

BSC

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1971
tom 17
nr 4

KWARTALNIK

<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 ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 1
tom XVII
zeszyt 4

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

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

Komitet Redakcyjny
Redaktor — Zofia Lassota
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1971

Nakład 2130 (2000+130)	Oddano do składania 20.VII.1971 r.
Ark. wyd. 9,5, druk. 8,0	Podpisano do druku w październiku 1971 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w czerwcu 1971 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 993/71 U-107

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

IGNACY REIFER

1909—1971

2 kwietnia 1971 roku zmarł w Krakowie Ignacy Reifer, profesor zwyczajny Uniwersytetu Jagiellońskiego, członek korespondent Polskiej Akademii Nauk, były wicedyrektor Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Nauka polska poniosła niepowetowaną stratę. Był jednym z tych, którzy dźwignęli ją z chaosu i ruin pozostawionych przez najstraszniejszą z wojen. Już w pierwszych latach po zakończeniu II wojny światowej zorganizował w Warszawie nowoczesny warsztat pracy, ku któremu zdążali zewsząd entuzjaści młodej, dynamicznie rozwijającej się gałęzi nauk biologicznych — biochemii. Tworzył, organizował, wychowywał. Szedł tą drogą niestrudzenie, z optymizmem i entuzjazmem. Śmierć zabrała Go nagle, w pełni sił twórczych.

Urodził się 30.VI.1909 roku w Chrzanowie w woj. krakowskim. Tamże ukończył gimnazjum. Po studiach i uzyskaniu doktoratu na Wydziale Chemicznym Politechniki w Brnie Morawskim (1932 rok) rozpoczął pracę zawodową w Instytucie Patologii Eksperymentalnej i Ogólnej Uniwersytetu Wiedeńskiego. Prześladowany przez władze hitlerowskie wyemigrował w 1939 roku do Nowej Zelandii, gdzie wkrótce założył Zakład Chemii Roślin przy Instytucie Badań Naukowych i Przemysłowych w Palmerston North. Po wojnie wraca do kraju, by już w 1947 roku utworzyć Zakład a następnie Katedrę Biochemii na Wydziale Rolnym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tu habilituje się na podstawie rozprawy pt. „Źródła amoniaku w ekstraktach roślinnych” (1950 rok), a następnie uzyskuje kolejno tytuł profesora nadzwyczajnego i zwyczajnego. W 1967 roku zostaje członkiem korespondentem Polskiej Akademii Nauk. Będąc kierownikiem Katedry Biochemii SGGW bierze czynny udział w organizacji Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Przez kilkanaście lat pełni w nim funkcje wicedyrektora do spraw naukowych oraz kierownika Zakładu Biochemii Roślin. W tym samym czasie jest członkiem Komitetu Biochemicznego i Sekretariatu II Wydziału PAN. Równocześnie współpracuje z Państwową Radą do Spraw Pokojowego Wykorzystania Energii Jądrowej, jako członek Komisji Nauk Biologicznych i Medycznych. Był jednym z założycieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego a także polskich czasopism biochemicznych, *Acta Biochimica Po-*

lonica i *Postępów Biochemii*. Od 1965 roku był organizatorem i opiekunem Katedry Biochemii i Biofizyki U.J. w Krakowie, do której przeniósł się na stałe w 1969 roku.

Bogaty dorobek naukowy Profesora Reifera jest dobrze znany szerokim kręgom biochemików i fizjologów w kraju i zagranicą. Rejestr jego publikacji obejmuje sto kilkadziesiąt pozycji. Koncentrują się one głównie wokół metabolizmu niskocząsteczkowych związków azotowych w roślinach wyższych. Szczególnie cennymi były wyniki badań nad biogenezą alkaloidów, przemianami aminokwasów cyklu ornitynowego i biosyntezą nukleotydów pirymidynowych. Stale cytowane w piśmiennictwie światowym są także liczne mikrometody ilościowego oznaczania wielu niskocząsteczkowych metabolitów komórki roślinnej. W ostatnich latach podjął zakrojone na szeroką skalę badania nad istotą i mechanizmem działania naturalnych inhibitorów enzymów. Już wstępne wyniki rzuciły nowe światło na procesy regulacji aktywności enzymów w komórce roślinnej. Śmierć przerwała te badania w fazie najbardziej fascynującej. Drogą wskazaną przez Profesora Reifera idzie obecnie liczna grupa jego uczniów i wychowanków.

Wybitne osiągnięcia naukowe, bogaty dorobek organizacyjny i wychowawczy wynikały z niezwykłych zalet jego umysłu i zdumiewającej pracowitości. Był wymagający wobec innych, ale jeszcze więcej wymagał od siebie. Zawsze pełen energii i niegasnącego zapału. Porywał swym optymizmem. W kierowanych przez siebie placówkach stwarzał atmosferę twórczej pracy, entuzjazmu i koleżeńskości.

Był szlachetnym człowiekiem i prawdziwym uczonym.

J. Buchowicz

JADWIGA BRYŁA*

Regulacja glukoneogenezy

II. Rola hormonów

Control of Gluconeogenesis

II. Role of Hormones

Regulatory action of adrenal corticosteroids and pancreatic hormones (glucagon and insulin) on gluconeogenesis is reviewed.

Znamienną cechą żywych organizmów jest ich zdolność do utrzymania „stałości środowiska wewnętrznego”, mimo zmian zachodzących w środowisku zewnętrznym. Utrzymywanie stałego poziomu glukozy w krwi jest jednym z uderzających przykładów homeostazy. W organizmie muszą zatem istnieć mechanizmy, dzięki którym jest zachowywana równowaga między procesami powodującymi rozpad glukozy w tkankach (glikoliza), przeksztalcanie glukozy w glikogen (glikogeneza), przeksztalcanie glikogenu w wątrobie w glukozę (glikogenoliza) i powstawanie glukozy z prekursorów niewęglowodanowych (glukoneogeneza). W regulacji tych złożonych procesów metabolicznych odgrywa znaczną rolę poziom pewnych metabolitów i hormonów w krwi.

Wpływ poziomu kwasów tłuszczowych na szybkość wytwarzania glukozy omówiono uprzednio (7). Jak wiadomo, w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych wzrasta znacznie poziom acetyloCoA i zređ. NAD (43, 66, 68, 85, 87, 89, 91, 92). AcetyloCoA aktywuje karboksylazę pirogronianową (6, 34, 70, 89, 90, 91), a równoważniki redukujące zređ. NAD są wykorzystywane w reakcji przeksztalcania kwasu 3-fosfoglicerynowego w aldehyd 3-fosfoglicerynowy (29, 36, 41, 60, 63, 68, 70, 87, 89). Wzmózone utlenianie

* Dr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: Lact — mleczan, Pyr — pirogronian, OA — szczawiooctan, Mal — jabłczan, PEP — fosfoenolpirogronian, 2PGA — kwas 2-fosfoglicerynowy, 3PGA — kwas 3-fosfoglicerynowy, GAP — aldehyd 3-fosfoglicerynowy, DAP — fosfodwuhydroksyaceton, FDP — fruktozo-1,6-dwufosforan, FDPaza — fosfohydrolaza fruktozo-1,6-dwufosforanu, F6P — fruktozo-6-fosforan, G6P — glukoza-6-fosforan, G6Paza — fosfohydrolaza glukoza-6-fosforanu, Triamcinolon — 1-dehydro-16 α -hydroksy,9 α -fluorokortyzol, AIS — surowica świnki morskiej immunizowanej przeciwko insulinie, O — kwas oleinowy, KT — kwasy tłuszczowe, Glk — glukoza

kwasów tłuszczowych w warunkach związanych ze zwiększoną szybkością syntezy glukozy dostarcza również energii niezbędnej do przeprowadzenia reakcji katalizowanych przez karboksylazę pirogronianową, karboksylazę fosfopirogronianową i kinazę kwasu 3-fosfoglicerynowego.

Wyniki badań nad wpływem hormonów na szybkość glukoneogenezy w całym organizmie jest trudno interpretować, ponieważ dotyczą one zarówno tkanek glukoneogenicznych jak i obwodowych (39). Ostatnio, badania prowadzi się na skrawkach tkanek glukoneogenicznych (wątroba, nerka) lub metodą perfuzji całych organów. Szybkość glukoneogenezy w preparatach wątroby i nerki szczura poddawanych perfuzji (15, 51, 56) oraz w skrawkach wątroby (37, 56) i w skrawkach kory nerki (38) jest zbliżona do wartości obserwowanych w całych organizmach (3, 33) i dlatego uważa się, że w układach poddawanych perfuzji szybkości przemian metabolicznych są zbliżone do panujących *in vivo* (15, 30, 56). Jednakże przy rozpatrywaniu sposobu działania różnych hormonów, powodujących zmianę szybkości glukoneogenezy, należy zwrócić uwagę na różnice we właściwościach badanych preparatów oraz metodykę przeprowadzania perfuzji (47, 48, 92). Czynniki te mają szczególne znaczenie w badaniach szybkości wytwarzania glukozy w wątrobie.

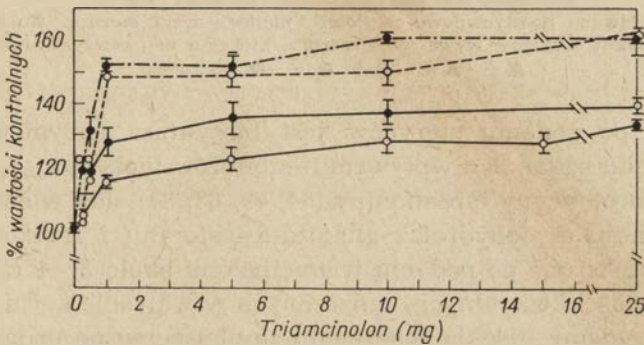
Szybkość glukoneogenezy jest uwarunkowana w głównej mierze obecnością w krwi hormonów wydzielanych przez dwa ośrodki: nadnercza (kortykosterydy i adrenalina) i trzustkę (glukagon, insulina). Współdziałanie tych hormonów w regulacji aktywności enzymatycznej oraz biosyntezy enzymów warunkuje zachowanie równowagi między intensywnością procesów powodujących rozpad glukozy i syntezę tego związku, w wyniku czego jest utrzymywany stały poziom glukozy w krwi.

I. Kortykosterydy

Kortykosterydy są wytwarzane w części korowej nadnerczy. Usunięcie tych narządów głodzonemu szczurom (adrenalektomia) powoduje zmniejszenie intensywności glukoneogenezy w wątrobie poddawanej perfuzji (13), w skrawkach wątroby (10, 28) i kory nerki (69). Szybkość wytwarzania glukozy z pirogronianu (13, 69) z młeczanu (13) i alaniny (10, 28) jako substratów jest niewielka. Przywrócenie normalnej szybkości syntezy glukozy w wątrobie i nerce obserwowano po iniekcji kortykosterydów zwierzętom (69). Co więcej, także dodanie hormonów do mieszaniny inkubacyjnej przyspiesza zarówno wytwarzanie glukozy w skrawkach wątroby (10, 28) i kory nerki (32, 61), jak i pobieranie dwutlenku węgla (61). Dane te sugerują, że pod wpływem kortykosterydów zwiększa się aktywność enzymów katalizujących przekształcenie pirogronianu w triozofosforan. Za tym przypuszczeniem przemawia również zwiększenie aktywności karboksylazy fosfopirogronianowej w cytoplazmie wątroby i kory nerki (32, 40)

oraz karboksylazy pirogronianowej w wątrobie (23, 31) *in vivo* po podaniu kortykosterydów.

Według We b e r a (72) kortykosterydy odgrywają pewną rolę w homeostazie w wyniku wytwarzania prekursorów glukoneogenezy w tkance tłuszczowej i mięśniach. Uwolnione kwasy tłuszczowe, glicerol, mleczan i aminokwasy są przenoszone przez krew do wątroby i nerki (16, 17, 18, 79, 83, 84), wskutek czego zwiększa się poziom substratów i aktywatorów syntezy glukozy. Wzrost stężenia kwasów tłuszczowych powoduje zahamowanie aktywności kluczowych enzymów glikolitycznych: glukokinazy pirogronianowej (42, 75, 77, 92), w wyniku czego następuje przesunięcie równowagi w kierunku wytwarzania glukozy. Co więcej, utlenianie kwasów tłuszczowych w procesie β -oksydacji dostarcza acetyloCoA (61), aktywatora karboksylazy pirogronianowej (71).



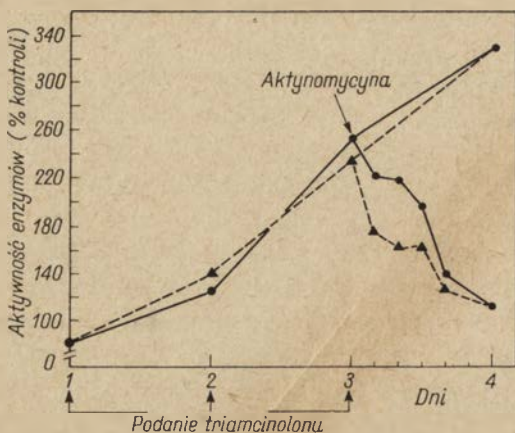
Rys. 1. Wpływ podania triamcinolonu na aktywność enzymów glukoneogenezy i poziom aminokwasów i RNA w wątrobie szczura (wg 76 cyt. wg 72)

Triamcinolon podawano w różnych ilościach (od 0 do 25 mg) dootrzewnowo. Szczury zabijano po 6 godzinach od podania sterydu

○ — RNA, ○ — FDPaza, ● — G6Paza, ● — N₂ aminokwasów

Po podaniu szczurom triamcinolonu, fluorowej pochodnej glukokortykoidu (rysunek 1), zwiększa się aktywność enzymów biorących udział w procesie glukoneogenezy, czemu towarzyszy wzrost poziomu aminokwasów i RNA (19, 20, 79, 83, 84). Można przypuszczać, że większa aktywność enzymów glukoneogenezy po podaniu sterydów może być spowodowana zwiększoną biosyntezą kluczowych enzymów glukoneogenezy: fosfohydrolaz glukozy-6-fosforanu (73) i fruktozo-1,6-dwufosforanu (74), karboksylazy fosfopirogronianowej (64) i karboksylazy pirogronianowej (31, 80). Wydaje się, że hormony te wpływają również na biosyntezę tzw. enzymów dwufunkcyjnych, działających zarówno w procesie glukoneogenezy jak i glikolizy: izomerazy heksozo-6-fosforanu i dehydrogenazy mleczanowej. Natomiast poziom kluczowych enzymów glikolizy pozostaje niezmienny (76 cyt. wg 72).

O tym, że przyczyną większej aktywności kluczowych enzymów glu-



Rys. 2. Hamowanie przez aktynomycynę biosyntezy enzymów glukoneogenezy indukowanej podaniem glukokortykoidu (wg 81)

Triamcinolon podawano dootrzewnowo w ilości 1 mg/100 g wagi szczura. Wartości kontrolne oznaczają aktywności enzymów w wątrobie szczura, któremu nie wstrzykiwano triamcinolonu

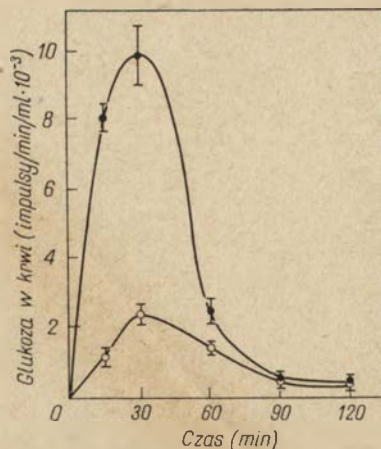
▲ --- ▲ — G6Paza, ● — ● — FDPaza

koneogenezy po podaniu sterydów jest biosynteza enzymów *de novo*, świadczą wyniki badań nad wpływem inhibitorów biosyntezy białka: aktynomycyny, puromycyny lub etioniny (64, 79, 83, 84). Jak widać na rysunku 2, aktywności fosfohydrolaz glukozo-6-fosforanu i fruktozo-1,6-dwufosforanu, zwiększone po podaniu triamcinolonu około 3—4 razy (w stosunku do wartości kontrolnych, oznaczonych w wątrobie szczura nie traktowanego sterydem), ulegają znacznemu zmniejszeniu po podaniu aktynomycyny. Mimo to *in vivo* po podaniu triamcinolonu obserwuje się tylko niewielkie zmniejszenie szybkości wytwarzania glukozy w wątrobie szczura (22, 55). Zjawisko to można tłumaczyć tym, że aktynomycyna nie hamuje wpływu sterydów na uwalnianie aminokwasów (4) lub zwiększenie stężenia acetyloCoA w tkankach obwodowych (61), w wyniku czego synteza glukozy zachodzi nawet przy nieznacznym stężeniu enzymów glukoneogenezy (22, 55), a także tym, że aktynomycyna hamuje tylko transkrypcję, a i to *in vivo* nie w 100%.

II. Glukagon

Glukagon jest wytwarzany przez tzw. komórki α trzustki. Powoduje on przede wszystkim wzrost poziomu glukozy w wyniku rozpadu glikogenu wątroby (21). Ostatnio wykazano, że wpływa on również na zwiększenie syntezy glukozy w wątrobie (12, 14, 24, 56, 59, 68, 87).

Jak widać na rysunku 3, pojawianie się ^{14}C w glukozie krwi ze znakowanego dwuwęglanu jest szybsze tylko przez pół godziny po dodaniu glukagonu. Ilość włączonego dwutlenku węgla osiąga wartość maksymalną po



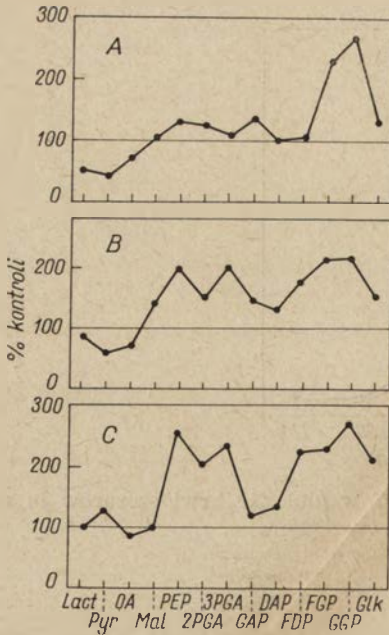
Rys. 3. Wpływ glukagonu na pojawianie się ^{14}C w glukozie krwi szczurów *in vivo* ze znakowanego ^{14}C -dwuwęglanu

Glukagon podano w ilości 250 μg dootrzewnowo

●—● — Glukagon, ○—○ — Kontrola

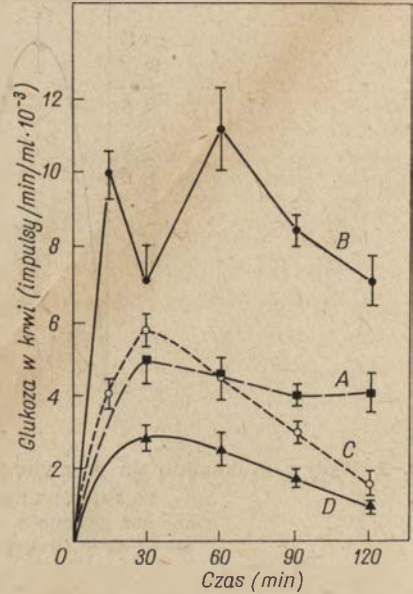
30 minutach, a następnie spada do wartości kontrolnych, oznaczonych u szczurów nie poddawanych działaniu zwiększonych dawek hormonu. Ten przejściowy, pobudzający wpływ glukagonu na glukoneogenezę Williamson (87) tłumaczy uwalnianiem insuliny mającej działanie antagonistyczne do glukagonu.

Poziom poszczególnych pośredników glukoneogenezy po 5 minutach od podania glukagonu (rysunek 4A) ujawnia znaczny przyrost zawartości heksozomonofosforanów, związany prawdopodobnie z szybszą glikogenezą. Równocześnie zmniejsza się stężenie mleczanu, pirogronianu i szczawiooctanu, a zwiększa stężenie pośredników na odcinku między fosfoenolpirogronianem a triozofosforanem, co może być wynikiem aktywacji karboksylazy pirogronianowej. Zwiększenie ilości heksozomonofosforanów w połączeniu ze zmniejszeniem stężenia fruktozo-1,6-dwufosforanu i glukozy wskazuje na zahamowanie fosfofruktokinazy lub zaktywowanie fosfohydrolazy fruktozo-1,6-dwufosforanu (86). Zmiany zawartości pośredników glukoneogenezy są jeszcze wyraźniej zaznaczone po 30 minutach od podania glukagonu (rysunek 4B). Natomiast po upływie 60 minut (rysunek 4C) stężenie mleczanu, pirogronianu i szczawiooctanu osiąga ponownie wartości kontrolne, podczas gdy stężenia pozostałych pośredników są w dalszym ciągu większe od oznaczonych dla szczurów nie traktowanych glukagonem. Badania wielu autorów (5, 21, 68, 87, 88, 93) wskazują, że zmianom poziomowi metabolitów po podaniu glukagonu towarzyszy początkowo wzrost lipolizy i ketogenezy, a następnie ich spadek. Dlatego wydaje się, że zwiększenie szybkości wytwarzania glukozy w wątrobie jest wywoływane podniesieniem poziomu kwasów tłuszczowych uwalnianych w wyniku lipolizy (87, 88). Zmniejszenie lipolizy spowodowane na przykład uwalnianiem



Rys. 4. Wpływ glukagonu na zmianę zawartości pośredników glukoneogenezy w wątrobie szczura po 5 minutach (A), 30 minutach (B) i 60 minutach (C) perfuzji (wg 87)

Glukagon był podawany w czasie pierwszej minuty z szybkością 50 $\mu\text{g}/\text{min}$., a w czasie następných minut z szybkością 5 $\mu\text{g}/\text{min}$

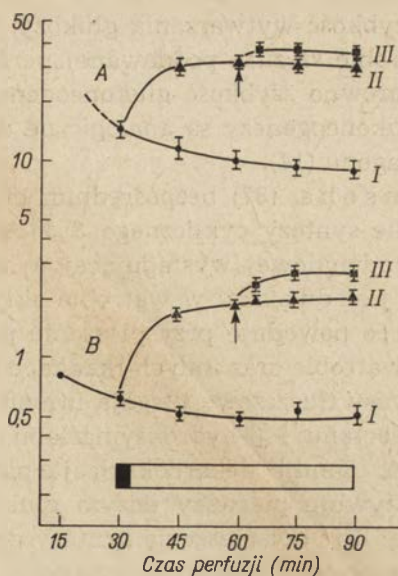


Rys. 5. Pojawianie się ^{14}C ze znakowanego dwuwęglanu w glukozie krwi szczurów po podaniu surowicy świnki morskiej immunizowanej przeciwko insulinie (A), glukagonu z surowicą insulini (B) lub maślanu sodowego (C), kontrola (D) (wg 87)

2 ml surowicy świnki morskiej immunizowanej przeciwko insulinie wstrzyknięto do żyły ogonowej. Glukagon podano dootrzewnowo w ilości 250 $\mu\text{g}/20$ g wagi szczura w tym samym czasie, w jakim podano insulinę, 1 mmol maślanu sodowego podano dootrzewnowo

insuliny mogłoby indukować zwolnienie syntezy glukozy. Wydaje się, że glukogenolityczne działanie glukagonu w przeciwieństwie do glukoneogenetycznego jest mniej wrażliwe na obecność insuliny, ponieważ poziom glukozy i heksozomonofosforanów pozostaje w dalszym ciągu podniesiony.

Do ustalenia, że zmniejszenie syntezy glukozy następuje wskutek uwalniania insuliny przyczyniły się badania nad pojawianiem się ^{14}C ze znakowanego dwuwęglanu w glukozie krwi szczurów, którym podawano glukagon w połączeniu z surowicą świnki morskiej immunizowanej przeciwko insulinie (87, 93). W tych warunkach wpływ glukagonu jest wyraźnie widoczny. Podanie surowicy świnki morskiej immunizowanej przeciwko insulinie powoduje około dwukrotne zwiększenie ilości ^{14}C ze znakowanego dwuwęglanu w glukozie krwi (rysunek 5). Glukagon wpływa na dalsze zwiększenie szybkości włączania dwutlenku węgla (około 3—4 razy w porównaniu z włączaniem u zwierząt, którym nie podawano ani surowicy ani glukagonu). Zwiększenie ilości dwutlenku węgla w glukozie ob-



Rys. 6. Wpływ glukagonu na stosunek zredukowanego NAD/NAD w cytoplazmie i mitochondriach wątroby szczura poddawanej uprzednio perfuzji kwasem oleinowym w obecności mleczanu jako substratu (wg 88)

Kwas oleinowy podano po 30 minutach z szybkością $50 \mu\text{moli/min.}$ przez pierwsze 3 minuty, a następnie z szybkością $4 \mu\text{moli/min.}$ (⇒). Podawanie 10 mM glukagonu rozpoczęto po 60 minutach (↑↑). Stężenie mleczanu w czasie doświadczenia było stałe — 10 mM . Stosunek zredukowanego NAD/NAD w cytoplazmie oznaczano na podstawie pomiaru stosunku mleczan/pirogronian (A) a stosunek NAD/NAD w mitochondriach — na podstawie stosunku β -hydroksymaślan/acetoctan (B)

I — kontrola, II — kwas oleinowy, III — glukagon

serwuje się również w wyniku dootrzewnowego podania soli kwasu masełowego. Można przypuszczać, że intensywność glukoneogenezy w obecności glukagonu lub przy braku insuliny jest uwarunkowana szybkością uwalniania i utleniania kwasów tłuszczowych (87). Dowodów na poparcie tego przypuszczenia dostarczyły pomiary stosunku zredukowanego NAD/NAD w cytoplazmie i mitochondriach wątroby szczura poddawanej perfuzji buforem węglanowym, zawierającym kwasy tłuszczowe i glukagon.

Po podaniu kwasów tłuszczowych stosunki mleczan/pirogronian i β -hydroksymaślan/acetoctan znacznie wzrastają w porównaniu ze stosunkami tych metabolitów w wątrobie szczura poddawanej perfuzji buforem węglanowym (rysunek 6). Jest przy tym szczególnie interesujące, że podanie glukagonu po uprzednim podaniu kwasu oleinowego powoduje dalszą redukcję NAD, zarówno cytoplazmatycznego jak i mitochondrialnego. Williams (88) tłumaczy ten fakt zwiększonym utlenianiem kwasów tłuszczowych, uwolnionych w wyniku lipolitycznego działania glukagonu.

W roku 1966 Exton i wsp. (12, 14) donieśli, że po podaniu glukagonu lub surowicy świnki morskiej immunizowanej przeciwko insulinie znacznie wzrasta poziom cyklicznego $3',5'$ -AMP w wątrobie szczura poddawanej perfuzji. Autorzy ci przypisali stężeniu tego związku rolę czyn-

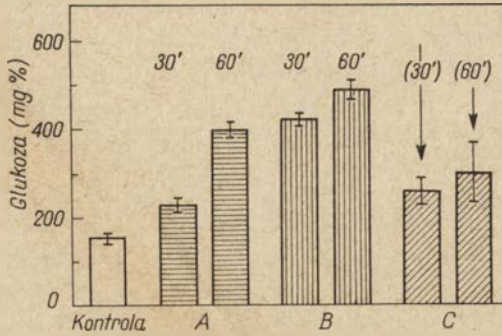
nika kontrolującego szybkość wytwarzania glukozy. Za tą hipotezą przemawia fakt, że w wątrobie szczura poddawanej perfuzji w obecności cyklicznego 3',5'-AMP zarówno szybkość glukoneogenezy jak i zmiany poziomu pośredników glukoneogenezy są analogiczne do zmian obserwowanych w obecności glukagonu (14).

Według Williamsa (87) bezpośrednim efektem działania glukagonu jest zwiększenie syntezy cyklicznego 3',5'-AMP w wyniku aktywacji układu cyklazy adenylowej występującej w wielu tkankach. Rola cyklicznego 3',5'-AMP jest dwójaka: w wątrobie aktywuje on fosforylaze glikogenu (35, 46, 53), co powoduje przyspieszenie procesu glikogenolizy; w tkance tłuszczowej, wątrobie oraz innych tkankach — przyspiesza proces lipolizy. Uwolnione kwasy tłuszczowe ulegają utlenieniu z wytworzeniem acetyloCoA oraz octoocianu i β -hydroksymaślanu. Zwiększony poziom acyloCoA i acetyloCoA hamuje dekarboksylację pirogronianu i syntezę malonyloCoA, oraz aktywuje pierwszy enzym glukoneogenezy — karboksylaze pirogronianową. Do przyspieszenia syntezy glukozy przyczynia się również podniesiony skutek utleniania kwasów tłuszczowych poziom zred. NAD, niezbędnego w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Równocześnie zwiększone stężenie zred. NAD hamuje enzymy glikolityczne, uniemożliwiając rozpad glukozy.

Zjawisko stymulacji syntezy glukozy przez glukagon nie jest charakterystyczne dla wszystkich zwierząt. Na przykład Söling i wsp. (67) zaobserwowali, że w poddawanej perfuzji wątrobie świnki morskiej podanie glukagonu nie ma wpływu na szybkość glukoneogenezy, chociaż hormon ten pobudza ketogenezę, urogenezę i glikogenolizę, podobnie jak w wątrobie szczura. Różnice te autorzy tłumaczą innym rozmieszczeniem karboksylazy fosfopirogronianowej u tych zwierząt zarówno w cytoplazmie jak i mitochondriach (por. 7), co może wpływać na występowanie odmiennego mechanizmu regulacji syntezy fosfoenolopirogronianu ze szczawioocianu. Wydaje się również, że rozbieżności te mogą być wynikiem działania kinazy pirogronianowej, której aktywność w wątrobie świnki morskiej jest znacznie niższa niż w wątrobie szczura (67).

III. Insulina

Insulina, wydzielana przez komórki β trzustki, jest hormonem o działaniu antagonistycznym do kortykosterydów i glukagonu. Podanie dużych ilości insuliny szczurom o wysokim poziomie glukozy w krwi (w wyniku uprzedniego podania glukagonu i immunizowanej przeciwko insulinie surowicy świnki morskiej) powoduje jego obniżenie (rysunek 7), czemu towarzyszy zmniejszenie ilości wolnych kwasów tłuszczowych, ciał ketonowych, acyloCoA i acetyloCoA (87). Równocześnie poziom pośredników glukoneogenezy w wątrobie zmienia się w kierunku wartości oznaczonych dla szczurów, nie traktowanych ani glukagonem ani insuliną. Wydaje się



Rys. 7. Obniżające poziom glukozy w krwi działanie insuliny w obecności glukagonu i immunizowanej przeciwko insulinie surowicy świnki morskiej (wg 87)

Zawartość glukozy oznaczono po 30 lub 60 minutach (jak wskazano na rysunku) od podania surowicy świnki morskiej immunizowanej przeciwko insulinie (A) lub glukagonu razem z surowicą (B). W doświadczeniu C po 30 minutach od podania glukagonu i surowicy wstrzyknięto insulinę i po upływie 30 lub 60 minut oznaczono poziom glukozy w krwi

zatem, że insulina powoduje zahamowanie wytwarzania glukozy w wątrobie i, być może, zwiększone wykorzystywanie tego związku w tkankach obwodowych (87).

Exton i Park (14) oraz Bütcher i wsp. (8) zaobserwowali, że wzrost stężenia insuliny powoduje również zmniejszenie poziomu cyklicznego 3',5'-AMP w wątrobie, w wyniku czego fosforylaza glikogenu i lipaza zostają przekształcone w ich formy nieaktywne. W tych warunkach następuje zahamowanie glikogenolizy i lipolizy, co powoduje zmniejszenie stężenia kwasów tłuszczowych w wątrobie. W wyniku spadku poziomu kwasów tłuszczowych i acetyloCoA ulegają aktywacji enzymy glikolizy (glukokinaza, heksokinaza, fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa) (72), lipogenezy (52) oraz cyklu Krebsa (62, 75). Natomiast kluczowy enzym glukoneogenezy, karboksylaza pirogronianowa, jest w tych warunkach nieaktywny.

Istnieją dane świadczące o pobudzaniu przez insulinę biosyntezy enzymów glikolitycznych (62, 65, 72, 78, 82), cyklu pentozowego i lipogenezy (72) oraz hamowaniu biosyntezy enzymów glukoneogenezy (72, 80). Według Halesa (27) insulina może również zwiększać przepuszczalność błon komórkowych w stosunku do glukozy, wskutek czego następuje gromadzenie glikogenu i trójglicerydów w komórkach. Tak więc hormon ten stymuluje wykorzystywanie glukozy w procesach glikogenezy, glikolizy i lipogenezy, natomiast hamuje wytwarzanie glukozy na drodze glukoneogenezy i glikogenolizy.

Zmiany stężenia insuliny w krwi są prawdopodobnie wynikiem zmian szybkości sekrecji, a nie degradacji tego hormonu. Badania nad inkubacją skrawków trzustki w roztworze zawierającym różne ilości glukozy wykazały, że zwiększanie stężenia glukozy w mieszaninie inkubacyjnej w fizjologicznym zakresie od 3 do 7mM powoduje wzrost wydzielania insuliny

(1, 9). Regulacja sekrecji hormonu w odpowiedzi na podanie glukozy *in vivo* jest bardziej złożona. W przeciwieństwie do glukozy podanej doustnie, glukoza podana dożylnie zdrowym szczurom nie powoduje wzrostu stężenia insuliny w krwi (11, 45). A zatem, po podaniu glukozy doustnie, w żołądku lub jelitach powinna uwalniać się jakaś substancja powodująca sekrecję insuliny. Według Samolsa i wsp. (57) substancją tą może być glukagon, którego obecność wykazano w żołądku i jelicie.

IV. Inne hormony

Poza hormonami opisanymi poprzednio, w regulacji intensywności glukoneogenezy mają znaczenie jeszcze dwa: adrenalina i hormon przytarczycowy.

Według Extona i Parka (14) zwiększenie szybkości wytwarzania glukozy w wątrobie szczura w obecności adrenaliny jest spowodowane aktywacją karboksylazy fosfopirogronianowej. Adrenalina oddziałuje na proces glukoneogenezy prawdopodobnie w wyniku zwiększenia stężenia cyklicznego 3',5'-AMP (14, 87, 93).

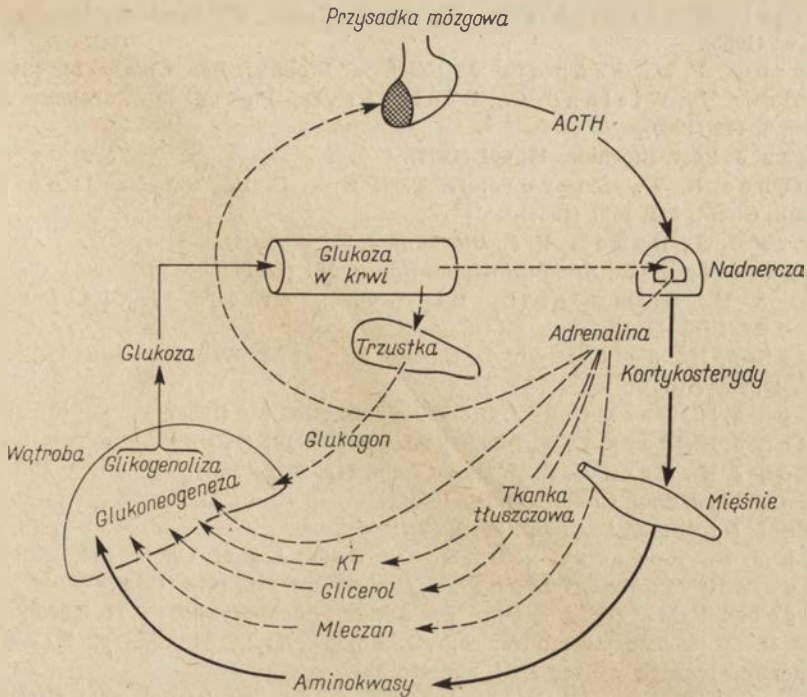
Ostatnio Nagata i Rasmussen (50, 54) wykazali, że w kanałkach nerkowych szczura synteza glukozy jest stymulowana przez hormon przytarczycowy. Ponieważ zmiany pośredników glukoneogenezy są takie same po podaniu hormonu, jak w obecności zwiększonych stężeń jonów Ca^{2+} , autorzy ci sugerują, że hormon przytarczycowy przyspiesza syntezę glukozy w wyniku pobieranie przez komórki nerki jonów Ca^{2+} , które aktywują karboksylazę fosfopirogronianową (49, 54).

V. Uwagi końcowe

Utrzymywanie stałego poziomu glukozy w krwi jest uwarunkowane współdziałaniem kilku hormonów. Ich udział w regulacji syntezy glukozy w procesie glukoneogenezy jest przedstawiony na schemacie 1.

Kortykosterydy, których wydzielanie następuje pod wpływem kortykotropiny (ACTH), powodują uwalnianie głównie aminokwasów i mleczanu z mięśni. W wyniku wydzielania adrenaliny, stymulującej sekrecję ACTH, następuje przyspieszenie lipolizy w tkance tłuszczowej, co prowadzi do podniesienia stężenia kwasów tłuszczowych i glicerolu w krwi. Glukagon wpływa na zwiększenie poziomu cyklicznego 3',5'-AMP oraz kwasów tłuszczowych w wątrobie. Uwolnione metabolity są wykorzystywane jako substraty procesu glukoneogenezy lub dostarczają aktywatorów jak na przykład acetyloCoA.

Określanie zawartości hormonów w krwi jest niezwykle trudne, ponieważ ich stężenie jest bardzo niskie, około 10^{-10}M (27). Wzrost stężenia



Schemat 1. Stymulujący wpływ hormonów na wytwarzanie glukozy w procesie glukoneogenezy (wg 81)
Objaśnienia w tekście

glukozy w krwi powoduje podniesienie około 4—10 razy poziomu insuliny i 2—3 razy — glukagonu, oraz wpływa na zmniejszenie stężenia hormonu wzrostowego (58). Natomiast spadek poziomu glukozy w krwi powoduje zmniejszenie stężenia insuliny i zwiększenie wydzielania hormonu wzrostowego, kortyzolu (2) i adrenaliny (25, 44).

Szybkość wytwarzania glukozy w procesie glukoneogenezy wzrasta przy pewnych schorzeniach, np. cukrzycy i zaburzeniach w funkcjonowaniu nadnerczy. Obserwuje się wówczas zmniejszone wykorzystanie tego metabolitu przez tkanki obwodowe (26) oraz zwiększoną lipolizę i zwiększone uwalnianie glukozy przez wątrobę (87). Zmiany te nie są prawdopodobnie spowodowane brakiem insuliny *per se*, lecz zaburzeniami w zachowaniu równowagi hormonalnej (93). W obu przypadkach obserwuje się wzrost uwalniania kwasów tłuszczowych oraz zwiększone wytwarzanie ciał ketonowych.

LITERATURA

1. Anderson E., Long J. A., *Recent Prog. Horm. Res.* 2, 2096 (1948).
2. Arner B., Hedner P., Karlefors T., *Acta Endocrinol.* 40, 421 (1962).
3. Baker N., Shipley R. A., Clark R. E., Incefy G. E., Skinner S. S., *Am. J. Physiol.* 200, 863 (1961).

4. Bethel J. J., Feigelson M., Feigelson P., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 92 (1965).
5. Bewsher P. D., Ashmore J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 431 (1966).
6. Böttger I., Wieland O., Brdiczka D., Pette D., *European J. Biochem.* **8**, 113 (1969).
7. Bryła J. *Post. Biochem.* **17**, 401 (1971).
8. Bütcher R. W., Sneyd J. G. T., Park C. R., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **241**, 1651 (1966).
9. Coore H. G., Randle P. J., *Biochem. J.* **93**, 66 (1964).
10. Eisenstein A. B., *Advan. Enzyme Reg.* **3**, 121 (1965).
11. Elrick H., Stimmler L., Hlad C. J., Arai Y., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 1076 (1964).
12. Exton J. H., Jefferson L. S., Butcher R. W., Park C. R., *Am. J. Med.* **40**, 709 (1966).
13. Exton J. H., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 955 (1965).
14. Exton J. H., Park C. R., *Pharmacol. Rev.* **18**, 181 (1966).
15. Exton J. H., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **242**, 2622 (1967).
16. Fain J. N., *J. Biol. Chem.* **238**, 54 (1963).
17. Fain J. N., *Advan. Enzyme Reg.* **5**, 39 (1967).
18. Fain J. N., Kovacev V. P., Scow R. O., *J. Biol. Chem.* **240**, 3522 (1965).
19. Feigelson M., Feigelson P., *J. Biol. Chem.* **238**, 1073 (1963).
20. Feigelson M., Feigelson P., *Advan. Enzyme Reg.* **3**, 11 (1965).
21. Foa P. P., w The Hormones, red. G. Pincus, K. V. Thiman, E. B. Astward, Academic Press, New York 1964, t. 4, str. 531.
22. Foster D. O., Ray P. D., Lardy H. A., *Biochemistry* **5**, 5855 (1966).
23. Freedman A. D., Kohn L., *Science* **145**, 58 (1964).
24. Garcia A., Williamson J. R., Cahill G. F., *Diabetes* **15**, 188 (1966).
25. Goldfien A., Moore R., Zileli S., Havens L. L., Boiling L., Thorn G. W., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 296 (1961).
26. Gregor W. H., Martin J. M., Williamson J. R., Lacy P. E., Kipnis D. M., *Diabetes* **12**, 73 (1963).
27. Hales C. N., w Essays in Biochemistry, red. P. N. Campbell, G. D. Greville, Academic Press, Londyn 1967, t. 3, str. 73.
28. Haynes R. C., *Endocrinology* **71**, 399 (1962).
29. Haynes R. C. Jr., *J. Biol. Chem.* **240**, 4103 (1965).
30. Hems R., Ross B. D., Berry M. N., Krebs H. A., *Biochem. J.* **101**, 284 (1967).
31. Henning H. V., Seiffert I., Seubert W., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 345 (1963).
32. Henning H. V., Stumpf B., Ohly B., Seubert W., *Biochem. Z.* **344**, 274 (1966).
33. Holt C. von, Schmidt H., Feldmann H., Hallmann I., *Biochem. Z.* **334**, 524 (1961).
34. Keech D. B., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2609 (1963).
35. Krebs E. G., Graves D. J., Fisher E. H., *J. Biol. Chem.* **234**, 2867 (1959).
36. Krebs H. A., *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* **159**, 545 (1964).
37. Krebs H. A., Notton B. M., Hems R., *Biochem. J.* **101**, 607 (1966).
38. Krebs H. A., Yoshida T., *Biochem. Z.* **338**, 241 (1963).
39. Landau B. R., *Vitamins Hormones* **23**, 1 (1965).
40. Lardy H. A., Foster D. O., Shrago E., Ray P. D., *Advan. Enzyme Reg.* **2**, 39 (1964).
41. Lardy H. A., Paetkau V., Walter P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 1410 (1968).

42. Lea M. A., Weber G., *J. Biol. Chem.* **243**, 1096 (1968).
43. Löffler G., Matchinsky F., Wieland O., *Biochem. Z.* **342**, 76 (1965).
44. Luft R., Cerazi E., Madison L. L., von Euler U. S., Della Casa L., Roovete A., *Lancet* **2**, 254 (1966).
45. Mc Intyre N., Holdsworth C. D., Turner D. S., *Lancet* **2**, 20 (1964).
46. Meyer W. L., Fisher E. M., Krebs E. G., *Biochemistry* **3**, 1033 (1964).
47. Miller L. L., Bly C. G., Watson M. L., Bale W. F., *J. Exptl. Med.* **94**, 431 (1961).
48. Mortimore G. E., *Am. J. Physiol.* **204**, 6999 (1963).
49. Nagata N., Rasmussen H., *Biochim. Biophys. Acta* **215**, 1 (1970).
50. Nagata N., Rasmussen H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **65**, 368 (1970).
51. Nishitsutsuji-Uwo J. M., Ross B. D., Krebs H. A., *Biochem. J.* **103**, 852 (1967).
52. Numa S., Bortz W. M., Lynen F., *Advan. Enzyme Reg.* **3**, 407 (1965).
53. Posner J. B., Stern R., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **240**, 982 (1965).
54. Rasmussen H., Nagata N., *Biochim. Biophys. Acta* **215**, 17 (1970).
55. Ray P. D., Foster D. O., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **239**, 3396 (1964).
56. Ross B. D., Hems R., Krebs H. A., *Biochem. J.* **102**, 942 (1967).
57. Samols E., Marri G., Marks V., *Lancet* **2**, 415 (1965).
58. Samols E., Tyler J., Marri G., Marks V., *Lancet* **2**, 1257 (1965).
59. Schimassek H., Mitzkat H. J., *Biochem. Z.* **337**, 510 (1963).
60. Scrutton M. C., Utter M. F., *Annal. Rev. Biochem.* **37**, 249 (1968).
61. Seubert W., Henning H. V., Schoner W., L'age M., *Advan. Enzyme Reg.* **6**, 153 (1968).
62. Sharma C., Manjeshwar R., Weinhouse S., *J. Biol. Chem.* **239**, 3840 (1963).
63. Shrago E., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **241**, 663 (1966).
64. Shrago E., Lardy H. A., Nordlie R. C., Foster D. O., *J. Biol. Chem.* **238**, 3188 (1963).
65. Sols A., Salas M., Vinuela E., *Advan. Enzyme Reg.* **2**, 177 (1964).
66. Sölig H. D., Willms B., Friedrichs D., Kleineke J., *European J. Biochem.* **4**, 364 (1968).
67. Söling H. D., Willms B., Kleineke J., Gehlhoff M., *European J. Biochem.* **16**, 289 (1970).
68. Struck E., Ashmore J., Wieland O., *Advan. Enzyme Reg.* **4**, 219 (1966).
69. Subrahmanyam K., Joseph P. K., Natarajan P., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 246 (1967).
70. Utter M. F., Keech D. B., *J. Biol. Chem.* **238**, 2603 (1963).
71. Utter M. F., Keech D. B., Scrutton M. C., *Advan. Enzyme Reg.* **2**, 49 (1964).
72. Weber G., w *The Biological Bases of Medicine*, red. E. E. Bitter i N. Bitter, Academic Press, New York 1968, t. 2, str. 263.
73. Weber G., Allard C., De Lamirande G., Cantero A., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 618 (1955).
74. Weber G., Banerjee G., Bronstein S. B., *J. Biol. Chem.* **236**, 3106 (1961).
75. Weber G., Hird Convery H. J., Lea M. A., Stamm N. B., *Science* **154**, 1357 (1966).
76. Weber G., Lea M. A., Fisher E. A., Stamm N. B., *Enzymol. Biol. Clin.* **7**, 11 (1966).
77. Weber G., Lea M. A., Hird Convery H. J., Stamm N. B., *Advan. Enzyme Reg.* **5**, 257 (1967).
78. Weber G., Lea M. A., Stamm N. B., *Advan. Enzyme Reg.* **6**, 101 (1968).

79. Weber G., Singhal R. L., Srivastava S. K., *Advan. Enzyme Reg.* 3, 43 (1965).
80. Weber G., Singhal R. L., Srivastava S. K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 53, 96 (1965).
81. Weber G., Singhal R. L., Stamm N. B., Fisher E. A., Menten-diek M. E., *Advan. Enzyme Reg.* 2, 1 (1964).
82. Weber G., Singhal R. L., Stamm N. B., Lea M. A., Fisher E. A., *Advan. Enzyme Reg.* 4, 59 (1966).
83. Weber G., Srivastava S. K., Singhal R. L., *Life Sci.* 3, 829 (1964).
84. Weber G., Srivastava S. K., Singhal R. L., *J. Biol. Chem.* 240, 750 (1965).
85. Wieland O., Weiss L., Eger-Neufeldt I., *Advan. Enzyme Reg.* 2, 85 (1964).
86. Williamson J. R., *J. Biol. Chem.* 240, 2308 (1965).
87. Williamson J. R., *Advan. Enzyme Reg.* 5, 229 (1967).
88. Williamson J. R., w Metabolic Regulation and Enzyme Action, red. A. Sols i S. Grisolia, Academic Press, Londyn 1970, t. 19, str. 107.
89. Williamson J. R., Browning W. T., Olson M. S., *Advan. Enzyme Reg.* 6, 67 (1968).
90. Williamson J. R., Browning E. T., Scholz R., *J. Biol. Chem.* 244, 4607, 4617 (1968).
91. Williamson J. R., Browning E. T., Scholz R., Kreisberg R. A., Fritz I. B., *Diabetes* 17, 194 (1968).
92. Williamson J. R., Kreisberg R. A., Felts P. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 56, 247 (1966).
93. Williamson J. R., Wright P. H., Malaisse W., Ashmore J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 765 (1966).

MARIA JACHIMOWICZ*, TERESA SZYMCZYK**

Biologiczna rola kwasów sialowych

Biological Function of Sialic Acids

The present state of knowledge concerning function of sialic acids as an important component of some enzymes, hormones, antigens and receptors is reviewed. Significance of sialic acid tests in clinical diagnosis is discussed.

Kwas sialowy (termin ten będziemy w dalszym ciągu artykułu stosować jako określenie N-glikolilowych lub N-acetylowych pochodnych kwasu neuraminowego, których budowę, występowanie i metabolizm omówiliśmy poprzednio (73)) stanowi charakterystyczną składową związków o różnej strukturze i pochodzeniu i nadaje im określone własności chemiczne, immunologiczne i fizjologiczne. Informacje o biologicznej funkcji jaką nadaje substancjom obecność w nich jednej lub kilku reszt kwasu sialowego są fragmentaryczne i często kontrowersyjne. Stosunkowo wiele wiadomości nagromadzono o roli kwasu sialowego jako: nośnika ładunku, składnika antygenów, czynnika maskującego antygeny, receptora oraz czynnika warunkującego aktywność gonadotropiny i *intrinsic factor*.

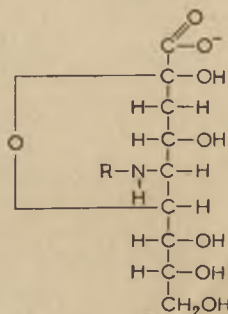
I. Rola kwasu sialowego jako nośnika ładunku

Kwas sialowy ze względu na obecność grupy karboksylowej (schemat 1) wykazuje własności anionu i nadaje ładunek ujemny wielu substancjom, w skład których wchodzi. Dotyczy to zarówno pojedynczych cząsteczek związku chemicznego (glikolipidy, glikoproteidy) jak i błon nienaruszonych komórek (7, 21, 30). Zmiany ładunku a zatem i szybkości poruszania się cząsteczki w polu elektrycznym zależą:

* Lek. dent., Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

** Dr med., Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: NANA — kwas N-acetyloneuraminowy, NGNA — kwas N-glikoliloneuraminowy, RDE — enzym niszczący receptor (ang. *receptor destroying enzyme*), ICSH — hormon gonadotropowy przedniego płata przysadki pobudzający komórki śródmiąższowe (ang. *interstitial cell stimulating hormone*), FSH — hormon gonadotropowy przedniego płata przysadki stymulujący pęcherzyki Graafa (ang. *follicle stimulating hormone*), HCG — hormon gonadotropowy łożyska, stymuluje produkcję estrogeny i progesteronu a wtórnie wzrost macicy (ang. *human chorion gonadotropin*).



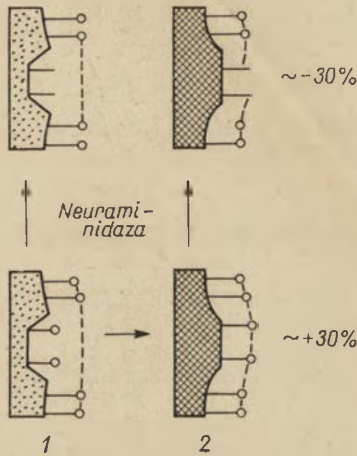
Schemat 1. Ogólny schemat budowy kwasów N-acetyloneuraminowych

a) od obecności i ilości reszt kwasu siałowego na powierzchni cząsteczki, b) od obecności wiązania typu laktonowego między dwiema resztami kwasu siałowego połączonymi wiązaniem α -ketozydowym (2 \rightarrow 8). Wiązanie laktonowe występuje w niektórych gangliozydach bogatych w kwas siałowy (43, 47, 48) oraz w kwasie kolominowym (52). Wiegandt (90) sugeruje, że wiązanie to w układzie biologicznym umożliwiałoby bardzo szybkie zmiany ładunku. Ostatnio uważa się, iż kwas siałowy jako składnik pewnych enzymów warunkuje ich polimorfizm (55, 59, 66). Są dane, że potwierdzony elektroforetycznie polimorfizm izoenzymów alkalicznej fosfatazy zależy od aktualnej zawartości kwasu siałowego w cząsteczce. Potraktowanie bowiem heterogennych frakcji tego enzymu neuraminidazą zmienia obraz elektroforetyczny zmniejszając migrację w kierunku anody cząsteczek, które utraciły kwas siałowy d. Na tej podstawie sugeruje się, że zasadnicze różnice między izoenzymami również i innych enzymów wynikają z różnych ilości związanego z cząsteczką kwasu siałowego. Saraswathi i Bachhawat (66) przypuszczają, że pewne izoenzymy powstają podczas przygotowywania homogenatów i wyciągów z tkanek jako wynik zadziałania wewnątrzkomórkowej neuraminidazy na natywny enzym zawierający kilka cząsteczek kwasu N-acetyloneuraminowego (NANA). Wskutek odłączenia cząsteczek kwasu siałowego może powstać kilka frakcji enzymów różniących się ilością grup karboksylowych a więc heterogennych w polu elektrycznym, przy zachowaniu niezmięnionej kinetyki katalizowanej przez nie reakcji. Ma to oczywiście miejsce wtedy, gdy kwas siałowy nie jest składnikiem centrum aktywnego enzymu.

W ostatnich kilku latach zwrócono uwagę na szczególną rolę kwasu neuraminowego w komórkach nowotworowych (33, 67, 68, 78). W guzach mózgu typu glioma i meningioma (67, 68, 76, 78) kwas ten stanowi terminalną komponentę nowotworowego glikolipidu. Zmieniony topochemiczny układ glikolipidów i gangliozydów błony komórkowej daje w efekcie przegrupowania przestrzenne na jej powierzchni, co zmienia wielkość powierzchniowego ładunku błony. Zwiększenie ujemnego ładunku w porównaniu do komórki normalnej jest zmianą typową dla komórki nowotworo-

wej (1, 23, 24, 64, 77, 78, 83, 91).

Pomiary ładunku powierzchniowego komórek zdrowych i nowotworowych wątroby przed i po działaniu neuraminidazą, ujawniły znaczenie kwasu neuraminowego jako nośnika grup naładowanych ujemnie (schemat 2). Komórki normalne pod wpływem neuraminidazy nie wykazywały żadnych zmian w wielkości ładunku, ponieważ odłączały się cząsteczki kwasu neuraminowego leżące w głębi błony komórkowej. Natomiast w komórkach nowotworowych, przewyższających komórki normalne wielkością ładunku ujemnego o $\sim 30\%$, po działaniu neuraminidazą obserwowano zmniejszenie ładunku o $\sim 30\%$. Spowodowane to było utratą cząsteczek kwasu neuraminowego położonych bardziej powierzchniowo w błonie komórkowej.



Schemat 2. Topochemiczne rozmieszczenie nosicieli ładunku ujemnego w błonach komórek wątroby: normalnych i nowotworowych (wg 77)

1 — komórka normalna, 2 — komórka nowotworowa, —○ reszty cukrowe z terminalnie związanym kwasem siałowym, —● inne grupy kwasowe, - - - dzeta potencjał

Komórki nowotworowe dzięki zwiększonej zawartości kwasu neuraminowego nie wywołują wzrostu antygenowości w ustroju. Wynika to z „ukrycia” struktury antygenowej zmienionym ładunkiem powierzchniowym oraz z zamaskowania cząsteczką kwasu neuraminowego, którego organizm nie jest zdolny rozpoznać jako obcego. Trudno dostępną immunologicznie komórkę nowotworową zachowuje się więc jak „idealnie dopasowany pasożyt” (78).

Po inkubacji komórek nowotworowych nerki chomika z substancjami zasadowymi (histony, polilizyna i inne) ich wysoki ładunek ujemny zmniejsza się do wartości normalnej, po czym wzrost zostaje zahamowany do granic zbliżonych do normy. Zaczęto z tym początkowo wiązać, niestety złudne, jak się okazało, nadzieje na efektywne niszczenie guzów (cyt. wg 78).

Kwas sialowy w centralnym układzie nerwowym rozpowszechniony jest jako składnik strukturalny gangliozydów. Według obliczeń Wolfe'a (92) neuron zdrowego ludzkiego mózgu zawiera 5×10^{10} cząsteczek gangliozydów. Przeciętnie na cząsteczkę gangliozydu przypada 2 cząsteczki kwasu neuraminowego — tak więc ilość zdolnych do jonizacji grup karboksylowych w neuronie byłaby rzędu 10^{11} . Skłania to do zastanowienia się nad znaczeniem kwasu neuraminowego dla funkcji błon nerwowych.

Wyniki badań nad podkomórkową lokalizacją gangliozydów tkanki nerwowej wskazują na udział tych związków w przenoszeniu bodźców nerwowych (18, 38, 46, 74, 75). Kompleksy glikolipido-sialoproteidowe zlokalizowane są głównie we frakcji synaptosomalnej, a istotną rolę w przewodnictwie nerwowym odgrywają zjonizowane i zlaktonizowane grupy karboksylowe kwasu neuraminowego, który jako determinujący składnik wspomnianego kompleksu błony neuronu działa jako receptor kationów: Na^+ i K^+ (27).

Zmiany w poziomie gangliozydów (zarówno w kierunku nagromadzenia jak i ubytku) mogą być przyczyną znacznego upośledzenia funkcji mózgu (idiotyzm) (78).

II. Rola kwasu sialowego jako składnika antygenów

Eryocyty ludzkie zawierają mukoidy bogate w kwas sialowy, dzięki któremu przejawiają własności antygenowe grupy krwi M i N. Podstawą swoistości serologicznej antygeny M i N w krwi człowieka są terminalnie położone cukrowce. Wspólną dla M i N determinantą antygenową jest kwas N-acetylneuraminowy. Determinanta M zawiera dodatkową drobinę NANA, po utracie której staje się antygenem N. Kwas sialowy antygeny M i N pod wpływem neuraminidazy ulega oderwaniu, co pociąga za sobą utratę aktywności serologicznej (5). O aktywności immunologicznej substancji grupowych krwi M i N decyduje jednak nie tylko kwas sialowy. Oprócz niego muszą istnieć specyficzne układy strukturalne w aminokwasach rozmieszczonych w sąsiedztwie. Szczególne znaczenie przypisuje się lizynie z wolną grupą ϵ -aminową. Lisowska i Morawiecki (50) stwierdzili, że po utracie wolnej grupy NH_2^+ lizyny zanika antygenowość erycytu. Nie ustalono, czy grupa ta zaangażowana jest bezpośrednio w wiązanie przeciwciała, czy też oddziałując elektrostatycznie na cząsteczkę kwasu sialowego usztywnia przestrzennie kwas N-acetylneuraminowy lub cały łańcuch węglowodanowy stanowiący fragment cząsteczki odpowiedzialnej za aktywność i swoistość. Tak więc kwas sialowy jest głównym składnikiem grupy determinującej, ale jako antygen może działać tylko w powiązaniu z innymi strukturalnymi czynnikami cząsteczki.

Według Uhlenbruck'a i Pardoe'a (79) jedynym wypadkiem, gdzie immunodeterminantą jest wyłącznie kwas sialowy są receptory erytrocytowe $\text{M}^{\text{duck-kaczki}}$. Kwas N-acetylneuraminowy nie może być za-

stąpiony przez N-glikoliloneuraminowy (NGNA). Po zadziałaniu neuraminidazą na erythrocyty kaczki ginie ich zdolność do aglutynacji.

W celu sprawdzenia immunogenności kwasu sialowego wprowadzono do badań sztuczny antygen NANA-ovoalbumina (78). Podając ten antygen królikom (przy zastosowaniu pełnego adiuwantu Freund'a) należało spodziewać się autoimmunizacji zwierząt doświadczalnych, ponieważ prawie wszystkie komórki ciała mają na swej powierzchni kwas sialowy. Gdyby powstały przeciwciała skierowane przeciw kwasom sialowym, to musiałyby reagować z kwasem neuraminowym rozpowszechnionym w organizmie, a więc np. z kwasem sialowym erythrocytów. Wszystkie zwierzęta przeżyły jednak ponad 8 tygodni bez objawów autoimmunizacji. Testy hemaglutynacyjne surowicy przeciwko różnym erythrocytom z cząsteczkami NANA na powierzchni wypadły również ujemnie. Zbadane antysurowice zarówno przeciw erythrocytom z NANA jak z NGNA na powierzchni we wszystkich przypadkach miały to samo miano co przed immunizowaniem. Także immunodyszfuzja nie ujawniła żadnych specyficznych przeciwciał przeciwko sztucznemu antygenowi czy też przeciwko mukoidom erythrocytów lub innym związkom zawierającym NANA. Stwierdzone zmiany w obrazie immunoelektroforezy (przesunięcie w kierunku anody) można wytłumaczyć zwiększeniem ujemnego ładunku ovoalbuminy po przyłączeniu NANA. Zaobserwowano również słabe zamaskowanie pierwotnie istniejących antygenowych grup ovoalbuminy.

Zatem wprawdzie odłączenie kwasu sialowego inaktywuje odpowiedni antygen, ale nie udało się wykazać wzrostu antygenowości białka przez wprowadzenie cząsteczki kwasu sialowego (jako haptenu). Zaobserwowano raczej obniżenie własności immunologicznych poprzez zobojętnienie ładunku i zamaskowanie struktury antygenowej białka. Z przedstawionych wywodów wynika, że u kręgowców najprawdopodobniej nie tworzą się przeciwciała przeciwko samemu kwasowi sialowemu. Równałoby się to immunologicznej autoagresji spowodowanej rozpowszechnieniem pochodnych kwasu neuraminowego w ustroju.

III. Rola kwasu sialowego jako czynnika maskującego antygeny (Friedenreicha i Pseudo-Friedenreicha)

Jak już wspomniano, w badaniach nad sztucznym antygenem (NANA-ovoalbuminą) zauważono, że wprowadzenie cząsteczki NANA zamaskowało pierwotne antygenowe grupy ovoalbuminy. Zamaskowany antygen, który po zadziałaniu neuraminidazą w wyniku odsłonięcia grupy determinującej zdolny jest wchodzić w reakcję z przeciwciałem, nosi nazwę antygeny Friedenreicha (78). Antygen taki może być ponownie zablokowany przez przeniesienie cząsteczki kwasu sialowego pod działaniem sialilotransferazy. Te antygeny, które po potraktowaniu neuraminidazą zwiększają

lub uzyskują *de novo* własności antygenowe spotykamy jako antygeny erytrocytowe, transplantacyjne, nowotworowe, a może nawet jako antygeny normalnych komórek ciała (65).

W komórkach nowotworowych antygenowy profil powierzchniowy w dużej mierze zamaskowany jest przez kwasy sialowe, bądź to w wyniku powiązania pochodnej kwasu neuraminowego bezpośrednio wiązaniem chemicznym z determinantą, bądź też przez elektrostatyczne oddziaływanie na układ przestrzenny co stwarza niedogodne odległości między receptorem, a przeciwciałem (78).

Odczepienie kwasu sialowego może więc znosić własności immunologiczne (np. niektórych antygenów grupowych krwi, rozdział II) lub też podwyższać je bądź wywoływać *de novo*. Kwasy sialowe znalazły w związku z tym zastosowanie w badaniach nad receptorami antygenów.

Rozważając możliwości oddziaływania kwasu neuraminowego jako receptora Burger (8) zaproponował pięć alternatywnych jego połączeń z przeciwciałem. Może być tak, że aglutynina nie tylko jest „niespecyficznie” wiązana przez kwas neuraminowy, ale także „specyficznie” reaguje z drugim receptorem.

Kwas sialowy może tak wpływać na konformację cukru, że umożliwia jego reakcję z przeciwciałami. Może również zaistnieć układ, w którym kwas sialowy usztywniony przestrzennie przez część cukrową lub grupę aminową aminocukru działa jako część antygeny. Poza tym kwas sialowy i reszta cukrowa mogą wspólnie tworzyć kompleks antygenowy lub receptor. Wyjątkowo antygen lub receptor może składać się wyłącznie z terminalnego kwasu sialowego. We wszystkich omówionych wypadkach antygen czy receptor ulegają zniszczeniu pod działaniem neuraminidazy.

IV. Rola kwasu sialowego jako receptora myxowirusów, serotoniny oraz toksyny tężcovej

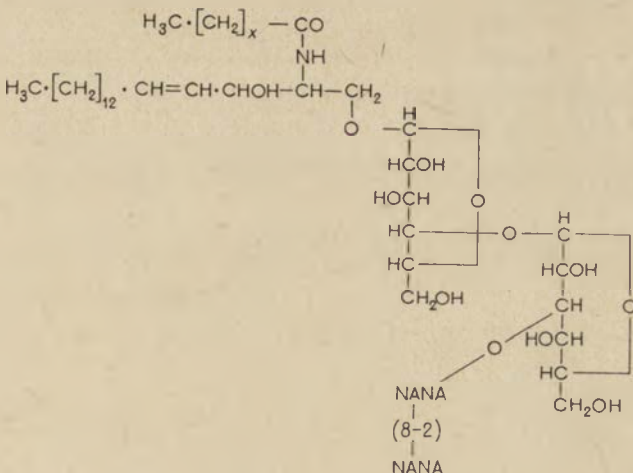
W znanym zjawisku aglutynacji wirusów grypy z erytrocytami (35) hemaglutynina łączy się w kompleks z receptorami dostępne ułożonymi na powierzchni czerwonych ciałek krwi. Ze związku tego wirus może eluować się nienaruszony, podczas gdy na powierzchni erytrocytu zachodzą nieodwracalne zmiany, w wyniku których traci on charakterystyczną dla siebie ruchliwość elektroforetyczną. Burnet i Stone (10) w przesączach kultur wirusowych wykazali obecność enzymu niszczącego receptor otoczki erytrocytu (ang. *receptor destroying enzyme*, w skrócie RDE). Enzym niszczący receptor na powierzchni erytrocytu znaleziono (49a) również w przesączach hodowli bakterii (*Corynebacterium diphtheriae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Clostridium welchi*).

Według Klénka i wsp. (42, 44) poszukiwanym receptorem jest kwas N-acetyloneuraminowy. Efekty receptorowe mają miejsce jedynie w wy-

padku jego terminalnego α -ketozydowego połączenia z łańcuchem cukrowym glikoproteidów otoczki erythrocytu. Po odłączeniu NANA nikną własności adsorpcyjne w stosunku do wirusa oraz charakterystyczna ruchliwość elektroforetyczna nadawana erythrocytom przez silnie ujemny ładunek kwasu siałowego. Niektóre glikoproteidy zawierające kwas siałowy, w wyniku konkurencyjnego wiązania się ich z aglutyniną wirusa, hamują odczyn hemaglutynacyjny erythrocytu. Po enzymatycznym odczepieniu kwasu neuraminowego glikoproteidy tracą zdolność hamowania tego odczynu (9, 28, 40, 45, 57, 60, 61, 69).

Na podstawie tych danych można było sądzić, że receptorem wirusa grypy jest kwas siałowy otoczki erythrocytów, a zdolność wirusa do elucji wiąże się jednoznacznie z jego aktywnością neuraminidazową.

Jednak, gdy w 1957 roku wykryto nową postać wirusa grypy — A₂, który wykazując aktywność neuraminidazową w stosunku do rozpuszczalnych substratów nie eluował się z erythrocytów (14), powrócono do zagadnienia i przeprowadzono szereg nowych badań. Brak aktywności enzymatycznej w stosunku do kwasów siałowych powierzchni erythrocytu próbowano tłumaczyć niedogodnym przestrzennym rozlokowaniem receptorów na powierzchni czerwonych ciałek krwi. Zakładano również możliwość istnienia dodatkowych niesiałinowych receptorów dla nieeluującego się wirusa grypy. Wyniki prac C wietkowej i wsp. (17) prowadzone na szczepach wirusów Bar i Knop różniących się zdolnością do elucji, potwierdziły przypuszczenia o istnieniu drugiego receptora utrzymującego wirus na powierzchni erythrocytu po odczepieniu neuraminidazą kwasu siałowego. O możliwości istnienia receptora odmiennego od kwasu siałowego świadczy fakt, że preparaty glikoproteidów (GTH-Tamm-Horsfall) normalnie hamujących hemaglutynację, pozbawione kwasu neuraminowe-



Wzór I. Gangliozydowy receptor serotoniny (wg 27)

go zachowywały niezmienione własności hamujące (17). Również usunięcie kwasu neuraminowego z powierzchni erythrocytu nie powodowało pełnego zahamowania zakażenia komórki (32).

Podwaliny pod nowy rozdział w historii kwasu sialowego jako receptora, w tym wypadku serotoniny (5-hydroksytryptaminy) dały badania Woolley'a i Gommiego (93, 94). Autorzy ci stwierdzili, że gangliozydy wykazują własności specyficznego wiązania serotoniny (wzór I). Siła wiązania jest szczególnie duża w gangliozydach zawierających cząsteczkę dwuneuraminylo-laktozy. W wiązaniu serotoniny z receptorem przeszkadzają jony Ca^{2+} , rezerpina i minimalne stężenia pochodnych kwasu lysergowego (LSD). W normalnym ludzkim mózgu gangliozydy o zdolnościach receptorowych dla serotoniny zlokalizowane są w obszarach bogatych w serotoninę: w *hypocampus*, *hypothalamus*, *medulla oblongata*, *nucleus caudatus*. Gangliozydy te występują również w miejscach, gdzie reakcje fizjologiczne wywoływane są przez serotoninę: w błonie śluzowej żołądka szczura i świnki morskiej, w jelitach, w macicy, w płucach, w mięśniu gładkim szczura. W dużych ilościach występują one także w mózgu ryb i żab (26).

Badania izotopowe nad budową receptora serotoniny z mięśni gładkich dna żołądka szczura wykazały, że aktywny biologicznie receptor syntetyzowany jest z nieznanego jeszcze najprawdopodobniej makrocząsteczkowego prekursora oraz z NANA (86). Ubytek (enzymatyczne odszczepienie) kwasu sialowego z pola receptorowego tak zmienia konformację na tym obszarze, że wrażliwość na serotoninę maleje. Glikolipidy traktowane neuraminidazą tracą kolejno obie cząsteczki kwasu sialowego. Już wiązanie mononeuraminylowe nie wykazuje żadnych własności receptorowych. Wasemanni i Zilliken (85) donieśli, że dodanie NANA czy NGNA do tkanek poddanych uprzednio działaniu neuraminidazy, całkowicie przywraca ich wrażliwość na serotoninę.

Istnieje pewna niezgodność w opiniach różnych autorów odnośnie natury receptora serotoniny w mięśniu macicy. Woolley i Gommie (93) na podstawie faktu, że dodanie gangliozydów do tkanki poddanej preinkubacji z neuraminidazą częściowo przywraca właściwości receptorowe sugerują, że odpowiada za nie grupa gangliozydów. Natomiast Carroll i Sereida (11) w oparciu o badania własne oraz prace Wasemanna i Zillikena (85) twierdzą, że właściwymi receptorami serotoniny w mięśniach gładkich macicy są glikoproteidy, będące w tej tkance główną grupą związków zawierających kwas sialowy. Za takim poglądem przemawia też fakt, że neuraminidaza uwalnia przede wszystkim „nielipidowe” kwasy sialowe.

Wiązanie toksyny tężcowej przez tkankę mózgową znane jest od dawna (87). Ustalono, że komponentą, która specyficznie wiążąc toksynę tężcową inaktywuje ją, są gangliozydy (49, 81, 82). W zjawisku tym mamy prawdopodobnie do czynienia z agregacją podobną do tej, jaka zachodzi

między zasadowymi białkami a anionowymi gangliozydami. Zdolność wiązania toksyny tężcowej przez gangliozydy wzrasta wraz z liczbą cząsteczek kwasu sialowego w gangliozydzie (27).

V. Rola kwasu sialowego jako czynnika warunkującego aktywność niektórych hormonów oraz *intrinsic factor*

W cząsteczkach niektórych hormonów, np. gonadotropiny, erytropoetyny stwierdzono występowanie znacznych ilości kwasów sialowych (16). W gonadotropinie składnik cukrowy stanowi 45% cząsteczki, z czego 10% przypada na kwas sialowy. Cząsteczka erytropoetyny zawiera 16% kwasu sialowego, a część węglowodanowa wynosi 34% (62). Wiele danych wskazuje, że kwasy sialowe są istotną komponentą warunkującą aktywność biologiczną wymienionych hormonów (16, 31).

Już w 1948 roku Whitten (89) zauważył, że gonadotropiny przysadkowe ICSH i łożyskowe HCG tracą swoją aktywność biologiczną po zadziałaniu wirusem grypy lub RDE z *Vibrio cholerae*. Następnie stwierdzono, że preparaty gonadotropiny FSH poddane działaniu oczyszczonej neuraminidazy (sialidazy z *Vibrio cholerae*) traciły 97% aktywności biologicznej (6, 29). Brossmer i Wolter (6) wykazali metodą chromatografii bibułowej, że związkami odłączanymi w reakcjach inaktywujących hormony gonadotropowe są pochodne kwasu neuraminowego.

Kwas sialowy będąc składnikiem glikoproteidów śluzu żołądkowego bierze udział w zachowaniu aktywności biologicznej *intrinsic factor* — czynnika koniecznego dla resorpcji witaminy B₁₂. Po traktowaniu sialidazą — preparaty *intrinsic factor* tracą swoją funkcję biologiczną oraz stają się podatne na działanie enzymów proteolitycznych (22). Właściwości unieczynnionego neuraminidazą *intrinsic factor* można przywrócić zastępując kwas sialowy równie silnymi, ujemnie naładowanymi wymiennikami kationowymi. Niektórzy autorzy sugerują, że biologiczna rola kwasu sialowego, stanowiącego terminalną część receptora witaminy B₁₂ polega na ochronie tegoż receptora przed proteolizą, gdyż ani kwas sialowy ani wymiennik kationowy nie posiada specyficzności *intrinsic factor* (36).

Podobne działanie antyproteolityczne przypisują niektórzy autorzy α₁-glikoproteidom (96) i γ-globulinom (63) surowicy ludzkiej, jak również hormonom follikulostymulującemu i luteinizującemu (cyt. wg 27).

VI. Uwagi końcowe

Szerokie rozpowszechnienie kwasu sialowego w tkankach i płynach ustrojowych człowieka jako stałej, terminalnej komponenty cukrowej wielu glikolipidów i glikoproteidów (73), stało się podstawą wielu badań kli-

nicznych nad zależnością pomiędzy różnymi stanami chorobowymi, a stężeniem tego związku w surowicy lub w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Opracowano kilka metod i ich modyfikacji dla oznaczania kwasu sialowego, co wprawdzie umożliwiło bardziej wnikliwą analizę jego zmian, ale z drugiej strony, utrudniło ocenę porównawczą wyników otrzymywanych przez różne grupy badaczy (2, 19, 20, 53, 72, 84).

Do celów klinicznych wprowadzili testy sialowe Hess i Coburn (34). Doszli oni do wniosku, że zmiany zawartości kwasu sialowego w surowicy krwi pacjentów z ostrą chorobą reumatyczną, gruźlicą i nowotworami mogą być miarą ciężkości choroby.

Wzrost zawartości glikoproteidów w surowicy krwi jest wypadkową procesów destrukcyjnych i proliferacyjnych w tkance łącznej. Zawartość kwasu sialowego w surowicy może być zatem wskaźnikiem zachowania się glikoproteidów w schorzeniach tkanki łącznej, wątroby, tarczycy, reumatycznych, gośćcowych, nowotworowych, gruźlicy i innych.

Zmiany zawartości kwasu sialowego w mukoproteidach odgrywają istotną rolę w jednostce chorobowej określanej jako *mukoviscidosis*. Lepkość mukoproteidów zależy od stosunku dwóch terminalnych składników komponenty mukopolisacharydowej: kwasu sialowego — hydrofilowego i fukozy — zawierającej hydrofobowe grupy $-CH_3$. Obniżenie stosunku kwas sialowy: fukoza jest przyczyną wzrostu lepkości i skłonności do zagęszczania mukoproteidów (37).

Ponieważ 90—95% syntezy mukoproteidów zachodzi w wątrobie, a ilość kwasu sialowego ściśle odpowiada ilości mukoproteidów — upośledzenie wytwarzania tych związków przy różnych schorzeniach wątroby znajduje odbicie w obniżonej zawartości kwasu sialowego w surowicy (39, 41, 80).

Do zastosowania testów sialowych w badaniach nad schorzeniami centralnego układu nerwowego skłoniło wykrycie kwasu sialowego w mózgu ludzkim (41a, 71). Kwas sialowy jest typowym składnikiem gangliozydów (73). Zajmując w związkach tych położenie terminalne, w określonych warunkach ulega on odcepieniu i przez barierę krew-mózg przechodzi do płynu mózgowo-rdzeniowego i surowicy. Szczególnie dużo wysiłku poświęcono znaczeniu testów sialowych w diagnostyce schizofrenii oraz w przebiegu oligofrenii i epilepsji z niedorozwojem umysłowym (3, 4, 13, 54, 69, 95). Według Musila (56) źródłem atroficznych procesów w mózgu oraz obniżenia zawartości kwasu sialowego w płynie mózgowo-rdzeniowym jest niedobór kwasu pirogronowego, wynikający z niedostatecznej glikolizy beztlenowej. Pokrywa się to z wcześniejszymi sugestiami Bogocha i wsp. (4), którzy u podstaw schizofrenii dopatrują się chemicznej niedojrzałości mózgu.

Dla oceny dynamiki choroby reumatycznej test sialowy przedstawia większą wartość niż badania szybkości opadania krwinek czerwonych, czy poziom swoistych antystreptolizyn (25, 70).

Zmiany zawartości kwasu sialowego w surowicy krwi wybitnie nasilają się nie tylko w ostrej fazie, ale również w utajonym stadium choroby gościcowej (12, 19, 88). Z tego powodu test sialowy ma wielką wartość nie tylko w ocenie dynamiki procesu chorobowego, ale również dla wczesnego rozpoznania gościca przewlekłego postępującego w utajonym stadium choroby oraz w przypadkach o niepełnej symptomatologii klinicznej.

Badania kwasu sialowego w glikoproteidach i seromukoidzie przedstawiają też dużą wartość diagnostyczną w schorzeniach wątroby. Według K a n i a k a i wsp. (39) w przypadku wirusowego zapalenia wątroby przechodzącego w marskość testy sialowe przewyższają wartość oznaczeń enzymatycznych.

Natomiast oceny przydatności omawianego testu w diagnostyce chorób psychicznych i chorób mózgu nie są zgodne.

Badania z implantowanym rakiem *Walker 236* wykazały pewną korelację pomiędzy stopniem zaawansowania guza, jego lokalizacją, obecnością przerzutów, a poziomem w surowicy frakcji węglowodanowej (kwasu sialowego i heksoz) związanej z białkiem (51, 58). Autorzy sugerują możliwość swoistego odczynu ze strony cukrowych składników grupy prostetycznej na rozwijający się nowotwór. Wyniki prac C h y r e k --B o r o w s k i e j (15) potwierdzają powyższe spostrzeżenia, iż rozwijający się proces nowotworowy w znamieny sposób wpływa na poziom glikoproteidów surowicy krwi.

Szersze omówienie zagadnienia badań nad kwasem sialowym w wielu innych schorzeniach przygotowane zostało do druku jako odrębny artykuł.

LITERATURA

1. Abercrombie M., Ambrose A. J., *Cancer Res.* **22**, 525 (1962).
2. Boehm P., Baumeister L., *Klin. Wochschr.* **32**, 291 (1954).
3. Bogoch S., *Arch. Neurol. Psychiat.* **80**, 221 (1958).
4. Bogoch S., Dussik K. T., Conran P., *New Engl. J. Med.* **264**, 523 (1961).
5. Bratkowska-Seniów B., *Immunopatologia Kliniczna*, PZWL, Warszawa 1966, str. 6.
6. Brossmer R., Wolter K., *Klin. Wochschr.* **36**, 925 (1958).
7. Brünngraber E. G., Dekirmenjian H., Brown B. D., *Biochem. J.* **103**, 73 (1967).
8. Burger M. M. w *Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane*, The Wistar Institute Symposium Monograph Nr 8, red. L. A. Manson, Filadelfia 1968, cyt. wg (78).
9. Burnet F. M., *Ann. Rev. Microbiol.* **6**, 229 (1952).
10. Burnet F. M., Stone J. D., *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.* **24**, 1 (1946).
11. Carroll P. M., Sereda D. D., *Nature* **217**, 667 (1968).
12. Cellary J., *Med. Dośw.* **29**, 5 (1964).
13. Chistoni G., Zappeli K., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **35**, 707 (1959).
14. Choppin P. W., Tamm J., *J. Exptl. Med.* **112**, 895 (1960).
15. Chyrek-Borowska S., *Arch. Med. Wew.* **35**, 13 (1965).
16. Cwetkowa I. V., *Voprosy Med. Chimii* **1**, 3 (1961).

17. Cwetkowa I. V., Lipkind M. A., Zakstelskaja L. J., Jusipowa N. A., Rosenfeld E. L., *Biochimija* **32**, 994 (1967).
18. De Robertis E., Pellegrino de Iraldi A., Rodriguez C., Gomez C. J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 229 (1961).
19. Dżułyńska J., Pałowska - Wawrzyńska J., *Pol. Arch. Med. Wew.* **3**, 329 (1958).
20. Dżułyńska J., Piekarska Z., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **6**, 133 (1958).
21. Eylar E. H., Madoff M. A., Brody O. V., Oncley J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 6 (1962).
22. Faillard H., Pribilla W., *Klin. Wochschr.* **42**, 686 (1964).
23. Forrester J. A., Ambrose E. J., Mac Pherson I. A., *Nature* **196**, 1068 (1962).
24. Forrester J. A., Ambrose E. J., Stocker M., *Nature* **201**, 945 (1964).
25. Gębala A., Chwedorczuk B., *Przegl. Lek.* **25**, 292 (1969).
26. Gielen W., *Z. Naturforsch.* **22b**, 1007 (1966).
27. Gielen W., *Naturwissenschaften* **55**, 104 (1968).
28. Gottschalk A., *The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Compounds.* Cambridge University Press, Londyn 1960.
29. Gottschalk A., Whitten W. K., Graham E. R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 183 (1960).
30. Granzer E., Fuhrman G. F., Ruhenstroth G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **337**, 52 (1964).
31. Gröschel U., Hao Li Ch., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 375 (1960).
32. Haff B., Stewart R., *J. Immunol.* **94**, 842 (1965).
33. Hakomori S., Teather C., Andrews A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 563 (1968).
34. Hess E., Coburn A., *J. Clin. Invest.* **36**, 449 (1957).
35. Hirst G. K., *J. Exptl. Med.* **76**, 195 (1942).
36. Hoskins L. C., Zancheck N., *Gastroenterology* **44**, 456 (1965).
37. Houstek J., Vavrova W., *Čas. Lek. Česk.* **104**, 201 (1965).
38. Huxley A. F., *Angew. Chem.* **76**, 668 (1964).
39. Kaniak J., Mejbaum-Katzenellenbogen W., Jełewska-Kaniakowa Z., Kudrewicz-Hubicka Z., Kowal-Gierczak B., *Pol. Tyg. Lek.* **24**, 1953 (1969).
40. Kathan R. H., Winzler R. J., Johnson C. A., *J. Exptl. Med.* **113**, 37 (1961).
41. Kędrowa S., Szyszko B., *Pol. Tyg. Lek.* **22**, 1884 (1967).
- 41a. Klenk E., *Hoppe-Seylers Z., Physiol. Chem.* **268**, 50 (1941).
42. Klenk E., Faillard H., Lempfrid H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **301**, 235 (1955).
43. Klenk E., Hof L., Georgias L., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 149 (1967).
44. Klenk E., Lauenstein K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **291**, 147 (1952).
45. Klenk E., Uhlenbruck G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **319**, 151 (1960).
46. Kuhn R., Müldner H., *Naturwissenschaften* **51**, 635 (1964).
47. Kuhn R., Wiegandt H., *Chem. Ber.* **96**, 866 (1963).
48. Kuhn R., Wiegandt H., *Z. Naturforsch.* **18b**, 541 (1963).
49. Landsteiner K. i Botteri A., *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.* **42**, 562 (1906), cyt. wg (27).
- 49a. Laurell A. B., Broonestam R., *Acta Path. Microb. Scand.* **47**, 429 (1959).
50. Lisowska E., Morawiecki A., *European J. Biochem.* **3**, 237 (1967).
51. Macbeth R. A. L., Bekesi J. G., Tuba J., *Cancer Res.* **23/6**, 938 (1963).

52. McGuire E. J., Binkley S. B., *Biochemistry* **3**, 247 (1963).
53. Mejbaum-Katzenellenbogen W., Maskos Ch., Skrzypczyk J., Kudrewicz-Hubicka Z., *Pol. Tyg. Lek.* **23**, 161 (1968).
54. Michajłowa K. M., *Zh. Nevpropat. Psikhist. Korsahow* **66**, 102 (1966).
55. Moss D., Eaton R. H., Smith J. H., Whitby L. G., *Biochem. J.* **98**, 32c (1966).
56. Musil J., *Cas. Lek. Česk.* **102**, 215 (1963).
57. Nagai X., Springer G. F., *Federation Proc.* **21**, 67 (1962).
58. Robert B., Robert L., Jayle M. F., *Experientia* **15**, 385 (1959).
59. Robinson J. C., Pierce J. E., *Nature* **204**, 472 (1964).
60. Romanowska E., *Arch. Immunol. Therap. Exper.* **7**, 749 (1959).
61. Romanowska E., *Arch. Immunol. Therap. Exper.* **7**, 759 (1959).
62. Roseman S., *Federation Proc.* **21**, 1075 (1962).
63. Rosevaer J. W., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 425 (1961).
64. Ruhenstroth-Bauer G., Fuhrmann G. F., Granzer E., Kubler W., Rueff F., *Naturwissenschaften* **49**, 363 (1962).
65. Sanford B. H., *Transplantation* **5**, 1273 (1967).
66. Saraswathi S., Bachhawat B. K., *Biochem. J.* **107**, 185 (1968).
67. Seifert H., *Klin. Wochschr.* **44**, 469 (1966).
68. Seifert H., Uhlenbruck G., *Naturwissenschaften* **52**, 190 (1965).
69. Słowik St., *Neurol. Neurochir. Psych. Pol.* **15**, 241 (1965).
70. Stickl H., Aufmkolk H., *Z. Kinderhk.* **85**, 583 (1961).
71. Svennerholm L., *Acta Soc. Med. Upsal.* **62**, 1 (1957).
72. Svennerholm L., *Acta Chem. Scand.* **12**, 547 (1958).
73. Szymczyk T., Jachimowicz M., *Post. Biochem.* **17**, (1971).
74. Tanaka R., Strickland K. P., *Arch. Biochem.* **111**, 583 (1965).
75. Tettamanti G., Preti A., Lombardo A., Zambotti V., *FEBS Abstracts 1969*, str. 295.
76. Uhlenbruck G., *Bibliotheca Haematol.* **27**, 1 (1967).
77. Uhlenbruck G., Gielen W., *Die Medizinische Welt* **20** (nr 7), 3 (1969).
78. Uhlenbruck G., Gielen W., *Neurol. Psychiat.* **38**, 202 (1970).
79. Uhlenbruck G., Pardoe G. I., *Z. Naturforsch. Sect B* **24**, 142 (1969).
80. Urbaszek W., *Z. Inn. Med.* **19**, 617 (1964).
81. Van Heyningen W. E., Mellanby J., *J. Gen. Microbiol.* **52**, 447 (1968).
82. Van Heyningen W. E., Miller P. A., *J. Gen. Microbiol.* **24**, 107 (1961).
83. Wallach D. F. M., Eylar E. H., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 594 (1961).
84. Warren L., *J. Clin. Invest.* **38**, 755 (1959).
85. Wasemann W., Zilliken F., *Liebigs Ann. Chem.* **695**, 209 (1966).
86. Wasemann W., Zilliken F., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **349**, 823 (1968).
87. Wassermann A., Takaki T., *Berlin. Klin. Wochschr.* **35**, 5 (8198).
88. Wawrzyńska-Pągowska J., Dżułyńska J., *Pol. Tyg. Lek.* **17**, 43 (1962).
89. Whitten W. K., *Australian J. Sci. Res. Ser. B* **1**, 388 (1948).
90. Wiegandt W. H., *Ergeb. Physiol.* **57**, 190 (1966).
91. Witebsky E., *Z. Immunol. Allergie Forsch.* **62**, 35 (1929).
92. Wolfe L. S., *Can. J. Biochem.* **42**, 971 (1964).
93. Wooley D. W., Gommi B. W., *Nature* **202**, 1074 (1964).
94. Wooley D. W., Gommi B. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 959 (1965).
95. Wooley D. W., Gommi B. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 191 (1966).
96. Yamashina I., *Acta Chem. Scand.* **10**, 1666 (1956).

JÓZEF BIELAWSKI*

Elektroda tlenowa i jej zastosowanie w badaniach procesów życiowych

Oxygen Electrode and Its Application in Investigations of Life Processes

Different types of oxygen electrodes are described. The use of these electrodes in measuring the oxygen concentration in blood, the rate of respiration and the kinetics of oxidation-reduction processes are discussed.

W miarę automatyzacji badań fizjologicznych oraz konieczności stosowania ciągłej rejestracji w badaniach kinetyki procesów biochemicznych, coraz częściej sięga się do metod instrumentalnych. Do takich metod o podstawowym znaczeniu dla badania procesów życiowych należą metody elektrochemicznego oznaczania stężenia tlenu. Metody te, ciągle ulepszone, doczekały się szeregu rozwiązań technicznych. Często przystosowanie urządzenia do specjalnych celów, zwiększenie dokładności czy stabilności pomiarów, pociąga za sobą znaczną komplikację w konstrukcji. Eksperymentator powinien się w tym orientować, aby wybrać do swoich celów możliwie proste urządzenie, które tym samym sprawi mu najmniej kłopotów podczas eksploatacji.

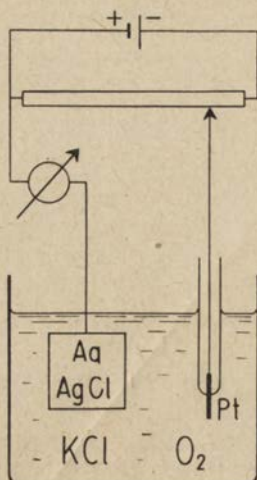
W artykule tym zwrócono więc szczególną uwagę na praktyczne konsekwencje różnych rozwiązań konstrukcyjnych. Podstawy teoretyczne amperometrii i polarografii oraz niektóre zastosowania elektrody tlenowej doczekały się bowiem szeregu opracowań (10, 57, 70, 103, 109).

I. Urządzenie pomiarowe

Zasadnicze urządzenie służące do pomiaru stężenia tlenu przedstawia schemat 1. Składa się ono ze źródła prądu, potencjometru, galwanometru i dwóch elektrod zanurzonych w roztworze elektrolitu (KCl) zawierającym tlen. Polaryzująca się katoda (Pt) jest elektrodą pomiarową, a niepolaryzująca się anoda (Ag-AgCl) stanowi elektrodę porównawczą.

Krzywa zależności natężenia prądu od przyłożonego napięcia daje tak zwaną falę polarograficzną (rysunek 1, krzywa A). Natężenie prądu dyfu-

* Doc. dr hab., Zakład Cytologii i Histologii, Instytut Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

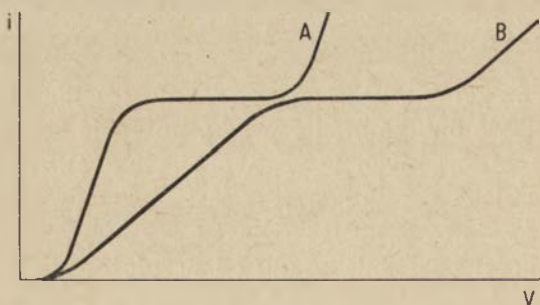


Schemat 1. Urządzenie pomiarowe

zyjnego mierzy się poza falą polarograficzną tlenu w zakresie potencjałów, w którym krzywa jest równoległa do osi odciętych. W tym zakresie natężenie prądu dyfuzyjnego jest proporcjonalne do stężenia tlenu.

Elektrolit zapewnia mały opór elektryczny badanego roztworu. W przypadku małego stężenia elektrolitu opór elektryczny może spowodować przesunięcie fali polarograficznej w kierunku bardziej ujemnego potencjału (rysunek 1, krzywa B). W tym przypadku krzywa kalibracyjna (krzywa zależności natężenia prądu od stężenia tlenu) nie będzie linią prostą. Przesunięcie fali zależy od natężenia prądu dyfuzyjnego i tym samym zwiększa się wraz ze stężeniem tlenu (38, 72) oraz powierzchnią katody (100, 101).

Podczas analizy na katodzie następuje redukcja tlenu najpierw do nadtlenu wodoru, a następnie do wody. Na katodzie rtęciowej oba procesy zachodzą przy różnym potencjale dając dwie fale polarograficzne. Natężenie prądu dyfuzyjnego obu fal jest proporcjonalne do stężenia tlenu. Na



Rys. 1. Schematyczny wykres wpływu stężenia elektrolitu na krzywą zależności natężenia prądu od napięcia

A — w obecności dużego stężenia, B — w obecności małego stężenia elektrolitu

katodzie platynowej nie ma zróżnicowania obu fal i ilość wytworzonego nadtlenu wodoru zależy od przyłożonego napięcia (29).

Podczas pełnej redukcji tlenu do H_2O prądowi o natężeniu $1\mu A$ w ciągu minuty towarzyszy ubytek $0,16nmoli O_2$. Jest to ilość tlenu zawarta w $0,53\mu l$ wody wysyczonej powietrzem w temperaturze 20° . Wartość ta jest na tyle duża, że w niektórych pomiarach zużycie tlenu przez elektrodę należy brać pod uwagę (18).

II. Anoda

Budowa anody w zasadzie nie odbiega od budowy powszechnie stosowanych elektrod porównawczych. Anoda nie powinna ulegać polaryzacji i dlatego jej powierzchnia musi być dostatecznie duża w stosunku do przepływającego prądu. Natężenie prądu dyfuzyjnego zależy z kolei od powierzchni i innych parametrów katody.

Potencjały najczęściej stosowanych elektrod porównawczych różnią się między sobą prawie o $0,2V$ (50, 70) i dlatego dobrze jest dla danego układu wyznaczyć krzywą zależności natężenia od przyłożonego napięcia.

W klasycznej polarografii powszechnie stosowaną anodą jest rtęć, która wyciekła z katody (50). Jest ona wygodna w przypadku stosowania katody kropłowej, gdyż stanowi naturalny odpływ rtęci. Potencjał takiej elektrody może się jednak zmieniać w zależności od składu chemicznego badanego roztworu. Podczas długotrwałych pomiarów w niektórych roztworach powierzchnia rtęci może pokrywać się nalotem wytrąconym z roztworu podczas przepływu prądu, co może zmieniać jej charakterystykę. Ponadto rtęć metaliczna działa toksycznie na niektóre organizmy (51).

Najszerze zastosowanie w pomiarach biologicznych znalazła elektroda chlorosrebrowa. Można ją wprowadzić wprost do środowiska, w którym zachodzi reakcja, a dzięki łatwej obróbce mechanicznej można jej kształt dostosować do urządzenia pomiarowego. W najprostszym przypadku jest to drut srebrny, pokryty $AgCl$. Potencjał tej elektrody zależy w niewielkim stopniu od składu chemicznego środowiska.

Przy długotrwałym używaniu anody chlorosrebrowej zachodzi jej utlenianie, przez co pokrywa się ona Ag_2O i tym samym zmienia potencjał (16). Anoda chlorosrebrowa jest również wrażliwa na pewne substancje chemiczne, które powodują tak zwane jej zatrucie. Do nich należą pochodne cysteiny (36, 105). Vos i wsp. (105) przestrzegają również przed szkodliwym działaniem cyjanków, żelazicyjanków, azydków i jodków na elektrodę chlorosrebrową.

Kontakt anody z badanym roztworem można uniknąć stosując anodę zewnętrzną. Elektroda znajduje się wówczas w odpowiednim roztworze elektrolitu i połączona jest z badanym roztworem poprzez mostek agar-

wy czy spiekane szkło o dostatecznie małym oporze elektrycznym (5, 11, 13, 44, 88, 95, 101, 105). Często stosowaną elektrodą zewnętrzną jest elektroda kalomelowa.

Dla uniknięcia oczyszczania elektrody chlorosrebrowej z produktów utleniania zastosowano zewnętrzną elektrodę $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{O}$ z 0,5M KOH jako płynem elektrodowym (12, 16, 42).

W celu uniknięcia przyłączania zewnętrznego źródła prądu zastosowano anody zewnętrzne wykonane z metali, które w odpowiednich roztworach tworzą z katodą ogniwo elektryczne o potencjale wystarczającym do redukcji tlenu (81, 100, 101). W badaniach laboratoryjnych źródło prądu nie nastręcza zwykle większych trudności, więc stosowanie tego rodzaju anod nie jest wygodne.

III. Katoda kropłowa

Właściwym czujnikiem tlenowym jest katoda i dlatego ta elektroda podlega najczęstszym modyfikacjom. Dla osiągnięcia dobrej polaryzacji wykonuje się ją z odpowiedniego metalu. Na polerowanej powierzchni metalu zachodzi zjawisko nadnapięcia wodoru, dzięki któremu redukcja wodoru przesunięta jest w kierunku bardziej ujemnych potencjałów. Pozwala to na stosowanie wyższego napięcia podczas analizy tlenu. Wartość nadnapięcia zależy między innymi od rodzaju metalu. Od platyny większe nadnapięcie wykazuje złoto, a jeszcze większe rtęć (18, 28). Wyższe nadnapięcie korzystne jest zwłaszcza podczas analizy roztworów o małym stężeniu elektrolitów, w których spadek napięcia może spowodować zniekształcenie krzywej kalibracyjnej w wyższych stężeniach tlenu.

Z powyższego wynika, że katoda rtęciowa powinna być najkorzystniejsza. Stała elektroda rtęciowa jest jednak bardzo niewygodna i dlatego w klasycznej polarografii wprowadzono katodę kropłową, zbudowaną z kapilary o średnicy 0,04mm, z której kroplami wycieka rtęć (50). Powierzchnia takiej elektrody stale się odnawia, co zapewnia dużą jej stabilność i reproduktywność.

W znanych warunkach elektrodę taką można używać bez kalibrowania. Ciągłe kapanie rtęci ma jeszcze jedną zaletę. Powoduje ono stałe równomierne mieszanie roztworu w sąsiedztwie katody tak, że prąd dyfuzyjny ustala się bardzo szybko. Małe zakłócenia mechaniczne mają przez to stosunkowo mały wpływ na wyniki (11, 68). Zbyt intensywne mieszanie i wstrząsy mogą jednak wprowadzić zakłócenia w kropleniu.

Jeżeli w badanym roztworze znajdują się nierozpuszczalne węglany, to przy długotrwałym używaniu mogą się one wytrącać u ujścia kapilary i w ten sposób zmieniać jej charakterystykę (13, 32, 95). Osad taki łatwo się usuwa przez zanurzenie kapilary w roztworze kwasu.

Na katodzie rtęciowej tlen redukuje się dwustopniowo dając dwie fale polarograficzne. Natężenie prądu dyfuzyjnego obu fal jest proporcjonalne do stężenia tlenu. Natężenie prądu dyfuzyjnego można zatem mierzyć albo przy potencjale około $-0,4V$ (5, 38, 72), albo przy potencjale około $-1,6V$ (11, 13, 32, 72). Pod koniec pierwszej fali występuje tak zwane maksimum tlenowe. Jest to wzrost natężenia prądu występujący na skutek ubocznych procesów zachodzących na katodzie kroplowej. Zjawiska tego można uniknąć mierząc prąd dyfuzyjny drugiej fali. W tym przypadku spadek potencjału w roztworze jest większy. Maksimum nie występuje, gdy w badanym roztworze znajdują się niewielkie ilości białka lub niektórych innych związków powierzchniowo czynnych. Należy jednak pamiętać, że substancje powierzchniowo czynne w dużych stężeniach mogą zniekształcać falę polarograficzną (68). Maksimum tlenowe nie występuje również w wyższych stężeniach elektrolitów. W przypadku wody morskiej wystarcza zasolenie równe 1‰ (38, 88).

Na dyfuzję tlenu, a tym samym na natężenie prądu dyfuzyjnego, ma wpływ temperatura. Zmiana temperatury o 1° w okolicy $20^\circ C$ powoduje zmianę natężenia o około 1,4‰ (11, 72, 88, 91).

Krzywa kalibracyjna (krzywa zależności natężenia prądu od stężenia tlenu) dla prądu dyfuzyjnego obu fal jest linią prostą, nie przechodzącą przez zero układu współrzędnych. Ciągłe ładowanie spadających kropeł rtęci powoduje bowiem stały przepływ tak zwanego prądu pojemnościowego.

Oprócz elektrod używanych w klasycznej polarografii zastosowano do badań natlenienia elektrody kroplowe o większym przepływie rtęci (13, 32, 56). Są to kapilary o średnicy do 1 mm ustawione ukośnie ku górze. Dają one większy prąd dyfuzyjny, a osadzanie się węglanów przy ujściu rtęci w znacznie mniejszym stopniu zniekształca wyniki.

IV. Katoda stała

Katoda stała ma szereg zalet w porównaniu z kroplową i dlatego w badaniach biologicznych stosowana jest najczęściej. Prąd dyfuzyjny mierzy się zwykle przy potencjale około $-0,6 V$. Przy takiej elektrodzie powstaje głęboki gradient stężenia tlenu w badanym roztworze i dlatego prąd dyfuzyjny ustala się bardzo długo, a małe nawet wstrząsy mogą mieć duży wpływ na wyniki. Z tego względu podczas pomiarów należy wytworzyć równomierny ruch badanego płynu przy powierzchni elektrody. Często stosowany sposób polega na wprowadzeniu katody w ruch obrotowy (2, 44, 57, 62, 107). W tym przypadku pewne trudności techniczne nastęca kontakt elektryczny między elektrodą a przyrządem pomiarowym. Inną modyfikacją systemu poruszania elektrody jest wprowadzenie jej w ruch wibrujący (21, 46, 70). System pośredni zastosował Longmuir (63):

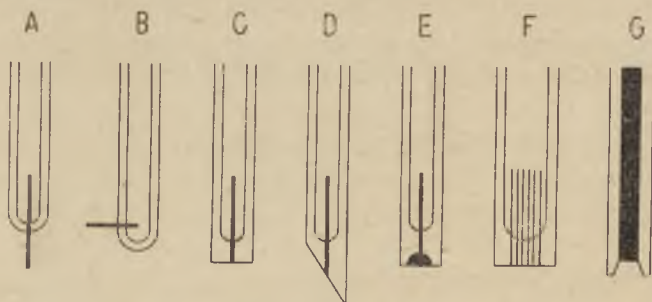
elektrodą umocowaną w elastycznym korku poruszał on w ten sposób, że zataczała okręgi bez obracania się dookoła własnej osi.

Dalsze modyfikacje szły w kierunku pozostawienia elektrody nieruchomo i poruszania płynu w bezpośrednim jej otoczeniu. Tu również znaleziono szereg rozwiązań technicznych jak: obracanie naczynka pomiarowego (89), mieszanie za pomocą mieszadła elektromagnetycznego (22, 52) czy wreszcie umieszczenie elektrody pomiarowej w strumieniu przepływającej cieczy (1, 12).

We wszystkich tych przypadkach natężenie prądu dyfuzyjnego wzrasta asymptotycznie ze wzrostem szybkości ruchu cieczy koło powierzchni elektrody (1, 2, 63). Kształt elektrody może mieć bardzo duży wpływ na ten wzrost (1). Przy niewielkim ruchu cieczy trzeba więc uważać, aby jego szybkość była stała albo też należy mierzyć przy dużych szybkościach, gdy niewielkie wahańa szybkości ruchu cieczy nie mają już wpływu na prąd.

Najprostszą elektrodą jest drut platynowy lub złoty, wtopiony w rurkę szklaną (schemat 2A). Przy elektrodzie wirującej korzystne jest wtopienie tego drutu z boku (schemat 2B), co przy tych samych obrotach samej elektrody zwiększa szybkość poruszania płynu koło powierzchni. Wadą tych elektrod jest stosunkowo trudne ich oczyszczanie. Zeszlifowanie drutu razem ze szkłem (schemat 2C) pozwala na czyszczenie elektrody bez zmiany pola jej powierzchni (14, 41, 71). Ukośne zeszlifowanie (schemat 2D) (44) oraz stopienie drutu w kulkę na końcu elektrody (schemat 2E) (105) pozwala na zwiększenie powierzchni przy niewielkiej grubości drutu. Cofnięcie elektrody w oprawie (schemat 2G) i, w większym jeszcze stopniu, wypełnienie wolnego miejsca odpowiednim żelom zmniejsza wrażliwość elektrody na ruch badanej cieczy i zmniejsza wpływ lepkości tej cieczy na wyniki, co ma szczególne znaczenie dla badania tkanek *in situ* (29).

Wrażliwość elektrody na ruch badanej cieczy i na stężenie elektrolitów maleje w miarę zmniejszania się jej powierzchni. Małe elektrody wymagają jednak stosowania bardzo czułych przyrządów pomiarowych. W praktyce stosowano elektrody o powierzchni od wielu cm^2 (100) do powierzchni koła o średnicy $1\mu\text{m}$ (34). Zalety małych elektrod przy stosun-



Schemat 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G. Typy elektrod stałych. Objaśnienie w tekście

kowo dużej powierzchni mają elektrody wykonane z wielu, odpowiednio rozmieszczonych cienkich drutów (schemat 2F) (14, 71) lub elektroda spiralna (15).

Dla dobrego funkcjonowania elektrody duże znaczenie ma jej wykonanie. Drut powinien być dokładnie oczyszczony (wyprażony) i dokładnie wtopiony w szkło o współczynniku rozszerzalności termicznej możliwie zbliżonym do tego współczynnika dla metalu. Drobne nawet pęknięcia dają tak zwany prąd szczątkowy czyli prąd płynący przez elektrody w środowisku beztlenowym (7, 29, 73). Prąd ten można ostatecznie kompensować elektrycznie (97).

Ze względu na łatwiejszą obróbkę mechaniczną i możliwość wtapiania większych elektrod szkło zastępuje się często masami plastycznymi łączącymi się dobrze z metalem. Tu również trzeba zwracać szczególną uwagę na jakość wtopienia. Najlepsze wyniki dają żywice epoksydowe takie jak araldit (15, 18, 43, 73), czy polski epidian (12). Dla dobrze wykonanej elektrody prąd szczątkowy wynosi 0.

Na elektrodzie stałej łatwo osadzają się różne wytrącone z badanego roztworu substancje, które zmniejszają prąd dyfuzyjny. Do substancji tych zalicza się między innymi węglan wapnia, a przede wszystkim białka (7, 18, 44, 83, 105). Osad ten usuwa się częściowo przez zanurzenie elektrod w roztworze kwasu. Szybkość powstawania osadu można zmniejszyć stosując prąd pulsujący (73), względnie zmieniając na krótki czas prąd na przeciwny (2). Jeszcze bardziej stabilne wyniki daje prąd przemienny, gdy elektroda pomiarowa polaryzowana jest na przemian dodatnio i ujemnie (14, 31, 71, 79). Prąd mierzy się tylko pod koniec fazy, w której elektroda pomiarowa naładowana jest ujemnie. Pociąga to jednak za sobą komplikacje w konstrukcji przyrządu pomiarowego.

Przed osadzaniem się białek częściej chroni się katodę przez pokrycie jej warstewką ochronną. Najczęściej jest to kolodion, który nakłada się przez zanurzenie elektrody w odpowiednim jego roztworze (18, 31, 44). Szereg innych substancji znalazło również zastosowanie, na przykład agar (18), celuloza (105), polistyren (4, 73). Warstewka taka musi być bardzo cienka, aby droga dyfuzji tlenu przez nią była możliwie mała. Jej opór elektryczny powinien być również dostatecznie mały. Warstewka ochronna zmniejsza wrażliwość elektrody na mieszanie.

Krzywa kalibracyjna dla katod stałych jest linią prostą. W związku z brakiem prądu pojemnościowego krzywa ta przechodzi przez zero układu współrzędnych. W przeciwieństwie do elektrody kroplowej, stała elektroda wymaga zwykle częstego kalibrowania.

W badaniach kinetyki procesów życiowych ważna jest szybkość, z jaką czujnik rejestruje zmiany stężenia tlenu. Otóż po zmianie stężenia tlenu prąd dyfuzyjny zmienia się asymptotycznie do nowej wartości. Szybkość tej zmiany określa się praktycznie pewną wartością umowną. Najczęściej przyjmuje się czas, w którym po usunięciu tlenu z roztworu

nasyconego powietrzem prąd dyfuzyjny spada o 90%. Dla elektrody stałej, przy dostatecznie szybkiej zmianie badanego płynu, Davies (29) podaje wartość 0,5 msek. Pokrycie elektrody warstewką ochronną opóźnia oczywiście reakcję elektrody, przy czym wartość opóźnienia zależy od rodzaju i grubości warstewki okrywającej (34, 44, 73).

Podobnie jak w przypadku elektrody kroplowej na prąd dyfuzyjny ma wpływ temperatura. Wzrost temperatury o 1° w zakresie temperatur około 20°C wywołuje zmianę natężenia prądu o około 2,5% (14, 63).

V. Czujnik tlenowy Clarka

Udoskonalanie elektrod tlenowych szło w kierunku coraz to większej izolacji od badanego środowiska. Clark (25) wprowadził w tym względzie stosunkowo dużą innowację. Umieścił on obie elektrody wraz z cienką warstwą elektrolitu po jednej stronie błony, a badany roztwór po drugiej (schemat 3). W takim układzie prąd nie płynie już przez badany roztwór, a jedynie przez płyn elektrodowy. Można więc było zastąpić osłonki kolodionowe, o małym oporze elektrycznym i stosunkowo małej odporności mechanicznej, przez dostatecznie cienką hydrofobową błonę polietylenową.

W ten sposób elektroda nie mierzy stężenia tlenu bezpośrednio w badanym roztworze, lecz w roztworze elektrodowym. Do roztworu elektrodowego tlen dyfunduje jak gdyby poprzez warstewkę powietrza znajdującego się w rusztowaniu błony polietylenowej. Konsekwencją tego jest fakt, że prąd dyfuzyjny jest proporcjonalny nie do stężenia tlenu w badanym roztworze, a do jego parcjalnego ciśnienia (12). Stąd też roztwory, które w stanie nasycenia tlenem czy powietrzem zawierają różne ilości tlenu jak krew, roztwór fizjologiczny, czy roztwory soli o różnym stężeniu, wykazują zbliżony prąd dyfuzyjny (60, 61, 69, 83, 85). Niewielkie różnice w wielkości prądu dyfuzyjnego w tych roztworach spowodowane są prawdopodobnie różnicą lepkości roztworów. Gdy lepkość ta różni się niewiele, można wyznaczyć krzywą kalibracyjną dla jednego roztworu, a wyniki otrzymane dla innego roztworu mnożyć przez: α_s/α_0 , gdzie α_0 to współczynnik absorpcji Bunsena dla tlenu w roztworze standartowym, a α_s to ten sam współczynnik dla roztworu badanego (12).

W układzie Clarka, ze względu na większą komplikację w budowie czujnika, elektrody zatapia się zwykle w masach plastycznych. Ponieważ stosowane masy plastyczne jak i błony są hydrofobowe, dla lepszego kontaktu elektrycznego między elektrodami niektórzy autorzy wprowadzają krążek bibuły (7, 35, 36, 83, 97), waty szklanej (80) lub celofan (39, 99) o grubości kilkunastu do kilkudziesięciu mikrometrów. Krążek ten ma również zapobiegać wpływowi zakłóceń mechanicznych na prąd dyfuzyjny. Bibuła czy celofan zwiększają odległość, przez którą dyfunduje tlen

i dlatego stosuje się obecnie raczej płyn elektrodowy w postaci żelu, lub też dodaje się do tego płynu substancje zmniejszające napięcie powierzchniowe.

W czujniku Clarka prąd dyfuzyjny zależy już nie tylko od szybkości dyfuzji tlenu w płynie elektrodowym, ale również od dyfuzji poprzez błonę. Ta z kolei zależy od materiału, z którego błona jest wykonana oraz od jej grubości. W zasadzie stosuje się dwa rodzaje błon: polietylenowe (12, 30, 39, 83, 97) i teflonowe (35, 36, 39, 58, 61, 99). Zaletą teflonu jest jego większa przepuszczalność dla tlenu (52) oraz duża odporność termiczna, pozwalająca na sterylizację czujnika w autoklawie (36, 61). Błony te są jednak często porowate i w zasadzie trzeba je sprawdzać przed użyciem. Zwłaszcza w badaniach wpływu jonów na procesy życiowe wyciekanie płynu elektrodowego może wprowadzać znaczne zakłócenia. Błona polietylenowa jest wprawdzie mniej odporna termicznie, ale jonów nie przepuszcza.

Jako płyn elektrodowy stosuje się najczęściej roztwór KCl. Można go zastąpić roztworem buforowym (93), płynem Ringera (60, 83) czy roztworem KOH (12, 16).

Błona polietylenowa zmniejsza wrażliwość czujnika na mieszanie badanego roztworu. Czym większa odległość badanego płynu od katody, tym wpływ mieszania na natężenie prądu jest mniejszy. Na ustalenie się gradientu stężenia tlenu w błonie ma wpływ również wielkość powierzchni katody. Otóż elektroda reaguje na obecność tlenu na pewną odległość. Obrazowo można powiedzieć, że elektroda „widzi” na pewną odległość. Odległość ta wzrasta z wielkością elektrody i równa się w przybliżeniu sześciokrotnej średnicy elektrody o kształcie koła (34).

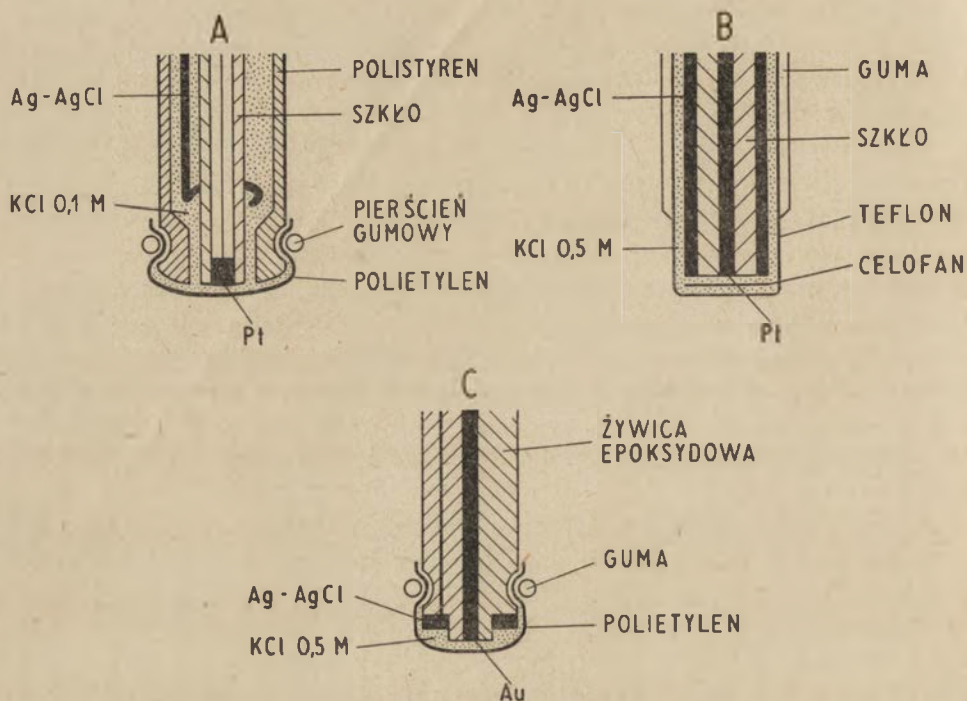
W obrębie czujnika wytwarza się podczas pomiaru gradient stężenia tlenu oraz produktów pośrednich jego redukcji i dlatego bezpośrednio po przyłożeniu napięcia obserwuje się szybki wzrost natężenia prądu i stopniowy spadek do określonego poziomu. Czas ustalenia się prądu wynosi około 30 minut (7, 12, 16, 34, 97). Po tym okresie prąd jest już bardzo stabilny i w ciągu 24 godzin pracy w stałych warunkach obserwowano zmiany natężenia prądu nie przekraczające 1% (12). Niemniej wskazana jest częsta kalibracja, gdyż zmiana warunków pomiaru, a zwłaszcza wymiana błony, może znacznie zmienić charakterystykę elektrody. Do kalibrowania oprócz metody Winklera wykorzystuje się usuwanie stechiometrycznych ilości O_2 przez zred. NAD (85).

W omawianym układzie elektrod prąd elektryczny nie płynie przez badany roztwór. Z tego względu można badać natlenienie roztworów pozabawionych elektrolitów, a nawet gazy (29, 58). W tym ostatnim przypadku, w celu zmniejszenia szybkości parowania wody z płynu elektrodowego, zastosowano błony napyłane metalem, przepuszczające tlen (9). Błona hydrofobowa chroni także elektrody przed substancjami „zatruwającymi” i substancjami redukującymi się razem z tlenem. Niektóre z tych sub-

stancji, na przykład H_2S , dyfundują jednak przez błonę i ich obecność w dużych stężeniach należy brać pod uwagę (42).

Badania nad wpływem temperatury na prąd dyfuzyjny dla czujnika Clarka wykazują dużą rozbieżność wyników. Podaje się wartości zmiany prądu o około 2,5% na 1° w temperaturze około 35° (34, 39, 59, 61) oraz wartości znacznie wyższe, bo około 7%/1 $^\circ$ w okolicy 25° (16, 42). Przyczyna tych rozbieżności nie jest jasna. Wpływ temperatury można kompensować elektrycznie (16).

Krzywa kalibracyjna dla elektrod Clarka jest linią prostą, przechodzącą przez zero układu współrzędnych.



Schemat 3A, 3B, 3C. Typy czujników tlenowych Clarka. Objaśnienie w tekście

W badaniach nad kinetyką procesów biologicznych ważna jest szybkość, z jaką elektroda reaguje na zmianę natlenienia. Szybkość ta waha się znacznie w zależności od budowy elektrody, oraz od rodzaju i grubości stosowanej błony (80). Szybkość reakcji elektrody mierzona jako czas, w którym prąd dyfuzyjny zmienia się o 90% po zmianie natlenienia, mieści się w granicach jednej do kilku sekund (39, 42, 59, 60, 61).

Kilka rozwiązań konstrukcyjnych czujnika tlenowego Clarka przedstawia schemat 3. Zwykle jest to drut platynowy lub złoty wtopiony w szkło (schemat 3A i 3B) (35, 39, 55). Taka elektroda może być następnie zatopiona w żywicy epoksydowej (34, 36). Drut może być również zato-

piony bezpośrednio w żywicy (schemat 3C) (12, 16). Anoda stanowi pierścień srebrny lub rurkę srebrną otaczającą katodę i zatopiona jest w tej samej żywicy (schemat 3B i 3C) (16, 61). Niekiedy anodę umieszcza się z dala od powierzchni katody (schemat 3A) (15, 55, 96).

VI. Zastosowanie

Zasadniczymi procesami fizjologicznymi, w których bierze udział tlen, są oddychanie i fotosynteza. W oddychaniu, w szerokim tego słowa znaczeniu, można wyróżnić szereg etapów jak wymiana gazu między organizmem i środowiskiem, transport tlenu między tkankami a organami oddechowymi i utlenianie tkankowe. Amperometria znalazła zastosowanie w badaniach wszystkich tych etapów i do tych celów opracowano różnorodne urządzenia.

Zajmiemy się najpierw oddychaniem całych zwierząt. Na ogół z wyjątkiem użycia elektrod Clarka, ilość tlenu można oznaczać tylko w roztworach, toteż za pomocą elektrody tlenowej mierzy się w zasadzie (choć nie wyłącznie (110)) oddychanie organizmów wodnych. W najprostszym przypadku badany obiekt umieszcza się w zamkniętym naczyniu i w odpowiednich odstępach czasu pobiera próbki do analizy zawartości tlenu (8). W tych pomiarach najlepiej stosować elektrodę kroplową, która daje najbardziej reproduktywne wyniki i nie wymaga częstego kalibrowania. Przeprowadzenie analizy amperometrycznej jest znacznie szybsze i wygodniejsze od tradycyjnych metod chemicznych, co znacznie ułatwia pomiary seryjne.

W powyższych pomiarach natlenienie środowiska, w którym badany obiekt przebywa, ulega ciągłym zmianom, co może mieć z kolei wpływ na intensywność oddychania. Można tego uniknąć umieszczając zwierzę w naczyniu, przez które przepływa prąd wody (11, 12, 32, 54, 56, 84, 92, 95). Z pomiarów natlenienia wody napływającej do naczynia i wypływającej z niego, oraz z szybkości przepływu można obliczyć intensywność oddychania. Taki układ pozwala na dokładną kontrolę składu chemicznego środowiska i na wygodne wprowadzanie czy wycofywanie jakiegoś czynnika chemicznego bez zakłóceń mechanicznych, szczególnie ważnych przy badaniu podstawowej przemiany materii. Jeżeli czynnikiem dozowanym jest tlen, łatwo wyznacza się tak zwane natlenienie krytyczne (11, 12).

Oprócz całych zwierząt można w ten sposób badać wyizolowane organy i tkanki i wtedy przepuszcza się płyn bezpośrednio przez zbiorniczek z badanym obiektem (12) lub też umieszcza się obiekt poza odpowiednią błoną (53, 92). Amperometria jest metodą bardzo czułą, więc można stosować wolny przepływ rzędu jednego ml/godzinę (12).

W przypadku badania skrawków tkanek (30, 66), zawiesziny komórek (21, 63, 64) czy elementów subkomórkowych (21, 23, 55) elektrody wpro-

wadza się najczęściej wprost do naczynka pomiarowego i bada szybkość spadku natlenienia.

Objętość gazu inkubacyjnego nasyconego w danych warunkach powietrzem i czułość przyrządu pomiarowego wygodnie jest dostosować tak, aby podziałkom skali galwanometru odpowiadały jednostki zużycia tlenu. Zero galwanometru ustala się zwykle przez chemiczne usuwanie tlenu (7, 29) dodatkiem Na_2SO_3 (10mM lub więcej). Do naczynka z płynem inkubacyjnym o znanym natlenieniu wprowadza się elektrody, dostosowuje czułość galwanometru, dodaje zawieszinę oddychającą i ewentualnie substancje stymulujące lub hamujące oddychanie. W ten sposób przy każdym pomiarze następuje kalibracja elektrody.

Należy jednak pamiętać, że w opisanym wyżej układzie białko zmniejsza czułość niepokrytej polietylenem katody i trzeba wprowadzić w związku z tym odpowiednią poprawkę. Trudność polega na tym, że białko wprowadza się zwykle w zawieszinie oddychającej, która jako anaerobowa powoduje rozcieńczenie tlenu w środowisku inkubacyjnym. Efekty rozcieńczenia tlenu i odkładania białka nakładają się więc na siebie. Dzięki hydrofobowym właściwościom polietylenu czy teflonu białko nie ma wpływu na czujnik Clarka.

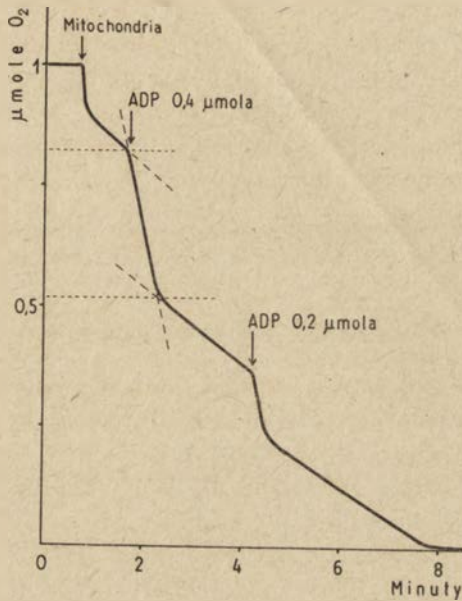
Przydatność amperometrii jest większa niż metod manometrycznych, gdyż mierzy się natlenienia wprost w płynie inkubacyjnym, a nie w fazie gazowej. Między tymi fazami może wystąpić duża różnica, co ma szczególnie duże znaczenie przy badaniu szybko przebiegających lub szybko zanikających procesów (7, 37, 40, 49, 82, 86, 90). Również podczas pomiarów w małych stężeniach tlenu, na przykład podczas wyznaczania stałej Michaelisa dla tlenu, pomiar bezpośrednio w płynie inkubacyjnym jest konieczny (21, 48, 63, 64).

Intensywność oddychania mierzy się zwykle jako szybkość spadku stężenia tlenu w badanym roztworze. Przez wstawienie w obwód odpowiedniego kondensatora można elektrycznie różniczkować szybkość spadku natlenienia w badanej próbce, co pozwala na bezpośredni odczyt intensywności oddychania w danym momencie (23).

Za pomocą elektrody tlenowej bada się nie tylko ubytek tlenu, ale również jego pojawianie się w takich procesach jak fotosynteza czy rozkład nadtlenu wodoru w obecności katalazy. W tym drugim przypadku stosuje się elektrody Clarka, ponieważ błona hydrofobowa zapobiega dyfuzji nadtlenu wodoru do powierzchni katody (40, 86).

Duże usługi oddała amperometryczna metoda w badaniach mechanizmu fosforylacji oksydacyjnej. W sprzężonych mitochondriach bardzo łatwo wyznacza się wydajność energetyczną fosforylacji czyli stosunek ilości wbudowanego do ADP fosforanu do ilości zużytego w tym samym czasie tlenu (P/O) (21). W tym celu mitochondria inkubuje się w obecności wszystkich elementów koniecznych do syntezy ATP oprócz akceptora energii, jakim jest ADP (rysunek 2). Dodatek określonej ilości ADP po-

woduje skokowy wzrost szybkości oddychania, aż do momentu związania całej dostępnej ilości ADP w postaci ATP. W tym momencie intensywność oddychania wraca do wartości wyjściowej. Z ilości zużytego tlenu podczas skoku oddychania i ilości dodanego ADP można obliczyć stosunek P/O. Ponadto oblicza się łatwo tzw. kontrolę oddychania przez akceptor energii, wyrażaną jako stosunek szybkości oddychania po dodaniu akceptora energii do tej szybkości przed dodaniem ADP. Podobne skokowe zmiany oddychania jak podczas fosforylacji oksydacyjnej obserwuje się podczas akumulacji jonów dwuwartościowych (20, 87).



Rys. 2. Pomiar intensywności oddychania, stosunku ADP/O oraz kontroli oddychania przez akceptor energii w mitochondriach wątroby szczura za pomocą czujnika tlenowego Clarka

Do roztworu inkubacyjnego o składzie 80 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM bursztynianu sodu, 4 mM bufor fosforanowy o pH 7,4, dodano w miejscach oznaczonych strzałkami mitochondria w ilości 5 mg białka oraz ADP. Objętość końcowa wynosiła 2 ml. Linia przerywana oznaczono ekstrapolację krzywej zużycia tlenu oraz rzuty odpowiednich punktów na rzędną, wykonane w celu dokładnego pomiaru ilości zużytego tlenu podczas skoku oddychania wywołanego dodatkiem ADP

Dla badania procesów zachodzących w mitochondriach duże znaczenie ma stosowanie elektrody tlenowej w połączeniu z innymi metodami pozwalającymi na równoczesne pomiary zmian zużycia tlenu, fluorescencji, absorpcji i rozproszenia światła oraz w połączeniu z elektrodami rejestrującymi stężenie H⁺, K⁺, Na⁺ itp. (19, 20, 23, 47, 78).

Konstrukcja naczynka pomiarowego może być bardzo różna. W najprostszym przypadku jest to zwykła probówka, umieszczona w łaźni termostatowej, do której wprowadza się od góry elektrody. Mieszanie pły-

nu odbywa się za pomocą elektrod, jeżeli stosuje się elektrodę wirującą lub wibrującą, przez obracanie całego naczynka lub też za pomocą mieszadła elektromagnetycznego. Poprzez górny otwór płyn badany kontaktuje z powietrzem, toteż należy zwracać uwagę, aby powierzchnia otworu była możliwie mała w porównaniu z objętością płynu. Gdy reakcja badana jest dostatecznie szybka dyfuzja z powietrza nie odgrywa większej roli (21). Dokładne izolowanie układu od czynników zewnętrznych może pociągać dość duże komplikacje w konstrukcji (44).

Często w analizie materiału biologicznego dysponuje się niewielką ilością preparatu czy odczynnika i wtedy korzystne jest stosowanie naczynka o możliwie małej objętości. Skonstruowano więc naczynka o pojemności rzędu 0,5ml i mniejsze (7, 35, 80, 97). Wymagają one jednak szczególnego zabezpieczenia przed kontaktem z powietrzem, zwłaszcza, jeżeli trzeba dodawać jakieś substancje podczas analizy. Przy tak małych ilościach należy już pamiętać, że masy plastyczne rozpuszczają pewne ilości tlenu (15, 39) i że elektroda pewną jego ilość zużywa (18, 39).

Do analizy amperometrycznej konieczne są niewielkie próbki, co ma duże znaczenie w badaniu natlenienia płynów ustrojowych (3). Do badania krwi pobierano próbki rzędu 0,1ml (74, 75). Wymaga to oczywiście zabezpieczenia badanej próbki przed kontaktem z powietrzem. Krótki czas przebiegu analizy pozwala na uniknięcie błędu spowodowanego zużyciem tlenu przez elementy komórkowe znajdujące się w płynie (39, 74, 76, 99).

W przypadku badania krwi należy pamiętać, że duża ilość tlenu związana jest z hemoglobina. W bezpośrednim sąsiedztwie elektrody na skutek reakcji elektrodowych, stężenie tlenu może być niskie tak, że hemoglobina oddaje tlen, który zwiększa natężenie prądu dyfuzyjnego (6, 27, 71). Z drugiej strony obecność białek powoduje spadek prądu dyfuzyjnego nawet przy użyciu elektrod pokrytych kolodionem. To zjawisko można tłumaczyć wzrostem lepkości badanego roztworu, co z kolei zmniejsza szybkość dyfuzji tlenu (77, 102).

Amperometria umożliwia pomiar natlenienia wprost w obiegu krwi przez wprowadzenie elektrod do naczyń krwionośnych (18, 26). Miniaturowe elektrody zamontowane w odpowiednim kateterze można poprzez naczynia krwionośne wprowadzić w różne okolice organizmu (52, 58, 61).

Elektrody implantowane wprost do tkanek *in vivo* pozwalają na pomiar stężenia tlenu w bezpośrednim sąsiedztwie komórek (17, 18, 26, 34, 45). Przy ich pomocy można mierzyć szybkość zużycia tlenu przez te tkanki *in situ*. Zatrzymuje się wówczas lokalnie krążenie i notuje spadek natlenienia (29). Z drugiej strony zmiany natlenienia w tkankach mogą być wskaźnikiem lokalnych zaburzeń w krążeniu (69).

Elektrody tlenowe przystosowano do pomiarów współczynnika dyfuzji tlenu w tkankach (65, 98). Zminiaturyzowano je również do tego stopnia, że możliwy stał się pomiar natlenienia wewnątrz pojedynczej komórki (108).

Przykładem wykorzystania elektrod tlenowych do pośredniego pomiaru stężenia innych substancji może być czujnik wrażliwy na glukozę. Czujnik ten to elektrody Clarka pokryte warstwą żeluz akrylamidowego zawierającego oksydazę glukozy. Glukoza z badanego roztworu, wchodząc w kontakt z enzymem, powoduje ubytek tlenu w bezpośrednim sąsiedztwie elektrody i tym samym zmniejsza prąd dyfuzyjny tlenu. Prąd ten jest funkcją stężenia glukozy i tym samym może być jego miarą (104).

Na zakończenie można wspomnieć o elektrometrycznych pomiarach zużycia tlenu opartych na innych zasadach. Organizmy oddychające tlenem atmosferycznym umieszcza się w naczyniu, w którym ubytek tlenu zostaje uzupełniony elektrolitycznie. Ilość zużytego tlenu oblicza się z wartości prądu, jaki przepłynął podczas elektrolizy (24, 67, 106).

Do pomiaru stężenia tlenu w gazach oddechowych wykorzystuje się właściwości pewnych związków cyrkonu. Czujnik stanowi tu ogniwo, zbudowane z tych związków, którego siła elektromotoryczna jest w odpowiednich warunkach funkcją stężenia tlenu (33, 94).

LITERATURA

1. Ambühl H., *Schweiz. Z. Hydrobiol.* **17**, 123 (1955).
2. Armstrong F. E., Heemstra R. J., Kincheloe G. W., *Anal. Chem.* **27**, 1296 (1955).
3. Bartels H., *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* **252**, 264 (1950).
4. Bartels H., Reinhardt W., Burger H., *Naturwissenschaften* **46**, 672 (1959).
5. Batholomew W. H., Karow E. O., Sfat M. R., Wilhelm R. H., *Ind. Eng. Chem.* **42**, 1801 (1950).
6. Baumberger J. P., Markus G., *Federation Proc.* **11**, 9 (1952).
7. Bellamy D., Bartley W., *Biochem. J.* **76**, 78 (1960).
8. Berg K., Lumbye J., Ockelmann K. W., *J. Exptl. Biol.* **35**, 43 (1958).
9. Bergman I., *Nature* **218**, 266 (1968).
10. Bielawski J., *Biul. Inform. Kom. Hydrobiol. PAN* **1**, 137 (1958).
11. Bielawski J., *Acta Biol. Exptl.* **19**, 41 (1959).
12. Bielawski J., *Comp. Biochem. Physiol.* **3**, 261 (1961).
13. Briggs R., Dyke G. V., Knowles G., *Analyst* **83**, 304 (1958).
14. Burger H., Lubbers D., Ockenaga Th., *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* **265**, 172 (1957).
15. Butler R. A., Nunn J. F., Askill S., *Nature* **196**, 781 (1962).
16. Carritt D. E., Kanwisher J. W., *Anal. Chem.* **31**, 5 (1959).
17. Cater D. B., *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **10**, 153 (1960).
18. Cater D. B., Silver I. A., Wilson G. M., *Proc. Roy Soc. (London) Ser. B* **151**, 256 (1959).
19. Chance B., *Science* **120**, 767 (1954).
20. Chance B., *J. Biol. Chem.* **240**, 2729 (1965).
21. Chance B., Williams G. R., *Nature* **175**, 1120 (1955).
22. Chappell J. B., w *Biological Structure and Function*, Red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, Academic Press, Londyn 1961, tom 2, str. 71.
23. Chappell J. B., Crofts A. R., *Biochem. J.* **95**, 378 (1965).
24. Chase A. M., Unwin D. M., Brown R. H. J., *J. Exptl. Biol.* **48**, 207 (1968).
25. Clark L. C. Jr., *Trans. Am. Soc. Arti. Intern. Org.* **2**, 41 (1956).

26. Clark L. C. Jr, Wolf R., Granger D., Taylor Z., *J. Appl. Physiol.* **6**, 189 (1953).
27. Connelly C. M., *Federation Proc.* **16**, 681 (1957).
28. Damaschke K., Rothbuhr L., Todt F., *Biochem. Z.* **326**, 424 (1955).
29. Davies W. P., w *Physical Techniques in Biological Research*, Red. W. L. Nastuk, Academic Press, New York 1962, tom 4, str. 137.
30. MacDonald I. R., Laties G. G., *J. Exptl. Botany* **13**, 435 (1962).
31. Drenckhahn F. O., *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* **262**, 196 (1956).
32. Edwards R. W., Learner M. A., *J. Exptl. Biol.* **37**, 707 (1960).
33. Elliott S. E., Seger F. J., Osborn J. J., *J. Appl. Physiol.* **21**, 1672 (1966).
34. Fatt I., *J. Appl. Physiol.* **19**, 326 (1964).
35. Foster J. M., *Anal. Biochem.* **14**, 22 (1966).
36. Froese G., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 509 (1962).
37. Gesinski R. M., Morrison J. H., Toepfer J. R., *J. Appl. Physiol.* **24**, 751 (1968).
38. Giguere P. A., Lauzier L., *Can. J. Res.* **23**, 76 (1954).
39. Gleichmann U., Lubbers D. W., *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* **271**, 431 (1960).
40. Goldstein D. B., *Anal. Biochem.* **24**, 431 (1968).
41. Goodkind M. J., Harvey E. N., *J. Cellular Comp. Physiol.* **39**, 45 (1952).
42. Grasshoff K., *Kieler Meeresforsch.* **18**, 151 (1962).
43. Gregory N. L., *Advan. Polarogr.* **1**, 223 (1960).
44. Hagihara B., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 134 (1961).
45. Hardwick D. F., Strauss J., Misrahy G. A., *Am. J. Physiol.* **205**, 322 (1963).
46. Harris E. D., Lindsey A. J., *Nature* **162**, 413 (1948).
47. Harris E. J., Catlin G., Pressman B. C., *Biochemistry* **6**, 1360 (1967).
48. Hegner D., Glossmann H., *Z. Naturforsch.* **20**, 234 (1965).
49. Hemker H. C., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 646 (1962).
50. Heyrowsky I., Zuman P., *Wstęp do Polarografii Praktycznej*, PWN Warszawa 1956.
51. Horwitz L., *J. Cellular Comp. Physiol.* **49**, 437 (1957).
52. Johansen K., Krog J., *Acta Physiol. Scand.* **46**, 228 (1959).
53. Joliot P., Joliot A., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 625 (1968).
54. Kanwisher J. W., *Mar. Sci. Instr.* **1**, 334 (1962).
55. Kielley W. W., Bronk J. R., *J. Biol. Chem.* **230**, 521 (1958).
56. Klekowski R. Z., Kamler E., *Pol. Arch. Hydrobiol.* **15**, 121 (1958).
57. Kolthoff I. M., Lingane J. J., *Polarography*, Interscience, New York 1952.
58. Kreuzer F., Harris E. D. Jr., Hessler C. G. Jr., *J. Appl. Physiol.* **15**, 77 (1960).
59. Kreuzer F., Rogers C. A., Bornstein P., *J. Appl. Physiol.* **15**, 1157 (1960).
60. Kreuzer F., Watson T. R. Jr., Ball J. M., *J. Appl. Physiol.* **12**, 65 (1958).
61. Krog J., Johansen K., *Rev. Sci. Instr.* **30**, 108 (1959).
62. Laitinen H. A., *Science* **92**, 151 (1940).
63. Longmuir I. S., *Biochem. J.* **57**, 81 (1954).
64. Longmuir I. S., *Biochem. J.* **65**, 378 (1957).
65. Longmuir I. S., *Advan. Polarogr.* **3**, 1011 (1960).
66. Longmuir I. S., *Biochem. J.* **76**, 225 (1960).
67. Macfayden A., *J. Exptl. Biol.* **38**, 323 (1961).
68. Mancy K. H., Okun D. A., *Anal. Chem.* **32**, 108 (1960).

69. Miller W. F., Sproule B. J., Cushing I. E., *Am. Rev. Tubercul. Pulmonary Dis.* **79**, 315 (1959).
70. Milner G. W. C., *Polarografia*, WNT Warszawa 1962.
71. Mochizuki M., Bartels H., *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* **261**, 151 (1955).
72. Moore E. W., Morris J. C., Okun D. A., *Sewage Works J.*, **20**, 1041 (1948).
73. Naylor P. F. D., Evans N. T. S., *Nature* **199**, 911 (1963).
74. Neumann H. G., *Advan. Polarogr.* **3**, 1027 (1960).
75. Neumann H. G., *Z. Anal. Chem.* **171**, 109 (1960).
76. Neville J. R., *J. Appl. Physiol.* **15**, 717 (1960).
77. Nightingale T. E., Boster R. A., Fedde M. R., *J. Appl. Physiol.* **25**, 371 (1968).
78. Ogata E., Rasmussen H., *Biochemistry* **5**, 57 (1966).
79. Olson R. A., Brackett F. S., Crickard R. G., *J. Gen. Physiol.* **32**, 681 (1949).
80. Ostrowskij D. N., Gelman N. S., *Biochimija* **27**, 532 (1962).
81. Petering H. G., Daniels F., *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 2796 (1938).
82. Pettko E., Kovacs E., *Naturwissenschaften* **45**, 43 (1958).
83. Reeves R. B., Rennie D. W., Pappenheimer J. R., *Federation Proc.* **16**, 693 (1957).
84. Roberts J. L., *Helgolander wiss. Meeresunters.* **9**, 459 (1964).
85. Robinson J., Cooper J. M., *Anal. Biochem.* **33**, 390 (1970).
86. Rorth M., Jansen P. K., *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 171 (1967).
87. Rossi C. S., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **239**, 3971 (1964).
88. Rotthauwe H. W., *Kieler Meeresforsch.* **14**, 48 (1958).
89. Sack K. A., Staudinger H., Zubrzycki Z. J., *Biochem. Z.* **335**, 177 (1961).
90. Sactor B., Packer L., Estabrook R. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 67 (1959).
91. Seaman W., Allen W., *Sewage Ind. Wastes* **22**, 912 (1950).
92. Serak L., *Advan. Polarogr.* **3**, 1057 (1960).
93. Severinghaus J. W., *Clin. Chem.* **9**, 727 (1963).
94. Sodal I. E., Bowman R. K., Filley G. F., *J. Appl. Physiol.* **25**, 181 (1968).
95. Spoor W. A., *Science* **108**, 421 (1948).
96. Sproule B. J., Moller W. F., Cushing J. E., Chapman C. B., *J. Appl. Physiol.* **11**, 365 (1957).
97. Stickland R. G., *Biochem. J.* **77**, 636 (1960).
98. Takahashi G. H., Fatt I., Goldstick T. K., *J. Gen. Physiol.* **50**, 317 (1966).
99. Thews G., *Pflugers Arch. Ges. Physiol.* **276**, 89 (1962).
100. Todt F., *Elektrochemische Sauerstoffmessungen*, Walter de Gruyter and Co, Berlin 1958.
101. Todt F., Todt H. G., *Vom Wasser* **20**, 72 (1953).
102. Tsao M. U., Vadnay A., *J. Appl. Physiol.* **15**, 712 (1960).
103. Tysarowski W., *Post. Biochem.* **1**, 155 (1955).
104. Updike S. J., Hicks G. P., *Nature* **214**, 986 (1967).
105. Voss D. O., Cowles J. C., Bacila M., *Anal. Biochem.* **6**, 211 (1963).
106. Wager H. G., Porter F. A. E., *Biochem. J.* **81**, 614 (1961).
107. Warshowsky B., Schanitz E. J., *Anal. Chem.* **26**, 1811 (1954).
108. Whalen W. J., Riley J., Nair P., *J. Appl. Physiol.* **23**, 798 (1967).
109. Zagórski Z. P., *Analiza Polarograficzna* PWN Warszawa 1970.
110. Zawielak J., *Acta Agr. Silvestr. Ser. Zootechn.* **3**, 3 (1963).

EWA PRÓCHNIEWICZ*, HANNA STRZELECKA-GOŁASZEWSKA**

Spektroskopia fluorescencyjna i jej zastosowanie do badania struktury białek

Fluorescence Spectroscopy and its Application to Studies on the Protein Structure

Theoretical basis of fluorescence phenomenon is described and examples of application of the fluorescence spectroscopy to studies on the protein conformation are given.

Jednym z kluczowych problemów biologii molekularnej jest znalezienie związku pomiędzy strukturą i funkcją cząsteczek białkowych w żywych organizmach. Rozwiązanie tego zagadnienia wymaga stosowania wielu metod zarówno fizycznych jak chemicznych oraz umiejętnego zestawienia uzyskanych danych. Celem niniejszego artykułu jest zasygnalizowanie możliwości zastosowania spektroskopii fluorescencyjnej do badania struktury, dynamiki cząsteczek białkowych oraz połączeń białek z innymi substancjami.

I. Teoria zjawiska fluorescencji

W cząsteczkach związków chemicznych, podobnie jak w atomach, elektrony mogą znajdować się tylko w stanach o określonej energii, zwanych poziomami energetycznymi, przy czym każdej wartości energii elektronewej cząsteczki odpowiada szereg podpoziomów o różnych wartościach energii oscylacyjnej.

W normalnych warunkach cząsteczki znajdują się w stanie podstawowym, który na ogół jest stanem singletowym. Absorpcja energii promie-

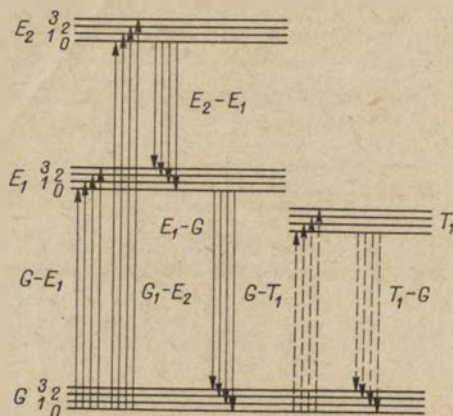
* Mgr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

** Dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: ANS — kwas 1-anilino-8-naftaleno-sulfonowy, DNS — chlorek dwumetylnaftaleno-5-sulfonowy, TNS — kwas 2-p-toluidynylonaftaleno-6-sulfonowy, TAS — 4,4'-bis-(2-chloro-4-dwuetańloamino-1,3,5-triazyl-6-dwuaminostilbeno-2,2'-dwusulfonian sodu, MDC — 4-metylo-7-dwuetyloaminokumaryna, NPA — p-nitrofenyloantranilan

nistej prowadzi do wzbudzenia cząsteczki, to znaczy do przejścia elektronów na jeden z wyższych, niezajętych stanów (schemat 1). Cząsteczki są wzbudzane z najniższego poziomu oscylacyjnego stanu podstawowego do różnych poziomów oscylacyjnych stanów wzbudzonych. W roztworach oddziaływanie wzbudzonych cząsteczek z rozpuszczalnikiem może powodować utratę nadmiaru energii oscylacyjnej w czasie rzędu 10^{-12} sekundy i przejście do najniższego poziomu oscylacyjnego danego stanu wzbudzonego. Jest to proces bezpromienisty.

Utrata energii wzbudzenia wskutek emisji promieniowania nazywana jest luminescencją, której szczególny przypadek stanowi fluorescencja. Jest to proces emisji promieniowania z najniższego poziomu oscylacyjnego pierwszego wzbudzonego stanu singletowego. Czas życia tego stanu jest rzędu 10^{-9} — 10^{-7} sek i tego samego rzędu jest czas trwania fluorescencji.

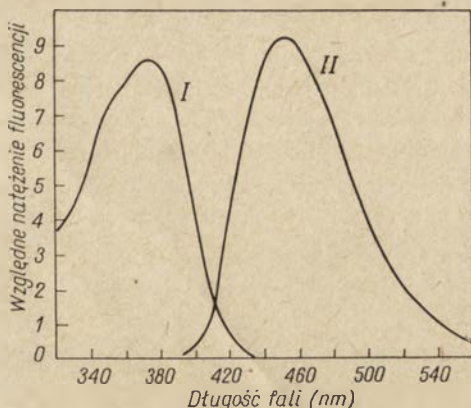


Schemat 1. Układ poziomów energetycznych w cząsteczce

G — stan podstawowy; E_1 , E_2 — wzbudzone stany singletowe; T_1 — stan tripletowy. Zaznaczono strukturę oscylacyjną poziomów

Utrata nadmiaru energii oscylacyjnej przed aktem emisji powoduje, że energia kwantów promieniowania fluorescencji jest niższa niż energia kwantów absorbowanych. Ponieważ energia promieniowania jest odwrotnie proporcjonalna do długości fali, położenie maksimum widma emisji fluorescencji przesuwa się w stronę fal dłuższych względem położenia maksimum widma absorpcji. Widmo wzbudzenia fluorescencji, ilustrujące zależność natężenia fluorescencji od długości fali światła wzbudzającego, w przypadku izolowanego chromoforu pokrywa się z jego widmem absorpcji. Na rysunku 1 przedstawiono stosunek pomiędzy widmami wzbudzenia i emisji na przykładzie kompleksu kwasu 1-anilino-8-naftalenosulfonowego (ANS) z apomioglobina.

Natężenie światła fluorescencji charakteryzuje tzw. wydajność kwantowa Q , zdefiniowana jako stosunek liczby kwantów wyemitowanych (F)



Rys. 1. Widmo wzbudzenia (I) i widmo emisji fluorescencji (II) kompleksu ANS z apomioglobina (wg 26)

do liczby kwantów zaabsorbowanych (A): $Q = \frac{F}{A}$. Wartość Q jest na ogół mniejsza od jedności i jest proporcjonalna do ułamka fluoryzujących cząsteczek. Obniżenie wydajności kwantowej poniżej 1 jest wynikiem możliwości przechodzenia cząsteczek ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego na drodze różnej od emisji promieniowania fluorescencji (10).

II. Procesy konkurencyjne w stosunku do fluorescencji

Pierwszym tego typu procesem, mającym w zasadzie niewielkie znaczenie, jest bezpromieniste przejście cząsteczki ze stanu wzbudzenia do stanu podstawowego, przy czym energia wzbudzenia zamienia się na ciepło. Bardziej zasługuje na uwagę zjawisko wewnętrznego przejścia energetycznego określanego w literaturze angielskiej nazwą *intersystem crossing* (10). Polega ono na przejściu cząsteczki z pierwszego wzbudzonego stanu singletowego do najniższego stanu tripletowego. Przejście promieniste między stanem tripletowym i podstawowym nazywane jest fosforescencją. Czas życia stanu tripletowego jest rzędu 10^{-4} —10 sek, wskutek czego promieniowanie fosforescencji trwa znacznie dłużej niż fluorescencji. Z drugiej strony, tak długi czas życia stanu tripletowego zwiększa prawdopodobieństwo utraty wzbudzenia wskutek zderzeń z innymi cząsteczkami obecnymi w roztworze. W konsekwencji w roztworach w temperaturze pokojowej fosforescencji na ogół się nie obserwuje.

Prawdopodobieństwo wewnętrznego przejścia energetycznego zależy od struktury stanów elektronowych cząsteczki. Stwierdzono, że prawdopodobieństwo to jest znacznie mniejsze w węglowodorach aromatycznych, wykazujących duże rozszczepienie singlet-triplet, niż w przypadku cząsteczek niektórych barwników organicznych, gdzie odpowiednia różnica energii jest mała (11).

Zjawiskiem *intersystem crossing* tłumaczy się tzw. efekt ciężkich atomów przejawiający się tym, że podstawienie ciężkich atomów do układu elektronów π zwiększa natężenie fosforescencji kosztem fluorescencji. Na przykład w serii pochodnych halobenzenowych wydajność kwantowa fluorescencji dla fluorobenzenu wynosi 0,16 dla chlorobenzenu 0,05, dla bromobenzenu 0,01, a jodobenzen nie fluoryzuje wcale (6).

Wygaszanie fluorescencji może być także związane z utratą energii wzbudzenia w wyniku zderzeń cząsteczki z innymi cząsteczkami obecnymi w środowisku, jak cząsteczki tlenu, haloidki alkili, czy chelaty atomów paramagnetycznych (22).

Innym rodzajem dezaktywacji stanu wzbudzonego jest bezpromienista wymiana energii — przekazanie energii na inną drobinę bez bezpośredniego kontaktu oddziałujących cząsteczek. Wzbudzona w ten sposób cząsteczka — akceptor energii — przy przejściu do stanu podstawowego emituje własne widmo fluorescencji. Dla zajścia bezpromienistej wymiany energii, zwanej także fluorescencją uczuloną, konieczne jest aby a) widmo emisji donora pokrywało się z widmem absorpcji akceptora, b) wzbudzone poziomy elektrony donora znajdowały się powyżej poziomów akceptora.

Wydajność procesu bezpromienistej wymiany energii zależy od odległości i wzajemnej orientacji przestrzennej donora i akceptora ze względu na postulowany dipolowy charakter ich oddziaływania. Prawdopodobieństwo wystąpienia wymiany energii jest największe w przypadku równoległego ustawienia oddziałujących dipoli, natomiast najmniejsze w przypadku ustawienia prostopadłego (5).

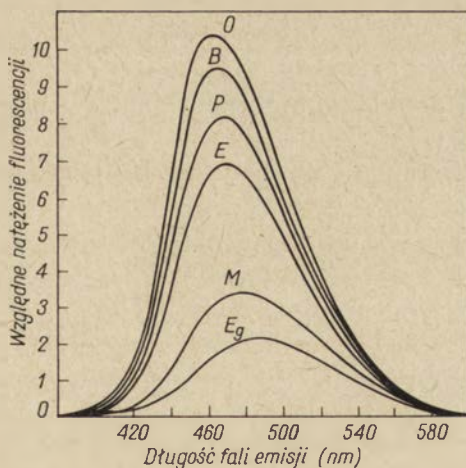
III. Wpływ geometrii cząsteczki i własności rozpuszczalnika na widmo fluorescencji

Zjawisko fluorescencji wykazują głównie cząsteczki mające układy elektronów π , a szczególnie związki aromatyczne i heterocykliczne (10). Wiele fluoryzujących cząsteczek organicznych charakteryzuje płaska, sztywna struktura. Przyjmuje się bowiem (10), że w przypadku struktur giętkich istnieje większe prawdopodobieństwo rozproszenia energii wzbudzenia na rotacje i oscylacje poszczególnych fragmentów cząsteczki względem siebie niż w przypadku cząsteczek sztywnych.

Możliwość dezaktywacji stanu wzbudzonego chromoforu w wyniku wewnątrzcząsteczkowych ruchów (15) implikuje istnienie zależności pomiędzy natężeniem fluorescencji a lepkością rozpuszczalnika. Na przykład wydajność kwantowa fluorescencji kwasu 2-*p*-toluidynylnaftaleno-6-sulfonowego (TNS) wzrasta ze wzrostem lepkości rozpuszczalnika (19). Według autorów (19) przyczyna tego rodzaju zależności związana jest z rozpraszaniem energii wzbudzenia na wzajemny obrót pierścieni fenyłowego i naftyłowego w cząsteczce TNS.

Widmo fluorescencji cząsteczek organicznych w roztworach zależy od takich własności rozpuszczalnika, jak stała dielektryczna, czy zdolność tworzenia wiązań wodorowych z badaną substancją. Wpływ stałej dielektrycznej objawia się wystąpieniem w widmie tzw. przesunięć polaryzacyjnych. Przesunięcia te obserwuje się w związkach mających większy moment dipolowy w stanie wzbudzonym niż w stanie podstawowym (16). W rozpuszczalnikach polarnych część energii stanu wzbudzonego chromoforu zużywa się na oddziaływanie z dipolowymi drobinami rozpuszczalnika, co powoduje przesunięcie położenia maksimum widma emisji fluorescencji w kierunku fal dłuższych w porównaniu z położeniem maksimum w środowisku niepolarnym. Wielkość tego przesunięcia wzrasta ze stopniem polarności rozpuszczalnika. Polarne rozpuszczalniki obniżają również wydajność kwantową fluorescencji (26), jednak mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze dobrze poznany. Ilustracją zależności widma fluorescencji od polarności rozpuszczalnika są wyniki badań fluorescencji ANS w różnych alkoholach (rysunek 2). Widoczny jest wzrost wydajności kwantowej i przesunięcie położenia maksimum widma emisji fluorescencji ANS w kierunku fal krótszych wraz ze spadkiem polarności rozpuszczalnika, która zmniejsza się w porządku: glikol etylenowy (Eg), metanol (M), etanol (E), n-propanol (P), n-butanol (B) i n-oktanol (O).

Wpływ wiązań wodorowych na widmo fluorescencji badali Mataga i Kaifu (18). Powstanie wiązań wodorowych między rozpuszczalnikiem i substancją rozpuszczoną powoduje szereg niepożądanych efektów, jak przesunięcie położenia maksimum widma fluorescencji w kierunku fal dłuższych lub krótszych oraz zmiany wydajności kwantowej emisji fluorescencji. Ponieważ przewidywanie jakiego rodzaju efekt wystąpi w badanym układzie jest bardzo trudne, w badaniach za pomocą metody fluo-



Rys. 2. Widma fluorescencji ANS w alkoholach (wg 26)

rescencyjnej ważny jest dobór takich rozpuszczalników, które nie tworzą wiązań wodorowych z badaną substancją (40).

Wydajność kwantowa i położenie maksimum fluorescencji zależą również od temperatury. Na ogół spadek temperatury powoduje wzrost wydajności kwantowej fluorescencji oraz przesunięcie położenia maksimum w kierunku fal krótszych. A zatem interpretacja widma fluorescencji otrzymanego w danym rozpuszczalniku o danej temperaturze nie może być mechanicznie przenoszona na wyniki otrzymane w innym rozpuszczalniku o innej temperaturze.

IV. Zastosowanie fluorescencji do badania konformacji cząsteczek białkowych

Stosując fluorescencję do badań nad konformacją białek wykorzystuje się bądź chromofory naturalnie występujące w cząsteczce białka, bądź chromofory sztucznie do niej wprowadzone. Te ostatnie określa się zwykle mianem chromoforów zewnętrznych.

1. Chromofory naturalne

Mogą to być chromofory koenzymatyczne, na przykład dwunukleotyd nikotynoamidoadeninowy, zredukowany dwunukleotyd flawinowoadeninowy, fosforan pirydoksalu lub chromofory wewnętrzne, jak aromatyczne łańcuchy boczne tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny.

Badania wykazały, że wydajność kwantowa fluorescencji tryptofanu zależy od stanu sąsiednich grup funkcyjnych (4). Jony fenolowe pełnią przypuszczalnie rolę akceptorów w procesie bezpromienistej wymiany energii, przyczyniając się tym do obserwowanego wygaszania emisji fluorescencji tryptofanu w alkalicznym zakresie pH (4, 25). To przypuszczenie opiera się na fakcie, że widmo absorpcji zjonizowanej tyrozyny nakłada się na widmo emisji tryptofanu w stopniu wystarczającym do wystąpienia bezpromienistej wymiany energii. Przyczyną wygaszania fluorescencji tryptofanu w $pH > 11$ może być również powstawanie kompleksu jonów hydroksylowych ze wzbudzonym chromoforem (25).

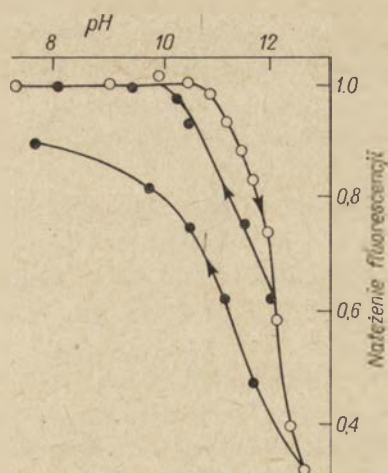
Także jonizacja grup karboksylowych powoduje wygaszanie fluorescencji, wywołane przypuszczalnie zakłóceniem struktury elektronowej reszt tryptofanu przez sąsiadujące grupy karboksylowe. Grupy aminowe przyczyniają się do wygaszania fluorescencji zarówno w stanie zjonizowanym jak i niezjonizowanym. Efekty te tłumaczy się przenoszeniem protonu między grupą aminową a pierścieniem indolowym tryptofanu (4). Ogólnie biorąc, wpływ innych aminokwasów na widmo fluorescencji zależy od ich położenia względem chromoforu, a więc od konformacji białka.

W przypadku pepsyny, albuminy jaja i lizozymu wygaszeniu fluorescencji w kwaśnym pH towarzyszy pojawienie się widma różnicowego w pasmie odpowiadającym absorpcji tryptofanu, co przypuszczalnie wiąże się z przemianami strukturalnymi białek w tym zakresie pH (25).

Badanie widma fluorescencji w zależności od pH i temperatury wykazało korelację zmian wydajności kwantowej fluorescencji ze zmianami konformacyjnymi białek, o których wiadomo na podstawie badań przeprowadzonych przy użyciu innych metod. Występujący w obszarze alkalicznym spadek wydajności kwantowej fluorescencji reszt tryptofanu, spowodowany bezpromienistą wymianą energii ze zjonizowanymi resztami tyrozyłowymi, okazał się zależny od własności strukturalnych danego białka. Na przykład w przypadku lizozymu przy alkalizacji roztworu obserwowano odwracalny spadek wydajności kwantowej fluorescencji, a obniżeniu pH od 12 do obszaru obojętnego towarzyszył wzrost wydajności kwantowej do wartości obserwowanej przed alkalizacją. Natomiast w przypadku albuminy jaja zmiany wydajności kwantowej towarzyszące podwyższeniu pH roztworu okazały się nieodwracalne (rysunek 3). Tę nieodwracalność przypisuje się denaturacji białka, której następstwem jest odsłonięcie i jonizacja grup tyrozylowych, zamaskowanych w rodzimym białku (3).

O zależności wydajności kwantowej fluorescencji tryptofanu od konformacji białka świadczy również jej zmiana pod wpływem wysokich stężeń mocznika i detergentów — czynników powodujących zmiany konformacyjne.

Badanie zależności temperaturowej widma fluorescencji wykazało, że gdy nie zachodzą zmiany strukturalne w białku, wzrostowi temperatury



Rys. 3. Zależność natężenia fluorescencji albuminy jaja od pH ; (o) przebieg zmian natężenia przy alkalizacji roztworu białka; (●) przebieg zmian natężenia przy zobojętnianiu (wg 25)

towarzyszy ciągły spadek wydajności kwantowej fluorescencji. Natomiast przemiany konformacyjne zaznaczają się w postaci wyraźnej zmiany nachylenia krzywej w krytycznym obszarze temperatur.

Przytoczone przykłady wskazują, że zależność widm fluorescencji od najbliższego otoczenia fluoryzujących chromoforów może być wykorzystana do badania zmian konformacyjnych białek. Jednak interpretację otrzymanych wyników utrudnia w wielu przypadkach brak znajomości sekwencji aminokwasów w sąsiedztwie odpowiednich chromoforów. Drugim ograniczeniem stosowania metody fluorescencji jest to, że nie zawsze fluoryzująca reszta znajduje się w interesującym badacza obszarze cząsteczki, na przykład w centrum aktywnym enzymu.

2. Chromofory zewnętrzne

Ostatnio dla umożliwienia badania własności konformacyjnych określonych obszarów cząsteczek białkowych rozwinięto technikę wprowadzania do nich niskocząsteczkowych związków fluoryzujących, określanych w literaturze nazwą *fluorescent probes*. Widma fluorescencji wprowadzonych związków, dzięki zależności od bezpośredniego otoczenia, dostarczają informacji o lokalnych zmianach konformacyjnych cząsteczki-nośnika.

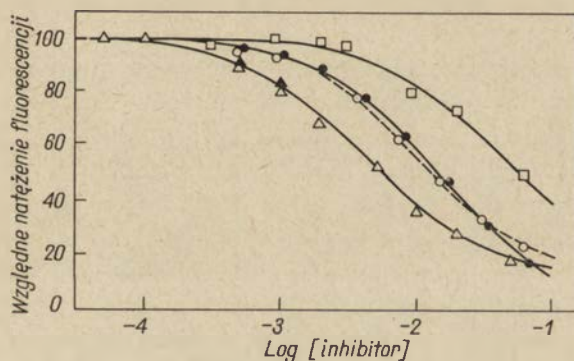
Fluoryzujące kompleksy białek z chromoforami można otrzymać albo w wyniku powstania kowalencyjnego wiązania między chromoforem a białkiem, albo też drogą użycia związków adsorbujących się na cząsteczkach białkowych bez tworzenia wiązań kowalencyjnych. Przy badaniu fluoryzujących kompleksów zawierających związany kowalencyjnie chromofor istotne jest, aby utworzenie wiązania chemicznego nie zmieniało właściwości danego białka. Pożądane jest też powstanie tylko jednego rodzaju połączenia, na tyle silnego, aby umożliwiło badania własności białka w szerokim przedziale *pH* i temperatury. Przykładem fluoryzującej pochodnej jest badane przez Webera (36) połączenie chlorku dwumetylonaftaleno-5-sulfonowego (DNS) z albuminą jaja i albuminą surowiczą, oraz badane przez Hartleya i Massey'a (8) połączenie DNS z aktywnym centrum α -chymotrypsyny.

Innymi przykładami chromoforów zewnętrznych są 1-anilino-8-naftalenosulfonian (ANS), 2-*p*-toluidynylonaftaleno-6-sulfonian (TNS), 4,4'-bis-(2-chloro-4-dwuetanolamino-1,3,5-triazyl-6)dwuaminostilbeno-2,2'-dwusulfonian sodu (TAS), 4-metylo-7-dwuetyloaminokumaryna (MDC) i pochodna 4,4'-dwuaminostilbeno-2,2'-dwusulfonianu (MBAS). Ich widma fluorescencji ulegają silnym zmianom w wyniku adsorpcji na pewnych białkach (14, 17, 19, 24, 30, 31, 38). Przykładowo badano widma fluorescencji ANS w obecności apomioglobiny i apohemoglobiny (26). Wykazano, że hydrofobowy obszar, do którego przyłączona jest grupa hemowa, wiąże również ANS. Zgodnie z opisaną uprzednio zależnością własności fluorescencyjnych chromoforów od polarności otoczenia, w wyniku utworzenia

kompleksu ANS-apomioglobina lub ANS-apohemoglobina obserwuje się znaczny wzrost wydajności kwantowej fluorescencji ANS i jednocześnie przesunięcie położenia maksimum widma w kierunku fal krótszych w stosunku do obserwowanych w roztworze wodnym.

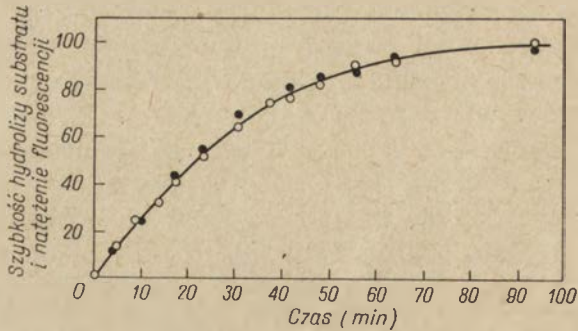
W oparciu o istniejący związek pomiędzy położeniem maksimum widma i wydajnością kwantową fluorescencji a polarnością środowiska badano polarność miejsc przyłączenia chromoforów do białek: MDC do albuminy bydlęcej, β -laktoglobuliny bydlęcej, insuliny, albuminy i lizozymu jaja kurzego (30), TAS do insuliny, lizozymu, rybonukleazy, chymotrypsynogenu, α -chymotrypsyny (31), 6-aminonaftaleno-2-sulfonianu do albuminy bydlęcej i homologicznego przeciwciała (41), TNS do albuminy bydlęcej, chymotrypsyny, lizozymu, γ -G-immunoglobulin, albuminy jaja (19) ANS do miozyny (2).

Badając widma fluorescencji TNS w obecności chymotrypsyny McClure i Edelman (20) śledzili procesy towarzyszące wiązaniu kompetytywnych inhibitorów tego enzymu. Wykazano, że TNS przyłącza się do apolarnego obszaru chymotrypsyny, różnego od centrum aktywnego enzymu. Wiązanie analogów substratów oraz inhibitorów kompetytywnych jak β -fenylopropionian pociągało za sobą zmiany widma fluorescencji TNS (rysunek 4), które można było zinterpretować jako następstwo zmian konformacyjnych, towarzyszących wiązaniu tych związków.



Rys. 4. Wpływ analogów substratu na natężenie fluorescencji roztworów zawierających TNS i chymotrypsynę. Natężenie fluorescencji wyrażono w procentach natężenia obserwowanego w nieobecności inhibitora
(Δ) β -fenylopropionian; (O) D-tryptofan; (●) acetylo-L-tryptofan; (□) L-tryptofan; (wg 20)

Metodą fluorescencyjną badano również wpływ szeregu czynników na przemianę chymotrypsynogenu do chymotrypsyny w obecności trypsyny (21). W tym przypadku, analogicznie jak poprzednio, obserwowano zmiany wydajności kwantowej fluorescencji TNS w czasie procesu aktywacji enzymu. Okazało się, że przemiany konformacyjne towarzyszące aktywacji chymotrypsynogenu powodują wyraźny wzrost wydajności kwantowej fluorescencji TNS (rysunek 5).

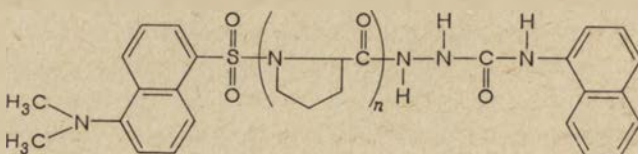


Rys. 5. Wzrost natężenia fluorescencji (o) i aktywności enzymatycznej (●) w czasie aktywacji chymotrypsynogenu przez trypsynę w obecności TNS (wg 21)

Opierając się na proporcjonalności natężenia fluorescencji TNS do aktywności enzymatycznej, autorzy mogli zatem zbadać wpływ siły jonowej, pH i stężenia reagentów na przebieg procesu aktywacji.

Gdy w cząsteczce występują dwa różne chromofory może między nimi zajść (przy spełnieniu warunków omówionych w teoretycznej części tego przeglądu) rezonansowa wymiana energii. Występowanie zjawiska fluorescencji uczulonej można wykryć obserwując zmiany widma wzbudzenia akceptora w obecności donora. Jak podano uprzednio, w przypadku izolowanego chromoforu widmo wzbudzenia pokrywa się z widmem absorpcji. Proces rezonansowej wymiany energii powoduje, że w obszarach widma wzbudzenia akceptora, odpowiadających maksimum absorpcji donora, pojawiają się dodatkowe przyczynki. Są one spowodowane przeniesieniem części energii wzbudzenia donora do akceptora. Ilustracją takiego efektu są dane otrzymane dla układu modelowego, którym była poli-L-prolina z grupą dansylową (akceptor) na jednym z końców łańcucha, oddzieloną określoną ilością monomerów L-proliny (1—12) od grupy α -naftyłowej (donor) na drugim końcu łańcucha (I) (28). Z rysunku 6 widać, że zgodnie z przewidywaniami (5) wydajność procesu wymiany energii maleje ze wzrostem liczby monomerów proliny (n). A zatem badanie wydajności rezonansowej wymiany energii pozwala oceniać odległość między donorem i akceptorem.

Przy interpretacji tego rodzaju danych niezbędne są jednak informacje dotyczące możliwości zmian wzajemnej orientacji oddziałujących chromoforów w czasie wykonywania pomiarów, ponieważ wydajność procesu wy-



I

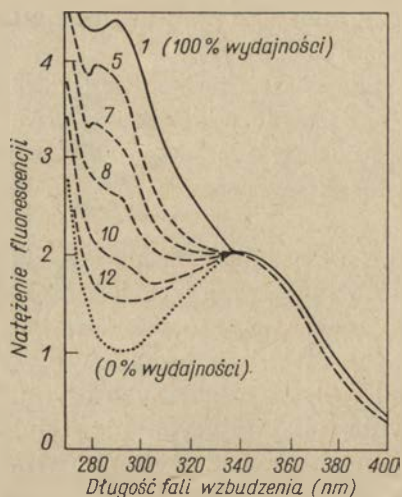
miany energii według Forstera (5) zależy nie tylko od odległości, ale też od orientacji przestrzennej donora względem akceptora.

Przykładem wykorzystania zależności wydajności fluorescencji uczulonej od konformacji białka zawierającego wzajemnie oddziałujące chromofory mogą być badania nad konformacją miozyny — jednego ze strukturalnych białek mięśniowych, posiadającego aktywność ATPazy (fosfohydrolaza ATP, EC 3.6.1.3).

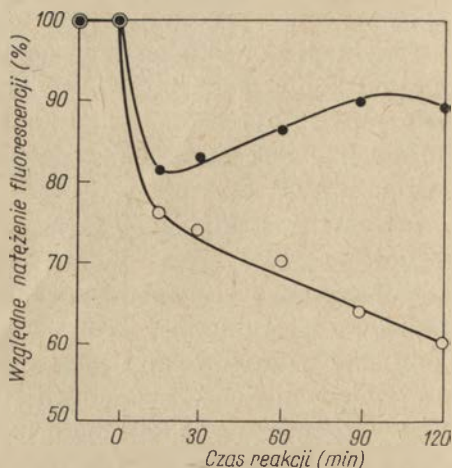
Cheung i Morales (2) stwierdzili, że czynniki zmieniające aktywność enzymatyczną miozyny powodują również zmniejszenie natężenia fluorescencji roztworu miozyny zawierającej ANS, który był w tym przypadku akceptorem energii od wzbudzonych reszt tryptofanu. Autorzy mogli stąd wnioskować o występujących pod wpływem badanych czynników zmianach konformacyjnych w miozynie, obejmujących niewielkie obszary w sąsiedztwie chromoforu. Dogodnym układem do badania własności strukturalnych miozyny jest także jej połączenie z DNS. Chromofor ten, podobnie jak ANS, może być akceptorem energii od wzbudzonych reszt tryptofanu w procesie rezonansowej wymiany energii. Ze zmian aktywności enzymatycznej miozyny następujących po utworzeniu kompleksu z DNS można wnioskować, że DNS przyłącza się w pobliżu centrum aktywnego tego białka (12).

W wyniku trawienia trypsyną miozyna rozpada się na dwa fragmenty: L-meromiozynę i H-meromiozynę; w tej ostatniej zlokalizowana jest aktywność ATPazowa miozyny. Podobne położenie maksimum widma absorpcji N- ϵ -DNS-lizyny oraz połączenia DNS z H-meromiozyną nasunęło wniosek, że DNS reaguje z ϵ -aminową grupą L-lizyny w cząsteczce H-meromiozyny (29). Kasuya i Takashina (13) obserwowali wpływ różnych czynników (pH , mocznika, chlorowodoru guanidyny, etanolu i dwuoksanu) na widmo fluorescencji miozyny zawierającej DNS. Badano widmo w obszarze fluorescencji tryptofanu i fluorescencji uczulonej DNS (wzbudzanej światłem o długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji tryptofanu, tj. 285nm), obejmujących zakres ultrafioletowy, oraz w zakresie widzialnym, odpowiadającym fluorescencji DNS wzbudzanej przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika (330nm). Po dodaniu dwuoksanu zauważono zależną od czasu zmianę natężenia fluorescencji (rysunek 7).

Krzywa wygaszania fluorescencji DNS wzbudzonego przy 330nm ma charakter dwufazowy, co autorzy interpretują jako rezultat występujących kolejno dwu rodzajów przejść strukturalnych pod wpływem dwuoksanu. Wniosek ten zgadza się z wynikami prac Tonomury i wsp. (32), którzy stwierdzili, że pierwszym efektem dodania dwuoksanu do miozyny jest wzrost zawartości α -heliksu w cząsteczce (mierzony metodą optycznej rotacji) z jednoczesnym zwiększeniem aktywności enzymatycznej białka, po czym zawartość α -heliksu i aktywność enzymatyczna zmniejszają się. Natomiast monotoniczny spadek natężenia fluorescencji reszt trypto-



Rys. 6. Widmo pobudzenia grupy dan-sylowej (akceptora) w zależności od liczby reszt proliny ($n = 1,5,7,8,10,12$) oddzielających ją od grupy α -naftylowej (donora) (wg 28)



Rys. 7. Wpływ dwuoksanu na natężenie fluorescencji miozyny znakowanej DNS. Długość fali światła emitowanego — 505nm; (●) długość fali światła wzbudzającego — 285 nm; (○) długość fali światła wzbudzającego — 330 nm (wg 13)

fanu w obecności dwuoksanu wiązany jest ze zmianami konformacyjnymi, zachodzącymi w miejscach odległych od centrum aktywnego miozyny.

W miarę podwyższania pH roztworu miozyny zawierającej DNS zmniejszało się natężenie fluorescencji. Wygaszanie fluorescencji tryptofanu w warunkach jonizacji reszt tyrozyny o $pK = 10,6$ autorzy przypisują rezonansowej wymianie energii między wzbudzonym tryptofanem i jodem fenolowym, natomiast wygaszanie fluorescencji uczulonej DNS, towarzyszące jonizacji reszt tyrozyny o $pK = 11,6$ interpretowane jest jako wynik zmian konformacyjnych, ponieważ jonizacja tych reszt wiąże się z denaturacją białka (33).

Etanol, który ma właściwość rozrywania wiązań hydrofobowych (23), zmienia przebieg zależności widma fluorescencji od pH . Obszar wygaszania fluorescencji tryptofanu przesuwają się do niższych wartości pH , co zdaniem autorów wskazuje na pewne rozluźnienie struktury, ułatwiające jonizację reszt tyrozylowych.

W obecności mocznika obserwuje się zmniejszenie natężenia fluorescencji tryptofanu oraz DNS w zakresie pH 8—10, natomiast w pH 10 zwiększa się silnie wydajność fluorescencji DNS wzbudzanego przy 330nm i maleje stopień wygaszania fluorescencji tryptofanu i DNS wzbudzanych przy 285nm. Autorzy przypuszczają, że te zmiany widma są spowodowane różnymi rodzajami przemian strukturalnych w cząsteczce miozyny. Widma fluorescencji miozyny w obecności chlorowodoru guanidyny lub mocznika w środowisku obojętnym wykazują w obu przypadkach różne

natężenie, co nasuwa przypuszczenie o odmiennych mechanizmach działania tych substancji na strukturę białka.

Metodę fluorescencji próbowano również zastosować do badania ewentualnych zmian konformacyjnych zachodzących w błonach biologicznych w zależności od ich stanu funkcjonalnego. W *Allach* i *wsp.* (35) analizowali możliwość zastosowania fluorescencji do badania zmian w lipidowych obszarach błon erytrocytów, zwracając uwagę na oddziaływanie ANS z fosfolipidami oraz z błonami erytrocytów. Wzrost natężenia fluorescencji i przesunięcie położenia maksimum widma w kierunku fal krótszych, towarzyszące przyłączaniu ANS do lizolecytyny, wskazują na hydrofobowe własności odpowiednich miejsc wiążących chromofor. W obecności błon erytrocytów ANS wykazuje również wzrost natężenia fluorescencji. Jednakże, biorąc pod uwagę zawartość lipidów w błonach, wzrost fluorescencji można było ocenić jako sześciokrotnie niższy niż w przypadku połączenia ANS z lizolecytyną. Jednocześnie w obecności ANS zmniejsza się wydajność kwantowa reszt tryptofanu białek błon, a w widmie pobudzenia ANS pojawiają się dodatkowe przyczynki, nie występujące w kompleksach ANS z fosfolipidami. Świadczy to o zachodzącym procesie rezonansowej wymiany energii pomiędzy resztami tryptofanu stanowiącymi donory i ANS jako akceptorem. Przytoczone tu obserwacje pozwalają według *Wallacha* i *wsp.* sądzić, że ANS przyłącza się głównie do białkowych obszarów błon.

Potwierdzają ten wniosek wyniki badań *Hasselbacha* i *Heimberga* (9) nad oddziaływaniem ANS z błonami siateczki sarkoplazmatycznej. Obserwowany przez nich wzrost natężenia fluorescencji ANS w zawiesinie frakcji mikrosomalnej wyizolowanych z mięśnia fragmentów siateczki sarkoplazmatycznej był taki sam, jak w obecności preparatów, z których usunięto fosfolipidy. Świadczyłoby to o tym, że niepolarne obszary błon, do których przyłącza się ANS, zawierają wyłącznie białka. Podobny wzrost fluorescencji ANS zachodzi w obecności pierwszo- i czwartorzędowych amin (np. bromku cetylotrójmetyloamoniowego) oraz w obecności kompleksu polilizyny z kwasem oleinowym. W związku z tym autorzy przypuszczają, że najprawdopodobniejszym miejscem wiązania ANS we fragmentach błon siateczki sarkoplazmatycznej są znajdujące się w niepolarnym otoczeniu grupy aminowe. *Hasselbach* i *Heimberg* zaobserwowali następnie cykliczne zmiany natężenia fluorescencji ANS w procesie zależnego od ATP pobierania wapnia przez preparaty siateczki sarkoplazmatycznej, będącego jedną z biologicznych funkcji tego systemu. Przypuszczają oni, że jest możliwe znalezienie korelacji między fluorescencją a stanem funkcjonalnym błony i, co za tym idzie, badanie zmian stanu funkcjonalnego błon metodą fluorescencji.

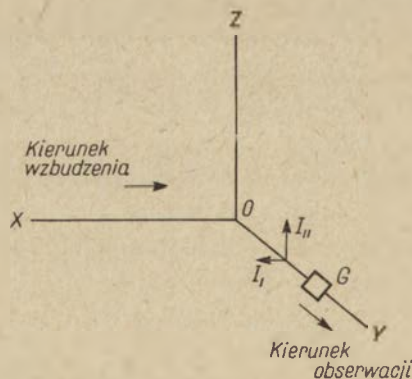
Z cytowanych wyżej prac (9, 35) wynika, że ANS łączy się głównie z białkami błon, co uniemożliwia użycie tego chromoforu do badania właściwości obszarów lipidowych oraz wzajemnych zależności pomiędzy biał-

kami i lipidami w błonach. Wallach i wsp. (35) proponują, aby w badaniach oddziaływań białka-lipidy metodą fluorescencyjną posługiwać się lipofilnymi chromoforami, które byłyby zdolne do pobierania energii wzbudzenia elektronowego od reszt tryptofanu białek. Jako przykłady takich chromoforów podają witaminę A i jej pochodne (7), antybiotyki polienowe (1), fenotiazynę i rezerpinę (34).

V. Zjawisko polaryzacji fluorescencji i jego zastosowanie w badaniach właściwości strukturalnych białek

Jak wspomniano na wstępie, warunkiem wystąpienia fluorescencji jest wzbudzenie cząsteczki na drodze absorpcji światła. Prawdopodobieństwo przejścia cząsteczek ze stanu k do stanu m wskutek absorpcji promieniowania jest proporcjonalne do wielkości $d_{mk}^2 E_0^2 \cos^2 \Theta$, gdzie E_0 jest amplitudą natężenia pola elektrycznego, d_{mk} (tzw. moment przejścia) jest wektorem równoległym do momentu dipolowego drobin, a kąt Θ jest kątem między wektorami E_0 i d_{mk} . Prawdopodobieństwo absorpcji światła jest największe, gdy kierunek drgań wektora elektrycznego fali absorbowanej jest równoległy do momentu dipolowego cząsteczki, tzn. $\Theta = 0$, $\cos \Theta = 1$. Ponieważ kierunek drgań wektora elektrycznego fali emitowanej jest równoległy do kierunku momentu przejścia cząsteczki emitującej, cząsteczka emituje światło spolaryzowane. Polaryzację emisji można zmierzyć. Jeżeli badany roztwór naświetla się światłem spolaryzowanym w kierunku OZ (schemat 2), po czym obserwuje się w kierunku OX natężenie dwóch składowych spolaryzowanych światła fluorescencji: składowej prostopadłej I_{\perp} , drgającej w kierunku OX i składowej równoległej I_{\parallel} , drgającej w kierunku OZ, polaryzację fluorescencji p definiuje wyrażenie:

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad 1$$



Schemat 2. Badanie polaryzacji fluorescencji

Badany roztwór znajduje się w punkcie O. Natężenie dwóch składowych spolaryzowanych fluorescencji określa się za pomocą odpowiedniego urządzenia G (np. przyzmatu Nikola) (37).

Ze względu na zależność między kierunkiem momentu przejścia cząsteczki a prawdopodobieństwem absorpcji i kierunkiem drgań wektora elektrycznego fali emitowanej wartość p zależy od wzajemnej orientacji momentów przejść drobin w chwili absorpcji i w chwili emisji (tzw. oscylatorów absorpcji i emisji). Obliczenia teoretyczne wykazały, że wartość p zawiera się w granicach od $-1/3$ do $1/2$. Wartość $p = 1/2$ odpowiada sytuacji, gdy oscylatory absorpcji i emisji są równoległe; $p = -1/3$ gdy tworzą one kąt $\pi/2$. A zatem wartość p zależy zarówno od struktury elektronowej cząsteczki, determinującej wzajemną orientację momentów emisji i absorpcji, jak też od czynników zewnętrznych, zmieniających orientację momentu emisji względem momentu absorpcji w czasie trwania stanu wzbudzonego. Czynniki zewnętrznymi są przede wszystkim ruchy Browna wzbudzonej cząsteczki oraz zjawisko przekazywania energii do sąsiednich cząsteczek, których momenty absorpcji mają kierunki zbliżone do momentów emisji wzbudzonych chromoforów. W lepkich, rozcieńczonych roztworach, w których wymienione zjawiska nie odgrywają dużej roli, wielkość polaryzacji p jest określona elektronową strukturą cząsteczki i wykazuje maksymalną wartość dla danej długości fali światła wzbudzającego $|p| = |p_0|$. W stężonych, lepkich roztworach możliwość przekazywania energii do sąsiadujących ze wzbudzonym chromoforem drobin powoduje, że następuje pewna depolaryzacja fluorescencji i $|p| \leq |p_0|$. Natomiast w roztworach rozcieńczonych, o niskiej lepkości, główną przyczyną depolaryzacji są ruchy Browna cząsteczki, których szybkość, a więc również szybkość depolaryzacji, zależy od właściwości strukturalnych „nośnika” oscylatora emisji (37). Perrin (cyt. wg 10) wykazał, że depolaryzacja promieniowania fluorescencji, spowodowana ruchami Browna sferycznej drobin w roztworze, spełnia zależność:

$$\left(\frac{1}{p} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{RT}{\eta V} \tau\right) \quad 2$$

gdzie p_0 — polaryzacja emisji fluorescencji w nieobecności czynników depolaryzujących, η — lepkość roztworu, τ — czas życia stanu wzbudzonego, V — objętość molowa cząsteczki.

Pomiar polaryzacji fluorescencji umożliwia znalezienie tzw. czasu rotacyjnej relaksacji ρ . Jeżeli przez Θ oznaczy się kąt między kierunkami przybieranymi przez oscylator emisji w krótkim przedziale czasu Δt , a przez ρ czas t wymagany dla zmiany wartości $\cos\Theta$ od 1 w chwili $t = 0$ do wartości $1/e$ w chwili t , to zależność między wartościami ρ i p można przedstawić następująco:

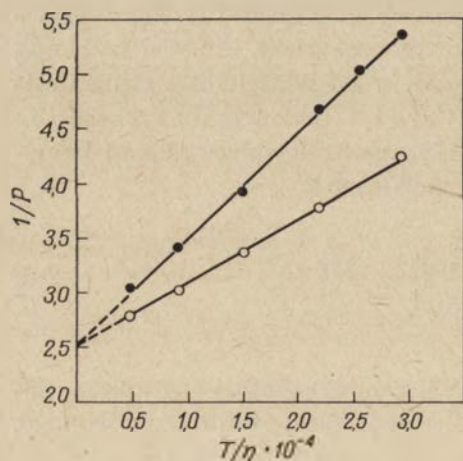
$$\left(\frac{1}{p} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{3\tau}{\varrho}\right) \quad 3$$

Ze wzorów (2) i (3) widać, że z wykresu zależności $\frac{1}{p}$ od $\frac{T}{\eta}$ można określić ϱ chromoforu. Zależność taką dla ANS związanego z apomioglobina przedstawia przykładowo rysunek 8.

Otrzymaną wartość ϱ dla kompleksu ANS-apomioglobina autorzy porównali z wartością ϱ metmioglobiny obliczoną inną metodą. Zbliżone wartości ϱ w obu przypadkach sugerują, że związaną ANS nie zmienia w istotny sposób właściwości konformacyjnych białka.

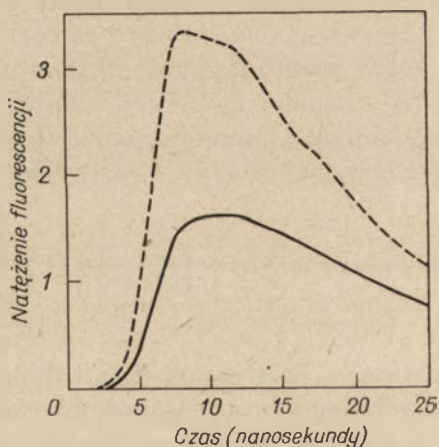
Zjawisko polaryzacji fluorescencji umożliwia również badanie szybko zachodzących (w czasie rzędu nanosekund) zmian konformacyjnych białek. Przykład mogą stanowić wyniki pracy, w której, stosując metodę polaryzacji fluorescencji, badano stopień elastyczności centrum aktywnego α -chymotrypsyny. W tym celu do centrum aktywnego enzymu wprowadzono fluoryzujący chromofor — *p*-nitrofenyloantranilan (NPA). Tak „naznaczoną” chymotrypsynę naświetlano trwającym kilka nanosekund błyskiem światła spolaryzowanego, po czym mierzono w funkcji czasu natężenie składowych fluorescencji spolaryzowanych w kierunkach: równoległym (F_y) i prostopadłym (F_x) do kierunku polaryzacji wiązki światła wzbudzającego (rysunek 9).

W chwili naświetlania najbardziej prawdopodobne jest wzbudzenie tych chromoforów, których moment absorpcji jest równoległy do kierunku



Rys. 8. Określenie czasu rotacyjnej relaksacji połączenia ANS z apomioglobina (●) i apohemoglobina (O)

Na osi rzędnych odłożono odwrotność polaryzacji $\left(\frac{1}{p}\right)$, na osi odciętych stosunek $\frac{T}{\eta}$, gdzie T — temperatura, η — lepkość roztworu (wg 26)



Rys. 9. Zależność polaryzacji fluorescencji grupy *p*-nitrofenyloantranilowej połączonej z α -chymotrypsyną od czasu (wg 27)

(—) F_x — składowa prostopadła, (---) F_y — składowa równoległa

ku drgań wektora elektrycznego światła wzbudzającego. Z tego powodu wkrótce po naświetleniu natężenie składowej równoległej fluorescencji F_y było ponad dwukrotnie większe niż składowej prostopadłej F_x . Po upływie kilku nanosekund ruchy Browna α -chymotrypsyny i związanego z nią sztywno wzbudzonego chromoforu spowodowały, że obie składowe spolaryzowane fluorescencji stały się równe. Szybkość zaniku różnicy pomiędzy wielkością F_x i F_y , będąca funkcją szybkości zmiany orientacji momentu emisji chromoforu, zależy od elastyczności centrum aktywnego chymotrypsyny. Pomiar zmian wielkości F_x i F_y w czasie pozwolił na wyznaczenie ρ związanego chromoforu. Porównanie otrzymanego w ten sposób czasu rotacyjnej relaksacji z wartościami obliczonymi teoretycznie dla przypadków, gdy a) centrum aktywne α -chymotrypsyny jest tak elastyczne, że ruchy chromoforu nie zależą od ruchów pozostałych części białka, oraz b) całą cząsteczkę enzymu traktuje się jak sztywną kulę, pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że centrum aktywne α -chymotrypsyny, przynajmniej w czasie rzędu nanosekund, jest sztywne.

Pomiar polaryzacji fluorescencji może być wykorzystany także do określania stałej równowagi wiązania drobnocząsteczkowych związków fluoryzujących do białek (14). Dla większości barwników w roztworach wodnych czas rotacyjnej relaksacji $\rho \ll \tau$, wskutek czego polaryzacja fluorescencji jest bardzo mała. Przyłączenie barwnika do dużej cząsteczki białka zwiększa czas rotacyjnej relaksacji i polaryzację fluorescencji. Pomiar wartości p dla chromoforu niezwiązanego i chromoforu w kompleksie z białkiem pozwala określić jego stężenie w obu tych stanach, a zatem i stałą równowagi tworzącego się połączenia.

Jak widać z tego krótkiego przeglądu, badanie widm fluorescencji może dostarczyć wielu informacji dotyczących właściwości niewielkich obszarów cząsteczek białkowych w otoczeniu chromoforów, rozszerzając zasób wiadomości o przebiegu procesów w określonych obszarach cząsteczki białkowej i przyczyniając się do ich lepszego zrozumienia.

LITERATURA

1. Bergy M. E., Eble T. E., *Biochemistry* 7, 653 (1969).
2. Cheung H. C., Morales M. F., *Biochemistry* 8, 2177 (1969).
3. Crammer J., Neuberger A., *Biochem. J.* 37, 302 (1943).
4. Edelhoch H., Brand L., Wilchek M., *Biochemistry* 6, 547 (1967).
5. Forster J. F., *Discussions Faraday Soc.* 27, 7 (1959).
6. Gilmore E. H., Gibson G. E., McClure D. S., *J. Chem. Phys.* 20, 829 (1952).
7. Hagins W. A., Jennings W. H., *Discussions Faraday Soc.* 27, 180 (1959).
8. Hartley B. S., Massey V., *Biochim. Biophys. Acta* 21, 58 (1956).
9. Hasselbach W., Heimberg K. W., *J. Membrane Biol.* 2, 341 (1970).
10. Hercules D. M., w *Fluorescence and Phosphorescence Analysis. Principles and Applications*, red. D. M. Hercules, Interscience Publishers, New York-London-Sydney, 1966, str. 1.

11. Kasha M., *Radiation Res. Suppl.* **2**, 243 (1960).
12. Kasuya M., Takashina H., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 452 (1965).
13. Kasuya M., Takashina H., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 35 (1967).
14. Laurence D. J. R., *Biochem. J.* **51**, 108 (1952).
15. Lewis G. N., Calvin M., *Chem. Rev.* **25**, 273 (1939).
16. Lippert E., *Z. Elektrochem.* **61**, 962 (1957).
17. Lynn J., Fasman G. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 327 (1968).
18. Mataga N., Kaifu Y., *Mol. Phys.* **7**, 137 (1964).
19. McClure W. O., Edelman G. M., *Biochemistry* **5**, 1909 (1966).
20. McClure W. O., Edelman G. M., *Biochemistry* **6**, 559 (1967).
21. McClure W. O., Edelman G. M., *Biochemistry* **6**, 567 (1967).
22. Nag-Chadhuri J., Stoessel L., McGlynn S. P., *J. Chem. Phys.* **38**, 2027 (1963).
23. Schrier E., Scheraga H., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 406 (1962).
24. Shore V. G., Pardee A. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 355 (1956).
25. Steiner R. F., Edelhoeh H., *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 341 (1963).
26. Stryer L., *J. Mol. Biol.* **13**, 482 (1965).
27. Stryer L., *Science* **162**, 526 (1968).
28. Stryer L., Haugland R. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 719 (1967).
29. Takashina H., *Biochim. Biophys. Acta* **200**, 319 (1970).
30. Takenaka O., Nishimura Y., Takenaka A., Shibata K., *Biochim. Biophys. Acta* **207**, 1 (1970).
31. Takenaka O., Shibata K., *J. Biochem.* **65**, 835 (1969).
32. Tonomura Y., Sekiya K., Imamura K., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 296 (1963).
33. Tonomura Y., Sekiya K., Imamura K., Tokiwa T., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 305 (1963).
34. Udenfriend S., Duggan D. E., Vasta B. M., Brodie B. B., *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **120**, 26 (1957).
35. Wallach D. F. H., Ferber E., Selin D., Widekamm E., Fisher H., *Biochim. Biophys. Acta* **203**, 67 (1970).
36. Weber G., *Biochem. J.* **51**, 155 (1952).
37. Weber G., w *Fluorescence and Phosphorescence Analysis. Principles and Applications*, red. D. M. Hercules, Interscience Publishers, New York-Londyn-Sydney 1966, str. 217.
38. Weber G., Laurence D. J. R., *Biochem. J.* **51**, XXXI (1954).
39. Weber G., Young L. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 1415 (1964).
40. Wehry E. L., Rogers L. B., w *Fluorescence and Phosphorescence Analysis. Principles and Applications*, red. D. M. Hercules, Intersciences Publishers, New York-Londyn-Sydney 1966, str. 81.
41. Winkler M. H., *Biochemistry* **8**, 2586 (1969).

LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ*, ZOFIA POLANOWSKA**

Kwaśne białka jąder komórkowych

Acidic Proteins of Cell Nuclei

The properties and function of nuclear acidic proteins as the regulators of gene activity has been presented.

Rosnące w ostatnich latach zainteresowanie kwaśnymi białkami jądrowymi wiąże się z sugestiami co do ich udziału w regulacji funkcji genów (17, 18, 34, 68). Już w 1893 roku Lilienfeld (37) wykazał w jądrach tymocytów obecność frakcji białkowej nie ekstrahującej się rozcieńczonymi kwasami. Jednak dopiero od lat 40-tych naszego stulecia datują się szersze badania nad tą grupą białek jądrowych z istnym chaosem w ich nomenklaturze.

Stedmanowie (58) wprowadzili pojęcie tzw. chromosominy dla zawierającego tryptofan białka o charakterze kwaśnym, występującego w pozostałości jąder komórkowych po ekstrakcji histonów rozcieńczonym kwasem mineralnym. Ilość chromosominy obliczana z różnicy między masą odlipidowanych jąder komórkowych, a sumą obecnych w nich kwasów nukleinowych i histonów wahała się od 30 do 70% przy czym wyższe wartości miały cechować tkanki nowotworowe i embrionalne.

Mirsky i Pollister (42) wykazali, że w kompleksie dezoksyrybonukleoproteidowym, nazwanym przez nich „chromozyną” około 10% stanowi białko nierozpuszczalne w roztworze 0,34M HgSO_4 —1,88M H_2SO_4 (w przeciwieństwie do histonów) i zawierające tryptofan. Białko to określili symbolem „Tr pr” (ang. *Tryptophan protein*). Wydaje się, że jego odpowiednikiem jest białko tzw. resztkowego chromosomu Mirsky'ego i Risa (43) odpowiedzialne za kształt chromosomów.

Według Zbarskiego i wsp. (73, 74) białka niehistonowe zasocjowane z DNA w kompleksie dezoksynukleoproteidowym (DNP), stanowią około 17% materiału jądrowego wątroby szczura. Z pozostałości po usunięciu DNP ekstrahuje się 0,025N NaOH tzw. białko kwaśne stanowiące ok. 5,6% masy jądra. Zawiera ono 15,6% RNA i reprezentuje białko jąd-

* Doc. dr habil., Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Fizjologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

** Mgr, Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Fizjologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

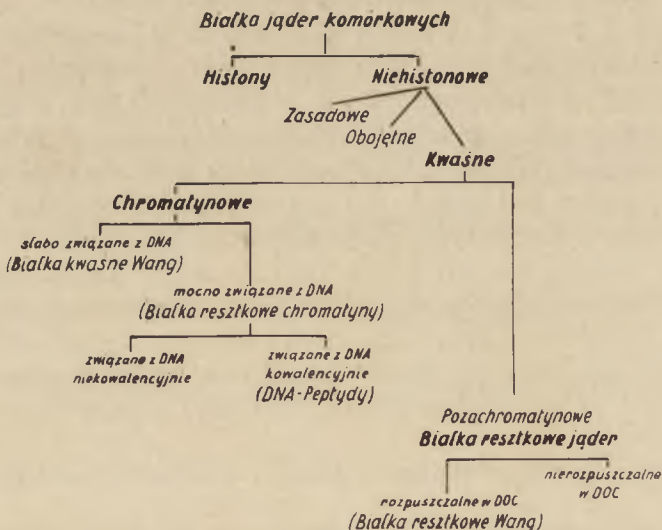
rek oraz resztkowych chromosomów. Nierozpuszczalna w tych warunkach reszta (4,5%) wolna od kwasów nukleinowych, zwana białkiem resztkowym stanowi białko otoczki jądrowej.

Termin „białko resztkowe” jest używany w literaturze dla różnych frakcji białek jądrowych. Np. Allfrey i wsp. (1) oraz Ono i Terayama (45) uważają za resztkowe białko frakcję jąder komórkowych, która pozostaje po dokładnym usunięciu globulin i DNP. Białka resztkowe w badaniach Steele'a i Buscha (56, 57) stanowią pozostałość po kolejnych ekstrakcjach jąder komórkowych za pomocą 0,14M NaCl lub buforu (albo łącznie obydwoma), 2M NaCl i rozcieńczonym NaOH, a w terminologii Dounce'a i Hilgartnera (16) — pozostałość po wyizolowaniu z jąder komórkowych globulin jądrowych (0,14M NaCl), histonów (0,1N HCl) oraz lipidów (alkohol+eter) i strawieniu DNA przez DNazę. Morfologicznie w skład resztkowej frakcji jądrowej wchodzi jąderka, błona jądrowa i struktury przypominające resztkowe chromosomy.

Szereg badań nad kwaśnymi białkami jądrowymi prowadzono w pracowni Wang. Początkowo zajmowano się zasadorozpuszczalną frakcją pozostałości jąder komórkowych po usunięciu histonów i DNA (71, 72) a wytrącającą się w pH 5,8. (Mayer i Gulick (41) nazywali ją precypitatem w pH 6). Później zaś wyodrębniono rybonukleoproteidy i inne białka jądrowe oraz badano ich aktywność metaboliczną (48, 59, 60, 61, 62).

W niniejszym artykule zaproponowano dla niehistonowych kwaśnych białek jądrowych nomenklaturę podaną na schemacie 1, a opartą głównie na pracach Wanga (64, 66) oraz Krivcova i Bogdanova (33).

W białkach kwaśnych chromatynowych wyróżnia się 2 typy, tj. słabo i mocno związane z DNA. Pierwsze z nich oddysocjują w 0,14M NaCl



Schemat 1. Podział białek jądrowych wg nomenklatury stosowanej w artykule

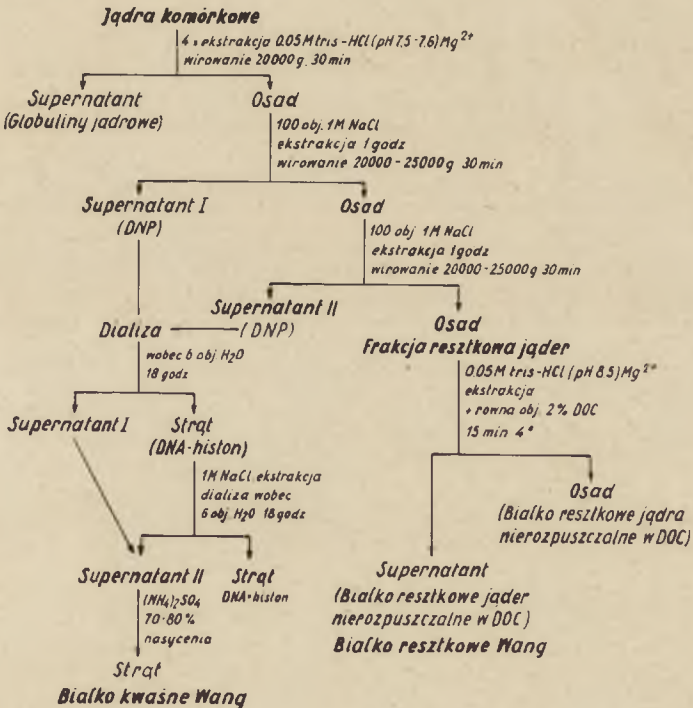
i mogą nosić nazwę „białka kwaśnego Wang”. W typie drugim, czyli „białek resztkowych chromatyny” dają się wyodrębnić białka sprzężone z DNA wiązaniami silnymi, ale niekowalencyjnymi, oraz wiązaniami kowalencyjnymi (to ostatnie pojęcie odnosi się raczej do peptydów).

Nazwę „białka kwaśne pozachromatynowe” ewentualnie „białka resztkowe jąder” rezerwuje się dla pozostałości jąder komórkowych po wyekstrahowaniu RNP i DNP, z wyodrębnieniem dwu frakcji, tj. nierozpuszczalnej oraz rozpuszczalnej w dezoksycholanie sodu (DOC). Ta druga frakcja może być nazywana „białkiem resztkowym Wang”.

P. Białka kwaśne chromatynowe

1. Metody wyodrębniania

Klasyyczne metody otrzymywania tego typu białek drogą ekstrakcji rozcieńczonych alkaliami, najczęściej przy użyciu rozpuszczalników organicznych, powodowały znaczną degradację i zmianę właściwości biologicznych. Przykładowo wg *Sevaga* i wsp. (53) kwaśne białko wyodrębnia się z DNP przez wytrząsanie z równą objętością mieszaniny chloroformu z al-

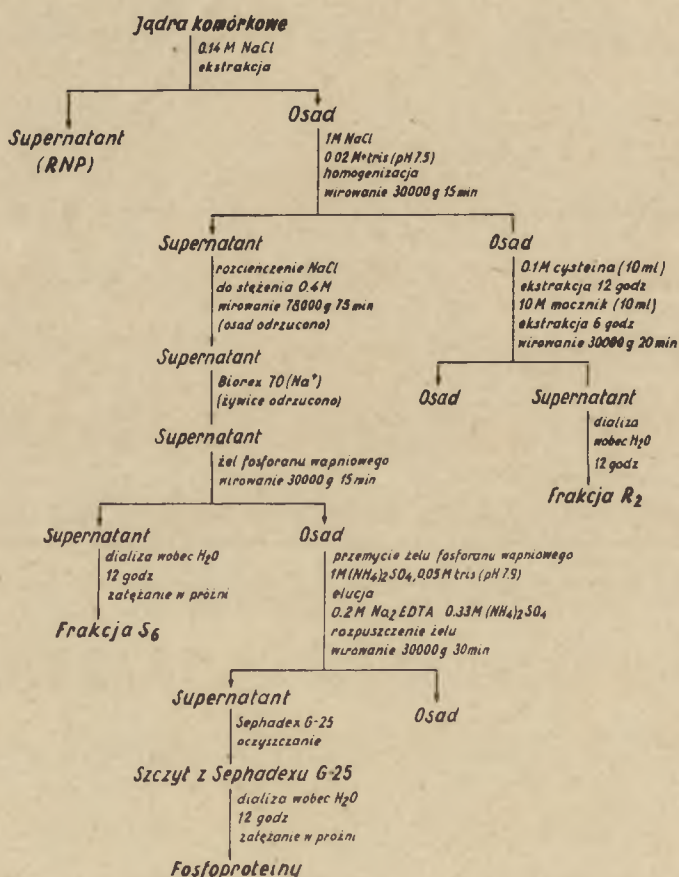


Schemat 2. Otrzymywanie kwaśnych białek chromatynowych i resztkowych metodą Wang (64, 66)

koholem izoamylowym (3:1) i zbieranie warstwy gromadzącej się na granicy faz. Można traktować w ten sposób DNP pozbawiony histonów, rozpuszczony w 2M NaCl (pH 10) lub też lepki roztwór DNP jako całość. W tym drugim przypadku z uzyskanego żelu białkowego usuwa się histony za pomocą 0,2N HCl.

Pod koniec lat 60-tych opracowano bardziej łagodne metody izolowania chromatynowych białek kwaśnych, głównie z tkanki wątrobowej szczura.

Wg Wang (66) jądra komórkowe (11), pozbawione rozpuszczalnych jądrowych białek i rybosomów ekstrahuje się 2-krotnie 1M NaCl. Podczas dializy wyciągu wobec 6 objętości H₂O przez 18 godz. (wg późniejszych doniesień 6—8 godz. (69)) z kompleksu DNP wypada nukleohiston, a białko kwaśne Wang oddysocjowuje od DNA i pozostaje w roztworze, z którego można je wydzielić siarczanem amonu przy 70—80% nasyceniu (schemat 2).



Schemat 3. Izolowanie fosfoproteidów i innych kwaśnych białek jądrowych (34, 55)

Benjamin i Gellhorn (3) ekstrahowali frakcję chromatynową ewentualnie jądra komórkowe uwolnione od histonów zbuforowanym 4M CsCl o pH 11,6, po czym oddzielali białko kwaśne od DNA i innych związków drogą ultrawierowania w 4M CsCl (45000 obr./min., 60—70 godz., 6°).

Langan (34) podał metodę izolowania fosfoproteidów jądrowych i tzw. frakcji S_6 stanowiących znaczny odsetek kwaśnych białek jądrowych (schemat 3).

Bustos-Valdes i wsp. (10) zastosowali ekstrakcję pozbawionego histonu i odlipidowanego materiału jądrowego roztworem 0,1N HCl — 8M mocznik.

Marushige i wsp. (40) uzyskali 50—60% wydajność w preparatyce białka kwaśnego chromatynowego wprowadzając ekstrakcję chromatyny wątroby szczura pozbawionej histonów solą sodową siarczanu dodecyłu (SDS) w pH 8.

Zgodnie z Johnsem i Forresterem (26) z DNP grasicy cielęcej po ekstrakcji histonów 0,25N HCl można wyizolować, za pomocą 0,3M NaCl, kwaśne białka o tych samych N-końcowych aminokwasach jak w białkach kwaśnych opisanych przez innych autorów (8, 9).

Ostatnio Krivcov i Bogdanov (33) podali warunki wyodrębniania kompleksu DNA-białko resztkowe chromatyny (białko chromatynowe kwaśne mocno związane z DNA) z grasicy cielęcej pozbawionej rybonukleoproteidów. Wyciąg z DNP uzyskany zbuforowanym 2M NaCl lub 4M chlorkiem guanidyny poddawali jednej z czterech operacji:

- 1) dwukrotne ultrawierowanie (165000g, 5 godz.) w 2M NaCl,
- 2) sączenie na kolumnie z 5% agarozą,
- 3) 4-krotne wytrącanie etanolem (końcowe stężenie 48%) lub też
- 4) 3-krotne wytrącanie etanolem (końcowe stężenie 32%) ekstraktów DNP w 2,5M NaCl.

Uzyskane kompleksy zawierały 1,6—2,6% chromatynowego białka resztkowego. Jeśli zastosowano 2—3-krotne odbiałczanie roztworów DNP 0,5% SDS zgodnie z techniką Kay'a i wsp. (27), to otrzymane preparaty zawierały tylko około 0,2% białka. Podobne kompleksy, być może DNA-peptydy, otrzymywano w wyniku alkalicznej obróbki (1N NaOH, 3 godz., 37°) czy odbiałczania fenolem połączeń DNA-chromatynowe białko resztkowe, a także z kwasorozpuszczalnej frakcji uzyskanej na drodze hydrolizy tych połączeń za pomocą 5% TCA (20min., 90°).

2. Frakcjonowanie

Pierwsza i najbardziej podstawowa technika frakcjonowania pochodzi z pracowni Wanga (66). Dotyczy ona białka kwaśnego słabo związanego z DNA czyli białka kwaśnego Wang (por. schemat 2 i 4). Rozpuszczano je i dializowano wobec 0,05M buforu tris (pH 8,5), następnie wirowano przez 1 godz. przy 105000g. Osad zawieszano w tym samym buforze i po odwiro-

waniu nierozpuszczalnego materiału przy 20000g otrzymywano frakcję R-RNP (ang. *residual ribonucleoprotein particles*). Z supernatantu po wirowaniu przy 105000g przez zakwaszenie 1N CH_3COOH do pH 5,7 wydzielano tzw. frakcję „ pH 6”. Przy dalszym zakwaszaniu do pH 4,8 wytrącała się frakcja „ pH 5”. Płyn nadosadowy o pH 4,8 nasycono następnie siarczanem amonu (70—80%) uzyskując frakcję A. S. ppt (ang. *ammonium sulphate precipitate fraction*). Frakcja A. S. ppt z grasicy cielęcej jest najbardziej kwaśną grupą białek kwaśnych chromatyny (stosunek aminokwasów kwaśnych do zasadowych 1,87). W dalszych pracach (65) rozdzielono ją na 4 podfrakcje wytrącające się w pH 4,8 siarczanu amonu przy nasyceniu 30, 40, 50 oraz 60—80%. Względny procentowy udział poszczególnych frakcji w białku kwaśnym Wang z grasicy cielęcej i wątroby szczura przedstawia tablica 1.

Tablica 1

Udział procentowy frakcji w białku kwaśnym Wang z wątroby szczura (66) i grasicy cielęcej (65)

Frakcja	Wątroba szczura	Grasica cielęcica
R-RNP	14,0	13,0
„ pH 6”	14,1	43,4
„ pH 5”	27,8	14,5
A.S.ppt	44,1	29,1

Główną frakcją kwaśnych białek Wang wątroby szczura stanowi A. S. ppt, natomiast w przypadku grasicy cielęcej — „ pH 6”.

K i n g i G o r d o n (29) otrzymali kwaśne białka chromatynowe z wątroby szczura przypominające szeregiem właściwości kwaśne białka Wang, frakcjonując na hydroksypatycie wyciąg uzyskany 0,1N NaOH z kwasnierozpuszczalnej pozostałości DNP. Uzyskali oni frakcję „1” wymywającą się 0,1M fosforanem potasu i frakcję „2” eluowaną 0,2M fosforanem potasu.

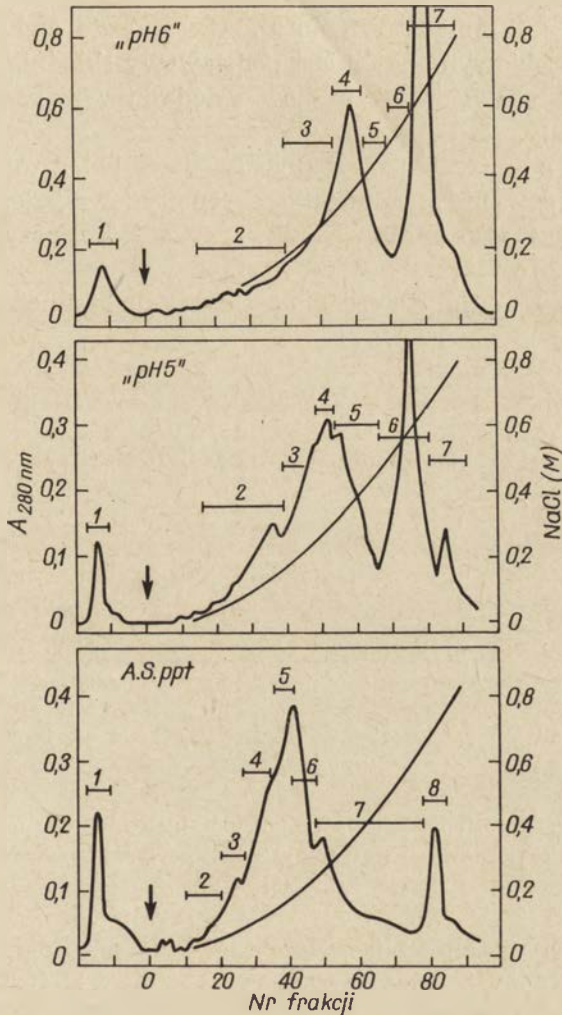
3. Niejednorodność fizykochemiczna

Wybitnej niejednorodności kwaśnych białek chromatynowych dowodzi ich zachowanie się w procesie elektroforezy, chromatografii jonowymiennej oraz sedymentacji w ultrawirówce. Wszystkie tego rodzaju analizy fizykochemiczne dotyczą głównie białka kwaśnego Wang (66, 70).

W a n g i J o h n s (70) zastosowali chromatografię na DEAE-celulozie dla czterech frakcji białek kwaśnych: R-RNP, „ pH 6”, „ pH 5” i A. S. ppt. Dializowany roztwór białka wprowadzano na kolumnę przemytą 0,005M buforem fosforan-tris (pH 8,2) i eluowano tymże buforem o wzrastającym

stężeniu NaCl. Profile chromatograficzne 3 frakcji przedstawia rysunek 1; brak na nim „R-RNP” ze względu na bardzo niskie odzyskanie tej frakcji z kolumny.

Wszystkie profile zawierają „przedzierający się” szczyt 1, który reprezentuje materiał niezadsorbowany na DEAE-celulozie. Szczyt ten we frakcji A. S. ppt ma charakter białka zasadowego i prawdopodobnie stanowi zanieczyszczenie histonami. We wszystkich trzech frakcjach występuje też składnik, wymywający się 0,5M lub wyższym stężeniem NaCl. Główny szczyt frakcji A. S. ppt przechodzi do 0,2M NaCl, a frakcji „pH 5” i „pH



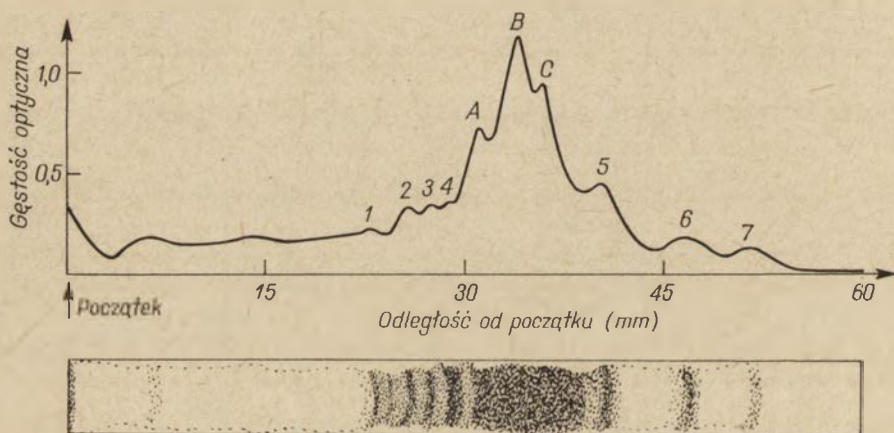
Rys. 1. Chromatografia na DEAE-celulozie frakcji „pH 6” i „pH 5” oraz A. S. ppt kwaśnego białka Wang z wątroby szczura. Strzałka wskazuje start gradientu NaCl („przedzierający” się szczyt oznaczono jako 1) (70)

6'' — odpowiednio do 0,3 i 0,4M NaCl. Frakcje „pH 5'' i A. S. ppt wykazują wyższą niejednorodność w porównaniu z „pH 6''.

Frakcje chromatynowych białek kwaśnych okazały się niejednorodne (66) w toku elektroforezy w żelu skrobiowym (pH 8,5), prowadzonej według techniki Smithiesa (54). Bardzo słabo rozpuszczalna frakcja R-RNP pozostaje na starcie, a „pH 6'' posuwa się jako ciągle niejednolite pasmo z 3 wyraźnymi obszarami. We frakcji „pH 5'' widoczne są 3 prążki podobne do „pH 6'' oraz 2 dodatkowe smugi o wyższej ruchliwości elektroforetycznej. W A. S. ppt można zidentyfikować 6 ujemnie naładowanych komponentów obok jednego pasma wędrującego do katody.

Elektroferogramy głównych szczytów frakcji „pH 6'' i „pH 5'' otrzymanych w toku chromatografii na DEAE-celulozie wykazały słaby rozdział w żelu skrobiowym, natomiast podstawowy składnik A. S. ppt dzielił się w tych warunkach na 11 prążków z dodatkowym pasmem poruszającym się do katody.

Benjamin i Gellhorn (3) zanalizowali elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym kwaśne białka chromatynowe jąder wątroby szczura uzyskane drogą wirowania w gradiencie CsCl. Żel przygotowano w buforze lizynowym o pH 11,6 i w tym samym buforze prowadzono rozdział przy 4mA przez 150 min. Heterogenność obrazuje rysunek 2.



Rys. 2. Elektroforeza pozioma w żelu poliakrylamidowym kwaśnego białka chromatynowego z jąder komórkowych wątroby szczura (powyżej krzywa densytometryczna) (3)

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (7,5%, pH 8) chromatynowych białek kwaśnych otrzymanych przez Kinga i Gordona (29) prowadzi do rozdziału frakcji „1'' na dwa większe i kilka drobnych prążków podczas gdy frakcja „2'' wędruje jako pojedyncza smuga.

Analityczne ultrawirowanie 4 frakcji kwaśnych białek Wang wykazało odmienną i niejednorodną sedymentację poszczególnych frakcji (66).

4. Skład chemiczny

Zawartość kwasów nukleinowych. Analiza chemiczna 4 frakcji kwaśnych białek Wang z wątroby szczura (66) wykazuje w nich dodatkową obecność RNA, DNA i fosforu (tabl. 2).

Znikomy odsetek kwasów nukleinowych cechuje frakcję A. S. ppt a najbogatszą w nie jest R-RNP.

Frakcje „1” i „2” kwaśnych białek chromatynowych, uzyskane przez Kinga i Gordona (29), zawierają RNA i fosfor związany z białkiem a nie wykrywa się w nich DNA. Niewielkie ilości kwasów nukleinowych (0,3—0,5%) zawierają również chromatynowe białka kwaśne otrzymane przez Marushige'a i wsp. (40).

Tablica 2

Zawartość procentowa białka, RNA, DNA i fosforu w chromatynowych białkach kwaśnych wątroby (66)

Frakcja	Białko	RNA	DNA	Fosfor
R-RNP	95,7	3,6	0,69	0,140
„pH 6”	97,4	2,3	0,30	0,021
„pH 5”	98,5	1,4	0,06	0,017
A.S. ppt	99,6	0,4	0,00	0,008

Skład aminokwasowy oznaczono dotychczas dla całkowitych białek kwaśnych chromatynowych (3, 40), poszczególnych frakcji białka kwaśnego Wang (66) i dla reszkowych białek chromatyny (33). Dane te zebrano w tablicy 3. Wszystkie badane białka kwaśne cechują się wyraźną przewagą aminokwasów kwaśnych nad zasadowymi. Można zaobserwować szereg podobieństw dla frakcji kwaśnych białek Wang z wyjątkiem frakcji R-RNP izolowanych z wątroby szczura (66) i grasicy cielęcej (65). Zbliżony jest też skład aminokwasowy frakcji „pH 6”, „pH 5” i A. S. ppt z grasicy cielęcej.

Analiza składu aminokwasowego reszkowych białek chromatyny otrzymanych różnymi metodami z grasicy cielęcej przez Krivcova i Bogdanova (33) wykazała zdecydowanie kwaśny charakter tych białek z przewagą kwasu glutaminowego oraz rozbieżności dla poszczególnych preparatów zwłaszcza w zawartości aminokwasów zasadowych (głównie argininy), a także proliny (tabl. 4).

Aminokwasy N-końcowe. Zgodnie z doświadczeniami Johnsa i Forrestera (26) kwas asparaginowy, alanina, seryna i prolina stanowią 76% N-końcowych aminokwasów otrzymanego przez tych autorów kwaśnego białka DNP grasicy cielęcej. W mniejszych ilościach obecne są walina, leucyna, treonina i lizyna. W białkach nierozpuszczalnych w fenolu z DNP guzów Walkera 256 (9) N-końcowe aminokwasy są reprezen-

Skład aminokwasowy kwaśnych białek chromatynowych wątroby szczura i grasicy cielęcia (mol %)

Aminokwas	Wątroba szczura			Grasica cielęcia						
	Całkowite białko kwaśne chromatynowe			Frakcje białka kwaśnego Wang (65, 66)						
	Marushige i wsp. (40)	Benjamin i Gellhorn (3)	R—RNP	"pH 6"	"pF 5"	A. S.ppt	R—RNP	"pH 6"	"pH 5"	A. S.ppt
Lizyna	6,25	6,23	7,38	7,19	7,68	7,70	7,75	7,3	6,89	6,94
Histydyna	1,51	1,53	2,31	2,22	2,12	2,11	2,52	2,34	2,00	1,74
Arginina	5,60	9,33	5,76	5,89	5,67	4,58	8,07	6,24	5,66	4,25
Kwas asparaginowy	9,48	10,95	8,63	8,73	9,41	9,76	9,25	9,02	9,78	9,78
Treonina	5,50	3,62	5,02	4,90	4,80	5,25	5,47	4,81	4,60	5,76
Seryna	7,54	8,51	5,78	5,66	4,98	5,22	6,12	5,40	5,36	5,79
Kwas glutaminowy	12,39	12,21	12,4	12,6	15,4	15,2	10,7	13,2	15,7	14,40
Prolina	4,96	5,50	4,86	4,92	4,52	4,82	3,86	4,88	4,48	6,38
Glicyna	7,54	14,00	7,15	7,08	7,47	8,25	7,13	6,60	6,60	7,65
Alanina	7,65	5,49	7,67	8,15	8,30	8,18	8,35	7,30	9,19	7,65
Cysteina	1,29	—	1,51	1,19	0,82	0,85	0,48	0,88	0,47	0,54
Walina	5,60	4,61	6,92	7,42	6,71	7,08	6,09	6,29	5,95	6,39
Metionina	1,94	2,12	2,18	2,10	2,14	1,85	2,29	4,00	3,42	3,74
Izoleucyna	4,31	2,89	5,25	5,33	5,07	4,73	4,8	4,93	4,36	4,7
Leucyna	9,91	4,90	9,89	9,60	8,51	7,70	9,57	9,91	9,31	8,23
Tyrozyna	2,59	4,25	3,20	3,16	2,67	2,52	3,82	3,14	2,65	2,20
Fenylalanina	3,88	3,87	4,10	3,88	3,73	4,23	4,11	3,80	3,59	3,60
Asp + Glu Liz + Hist + Arg	1,63	1,35	1,36	1,39	1,60	1,73	1,09	1,40	1,75	1,87

towane głównie przez prolinę, serynę, glicynę, lizynę, alaninę, kwas asparaginowy, treoninę obok niewielkich ilości kwasu glutaminowego, leucyny, waliny i fenyloalaniny.

5. Inne właściwości

Kwaśne białka są integralnym składnikiem interfazowej chromatyny, stanowiąc 21—23% wszystkich jej białek (56, 66). W przeciwieństwie do stałej zawartości DNA ilość ich zmienia się w chromatynach różnego pochodzenia (40). W różnych tkankach grochu (5) matrycowo aktywna rozproszona chromatyna (euchromatyna) zawiera więcej całkowitych kwaśnych białek niż skondensowana chromatyna nieaktywna (heterochromatyna).

Tablica 4

Skład aminokwasowy chromatynowych białek resztkowych i peptydów związanych z DNA z grasicy cielęcej (mol %) (33)

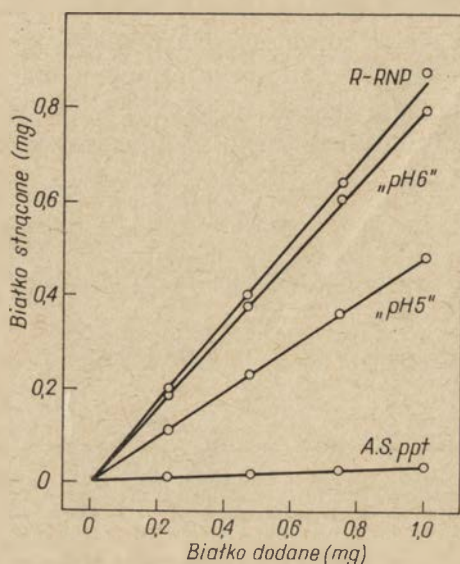
Aminokwas	Chromatynowe białka resztkowe				DNA-peptydy	
	1	2	3	4	5	6
Lizyna	9,9	6,6	10,8	8,9	10,6	11,5
Histydyna	3,1	1,7	3,7	1,7	2,4	3,7
Arginina	9,4	3,2	8,0	6,3	6,5	8,6
Kwas asparaginowy	10,6	11,7	11,5	10,5	11,8	11,6
Treonina	6,9	6,3	6,0	6,1	5,7	6,3
Seryna	7,0	9,2	9,7	9,7	10,3	9,2
Kwas glutaminowy	15,5	15,2	14,7	15,0	13,7	14,7
Prolina	3,4	+	7,6	8,0	6,3	6,4
Alanina	+	12,3	11,2	+	12,7	12,9
Walina	7,7	7,5	6,1	8,9	7,9	7,4
Izoleucyna	6,5	4,0	3,8	5,9	5,1	4,2
Leucyna	11,8	9,5	10,4	10,8	10,6	9,4
Tyrozyna	2,9	2,7	+	2,9	3,3	2,7
Fenyloalanina	4,4	3,8	4,5	+	4,5	4,4

1 — preparat uzyskany po dwukrotnym ultrawirowaniu (165000g, 5 godz) ekstraktu DNP w 2M NaCl, 2 — preparat uzyskany drogą filtracji żelowej na kolumnie z 5% agarozą ekstraktu DNP w 2M NaCl, 3 — preparat wytrącony 4-krotnie etanolem (stężenie końcowe 48%) z ekstraktu DNP w 4M chlorku guanidyny lub 2M NaCl, 4 — preparat wytrącony 3-krotnie etanolem (stężenie końcowe 32%) ekstraktu DNP w 2,5M NaCl, 5 — preparat uzyskany metodą K a y a i wsp. (27), 6 — preparat po odbiałczeniu fenolowym, + — śladowe ilości

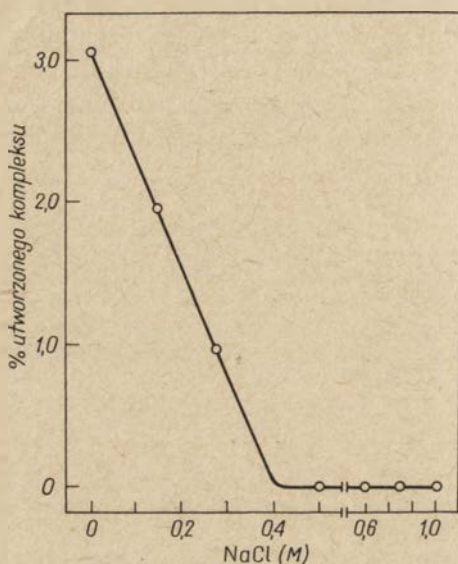
Rozpuszczalność. Białka kwaśne chromatyny rozpuszczają się w rozcieńczonych ługach i kwasach. Ta ostatnia właściwość zasługuje na szczególne podkreślenie. W a n g i J o h n s (70) twierdzą, że ekstrakcja histonów z całej tkanki lub jąder rozcieńczonym kwasem solnym winna być prowadzona z dużą ostrożnością. Całkowite białko kwaśne Wang rozpusz-

cza się w 0,25N HCl w 95%, a z czterech jego frakcji tylko R-RNP jest względnie oporna na tego rodzaju ekstrakcję.

Niedawne doświadczenia Burdicka i wsp. (6) nad białkami kwaśnymi z jąder hepatocytów i erytrocytów wątroby żaby potwierdziły istnienie 2 typów białek rozpuszczalnych w kwasie solnym, z których jedno (białko I) jednocześnie były rozpuszczalne w kwasie cytrynowym i występowały głównie w hepatocytach podczas gdy białka typu II nierozpuszczal-



Rys. 3. Strącanie całkowitego histonu gładkiego (1mg) przez frakcje kwaśnego białka Wang z wątroby szczura znakowane ^{14}C -tryptofanem. Końcowa objętość mieszaniny reagującej: 1 ml w 0,05M tris (pH 7,5). Ilość wytrąconych białek kwaśnych oznaczono przez pomiar radioaktywności (66)



Rys. 4. Wpływ stężenia NaCl na tworzenie kompleksu przez histon całkowity i niefrakcjonowane białko kwaśne Wang

Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 1 ml zawierała: 0,05M tris HCl (pH 7,4), 0,5 mg całkowitego histonu, 0,5 mg niefrakcjonowanego białka kwaśnego Wang i wykazane stężenia NaCl. Ilość nierozpuszczalnego kompleksu oznaczano po upływie 1 godz. w 4°

ne w kwasie cytrynowym były obecne w hepatocytach i erytrocytach. Ciekawym jest fakt występowania białek nierozpuszczalnych w HCl, które stawały się rozpuszczalne w tym kwasie w momencie usunięcia DNA (białko III), bądź RNA (białko IV).

Ciążar cząsteczkowy. Próby określenia ciężaru cząsteczkowego kwaśnych białek chromatynowych metodami wiskozymetrycznymi i przez ultrawierowanie zakończyły się w przeważającej większości wypadków niepowodzeniem. Jedynie w oparciu o oznaczanie N-końcowych aminokwasów stwierdzono wysoki ciężar cząsteczkowy tych związków. Dla kwaśnych białek jądrowych podaje się wartości w granicach 60 000—400 000 (8). Johns i Forrester (26) na tej samej podstawie wyznaczyli dla

uzyskanych przez siebie białek kwaśnych DNP grasicy cielęcej ciężar cząsteczkowy równy 44 000.

Chromatynowe białko kwaśne otrzymane z wątroby szczura przy użyciu 1% SDS przez Marushige i wsp. (40) wykazuje masę cząsteczkową około 14300 ($S_{20} = 2,7S$ w obecności 0,1% SDS). Usunięcie lub obniżenie stężenia detergentu prowadzi do agregacji białek i znacznego wzrostu współczynnika sedymentacji (do 6,3S).

Oddziaływania z histonami stanowią znamiennej cechę kwaśnych białek chromatynowych. Jeśli takie same ilości poszczególnych frakcji białka kwaśnego Wang zmieszać *in vitro* z tą samą ilością całkowitego histonu to utworzą one nierozpuszczalne połączenia w sposób przedstawiony na rysunku 3 (66). Stosunek kwaśnego białka do histonu w kompleksie zmniejsza się w następującej kolejności: 3,1 (R-RNP), 2,1 („pH 6”), 0,98 („pH 5”) i 0,52 (A. S. ppt).

Wang i Johns (70) badali oddziaływanie poszczególnych frakcji histonowych z komponentami kwaśnego białka Wang. Zwiększanie stosunku ilościowego kwaśnych białek do frakcji histonowych w granicach od 4 do 6 powodowało początkowo wzrost wytrącania kompleksu, potem zaś strącalność utrzymywała się na pewnym stałym poziomie (R-RNP i A. S. ppt), bądź też malała („pH 5” i „pH 6”). Wydaje się, że przy dysocjacji DNP odłączające się białka kwaśne to głównie frakcje A. S. ppt i „pH 5”, które wykazują najsłabsze powinowactwo do histonów.

Kompleksy histonów z kwaśnymi białkami Wang są nierozpuszczalne w 1—2M NaCl, a rozpuszczają się w 0,25N HCl. Elektroforeza w żelu skrobiowym rozpuszczalnego w kwasie wyciągu z takich kompleksów wykazała jedno nierozmyte pasmo wędrujące ku anodzie. Zaobserwowano też (70), że pewne sztuczne kompleksy mogą występować w formie rozpuszczalnej i różnią od połączeń nierozpuszczalnych.

Oddziaływanie histon — kwaśne białko Wang zależy od stężenia soli. Tworzenie nierozpuszczalnego kompleksu jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia NaCl (rysunek 4).

Przy stężeniu 0,14M NaCl lub wyższym kompleks strącony z mieszaniny o stosunku $\frac{\text{kwaśne białko Wang}}{\text{histon}} = 1$ zawiera tylko 20% białka kwaśnego (80% oddysocjowuje). Jeśli stosunek $\frac{\text{kwaśne białko Wang}}{\text{histon}} = 0,2$, co odpowiada proporcjom w rodzimej chromatynie szczura, to utworzony nierozpuszczalny kompleks stanowi mniej niż 5%. Doświadczenia te wskazują, że można względnie ilościowo odzyskać kwaśne białka Wang przez dysocjację kompleksu DNP.

Histony zmieszane *in vitro* z innymi białkami o charakterze kwaśnym, np.: laktoglobina, DNaza, aldolaza, albumina surowicy wołowej nie wytwarzają nierozpuszczalnych kompleksów. Wskazuje to, że oddziaływanie kwaśnych białek Wang z histonami ma cechy swoistości.

King i Gordon (29) badali oddziaływanie histonów grasicy cielęcej z frakcjami białek kwaśnych „1” i „2” wątroby szczura uzyskanymi

na hydroksypatycie. Tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów zależało od pH i siły jonowej. W pH mniejszym od 4 i wyższym od 11 nie obserwowano wytrącania kompleksów. Ponadto okazało się, że histon argininowy reagował łatwiej od silnie lizynowego z obu frakcjami białek kwaśnych a przy optymalnym stężeniu histonów frakcja „2” była aktywniejsza niż „1” w tworzeniu nierozpuszczalnych kompleksów.

Marushige i wsp. (40) także obserwowali natychmiastowe tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów po zmieszaniu chromatynowych białek kwaśnych z całkowitym histonem. Wytrącalność kompleksów wzrastała przy dodawaniu kwaśnych białek do reagującej mieszaniny osiągając maksimum przy wartościach od 1,0 do 1,5 dla stosunku $\frac{\text{kwaśne białko chromatynowe}}{\text{histon}}$ a potem gwałtownie spadała. Wytrącony kompleks był wrażliwy na zmianę siły jonowej; nie wytrącał się przy stężeniu NaCl wyższym od 0,5M.

Oddziaływanie z DNA. Frakcje białek kwaśnych Wang zmieszane z równą ilością DNA tworzą kompleksy, przy czym frakcja pH 6 wykazuje największe, a A. S. ppt — najmniejsze powinowactwo do DNA. Utworzone kompleksy można rozdzielić na wolno (7,2—8,1S) i szybko (8,4—9,5S) sedymentujące.

Jedynie w doświadczeniach Kinga i Gordona (29) frakcje „1” i „2” kwaśnych białek chromatynowych nie powodowały wytrącania DNA ani zmian w jego temperaturze topnienia.

Oddziaływanie z estrogenami. King i Gordon (28, 30) stwierdzili, że chromatynowe białka kwaśne są receptorami 17β -estradiolu. W jądrach komórkowych z tkanek wrażliwych na estrogeny 17β -estradiol łączył się z białkami tymi niekowalencyjnie. Kompleks estradiol-białko kwaśne dawał się najłatwiej ekstrahować za pomocą 1M NaCl-tris (pH 7,4), co wskazuje, że receptorem nie mógł być histon argininowy, który nie wymywa się przy tym stężeniu NaCl. Chromatografia takich ekstraktów na DEAE-celulozie potwierdziła, że 17β -estradiol był związany z receptorem o dużej masie cząsteczkowej. Zdaniem autorów 17β -estradiol może zmieniać strukturę chromatyny wpływając na oddziaływanie: DNA-histon-białko kwaśne.

Rozdział chromatograficzny na żywicy Biogel P-300 kwaśnych i zasadowych białek jąder komórkowych znakowanych $[6,7-^3H]$ estradiolem *in vivo* i *in vitro* pozwala przypuszczać, że znakowany steryd wiąże się silnie z kwaśnym składnikiem białkowym (30). Wiązanie estradiolu odbywa się prawdopodobnie w specjalnych obszarach białkowych receptora. Receptor może być zlokalizowany we frakcji lekkiej chromatyny, ponieważ Pooley i King (51) stwierdzili, że $[6,7-^3H]$ estradiol wiąże się *in vivo* 3 razy intensywniej z tą frakcją niż z pozostałymi frakcjami chromatyny. Frakcje lekkiej chromatyny wykazują ponadto wyższą niż inne aktywność fosfokinazy białkowej, która być może jest wykorzystywana w działaniu estradiolu.

II. Białka resztkowe jąder komórkowych

Białka resztkowe jąder komórkowych inaczej pozachromatynowe białka kwaśne są pozostałością jąder po usunięciu globulin i DNP chromatyny. Stanowiły one do niedawna *terra incognita* w chemii białek jądrowych z uwagi na swoją wybitną nierozpuszczalność. Dopiero pod koniec lat 60-tych udało się częściowo pokonać tę barierę i udostępnić badaniom biochemicznym pokaźną frakcję białek resztkowych rozpuszczalnych w stosunkowo łagodnych warunkach (55, 64).

Rozdział niniejszy poświęcony jest głównie tym rozpuszczalnym białkom resztkowym z jąder komórkowych wątroby szczura.

1. Metody wyodrębniania

O no i Tera y a m a (45) uzyskiwali białka resztkowe rozpuszczając w roztworze 8M mocznik — 0,05M Na_2CO_3 (pH 9,5), pozostałość po ekstrakcji jąder komórkowych buforem (pH 7,4) i 1M NaCl.

W technice Sp e l s b e r g a i wsp. (55) opartej na metodzie L a n g a n a (34) białka resztkowe wyosabnia się z jąder komórkowych pozabawionych globulin i DNP w sposób przedstawiony w schemacie 3. Białku resztkowemu odpowiada frakcja R_2 .

2. Frakcjonowanie

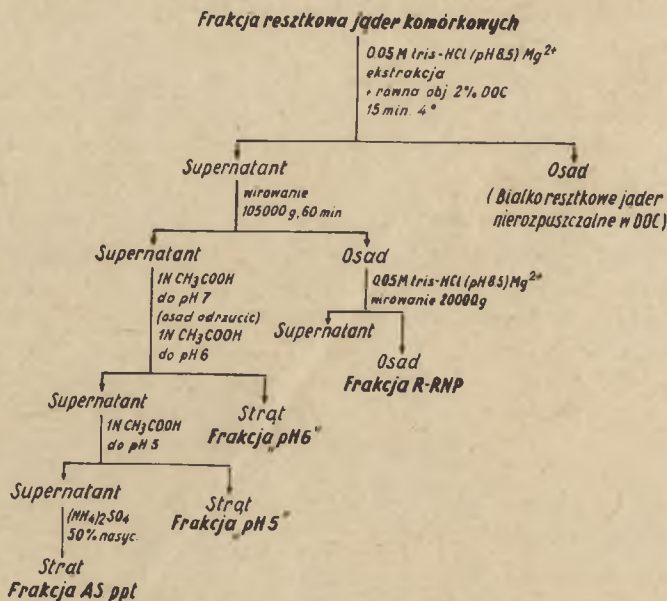
Sposób frakcjonowania białek resztkowych zaproponowany przez W a n g a (64) przedstawiono na schemacie 4. Jest on analogiczny do opisanego w poprzednim rozdziale sposobu frakcjonowania kwaśnych białek chromatynowych.

3. Niejednorodność fizykochemiczna

Podobnie jak białka kwaśne chromatyny białka resztkowe W a n g są wybitnie niejednorodne.

P a t e l i i wsp. (47) rozdzielali na DEAE-celulozie białka resztkowe rozfrakcjonowane uprzednio według metody W a n g a (64). Profile chromatograficzne wskazywały na heterogenność w obrębie frakcji i różnice pomiędzy frakcjami (rys. 5).

Otrzymane z rozdziału na DEAE-celulozie podfrakcje poddane elektroforezie w żelu skrobiowym okazały się również znacznie zróżnicowane (47). Wszystkie frakcje białka resztkowego Wang cechują się też niejednorodnością molekularną. Główne składniki białek resztkowych mają współczynniki sedymentacji od 2 do 7S (47). Frakcja R-RNP, której główny składnik sedymentuje przy 5,4S zawiera ponadto niewielkie ilości frag-



Schemat 4. Frakcjonowanie białek resztkowych Wang (64)

mentów o współczynnikach 26S i 83S. Dezoksycholan powoduje dysocjację białek resztkowych na mniejsze podjednostki. Przy braku detergentu DOC białka reasocjują do sferycznych cząstek o wyższym współczynniku sedymentacji (64).

4. Skład chemiczny

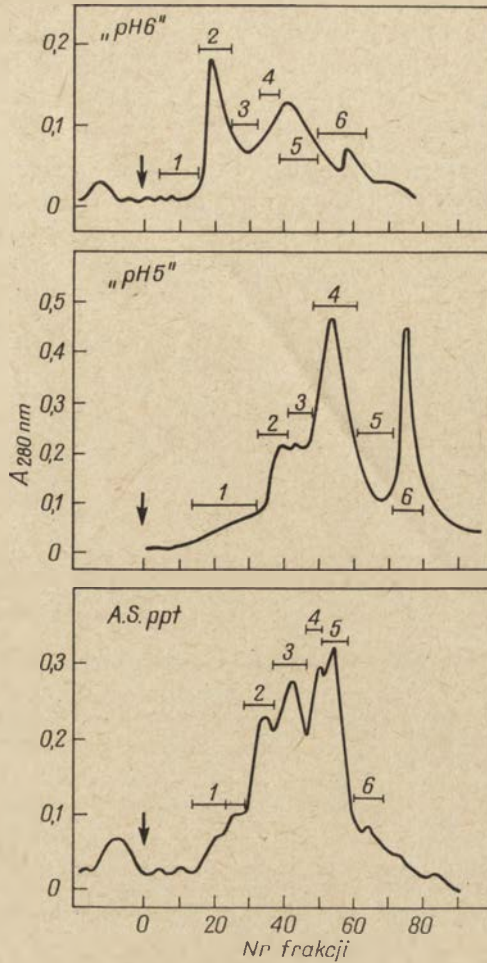
Zawartość kwasów nukleinowych i innych związków. Rozpuszczalne resztkowe białka jądrowe zawierają około 90% białek, 10% RNA i małe ilości DNA (47, 64). W tabelicy 5 scharakteryzowano pod tym względem frakcje białek resztkowych Wang.

Zawartość kwasów nukleinowych, głównie RNA w białkach resztkowych jest znacznie wyższa niż w białkach kwaśnych chromatyny. RNA białek resztkowych ma współczynnik specyficzności $\frac{G+C}{A+U}$ bliski 2 (64).

Tabela 5

Zawartość białek, RNA, DNA w resztkowych białkach Wang wątroby szczura (% względny) (47, 64)

Frakcja	Białko	RNA	DNA
R-RNP	25,3±4,07	2,8	27,7
„pH 6”	55,4±4,14	94,2	54,5
„pH 5”	12,8±2,24	1,2	13,9
A.S.ppt	6,5±1,07	1,8	3,9



Rys. 5. Chromatografia na DEAE-celulozie resztkowych białek Wang z jąder wątroby szczura. Strzałka wskazuje start gradientu NaCl (47)

Tablica 6

Skład nukleotydowy RNA białek resztkowych Wang z wątroby szczura (64)

Frakcja	Nukleotydy (mol %)				pur. pirymid.	$\frac{A+U}{C+G}$
	CMP	AMP	GMP	UMP		
R-RNP	21,2	22,8	41,5	14,5	1,80	0,59
„pH 6”	30,7	21,0	33,0	15,3	1,17	0,57
„pH 5”	32,6	17,2	33,9	16,3	1,05	0,50
A.S. ppt	35,3	17,0	34,1	13,6	1,05	0,44

Różnice w składzie nukleotydowym RNA z poszczególnych frakcji białek resztkowych Wang przedstawia tablica 6.

Białka resztkowe jąder wątroby szczura zawierają fosfoproteidy (47). Najbogatsza w fosfor zasadolabilny (0,272%) jest frakcja „pH 6”, a najuboższa (0,096%) — frakcja „A. S. ppt”.

Wang (64) przypuszcza, że składnik lipidowy jest powodem niskiej rozpuszczalności białek resztkowych z grasicy cielőcej.

Skład aminokwasowy. Stosunek aminokwasów kwaśnych do zasadowych w białkach resztkowych Wang waha się od 1,37 dla R-RNP do 2,06 w A. S. ppt (47).

Porównując frakcje białka resztkowego Wang (47) z rozpuszczalnymi w alkaliach białkami resztkowymi Steele'a i Buscha (9) oraz Dounce'a i Hilgartnera (16) widać, że główne różnice w składzie dotyczą zawartości kwasu glutaminowego oraz aminokwasów siarkowych (tablica 7).

Tablica 7

Skład aminokwasowy jądrowych resztkowych białek wątroby szczura (mol %)

Aminokwas	Frakcja białka resztkowego Wang (47)				Frakcja zasadowo-rozpuszczalna	
	R-RNP	pH 6	pH 5	A.S. ppt	Busch i Steele (9)	Dounce i Hilgartner (16)
Lizyna	7,12	6,23	6,48	7,22	6,3	7,09
Histydyna	2,31	1,94	1,92	1,56	2,3	2,45
Arginina	6,50	5,70	5,68	4,36	5,7	6,15
Kwas asparaginowy	9,00	9,39	10,16	10,86	9,3	9,29
Treonina	5,08	5,45	5,20	5,40	5,7	4,86
Seryna	5,85	6,28	6,16	6,38	7,4	6,63
Kwas glutaminowy	12,85	12,60	13,20	16,19	12,1	13,20
Prolina	5,61	5,08	4,48	5,54	5,5	5,46
Glicyna	7,02	6,70	6,64	7,73	8,0	8,78
Alanina	7,73	7,64	7,52	7,39	7,4	6,59
Cysteina	1,60	0,99	1,28	0,44	1,3	0,58
Walina	6,19	6,65	6,48	6,05	6,1	6,67
Metionina	2,25	1,78	2,16	1,34	2,6	0,89
Izoleucyna	4,62	5,29	5,12	4,42	4,6	4,89
Leucyna	9,71	11,29	10,64	8,29	9,4	8,74
Tyrozyna	2,68	2,62	2,27	2,12	2,8	2,84
Fenylalanina	3,82	4,45	4,16	4,53	4,0	4,12
Tryptofan	0,39*	1,15*	1,05*	1,93*	0,9	0,79
Asp+Glu Liz+His+Arg	1,37	1,59	1,66	2,06	1,50	1,43

*Dane wg (64)

Różnice mogą wynikać z odmiennej techniki otrzymywania tych preparatów. Białka resztkowe Wang stanowią niemal 90%, natomiast białka resztkowe rozpuszczalne w NaOH — tylko około 70% całości jądrowego białka resztkowego. Istnieje zatem możliwość, że resztkowe białka Wang zawierają również niektóre białka nierozpuszczalne w zasadach.

Aminokwasy N-końcowe. W białkach zasadorozpuszczalnych otrzymanych przez Hilgartnera (21) wykazano obecność dwóch N-końcowych aminokwasów: treoniny i lizyny. Busch i Steele (8, 9) w preparatach tego typu białek odnaleźli jako N-końcowe aminokwasy: alaninę, glicynę, serynę, lizynę, kwas asparaginowy (w sumie ok. 70%), a ponadto kwas glutaminowy, leucynę, fenyloalaninę, prolinę, treoninę i walinę.

5. Inne właściwości

Rozpuszczalność. Białka resztkowe izolowane w łagodnych warunkach są nierozpuszczalne lub bardzo słabo rozpuszczalne w roztworach stosowanych w tym celu w chemii białek. Jednakże po zastosowaniu rozpuszczalników rozbijających mostki dwusiarczkowe białka resztkowe rozpuszczają się w bardzo rozcieńczonych zasadach (pH 8—9) i w 8M moczniku. Białka resztkowe Wang (47) są bardzo dobrze rozpuszczalne w DOC, a w znacznej części rozpuszczają się w 0,25N HCl (47). Niektóre białka kwaśne jąderek ekstrahują się rozcieńczonym kwasem mineralnym (20).

Ciężar cząsteczkowy. Ciężary cząsteczkowe białek resztkowych wyznaczone na podstawie N-końcowych aminokwasów zamykają się w granicach od 80 000 do 400 000.

Oddziaływanie z histonami. Resztkowe białka Wang oddziałują *in vitro* z histonami tworząc nierozpuszczalne kompleksy (64). Powinowactwo poszczególnych frakcji do histonów zmniejsza się w kolejności: „ pH 6”, „ pH 5”, R-RNP, A. S. ppt. Należy podkreślić, że najslabiej wiążąca się z histonami frakcja A. S. ppt cechuje się najwyższą zawartością aminokwasów kwaśnych, a zawiera najmniejsze ilości fosforu zasadolabilnego. Wydaje się, że zawartość fosforu bardziej niż aminokwasów kwaśnych wpływa na oddziaływanie białek resztkowych Wang z histonami.

III. Aktywność biologiczna kwaśnych białek jądrowych

1. Włączanie radioaktywnych aminokwasów

Od 1957 roku, tj. od pracy Allfrey'a, Mirsky'ego i Osawy (2) sugeruje się wybitną aktywność metaboliczną białek niehistonowych związanych z DNA. Potwierdziły ją późniejsze doświadczenia z innych laboratoriów (15, 31, 36, 45, 49, 52, 63) i to zarówno dla jąder komórko-

wych o wysokim (np. grasica) jak i niskim (np. wątroba) stosunku jądrowo-cytoplazmatycznym.

W 1963 roku Wang (62) udowodnił znacznego stopnia włączanie ^{14}C -leucyny w cząstki rybonukleoproteidowe (R-RNP) z frakcji resztkowej jąder. Dalsze prace (49, 63) nad wbudowywaniem ^{14}C -tryptofanu w pozostałość jąder komórkowych po usunięciu globulin i rybosomów, przemawiają za istnieniem tzw. jądrowego kompleksu resztkowego, utworzonego głównie z białek kwaśnych i DNA, a reprezentującego pozarybosomowy system syntezy białka w jądrach komórkowych. Podobnie do rybosomowego wymagał on obecności jonów Mg^{2+} , ATP oraz układu regenerującego ATP. Jego aktywność uległa zahamowaniu pod wpływem DNazy, stymulacji po zadziałaniu trypsyną, pozostawała niezmienną pod wpływem RNazy, a optymalne pH było bliskie 8,5.

Bardzo zbliżonych warunków reakcji wymagało włączanie *in vitro* ^{14}C -tryptofanu w poszczególne frakcje białek kwaśnych Wang, jak też w ich zespół (66). Dodatek enzymów z supernatantu 105 000g czy rybosomów pochodzenia jądrowego lub cytoplazmatycznego nie aktywował tego procesu. Zrozumiałym jest fakt jego wyraźnej stymulacji przez rodzimy DNA, a tylko niewielkiego stopnia — przez DNA zdenaturowany.

Do włączania aminokwasów w białka jąder komórkowych, między innymi w białka resztkowe po usunięciu histonów, niezbędne są jony Na^+ (2, 52).

Ono i Terayama (45) udowodnili, że szczególnie aktywnie włącza aminokwasy materiał jąderkowy. Wykazali oni ponadto, że radioaktywne aminokwasy wbudowywane w białka resztkowe jąder związane były głównie z C-terminalnym końcem oraz z wnętrzem łańcuchów polipeptydowych, czyli pod tym względem synteza odbywała się zgodnie z ogólnie przyjętym schematem dla białek cytoplazmatycznych.

Również kwaśne białka DNP, ekstrahowane za pomocą roztworu 0,1N HCl — 8M mocznik wg Bustos-Valdes i wsp. (10) aktywnie włączają ^{14}C -leucynę, przy czym włączanie nie jest wrażliwe na trawienie RNazą. Wobec ścisłego powiązania tych białek z DNA, który jak wiadomo jest (z wyjątkiem fazy przedmitotycznej) metabolicznie nieaktywny można przypuszczać, że intensywne włączanie aminokwasów w białka kwaśne DNP związane jest tylko pewną frakcją DNA o bardzo dużej szybkości obrotu.

75% ^{14}C -lizyny włączanej *in vitro* w jądra komórkowe wątroby szczura i tumoru Walkera 256 odnajduje się w DNP, przy czym w tkance prawidłowej 2/3 piętna izotopowego pojawia się w białkach kwaśnych, a 1/3 w histonach, w tkance nowotworowej zaś proporcje te są wręcz odwrotne (56).

W komórkach nowotworu Ehrlicha włączanie ^{14}C -argininy w białka kwaśne sprzężone z DNA jest hamowane przez aktynomycynę i puromycynę w podobnym stopniu jak włączanie w inne białka komórkowe (22).

Obserwacje, że spadek wbudowywania ^{14}C -argininy jest poprzedzony zahamowaniem wbudowywania ^3H -urydyny w RNA wskazuje na zależność syntezy białek związanych z DNA od syntezy RNA. Sugestię tę potwierdza obniżenie syntezy białek związanych z DNA, występujące po trawieniu komórek Ehrlicha RN-azą (22).

Białka kwaśne, izolowane z jąder komórkowych nowotworu Krebsa 2, włączają *in vitro* grupy metylowe z S-adenozylu- ^{14}C -metioniny lub S-adenozylu- ^3H -metioniny. Proces ten wymaga obecności histonów, zwłaszcza argininowych, a optymalne włączanie zachodzi przy pH 8 i wobec 2-merkaptoetanolu. 1/3 piątna izotopowego trafia do białek jądrowych kwaśnych, a reszta do histonów. Puromycyna i aminopteryna hamują metylację obu typów białek (7).

2. Aktywność enzymatyczna kwaśnych białek Wang

Prawdziwą niespodzianką w chemii kwaśnych białek chromatynowych stało się doniesienie W a n g a (66) z 1967 roku o własnościach enzymatycznych 4 frakcji białka kwaśnego Wang (tabl. 8).

Tablica 8

Enzymatyczna aktywność kwaśnych białek chromatynowych (66)

Frakcja	Dehydrogenaza glutaminianowa	Aminotransferaza asparaginianowa	Dehydrogenaza mleczanowa	Dehydrogenaza jabłczanowa	ATP-aza
R-RNP	0,19	3,66	9,35	5,56	4,90
„ pH 6”	1,50	2,11	2,82	4,13	1,26
„ pH 5”	89,8	3,05	0,0	0,0	0,42
A S.ppt	0,95	20,0	15,4	61,0	0,0

Ważnym etapem było wykrycie w kwaśnych białkach chromatynowych enzymów, których aktywność jest związana z kontrolą genetyczną. Szereg danych wskazuje, że kwaśne białka jądrowe posiadają własne mechanizmy enzymatyczne dla syntezy i degradacji DNA: terminalną nukleotydylotransferazę DNA (66, 67), polimerazę DNA (23, 24, 38, 46) oraz alkaliczną dezoksyrybonukleazę (12, 24).

Terminalna nukleotydylotransferaza DNA wyizolowana z kwaśnych białek Wang grasicy cielęcej (67), polimeryzuje dezoksyrybonukleotydy lub rybonukleotydy z dowolnych nukleozydo-5'-trójfosforanów w obecności starterowego DNA wykazując wybiórczość w stosunku do DNA zdenaturowanego. Jako substrat może służyć każdy pojedynczy dezoksyrybonukleozydotrójfosforan w obecności startera i dlatego jest ona niespecyficzna. Optymalne działanie ma miejsce w pH 7,2 i przy włączaniu pojedynczego dezoksyrybonukleozydo-5'-trójfosforanu w nieobecności trzech pozostałych. Reakcja polimeryzacji wymaga obecności jonów Mg^{2+} , któ-

rych wpływ znosi całkowicie wprowadzenie Na_2EDTA . Enzymatyczny rozkład starterowego DNA przez DNazę I trzustki powoduje 8—10-krotny wzrost włączania znakowanych nukleotydów do DNA. Działanie DNazy II nie powoduje podobnego efektu. Zjawisko to można by wytłumaczyć niewykorzystywaniem przez enzym wolnego wiązania przy C-3' startera w reakcji polimeryzacji. Terminalna nukleotydylotransferaza DNA z białek kwaśnych wykazuje szereg analogii do jądrowej transferazy nukleotydylowej K r a k o w a (32) i W a n g a sugeruje identyczność obu enzymów.

Replikacyjny typ nukleotydylotransferazy DNA (polimeraza DNA) wyizolowano z kwaśnych białek Wang grasicy cielęcej (65) oraz wątroby szczura (46). Enzym wymaga do działania obecności DNA i dwuwartościowych jonów, głównie Mg^{2+} . Jony Mn^{2+} zapewniają tylko 30% aktywności enzymatycznej osiąganey w obecności Mg^{2+} . Jednowartościowe kationy są inhibitorami tego enzymu. Optymalne pH dla działania polimerazy DNA wynosi 8,5—9,0. Najwyższą jej czynność obserwuje się w obecności czterech dezoksyrybonukleozydo-5'-trójfosforanów i rodzimego DNA. Przy użyciu pojedynczego dezoksyrybonukleozydo-5'-trójfosforanu szybkość włączania wynosi ok. 1/4 wartości uzyskiwanej z udziałem czterech dezoksyrybonukleozydotrójfosforanów.

W chromatynowych kwaśnych białkach prawidłowej i regenerującej wątroby występuje również alkaliczna dezoksyrybonukleaza, która hydrolizuje rodzimy DNA (12). Filtracja na żelu *Sephadex G-100* enzymatycznego hydrolizatu DNA sugeruje, że alkaliczna DNaza rozrywa rodzimy DNA do polinukleotydów o różnym ciężarze cząsteczkowym. Enzym działa głównie jak endonukleaza. Istnieją sugestie, że chromosomalna DNaza może dostarczać oligodezoksyrybonukleotydów do zainicjowania syntezy DNA w wielu miejscach replikacji DNA, bądź może być używana do degradacji jakiegoś DNA, który został przesunięty z właściwej pozycji w strukturze chromosomu, zapobiegając w ten sposób nieuporządkowanym replikacjom DNA.

3. Wpływ kwaśnych białek jądrowych na syntezę RNA i DNA *in vitro*

Udział w syntezie RNA. Od czasu doświadczeń Frenstera (17, 18) z reprimowaną i aktywną chromatyną wielu badaczy uważa, że białka niehistonowe odgrywają rolę derepresorów genowych. Wprowadzenie siarczanu polietylenu do inkubowanej, reprimowanej i aktywnej chromatyny powoduje wzrost syntezy RNA. Naturalne jądrowe polianiony mogą zastępować częściowo histon w pewnych obszarach genomu biorąc udział w specyficznej derepresji syntezy RNA.

Ten model Frenstera (18) dla specyficznej derepresji syntezy RNA potwierdzają niedawne doświadczenia W a n g a (68). Frakcja białka kwaśnego Wang wątroby szczura wymyta z *DEAE*-celulozy 0,2—0,3M NaCl, dodana do układu polimerazy RNA zawierającego histony, częściowo od-

tworza syntezę RNA zależną od DNA. Frakcja ta najskuteczniej odwraca hamujące działanie histonu arginiowego (F3), a w znacznie mniejszym stopniu — wpływ histonu silnie lizynowego (F1). Wydaje się, że częściowe niwelowanie hamującego wpływu histonów na syntezę RNA można przypisać reakcji białka kwaśnego z histonami.

Również fosfoproteidy jądrowe wątroby szczura mogą tworzyć kompleksy z histonami udostępniając tym samym matrycę DNA dla syntezy RNA (34). Przy reakcji histonów z optymalną (1 : 1) ilością fosfoproteidów ilość zsyntetyzowanego RNA sięgała 78% kontroli. Godnym podkreślenia wydaje się fakt, że frakcja chromatyny aktywnej w syntezie RNA, tj. euchromatyny, zawiera większe ilości fosfoproteidów niż heterochromatyna. Według W a n g a i J o h n s a (70) fosfoproteiny otrzymane przez L a n g a n a i S m i t h a (35) stanowią oczyszczoną frakcję kwaśnych białek chromatynowych.

Doświadczenia S p e l s b e r g a i H n i l i c y (55) zmieniają dotychczasowe poglądy na mechanizm odwracania *in vitro* hamującego działania histonów przez kwaśne białka jądrowe. Zaobserwowali oni, że kwaśne białka jądrowe skuteczniej odwracają hamujące działanie histonów, gdy do układu reagującego dostają się wraz z histonem a przed dodaniem DNA.

P a u l i G i l m o u r (50) uważają, że rola białek kwaśnych może być związana z zapobieganiem interakcji DNA-histon, a nie z dysocjacją kompleksu nukleohistonu. Za taką hipotezę przemawia też fakt, że chromatyna aktywna w syntezie RNA zawiera więcej białek kwaśnych niż jej frakcja nieaktywna. Rozproszona chromatyna tkanek prawidłowych i nowotworowych zawiera znacznie więcej substancji natury polianionowej (niehistonowe białko, RNA) niż chromatyna skondensowana (4). Ponadto ³⁵S-metionina włącza się w kwaśne białka chromatynowe o 40—50% intensywniej w wypadku aktywnej euchromatyny.

K r i v c o v i B o g d a n o v (33) wysunęli śmiałą koncepcję, że wyizolowany przez nich kompleks DNA-białko resztkowe chromatyny jest połączeniem: DNA-polimeraza RNA-nowo syntetyzowany RNA. Upoważniły do niej autorów właściwości tego kompleksu, a mianowicie odporność na działanie czynników rozrywających wiązania jonowe (2,5M NaCl, 6M LiCl) i wodorowe (6M mocznik, 4M chlorek guanidyny), a labilność wobec detergentu (SDS). Hipoteza ta wydała się autorom prawdopodobna w świetle doświadczeń H u a n g a i B o n n e r a (25), którzy otrzymali z kiełków grochu preparaty DNA zawierające około 4% białek niehistonowych i wykazujące aktywność polimerazy RNA.

Udział w syntezie DNA. Białka kwaśne Wang zmniejszają hamujący wpływ histonów na replikację DNA (69). Przy stosunku wagowym $\frac{\text{histon}}{\text{DNA}} = 1$ synteza DNA jest prawie całkowicie zahamowana. Stymulowanie tej syntezy przez białko kwaśne Wang jest różne w obecności różnych frakcji histonowych (tablica 9).

Tablica 9

Wpływ białek kwaśnych Wang wątroby szczura na replikację DNA (69)

Histon 50 μg	Włączenie $^3\text{H-dATP}$ (% próby kontrolnej) wobec białek kwaśnych Wang			
	Brak	25 μg	50 μg	100 μg
F1	100*	18	35	30
F2a1	32	69	86	101
F2a2	48	81	101	101
F2b	59	82	92	91
F3	2	25	30	27

*Próba kontrolna

Składniki reakcji: 50 μM $^3\text{H-dATP}$, dGTP, dCTP, dTTP, 20 μM buforu glicynowego (pH 8,5), 0,5 μM merkaptoetanolu, 50 μM MgCl_2 , 50 μg DNA, 11 μg polimerazy DNA, histon i białko kwaśne w ilościach podanych w tablicy

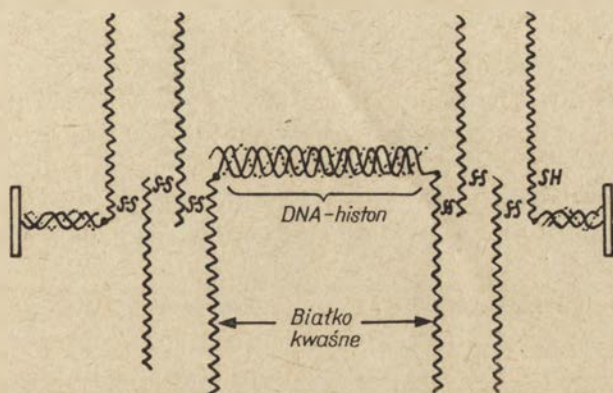
Kolejność dodawania składników: histon, DNA, polimeraza DNA oraz pozostałe związki

Blokowanie replikacji DNA przez histony może być wynikiem silnego współzawodnictwa między białkami zasadowymi i kwaśnymi chromatyny o wiązanie z DNA. Porównanie stopnia zahamowania syntezy DNA przez różne frakcje histonowe sugeruje, że matrycowa aktywność pewnych obszarów DNA może być całkowicie reprimowana, podczas gdy inne fragmenty DNA zostają odblokowane w wyniku wzajemnego oddziaływania określonych ilości białkowych komponentów chromatyny. Rezultaty doświadczeń *in vitro* jasno wskazują na możliwość, że kwaśne białka chromatynowe są zdolne regulować replikację i transkrypcję DNA. Odpowiedź, czy podobny proces może przebiegać *in vivo* wyjaśniłaby w znacznym stopniu zagadnienie regulacji genetycznej.

Udział kwaśnych białek w strukturze chromosomu. Od wykrycia kwaśnych białek w jądrze komórkowym datują się przypuszczenia o ich roli w strukturze chromosomów (43, 44, 58). Spośród wielu zaproponowanych dotychczas modeli chromosomu na uwagę zasługują przynajmniej dwa, tj. model De (14) oraz model D o u n c e' a i wsp. (16, 21, 39).

Najbardziej eksponowanym elementem w modelu De są włókna tzw. chromonemy o średnicy około 1000 Å. W modelu chromonemy wyodrębnia się 2 linie śrubowe utworzone z łańcuchów białka niehistonowego (odpowiadającego kwaśnemu białku chromatynowemu) powiązanych ze sobą przez dwuwartościowe kationy Ca^{2+} . Szkielet białkowy jest ciągły wzdłuż całej chromonemy. Niemal prostopadle do długiej osi chromonemy, a równoległe do siebie ustawiają się segmenty DNA, owinięte histonem. Długość segmentów DNA jest rzędu 500 do 1000 Å a ich sekwencja wzdłuż długiej osi chromonemy — specyficzna dla poszczególnych gatunków. Każda nić podwójnej spirali DNA przyłącza się do podstawy białkowej tylko jednym końcem; drugi koniec jest wolny i utrzymywany z drugim helikalnym łańcuchem DNA na zasadzie komplementarności zasad.

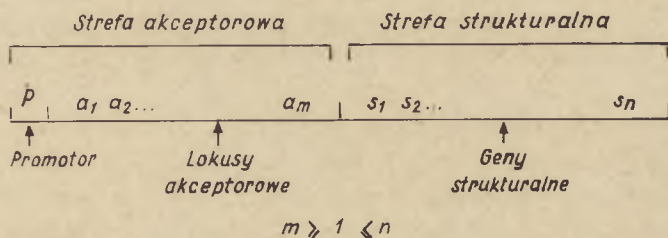
Model chromosomu Dounce'a i wsp. uwzględnia również poza dezoksy-nukleohistonem, obecność białka niehistonowego składającego się przynajmniej z 2 łańcuchów polipeptydowych sprzężonych ze sobą (jednym lub więcej) mostkami dwusiarczkowymi i połączonych kowalencyjnie z DNA. Niejasnym punktem koncepcji autorów (16, 21, 39) jest miejsce przyłączenia białka niehistonowego do DNA, tzn. do obu końców jednego łańcucha DNA czy też do jednego końca każdego z dwóch łańcuchów DNA (schemat 5).



Schemat 5. Model chromosomu wg Dounce'a i Hilgartnera (16, 21)

Ostatnio Georgiev (19) przedstawił pierwszą w dotychczasowym piśmiennictwie hipotezę roboczą o strukturalnej organizacji operonu w komórkach organizmów wyższych. Pod pojęciem operonu autor rozumie jednostkę transkrypcji, tj. odcinek genomu przepisywany w postaci nieprzerwanego łańcucha RNA. Tego rodzaju operon jest wielocistronowy i zawiera 2 strefy, a mianowicie: akceptorową (bliższą) oraz strukturalną (dalszą) w odniesieniu do tzw. promotora, będącego punktem przyłączenia polimerazy RNA (schemat 6).

W strefie pierwszej tuż za promotorem występują lokusy akceptorowe, czyli odcinki DNA nie zawierające informacji dla syntezy łańcuchów polipeptydowych, a więc operatory reagujące z represorami i induktorami



Schemat 6. Model operonu zwierząt wyższych wg Georgiewa (19)

$a_1 \dots a_m$ — lokusy akceptorowe, $s_1 \dots s_n$ — cistrony strukturalne i regulatorowe

oraz odcinki DNA oddziaływujące z białkami strukturalnymi chromosomu, głównie regulatorowymi. Strefę drugą stanowią cistrony strukturalne kodujące syntezę czynnych i strukturalnych białek komórkowych, a także cistrony regulatorowe odpowiedzialne za tworzenie białek represorowych i derepresorowych.

W procesie transkrypcji zachodzi odczytywanie całego operonu, co prowadzi do syntezy RNA-gigantu, komplementarnego do lokusów akceptorowych w obszarze 5', a do cistronów strukturalnych — w strefie końca 3' łańcucha RNA. Nowo utworzony gigantyczny RNA ulega rozczłonkowaniu i poszczególne jego fragmenty tworzą kompleksy z informoferami. Jednak do cytoplazmy dostają się tylko informofery połączone z właściwymi mRNA, tj. RNA powstałymi na matrycy genów strukturalnych; RNA komplementarne do lokusów akceptorowych ulegają rozkładowi.

Zdaniem Georgieva (19) przyłączenie białek regulatorowych do akceptorowych i lokusów tworzy barierę dla przesuwania się polimerazy RNA po operonie i tym samym uniemożliwia transkrypcję genów strukturalnych.

Charakterystyczną cechą lokusów akceptorowych byłaby ich mnogość, powtarzalność a także jednakowość w obrębie różnych operonów. Dzięki tej właściwości jeden typ białka regulatorowego mógłby od razu włączać i wyłączać dużą liczbę operonów rozsianych w całym genomie a nawet zlokalizowanych w różnych chromosomach.

Zróznicowanie komórki byłoby uwarunkowane włączaniem lub wyłączeniem lokusów akceptorowych zlokalizowanych głównie na początku operonu, odpowiadających na tzw. sygnały tkankowe, a niezbędnych dla formowania danego typu komórek. Lokusy akceptorowe znajdujące się dalej od promotora reagowałyby na bardziej specyficzne czynniki, np. na działanie hormonów, a najdalsze reprezentowałyby typ klasycznych operonów odpowiedzialnych za transkrypcję jednej grupy funkcjonalnie sprzężonych genów strukturalnych. W sumie strefa akceptorowa byłaby systemem zapewniającym subtelną i dokładną regulację transkrypcji, reagującą na najróżnorodniejsze sygnały regulatorowe. Ceną, którą każda komórka płaciłaby za ten precyzyjny mechanizm regulatorowy byłaby synteza nadmiaru RNA, tj. transkrypcja akceptorowych odcinków genomu (ok. 1/2—2/3 całości nowo syntetyzowanego RNA komórki).

Niezbędnym w tym systemie regulacji jest udział białek strukturalnych chromosomów, tj. histonów i białek niehistonowych (chromatynowych białek kwaśnych).

Według Georgieva (19) histony — inhibitory matrycowej aktywności DNA, a jednocześnie białka, których zawartość i skład chemiczny są praktycznie stałe w chromatynach z różnych tkanek oraz z różnych odcinków chromosomów — byłyby obecne w całej strefie akceptorowej, głównie proksymalnej w odniesieniu do promotora. Oddziaływałyby one z DNA niespecyficznie, tj. bez uwzględnienia sekwencji w DNA (pewien wyjątek

stanowią histony silnie lizynowe) i byłyby odpowiedzialne za stan zróżnicowania komórkowego. Natomiast białka niehistonowe, zlokalizowane w dalszych obszarach strefy akceptorowej, rozpoznawałyby określone sekwencje w DNA. Ich połączenie z histonami usuwałoby przeszkodę dla przesuwania się polimerazy RNA po operonie. Białka te regulowałyby szybkość syntezy RNA na odsłoniętych operonach.

Odnosi się wrażenie, że właśnie dla tych białek, ogromnie zróżnicowanych pod względem właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej (13, 31, 34, 65), zarezerwowany jest główny udział w regulowaniu przekazu informacji genetycznej.

LITERATURA

1. Allfrey V. G., Daly M. M., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.* **30**, 415 (1955).
2. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Osawa S., *J. Gen. Physiol.* **40**, 451 (1957).
3. Benjamin W., Gellhorn A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 262 (1968).
4. Berman A. E., Lebkowa N. P., Artamonowa W. A., Zbarski I. B., *Mol. Biol.* **2**, 224 (1970).
5. Bonner J., Dahmus M., Fambrough D., Huang R. C., Marushige K., Tuan D., *Science* **159**, 47 (1968).
6. Budrick C. J., Himes M., *Nature* **221**, 1150 (1969).
7. Burdon R. H., Garvin E. V., *Biochem. J.* **114**, 56P (1969).
8. Busch H., *Histones and other Nuclear Proteins*, Academic Press, New York-Londyn 1965.
9. Busch H., Steele W. J., *Advan. Cancer Res.* **8**, 41 (1964).
10. Bustos-Valdes S. E., Deisseroth A., Dounce A. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 848 (1968).
11. Chauveau J., Moulé Y., Rouiller Ch., *Exptl. Cell Res.* **11**, 317 (1956).
12. O'Connor P.J., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **35**, 805 (1969).
13. Daly M. M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.* **36**, 173 (1952).
14. De D. N., *Nature* **203**, 343 (1964).
15. Deisseroth A., *Biochim. Biophys. Acta* **186**, 392 (1969).
16. Dounce A. L., Hilgartner C. A., *Exptl. Cell Res.* **36**, 228 (1964).
17. Frenster J. H., *Nature* **206**, 680 (1965).
18. Frenster J. H., *Nature* **206**, 1269 (1965).
19. Georgiev G. P., *Mol. Biol.* **4**, 17 (1970).
20. Grogan D. E., Desjardins R., Busch H., *Cancer Res.* **26**, 775 (1966).
21. Hilgartner C. A., *Exptl. Cell Res.* **49**, 520 (1968).
22. Holoubek V. T., Crocker T., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 352 (1968).
23. Howk R., Wang T. Y., *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 238 (1969).
24. Howk R., Wang T. Y., *European J. Biochem.* **13**, 455 (1970).
25. Huang R. C., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1216 (1962).
26. Johns E. W., Forrester S., *European J. Biochem.* **8**, 547 (1969).
27. Kay E. R. M., Simmons N. S., Dounce A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1724 (1952).
28. King R. J., Gordon J., *J. Endocrinol.* **39**, 533 (1967).
29. King R. J., Gordon J., *Biochem. J.* **112**, 32P (1969).
30. King R. J., Gordon J., Steggle A. W., *Biochem. J.* **114**, 649 (1969).
31. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1188 (1966).

32. Krakow J. S., Kammen H. O., Canellakis E. S., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 52 (1961).
33. Krivcov G. G., Bogdanov A. A., *Mol. Biol.* **4**, 422 (1970).
34. Langan T. A., w Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis red. Koningsberger V. V., Bosch L., Elsevier Publishing Company Amsterdam-Londyn-New York 1967, str. 233.
35. Langan T. A., Smith L. K., *Federation Proc.* **25**, 778 (1966).
36. Leveson J. E., Peacocke A. R., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 329 (1966).
37. Lilienfeld L., *J. Physiol. Chem.* **18**, 1472 (1893).
38. Loeb L. A., Fansler B., Williams R., Mazia D., *Exptl. Cell Res.* **57**, 298 (1969).
39. Mackay M., Hilgartner C. A., Dounce A. L., *Exptl. Cell Res.* **49**, 533 (1968).
40. Marushige K., Brutlag D., Bonner J., *Biochemistry* **7**, 3149 (1968).
41. Mayer D. E., Gulick A. J., *Biol. Chem.* **146**, 433 (1942).
42. Mirsky A. E., Pollister A. W., *J. Gen. Physiol.* **30**, 17 (1946).
43. Mirsky A. E., Ris H., *Nature* **163**, 666 (1949).
44. Mirsky A. E., Ris H., *J. Gen. Physiol.* **34**, 475 (1950).
45. Ono H., Terayama M., *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 175 (1968).
46. Patel G., Howk R., Wang T. Y., *Nature* **215**, 1488 (1967).
47. Patel G., Patel V., Wang T. Y., Zobel C. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 654 (1968).
48. Patel G., Wang T. Y., *Exptl. Cell Res.* **34**, 120 (1964).
49. Patel G., Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 314 (1965).
50. Paul J., Gilmour R. S., *J. Mol. Biol.* **34**, 305 (1968).
51. Pooley A. S., King R. J., *Biochem. J.* **115**, 48P (1969).
52. Reid B. R., Cole R. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1044 (1964).
53. Sevag M. G., Lackman D. D., Smolens J., *J. Biol. Chem.* **124**, 425 (1938).
54. Smities O., *Biochem. J.* **71**, 585 (1959).
55. Spelsberg T. C., Hnilica L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 63 (1969).
56. Steele W. J., Busch H., *Cancer Res.* **23**, 1153 (1963).
57. Steele W. J., Busch H., *Exptl. Cell Res.* **33**, 68 (1964).
58. Stedman E., Stedman E., *Nature* **153**, 500 (1944).
59. Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 239 (1961).
60. Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 180 (1961).
61. Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 158 (1961).
62. Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 52 (1963).
63. Wang T. Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 800 (1965).
64. Wang T. Y., *J. Biol. Chem.* **241**, 2913 (1966).
65. Wang T. Y., *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 629 (1967).
66. Wang T. Y., *J. Biol. Chem.* **242**, 1220 (1967).
67. Wang T. Y., *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 235 (1968).
68. Wang T. Y., *Exptl. Cell Res.* **53**, 288 (1968).
69. Wang T. Y., *Exptl. Cell Res.* **57**, 467 (1969).
70. Wang T. Y., Johns E. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 176 (1968).
71. Wang T. Y., Kirkham W. R., Dallam R. D., Mayer D. T., Thomas L. E., *Nature* **165**, 974 (1950).
72. Wang T. Y., Mayer D. T., Thomas L. E., *Exptl. Cell Res.* **4**, 102 (1953).
73. Zbarski I. B., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 301 (1959).
74. Zbarski I. B., Georgiev G. P., *Biochimija* **29**, 192 (1959).

ADDENDUM

Po oddaniu niniejszego artykułu do redakcji Sonnenbichler i Nobis (*European J. Biochem.* **16**, 60 (1970)) poddali w wątpliwość istnienie białek niehistonowych w chromatynie i wysunęli przypuszczenie, że są to histony zmienione w czasie preparowania pod wpływem rozcieńczonych kwasów mineralnych.

U m a n s k i j i w s p. (*Mol. Biol.* **5**, 270 (1971)) opisali metodę izolowania białek niehistonowych przewyższającą pod względem wydajności technikę Wanga.

W wielu laboratoriach udowodniono *in vitro* specyficzność tkankową i gatunkową białek niehistonowych, której wyrazem byłaby ich selektywna interakcja z homologicznym DNA (Gilmour i wsp. *FEBS Letters* **9**, 242 (1970), Kleinsmith i wsp. *Nature* **226**, 1025 (1970), Teng i wsp. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41**, 690 (1970)). Spelsberg i wsp. (*Biochim. Biophys. Acta* **228**, 550 (1970)) wykazali tkankowo specyficzne ograniczenie przez białka niehistonowe matrycowej aktywności DNA w chromatynie.

Stein i wsp. (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41**, 715 (1970)) wykazali, że synteza białek niehistonowych w zsynchronizowanych komórkach HeLa odbywa się równie intensywnie w fazach S, G₂ a nawet w czasie mitozy, kiedy obniżona jest synteza tak innych białek jądrowych, jak i całości białek komórki.

Kamiyama i Wang (*Biochim. Biophys. Acta* **228**, 563 (1971)) donieśli, że niehistonowe białka z jąder wątroby szczura stymulowały *in vitro* oraz modyfikowały syntezę RNA kierowaną przez homologiczną skondensowaną chromatynę.

CELINA JANION*

Biosynteza i rola rzadkich zasad w tRNA

Biosynthesis and Role of Rare Bases in tRNA

The occurrence of rare bases in tRNA, the mechanisms of methylation of tRNA nucleosides as well as the influence of odd bases in tRNA on its function are reviewed and discussed.

Złożony i kluczowy udział tRNA w syntezie białka, na który składa się: przyjęcie, przeniesienie i ustawienie w odpowiedniej kolejności poszczególnych aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym, spowodował olbrzymie zainteresowanie tym typem kwasów nukleinowych i obfitość pojawiających się prac. Cechą charakterystyczną tRNA jest jego niewielki ciężar cząsteczkowy wynoszący około 25 000 (stała sedymentacji 4S), trójwymiarowa struktura ściśle związana z funkcją, oraz występowanie obok adeniny, guaniny, cytozyny i uracylu znacznej ilości różnorodnych zasad ogólnie objętych nazwą rzadkich (ang. *rare*, *odd*, lub *minor*).

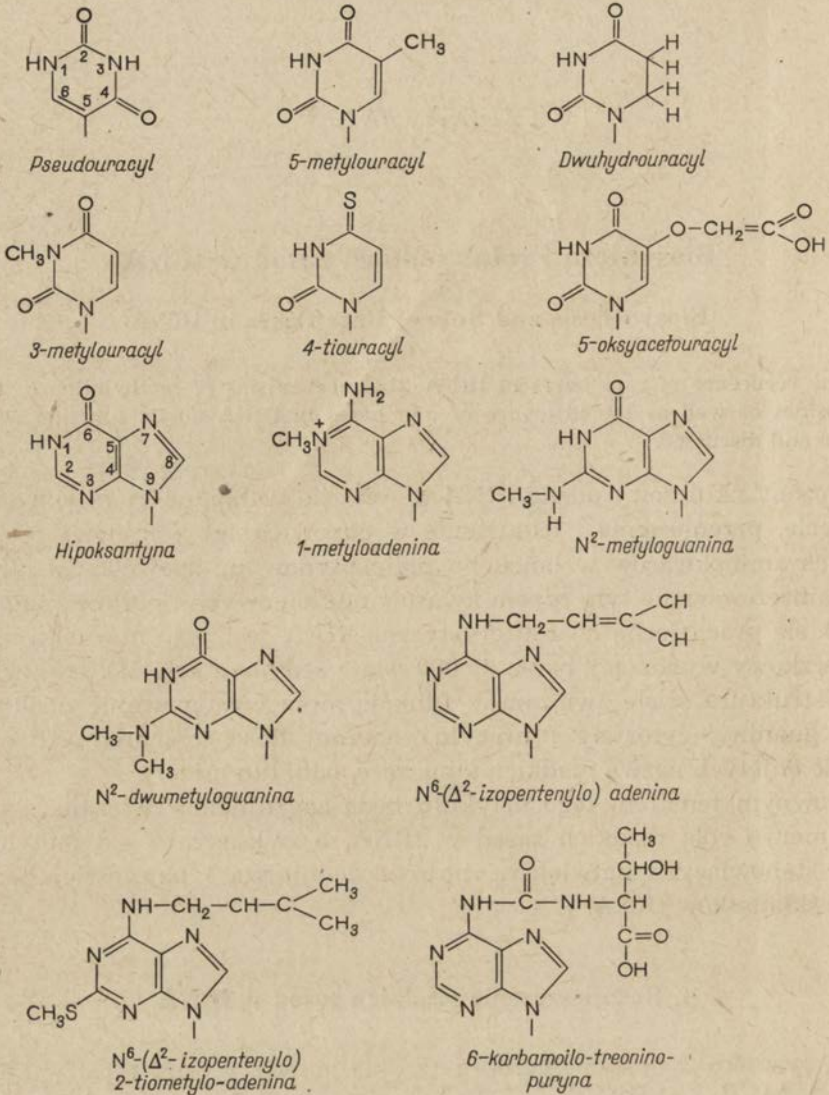
Głównym tematem tego artykułu będą zagadnienia związane z powstawaniem i rolą rzadkich zasad w tRNA, a zwłaszcza zasad metylowanych, stanowiących największą, najróżnorodniejszą i najczęściej badaną grupę składników tRNA.

I. Rozmieszczenie rzadkich zasad w tRNA

Na rysunku 1 podano niektóre rzadkie zasady występujące w tRNA. Modyfikacja składników tRNA może dotyczyć części cukrowej. W tRNA stwierdzono obecność wszystkich 4-ech klasycznych rybonukleozydów, oraz pseudourydyny w których wodór grupy -OH przy węglu C₂ rybozy został zastąpiony grupą metylową (49, 97). Ponadto z tRNA drożdży wyodrębniono 2'(3')-O-rybozyladenozynę, związek w którym na jedną zasadę przypadają dwie reszty cukrowe (50). Obecnie liczba modyfikowanych nukleozydów spotykanych w RNA osiągnęła liczbę 35 (51).

* Dr habil., Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

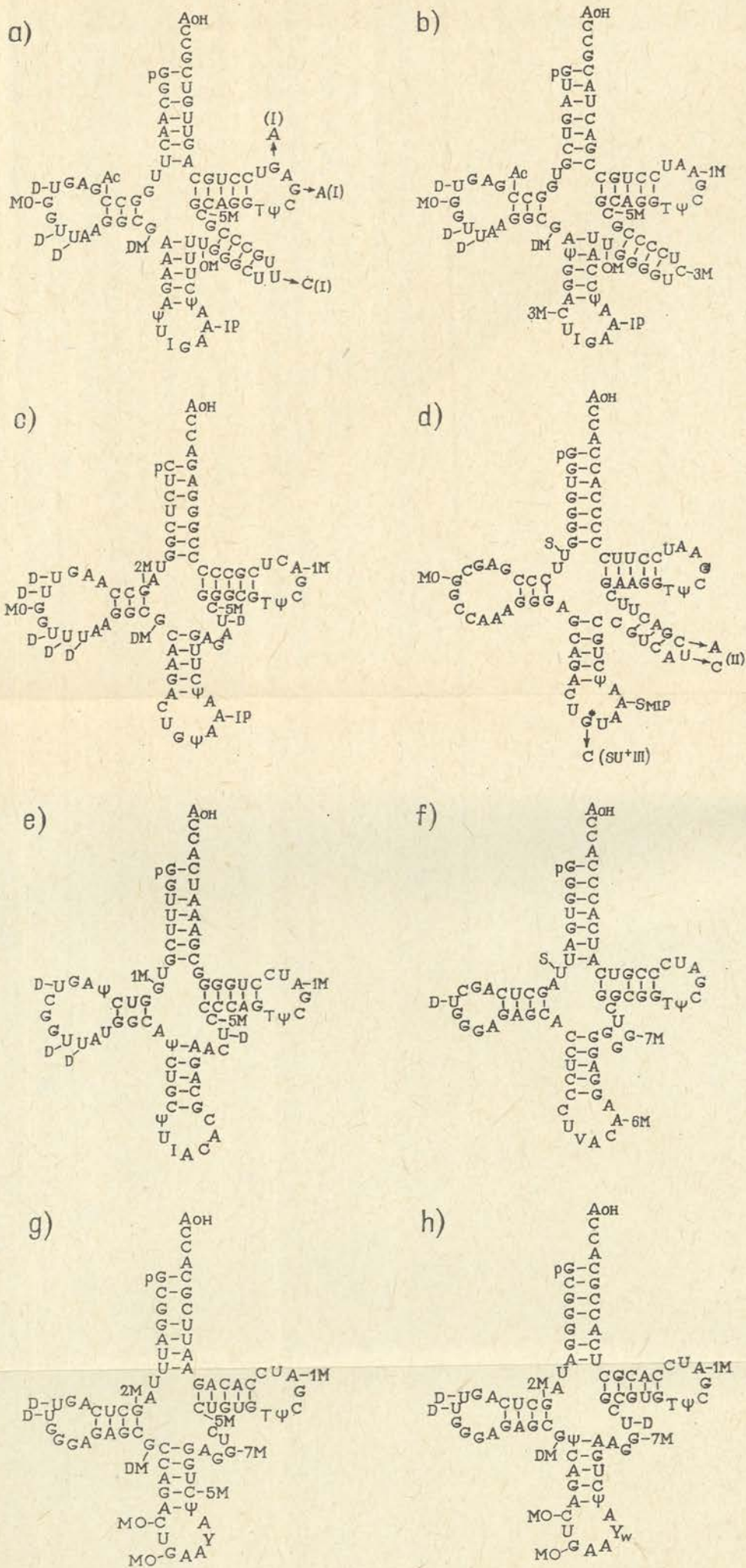
Wykaz stosowanych skrótów: IPA — N⁶-(Δ^2 -izopentenylo)-adenina; 5-MeC — 5-metylocytozyna; 2-MeA — 2-metyloadenina; N⁶-MeA — N⁶-metyloadenina; N⁶-DMeA — N⁶-dwumetyloadenina; 1-MeG — 1-metyloguanina; 7-MeG — 7-metyloguanina; N²-MeG — N²-metyloguanina; N²-DMeG — N²-dwumetyloguanina



Rys. 1. Niektóre zmodyfikowane zasady tRNA

Zasady modyfikowane, gdy przyjmiemy dla tRNA budowę liścia koniczyny (ang. *clover leaf*), w przeważającej części rozmieszczone są w miejscach gdzie występują przerwy w dwuniciowej strukturze tRNA: na pograniczu, lub w tak zwanych pętlach (ang. *loop*) znanych jako pętla dwuhydrouracylu, antykodonu, pseudouracylu i pętli dodatkowej. Na schemacie 1 przedstawiono kilka spośród wciąż wzrastającej liczby tRNA których sekwencja nukleotydów jest znana.

W danym organizmie różnice w składzie nukleotydowym tRNA przynoszących ten sam aminokwas są niewielkie (np. tRNA seryny I i II, lub



Schemat 1. a — tRNA II i I seryny z drożdży piekarskich (164); b — tRNA seryny z wątroby szczura (134); c — tRNA tyrozyny z drożdży piekarskich (87, 88); d — tRNA tyrozyny *E. coli* (45). Budowa su⁻ III i I jest identyczna su⁺ III i su⁺ II różnią się we wskazanych pozycjach; e — tRNA waliny z drożdży piekarskich (3); f — tRNA waliny z *E. coli* (58, 163), V = 5-oksycetouracyl (101); g — tRNA fenyloalaniny z drożdży piekarskich (116); h — tRNA fenyloalaniny z zarodków pszenicy (27)

Skróty nazw rzadkich zasad: C-Ac — N⁶-acetylocytozyna, C-5M — 5-metylocytozyna, C-3M — 3-metylocytozyna, U-OM — 2'-O-metylourydyna, Ψ — pseudourydyna, U-D — dwuhydouracyl, U-S — 4-tiouracyl, T — tymina, I — hipoksantyna, A-1M — 1-metyloadenina, A-6M — N⁶-metyloadenina, A-IP — N⁶-(Δ²-izopentenylo)-adenina, A-SMIP — 2-timetylo N⁶-(Δ²-izopentenylo)-adenina, G-1M — 1-metyloguanina, G-2M — N⁶-metyloguanina, G-DM — N⁶-dwumetyloguanina, G-7M — 7-metyloguanina, G*, Y, X — nieznane

tRNA tyrozyny I, II, III, su⁻ i su⁺), natomiast znaczne różnice w składzie nukleotydowym, w ilości i jakości rzadkich zasad, występują między tRNA tego samego aminokwasu pochodzącymi z różnych organizmów, oraz między tRNA przenoszącymi różne aminokwasy w tym samym organizmie. Różnice w zawartości rzadkich zasad w tRNA pochodzących z różnych źródeł mogą być bardzo znaczne. I tak np.: 1-metyloguanozyna stanowi w wątrobie szczura, myszy, królika i chomika kolejno: 1,0, 0,2, 1,2 i 11,0% ogólnej ilości nukleozydów tRNA (95). Najmniejsze ilości modyfikowanych zasad znajdują się w tRNA izolowanych z różnych gatunków *Mycoplasmy* (52, 60, 67).

II. Biosynteza rzadkich zasad

Metylowane pochodne tRNA. Pierwsze dowody, że zasady już wbudowane w tRNA mogą ulegać modyfikacji, co w konsekwencji prowadzi do zmian w strukturze pierwszorzędowej polimeru, przedstawił Borek ze swoją grupą (33, 34, 90, 91, 92, 93, 130, 131). Wykazali oni, co następnie potwierdzono w innych pracowniach (42, 136, 146), że grupy metylowe zasad występujących w tRNA, zostają wprowadzone enzymatycznie po zakończeniu budowy polinukleotydu. Punktem wyjścia było stwierdzenie, że tRNA gromadzące się podczas głodu metioninowego *Escherichia coli* K12B6 — szczepu zależnego od metioniny, zawiera znacznie mniejsze ilości zasad metylowanych, niż tRNA *E. coli* hodowanych w obecności metioniny (90). Nagromadzenie RNA w czasie głodu metioninowego jest wynikiem obecności genu RC^{rel}, który w odróżnieniu od genu dzikiego RC^{str} umożliwia syntezę RNA w nieobecności syntezy białka (137).

To tRNA uboższe w zasady metylowane posłużyło do wykazania zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, że metylowanie zachodzi na poziomie polinukleotydu i jest jak dotąd najogólniej używanym substratem do badań enzymów metylujących. Obok prac źródłowych, kolejne etapy prowadzące do wykrycia metylaz przedstawiono w kilku pracach przeglądowych (15, 132, 133).

W ten sam sposób jak zasady ulegają metylowaniu reszty rybozy w tRNA (11, 16, 38, 144).

Biosynteza niektórych innych rzadkich zasad. Ogólnie jest przyjęte, chociaż z pewnością zostało ustalone w jednym przypadku, że pozostałe rzadkie zasady (być może z wyjątkiem pseudouracylu) powstają podobnie jak związki metylowane, poprzez modyfikację wytworzonego polinukleotydu. Zdania co do pochodzenia pseudouracylu w tRNA są podzielone. Niektóre wyniki doświadczeń sprzyjają hipotezie modyfikacji urydyny w łańcuchu polinukleotydowym, niektóre zaś — w budowywaniu pochodnych pseudouracylu (44).

Siarka tiolowanych zasad, jak stwierdzono *in vivo* poprzez śledzenie inkorporacji różnych znakowanych prekursorów do tRNA, pochodzi w *E. coli* z cysteiny (111), a w kulturach tkankowych ssaków w 67% z metioniny i w 33% z cysteiny (28). Poszukując enzymu tiolującego wykazano aktywność enzymatyczną w ekstraktach *E. coli* powodującą przeniesienie ^{35}S z cysteiny do 4-tiouracylu tRNA (61, 62, 81). Jednak dalsze badania wyraźnie wskazały, że obserwowana aktywność enzymatyczna nie jest wynikiem rzeczywistej inkorporacji siarki z cysteiny do tRNA, a reakcją wymiany między siarką cysteiny a siarką 4-tiouracylu tRNA (106). Znaczenie tej reakcji, ani też związków między reakcją wymiany a tiolacją zasad nie zostały ostatecznie wyjaśnione.

N^6 -(Δ^2 -izopentenylo)-adenozyna (IPA) powstaje poprzez przyłączenie grupy izopentenylowej do adenozyiny znajdującej się w tRNA (30, 76). Dawcą łańcucha izopentenylowego, jak wynika z badań nad włączaniem prekursorów do tRNA przez całe komórki *Lactobacillus* (31, 107) i ekstrakty komórek wątroby szczura lub drożdży (30, 76), jest kwas mewalonowy, względnie produkt jego metabolizmu — pirofosforan Δ^2 -izopentenyłu. Enzymatyczny charakter włączania łańcucha izopentenylowego do adenozyiny udowodniono przy użyciu tRNA z drożdży, w których reszty IPA zostały przekształcone do adenozyiny (30). Oczyszczone enzymy drożdży i wątroby szczura mogą włączać znaczne ilości grup izopentenylowych również i do tRNA *E. coli* B. (76). Synteza 2-tio-metylo-IPA, występującej w niektórych tRNA, prawdopodobnie przebiega poprzez tiolowanie IPA do 2-tio-IPA i następnie metylację (38, 76).

III. Metylasy, występowanie i charakterystyka procesu metylacji

Enzymy metylujące są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. Występują we wszystkich badanych bakteriach i drożdżach (43, 131), w tkankach zwierzęcych normalnych i rakowych (53, 63, 149), w guzach wysiękowych Ehrlicha (11, 17, 162), w hodowlach tkankowych (24, 36, 72), w szpinaku (130), w kielkach pszenicy (140), w glonach (162). W komórce rozpowszechnione są głównie we frakcji rozpuszczalnej, otrzymanej po odwirowaniu jąder, mikrosomów i rybosomów i ta frakcja jest używana bezpośrednio do badań enzymów metylujących, lub stanowi wstępny etap przed ich oczyszczeniem (4, 21, 24).

Metylasy stanowią zbiór enzymów różniących się nie tylko zdolnością do metylacji określonej zasady, ale i miejscem metylacji w danej zasadzie. Jak dotychczas najpełniejszy rozdział enzymów metylujących uzyskali Hurwitz, Gold i Anders (63) z ekstraktów *E. coli*, a Björk i Svensson (12) z *Sacharomyces cerevisiae*. Hurwitz i wsp. wyodrębnili z *E. coli* sześć frakcji enzymatycznych, z których dwie metylowały reszty G do 1-metyloguaniny (1-MeG), a pozostałe metylowały kolejno:

G do 7-metyloguaniny (7-MeG), U do T, C do 5-metylocytozyny (5-MeC), oraz A do 2-metyloadeniny (2-MeA), N⁶-metyloadeniny (N⁶-MeA) i N⁶-dwumetyloadeniny (N⁶-DMeA). Wszystkie te frakcje oprócz dwóch metylujących G do 1-MeG, metylują niezależnie od siebie zasady występujące w odrębnych punktach tRNA. Po dodaniu kilku enzymów do mieszaniny reakcyjnej ilość grup metylowych wprowadzonych do tRNA równa się sumie grup metylowych wprowadzonych przez poszczególne frakcje (64).

Metylazy *Sacharomyces cerevisiae* rozdzielono na osiem oddzielnych frakcji (12). Wśród ich produktów reakcji wykryto: N²-metyloguaninę (N²-MeG), N²-dwumetyloguaninę (N²-DMeG), 7-MeG, 1-MeG, T, 5-MeC, 1-metyloadeninę (1-MeA) i prawdopodobnie 2'-O-metylowane pochodne rybozy. Przynajmniej trzy frakcje o nieco różnych właściwościach (145) metylowały głównie uracyl. Pozostałe w mniejszym, lub większym stopniu wytwarzały więcej niż jeden typ metylowanej zasady. O odrębności enzymów metylujących grupę aminową guaniny do N²-MeG, lub N²-DMeG świadczy wyodrębnienie mutantów *Sacharomyces cerevisiae*, które zawierają w tRNA te same ilości N²-MeG co szczepy siostrzane, ale pozbawione są zupełnie N²-DMeG (115).

Ponadto z wątroby i śledziony szczura Baguley i Staehelin (5) wyodrębnili enzym metylujący głównie A do 1-MeA, z niewielką aktywnością metylacji G do N²-MeG, a Kerr (70) podaje łatwą i szybką metodę wyodrębniania enzymu metylującego G do N²-DMeG.

Oczyszczanie i frakcjonowanie enzymów metylujących znacznie utrudnia ich labilność. Najbardziej trwałe są niektóre frakcje enzymatyczne *E. coli* (63). Dla zwiększenia trwałości enzymów autorzy zalecają: przechowywanie w 30% glikolu etylenowym (12), frakcjonowanie w obecności 10% i przechowywanie w 30% glicerolu (10), albo przechowywanie w roztworze w postaci zawiesiny strątu białka z siarczanem amonu (5), od którego należy się uwolnić przed ponownym użyciem enzymu.

1. Warunki reakcji metylacji

Enzymy metylują specyficznie tRNA. Nie są metylowane: DNA, rRNA, wirusowe RNA, poli U, poli A, poli C, poli I, ich kompleksy i inne syntetyczne kopolimery (64, 119). Czynnikiem metylującym jest S-adenozylometionina. Formaldehyd + kwas tetrahydrofaliowy, metylo-B₁₂, kwas metylotetrafaliowy — nie są donorami grup metylowych (64). Zastąpienie grupy metylowej w S-adenozylometioninie grupą etylową, nie powoduje etylacji tRNA (119). Chociaż w wątrobie szczura istnieje prawdopodobnie odrębny enzym etylujący tRNA (56). Dla aktywności enzymów wymagane są jony Mg²⁺ i związki sulfhydrylowe. Reakcje metylacji przy użyciu ekstraktów cytoplazmatycznych zawierających mieszaninę enzymów zwykle bada się w pH 8,0—8,2. Jednak optymalne wartości pH dla metylacji poszczególnych zasad są różne. Optimum reakcji metylacji dla odrębnych

enzymów izolowanych z *E. coli* waha się w granicach pH 7,5—9,0. Optimum pH dla metylacji adeniny enzymem z wątroby i śledziony szczura wynosi 9,25 (5), a ekstraktami mózgowymi szczurów i kotów — około 10,0 (128). Dlatego też badania metylacji tRNA przez ekstrakty komórkowe w różnych wartościach pH , wykazują kilka wartości pH przy których reakcja osiąga wielkość maksymalną.

Zeleznick (166) badając metylazy zawarte w ekstraktach tkanek KB (rakowata tkanka epidermy) zwrócił uwagę, że optimum pH dla enzymów oznaczanych w nieoczyszczonych preparatach zależy również od rodzaju używanego tRNA. Przy tym samym źródle enzymu, otrzymał on znaczne różnice w obrazie metylacji i optymalnych wartościach pH , zależnie od tego czy substratem było tRNA z *E. coli* K12W6, czy *E. coli* W. Fakt ten można tłumaczyć różnicami w zawartości w tych dwóch preparatach zasad podatnych do metylacji. Przy braku np. zdatnych do metylacji reszt guaniny, optimum pH odpowiadające metylacji guaniny nie będzie zaznaczone i obraz rozmiaru metylacji zależny od wartości pH może ulec zmianie.

Z badań nad zależnością między pH , a ilością włączanych grup metylowych do tRNA widać, że tRNA metylowane jest w szerokim zakresie pH (128, 166). Szczególnie zastanawia znaczne włączanie grup metylowych w pH ponad 10,0. Czy wtedy zasady metylowane są w tych samych miejscach cząsteczki, czy też wyeksponowane zostają nowe miejsca metylacji dotychczas nie było sprawdzane.

2. Specyficzność gatunkowa metylaz

Badania metylacji tRNA *in vitro* wykazały, że enzymy metylujące pochodzące z różnych źródeł wykazują specyficzność gatunkową. Z wyjątkiem tRNA otrzymanego z głodzonych metioniną komórek *E. coli* poddanych głodowi metioninowemu, lub tRNA *S. cerevisiae* izolowanych przy szczególnych warunkach wzrostu (73, 74, 75, 114), enzymy nie metylują tRNA pochodzącego z tego samego źródła. Np. metylazy wyodrębnione z drożdży nie metylują tRNA z drożdży, ale mogą w różnym stopniu metylować tRNA z wątroby, *E. coli* czy innych gatunków bakteryjnych (43, 53, 130, 131). Ten pozorny paradoks tłumaczy się tym, że tRNA pochodzące z tego samego źródła co metylazy jest już w pełni zmetylowane. Natomiast enzymy heterologiczne dla danego substratu mogą znaleźć miejsca metylacji nie wykorzystane przez enzymy homologiczne. Istnieją przypuszczenia, że odrębną specyficzność mogą wykazywać nawet różne organy tego samego zwierzęcia (20). Dotychczas brak danych na czym ta specyficzność gatunkowa polega; czy jest ona wynikiem braku niektórych, lub różnego stosunku poszczególnych metylaz, czy też istnieją faktyczne różnice w specyficzności enzymów metylujących. Odpowiedź na to pytanie

będzie można uzyskać po wyodrębnieniu z różnych źródeł enzymów metylujących poszczególne zasady i badanie ich specyficzności. Ten typ badań zapoczątkowali Baguley i Staehelin (5).

3. Mechanizm rozpoznania substratu przez enzym

Próby wyjaśnienia tego problemu pierwsi podjęli Baguley i Staehelin (4, 5, 6, 7) oraz Rogg i Staehelin (120). Badania rozmieszczenia 1-MeA i N²-DMeG otrzymanych po metylacji tRNA *E. coli* oczyszczonymi enzymami wątroby wykazały, że zasady te metylowane są w ściśle określonej sekwencji nukleotydów (4). Z tego nieprzypadkowego rozmieszczenia zasad autorzy wnioskują, że miejscem rozpoznawanym przez enzym jest nie pojedyncza zasada, ale pewien ciąg nukleotydów. Po stwierdzeniu znacznych różnic między zawartością 1-metyloadeniny w tRNA drożdży (0,7%) i w tRNA wątroby (1,3%) oraz ustaleniu, że tRNA drożdży jest substratem dla enzymu z wątroby metylującego A do 1-MeA, Baguley i Staehelin szukali wytłumaczenia tych faktów w odrębności specyficznej enzymów. W takim przypadku w tRNA drożdży powinno brakować pewnej sekwencji nukleotydów zawierających 1-MeA. Analiza oligonukleotydów zawierających 1-MeA otrzymanych z tRNA drożdży, tRNA wątroby oraz tRNA drożdży po metylacji enzymem wątroby wykazała we wszystkich preparatach obecność tych samych 6-ciu oligonukleotydów, a mianowicie: Gp1-MeApUp, Ap1-MeApUp, Gp1-MeApCp, Gp1-MeApApUp, Ap1-MeApApUp i Gp1-MeApApCp (6).

Te same badania Baguley, Wehrli i Staehelin (7) rozciągnęli na serylo-tRNA z drożdży. Skład i sekwencja nukleotydów tRNA seryny wątroby i drożdży są znane (134, 164). Jedną z różnic jest brak grupy metylowej w adeninie występującej w pętli pseudouracylu tRNA drożdży. Baguley, Wehrli i Staehelin (7) wykazali, że enzym wątroby może metylować tRNA I seryny drożdży dokładnie w tej samej pozycji i sekwencji ApApApUp w jakiej metylowana adenina występuje w tRNA seryny wątroby. W tRNA II seryny adenina występująca w tej samej części cząsteczki w sekwencji GpApGpUp nie jest metylowana. Fakt, że tRNA seryny drożdży nie jest metylowane przez enzym z drożdży, według wspomnianych autorów może wskazywać że a) reszta adeniny nie jest eksponowana na zewnątrz cząsteczki, b) enzym wątroby w odróżnieniu do enzymu drożdży może indukować zmiany konformacyjne umożliwiające metylację tRNA.

Podobne badania — porównania oligonukleotydów zawierających metylowaną guaninę — przeprowadzili Streeter i Lane (140) dla tRNA kielków zboża, a Kuchino i Nishimura (77) dla kilku odrębnych gatunków tRNA *E. coli*. Wnioski z obydwu prac są te same: enzym rozpoznaje miejsce metylacji poprzez określony ciąg nukleotydów.

IV. Wahania w aktywności metylaz

Zmiany w aktywności metylaz notowano w różnych systemach biologicznych, przy różnych stanach fizjologicznych.

Wpływ infekcji bakteriofagów. Najbardziej drastyczne zmiany, prawie całkowity zanik zdolności do metylacji tRNA, obserwowano u *E. coli* B w 10 minut po infekcji fagiem T₃. Zjawisko to było wynikiem indukcji enzymu powodującego rozpad S-adenozylometioniny, dawcy grupy metylowej. Metylacja tRNA i DNA zahamowana była w tym samym stopniu (41). Zmniejszenie metylacji tRNA (oraz 16S i 26S RNA) obserwowano również u *E. coli* w 5—8 minut po infekcji fagami T₄ (13). Natomiast infekcja *E. coli* fagami T₂ powoduje około 50% zwiększenie w obrazie metylacji. Po infekcji w większym stopniu metylowana była adenina i uracyl niż guanina (156).

Wahania w aktywnościach enzymów metylujących powoduje również indukcja faga wywołana działaniem UV, lub ogrzewaniem szczepów lizogennych *E. coli* (156, 158). W *E. coli* K12W6 (λ^+) po upływie 10, 20 i 30 minut od czasu indukcji faga promieniami UV, aktywność metylaz wynosiła 16, 27 i 84% aktywności wyjściowej (156). W *E. coli* C857 (λ^+) po 20 minutach inkubacji w 40°, co stanowi wystarczający warunek dla całkowitej indukcji faga, aktywność metylaz wynosiła 63%, a po dalszych 8 minutach inkubacji w 37°C 128% wartości otrzymanych przed indukcją (158). Mechanizmy powodujące zmiany w aktywności metylaz u *E. coli* po indukcji faga działaniem UV, lub ogrzewaniem są odmienne. W przypadku indukcji faga działaniem UV, zmniejszenie aktywności metylaz spowodowane jest pojawieniem się niskocząsteczkowego, dializującego inhibitora, o nieznaney jeszcze budowie chemicznej (158). Natomiast termiczna indukcja faga powoduje selekcję enzymów metylujących. Metylazy w komórkach indukowanych są znacznie bardziej odporne na denaturację w czasie preinkubacji w 40°C, niż w komórkach przed indukcją (155, 158).

Wpływ infekcji fagowej na metabolizm komórek bakteryjnych jest bardzo złożony. Biegnie synteza wielu nowych białek, specyficznych dla faga a także obserwuje się zmiany w składzie tRNA.

U *E. coli* w różnym czasie po infekcji fagiem T₂ pojawiają się przynajmniej dwa, lub trzy nowe rodzaje leucylo-tRNA (141, 143, 160). Jeden rodzaj tRNA, który pojawia się po 1—2 minutach od czasu zakażenia, powstaje przez enzymatyczne wywołanie jednego, lub kilku pęknięć w łańcuchu polinukleotydowym (68). Tak modyfikowane tRNA może przyjąć leucynę, ale w odróżnieniu od innych acylowanych tRNA nie zachodzi reakcja wymiany, między leucyną wolną i leucyną związaną w tRNA. Nie stwierdzono jednak żadnych zmian w syntezie białka *in vitro* gdy pierwotne, lub modyfikowane leucylo-tRNA było używane do reakcji (68).

Jak wynika z badań nad hybrydyzacją tRNA przed i po infekcji *E. coli* bakteriofagami T₄ (25, 121, 161) i T₂ (129), fagi mogą indukować syntezę

nowych gatunków tRNA, hybrydujących tylko z fagowym DNA. Nie wyjaśniono czy wahania w aktywności enzymów są tylko odbiciem różnic w składzie poszczególnych tRNA, czy też zmiany w składzie enzymów metylujących mogą powodować zróżnicowanie tRNA, poprzez wprowadzenie różnych ilości grup metylowych do jednego rodzaju tRNA.

Wpływ zakażenia wirusami. Zmniejszenie aktywności metylaz obserwowano po zakażeniu kultur komórkowych HRp2 wirusem polio (46). W 6 godzin po infekcji stosunek włączanej ^{14}C -metioniny do ^3H -urydyny był znacznie niższy, niż w komórkach przed infekcją. Natomiast procent włączania ^3H -urydyny do tRNA był 2-krotnie większy po infekcji. Zmiany występowały również w obrazie metylacji. Po infekcji głównie metylowaną zasadą była adenina. Znajdowano N^6 -metyloadeninę, której obecności nie wykrywano w komórkach niezakażonych. Autorzy przypuszczają, że jest to wynik syntezy nowych, specyficznych dla wirusa gatunków tRNA.

Znaczne zahamowanie metylacji i syntezy tRNA obserwowano w hodowlach tkankowych nerek chomika po infekcji wirusem stóp i jamy ustnej (152). Możliwe, że jest to wynik ogólnego zahamowania procesu metylacji gdyż metylacja rRNA była również znacznie zmniejszona.

Aktywność metylaz w różnicujących się tkankach. Wahania w aktywności metylaz obserwowano w wielu różnicujących się tkankach. Poziom enzymów metylujących w poczwarcie *Tenebrio molitor* jest znacznie wyższy, niż w gąsienicy, lub dorosłym motyłu (8). W wielu tkankach embrionalnych: w wątrobie królika, myszy, szczurów i chomika (54, 57, 86) w mózgu kotów (128), aktywność enzymów metylujących jest znacznie wyższa niż w tkankach zwierząt dojrzałych. Zmniejszenie aktywności metylaz w tkankach zwierząt dojrzałych, jak stwierdziła K e r r (70) na przykładzie tkanek królika i szczurów, jest wynikiem obecności inhibitora białkowego. Działa on niespecyficznie, powoduje zahamowanie metylacji wszystkich zasad, prawdopodobnie na skutek współdziałania z enzymem a nie z substratem. Dalsze badania nad inhibitorem izolowanym z wątroby królika wykazały, że składa się on z dwóch odrębnych cząsteczek białkowych o ciężarach cząsteczkowych 100 000 i 5 000. Obydwie części są potrzebne dla wywołania inhibicji (71).

Zmniejszenie enzymów metylujących obserwowano w czasie różnicowania się komórek śluzowca *Dictyostelium discoideum* (112). Zależnie od ilości pokarmu w podłożu, śluzowiec przechodzi ze stadium jednokomórkowej ameby, w wielokomórkową kolonię, a w końcu w zróżnicowany organizm wytwarzający spory. Tym zmianom towarzyszy stopniowe zmniejszanie się enzymów metylujących i zmiany w obrazie metylacji. Stosunek metylowanej N^2 -MeG do N^2 -DMeG wynosi w stanie ameby 6:1, w koloniach komórek 3:1 i znowu 6:1 w organizmie sporulującym. I w tym przypadku zmniejszenie aktywności metylaz następowało w wyniku pojawiania się inhibitora (123).

Wpływ hormonów. Zwiększenie aktywności metylaz obserwowano w czasie rozwoju gruczołu mlecznego w okresie poprzedzającym laktację (150, 151). Zwiększonej aktywności towarzyszyło proporcjonalne zwiększenie ilości tRNA. Badania przeprowadzono na całym zwierzęciu jak i w kulturach tkanek gruczołu mlecznego. Badania *in vitro* wykazały, że insulina stymuluje zarówno zwiększanie się tRNA, jak i enzymów metylujących. Najwyższy, około 6-krotny wzrost aktywności obserwowano po jednoczesnym dodaniu insuliny, hydrokortizonu i prolaktyny. Natomiast dodanie insuliny i prolaktyny do prób przy samym oznaczaniu aktywności metylaz nie powoduje żadnych zmian.

Regulujący wpływ na aktywność metylaz wywierają hormony estrogenne. Podawanie kurczętom dietylostilbestrolu znacznie podwyższa aktywność metylaz w rozwijających się jajowodach (47). Z wcześniejszych prac (26, 104) wynikało, że dietylstilbestrol znacznie zwiększa syntezę jądrowego tRNA i w mniejszym stopniu cytoplazmatycznego tRNA wyłącznie w jajowodach kurcząt. W wątrobie ilość tRNA nie ulegała zmianom. Estradiol podawany młodym 3-tygodniowym szczurom zwiększa szybkość metylacji rRNA i tRNA w tkance macicy (100). Wycięcie jajników u dojrzałych szczurów powoduje 2-krotne zmniejszenie poziomu i zmiany w obrazie metylacji (82).

Mechanizm działania hormonów estrogennych zbadano na pozbawionej jajników świni (122). Stwierdzono, że estradiol wpływa nie na poziom enzymów metylujących, ale na poziom inhibitora (czy inhibitorów) tych enzymów. Po wycięciu jajników dochodzi do zahamowania reakcji metylacji. Podanie estradiolu zmniejsza poziom inhibitora w tkance i przez to powoduje zwiększenie zdolności metylacji. Jednocześnie stwierdzono, że spośród 10 badanych acylowanych tRNA, estradiol wpływa na zmianę obrazu elucji z kolumny metylowana albumina — żel krzemionkowy, jedynie serylo-tRNA. Zarówno wahania poziomu metylacji, jak i zmiany w elucji serylo-tRNA są organiczne tylko do tkanki macicy. Estradiol nie wywołuje podobnych zmian w tkance wątroby.

V. Metylasy jako czynnik onkogenny

Srinivasan i Borek (130, 132) w oparciu o następujące dane: zawartość metylowanych puryn w tRNA tkanek rakowych jest znacznie wyższa niż tkanek normalnych (Berquist i Mathew (9)), czynniki alkilujące w większym stopniu alkilują RNA, aniżeli DNA (Magee i Farber (89)) oraz fakt istnienia specyficzności gatunkowej metylaz, wysunęli hipotezę onkogennego działania enzymów metylujących.

Autorzy zakładali, że jeżeli wirus onkogenny indukuje powstawanie w tkance dodatkowych metylaz, o innej specyficzności niż enzymy w tkance nie zakażonej, to ogólna ilość grup metylowych wprowadzonych do

tRNA zwiększy się. Metylazy działałyby więc podobnie jak czynniki alkilujące, powodowałyby hipermetylacje tRNA.

Szereg wyników wydaje się przemawiać za tą hipotezą. Tsutsui, Srinivasan i Borek (149) stwierdzili, że aktywność metylaz w tkankach rakowych oznaczana *in vitro* wobec tRNA *E. coli* jako substratu jest od 2—12 krotnie wyższa niż tkanek normalnych. Zmianie ulega również obraz metylacji: stosunek metylowanych zasad w tRNA jest inny po metylacji enzymami tkanek normalnych, niż rakowych. Okazało się też, że tRNA w pełni zmetylowane działaniem metylaz tkanek normalnych jest nadal substratem dla metylaz tkanek rakowych. Zmiany są więc nie tylko ilościowe (zwiększenie aktywności enzymów metylujących) ale i jakościowe (różnice w specyficzności metylaz).

Zwiększenie aktywności enzymów, zmiany w obrazie metylacji, lub zwiększenie ilości metylowanych zasad w tRNA obserwowano w wielu tkankach nowotworowych.

Zwiększenie aktywności metylaz obserwowano w tkance chomika zrakowaciałej wskutek infekcji adenowirusem 12 (85, 86), w kilku hepatomach myszy (53, 54), w leukocytach białaczkowych (6, 126, 127), w kulturach komórek mysich przekształconych w komórki nowotworowe dodaniem surowicy końskiej (36), w rakach wątroby szczurów (139) i myszy (55) wywołanych karmieniem etioniną, w limfosarkomach myszy wywołanych działaniem uretanu (69).

Zwiększenie aktywności i różnice w obrazie metylacji tRNA występują po infekcji wirusem SV40 kultur komórkowych chomika (96), jak również w wątrobie kurcząt po infekcji wirusem Marek'a (48, 94).

Zwiększoną ilość metylowanych zasad znajdowano w tRNA izolowanych z nowotworów mózgu (153, 154), oraz w nowotworach wątroby szczurów wywołanych przewlekłym karmieniem dwumetyloaminą, aflatoksyną lub etioniną (22).

Tylko w jednym przypadku po infekcji kultur komórkowych nerek mały wirusem onkogennym SV40, szczepionką, lub wirusem herpesa, nie obserwowano różnic w aktywności enzymów metylujących (72).

Chociaż większość autorów sądzi, że zwiększenie aktywności metylaz świadczy o ich powiązaniu z etiologią raka, niektórzy zwracają uwagę, że zwiększenie aktywności enzymów metylujących jest cechą tkanki szybko rosnącej (53, 54). Poziom metylaz tkanek rakowych nie przekracza aktywności metylaz płodu (85, 86, 139), 24 godz. myszy (69) lub 12-dniowych szczurów (139). Hancock (53) nie przesądzając sprawy hipermetylacji tRNA jako czynnika onkogenego stwierdził, że enzymy wątroby embriona królika mogą metylować tRNA wątroby królika dorosłego.

Kay i Leboy (69) zwracają uwagę, że różnice w aktywności i specyficzności metylaz mogą być wynikiem różnic w zawartości jonów w tkankach. Rodeh, Feldman i Littauer (119) stwierdzili, że aktywność metylaz zwiększa się w obecności octanu amonu. Gdy Kay

i Leboy (69) oznaczali aktywność metylaz tkanek normalnych i rakowych w obecności jonów amonowych obserwowali nie tylko zmiany w aktywności enzymów, ale również zmiany w obrazie metylacji. Optimum działania jonów amonowych przypada jednak na stężenie (0,36M) nie spotykane w tkankach. Leboy (78) w poszukiwaniu związków naturalnych stymulujących metylazy stwierdziła ostatnio, że poliaminy jak spermina, spermidyna i putrescyna w ilościach występujących w tkankach powodują znaczne zwiększenie aktywności tych enzymów i ogólnej ilości grup metylowych wbudowanych do tRNA. Autorka sugeruje, że zawartość poliamin w tkankach może wpływać na poziom i rozmieszczenie grup metylowych w tRNA.

Baguley i Staehelin (5) poprzez badanie sekwencji nukleotydów w jakiej występuje metylowana adenina, porównywali specyficzność enzymów metylujących A do 1-MeA pochodzących z wątroby i śledziony szczurów chorych na białaczkę, nie znaleźli jednak różnic świadczących o odmiennej specyficzności enzymu z tkanek rakowych.

Niektórzy autorzy kwestionują używanie przy oznaczaniu aktywności metylaz tRNA *E. coli*, a nie naturalnego homologicznego substratu. Pomijając już fakt, że używanie heterologicznego tRNA jest podyktowane koniecznością (substrat homologiczny nie jest metylowany przez enzymy homologiczne) zaletą takiego układu jest, że wyklucza tłumaczenie zwiększonej ilości grup metylowych w tRNA tkanek rakowych zmianami w jego strukturze trzeciorzędowej.

W świetle powyższych danych widać, że powód występowania zwiększonej ilości metylowanych zasad w tRNA tkanek rakowych, któremu towarzyszy podwyższenie aktywności enzymów metylujących, nie jest zupełnie jasny. Najprostsze z wytłumaczeń, że zwiększenie aktywności metylaz jest związane z pojawieniem się nowych rodzajów tRNA (22) nie wyjaśnia dlaczego zmiana ta łączy się z tRNA bogatszymi w grupy metylowe. Wydaje się, że zwiększenie aktywności metylaz w tkankach rakowych powstałych pod wpływem etioniny, czy związków alkilujących, osłabia hipotezę hipermetylacji tRNA jako wystarczającej przyczyny powstawania nowotworu i wskazuje na bardziej ogólny charakter tego zjawiska, które być może związane jest z ogólnymi zaburzeniami w syntezie białka.

VI. Wpływ modyfikowanych zasad na funkcję tRNA

Udział tRNA w regulacji syntezy białka jest szeroko dyskutowany (142). Modyfikacja zasad stanowi jeden z możliwych sposobów spełniania tej funkcji (14, 51, 157). Zależność prawidłowego działania tRNA od obecności modyfikowanych zasad stanowiłaby poparcie tej hipotezy. Regulacja syntezy białka dokonywana byłaby poprzez zmiany w składzie lub aktywności enzymów modyfikujących.

Wczesne badania roli modyfikowanych zasad w tRNA dotyczyły głównie wpływu obecności metylowanych pochodnych na ich funkcje akceptorowe. W wielu pracowniach nie stwierdzono żadnych różnic w zdolności przyłączania różnorodnych aminokwasów do tRNA pochodzących z kultur *E. coli* normalnych lub poddanych głodowi metioninowemu (83, 102, 109, 135, 146). Przenoszące RNA gromadzone w *E. coli* WB6, wzrastających w nieobecności metioniny stanowią mieszaninę 1:1 normalnych i niemetylowanych tRNA. Wyjątek stanowi praca Shugarta i wsp. (124) wg której tRNA z *E. coli* hodowanych bez metioniny mają znacznie mniejszą zdolność przyłączania fenyloalaniny i histydyliny niż normalne tRNA, a metylacja *in vitro* prowadzi do wyrównania tych różnic. Te wyniki potwierdzono na wyodrębnionych frakcjach, zawierających wyłącznie normalne lub niemetylowane tRNA przyłączające fenyloalaninę (125). Sprzeczne z wynikami Shugarta dane otrzymali Biezenski i wsp. (10). Z ich pracy wynika, że jednorodne niemetylowane tRNA przyłącza fenyloalaninę w tym samym, lub w nieco większym stopniu niż normalne tRNA. Przyczyny tych rozbieżności nie są jasne.

Pewne różnice w zdolności rozpoznawania tRNA zależnie od obecności grup metylowych obserwowano przy badaniu aminoacylacji tRNA przez enzymy heterologiczne. Podczas gdy normalne tRNA *E. coli* acylowane jest przez syntetazę leucylową drożdży z wydajnością sięgającą 75% acylacji syntetazą *E. coli*, to tRNA z poddanych głodowi metioninowemu *E. coli* acylowane jest tylko w 36% (105).

Wpływ modyfikowanych zasad na funkcję przeniesienia aminokwasów z tRNA do miejsca syntezy białka badany był techniką wiązania acylowanych tRNA do rybosomów w obecności mRNA, co pozwala na sprawdzenie zdolności rozpoznania kodonu przez dany tRNA, jak też przez oznaczanie włączania aminokwasów z acylowanych tRNA do białek. Capra i wsp. (18, 110) stwierdzili, że leucylo-tRNA z *E. coli* poddanych głodzeniu metioninowemu wiąże się z rybosomami w obecności poli UG (4:1) z wydajnością około 2-krotnie mniejszą, niż normalne leucylo-tRNA. W obecności poli UC (3:1) wydajność wiązania obydwu rodzajów leucylo-tRNA jest jednakowa. Po rozdzieleniu obu badanych rodzajów leucylo-tRNA na 4-ry frakcje, oddzielnie sprawdzano własności każdej z nich, oraz wpływ jaki wywiera metylacja *in vitro* na frakcje zawierające niemetylowane tRNA (19). Wykazano, że metylacja przywracała obraz elucji właściwy dla normalnych tRNA, a niektóre frakcje wykazujące zdolność wiązania do rybosomów wyłącznie w obecności poli UC, po metylacji zyskiwały zdolność wiązania w obecności poli UG. Autorzy wnioskujeją, że te rodzaje leucylo-tRNA, które normalnie wiążą się z poli UG, gdy nie są metylowane wiążą się z poli UC (19). Mechanizm tych zmian jest trudny do wytłumaczenia. Jak dotychczas ani hipoteza tolerancji (23), ani zmiany w kompleksowaniu wynikające z modyfikacji zasad, przy założeniu że zasada metylowana występuje w antykodonie (66), nie tłumaczą tego

rodzaju zmian w tworzeniu wiązań wodorowych, potrzebnych przy rozpoznaniu kodon — antykodon.

Podobne badania przeprowadzono dla fenyloalanilo-tRNA. Początkowe doniesienia o różnicach w wiązaniu do rybosomów w obecności poli U, w stosunku do poli UC, zależnie od obecności grup metylowych w fenyloalanilo-tRNA (84, 118), zostały odwołane. Obserwowane zmiany we właściwościach kodowania były wynikiem zanieczyszczenia metylowaną albuminą pochodzącą z kolumny używanej do frakcjonowania tRNA (138). Jedyną zauważalną różnicę stanowiła mniejsza wydajność wiązania z rybosomami niemetylowanych, niż normalnych tRNA.

Badania *in vitro* nad wbudowywaniem aminokwasu z tRNA do osłonki faga f2 (32), polifenyloalaniny (83), czy hemoglobiny (138) nie wykazały żadnych różnic gdy do reakcji stosowano normalne lub niemetylowane acylo-tRNA.

Mniejszą wydajność wiązania z rybosomami niemetylowanych, niż normalnych fenyloalanilo-tRNA, przypisuje się brakowi grupy metylowej w przylegającym do antykodonu nukleozydzie — 2-tiometylo-N⁶(Δ^2 -izopentenylo)-adenozynie (138). Wpływ modyfikacji przylegającej do antykodonu adenozyne na wiązanie tRNA z rybosomami jasno przedstawili Gefter i Russel (39). Wyizolowali oni trzy gatunki su⁺ tyrozylo-tRNA, w których reszta adenozyne przylegająca do antykodonu różniła się stopniem modyfikacji. Gatunek I — zawierał adenozyne, II — N⁶(Δ^2 -izopentenylo)-adenozynie, III — 2-tiometylo-N⁶(Δ^2 -izopentenylo)-adenozynie. Zarówno zdolność stymulacji syntezy białka *in vitro*, jak i wydajność wiązania z rybosomami była najwyższa w gatunku III w pełni modyfikowanym, gatunek II wykazywał połowę aktywności, a gatunek I — zawierający adenozyne — około 15% aktywności.

Badania rozpowszechnienia N⁶(Δ^2 -izopentenylo)-adenozyny w tRNA wykazały, że nukleozyd ten występuje w tych tRNA dla których pierwszą zasadę kodonu stanowi U. Obecność tego nukleozydu stwierdzono w tRNA przenoszącym tyrozyne, leucyne, tryptofan, cysteine i seryne (2, 103, 108). Przypuszcza się, że łańcuch boczny przylegającej do antykodonu modyfikowanej adenozyne poprzez wprowadzenie zmian w konformacji ułatwia rozpoznanie, czy współdziałanie kodon — antykodon dla trypletów zaczynających się na U. Podobną rolę przy rozpoznawaniu kodonu którego pierwszą literę stanowi A, proponowano dla 6-karbamoilo-treonino-puryny (65).

Obecność modyfikowanej zasady przylegającej do antykodonu nie zawsze jest koniecznym warunkiem prawidłowego działania tRNA. Np. mimo że w *E. coli* nukleozydem przylegającym do antykodonu w tRNA przenoszącym ulegającą formylacji metioninę jest adenina, a w drożdżach modyfikowana adenina (prawdopodobnie 6-karbamoilo-treonino-puryna), obydwa te rodzaje tRNA mają jednakowe właściwości kodowania i niezdolność włączania metioniny w wiązania wewnątrzpeptydowe (117).

Jednym ze sposobów sprawdzania roli rzadkich zasad w tRNA jest ich modyfikacja chemiczna i następnie sprawdzenie funkcji tRNA. Z wielu badań wynika, że funkcja tRNA jest ściśle związana z trójwymiarową strukturą, której naruszenie może powodować denaturację (35, 37, 79, 98, 99). Interpretacja wyników chemicznego działania ze względu na nieprzewidziane reakcje uboczne wymaga więc szczególnej ostrożności. Jak stwierdzono utlenienie jodem 2-metylotio- N^6 -(Δ^2 -izopentenylo)-adenozyny przylegającej do antykodonu w serylo-tRNA nie zmienia zdolności przyłączania tego aminokwasu, ale hamuje zdolność wiązania z rybosomami w obecności poli UC (29). Zdolności przyłączania aminokwasu nie zmienia wytworzenie dwusiarkowych połączeń między dwoma resztami tiouracylu występującymi w tyrozylo-tRNA (80). Zmian w zdolności wiązania aminokwasu i w syntezie białka nie powoduje również redukcja tiouracylu do uracylu w tRNA przenoszących tyrozynę i formylowaną metioninę (159). Usunięcie w pH 2,9 zasady Y (prawdopodobnie modyfikowana adenina) przylegającej do antykodonu fenyloalanilo-tRNA z drożdży znosi zdolność wiązania z rybosomami w obecności poli U (147, 148). Według ostatnich badań jest to wynik zmian w zdolności kodowania (40). Fenyloalanilo-tRNA bez zasady Y nie rozpoznaje kodonu UUU, ale w dalszym ciągu może rozpoznawać kodon UUC. Kodon UUU może być rozpoznany tylko przy wyższym stężeniu Mg^{2+} , lub w obecności streptomycyny.

Badania zależności odwrotnej, tzn. wpływu jaki na funkcje tRNA wywiera wprowadzenie dodatkowych grup metylowych wykazały, że metylacja chemiczna tRNA powoduje (z wyjątkiem cysteiny) znaczne zmniejszenie zdolności przyłączania kilku badanych aminokwasów (113, 165) i osłabienie syntezy białka (59). Natomiast metylacja enzymatyczna do 1-metyloadenozyny adenozyny występującej w pętli pseudouracylu serylo-tRNA drożdży, nie powoduje żadnych zmian w zdolności przyłączania aminokwasu (7).

Najjaskrawszym przykładem ścisłego związku funkcji tRNA z jego trójwymiarową strukturą jest zdolność syntetazy waliny *E. coli* do acylacji tRNA izolowanego z drożdży, mimo że skład nukleotydów walilo-tRNA z *E. coli* i drożdży jest zupełnie różny (58); porównaj e i f na schemacie 1.

Prawdopodobnie rola modyfikowanych zasad polega na ułatwieniu utrzymania odpowiedniej struktury tRNA, a ich znaczenie w głównej mierze zależy będzie od tego w jakim miejscu cząsteczki one występują. W niedalekiej przyszłości, dzięki nowemu osiągnięciu w biochemii — syntezie genu dla alanilo-tRNA (1), możliwe będzie zbudowanie tRNA całkowicie pozbawionego modyfikowanych zasad i po kolejnej, stopniowej modyfikacji, zbadanie wpływu wszystkich rzadkich zasad występujących w tym typie tRNA na jego funkcje.

Praca niniejsza została przygotowana na *University of Colorado, Medical Center, Department of Microbiology*. Za umożliwienie jej wykonania kierownikowi Zakładu Prof. dr. E. Borek'owi składam serdeczne podziękowania.

LITERATURA

1. Agarwal K. L., Büchi H., Caruthers M. H., Gupta N., Khorana H. G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U. L., Van de Sande J. H., Sgaragmella V., Weber H., Yamada T., *Nature* **227**, 27 (1970).
2. Armstrong D. J., Burrows W. J., Skoog F., Ray K. L., Söll D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **63**, 834 (1969).
3. Baev A. A., Venkstern T. V., Mirzabekov A. D., Krutilina A. L., Li L., Axelrod V. D., *Mol. Biol.* **1**, 754 (1967).
4. Baguley B. C., Staehelin M., *Biochemistry* **7**, 45 (1968).
5. Baguley B. C., Staehelin M., *European J. Biochem.* **6**, 1 (1968).
6. Baguley B. C., Staehelin M., *Biochemistry* **8**, 257 (1969).
7. Baguley B. C., Wehrli W., Staehelin M., *Biochemistry* **9**, 1645 (1970).
8. Baliga B. S., Srinivasan P. R., Borek E., *Nature* **208**, 555 (1965).
9. Bergquist P. L., Mathews R. E. F., *Biochem. J.* **85**, 305 (1962).
10. Biezunski N., Givon D., Littauer U. Z., *Biochim. Biophys. Acta* **199**, 382 (1970).
11. Biswas B. B., Edmonds M., Abrams R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 146 (1961).
12. Björk G. R., Svensson J., *European J. Biochem.* **9**, 207 (1969).
13. Boezi J. A., Armstrong R. L., De Backer M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 382 (1967).
14. Borek E. w Exploitable Molecular Mechanisms and Neoplasia, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1969, str. 163.
15. Borek E., Srivivasan R. S., w Transmethylation and Methionine Biosynthesis, red. S. H. Shapiro i F. Schlenk, University of Chicago Press, Chicago-Illinois 1965, str. 9.
16. Brown G. M., Attardi G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 298 (1965).
17. Burdon R. H., *Nature* **210**, 797 (1966).
18. Capra J. D., Peterkofsky A., *J. Mol. Biol.* **21**, 455 (1966).
19. Capra J. D., Peterkofsky A., *J. Mol. Biol.* **33**, 591 (1968).
20. Christman J., Borek E., *Federation Proc.* **26**, Nr 3426 (1967).
21. Comb D. G., Katz S., *J. Mol. Biol.* **8**, 790 (1964).
22. Cradock V. M., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 351 (1969).
23. Crick F. H. C., *J. Mol. Biol.* **19**, 548 (1966).
24. Culp L. A., Brown G. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 483 (1968).
25. Daniel V., Sarid S., Littauer U. Z., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 1403 (1968).
26. Dingman G. W., Aronow A., Burtin S. L., Peacock A. C., O'Malley B. W., *Biochemistry* **8**, 489 (1969).
27. Dudock B. S., Katz G., Taylor E. K., Holley R. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **62**, 941 (1969).
28. Elicieri G. L., *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 387 (1970).
29. Fitler F., Hall R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 441 (1966).
30. Fitler F., Kline L. K., Hall R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 571 (1968).
31. Fitler F., Kline L. K., Hall R. H., *Biochemistry* **7**, 940 (1968).
32. Fleissner E., *Biochemistry* **6**, 621 (1967).
33. Fleissner E., Borek E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1199 (1962).
34. Fleissner E., Borek E., *Biochemistry* **2**, 1093 (1963).
35. Fresco J. R., Adams A., Ascione R., Henley D., Lindahl T., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 527 (1966).

36. Gantt R., Evans V. J., *Cancer Res.* **29**, 536 (1969).
37. Garland W. J., Sueoka N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 948 (1966).
38. Geffter M. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 435 (1969).
39. Geffter M. L., Russel R. L., *J. Mol. Biol.* **39**, 145 (1969).
40. Ghosh K., Ghosh H. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **40**, 135 (1970).
41. Gold M., Hausmann R. H., Maitra U., Hurwitz J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 292 (1964).
42. Gold M., Hurwitz J., Anders M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 107 (1963).
43. Gold M., Hurwitz J., Anders M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 164 (1963).
44. Goldwasser E., Henrikson R. L., w *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, red. J. N. Davidson i W. E. Cohn, Academic Press Inc., New York 1966, tom 5, str. 399.
45. Goodman H. M., Abelson J. N., Landy A., Zadrazil S., *European J. Biochem.* **13**, 461 (1970).
46. Grado C., Friendlender B., Ihl M., Contreras G., *Virology* **35**, 339 (1968).
47. Hacker B., *Biochim. Biophys. Acta* **186**, 214 (1969).
48. Hacker B., Mandel L. R., *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 38 (1969).
49. Hall R. H., *Biochemistry* **3**, 876 (1964).
50. Hall R. H., *Biochemistry* **4**, 661 (1965).
51. Hall R. H., w *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Academic Press Inc., red. J. N. Davidson i W. E. Cohn New York 1970, tom 9, str. 57.
52. Hall R. H., Mittelman A., Horoszewicz J., Grace J. T., Jr., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **143**, 799 (1967).
53. Hancock R. L., *Cancer Res.* **27**, 646 (1967).
54. Hancock R. L., *Can. J. Biochem.* **45**, 1513 (1967).
55. Hancock R. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 77 (1968).
56. Hancock R. L., *Cancer Res.* **28**, 1223 (1968).
57. Hancock R. L., McFarland P., Fox R. R., *Experientia* **23**, 806 (1967).
58. Harada F., Kimura F., Nishimura S., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 590 (1969).
59. Hay J., Pillinger D. J., Borek E., *Biochem. J.* **119**, 587 (1970).
60. Hayashi H., Fisher H., Söll D., *Biochemistry* **8**, 3680 (1969).
61. Hayward R. S., Elicieri G. L., Weiss S. B., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 459 (1966).
62. Hayward S., Weiss S. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1161 (1966).
63. Hurwitz J., Gold M., Anders M., *J. Biol. Chem.* **239**, 3462 (1964).
64. Hurwitz J., Gold M., Anders M., *J. Biol. Chem.* **239**, 3474 (1964).
65. Ishikura H., Yamada Y., Marao K., Saneoyoshi M., Nishimura S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 990 (1969).
66. Janion C., *Post. Biochem.* **15**, 591 (1969).
67. Johnson L., Hayashi H., Söll D., *Biochemistry* **14**, 2823 (1970).
68. Kano-Sueoka T., Sueoka N., *J. Mol. Biol.* **37**, 475 (1968).
69. Kaye A. M., Leboy P. S., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 289 (1968).
70. Kerr S. J., *Biochemistry* **9**, 690 (1970).
71. Kerr S. J., informacja ustna.
72. Kit S., Nakajima K., Dubbs D. R., *Cancer Res.* **30**, 528 (1970).
73. Kjellin-Stråby K., Boman H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 1346 (1965).
74. Kjellin-Stråby K., Phillips J. H., *J. Bacteriology* **96**, 760 (1968).

75. Kjellin-Stråby K., Phillips J. H., *J. Bacteriology* **100**, 679 (1969).
76. Kline L. K., Fittler F., Hall R. H., *Biochemistry* **8**, 4361 (1969).
77. Kuchino Y., Nishimura S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **40**, 306 (1970).
78. Leboy P. S., *Biochemistry* **9**, 1577 (1970).
79. Lindhal T., Adams A., Fresco J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. S.* **55**, 941 (1966).
80. Lipsett M. N., Doctor B. P., *Federation Proc.* **26**, pozycja Nr 1855 (1967).
81. Lipsett M. N., Peterkofsky A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. S.* **55**, 1169 (1966).
82. Lipshitz-Wiesner R., Srinivasan P. R., Borek E., *Federation Proc.* **29**, pozycja Nr 1262 (1970).
83. Littauer U. Z., Muench K., Berg P., Gilbert W., Spahr P. F., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 157 (1963).
84. Littauer U. Z., Revel M., Stern R., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 501 (1966).
85. McFarlane E. S., *Can. J. Microbiol.* **15**, 189 (1969).
86. McFarlane E. S., Shaw G. J., *Can. J. Microbiol.* **14**, 499 (1968).
87. Madison J. T., Everett G. A., Kung H., *Science* **153**, 531 (1966).
88. Madison J. T., Kung H. K., *J. Biol. Chem.* **242**, 1324 (1967).
89. Magee P. N., Farber E., *Biochem. J.* **83**, 114 (1962).
90. Mandel L. R., Borek E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 14 (1961).
91. Mandel L. R., Borek E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 138 (1961).
92. Mandel L. R., Borek E., *Biochemistry* **2**, 555 (1963).
93. Mandel L. R., Borek E., Fleissner E., *Federation Proc.* **21**, 379 (1962).
94. Mandel L. R., Hacker B., Maag T. A., *Cancer Res.* **29**, 2229 (1969).
95. Mittelman A., Bonney R., Hall R. H., Grace J. T., Jr. *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 242 (1969).
96. Mittelman A., Hall R. H., Yohn D. S., Grace J. T., Jr. *Cancer Res.* **27**, 1409 (1967).
97. Morisawa S., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 147 (1963).
98. Muenich K. H., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 539 (1966).
99. Muenich K. H., *Biochemistry* **8**, 4872 (1969).
100. Munns T., Katzman A., *Federation Proc.* **29**, poz. Nr 1261 (1970).
101. Murao K., Saneyoshi M., Harada F., Nishimura S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 657 (1970).
102. Neidhart F. C., Eidilic L., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 380 (1963).
103. Nishimura S., Yamada Y., Ishikura H., *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 520 (1969).
104. O'Malley B. W., Aronow A., Peacock A. C., Dingman G. W., *Science* **162**, 567 (1968).
105. Peterkofsky A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. S.* **52**, 1233 (1964).
106. Peterkofsky A., w dyskusji nad pracą Hayward R. S., Elicieri G. L., Weiss S. B., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 459 (1966).
107. Peterkofsky A., *Biochemistry* **7**, 940 (1968).
108. Peterkofsky A., Jasensky C., *Biochemistry* **8**, 3799 (1969).
109. Peterkofsky A., Jasensky C., Bank A., Mehler A. H., *J. Biol. Chem.* **239**, 2918 (1964).
110. Peterkofsky A., Jasensky C., Capra J. D., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 515 (1966).
111. Peterkofsky A., Lipsett M. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 780 (1965).
112. Pillinger D. J., Borek E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. S.* **62**, 1145 (1969).
113. Pillinger D. J., Hay J., Borek E., *Biochem. J.* **114**, 429 (1969).

114. Phillips J. H., *J. Bacterial.* **100**, 695 (1969).
115. Phillips J. H., Kjellin-Straby K., *J. Mol. Biol.* **26**, 509 (1967).
116. RajBhandary U. L., Chang S. H., Stuart A., Faulkner R. D., Hoskinson R. M., Khorana H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 751 (1967).
117. RajBhandary U. L., Kumar A., *J. Mol. Biol.* **50**, 707 (1970).
118. Revel M., Littauer U. Z., *J. Mol. Biol.* **15**, 389 (1966).
119. Rodeh R., Feldman M., Littauer U. Z., *Biochemistry* **6**, 451 (1967).
120. Rogg H., Staehelin M., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 16 (1969).
121. Sarid V. P., Littauer U. Z., *Science* **167**, 1682 (1970).
122. Sharma O. K., Borek E., *Biochemistry* **9**, 2507 (1970).
123. Sharma O. K., Borek E., *J. Bacteriol.* **101**, 705 (1970).
124. Shugart L., Chastain G., Novelli G. G., Stulberg M. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 404 (1968).
125. Shugart Ł., Novelli G. D., Stulberg M. P., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 83 (1968).
126. Silber R., Berman E., Goldstein B., Stein H., Farnham G., Bertino J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 638 (1967).
127. Silber R., Goldstein B., Benman E., Dester J., Friend C., *Cancer Res.* **22**, 1264 (1967).
128. Simon L. N., Glasky A. J., Rejal T. H., *Biochim. Biophys. Acta* **142**, 99 (1967).
129. Smith D. W. E., Russel N. L., *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 171 (1970).
130. Srinivasan P. R., Borek E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 529 (1963).
131. Srinivasan P. R., Borek E., *Biochemistry* **3**, 616 (1964).
132. Srinivasan P. R., Borek E., *Science* **145**, 548 (1964).
133. Srinivasan P. R., Borek E., w *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, red. J. N. Davidson i W. E. Cohn, Academic Press Inc., New York 1966, tom 5 str. 157.
134. Staehelin M., Rogg H., Baguley B. C., Grinsberg T., Wehrli W., *Nature* **219**, 1363 (1968).
135. Starr J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 181 (1963).
136. Starr J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 428 (1963).
137. Stent G. S., Brenner S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 2005 (1961).
138. Stern R., Gonano F., Fleissner E., Littauer U. Z., *Biochemistry* **9**, 10 (1969).
139. Stewart M. J., Corrance M. H., *Cancer Res.* **29**, 1642 (1969).
140. Streeter D. G., Lane B. G., *Biochim. Biophys. Acta* **199**, 394 (1970).
141. Sueoka N., Kano-Sueoka T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 1535 (1964).
142. Sueoka N., Kano-Sueoka T., w *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, red. J. N. Davidson i W. E. Cohn, Academic Press Inc. New York 1970, tom 9, str. 23.
143. Sueoka N., Kano-Sueoka T., Gartland W. J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **31**, 571 (1966).
144. Svensson I., Björk W., Johansson K. E., Johansson A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 216 (1968).
145. Svensson I., Björk G. R., Lundahl P., *European J. Biochem.* **9**, 216 (1969).
146. Svensson I., Boman H. G., Eriksson K. G., Kjellin K., *J. Mol. Biol.* **7**, 254 (1963).
147. Thiebe R., Zachau H. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 260 (1968).
148. Thiebe R., Zachau H. G., *European J. Biochem.*, **5**, 546 (1968).

149. Tsutsui E., Srinivasan P. R., Borek E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1003 (1966).
150. Turkington R. W., *J. Biol. Chem.* **244**, 5140 (1969).
151. Turkington R. W., Riddle M., *Cancer Res.* **30**, 650 (1970).
152. Vande Woude G. F., Arlinghaus R. B., Polatnick J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 483 (1967).
153. Viale G. L., Fondelli A., Restelli A. F., Viale E., *Riv. Neurobiol.* **14**, 311 (1968).
154. Viale G. L., Restelli A. F., Viale E., *Tumori* **53**, 533 (1967).
155. Wainfan E., *Virology* **35**, 282 (1968).
156. Wainfan E., Srinivasan P. R., Borek E., *Biochemistry* **4**, 2845 (1965).
157. Wainfan E., Srinivasan P. R., Borek E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 525 (1966).
158. Wainfan E., Srinivasan P. R., Borek E., *J. Mol. Biol.* **22**, 348 (1966).
159. Walker R. T., RajBhandary U. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 907 (1970).
160. Waters L. C., Novelli G. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 979 (1967).
161. Weiss S. B., Hsu W. T., Foft J. W., Scherberg N. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 114 (1968).
162. Wells C., Moore B. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 409 (1970).
163. Yaniv M., Barrel B. G., *Nature* **222**, 278 (1969).
164. Zachau H. G., Düting D., Feldmann H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **347**, 212 (1966).
165. Zakharyan R. A., Venkstein T. V., Baev A. A., *Biokhimiya* **32**, 1068 (1967).
166. Zeleznick L. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 133 (1966).

RECENZJE

Ergebnisse der exp. Medizin, t. 2, Beitrage der Molekulargenetik wyd. Volk u. Gesundheit, Berlin, 1970, str. 76, 14 rys., 5 tabl.

Omawiany tom obejmuje 13 referatów wygłoszonych na sekcji genetyki molekularnej podczas I-ej Konferencji Niemieckiego Towarzystwa Medycyny Eksperymentalnej w Lipsku, w 1968 roku.

Tom otwiera referat przeglądowy pt. „Chromosomy gruczołów ślinowych jako modelowe obiekty badań genetyczno molekularnych u eukariotów”. (R. Panitz, Gatersleben). Praca dotyczy chromosomów (głównie u *Chironomidae*), będących zarówno pod względem morfologii jak i funkcji szczególnym stanem chromosomów interfazalnych. Obserwując w tych chromosomach aktywność genu przy pomocy mikroskopu optycznego, można badać jednocześnie jego działanie na poziomie molekularnym. Autor omawia strukturę i replikację DNA, funkcyjne znaczenie puffów, genetyczną strukturę chromomerów oraz regulację syntezy RNA. Dalsze referaty przedstawiają wyniki prac doświadczalnych. E. Serfling (Gatersleben) omówił indukowanie puffów w chromosomach śliniankowych *Chironomus* przy użyciu m.in. antybiotyków. Powodują one u *Chironomus* wytwarzanie dużych puffów bogatych w białka, przy czym białka te powstają na 20 godzin przed ujawnieniem się puffów.

W. Baudisch (Gatersleben) przedstawił biochemiczne różnice w gruczołach ślinowych *Acricotopus lucidus* wykazując, że 3 płyty z których składają się te gruczoły różnią się układem puffów, a gibberellina o której wiadomo, że hamuje powstawanie puffów blokuje syntezę hydroksyproliny.

U. Wobus (Gatersleben) badając zależność pomiędzy zróżnicowaniem chromosomów a układem białek u *Chironomidae* stwierdził m.innymi, że szczep *Acricotopus lucidus* z modyfikacją strukturalną w I-ym chromosomie wykazywał różnice w układzie prążków białek z hemolimfy w porównaniu z osobnikami normalnymi.

Badania nad genetycznymi aspektami reperacji zmian w DNA przedstawił H. Böhm (Gatersleben). Izolując defektywne pod względem zdolności do reperacji mutanty *Proteus mirabilis* obok typowych mutantów hcr⁻ znaleziono też mutanty wykazujące zwiększoną wrażliwość na monofunkcyjne związki alkilujące i jednocześnie na inaktywację fotodynamiczną. Te ostatnie wykazują też zaburzenia w procesie rekombinacji. Duża grupa mutantów wrażliwych na UV wykazuje znaczne zwiększenie częstości mutacji spontanicznych.

W. Witte (Gatersleben) stosując u *Proteus mirabilis* działanie ultrafioletem oraz alkilację przy pomocy HN-2 stwierdził, że kofeina hamuje reperację uszkodzeń.

B. Adler (Gatersleben) przedstawił dane, że obecność czynnika przenoszącego odporność (R-222) u mutantów *P. mirabilis* MUT, HCR i REC nie kompensuje efektu mutacji genów reperacji ale zaburzenia w reperacji wpływają na stabilność tego czynnika. Ulega on eliminacji w całości lub w części dając typy segregacyjne.

Integrację epizomu F indukowaną chemicznie lub przez UV u mutantów *E. coli* defektywnych pod względem wycinania dimerów omówił H. Malke (Jena).

E. Geiszler, S. Scherneck i M. Theile (Rostock) przedstawili hipot-

tezę na temat mechanizmu inaktywacji represorów fagowych indukującej lizogeniczność u bakterii. Wg tej hipotezy represory reagują z tymi fragmentami jednoliniowego DNA wycinanymi lub syntetyzowanymi podczas reoperacji, których układ zasad odpowiada sekwencji jednego z operatorów faga. Dopóki ten proces trwa, możliwa jest fotoreaktywacja. Czynniki, które nie wywołują uszkodzeń reperowanych przez wycinanie, słabo lub wcale nie indukują lizogeniczności.

S. Bleecken (Jena) zaprezentował model organizacji i replikacji chromosomu bakterii *in vivo*.

H. A. Rosenthal, D. Scholz i S. Hansen (Berlin) zbadali zachodzące pod wpływem UV zmiany w zdolności komórek *E. coli* do reprodukcji fagów RNA dochodząc do wniosku, że przy reprodukcji tych fagów współdziałają białka kodowane przez komórkę gospodarza.

J. Hofmeister (Gatersleben) podał charakterystykę odporności na tetracyklinę czynnika R i szczepów *P. mirabilis* chromosomowo odpornych na tetracyklinę.

H. Erler i H. Schlechte (Rostock) przedstawili kryteria prawdziwej i pseudo-lizogenii u *Bacillus subtilis*.

A. Makarewicz

Towaroznawstwo Produktów Spożywczych

Praca zbiorowa pod redakcją Aleksandra Lemпки. Państwowe Wydawnictwo Ekonomiczne, Warszawa, 1970, str. 1186, cena 136.— zł

Rozwój problematyki żywnościowej wiąże się ściśle z rozwojem podstawowych gałęzi wiedzy przyrodniczej, tj. z chemią i biochemią, z fizykochemią i analityką chemiczną, z fizjologią, mikrobiologią, higieną i toksykologią, a także z innymi pokrewnymi naukami. Problematyka ta obejmuje zarówno produkcję surowców i technologię gotowych artykułów żywnościowych jak i ocenę ich przydatności, wartości odżywczej, trwałości oraz ocenę warunków ich przechowywania, opakowania i magazynowania. Szczególnie rozwój biochemii nie pozostał bez wpływu na stan wiedzy o środkach spożywczych. Kontrolowane przemiany biochemiczne stanowią podstawę dla produkcji i przechowywania żywności i przyczyniają się do poznania struktury i właściwości związków wykorzystywanych w żywieniu.

W recenzowanym podręczniku aspekt biochemiczny i chemiczny wysunięto na plan pierwszy, co uzasadnia polecenie tej książki także chemikom, biochemikom i biologom zajmującym się naturalnymi produktami nie tylko z punktu widzenia żywienia. Całokształt zagadnień dotyczących produktów żywnościowych ujęto w 15 rozdziałach, uzupełnionych 20-stronicowym alfabetycznym spisem hasel rzeczowych. Chemizmowi oraz przemianom chemicznym i biochemicznym produktów spożywczych poświęcono dwa pierwsze rozdziały (225 stron), trzeci natomiast stanowi przegląd metod badawczych (51 stron). Rozdział ten oprócz fizykochemicznych metod analitycznych obejmuje też dział badań sensorycznych produktów żywnościowych wraz z próbami zastosowania metod fizykochemicznych do ostatecznej wyceny doznań zmysłowych.

Dalsze 12 rozdziałów w podręczniku poświęcono poszczególnym produktom żywnościowym (879 stron), z uwzględnieniem wybranych zagadnień normalizacji, przechowywania, transportu i opakowania. Ponadto w szerokim zakresie omówiono wpływ procesów technologicznych na jakość i trwałość produktów spożywczych oraz podano normy jakościowe i dane dotyczące wahań w asortymentach. Na końcu każ-

dego rozdziału wymienione jest piśmiennictwo zarówno monograficzne jak i źródłowe. Szczegółowo opracowane zostały: zboże i produkty zbożowe, owoce i warzywa, cukier, skrobia i produkty hydrolizy skrobi, produkty cukiernicze, wyroby przemysłu fermentacyjnego, mięso i produkty mięsne, ryby i produkty rybne, mleko i produkty mleczne, jaja i produkty jajczarskie, tłuszcze jadalne, używki i przyprawy oraz koncentraty spożywcze. Niektóre z wymienionych opracowań nie mają żadnego odpowiednika w literaturze polskiej, brak np., o ile mi wiadomo, monografii z dziedziny koncentratów spożywczych oraz używek i przypraw, a istniejące w języku polskim podręczniki i opracowania np. z dziedziny owoców i warzyw lub przetworów mięsnych mają charakter raczej technologiczny a nie towaroznawczy.

Układ i treść poszczególnych rozdziałów oparte zostały o najnowszą literaturę monograficzną a także często o materiały z własnych prac doświadczalnych autorów. Każdy bowiem z współautorów podręcznika przygotowany był przez wieloletnią działalność dydaktyczną w dziedzinie towaroznawstwa oraz przez działalność badawczą w wybranej dziedzinie związków występujących w produktach spożywczych (np. enzymy, witaminy itp.). Dobre przygotowanie fachowe zespołu autorów oraz kierownictwo prof. dr Lempki doprowadziło do wydania dzieła o dużej wartości i oryginalnym ujęciu zagadnień, mimo istnienia możliwości powtórzeń i wzorowania się na innych tego typu podręcznikach zagranicznych. Obszerny materiał został w podręczniku opracowany w miarę możliwości jednolicie pod względem układu treści i formy. Jest to także niewątpliwa zasługa redaktora podręcznika.

Szeroki zakres materiału, obejmujący wszystkie główne produkty żywnościowe rozszerza w wybitny sposób krąg odbiorców niniejszego podręcznika. Przygotowany został dla studiującej młodzieży kierunku towaroznawstwa w Wyższych Szkołach Ekonomicznych oraz dla wykładowców i nauczycieli tego przedmiotu i pracowników placówek i instytutów zajmujących się problemami żywienia i jakości produktów spożywczych, jako pierwsze tego rodzaju opracowanie w piśmiennictwie polskim. Niewątpliwie jednak zostanie życzliwie przyjęty także przez wszystkich zainteresowanych chemizmem, produkcją i technologią naturalnych związków organicznych.

A. Smockiewiczowa

SPRAWOZDANIA

Kurs FEBS w Hintermoos (Austria) poświęcony transkrypcji genu

W dniach 4—10 marca 1971 w Hintermoos koło Salzburga (Austria) odbył się kurs poświęcony transkrypcji genu, zorganizowany przez Federację Europejskich Towarzystw Biochemicznych. Wzięli w nim udział biochemicy z Europy, Stanów Zjednoczonych i Azji. Tematem wykładów prowadzonych przez tak znakomitych uczonych, jak E. K. Bautz, W. Gilbert, K. Scherrer i wielu innych, był proces transkrypcji DNA, mechanizmy, które go regulują oraz warunkujące go enzymy.

W. Zillig z Monachium przedstawił aktualny stan badań nad strukturą i funkcją bakteryjnej polimerazy RNA zależnej od DNA. Z otrzymanych specjalnymi metodami natywnych podjednostek, odpowiednio łącząc je, można uzyskać aktywne białko enzymatyczne. Następnie przedyskutował funkcję polimerazy RNA i jej podjednostek w poszczególnych etapach złożonego procesu transkrypcji genu i jego inicjacji. Przedstawił zmiany, jakim podlega polimeraza RNA u bakterii po zakażeniu ich bakteriofagiem T₄. Pierwsza, nazwana *alteration*, nie wymaga syntezy białka i jest wywołana samą obecnością faga w komórce. Następne, zwane wspólnie *modification*, powodują zmiany we wszystkich podjednostkach enzymu, wymagają syntezy białka i mogą być zależne od genu fagowego.

Zapoczątkowanie reakcji katalizowanej przez polimerazę RNA i rola antybiotyku rifampicyny w blokowaniu tego procesu była przedmiotem wykładu G. Hartmanna z Wurzburga. Warunkiem działania polimerazy jest jej połączenie się z matrycą DNA, przy czym proces ten nie wymaga obecności substratu. Po całkowitej asocjacji enzymu z matrycą kompleks ten staje się odporny na działanie rifampicyny. Czynniki zapoczątkowujący σ jest bezpośrednio związany z powstawaniem kompleksu polimerazy RNA z DNA i jego działanie polega prawdopodobnie na katalizowaniu połączenia polimerazy RNA ze specyficznymi miejscami na DNA.

Określoną wielkość kwasu rybonukleinowego, syntetyzowanego na matrycy DNA, warunkuje nie tylko czynnik zapoczątkowujący syntezę, ale chyba jeszcze w większym stopniu czynnik, który warunkuje ukończenie jej w ściśle określonym miejscu. Zagadnieniem tym zajął się Roberts z Cambridge, który przedstawił, w jaki sposób następuje ukończenie syntezy RNA i dokładnie omówił znaczenie wykrytego przez siebie czynnika w tym procesie.

J. J. Dunn z Heidelberga porównał właściwości polimeraz fagów T₃ i T₇ z polimerazą otrzymaną z *E. coli*. Polimerazy wspomnianych fagów są strukturalnie mniej złożone i ich zdolności w procesie transkrypcji znacznie ograniczone. Polimeraza faga może łączyć się z matrycą bez rozpoczynania syntezy RNA i dzięki temu może służyć jako model do wyjaśnienia struktury promotora.

Regulację transkrypcji faga T₄ omówił E. K. Bautz z Heidelbergu, przedstawiając swoje badania nad tym fagiem. DNA faga T₄ ma trzy czynnościowe różne miejsca promotorowe, co wskazuje na istnienie przynajmniej trzech odrębnie regulowanych genów w genomie faga T₄. Transkrypcja pierwszego znajduje się pod kontrolą czynnika, wykazującego zdolność inicjacji syntezy łańcucha polinukleotydowego, ale nie mającego wpływu na jego wydłużanie. Oczyszczono również częściowo dwa dodatkowe czynniki, mające wpływ na transkrypcję dwóch pozostałych genów.

W. Szybalski z Madison w obszernym wykładzie przedstawił regulację transkrypcji DNA bakteriofaga λ , który jest znakomitym modelem do badania tego procesu. Po infekcji komórki bakteryjnej fagiem, jego DNA nie jest całkowicie przepisywane przez polimerazę RNA gospodarza. Wybór odpowiedniego odcinka DNA do transkrypcji, a także przebieg tego procesu regulowane są przez szereg pozytywnych i negatywnych mechanizmów kontrolnych. U faga λ większość jednostek transkrypcji, które Szybalski nazwał skryptonami, ma bardziej złożoną budowę niż klasyczny operon. Przyjmuje się, że u tego faga są przynajmniej cztery skryptony: dwa przepisywane z nici L i dwa przepisywane z nici D. Większość mechanizmów kontrolujących transkrypcję DNA faga λ jest oparta na zasadzie interakcji między białkiem i DNA, i dzięki temu mogą one być modyfikowane przez mutacje odpowiednich genów.

J. Hindley z Bristolu przedstawił badania dotyczące struktury genomu faga QB, zbudowanego z pojedynczej nici polinukleotydu, składającej się z około 3500 nukleotydów. Zawiera ona cistrony dla białka otoczki, polimerazy RNA i dwóch innych białek wykrytych w cząsteczce wirusa. Określono dotychczas sekwencję 175 nukleotydów końcowego fragmentu 5', a obecnie trwają prace nad ustaleniem sekwencji następnych 150 nukleotydów. Dotychczasowe dane wskazują, że: koniec 5'-nukleotydu zaczyna się bardzo stabilną pętlą utrzymywaną za pomocą wiązań wodorowych, w obrębie pierwszych 62 nukleotydów nie znaleziono trypletów warunkujących specyficzną inicjację syntezy polipeptydu, na odcinku 300 nukleotydów, poczynając od końca 5'-nukleotydu, nie zidentyfikowano sekwencji niezbędnej do specyficznego zapoczątkowania syntezy białka otoczki faga.

E. Wintersberger z Wiednia przedstawił stan badań nad transkrypcją mitochondrialnego DNA. Obecnie powszechnie przyjmuje się, że w mitochondriach zachodzi biosynteza kwasów rybonukleinowych na matrycy DNA, w reakcji, która całkowicie hamowana jest aktynomycyną D. Mitochondria zawierają przynajmniej trzy rodzaje kwasu rybonukleinowego, w tym oba rodzaje rRNA oraz tRNA specyficzne dla mitochondriów. Stosując technikę hybrydizacji wykazano, że w syntezie mitochondrialnych kwasów rybonukleinowych wykorzystywane są odpowiednie odcinki obu łańcuchów DNA. Mitochondrialne polimerazy RNA, otrzymane z drożdży i *Neurospora crassa*, różnią się znacznie swoimi właściwościami, szczególnie w preferowaniu pewnych typów DNA w procesie transkrypcji, jak również wrażliwością w stosunku do antybiotyku rifampicyny.

P. Chambon ze Strasbourga omówił właściwości polimeraz otrzymanych z różnych tkanek zwierzęcych. W zależności od wrażliwości na amanitynę można podzielić polimerazy RNA na dwie grupy, oznaczone A i B, przy czym stosując elektroforezę na żelu poliakrylamidowym polimerazy z grupy B można rozdzielić na dwie podgrupy BI i BII. Polimeraza A występuje głównie w jąderku, natomiast polimeraza B w nukleoplazmie. Różnią się one wrażliwością na Mn^{2+} i Mg^{2+} . Oba typy polimeraz są niezdolne do syntezy RNA na matrycy DNA pochodzącego z faga.

K. Seifart z Marburga w swoim wykładzie omówił dalsze różnice między polimerazą A i B. Polimeraza A ma zdolność syntetyzowania RNA na natywnym DNA, podczas gdy polimeraza B wymaga jako matrycy zdenaturowanego DNA. Z wątroby szczura otrzymano za pomocą chromatografii na DEAE-celulozie, CM9-celulozie i *Sephadex G-200* frakcję białkową, która stymuluje działanie polimerazy B na matrycach natywnych DNA z różnych tkanek. Białko to natomiast nie ma wpływu na inne polimerazy, jak również nie wykazuje właściwości tego enzymu. Działa ono natychmiast po dodaniu do pełnego układu, bez okresu utajania. Mechanizm działania nie jest znany.

W. Gilbert z Bostonu i B. Muller Hill z Kolonii przedstawił swoje badania nad izolowaniem operatora operonu laktozy u *E. coli*, oraz nad represorem warunkującym funkcjonowanie tego operonu.

Poza znakomitymi wykładami i oficjalnymi, stojącymi na bardzo wysokim poziomie dyskusjami, w kularach szkoły toczyły się rozmowy w bardzo bezpośredniej atmosferze. Organizatorzy kursu dr, dr E. U. Wintersbergowie zadbali bowiem o to, aby zapewnić jak największą swobodę dyskusji. Dla uczestników kursu wynajęto wysokogórskie schronisko w Alpach i w godzinach przedpołudniowych odbywała się, prawie obowiązkowo, nauka jazdy na nartach, w czasie której na alpejskich stokach zjazdy narciarskie krzyżowały się z dyskusjami biochemicznymi.

Podsumowując, należy jeszcze raz podkreślić znakomitą organizację kursu, bardzo dobry dobór wykładów, które może nie przedstawiały najnowszych osiągnięć, jeszcze nieopublikowanych, ale dawały ogólny przegląd dotychczasowych badań nad tak istotnym problemem dla biologii molekularnej, jakim jest struktura i funkcja genu.

M. Ombach

II Międzynarodowy Kongres Badań nad Fotosyntezą Stresa, 24—29 czerwca 1971 r

W dniach 24—29 czerwca 1971 r odbył się w Stresa (Włochy) II Międzynarodowy Kongres Badań nad Fotosyntezą. Organizatorem Kongresu, któremu patronowali Consiglio Nazionale delle Ricerche (Włochy) i Istituto Lombardo do Scienze e Lettere w Mediolanie, był profesor Giorgio Forti z Instytutu Botaniki Uniwersytetu w Neapolu. W Kongresie wzięło udział około 600 uczestników.

Obrady Kongresu, trwającego 6 dni, składały się z sesji przedpołudniowych, poświęconych na 2 referaty plenarne (po 40 min) oraz 4—5 uzupełniających referatów (20—30 min) przedstawianych przez zaproszonych dyskutantów. Sesje popołudniowe były przeznaczone w zasadzie na 15 minutowe komunikaty, których wygłoszono około 300.

Problematykę badań nad fotosyntezą podzielono na następujące grupy tematyczne:

1. Fotochemia i pierwotne reakcje fotosyntezy — referaty L. N. M. Duysensa i A. Trebsta,
2. Fotosyntetyczny transport elektronów — referaty G. Husaka i A. San Pietro,
3. Transport jonów a fotofosforylacja — referaty M. Avrona i A. P. G. Croftsa,
4. Fotosyntetyczna asymilacja dwutlenku węgla — mechanizmy regulacji. Referaty plenarne J. A. Basshama i M. Gibbsa,
5. Biosyntezy katalizowane przez aparat fotosyntetyczny,
6. Struktura i funkcja błon aparatu fotosyntetycznego.

Referaty plenarne z zakresu dwu ostatnich grup tematycznych, a ściślej na temat biosyntezy i struktury aparatu fotosyntetycznego wygłosili N. K. Boardman oraz I. Ohad. Poza tym jedną z sesji plenarnych poświęcono zagadnieniu: „Fotosynteza a ewolucja”. Po wprowadzeniu H. Gaffrona jako dyskutanci wystąpili H. Baltscheffsky, C. Sagan i P. Siekewitz. Zagadnienie „Fotooddychanie a fotosynteza” było przedmiotem referatów plenarnych N. E. Tolberta i I. Zetitcha.

Kongres odbywał się w dwusetną rocznicę odkrycia fotosyntezy przez Priesley'a. Z tej okazji Robert Hill, na sesji wieczornej wygłosił referat o jego życiu i badaniach

Referaty plenarne, wypowiedzi dyskutantów oraz komunikaty przedstawione na Kongresie będą wydane łącznie w formie książkowej.

Z. Kaniuga

**Międzynarodowe sympozjum na temat biochemii i biofizyki błon
mitochondrialnych
Bressanone, 26—29 czerwca 1971 r**

W dniach 26—29 czerwca 1971 r odbyło się w Bressanone (Włochy) kolejne, siódme już, międzynarodowe sympozjum organizowane corocznie we Włoszech przez europejską grupę badaczy struktury, funkcji i procesów katalizowanych przez mitochondria. Obecnie sympozjum, którego organizatorami byli prof. N. Siliprandi i prof. G. F. Azzone z Uniwersytetu w Padwie poświęcone było w szczególności biochemii i biofizyce błon mitochondrialnych.

Inauguracyjny wykład o historii badań nad mitochondriami wygłosił A. Lehninger. Tematyka sympozjum została podzielona na trzy sekcje, na których wygłaszano 20 minutowe komunikaty. Sesja I dotyczyła łańcucha oddechowego i mechanizmów sprzężenia. Przedstawiono tutaj 15 doniesień m.in. o własnościach i regulacji aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (3), o własnościach różnych form cytochromu b (3) oraz dane z zakresu dwu kontrowersyjnych hipotez odnośnie mechanizmu działania antymycyny w łańcuchu oddechowym.

Sesja II — „Skład chemiczny i budowa molekularna błon” składała się z 19 doniesień, w większości poświęconych zastosowaniu wskaźników fluorescencyjnych do badania zmian zachodzących w błonie w wyniku działania różnych czynników (substratu, inhibitora, stanu energetycznego błony, zmian środowiska itp.).

Sesję III poświęcono mechanizmowi transportu poprzez błonę. Sesja ta składała się z 9 doniesień. Szczególnie interesujący był referat A. Lehningera o transporcie ornityny i cytruliny przez błonę mitochondrialną w procesie biosyntezy mocznika.

Poza tym dwa kilkogodzinne posiedzenia przeznaczono na ogólną dyskusję szczególnie kontrowersyjnych zagadnień. W Sympozjum wzięło udział około 80 osób w tym 12 z USA. Materiały sympozjum zostaną wydane w formie książkowej.

Z. Kaniuga

SPIS TREŚCI

J. Buchowicz—Ignacy Reifer, 1909—1971	535
J. Bryła—Regulacja glukoneogenezy. II. Rola hormonów	537
M. Jachimowicz, T. Szymczyk—Biologiczna rola kwasów siałowych	551
J. Bielański—Elektroda tlenowa i jej zastosowanie w badaniach procesów życiowych	565
E. Próchniewicz, H. Strzelecka-Gólaszewska—Spektroskopia fluorescencyjna i jej zastosowanie do badania struktury białek	583
L. Kłyszajko-Stefanowicz, Z. Polanowska—Kwaśne białka jąder komórkowych	601
C. Janion—Biosynteza i rola rzadkich zasad w tRNA	631
Recenzje książek (A. Makarewicz, A. Smockiewiczowa)	651
Kurs FEBS w Hintermoos (Austria) poświęcony transkrypcji genu (M. Ombach)	655
II Międzynarodowy Kongres Badań nad Fotosyntezą, Stresa 24—29 czerwca 1971 r. (Z. Kaniuga)	657
Międzynarodowe Sympozjum na temat biochemii i biofizyki błon mitochondrialnych, Bressanone 26—29 czerwca 1971 r. (Z. Kaniuga)	658

W 1-szym zeszycie 18-go tomu ukażą się:

1. Badanie konfiguracji przestrzennej biopolimerów za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich — *M. Tichy*
2. Charakterystyka uwodnienia makromolekuł DNA i metody jego wyznaczenia — *B. Lubas*
3. Nierozpuszczalne w wodzie pochodne białek biologicznie czynnych — *U. Kocemba-Sliwowska*
4. Zastosowanie metody swoistej sorpcji (ang. *affinity chromatography*) do wyosobniania enzymów i inhibitorów enzymatycznych — *J. Chudzik, A. Koj*
5. Trzustkowe inhibitory enzymów proteolitycznych — *A. Wilimowska-Pelc*
6. Papaina — *E. Machowicz, M. Sarnecka-Keller*
7. Hydroksylaza proliny protokolagenu — *J. Tomaszewski*
8. Podstawowe procesy biologiczne podczas kiełkowania nasion — *T. Gólaszewski, M. Siwecka, J. W. Szarkowski*
9. Peroksysomy — *A. Kahl, M. Gross, W. Turski*

POSTĘPY BIOCHEMII

November 1971

ARTICLES IN POLISH

Volume 17	Number 4
J. Buchowicz—Ignacy Reifer, 1909—1971 (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	535
J. Bryła—Control of Gluconeogenesis. II. Role of Hormones (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	537
M. Jachimowicz, T. Szymczyk—Biological Function of Sialic Acids (Dep. Chem. Physiol., Medical School, Warszawa)	551
J. Bielański—Oxygen Elektrode and Its Application in Investigations of Life processes (Dep. Cytol. and Histol., Inst. Biol. Univ., Poznań)	565
E. Próchniewicz, H. Strzelecka-Gólaszewska—Fluorescence Spectroscopy and its Application to Studies on the Protein Structure (Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	583
L. Klyszejko-Stefanowicz, Z. Polanowska—Acidic Proteins of Cell Nuclei (Dep. Gen. Biochem. Univ., Łódź)	601
C. Janion—Biosynthesis and Role of Rare Bases in tRNA (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	631
Chronicle	651

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

SPIS TREŚCI

J. Buchowicz—Ignacy Reifer, 1909—1971	535
J. Bryła—Regulacja glukoneogenezy. II. Rola hormonów	537
M. Jachimowicz, T. Szymczyk—Biologiczna rola kwasów sialowych	551
J. Bielawski—Elektroda tlenowa i jej zastosowanie w badaniach procesów życiowych	565
E. Próchniewicz, H. Strzelecka-Gołaszewska—Spektroskopia fluorescencyjna i jej zastosowanie do badania struktury białek	583
L. Kłyszejko-Stefanowicz, Z. Polanowska—Kwaśne białka jąder komórkowych	601
C. Janion—Biosynteza i rola rzadkich zasad w tRNA	631
Recenzje książek (A. Makarewicz, A. Smoczkiewiczowa)	653
Kurs FEBS w Hintermoos (Austria) poświęcony transkrypcji genu (M. Ombach)	657
II Międzynarodowy Kongres Badań nad Fotosyntezą, Stresa 24—29 czerwca 1971 r. (Z. Kaniuga)	659
Międzynarodowe Sympozjum na temat biochemii i biofizyki błon mitochondrialnych, Bressanone 26—29 czerwca 1971 r. (Z. Kaniuga)	660