stałe sedymentacji RNA wyizolowanego z takich rybosomów są takie same jak RNA z normalnych rybosomów. Autorzy sugerują, że antybiotyk poza działaniem pośrednim na biosyntezę białka drogą hamowania syntezy RNA może także bezpośrednio obniżać biosyntezę białka. Jednakże pogląd ten jest raczej odosobniony i mało udokumentowany.

Poza działaniem antybakteryjnym ryfampina posiada także własności przeciwwirusowe. Efekt ten wykazano na wirusach ospy hodowanych w



hodowlach tkankowych oraz na małych wirusach RNA (Q $\beta$ , R17, f2) żerujących na *Escherichia coli*.

Można było sądzić, że ryfampina będzie bezpośrednio wpływała na aktywność wirusowej polimerazy RNA, tak jak to ma miejsce w przypadku bakteryjnego enzymu. Jednak doniesienia na ten temat są niejednoznaczne. McAuslan w pracy z 1969 roku (17), a także Gurgo i wsp. w 1971 roku (11) twierdzą, że ryfampina działa na wirusowy enzym w ten sam sposób, jak na bakteryjną polimerazę, jednakże nie udało się wykazać tego efektu w przypadku polimerazy RNA w oczyszczonych cząstkach wirusa ospy krowiej (4).

Ryfampina w stężeniu 100 $\mu$ g/ml hamuje produkcję infekcyjnego wirusa ospy krowiej w komórkach HeLa (13, 26). Wykazano, że ryfampina nie zakłóca syntezy wirusowego DNA ani wirusowego mRNA (2, 17) a także, że syntetyzowane są zarówno wczesne jak i późne białka wirusa, z tym, że synteza późnych białek jest zahamowana (18). Do późnych białek należy główny polipeptyd strukturalny wirusa krowianki, o ciężarze cząsteczkowym 76 000, powstający przez degradację prekursora o ciężarze 125 000 (14). Katz i Moss (15) wykazali, że w obecności ryfampiny zahamowane jest powstawanie głównego strukturalnego polipeptydu wirusa, jednakże synteza prekursora tego białka zachodzi normalnie. Równoległym efektem, być może wynikającym ze zjawiska opisanego powyżej, jest niemożność wyizolowania dojrzałych cząstek wirusa krowianki z komórek zakażonych w obecności ryfampiny. Po usunięciu antybiotyku z hodowli, cząstki te tworzą się, mimo że ponowna synteza białka zahamowana jest prawie całkowicie działaniem cykloheksimidu (19). Świadczy to o wczesnym zablokowaniu procesu organizowania się cząsteczek wirusa, czego dowodzą także zdjęcia otrzymane z zakażonej hodowli komórkowej w obecności ryfampiny, uzyskane drogą mikroskopii elektronowej (10).

Przebadano także wpływ wywierany przez ryfampinę i jej pochodne na onkogenne wirusy RNA. Wirusy te posiadają bardzo charakterystyczny enzym — polimerazę DNA zależną od RNA (27). Okazało się, że ryfampina nie wywiera żadnego efektu na aktywność tego enzymu. Zdemetylowane pochodne ryfampiny hamują natomiast aktywność polimerazy DNA zależnej od RNA z wirusa mięsaka myszy (MSV), wirusa leukemii kocięj (FeLV) i wirusa myeloblastomy ptasiej (AMV). Wykazano także, że po rozbięciu cząsteczki ryfampiny na części składowe, 1-amino4-metylopiperazyna nie posiada działania przeciwwirusowego (6). Wynika z tych doświadczeń, że makrocykliczna część ryfampiny niezbędna jest dla jej przeciwwirusowej aktywności. Zgadza się to z wynikami uzyskanymi przez Wehrli i Staehelina, badającymi udział części składowych ryfampiny w hamowaniu bakteryjnej syntezy RNA (32).

Ryfampina wywiera hamujący wpływ na rozwój tzw. małych wirusów RNA. Są to *colifagi*, rozmiarami zbliżone do rybosomów, które za-



wierają kwas rybonukleinowy jako materiał genetyczny (34). Po zakażeniu komórki bakterii *E. coli* wirusy te produkują enzym, przy pomocy którego zachodzi powielanie RNA na matrycy RNA fagowego. W odróżnieniu od efektu wywieranego na polimerazę RNA zależną od DNA, antybiotyk nie hamuje aktywności wirusowej polimerazy RNA, zależnej od RNA (21). Ryfampinę zastosowano w celu zahamowania metabolizmu komórkowego, co pozwoliło na lepsze wyeksponowanie syntezy białek i kwasu rybonukleinowego wirusa. Odnosne wyniki nie były jednak zgodne. Fromageot i Zinder (8) stwierdzili, że ryfampina, oddana co najmniej 5 minut po infekcji, nie wpływa w widoczny sposób na rozwój faga f2 w komórkach *Escherichia coli*, podczas gdy Friesen (7) wykazał trzykrotne obniżenie produkcji faga f2, gdy antybiotyk był dodawany nawet 15 minut po zakażeniu hodowli *E. coli*. Pasent i Kaesberg (21) wykazali, że ryfampina dodana do hodowli *E. coli* w momencie infekcji fagiem Q $\beta$  (należącym do tej samej grupy małych fagów RNA) powoduje obniżenie jego produkcji 5—6-krotnie. Efekt ten jest nieodwracalny. Autorzy przedstawili dane doświadczalne, które pozwalają stwierdzić, że zarówno synteza RNA jak i białek wirusowych zachodzą z tą samą szybkością w hodowli zakażonej fagiem zarówno w obecności antybiotyku jak i bez niego, ale powstawanie cząstek faga z części składowych jest silnie upośledzone w obecności ryfampiny. Autorzy postulują istnienie komórkowego fatora, niezbędnego dla uorganizowania się dojrzałej cząstki faga. Synteza tego fatora jest wstrzymana ze względu na zahamowanie aktywności komórkowej polimerazy RNA.

Wydaje się, że nie jest to jedyny mechanizm, dzięki któremu w obecności ryfampiny wykrywa się mniej cząstek wirusa, niż w komórkach *E. coli* zakażonej w nieobecności antybiotyku. Porównując ilość wirusa wewnątrzkomórkowego i ilość wirusa uwolnionego na zewnątrz drogą spontanicznej lizy wykazano, że ryfampina nie tylko obniża ilość wirusa utworzonego w zakażonej komórce, ale także hamuje uwalnianie się dojrzałych wirionów z komórki (5).

Wyniki przedstawionych wyżej prac wskazują na rolę ryfampiny nie tylko jako leku, lecz jako substancji, której użycie pozwala na wyjaśnienie pewnych zjawisk biochemicznych w cyklu życiowym bakterii i wirusów.

### Podsumowanie

Ryfampina jest antybiotykiem wykazującym aktywność przeciwbakteryjną i przeciwwirusową. Jako czynnik przeciwbakteryjny działa poprzez zahamowanie polimerazy RNA zależnej od DNA, tworząc z enzymem stabilny kompleks. Jako czynnik przeciwwirusowy hamuje dojrze-

wanie wirusów zawierających RNA, na drodze mechanizmu jeszcze niewyjaśnionego. W obu przypadkach czynną częścią cząsteczki ryfampiny jest pierścień makrocycliczny, a nie aminopiperazyna.

## LITERATURA

1. Babinet C., *Biochemie* **53**, 507 (1971).
2. Ben-Ishai Z., Heller E., Goldblum N., Becker Y., *Nature* **224**, 29 (1969).
3. Blundell M. R., Wild D. G., *Biochem. J.* **121**, 391 (1971).
4. Constanzo F., Fiume L., La Placa M., Mannini-Palenzona A., Novello F., Stirpe F., *J. Virol.* **5**, 266 (1970).
5. Engelberg H., Soudry E., *J. Virol.* **7**, 847 (1971).
6. Follet E. A. C., Pennington T. H., *Nature* **230**, 117 (1971).
7. Friesen J. D., *J. Mol. Biol.* **46**, 349 (1969).
8. Fromageot H. P. M., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 184 (1968).
9. Gadaleta M. N., Greco M., Saccone C., *FEBS Letters* **10**, 54 (1970).
10. Grimley P. M., Rosenblum E. N., Mims S. J., Moss B., *J. Virol.* **6**, 519 (1970).
11. Gurgo C., Ray R. K., Thiry L., Green M., *Nature* **229**, 111 (1971).
12. Hartmann G., Hönikel K. O., Knuesel F., Nuesch J., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 843 (1967).
13. Heller E., Argaman M., Levy H., Goldblum N., *Nature* **222**, 273 (1969).
14. Holowczak J. A., Joklik W. K., *Virology* **33**, 726 (1968).
15. Katz E., Moss B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **66**, 677 (1970).
16. Maggi N., Pasqualucci C. R., Ballotta R., Sensi P., *Chemo-therapia* **11**, 285 (1966).
17. McAuslan B. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 289 (1969).
18. Moss B., Katz E., Rosenblum E. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 858 (1969).
19. Moss B., Katz E., Rosenblum E. N., Grimley P. M., *Nature* **224**, 1280 (1969).
20. Nagl E. *Naturwissenschaften* **57**, 458 (1970).
21. Passent J., Kaesberg P., *J. Virol.* **8**, 286 (1971).
22. Rabussay D., Zillig W., *FEBS Letters* **5**, 104 (1969).
23. Roodyn D. B., Wilkie D., *The Biogenesis of Mitochondria*, Methuen, London 1968, str. 39.
24. Sensi P., Margalith P., Timbal M. T., *Il Farmaco* **14**, 146 (1959).
25. Sippel A., Hartmann G., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 218 (1968).
26. Subak-Sharpe J. H., Timbury M. C., Williams J. F., *Nature* **222**, 341 (1969).
27. Temin H. M., Mizutani S., *Nature* **226**, 1211 (1970).
28. Travers A. A., Burgess R. R., *Nature* **222**, 437 (1969).
29. Wehrli W., Knuesel F., Schmid K., Staehelin M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 667 (1968).
30. Wehrli W., Knuesel F., Staehelin M., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **32**, 284 (1968).

31. Wehrli W., Nuesch J., Knuesel F., Staehelin M., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 215 (1968).
32. Wehrli W., Staehelin M., *Biochim. Biophys. Acta* **182**, 24 (1969).
33. Wehrli W., Staehelin M., Proc. 1st Int. Lepetit Colloq. RNA Polymerase Transcript., North Holland Publishing Co., Amsterdam-London 1970.
34. Weissman C., Ochoa S., w Progress in Nucleic Acids Research, red. Davidson J. N., W. E. Cohn, Academic Press, New York, London 1967, tom VI, str. 353.
35. Wintersberger E., Wintersberger U., *FEBS Letters* **6**, 58 (1970).





## Karnozyna i jej rola biologiczna

### Carnosine and its Biological Role

It was presented literature review on the occurrence of carnosine, its biosynthesis, and the effect on the biochemical processes in skeletal muscle.

Odkryta w 1900 roku przez Gulewicza i Amiradżibi (23) karnozyna określona została później przez Gulewicza (22) jako  $\beta$ -alanylohistydyna. Dwupeptyd ten okazał się specyficznym składnikiem mięśni szkieletowych większości kręgowców. Karnozyna nie występuje bowiem w mięśniach gładkich (50) i w mięśniu sercowym (50, 54). Nieznaczne jej ilości stwierdzono w mięśniach przepony i w wątrobie (54). W krwi ilość tego związku jest 10-krotnie niższa aniżeli w wątrobie. Według dawnych doniesień karnozyna nie występuje w tkance płucnej (29). W tkance mózgowej wielu zwierząt i człowieka znaleziono natomiast znaczne ilości homokarnozyny ( $\gamma$ -aminobutyrylohistydyny (1)).

### I. Występowanie karnozyny

#### 1. Ilość karnozyny w mięśniach różnych gatunków zwierząt

Jak wynika z badań wielu autorów (cyt. za Wulfsonem (81)) karnozyna nie występuje u bezkręgowców. Nieznaczne ilości karnozyny i jej metylowej pochodnej — anseryny (łącznie około 6 mg<sup>0/0</sup>) znaleziono jedynie u kraba *Portunus trituberculatus* (71).

Ilość karnozyny w mięśniach kręgowców zależy od gatunku zwierzęcia (15, 62, 71, 82). Badania Wulfsona (81) wykazały, że mięśnie niektórych gatunków ryb (płaszczka, ogończa) nie zawierają ani karnozyny ani anseryny; charakteryzuje je natomiast znaczna ilość  $\beta$ -alaniny. Inną grupę stanowią ryby pelagiczne (pelamida, belona, sardela, śledź, szprot), których mięśnie nie zawierają dwupeptydów ani  $\beta$ -alaniny, zawierają natomiast duże ilości histydyny. U ryb dorszowatych i łososio-

\* Dr, Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt, Akademia Rolnicza-Techniczna, Olsztyn.

\*\* Prof. dr, Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt, Akademia Rolnicza-Techniczna, Olsztyn.

watych wykryto anserynę, przy czym u dorszowatych występuje równocześnie  $\beta$ -alanina, natomiast u łososiowatych — histydyna. Szczególną grupę stanowią wargacz, kwap, morski węgorz, podeszwica i morski drakon; ich mięśnie nie zawierają ani dwupeptydów ani  $\beta$ -alaniny i histydyny.

Z gromady płazów, jeśli chodzi o występowanie karnozyny, dobrze poznana jest żaba, u której w mięśniach występuje około 200 mg<sup>0/0</sup> tego dwupeptydu (66). Obecność karnozyny stwierdzono także u przedstawiciela gadów — żółwia; u jaszczurki natomiast znaleziono anserynę (82).

Mięśnie wyższych kręgowców — ptaków i ssaków — zawierają oba dwupeptydy, których suma u zwierząt dorosłych wynosi 100 do 1000 mg<sup>0/0</sup> w świeżej masie mięśni (57). Według Parkera i Ringa (48) mięśnie szkieletowe królika oraz kurczęcia zawierają około 450 mg<sup>0/0</sup> karnozyny i anseryny.

Zdaniem Suyamy i wsp. (71) wiedza o występowaniu karnozyny i anseryny jest ciągle niedostateczna z powodu niedokładności metod analitycznych. Autorzy zbadali zawartość tych dwupeptydów oraz baleniny ( $\beta$ -alanylo-3-metylohistydyna) w mięśniach 33 gatunków kręgowców (w tym 19 gatunków ryb) stosując chromatografię jonowymienną na Amberlicie IR-120. Wyniki tych badań zawierają tablice 1 i 2.

Tablica 1

Zawartość karnozyny, anseryny i baleniny w mięśniach ryb (wg Suyamy i wsp. (71))

	mg %		
	karnozyna	anseryna	balenina
<b>Chrzęstnoszkieletowe</b>			
<i>Glyphis glaucus</i>	0	22,6—34,3	2,3—3,6
<i>Carcharinus longimanus</i>	50,3	284	29,9
<i>Isurus glaucus</i>	0	872	2,9
<i>Mustelus manazo</i>	0	0	0
<i>Squalus mitsukurii</i>	0,4	1010	0,3
<i>Dasyatis akajei</i>	0	2,3	0
<b>Kostnoszkieletowe</b>			
<i>Thunnus obesus</i>	0	859—1590	0—10,9
<i>Thunnus albacares</i>	9,5	1090	0
<i>Thunnus alalunga</i>	0,2	1570	0
<i>Thunnus maccoyii</i>	0	735	0
<i>Sardinops melanosticta</i>	0	0,1—4,3	0
<i>Cololabis saira</i>	0	0	0
<i>Scomber japonicus</i>	0	0	0
<i>Trachurus japonicus</i>	0	2,6	0
<i>Anguilla japonica</i>	542	0	0
<i>Lateobrax japonicus</i>	0,1	0	0,4
<i>Pagrus major</i>	0	1,8	0
<i>Kareius bicoloratus</i>	0	0	0
<i>Labracogrossa argentiventris</i>	0	0	0



Tablica 2.

Zawartość karnozyny, anseryny i baleniny w mięśniach ssaków, ptaka i gadów  
(wg S u y a m a i wsp. (71))

	mg %		
	karnozyna	anseryna	balenina
<b>Ssaki</b>			
guar ( <i>Bos gaurus</i> )	230	10,5	0
świnia ( <i>Sus v. domesticus</i> )	387	30,7	41,9
finwal ( <i>Balaenoptera physalus</i> )	103—140	2,8— 5,0	1340—1520
sejwal ( <i>Balaenoptera borealis</i> )	272—300	7,5— 18,2	1560—1930
pletwal karłowaty ( <i>Balaenoptera acutorostrata</i> )	117—154	22,7— 49,3	1700—1900
kaszalot ( <i>Physter catodon</i> )	196—235	83,6—137	0,8—3,2
grindwal ( <i>Globicephala melaena</i> )	227—275	37,5— 39,0	515— 590
delfin zwyczajny ( <i>Delphinus delphis</i> )	384—447	92,7—136	489— 766
foka pospolita ( <i>Phoca vitulina</i> )	511—592	118—150	0
<b>Ptaki</b>			
kura domowa ( <i>Gallus domestica</i> )	439	956	0
<b>Gady</b>			
<i>Elaphe quadrivirgata</i>	22,1	2,8	391
<i>Natrix tigrina tigrina</i>	209	1,2	111
<i>Agistrodon halys blomhoffii</i>	140	2,7	74,4

## 2. Ilość karnozyny w zależności od wieku zwierzęcia

Karnozyna pojawia się w tkance mięśniowej w określonym okresie życia embrionalnego, zbiegającym się z formowaniem się łuku odruchowego (57, 62, 82). U królika karnozyna pojawia się 22—24 dnia życia płodowego (62) w ilości 23 mg<sup>0</sup>/o. W pierwszym dniu życia postembrionalnego ilość karnozyny w mięśniach królika wynosi już 82 mg<sup>0</sup>/o i wzrasta stopniowo z wiekiem zwierzęcia do trzeciego tygodnia życia osiągając ponad 180 mg<sup>0</sup>/o. Następnie zawartość karnozyny w mięśniach królików maleje i u zwierząt dorosłych wynosi około 70 mg<sup>0</sup>/o. W mięśniach kur karnozyna zjawia się 12—14 dnia (57, 69), a u kaczek 20—23 dnia życia embrionalnego (82). W momencie wykluwania się kacząt ich mięśnie nożne zawierają (w suchej masie mięśni) około 120 mg<sup>0</sup>/o karnozyny. W 30 dniu życia postembrionalnego ilość jej wzrasta do około 360 mg<sup>0</sup>/o, po czym maleje, osiągając u kaczek dorosłych znowu około 120 mg<sup>0</sup>/o. W momencie pojawienia się karnozyny w mięśniach embrionów znajdują się w nich również znaczne ilości prekursorów tego dwupeptydu: β-alaniny u królika i histydyny u kury (57), a obu aminokwasów u kaczek (82). Ilość tych aminokwasów zmniejsza się w miarę wzrostu ilości karnozyny w mięśniach. W mięśniach zwierząt dorosłych aminokwasów tych nie znaleziono wśród niebiałkowych związków azotowych, prawdopodobnie z powodu ich znikomych ilości.

U bydła karnozyna pojawia się w 4-tym miesiącu życia embrionalnego. W miarę rozwoju, jej poziom w mięśniach płodu wzrasta, a maleje równocześnie w mięśniach matki (tablica 3). Najwyższą zawartość tego dwupeptydu zanotowano u krów w wieku 4—7 lat (tablica 4).

Tablica 3.

Zawartość karnozyny w mięśniach cielnych krów i ich płodów  
(wg Pielewina) (52))

Wiek płodu (mies.)	mg% karnozyny w świeżej masie mięśni	
	matka	płód
4	273	16
6	238	47
8	232	124

Tablica 4

Zawartość karnozyny w mięśniach krów w zależności od ich wieku  
(wg Pielewina) (52))

Wiek krowy	mg% karnozyny w świeżej masie mięśni
8 dni	202
4-7 lat	248
powyżej 7 lat	192

### 3. Poziom karnozyny w zależności od rodzaju mięśnia

Zawartość karnozyny, nawet u tego samego zwierzęcia, zależy od charakteru mięśnia (59, 82). Siewierin i wsp. (59) wykazali, że toniczne mięśnie żaby (*m. gastrocnemius*) zawierają znacznie więcej karnozyny niż jej mięśnie tetaniczne (*m. sartorius*, *m. rectus abdominis*). Cechą charakterystyczną mięśni tonicznych jest ich zdolność do długotrwałego skurczu. Z badań Aleksachinej (2) wynika ponadto, że mięśnie białe (piersiowe) kur zawierają prawie trzykrotnie więcej karnozyny i anseryny aniżeli mięśnie czerwone (nożne). U kaczek sprawa przedstawia się odwrotnie (82).

Rozmieszczenie karnozyny w poszczególnych mięśniach związane jest z ich unerwieniem. Z badań Siewierina i wsp. (59) wynika, że w poszczególnych odcinkach *m. gastrocnemius* żaby, charakteryzującego się równomiernym rozmieszczeniem zakończeń nerwowych, karnozyna występuje w jednakowym stężeniu. *M. sartorius* natomiast największe stężenie tego dwupeptydu wykazuje w swojej części środkowej. Również *m. plantaris* królika znacznie więcej zawiera karnozyny w części dystalnej („nerwowej”), aniżeli w części proksymalnej (73).

Neurotomia lub tenektomia pociąga za sobą gwałtowne zmniejszenie zawartości karnozyny w mięśni (26, 73). Stwierdzono, że ilość karnozyny w *m. plantaris* królika obniża się 3—4-krotnie w kończynach w ciągu 12—14 dni po przecięciu nerwu. Jednocześnie zachodzi wyrównanie poziomu karnozyny w poszczególnych częściach badanego mięśnia (73). J u d a j e w i wsp. (26) wykazali prawie całkowity zanik karnozyny w mięśni przy neurotomii, czemu towarzyszył silny wzrost ilości  $\beta$ -alaniny. Autorzy ci wykazali, że wstrzyknięcie w tym czasie zwierzęciu histydyny powoduje całkowite zniknięcie  $\beta$ -alaniny z równoczesnym wzrostem ilości karnozyny. Zjawisko to może służyć jako pośredni dowód powstawania karnozyny w organizmie zwierzęcia z wymienionych aminokwasów. Do chwili regeneracji nerwu i pojawienia się słabego ruchowego przewodnictwa mięsień pod względem zawartości karnozyny przypomina mięsień 10—12-dniowego królika.

#### 4. Poziom karnozyny w stanach patologicznych

Wykazano, że w niektórych stanach odbiegających od norm fizjologicznych, np. przy deficycie witaminy E u królików, zawartość karnozyny w mięśniach znacznie spada (39).

Ostatnio stwierdzono, że im większy stopień inwazji pasożytniczej mięśni tonicznych i nietonicznych świnki morskiej oraz szczura, tym zawartość karnozyny i anseryny jest w nich mniejsza (6) (tablica 5).

Tablica 5

Zależność między poziomem karnozyny i anseryny w mięśniach szczura a stopniem ich zarażenia larwami trychiny (wg B e k i s z a (6))

Mięsień	% larw w stosunku do ilości całkowitej	mg% w świeżej masie mięśni	
		karnozyna	anseryna
Toniczne			
przepona	30,33	22,15	106,38
język	26,11	21,02	106,90
m. żwacz	16,54	22,13	126,58
Tetaniczne			
łydkowy	7,88	59,48	160,70
trójgłowy	6,74	59,15	174,64
Mieszane			
czworogłowy	6,21	56,80	163,10
skośny brzucha	6,19	64,25	185,51



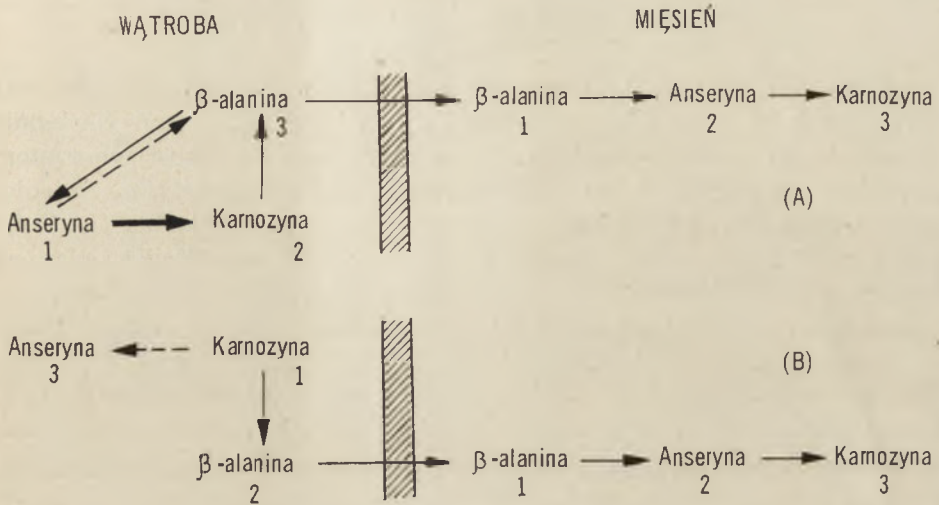
## II. Biosynteza karnozyny

Gulewicz (22) wysunął dwa przypuszczenia o powstawaniu karnozyny w organizmie zwierzęcym. Pierwsze z nich zakłada możliwość kondensacji  $\beta$ -alaniny i histydyny, drugie natomiast — powstawanie karnozyny na drodze dekarboksylacji asparagilohistydyny. Ta druga sugestia nie została jednak eksperymentalnie potwierdzona (55). Na możliwość biosyntezy karnozyny w organizmie zwierzęcia z  $\beta$ -alaniny i histydyny zwrócił również uwagę J u d a j e w (cyt. za Mieszkową, (42)). Po podaniu rosnącym królikom histydyny autor stwierdził wzrost zawartości karnozyny w mięśniach badanych zwierząt. Następnie Martignoni i Winnick (38), w badaniach *in vitro*, przy zastosowaniu 1-<sup>14</sup>C- $\beta$ -alaniny, oraz Razina (53) i Mc Manus (39) — przy zastosowaniu 2-<sup>14</sup>C-histydyny, wykazali powstawanie karnozyny w mięśniach. Tworzenie karnozyny w mięśniach drogą kondensacji  $\beta$ -alaniny i histydyny potwierdzono także *in vivo* (17, 20). Cząsteczka radioaktywnej  $\beta$ -alaniny, wprowadzona doustnie ssącym szczurom, wbudowuje się w karnozynę mięśni kończyn całkowicie;  $\beta$ -alanina, wprowadzona dożylnie, znika z krwi już w pierwszej godzinie po iniekcji, przy czym pewna ilość tego aminokwasu wydalana jest z moczem w niezmienionej formie (20). Badania na skrawkach wątroby doprowadziły do sprzecznych wniosków (42, 53). Jednakże Parszin i wsp. (51) wykazali syntezę karnozyny zarówno w izolowanych mięśniach kończyn jak i w izolowanej wątrobie żaby. Metodą izotopową ustalono, że w wątrobie zachodzi ona średnio 22 razy intensywniej aniżeli w mięśniach. Autorzy uważają zatem wątrobę za główne miejsce powstawania karnozyny w organizmie zwierzęcia. Małą zawartość tego związku w wątrobie (3—5 mg<sup>0</sup>/o) można tłumaczyć jego szybkim i nieprzerwanym odpływem za pośrednictwem krwi do mięśni.

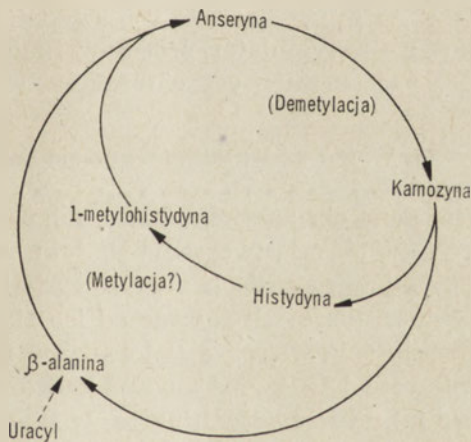
Aonuma i wsp. (3) uważają również wątrobę za główne miejsce biosyntezy anseryny. Autorzy sugerują, że anseryna jest pierwotnym produktem biosyntezy, który następnie jest przekształcany w karnozynę. Potwierdzałyby to ich badania nad przemianą tych dwupeptydów (znakowanych trytem), wprowadzonych dożylnie szczurom. Na podstawie zaobserwowanego rozmieszczenia radioaktywności autorzy proponują drogę tej przemiany (schemat 1), oraz drogi możliwej biosyntezy karnozyny i anseryny *in vivo* (schemat 2). Autorzy uważają, że niezależna biosynteza tych dwupeptydów, a także powstawanie anseryny drogą metylacji nie są możliwe.

Winnickowie (76) oraz Kalyankar i Meister (28) wyodrębnili z mięśnia piersiowego kurczęcia czysty preparat enzymatyczny, zdolny do syntezy karnozyny z  $\beta$ -alaniny i histydyny przy udziale ATP i jonów Mg<sup>2+</sup>. Otrzymana syntetaza karnozynowa (EC 6.3.2.11) charakteryzuje się względną specyficznością, zdolna jest bowiem również do syntezy anseryny z  $\beta$ -alaniny i 1-metylohistydyny (76). Enzym ten odzna-

cza się też dużą aktywnością przy zastąpieniu  $\beta$ -alaniny kwasem  $\gamma$ -aminomasłowym, czego wyrazem jest synteza homokarnoizyny (1, 28). Przy udziale tego enzymu możliwa jest również (wprawdzie znacznie słabsza) synteza dwupeptydów z  $\beta$ -alaniny i analogów histydyny, np. 2-metylo-



**Schemat 1.** Przemiana znakowanej trytem anseryny (A) i karnoizyny (B); cyfry 1, 2, 3 oznaczają wielkość specyficznej radioaktywności (wg A o n u m y i w s p. (3))



**Schemat 2.** Możliwa droga biosyntezy karnoizyny i anseryny *in vivo* (wg A o n u m y i w s p. (3))

histydyny (28). Dwupeptyd znaleziony w mięśniach wieloryba (30) i żmii (30) był do niedawna mylnie uważany za  $\beta$ -alanilo-2-metylohistydynę (ofidyna). Dzięki bowiem analizie widma magnetycznego rezonansu jądro-

wego ofidyna okazała się identyczna z baleniną ( $\beta$ -alanylo-3-metylohistydyna). Dwupeptyd ten występuje w dużych ilościach w mięśniach ssaków morskich oraz w mięśniach niektórych gatunków węży (71).

### III. Enzymatyczna hydroliza karnozyny

Stwierdzono, że glicerynowy wyciąg ze śluzówki jelit cienkich oraz dwupeptydaza nerki psa zdolne są do hydrolizy karnozyny. Następnie Mieszkowa (40) wykazała, że karnozyna wprowadzona zwierzętom parenteralnie wydalana jest częściowo (30—50%) z moczem w niezmienionej formie, częściowo zaś ulega w organizmie rozpadowi. Tkanka wątroby ptaków, w odróżnieniu od wątroby ssaków, nie jest zdolna, zdaniem autorki, do rozszczepienia karnozyny. Hanson i Smith (24) wyisolowali karnozynazę (EC 3.4.3.3) z wątroby, śledziony oraz z nerki szczura, a także z nerki świni. Enzym z nerki świni, częściowo oczyszczony, jest prawdopodobnie metaloproteidem. Autorzy sądzą bowiem, że jony cynku wchodzi w skład enzymu, jakkolwiek i jony  $Mn^{2+}$  aktywują karnozynazę.

Obecność karnozynazy stwierdzono ostatnio w łożysku ludzkim (84) oraz w najądrzu rocznego buhaja (79). W obu przypadkach jony  $Mn^{2+}$  okazały się aktywatorami tego enzymu.

Istnieje zatem najprawdopodobniej ujemna korelacja między zawartością karnozyny a obecnością karnozynazy w poszczególnych organach.

### IV. Karnozyna — stymulator procesów fizjologicznych i biochemicznych w mięśniu

#### 1. Wpływ na kurczliwość mięśnia

Przytoczone wyżej dane eksperymentalne o pojawieniu się karnozyny w mięśniach zwierzęcia w okresie tworzenia się łuku odruchowego, praktyczny brak dwupeptydu w narządach mięsnych i w krwi oraz rozmieszczenie karnozyny w mięśniach zależne od ich fizjologicznego obciążenia, wskazują na ścisły jej związek z fizjologiczną funkcją mięśni.

Badania nad wpływem karnozyny na skurczowe właściwości mięśni wykazały, że dodanie jej do roztworu Ringera, w którym zanurzono preparat mięśniowo-nerwowy, powoduje zwiększenie amplitudy i długości skurczu mięśnia przy pośrednim jego drażnieniu prądem elektrycznym (7, 11, 59). Efekt ten nie występuje przy bezpośrednim drażnieniu mięśnia, co zdaniem Siewierina i wsp. (59) wskazuje na rolę karnozyny jako pośrednika w przekazywaniu impulsów nerwowych; przyczynia się ona bowiem także do likwidacji blokady tubokurarynowej w płytkach ruchowych (58). Stwierdzono ponadto, że zwiększeniu zdolności



preparatu mięśniowo-nerwowego do pracy pod wpływem karnozyny towarzyszy nasilenie procesu glikolizy, co uwidacznia się zwiększoną syntezą kwasu mlekowego oraz zwiększonym zużyciem ATP (11, 59).

## 2. Pobudzenie procesów fosforylacji w tkance mięśniowej

Liczne badania nad wpływem karnozyny i innych związków imidazolowych (anseryna, imidazol) na procesy fosforylacji w tkance mięśniowej wykazały pobudzający wpływ tych związków na proces całościowy glikogenolizy oraz na poszczególne jej etapy (41, 45, 46, 47, 58, 60, 61, 63, 64, 65, 69). Badania Siewierina i wsp. (60, 61) na rozdrobnionej tkance mięśniowej żaby dowodzą, że dodanie karnozyny przyspiesza estryfikację nieorganicznego fosforanu, co wyraża się dodatkowym nagromadzeniem labilnych związków fosforanowych, których ilość przewyższa poziom powstającej fosfokreatyny. Karnozyna, a także anseryna i histydyna, dodane do ekstraktu tkanki mięśniowej żaby (61), przyspieszają reakcje przekształcania heksozo-1-fosforanu w heksozo-6-fosforan, jak również estryfikację nieorganicznego fosforanu na etapie reakcji sprzężonej z oksydoredukcją. W badaniach na dializowanych ekstraktach tkanki mięśniowej karnozyna przyspiesza przenoszenie reszty fosforanowej z ATP na kreatynę. Dodatkowemu wiązaniu  $P_i$  w rozdrobnionym mięśniu piersiowym gołębia towarzyszy dodatkowe nagromadzenie kwasu fosfoglicerynowego (45, 63, 65, 69) oraz fruktozodwufosforanu (45, 69). Nagrodowa (46, 47), w badaniach na dializowanych ekstraktach tkanki mięśniowej królika oraz przy zastosowaniu czystego preparatu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, stwierdziła również wpływ karnozyny na glikolityczną oksydoredukcję. Autorka wykazała także brak bezpośredniego wpływu karnozyny i innych związków imidazolowych (anseryna, histydyna) na aktywność tego enzymu. Na podstawie uzyskanych wyników autorka przypuszcza, że wpływ tych związków dotyczy ochrony enzymu przed hamującym działaniem mineralnego fosforanu.

Stwierdzono także (66), że karnozyna przeciwdziała hamującemu działaniu 2,4-dwunitrofenolu na tlenową fosforylację w tkance mięśniowej.

Stosując oczyszczony preparat dehydrogenazy kwasu pirogronowego wykazano, że karnozyna przyspiesza proces tlenowej dekarboksylacji kwasu pirogronowego i tworzenie acetylo-CoA (67, 68).

Niektórzy autorzy (16, 72) wpływ karnozyny jak również anseryny na procesy fosforylacji skłonni są przypisać ich buforowemu działaniu (5). Należy jednak nadmienić, że badając wpływ dwupeptydów Davey (16) zastosował w próbach kontrolnych bufor imidazolowy. Badania w laboratorium Siewierina wykazały jednak, że imidazol w pewnym stopniu wpływa na reakcje fosforylacji.

### 3. Wpływ karnozyny na aparat kurczliwy włókna mięśniowego

Stwierdzony przez wielu autorów stymulujący wpływ karnozyny na procesy glikolityczne, które nie są jednak swoiste tylko dla mięśni, nie tłumaczy jej występowania jako specyficznego dla tych mięśni dwupeptydu. Ponieważ rozmieszczenie karnozyny w mięśniach jest uzależnione od ich fizjologicznej aktywności, wydaje się zatem słusznym przypuszczenie, że rola jej wiąże się z funkcjonowaniem systemu kurczliwego miozyna-aktyna włókien mięśniowych. Zapewne pogląd ten skłonił badaczy do poszukiwania wpływu karnozyny na wzajemne oddziaływanie białek „kurczliwych” i ATP.

Kaldor i Gergely (27) nie wykazali wpływu karnozyny na aktywność miofibrylarnej ATPazy. Analogiczne rezultaty uzyskali Boczarnikowa i Pietuszkowa (8) w niezbuforowanym środowisku z naturalną aktomiozyną. Uprzednie przetrzymywanie enzymu w roztworze z karnozyną w ciągu 15—60 minut nie zmieniało wyników doświadczenia. Stwierdzono natomiast, że karnozyna zmniejsza wpływ ATP na błonkowe nici aktomiozynowe sporządzone wg metody Hayashi (zmniejszanie dodatkowego wydłużenia obciążonych nici po dodaniu ATP). Na tej podstawie wysnuto wniosek, że wpływ karnozyny polega na umocnieniu wiązań między aktyną i miozyną lub na stabilizacji wiązań między białkowymi micelami.

Ciekawe wyniki dały badania Bowena (12) nad wpływem karnozyny na kurczliwość glicerynowanych włókien mięśniowych. Autor stwierdził, że  $\text{Na}_2\text{ATP}$  i 45mM karnozyna daje w efekcie 50-krotnie większą wartość skurczu niż  $\text{Na}_4\text{ATP}$  oraz 10-krotnie większą niż  $\text{Na}_2\text{ATP}$  i 1mM  $\text{MgCl}_2$  podczas początkowych 5 sekund. Ponadto stwierdzono, że ATP neutralizowany karnozyną powoduje większy skurcz aniżeli ATP neutralizowany NaOH. Podobny efekt daje tetrametyloamon użyty zamiast karnozyny. Wyniki tych badań, zdaniem Bowena, wskazują, że efekt karnozyny jest specyficzny — nie odnoszący się do jej wkładu w siłę jonową roztworu i polegałby na jej działaniu jako dużego kationu.

Wpływ związków imidazolowych na ATPazę miozynową omawiają dwie sprzeczne ze sobą prace, których wyniki są ze sobą jednak nieporównywalne z uwagi na duże różnice w stosowanej metodyce. Mieszkowa i Cwietkova (44) wykazały, że związki imidazolowe (w tej liczbie i karnozyna) w ekwimolarnych stężeniach do stężeń ATP nie wpływają na ATPazową aktywność miozyny. Nawet koncentracja tych związków, 10-krotnie przewyższająca stężenie ATP (5mM), nie zmienia aktywności enzymu, badanej w buforze Tris. Jedynie przy stężeniu 0,1 M związków imidazolowych obserwowano nieznaczne (5%) obniżenie aktywności miozynowej ATPazy. Natomiast Boczarnikowa i Pietuszkowa (9) wykazały wpływ związków imidazolowych na enzymatyczną aktywność miozyny. Stwierdzono, że związki te w stężeniach 0,01M w



roztworze niezbuforowanym obniżają aktywność miozynowej ATPazy. Karnozyna wykazała przy tym najsilniejszy wpływ powodując obniżenie aktywności enzymu o 30—40%. Należy podkreślić, że badania były przeprowadzone przy pH 7,6. Jak wykazali Kitagawa i wsp. (34) oraz Sekine i Kielley (56) przy pH 7,5 ATPaza miozynowa wykazuje obniżoną aktywność. Można by więc przypuszczać, że związki imidazolowe (dzięki swym właściwościom buforowym) utrzymywały niekorzystne pH badanych prób, natomiast w próbach kontrolnych dochodziło zapewne do obniżenia pH na skutek działania ATPazy, co mogło powodować wzrost aktywności enzymu stwarzając pozory hamowania reakcji przez związki imidazolowe.

Przed dziesięciu laty pojawiły się w piśmiennictwie dane, że karnozyna jest antagonistą systemu rozkurczowego. Początkowo Kaldor i Gergely (27) poszukując czynnika rozkurczowego stwierdzili, że fosforan pirydoksalu hamuje synerzę miofibryli i aktywność miofibrylarnej ATPazy, karnozyna natomiast przeciwdziała tej inhibicji.

Następnie stwierdzono, że karnozyna przeciwdziała hamującemu działaniu ziaren Marsh-Bendalla (pęcherzyki sarkoplazmatycznego retikulum) na skurcz glicerynowanych włókien mięśniowych pod wpływem ATP (13) i na aktywność miofibrylarnej ATPazy (18, 49). Yun i Parker (83) stwierdzili następnie, że karnozyna aktywuje miofibrylarną ATPazę po inaktywacji ziaren tymolem. Stopień aktywacji wahał się, w zależności od preparatu, w granicach 30—60%, przy czym maksymalną aktywację uzyskano przy 2mM stężeniu karnozyny, zwiększenie jej stężenia do 10mM dało mały dodatkowy efekt. Podobne rezultaty uzyskano w naszej pracowni, bowiem 2,5mM stężenie karnozyny zwiększało aktywność aktomiozynowej ATPazy o 23—24% (77), a 8mM — o 35% (80).

Yun i Parker wykazali ponadto, że 10mM karnozyna zwiększa aktywność miofibrylarnej ATPazy w tym samym stopniu (o około 44%), co 0,1mM CaCl<sub>2</sub>. Dodanie 10mM karnozyny do ATPazy, aktywowanej 0,1mM CaCl<sub>2</sub>, daje wzrost aktywności jeszcze o około 17%, przy czym nie jest on uwarunkowany zanieczyszczeniem karnozyny jonami Ca<sup>2+</sup>. Autorzy przypuszczają, że jony wapnia w stężeniu 0,0007mM mogły być jednak wprowadzone jako zanieczyszczenia ATP. Chociaż aktywacja przez wapń, według Yuna i Parkera ma tendencję do maskowania aktywacji karnozyną, jednak wprowadzony Ca<sup>2+</sup> (jako zanieczyszczenia ATP) jest prawdopodobnie wiązany przez pęcherzyki sarkoplazmatycznego retikulum, a obserwowana aktywacja miofibrylarnej ATPazy jest istotnie wynikiem działania karnozyny. Tym tłumaczą autorzy poprzednie rezultaty, które doprowadziły do wniosku, że karnozyna jest antagonistą działania ziaren Marsh-Bendalla.

Nasze badania wykazały również silny aktywujący wpływ karnozyny na miofibrylarną ATPazę (80). Karnozyna w stężeniu 8mM powodowała 2,5-krotny wzrost aktywności ATPazy, oznaczanej w obecności jonów



$\text{Ca}^{2+}$  (5mM stężenie) przy 2mM stężeniu  $\text{Na}_2\text{ATP}$ . Natomiast przy stężeniu 4mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , które powodowało 22% hamowanie substratowe, karnozyna powodowała 4,5-krotny wzrost aktywności miofibrylarnej ATPazy. Ponieważ jony  $\text{Ca}^{2+}$  były obecne w takich samych stężeniach, zarówno w próbach z karnozyną jak i bez niej, nie wydaje się zatem, aby tak wyraźny efekt karnozyny był w jakiejś mierze maskowany przez wpływ  $\text{Ca}^{2+}$ .

Stwierdzono, że karnozyna nie wpływa na aktywność ATPazy miofibryli z mięśni bezkręgowców (homar, dżdżownica), podczas gdy dwukrotnie zwiększa aktywność miofibrylarnej ATPazy królika oraz kurczęcia (48). Istnieje zatem logiczny związek między występowaniem karnozyny w mięśniach zwierzęcia a jej wpływem na białka miofibryli.

Interesujące dane wnoszą badania Avena i Boven (4) nad wpływem karnozyny na ATPazę miozynową i aktomiozynową. Karnozyna (0,1 M) aktywowała silniej ATPazę miozynową aniżeli jony  $\text{K}^+$  (0,0175—0,206M). Według autorów nie jest to spowodowane wzrostem siły jonowej pod wpływem karnozyny, bowiem wnoszona przez nią siła jonowa byłaby nie większa niż 0,1. Autorzy sugerują, że w doświadczeniu Yuna i Parkera (83) 30-procentowa aktywacja miofibrylarnej ATPazy pod wpływem karnozyny (0,002M) mogła być wynikiem odwracania inhibicji substratowej, spowodowanej 5mM ATP. Avena i Boven badali aktywność miozynowej ATPazy przy trzech stężeniach ATP: 0,5, 2 i 5mM. Przy tym ostatnim stężeniu ATP uzyskano hamowanie substratowe, a karnozyna odwracała tę inhibicję bardzo znacznie.

Dodanie karnozyny (0,1M) zwiększało aktywność miozynowej ATPazy 6-krotnie w obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$ , co sugeruje, że karnozyna odwraca częściowo inhibicję spowodowaną przez te jony. Takie przypuszczenia potwierdzałyby także inne badania (78). Uzyskano bowiem prawie 45-krotny spadek aktywności miozynowej ATPazy pod wpływem 1,25mM stężenia  $\text{MgCl}_2$ . Karnozyna natomiast, dodana w ekwimolarnym stężeniu (stęż. ATP 1,25mM), podnosiła aktywność tej zahamowanej miozyny prawie pięciokrotnie. Przy dwukrotnie wyższym stężeniu  $\text{Mg}^{2+}$ , powodującym całkowite zahamowanie hydrolizy ATP, karnozyna utrzymywała aktywność ATPazy na poprzednim poziomie.

Avena i Boven (4) zaobserwowali ponadto przy 4mM ATP 8—10-krotną aktywację miozynowej ATPazy karnozyną w fazie początkowej (1 min.), niezależnie od tego czy substratem był 4mM ATP czy też 4mM  $\text{MgATP}$ . Również przy pozostałych stężeniach ATP (0,5 i 2mM) karnozyna zwiększała aktywność enzymu, co wskazywało na brak interakcji karnozyny i ATP. Zdaniem autorów, efekt karnozyny nie polega również na znoszeniu zahamowania spowodowanego przez ADP. Przy 4mM ATP, w wyniku działania ATPazy, mogło się uwolnić ADP w ilości 0,0025 początkowego stężenia ATP, a według Bluma dodatek ADP w stężeniu

10-krotnie większym niż początkowe stężenie ATP, hamuje ATPazę nieznacznie.

Badano także wpływ histydyny, imidazolu i  $\beta$ -alaniny na miozynową ATPazę. Jakkolwiek każdy z tych związków wpływał tak na wczesną jak i na późniejsze fazy hydrolizy ATP, jednak żaden z nich nie był tak efektywny jak karnozyna w tym samym stężeniu (0,1M). Podobne rezultaty uzyskano porównując wpływ anseryny, metylohistydyny, metyloimidazolu i  $\beta$ -alaniny. Wpływ karnozyny na aktomiozynę syntetyczną (miozyna : aktyna = 4 : 1), zaznaczył się jednak wyraźnie nie w fazie początkowej (tj. po 2 min.) lecz po 5 minutach, powodując wzrost hydrolizy ATP o 35%.

Badania na oczyszczonych preparatach aktomiozyny naturalnej (77, 78) wykazały, że wpływ karnozyny na aktywność aktomiozynowej ATPazy uzależniony jest od stężenia jonów  $Mg^{2+}$ , jak też i od stężeń stosowanej karnozyny (0,5—2,5mM). Karnozyna w niskich stężeniach (0,5—1,5mM) nieznacznie obniża aktywność ATPazy przy 1mM stężeniu  $MgCl_2$ . W zastosowanych warunkach przy ekwimolarnych stężeniach (1mM) karnozyny i jonów magnezu aktywność enzymu była najniższa — 15% niższa niż bez karnozyny. Wyższa od 1,5mM stężenia karnozyny aktywowały aktomiozynową ATPazę; przy ekwimolarnych stężeniach karnozyny i ATP (2,5mM) aktywność enzymu była o 24% wyższa niż bez karnozyny. Przy ekwimolarnych stężeniach ATP i jonów magnezu (2,5mM) wzrost stężenia karnozyny od 0,5—2,5mM pociągał za sobą stopniowy wzrost aktywności aktomiozynowej ATPazy — do 23% przy 2,5mM stężeniu tego dwupeptydu.

Stwierdzono następnie (78, że przy niskim stężeniu  $Mg^+$  i karnozyny jej hamujący wpływ był najsilniejszy we wczesnej fazie hydrolizy ATP przez aktomiozynową ATPazę. Obserwowano bowiem po 2 min. 25% hamowanie oraz słabsze (10—13%) w fazach późniejszych (4—15 min.).

Ostatnio zaobserwowano (80), że 8mM karnozyna aktywuje o 35% aktomiozynową ATPazę. Okazało się, przy tym, że karnozyna nie zmienia  $K_m$  lecz zwiększa  $V_{max}$ . Można by zatem przypuszczać, że karnozyna powoduje zmiany konformacyjne w cząsteczce miozyny, co pociągałoby za sobą zmiany w aktywności ATPazy miozynowej, jak i aktomiozynowej. Nie wykluczone, że efekt ten byłby wynikiem wiązania się karnozyny z pewnymi grupami -SH miozyny.

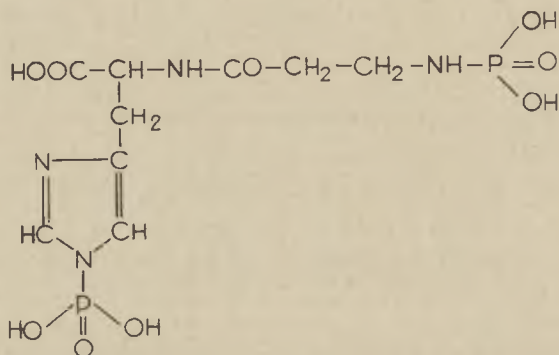
Na poparcie powyższego przypuszczenia można przytoczyć wnioski wypływające z badań Boczarńnikowej i Pietuszkowej (10) nad zapobiegającym połowicznej denaturacji cieplnej działaniem związków imidazolowych na miozynową ATPazę. Denaturacja ta wiązałaby się z utlenianiem labilnych grup -SH miozyny z utworzeniem wiązań dwusiarczkowych (37). Liczne zaś badania wskazują na istotną rolę grup -SH miozyny w jej enzymatycznej aktywności (31, 32, 33, 35, 70). Przypuszcza



się także (59), że wpływ karnozyny na procesy enzymatyczne w tkance mięśniowej wiąże się z jej działaniem na grupy -SH aktywnych centrów enzymów.

#### 4. Czy karnozyna uczestniczy w procesach transfosforylacji?

Istnieje prawdopodobieństwo, iż karnozyna może uczestniczyć w procesach transfosforylacji. Na możliwość występowania w tkance mięśniowej ufosforylowanej karnozyny zwrócili już uwagę Siewierin, Georgijewska ja i Iwanow (60). Otrzymana bowiem przez nich syntetycznie, przy użyciu  $\text{POCl}_3$ , dwufosfokarnozyna (I) ulegała z łatwością nie tylko kwaśnej hydrolizie (najbardziej w roztworze molibdenianu amonu), ale i hydrolizie enzymatycznej w wodnych ekstraktach tkanki mięśniowej.



Okazało się przy tym, iż reszta fosforanowa przy grupie aminowej  $\beta$ -alaniny jest bardziej labilna, aniżeli reszta związana z pierścieniem imidazolowym histydyny. Następnie na możliwość istnienia w mięśniach fosfokarnozyny jako donatora reszty fosforanowej wskazywał Goodall (19). Jednakże Cain i wsp. (14) nie mogli wykazać fosforylacji karnozyny w mięśniu. Davey (16) przypuszcza, że mogło to być spowodowane użyciem nieodpowiedniego obiektu mięśniowego (*m. retractor penis* żółwia). Mięsień ten z uwagi na małą aktywność nie zawiera zapewne większych ilości karnozyny. Daveyowi nie udało się również wykazać obecności fosfokarnozyny w mięśniach królika. Autor uważa, że wynik ten można przypisać ewentualnemu rozpadowi fosforanu karnozyny podczas sporządzania ekstraktu mięśniowego przy użyciu kwasu nadchlorowego. Dotychczasowe zatem niepowodzenia w próbach znalezienia fosfokarnozyny w mięśniach nie wykluczają jednak możliwości fosforylacji karnozyny w procesie skurczu mięśniowego. Należy bowiem uwzględnić fakt, że tworzenie wysokoenergetycznego fosforanu miozyny podczas hydrolizy ATP można uważać za udowodnione (21, 36, 74, 75). Powstawanie fosfomiozyny T o -



nomura i wsp. (74, 75) uważają za kluczową reakcję w skurczu aktomiozynowego systemu pod wpływem ATP.

Biorąc zatem pod uwagę, że z łatwością można uzyskać syntetycznie fosforany karnozyny, podobnie jak fosforan kreatyny, transfosforylację z fosfomiozyny na karnozynę można uważać za możliwą. Z tym przypuszczeniem wiązałyby się wyniki badań Mieszkowej i wsp. nad wpływem syntetycznych fosforanów imidazolu i karnozyny na aktywność miozynowej ATPazy. Wykazano początkowo (44), że fosforany te obniżają aktywność miozynowej ATPazy. Stwierdzono następnie (43), że tylko monofosfoimidazol jest kompetytywnym inhibitorem, podczas gdy dwufosfoimidazol wpływa w nieznacznym stopniu na ATPazę, co jak przypuszczano mogło być wynikiem zawartości monofosfoimidazolu w preparacie. Ostatnio stwierdzono (25), że monofosfoimidazol przejawia hamujące działanie jedynie w obecności jonów  $Ca^{2+}$ . Zaobserwowano 33—45% hamowanie, przy czym stopień hamowania zależał od aktywności względnej preparatu miozyny. Prócz monofosfoimidazolu, aktywność miozynowej ATPazy obniżała tylko monofosfokarnozyna. Trójfosfokarnozyna jak i trójfosfoimidazol nie obniżały aktywności enzymu. Hamowanie przez te związki miało kompetytywny charakter.

Z dokonanego przeglądu piśmiennictwa wynika, że dotychczasowe badania rzuciły już pewne światło na rolę karnozyny i anseryny, jednak nie jest ona w pełni wyjaśniona.

#### LITERATURA

1. Abraham D., Pisano J. J., Udenfriend S., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 570 (1961).
2. Aleksachina N. W., *Biochimija* **18**, 513 (1953).
3. Aonuma S., Hama T., Tamaki N., *J. Biochem. (Tokyo)* **68**, 581 (1970).
4. Avena R. M., Boven W. J., *J. Biol. Chem.* **244**, 1600 (1969).
5. Bate Smith E. C., *J. Physiol.* **92**, 336 (1938).
6. Biekisz O. J. L., *Mied. Parazitol. Parazitar. Bolezni.* **40**, 423 (1971).
7. Boczarnikowa I. M., *Fizjol. Ż. SSSR* **45**, 1021 (1959).
8. Boczarnikowa I. M., Pietuszkowa E. W., *Ż. Ewoluc. Biochim. Fiziol.* **1**, 385 (1965).
9. Boczarnikowa I. M., Pietuszkowa E. W., *Biochimija* **32**, 17 (1967).
10. Boczarnikowa I. M., Pietuszkowa E. W., *Biochimija* **32**, 119 (1967).
11. Bołdyrew A. A., Lebiediew A. W., *Biochimija* **32**, 600 (1967).
12. Bowen W. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 427 (1965).
13. Briggs F. N., Kaldor G., Gergely J., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 211 (1959).
14. Cain D. F., Delluva A. M., Davies R. E., *Nature* **182**, 720 (1958).
15. Clifford W. M., Mottram V. H., *Biochem. J.* **22**, 1246 (1928).
16. Davey C. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 296 (1960).
17. Dobrynina O. W., *Biochimija* **32**, 612 (1967).

18. Gergely J., Kaldor G., Briggs F. N., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 218 (1959).
19. Goodall M. C., *Nature* **178**, 539 (1956).
20. Greczko W. W., *Biochimija* **22**, 736 (1957).
21. Gruda J., Kąkol I., Niemierko W., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 215 (1962).
22. Gulewicz W., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **73**, 434 (1911).
23. Gulewicz W., Amiradżibi S., *Ber. Deut. Chem. Ges.* **33**, 1902 (1900).
24. Hanson H. T., Smith E. L., *Federation Proc.* **8**, 204 (1949).
25. Jaszkowa Ł. B., Mieszkowa N. P., *Biochimija* **36**, 49 (1971).
26. Judajew N. A., Smirnow M. I., Razina P. G., Dobbier N. N., *Biochimija* **18**, 732 (1953).
27. Kaldor G., Gergely J., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 393 (1959).
28. Kalyankar G. D., Meister A., *J. Biol. Chem.* **234**, 3210 (1959).
29. Kaplansky S., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **140**, 69 (1924).
30. Kazuyoshi H., Musashi A., *J. Biochem. (Tokyo)* **53**, 271 (1963).
31. Kąkol I., V Krajowe Sympozjum Biochemiczne, Kraków 1967, B. **34**, str. 31.
32. Kąkol I., Gruda S., Bitny-Szlachto S., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 411 (1964).
33. Kielley W. W., Brandley L. B., *Biol. Chem.* **218**, 653 (1956).
34. Kitagawa S., Yoshimura J., Tonomura Y., *J. Biol. Chem.* **236**, 902 (1961).
35. Kominz D. R., *Science* **149**, 1374 (1965).
36. Levy H. M., Koshland Jr. D. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1102 (1959).
37. Levy H. M., Ryan E. M., *Science* **156**, 73 (1967).
38. Martignoni P., Winnick T., *J. Biol. Chem.* **208**, 251 (1954).
39. Mc Manus I. R., *J. Biol. Chem.* **235**, 1398 (1960).
40. Mieszkowa N. P., *Biochimija* **5**, 151 (1940).
41. Mieszkowa N. P., *Biochimija* **24**, 323 (1959).
42. Mieszkowa N. P., *Usp. Biol. Chimii* **6**, 86 (1964).
43. Mieszkowa N. P., Akijewa Ł. B., *Biochimija* **33**, 895 (1968).
44. Mieszkowa N. P., Cwietkowska N. N., *Biochimija* **32**, 595 (1967).
45. Mieszkowa N. P., Kariawkina O. E., *Biochimija* **30**, 88 (1965).
46. Nagrodowa N. K., *Biochimija* **21**, 17 (1956).
47. Nagrodowa N. K., *Biochimija* **23**, 511 (1958).
48. Parker C. J. Jr. Ring E., *Comp. Biochem. Physiol.* **37**, 413 (1970).
49. Parker C. J. Jr., Yun J., *Federation Proc.* **22**, 351 (1963).
50. Parszin A. N., *Biochimija* **4**, 555 (1939).
51. Parszin A. N., Goriuchina T. A., Szerstniew E. A. Wdowiczhenko Ł. M., *Dokl. AN SSSR* **141**, 233 (1961).
52. Pielewin A. D., *Naczn. Dokl. Wyższ. Szkoły Biol. N.*, nr **12**, 27 (1970).
53. Razina Ł. G., *Dokl. A. N. SSSR* **111**, 161 (1956).
54. Reddy W. J., Hegsted D. M., *J. Biol. Chem.* **237**, 705 (1962).
55. Schenk J. R., *J. Biol. Chem.* **149**, 111 (1943).
56. Sekine T., Kielley W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 336 (1964).
57. Siewierin S. E., II Congress International de Biochimie, Paris 1952, str. 426.
58. Siewierin S. E., Proc. 6-th Intern. Congr. Biochem., Plenary Sessions, str. 45, 1964.
59. Siewierin S. E., Boczarnikowa I. M., Wulfson P. Ł., Grigorowicz U. A., Sołowjewa G. A., *Biochimija* **28**, 510 (1963).
60. Siewierin S. E., Georgijewskaja E. F., Iwanow W. I., *Biochimija* **12**, 35 (1947).

61. Siewierin S. E., Iwanow W. I., Karuzina N. P., Judiełowicz R. A., *Biochimija* **13**, 158 (1948).
62. Siewierin S. E., Judajew N. A., *Biochimija* **16**, 286 (1951).
63. Siewierin S. E., Mieszkowa N. P., *Dokł. A. N. SSSR* **74**, 549 (1950).
64. Siewierin S. E., Mieszkowa N. P., *Dokł. A. N. SSSR* **84**, 105 (1952).
65. Siewierin S. E., Mieszkowa N. P., *Dokł. A. N. SSSR* **92**, 807 (1953).
66. Siewierin S. E., Mieszkowa N. P., *Dokł. A. N. SSSR* **103**, 871 (1955).
67. Siewierin S. E., Szestakow S. W., *Dokł. A. N. SSSR* **140**, 1452 (1961).
68. Siewierin S. E., Szestakow S. W., Worobjew O. E., *Dokł. A. N. SSSR* **138**, 462 (1961).
69. Skworcowa R. I., *Biochimija* **18**, 594 (1953).
70. Stracher A., *J. Biol. Chem.* **239**, 1118 (1964).
71. Suyama M., Suzuki T., Maruyama M., Saito K., *Bull. Jap. Soc. Fisher* **36**, 1048 (1970).
72. Szerstniew E. A., *Dokł. A. N. SSSR* **119**, 753 (1958).
73. Tielepniewa W. I., *Biul. Eksp. Biol. Med.* **7**, 60 (1963).
74. Tokiwa T., Tonomura Y., *J. Biochem. (Tokyo)* **57**, 616 (1965).
75. Tonomura Y., Kitagawa S., Youhimura J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3660 (1962).
76. Winnick R. E., Winnick T., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 47 (1959).
77. Wołos A., VI Zjazd P. T. Bioch., Olsztyn 1968, str. 61.
78. Wołos A., *Zesz. Nauk. WSR Olsztyn* **26**, 77 (1970).
79. Wołos A., X Zjazd P. T. Bioch., Poznań 1972, str. 113.
80. Wołos A., Bauknecht M., X Zjazd P. T. Bioch., Poznań 1972, str. 112.
81. Wulfson P. Ł., *Biochimija* **26**, 300 (1961).
82. Wulfson P. Ł., *Usp. Biol. Chim.* **4**, 81 (1962).
83. Yun J., Parker C. J. Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 212 (1965).
84. Zoch E., Müller H., *Enzymologia* **40**, 199 (1971).





## Tokoferole a wykorzystanie karotenu i witaminy A

### Tocopherols in Relation to the Utilization of Carotene and Vitamin A

Some recent data concerning interrelationships between carotene, vitamin A and E in the human or animal body are discussed.

Współzależność między poszczególnymi składnikami pokarmowymi w organizmie człowieka i zwierząt ma wielkie znaczenie zarówno z teoretycznego jak i praktycznego punktu widzenia. Określenie w praktyce wartości odżywczej pożywienia jest niezwykle trudne, ponieważ szereg czynników, takich jak dostępność tych składników z pożywienia, obecność w nim antywitamin i prowitamin, wpływają na wykorzystanie witamin przez organizm. W związku z tym w niniejszym artykule zajęto się zagadnieniem współdziałania między tokoferolami a karotenem i witaminą A, jako jednym z czynników określających wykorzystanie tej witaminy i jej prowitaminy w organizmie.

Pierwszym, który jeszcze przed 1940 rokiem zaobserwował wpływ witaminy E na wykorzystanie karotenu i witaminy A, był Moore (28). Stwierdził on 2—10-krotnie niższe zapasy witaminy A w wątrobie zwierząt pozbawionych w pożywieniu witaminy E w porównaniu do grup otrzymujących tę witaminę. Wpływ ten był znacznie mniejszy w przypadku podawania zwierzętom karotenu.

Następnie Sherman (32) już w 1941 roku postulował ochraniające działanie tokoferoli w stosunku do karotenu w procesie rozkładu tego związku w obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jednak Johnson i Baumann (wg 33) wykazali, że podawanie zwierzętom z objawami niedoboru witaminy A, karotenu i tokoferolu powodowało spadek ilości witaminy A zmagazynowanej w wątrobie tych zwierząt.

W toku dalszych badań Guggenheim i inni (15) oraz Rao (31) ustalili, że wykorzystanie karotenu z roślin zależy od zawartości w nich tokoferoli, przy czym zwiększająca się zawartość tokoferoli powodowała wzrost wydalania karotenu z kałem a tym samym obniżenie stopnia wykorzystania tej prowitaminy.

---

\* Dr inż., Katedra Technologii i Higieny Żywności Człowieka, Akademia Rolnicza, Warszawa

Natomiast Kemmerer i wsp. (21) karmiąc szczury szpinakiem z dodatkiem  $\alpha$ -tokoferolu nie stwierdzili zależności między stopniem wykorzystania  $\beta$ -karotenu mierzonego ilością witaminy A odłożonej w wątrobie, a obecnością witaminy E w diecie. Na tej podstawie autorzy ci sugerowali, że wzajemne powiązanie między obu witaminami uzależnione jest dodatkowo od innych składników diety.

Inni badacze (3, 17) zwrócili uwagę na fakt, że zależnie od użytej dawki tokoferolu zmieniało się wykorzystanie karotenu i witaminy A przez organizm. Badania te nasunęły przypuszczenie, że współzależność między tymi dwiema witaminami sprowadza się do oddziaływania na proces wchłaniania karotenu, chociaż High i inni (19) wykazali, że stwierdzenie to jest słuszne tylko w przypadku małych dawek tokoferolu.

Jednocześnie McGillivray i Worker (25) podając szczurom karoten i tokoferol drogą pozajelitową zaobserwowali zahamowanie procesu konwersji karotenu do witaminy A. W późniejszych badaniach autorzy ci (26) wykazali ponadto, że również wzrastający poziom  $\alpha$ -tokoferolu we krwi i tkankach upośledzał wyżej wymieniony proces. Na tej podstawie wysunęli hipotezę, że karoten we krwi ulega prawdopodobnie gwałtownemu rozszczepieniu a powstałe produkty tej reakcji znacznie wolniej konwertują do witaminy A.

Jednak Wendel (37) oraz Tiews i inni (34) nie potwierdzili tej hipotezy, wykazując w doświadczeniu na kurach, że dodatek octanu  $\alpha$ -tokoferolu do diety nie wpływał na proces konwersji beta karotenu.

Istnieje również szereg prac, których autorzy badali wykorzystanie samej witaminy A zależnie od witaminy E.

Davis i Moore (7) w doświadczeniu na szczurach pozbawionych witaminy A i E w diecie, a posiadającym 20 000 j. m. witaminy A w wątrobie wykazali, że okres 7 tygodni wystarczał do zredukowania zapasów witaminy A w tym narządzie do wartości zerowej, podczas gdy u zwierząt otrzymujących witaminę E poziom ten wynosił jeszcze 5000 j. m.

Podobne zależności stwierdzili Dam i inni (6), w badaniach na kurczętach oraz na szczurach. Autorzy ci wywnioskowali, że witamina E działa jako przeciwutleniacz w stosunku do witaminy A, a ponadto przeciwdziała ona rozszerzaniu się peroksydacji w całym organizmie zwierzęcym.

Fakt zwiększonego odkładania się witaminy A w wątrobie w obecności witaminy E oraz podwyższonego poziomu karotenu w surowicy krwi (5, 14, 18, 29) doprowadziły do powstania poglądu, że działanie przeciwutleniające witaminy E występuje przed procesem absorpcji witaminy A w jelicie podczas gdy inni badacze (12) sugerują, że po tym procesie.

Istnieją również prace (11, 24) wskazujące, że powiązanie między witaminą A i E *in vivo* nie jest związane z rolą witaminy E jako przeciwutleniacza, natomiast magazynowanie witaminy A w tkankach uzależnione jest od warunków doświadczenia.



Herbert i Morgan (17) podając szczurom różne dawki witaminy A oraz stałą dawkę  $\alpha$ -tokoferolu przez okres 2 i 4 tygodni nie stwierdzili wpływu tej dawki tokoferolu na magazynowanie witaminy A w wątrobie. Wyraźny wzrost w ilości odłożonej witaminy A w stosunku do grupy kontrolnej wystąpił przy podawaniu zwierzętom w tych samych warunkach doświadczalnych różnych dawek karotenu.

Diplock i inni (10), Edwin i wsp. (11) badając różne tkanki szczurów karmionych dietami o zróżnicowanym poziomie witaminy A i E wykazali spadek poziomu tokoferolu przy wzrastających dawkach witaminy A. Jednocześnie Pudelkie wicz i wsp. (30) oraz Brubacher i inni (4) stwierdzili, że duże dawki witaminy A w diecie hamują działanie witaminy E zwiększając tym samym zapotrzebowanie na witaminę A. Jednak Weber i Wiss (36) oraz Dicks i inni (8) przypuszczają, że skutki wzajemnego powiązania metabolicznego tych witamin mogą wystąpić tylko w przypadku nadmiernych lub niedoborowych ich dawek. Przy normalnych ilościach obu witamin w diecie powiązanie to zdaje się nie odgrywać większej roli.

Green i inni (13) podają, że specyficzna rola witaminy E odnośnie zachowania zapasów witaminy A w wątrobie uzależniona jest od początkowej zawartości witaminy A w tym narządzie. Przy niskiej początkowej zawartości witaminy A trudno było wykazać dodatni wpływ tokoferolu. Jeśli natomiast początkowe magazynowanie witaminy A było wysokie, wówczas dodatek witaminy E do diety wyraźnie zmniejszał zapasy witaminy A w wątrobie. Ten związek między witaminą E a magazynowaniem witaminy A w wątrobie został potwierdzony badaniami Vogtmana i innych (35), którzy w doświadczeniu na kurach stwierdzili, że wraz ze wzrostem zawartości palmitynianu retinolu i octanu  $\alpha$ -tokoferolu, w diecie, wzrastał ich poziom w wątrobie. Zwiększenie dodatku witaminy E powodowało równocześnie procentowy wzrost zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w całości lipidów wątroby.

Istnieją również prace sugerujące powiązanie obu witamin zależnie od poziomu tłuszczu.

Horwitt i inni (20) wykazali, że wysoki poziom tłuszczu w surowicy krwi zwiększał znacznie poziom tokoferolu i witaminy A w surowicy, przy czym w przypadku witaminy A wzrost ten nie był proporcjonalny do wzrostu lipidów surowicy, co obserwowano w przypadku tokoferolu.

Stwierdzono również (16), że podanie dużych dawek witaminy A (1 200 j. m. dziennie) szczurom zubożonym w witaminę E zwiększało znacznie poziom cholesterolu we krwi w stosunku do zwierząt otrzymujących fizjologiczne dawki tokoferolu.

Współdziałanie między obu witaminami wyraża się również ich wpływem na zmiany w obrazie erytrocytów krwi i zawartość w nich fosforanów.

Anderson i inni (1) badając pod mikroskopem elektronowym erytrocyty szczurów zubożonych w witaminę A zaobserwowali, że brak retinolu, zarówno przy fizjologicznym jak i wysokim poziomie tokoferolu w diecie, powodował zniekształcenie erytrocytów, przy czym było ono większe przy wysokim poziomie witaminy E. Podanie witaminy A cofało te zmiany.

Krukowa i inni (22) przez długotrwałe podawanie świnkom morskim dużych dawek witaminy A (150 000 j. m. dziennie) doprowadzili do oznak awitaminozy E, jak niedokrwistość, podwyższona skłonność do hemolizy erytrocytów oraz zmiany dystroficzne w mięśniach. Jednak obserwacje te nie znalazły potwierdzenia w badaniach na ludziach (23).

Melnik (27) badając wpływ witaminy A i E na zawartość ATP i ADP w erytrocytach szczurów stwierdził, że niedobór tych witamin w diecie powodował spadek zawartości fosforanów w erytrocytach o 50% w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą fizjologiczne dawki witamin.

Istnieje też praca (9), której autorzy sugerują możliwość wzajemnego powiązania obu witamin w zakresie oddziaływania na system błon komórkowych. Przypuszczają oni, że witamina E jest jednym z czynników równoważących zmienny wpływ dużych dawek witaminy A na błony komórkowe.

Ostatnio Berger (2) w artykule przeglądowym zwrócił uwagę na możliwość powiązania między tymi witaminami z punktu widzenia zalecanych norm zapotrzebowania na nie. Stwierdzono bowiem, że witamina A absorbuje się szybciej z przewodu pokarmowego człowieka niż witamina E, co może rzucać nowe światło na zalecane zapotrzebowanie na omawiane składniki.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa, wykorzystanie obu witamin przez organizm uwarunkowane jest wieloma czynnikami, a uzyskane wyniki niejednokrotnie kontrowersyjne związane być mogą z brakiem ujednoczonej metodyki prowadzenia doświadczeń w tym zakresie. Skutkiem tego trudno oczekiwać zbieżnych wyników z tych doświadczeń, w których podawano tokoferol w celu zapobieżenia niedoborowi tej witaminy z doświadczeniami, w których tokoferol podawano w nadmiarze, pomimo jego wystarczającej ilości w diecie.

Należy ponadto podkreślić, że zebrane dane w przeważającej części dotyczą fizjologicznych aspektów zagadnienia, niewiele natomiast wiadomo na temat powiązania obu omawianych witamin na poziomie molekularnym. Niemniej jednak ogłoszone dotychczas prace mogą stanowić źródło ważnych informacji rzucających wiele światła na temat współzależności między tymi witaminami. Wnosząc z powyższego zainteresowania omawianym zagadnieniem należy oczekiwać, że najbliższe lata przyniosą dalsze dane doświadczalne w tym zakresie.

## LITERATURA

1. Anderson O. R., Roels O. A., Pfister R. M., *Nature* **213**, 47 (1967).
2. Berger S., *Nutr. Dieta* **15**, 85 (1970).
3. Bieri J. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **88**, 482 (1955).
4. Brubacher G., Scharer K., Studer A., Wiss O., *Z. Ernährungsch* **5**, 190 (1965).
5. Cawthorne M. A., Bunyan J., Diplock A. T., Murell E. A., Green J. *Br. J. Nutr.* **22**, 133 (1968).
6. Dam H., Prange I., Søndergaard E., *Acta Pharmacol.* **8**, 1 i 23 (1952).
7. Davis A. W., Moore T., *Nature* **147**, 794 (1941).
8. Dicks M. W., Rousseau J. E., Eaton H. D., Teichman R., Grifo A. P., Kemmerer H. A., *J. Dairy Sci.* **92**, 501 (1959).
9. Dingle J. T., Lucy J. A., *Biol. Rev.* **40**, 422 (1965).
10. Diplock A. T., Edwin E. E., Bunyan J., Green J., *Br. J. Nutr.* **15**, 425 (1961).
11. Edwin E. E., Bunyan J., Green J., Diplock A. T., *Br. J. Nutr.* **16**, 135 (1962).
12. Green J., *Vitam. Horm.* **20**, 485 (1962).
13. Green J., Murthy I. R., Diplock A. T., Bunyan J., Cawthorne M. A., Murell E. A., *Br. J. Nutr.* **21**, 845 (1967).
14. Gronowska-Senger A., Zając M., Bartnik J., *Roczn. Państw. Zakł. Hig.* **2**, 217 (1972).
15. Guggenheim K., *Biochem. J.* **38**, 260 (1944).
16. Harrill J., Minarik G., Gifford E. D., *J. Nutr.* **87**, 424 (1965).
17. Herbert J. W., Morgan A. F., *J. Nutr.* **50**, 175 (1953).
18. Hickman K. C., Kaley M. W., Harris P. L., *J. Biol. Chem.* **152**, 303 (1944).
19. High E. G., Smith H. C., Taylor H. H., Wilson S. S., *J. Biol. Chem.* **210**, 681 (1954).
20. Horwitt M. K., Marvey C. C., Searcey M. T., *Fed. Proc.* **30**, 640 (1971).
21. Kemmerer A. R., Fraps G. S., De Motter J., *Arch. Biochem. Biophys.* **12**, 135 (1947).
22. Kriukowa L. W., Ulasiewicz I. L., Miedwiedskaja W. S., *Biull. Eksp. Biol. Med.* **8**, 59 (1969).
23. Kurokawa I., Kimura T., Veno Y., Nagahama K., Kobayashi T., Suzuki I., Kishi Y., Nagai T., Kaminura M., *Vitamins* **39**, 11 (1969).
24. Lemley J. M., Brown R. A., Bird O. D., Emmett A. D., *J. Nutr.* **34**, 205 (1947).
25. McGillivray W. A., Worker N. A., *Br. J. Nutr.* **11**, 47 (1957).
26. McGillivray W. A., Workwr N. A., *N. Z. Agric. Res.* **1**, 273 (1958).
27. Melnik W. P., *Vopr. Pitan.* **30**, 31 (1971).
28. Moore T., *Biochem. J.* **34**, 1321 (1940).
29. Moore T., Sharman J. M., Ward R. I., *Br. J. Nutr.* **13**, 100 (1959).
30. Pudelkiewicz W. J., Webster L., Materson L. D., *J. Nutr.* **84**, 113 (1964).



31. Rao S. D., *Nature* 156, 449 (1945).
32. Sherman W. C., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47, 199 (1941).
33. Thompson S. Y., *Exp. Eye Res.* 3, 392 (1964).
34. Tiews J., Zucker H., Wendel E., *Int. Z. Vitaminforsch.* 39, 141 (1969).
35. Vogtman H., Prabucki A. I., *Int. Z. Vitaminforsch.* 39, 157 (1969).
36. Weber F., Wiss O., *Nutr. Dieta* 8, 54 (1966).
37. Wendel E., *Nutr. Abstr. Rev.* 40, 817 (1970).

## SPRAWOZDANIA

### Symposium na temat Organellogenezy

Brno 25—29. IX. 1972

XV Kongres Morfologiczny (Congressus Morphologicus cum Participatione Internationali) został zorganizowany przez Towarzystwo Lekarskie i Towarzystwo Anatomów Czechosłowackich w Brnie. W ramach Kongresu odbyło się sympozjum na temat powstawania i rozwoju różnych organelli komórkowych. Sympozjum to zostało zwołane pod auspicjami Uniwersytetu w Brnie, a jego organizatorem był prof. dr M. Dvořák, kierownik katedry histologii i embriologii. Prof. dr M. Dvořák był też przewodniczącym tego sympozjum (Symposium on the Genesis of Cell Organelles). Współprzewodniczącymi sympozjum byli: prof. Y. I. Afanasjew (Moskwa), prof. J. André (Paryż), prof. P. Drochmans (Bruksela) oraz prof. K. Smetana (Praga).

W ramach sympozjum zaprezentowano zarówno referaty przeglądowe, jak też doniesienia doświadczalne. Do najciekawszych referatów wygłoszonych na Sympozjum należał wykład profesora J. André zatytułowany „Biogenesis of Mitochondria — General Considerations”. W swoim wystąpieniu profesor André przedstawił najnowsze wyniki badań własnych i innych autorów na temat powstawania i rozwoju mitochondriów. Przewodnim motywem referatu profesora André było stwierdzenie, że w wyniku dotychczasowych badań nad genezą mitochondriów u różnych organizmów, dawna koncepcja powstawania mitochondriów *de novo*, musi być odrzucona. Referent poruszył trzy podstawowe zagadnienia, na których skupia się uwaga biochemików zajmujących się mitochondriogenezą. Zagadnieniami tymi są: miejsce syntezy makrocząsteczek biorących udział w procesie formowania mitochondriów, mechanizmy doprowadzające do wbudowania podstawowych składników organelli (tzn. białek i fosfolipidów) w architekturę mitochondriów oraz sposoby regulacji procesów mitochondriogenezy w komórce.

Specjalną uwagę André zwrócił na syntezę białek mitochondrialnych. Różnicowe działanie cykloheksimidu i chloramfenikolu na procesy biosyntezy białek wewnątrz organelli i poza nią przy udziale rybosomów cytoplazmatycznych, okazało się niezwykle cennym narzędziem badawczym. Dzięki wykorzystaniu różnicowego działania obu substancji można już dzisiaj stwierdzić z całą pewnością, że jedynie niewielka część puli białek mitochondrialnych jest syntetyzowana *in situ*, przy udziale rybosomów mitochondrialnych.

W związku z poruszonym problemem syntezy białek wewnątrz mitochondriów, André zakomunikował o obserwacji dokonanej niedawno w jego pracowni — obserwował on, że w mitochondriach drożdży *Candida utilis* występują struktury polisomalne. Jest to pierwsze doniesienie na ten temat (wyniki będą publikowane w *J. Cell Biol.*).

André rozważał możliwości współdziałania systemu cytoplazmatycznego i mitochondrialnego w biosyntezie białek, jak również współudziału jądra komórkowego

w syntezie mRNA dla mitochondriów. W związku z tym ostatnim zagadnieniem referent przedstawił badania własne nad syntezą RNA (różnych klas) w mitochondriach u pozbawionej jądra ameby. Stwierdził on, że pod nieobecność jądra w komórce — utrzymującej się przy życiu przez pewien czas — inkorporacja prekursorów do RNA mitochondrialnego znacznie wzrasta, w porównaniu do intensywności włączania obserwowanej dla mitochondriów w komórce posiadającej jądro. Autor sugerował, że wynik taki przemawia za hipotezą „hamującego” syntezę RNA w mitochondriach wpływu jądra komórkowego. Tym samym, wyniki André raz jeszcze potwierdziły, że tzw. połowiczna samowystarczalność metaboliczna mitochondriów determinowana jest przez metabolity jądra komórkowego.

Profesor Afanasjew w swoim referacie poruszył kwestię powstawania *de novo* mitochondriów zwierzęcych. Autor referatu (wspólnie z V. L. Goriaczkiną) obserwował niedojrzałe funkcjonalnie formy mitochondriów, tzw. promitochondria, w różnych tkankach zwierzęcych. Struktury promitochondrialne o średnicy około 0,1 $\mu$  wykazujące obecność dehydrogenazy bursztynianowej, były stwierdzane przede wszystkim u nowonarodzonych zwierząt. W komórkach zwierząt starszych liczba promitochondriów znacznie spada, niemniej jednak są one zawsze widoczne. Autor nie wykluczył możliwości, że promitochondria mogą powstawać *de novo*. W związku z tym ostatnim stwierdzeniem wywiązała się dyskusja, w której zabrał głos prof. André, krytycznie nastawiony do hipotezy o powstawaniu mitochondriów z elementów pozastrukuralnych komórki.

Problemy związane z mechanizmem współdziałania genów cytoplazmatycznych i jądrowych omawiał w swym doniesieniu Kovač z Bratysławy. Omawiał on wpływ inhibicji fosforylacji oksydacyjnej na intensywność podziałów organelli. Autor podkreślił znaczenie obecności ATP w mitochondriach dla procesu replikacji DNA mitochondrialnego.

Profesor M. Dvořák wygłosił interesujący referat zatytułowany „Origin and Development of Lysosomes and Peroxisomes”. Autor podkreślił, że nie ma dzisiaj dowodów na powstawanie *de novo* tzw. pierwotnych lysosomów. Wtórne lysosomy z kolei powstają przez fuzję struktur pierwotnych. Wyraził on przypuszczenie, że lysosomy mogą wywodzić się ze struktur wchodzących w skład zespołów Golgiego. Podkreślił jednocześnie, iż enzymy wykrywane w lysosomach wykrywane są pierwotnie w cytoplazmie, skąd wnikają do omawianej organelli.

Powstawanie peroksysomów jest mniej poznane. Zdaniem Dvořáka peroksysomy mogą powstawać z innych struktur komórkowych, np. z endoplazmatycznego retikulum; autoreprodukcja peroksysomów — jeśli zachodzi — musi być procesem odmiennym niż podział mitochondriów. Wynika to z nieobecności kwasów nukleinowych w peroksysomach. Dvořák podkreślił, że wyniki badań w jego laboratorium wskazują na powiązanie peroksysomów z aparatem Golgiego.

Profesor P. Drochmans z Uniwersytetu w Brukseli wygłosił przeglądowy referat zatytułowany „Endoplasmic Reticulum — Morphology, Function and Origin”. Omówił on historię badań nad błonami endoplazmatycznego retikulum ilustrując swój piękny wykład licznymi elektronogramami. Przytoczył też doświadczenia nad stymulacją wzrostu błon endoplazmatycznego retikulum pod wpływem barbituranów, a także fruktozy. Autor zwrócił uwagę, iż błony endoplazmatycznego retikulum otaczające mitochondrium odbiegają pewnymi właściwościami od błon retikulum leżących w cytoplazmie, ale nie w bezpośrednim sąsiedztwie organelli.

Interesujące doniesienie zostało wygłoszone przez dr M. Havelkową (Brno). Tematem tego doniesienia była rola aparatu Golgiego w formowaniu i wzroście błony komórkowej u protoplastów drożdży. Autorka zaobserwowała korelację między liczbą struktur Golgiego i aktywnością wzrostu regenerującej się ściany — po jej uformowaniu liczba struktur Golgiego w komórce wyraźnie zmniejsza się.



Autorka doniesienia zwróciła również uwagę na możliwość udziału błon reticulum endoplazmatycznego w regeneracji błon plazmatycznych protoplastu.

Profesor K. Smetana (Laboratorium Badań nad Ultrastrukturą Komórek i Tkank, Praga) wygłosił referat zatytułowany „The Formation and Morphological Organization of Nuclear Ribonucleoprotein Structures”. Omówił on substrukturę jąderka i wyszczególnił różne typy cząstek rybonukleoproteidowych występujących w poszczególnych układach strukturalnych jądra komórkowego. Autor zwrócił uwagę na możliwość udziału cząstek nukleoproteidowych (intrachromatynowych i perichromatynowych) w syntezie pozająderekowego RNA. Wykład ilustrowany był licznymi przezręczami.

Na uwagę zasługiwał też wykład prof. Z. Vacka (wydział Embriologii Uniwersytetu Karola w Pradze) na temat ciliogenezy. Omówiono rolę centrioli w procesie morfogenezy rzęsek, jak również przedstawiono ontogenezę centrioli — od stadium pro-centrioli aż do ciała bazalnego rzęsek.

Ten krótki przegląd tematyki Sympozjum Organellogenezy w Brnie obrazuje nam znaczny postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w badaniach nad powstawaniem i rozwojem poszczególnych struktur komórkowych.

*T. Gołaszewski*



## KOMUNIKATY

### Nagrody przyznane w 1972 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z prawdziwą przyjemnością zawiadamia czytelników o przyznaniu dorocznych nagród Towarzystwa:

#### Nagroda imienia Bolesława Skarżyńskiego

została przyznana dr Barbarze Czartoryskiej za artykuł p.t. „Metabolizm glikolipidów” opublikowany w *Postęпах Biochemii*, 17, (1971).

#### Nagroda imienia Jakuba Parnasa

została przyznana dr T. Wiluszowi za pracę p.t. „Preparation, crystallization and properties of a trypsin inhibitor from bovine thyroid gland” opublikowaną w *Arch. Immunol. Ther. Experim.* 19, (1971).

W konkursie dla młodych biochemików za prace przedstawione na X Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Poznaniu w 1972 roku przyznane zostały na wniosek Komisji następujące nagrody i wyróżnienia:

- Nagroda I — Hanausek M. — Otrzymywanie i charakterystyka hybrydów DNA-rRNA z wątroby szczura;
- Nagroda II — Filipowicz W., Wodnar A. — Własności fizykochemiczne i aktywność biologiczna bakteriofagowego RNA zmienionego działaniem O-metylohydroksylu;
- Nagroda III — Gaworowska-Michalik J., Świtalski L. — Oksydaza o-dwufenolowa *Streptomyces lincolnensis*;
- Nagroda III — Zubrzycka E., Sarzała M. C. — Rozdział białek sarkoplazmatycznego retikulum metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym.

#### Wyróżnienia:

Torliński L. — Aktywność heksokinazy i aldolazy krwinek czerwonych w różnych okresach rozwoju przeszczepialnego wątrobiaka Morrisa; Klein A. — Charakterystyka grupy peptydów osocza krwi bydłowej; Wieraszko A., Oderfeld-Nowak B., Dąbrowska J. — Aktywność O-acetylotransferazy acetyloCoA: cholina w układzie limbicznym szczura; Warwas M. — Proteazy i ich inhibitor z łożyska ludzkiego.



Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zawiadamia, że na IV krajowym Sympozjum Fotobiologicznym w Krakowie w dniach 20—22 października 1972 wybrano Zarząd Sekcji Polskich Fotobiologów naszego Towarzystwa:

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Prof. dr Jan Zurzycki              | — przewodniczący<br>Instytut Biologii Molekularnej<br>Uniwersytetu Jagiellońskiego,<br>Kraków, ul. Grodzka 53                   |
| Prof. dr Kazimierz L. Wierzchowski | — v-przewodniczący<br>Instytut Biochemii i Biofizyki<br>Polska Akademia Nauk,<br>Warszawa ul. Rakowiecka 36                     |
| Prof. dr Danuta Frąckowiak         | — v-przewodnicząca<br>Instytut Fizyki<br>Politechniki Poznańskiej<br>Poznań, ul. Piotrowo 5                                     |
| Dr Zofia Zarębska                  | — sekretarz<br>Instytut Biochemii i Biofizyki<br>Polska Akademia Nauk<br>Warszawa, ul. Rakowiecka 36<br>tel. 44-52-01 wewn. 505 |

## SPIS TREŚCI

A. Kahl — Receptory hormonów sterydowych . . . . .	171
A. Rabczenko — Konformacja nukleozydów . . . . .	195
M. Malicka-Błaszkiewicz — Inhibitory rybonukleaz . . . . .	233
S. Kalbarczyk — Niektóre hipotezy dotyczące działania egzogenicznego zwierzęcego DNA na ssaki . . . . .	247
T. Laskowska-Klita — Oksydaza cytochromowa, budowa i funkcja	261
R. T. Mariak, K. Worowski — Wewnątrzkomórkowe proteazy tkanek zwierzęcych . . . . .	279
J. Chroboczek — Rifampina . . . . .	299
A. Wołos, W. Minakowski — Karnozyna i jej rola biologiczna . . . . .	307
A. Gronowska-Senger — Tokoferole a wykorzystanie karotenu i witaminy A . . . . .	325
Symposium na temat Organellogenezy, Brno 25—29.IX.1972 (T. Gołaszewski)	331
Komunikat o dorocznych nagrodach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	335
Komunikat Zarządu Sekcji Polskich Fotobiologów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	337

## POSTĘPY BIOCHEMII

April 1973

### ARTICLES IN POLISH

Volume 19	Number 3
A. Kahl—Receptors of Steroid Hormones (Ludwik Hirszfeld Inst. of Immunol. and Exp. Therapy Pol. Acad. Sci., Wrocław; Inst. of Oncology, Warszawa) . . . . .	171
A. Rabczenko—Conformation of Nucleosides (Dep. Biophys., Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	195
M. Malicka-Błaszkiwicz—Inhibitors of Ribonucleases (Inst. Biochem., University of Wrocław) . . . . .	233
S. Kalbarczyk—Some Hypotheses Concerning the Mechanism of Action of Exogenous Animal DNA on Mammals (Warszawa) . . . . .	247
T. Laskowska-Klita—Cytochrome Oxidase, Structure and Function (Dep. Biochem., Inst. Biopharmacy, Medical School, Warszawa) . . . . .	261
R. T. Mariak, K. Worowski—Endocellular Peptidases of Animal Tissues (Dep. Biochem., Inst. Physiol. Biochem., Medical School, Białystok) . . . . .	279
J. Chroboczek—Rifampin (Dep. of Protein Biosynthesis, Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	299
A. Wołos, W. Minakowski—Carnosine and its Biological Role (Inst. Animal Physiology and Biochemistry, Agricult. Techn. Academy, Olsztyn)	307
A. Gronowska-Senger—Tocopherols in Relation to the Utilization of Carotene and Vitamin A (Dep. of Technology and Human Nutrition, Agricult. Academy, Warszawa) . . . . .	325
<i>Meeting Reports</i> —Symposium on Organellagenesis, Brno 25—29.IX 1972 ( <i>T. Gołtaszewski</i> ) . . . . .	331
<i>Communication</i> —Rewards of Polish Biochem. Soc. . . . .	335
Section of Polish Photobiologists, Polish Biochem. Soc. . . . .	337



## Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej

rocznie zł 80.—

półrocznie zł 40.—

Instytucje państwowe, społeczne, zakłady pracy, szkoły itp. mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie w miejscowych Oddziałach i Delegaturach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Prenumeratory indywidualni mogą opłacać w urzędach pocztowych i u listonoszy, lub dokonywać wpłat na konto PKO Nr 1-6-100020 RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, Warszawa ul. Towarowa 28 (w terminie do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty).

Prenumeratę za zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych Warszawa ul. Wronia 23, konto PKO Nr 1-6-100024.

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

Sprzedaż egzemplarzy zdezaktualizowanych, na uprzednie pisemne zamówienie, prowadzi RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, 00-958 Warszawa, skr. poczt. 12.

Subscription orders can be sent directly to:

„Ars Polona — Ruch”

Warszawa 1

P.O. Box 154

sending remittance of \$ 9.60 through the  
Bank Handlowy, Warszawa ul. Traugutta 7



Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalne), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793 (1953). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., Podręcznik Biochemii, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np.: Schneider W.C., w Methods in Enzymology, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.



## SPIS TREŚCI

A. Kahl — Receptory hormonów steroidowych . . . . .	171
A. Rabczenko — Konformacja nukleozydów . . . . .	195
M. Malicka-Błaszkiwicz — Inhibitory rybonukleaz . . . . .	233
S. Kalbarczyk — Niektóre hipotezy dotyczące działania egzogenicznego zwierzęcego DNA na ssaki . . . . .	247
T. Laskowska-Klita — Oksydaza cytochromowa, budowa i funkcja	261
R. T. Mariak, K. Worowski — Wewnątrzkomórkowe proteazy tkanek zwierzęcych . . . . .	279
J. Chroboczek — Rifampina . . . . .	299
A. Wołos, W. Minakowski — Karnozyna i jej rola biologiczna . . . . .	307
A. Gronowska-Senger — Tokoferole a wykorzystanie karotenu i wi- tamin A . . . . .	325
Sympozjum na temat Organellogenezy, Brno 25—29.IX.1972 (T. Gołaszewski)	331
Komunikat o dorocznych nagrodach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	335
Komunikat Zarządu Sekcji Polskich Fotobiologów Polskiego Towarzystwa Bio- chemicznego . . . . .	337