

131A 2

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

155

1972

tom 18

nr 1

KWARTALNIK

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 2  
tom XVIII  
zeszyt 1

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 (1993+137)	Oddano do składania 30.X.1971 r.
Ark. wyd. 13,0, druk. 10,75+0,5 wkładka	Podpisano do druku w lutym 1972 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w marcu 1972 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1419/71      A-84

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

MAREK TICHY\*

## Badanie konfiguracji przestrzennej biopolimerów za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich

### The Study of Configurations of Biopolymers by the Use of X-ray Diffraction

This paper describes roentgenographic methods for resolution of protein (fibrillar and globular) and nucleic acid (DNA, RNA and model polynucleotides) structures.

Do dokładnego poznania właściwości takich substancji biologicznych, jak białka czy kwasy nukleinowe oraz szczegółowego rozważenia mechanizmów ich działania, niezbędna jest znajomość przestrzennego ułożenia wszystkich atomów w cząsteczce. Reguła fizyczna mówi, że długość fali promieniowania oświetlającego obiekt musi być współmierna lub mniejsza od jego wymiarów, aby mógł on być dostrzeżony przez obserwatora. Ponieważ atomy mają średnice rzędu kilku angstrémów ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ), nie można użyć promieniowania widzialnego, gdyż jego długość fali mieści się w zakresie 4000—7500  $\text{\AA}$ . Natomiast promieniowanie rentgenowskie odpowiada wymogom eksperymentalnym i dlatego jest ono powszechnie używane do badań strukturalnych. Na ogół stosuje się promieniowanie o długości fali 0,5—2,5  $\text{\AA}$ . Strukturalne badania rentgenowskie wymagają specjalnej metodyki, zarówno doświadczalnej jak i teoretycznej — interpretacyjnej. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie jej w zarysie Czytelnikowi o wykształceniu przyrodniczym. W literaturze polskiej ukazały się dotychczas tylko pozycje dotyczące rentgenografii technicznej (32). Natomiast w literaturze światowej można znaleźć prace przeglądowe o rentgenografii w chemii organicznej (91) oraz o rentgenografii biopolimerów (33, 56, 100, 141).

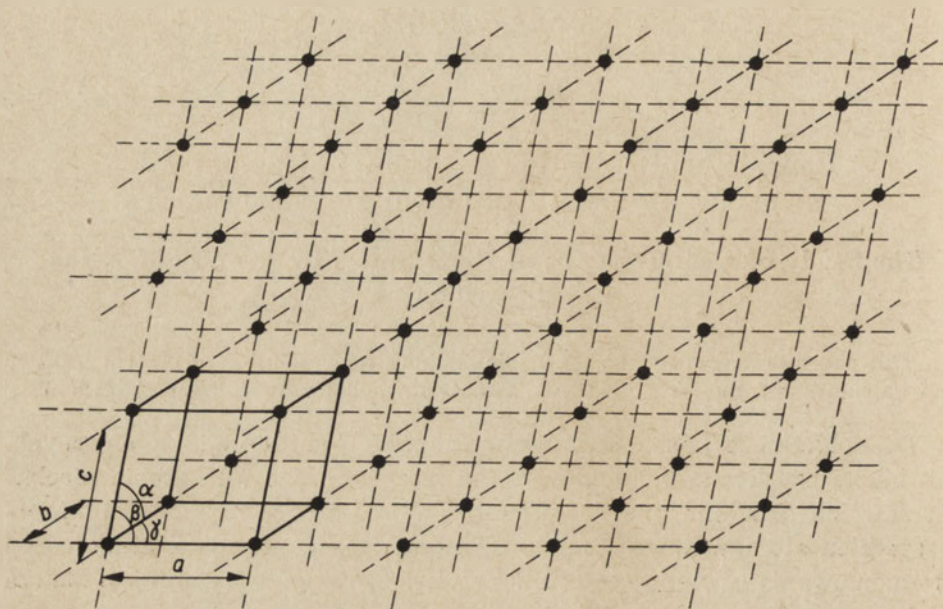
#### I. Geometria kryształów

Ze względu na to, że obiektami badań rentgenowskich są kryształy należy rozpocząć od opisu ich budowy wewnętrznej. Kryształem nazywamy ciało stałe, w którym atomy ułożone są periodycznie, tworząc trój-

\* Mgr, Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: PMG — poli- $\gamma$ -metylo-L-glutamina, PLA — poli-L-alanina.

wymiarową sieć atomową. Związane z tym są różne charakterystyczne właściwości fizyczne, jak na przykład ściśle określona temperatura topnienia.



Rys. 1. Schemat sieci krystalicznej; linią ciągłą zaznaczono kontur komórki elementarnej

Trójwymiarową sieć kryształu można podzielić na szereg przylegających do siebie klatek (komórek) identycznych zarówno pod względem kształtu jak i składu atomowego (rysunek 1). W związku z tym każdą z nich można wybrać jako reprezentantkę wszystkich i nazwać komórką elementarną (na rysunku 1 zaznaczono jej kontury liniami ciągłymi). Wielkość i kształt komórki elementarnej charakteryzuje się za pomocą sześciu parametrów:

Tablica 1

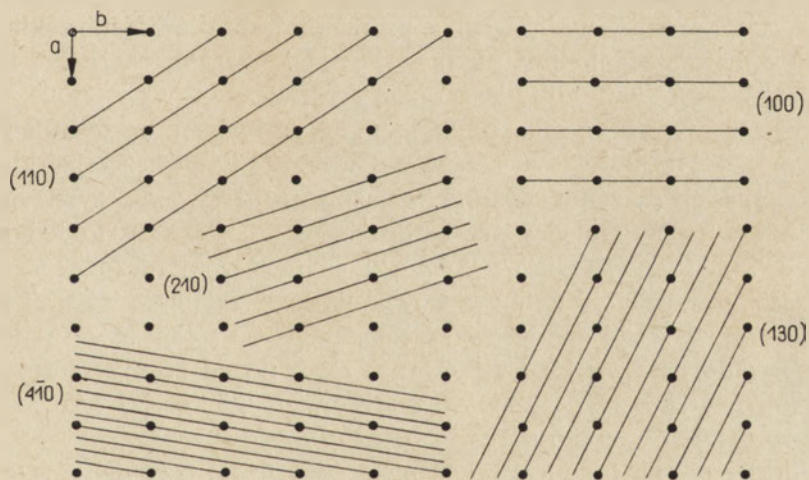
Układy krystalograficzne

Układ	Wymiary komórki elementarnej (stałe sieciowe)
Regularny	$a = b = c \quad \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonalny	$a = b \neq c \quad \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Rombowy	$a \neq b \neq c \quad \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Romboedryczny (trygonalny)	$a = b = c \quad \alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Heksagonalny	$a = b \neq c \quad \alpha = \beta = 90^\circ \quad \gamma = 120^\circ$
Jednoskośny	$a \neq b \neq c \quad \alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
Trójskośny	$a \neq b \neq c \quad \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

długości boków  $a$ ,  $b$ ,  $c$  oraz kątów między nimi  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . W zależności od wielkości i wzajemnych stosunków tych sześciu parametrów rozróżnia się siedem układów krystalograficznych. Podano je w tabelicy 1.

Występujące w komórkach elementarnych atomy mogą znajdować się nie tylko na ich krawędziach, lecz także w całej ich objętości, co powoduje asymetrię komórki. W krystalografii wyróżniono 230 możliwości takich asymetrii, uwzględniając różne typy przekształceń, jak obrót, odbicie zwierciadlane, inwersję itp.; są to tzw. grupy przestrzenne. Szczegółowy ich opis można znaleźć w pracy (65).

Przez punkty — atomy, tworzące sieć krystaliczną, można przeprowadzić wiele płaszczyzn. Pokazano to w dwu wymiarach na rysunku 2. Aby móc rozróżnić płaszczyzny między sobą uwzględnia się różne kierunki ich przebiegania przez komórkę elementarną. Do określania kierunku danej płaszczyzny stosuje się wskaźniki Millera  $h$ ,  $k$ ,  $l$ . Są to liczby całkowite, wskazujące, że płaszczyzna przecina osie  $a$ ,  $b$ ,  $c$  komórki elementarnej odpowiednio w punktach:  $\frac{a}{h}$ ,  $\frac{b}{k}$ ,  $\frac{c}{l}$ . Jeśli płaszczyzna przecina oś komórki elementarnej po stronie ujemnej, to używa się wówczas wskaźnika ujemnego; ujemne wskaźniki Millera oznaczają się  $\bar{h}$ ,  $\bar{k}$ ,  $\bar{l}$ . Płaszczyzny tworzące



Rys. 2. Różne płaszczyzny w sieci krystalicznej

rodzinę płaszczyzn równoległych będą miały wszystkie te same wskaźniki  $h$ ,  $k$ ,  $l$ . Ze wskaźników Millera oraz sześciu parametrów charakterystycznych dla komórki elementarnej można wyznaczyć dla każdego układu krystalograficznego odległość  $d_{hkl}$  między kolejnymi płaszczyznami równoległymi.

## II. Dyfrakcja promieni rentgenowskich na kryształach

Mianem dyfrakcji określamy zjawisko dodawania się (interferowania) dużej ilości fal wytworzonych przez rozproszenie jednej fali padającej na obiekt rozpraszający. Takim obiektem rozpraszającym może być np. siatka dyfrakcyjna czyli płytką z dużą ilością równoodległych liniowych nacięć na powierzchni. Przy naświetlaniu siatki światłem widzialnym każda rysa staje się źródłem nowej fali. Fale te, interferując ze sobą, dają obraz dyfrakcyjny w postaci jasnych i ciemnych prążków, w zależności od tego, czy są zgodne w fazie i dodają się, czy przeciwnie w fazie i odejmują się. Obiektem rozpraszającym może być również kryształ. Przy naświetlaniu kryształu falą promieniowania rentgenowskiego każdy atom staje się źródłem nowej fali; interferując ze sobą fale te dają efekt dyfrakcyjny.

### 1. Kierunki ugiętych wiązek

Możliwość wystąpienia dyfrakcji (ugięcia) promieni rentgenowskich na kryształach uwzględnia prawo Bragga:

$$\lambda = 2d \sin \vartheta \quad (1)$$

gdzie:  $\lambda$  — długość fali promieniowania naświetlającego

$d$  — odległość między kolejnymi równoległymi płaszczyznami kryształicznymi, uginającymi promieniowanie rentgenowskie ( $d_{hkl}$ )

$\vartheta$  — kąta padania fali na płaszczyznę kryształu, czyli kąt między kierunkiem fali i płaszczyzną krystaliczną.

Z powyższego wzoru wynika, że występowanie maksimum dyfrakcyjnego możliwe jest tylko dla ściśle określonej wartości kąta  $\vartheta$ . Znając kierunki wiązek ugiętych możemy określić wskaźniki Millera płaszczyzn uginających oraz odległości między tymi płaszczyznami. Pozwala to jedynie na ustalenie kształtu i wymiarów komórki elementarnej nieznanego kryształu. Natomiast pozycje atomów wewnątrz komórki elementarnej można określić na podstawie pomiarów natężenia wiązek ugiętych. Jest to problem znacznie bardziej skomplikowany, zarówno od strony teoretycznej, jak i praktycznej. Szczegóły można znaleźć w drugiej części tego rozdziału oraz w rozdziale następnym.

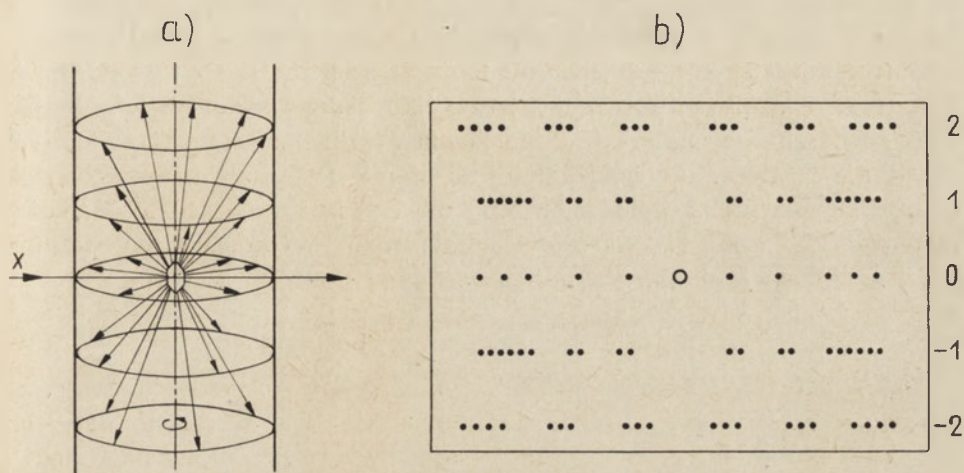
Opierając się na prawie Bragga można wyróżnić trzy metody dyfrakcyjne:

metoda Lauego	$\lambda$ zmienne	$\vartheta$ stałe
metoda obracanego kryształu	$\lambda$ stałe	$\vartheta$ zmienne (częściowo)
metoda proszkowa Debye'a-Scherrera	$\lambda$ stałe	$\vartheta$ zmienne

Do badania monokryształów biopolimerów wykorzystuje się metodę obracanego kryształu. Kryształ obraca się wokół jednej z jego osi lub wokół jakiegoś ważnego kierunku krystalograficznego, prostopadle do monochro-



matycznej wiązki naświetlającej. Rejestracji dokonuje się na błonie fotograficznej ułożonej cylindrycznie tak, że oś obrotu kryształu pokrywa się z osią cylindra. Wiązki ugięte układają się na powierzchniach stożków, których osie pokrywają się z osią obrotu, a na błonie fotograficznej odpowiadające im refleksy znajdują się na liniach poziomych (rysunek 3).



Rys. 3. Metoda obracanego kryształu:

a) kierunki ugiętych przez monokryształ wiązek; b) układ refleksów na błonie filmowej

## 2. Natężenia ugiętych wiązek

Aby móc wyznaczyć natężenia ugiętych przez kryształ wiązek, należy poznać naturę zjawisk zachodzących przy rozpraszaniu promieni rentgenowskich. Zmienne pole elektryczne elektromagnetycznej fali promieniowania Roentgena oddziałuje na naładowane cząstki, na przykład elektrony, wprawiając je w ruch drgający. Oscylujące wokół położenia równowagi elektrony stają się źródłami nowych fal elektromagnetycznych o tej samej długości fali, co wiązka padająca. Emitowane fale są spójne z wiązką pierwotną, ponieważ istnieje określona zależność między fazami wiązki padającej i wiązki rozproszonej; mogą więc ze sobą interferować. Natężenie wiązki rozproszonej przez pojedynczy elektron zostało określone przez Thomsona wzorem:

$$I = I_0 \frac{e^4}{m^2 c^4 r^2} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\vartheta}{2} \quad (2)$$

gdzie:  $I$  — natężenie wiązki rozproszonej,  $I_0$  — natężenie wiązki padającej,  $e$  — ładunek elektronu,  $m$  — masa elektronu,  $c$  — prędkość światła,  $r$  — odległość od rozpraszającego elektronu,  $\vartheta$  — kąt ugięcia (Bragga). Istnieje jeszcze drugi, korpuskularny sposób opisu oddziaływania wiązki rentgenowskiej na elektrony, zwany rozpraszaniem comptonowskim. Polega on

na rozważeniu zderzenia kwantu promieniowania (traktowanego jak cząstka) z elektronem, co wiąże się zarówno ze zmianą długości fali, jak i z utratą spójności. Interferencja wiązek rozproszonych nie może tu oczywiście występować i dlatego efekt ten nie może być istotny dla powstawania obrazów dyfrakcyjnych.

Rozpatrując następnie rozpraszanie przez atom można na podstawie wzoru Thomsona stwierdzić, iż w atomie jedynie elektrony mogą być centrami rozpraszającymi, zaś jądro nie może ze względu na zbyt wielką masę (natężenie wiązki rozproszonej przez tylko jeden proton byłoby około  $1840^2 \approx 3,4 \cdot 10^6$  razy mniejsze od natężenia wiązki rozproszonej na jednym elektronie). Natężenie wiązki ugiętej na atomie jest sumą natężeń wiązek ugiętych przez poszczególne elektrony dla  $\vartheta = 0$ , a więc zależy od liczby atomowej  $Z$ , i maleje ze wzrostem  $\vartheta$ . Jako miarę wydajności rozpraszania przez atom stosuje się tzw. czynnik atomowy

$$f = \frac{\text{amplituda fali rozproszonej przez atom}}{\text{amplituda fali rozproszonej przez jeden elektron}} \quad (3)$$

Jak widać, im cięższy pierwiastek, tym wiązka rozproszona ma większe natężenie. Niestety rozpraszanie comptonowskie, choć niespójne, daje tło, tym większe, im mniejsza jest liczba atomowa rozpraszających atomów. Dlatego też najbardziej zaciemnione są obrazy dyfrakcyjne związków organicznych, zawierających atomy lekkich pierwiastków, jak węgiel, azot i tlen, nie mówiąc już o wodorze, które równocześnie dają spójne wiązki o małym natężeniu.

Przechodząc wreszcie do rozpraszania przez całą komórkę elementarną o  $N$  atomach należy stwierdzić, że amplituda fali wypadkowej  $F_{hkl}$  jest wektorową sumą amplitud fal rozproszonych przez poszczególne atomy i wyraża się wzorem:

$$F_{hkl} = \sum_{i=1}^N f_i(hkl) \exp[2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)] \quad (4)$$

gdzie:  $F_{hkl}$  — amplituda fali rozproszonej (refleksu), zwana czynnikiem struktury

$f_i(hkl)$  — czynnik atomowy  $i$ -tego atomu

$x_i, y_i, z_i$  — ułamkowe współrzędne  $i$ -tego atomu, otrzymane przez podzielenie współrzędnych atomu odpowiednio przez  $a, b$  oraz  $c$

$h, k, l$  — wskaźniki danego refleksu, określające równocześnie kierunek, wzdłuż którego następuje sumowanie.

Natężenie fali ugiętej oblicza się podnosząc amplitudę do kwadratu, a ponieważ jest ona liczbą zespoloną, należy pomnożyć amplitudę przez wielkość do niej sprzężoną, tzn.:

$$I = F^2 = F \cdot F^* \quad (5)$$

gdzie:  $I$  — natężenie,  $F$  — amplituda,  $F^*$  — amplituda sprzężona.

### III. Rozwiązywanie struktury przestrzennej monokryształu

#### 1. Informacje uzyskane z danych krystalograficznych oraz z pomiaru kierunków ugiętych wiązek

Badania kryształów prowadzono znacznie wcześniej, niż zastosowano po raz pierwszy (von Laue, 1912) promieniowanie rentgenowskie. Rozwinięto wtedy metody krystalograficzne, polegające na określaniu właściwości monokryształu na podstawie jego wyglądu zewnętrznego, łupliwości w pewnych kierunkach itp. Mimo swego klasycznego charakteru metody te są stosowane do dzisiaj do wstępnej charakterystyki kryształu, ułatwiającej np. wybór kierunków, wokół których będzie się obracać kryształ przy wykonywaniu zdjęć rentgenowskich.

Zdjęcia rentgenowskie otrzymujemy przy zastosowaniu metody opisanej w części 1 rozdziału II. Stosując specyficzną metodykę każdemu z refleksów na zdjęciu przypisuje się wskaźniki Millera  $hkl$ , określające rodzinę płaszczyzn krystalicznych, od których nastąpiło odbicie (ugięcie) dające ten refleks. Nazywamy to wskaźnikowaniem zdjęcia rentgenowskiego. Z występowania pewnych refleksów i braku innych można wyciągnąć wnioski co do wyglądu i asymetrii komórki elementarnej.

W sumie z danych krystalograficznych, kierunków ugiętych wiązek i wywskaźnikowanych zdjęć otrzymuje się dane o kształcie, wymiarach i grupie przestrzennej komórki elementarnej.

#### 2. Informacje uzyskane z pomiaru natężeń wiązek ugiętych

Metody stosowane do wyznaczenia natężeń poszczególnych wiązek ugiętych zostaną scharakteryzowane w rozdziale VI.

Natężenie fali ugiętej zostało określone równaniem (5). Przez odwrócenie tego równania otrzymujemy:

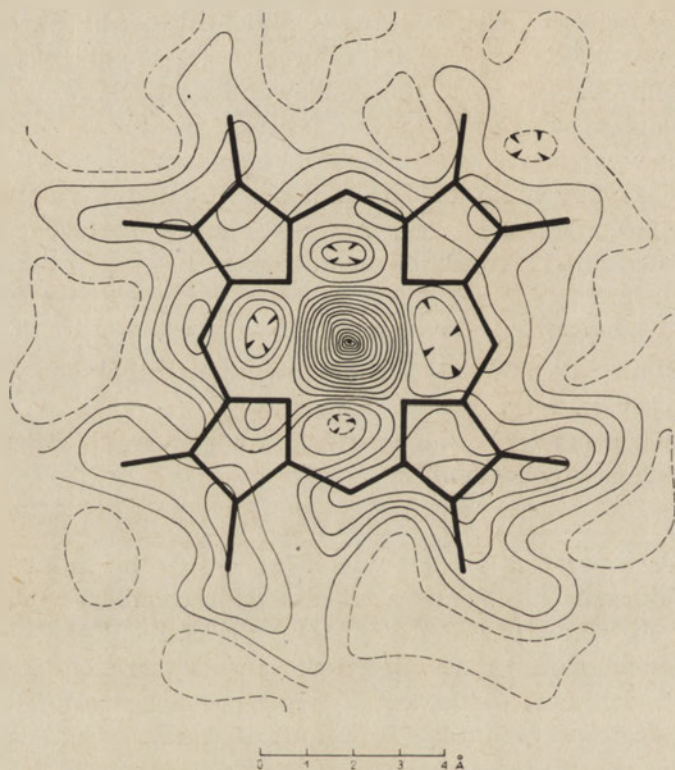
$$|F_{hkl}| = \sqrt{I_{hkl}} \quad (6)$$

Amplituda dana wzorem (6) jest wielkością eksperymentalną, otrzymaną z pomiaru natężenia  $I_{hkl}$ . Ponieważ rozpraszanie promieni rentgenowskich warunkują elektrony związane z atomami, rozkład gęstości elektronowej w komórce elementarnej musi odpowiadać rozkładowi atomów, przy czym im większa będzie liczba atomowa  $Z$ , tym większa będzie gęstość elektronowa. W oparciu o amplitudę  $|F_{hkl}|$  można określić rozmieszczenie atomów, poprzez wyznaczenie rozkładu gęstości elektronowej wg równania:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F_{hkl}| \cos[2\pi(hx + ky + lz) - \alpha_{hkl}] \quad (7)$$

gdzie:  $\rho(xyz)$  — gęstość elektronowa,  $\alpha_{hkl}$  — stała fazowa. Wzór (7) wynika z rozłożenia całej gęstości elektronowej w punkcie o współrzędnych  $x, y, z$  na fourierowski szereg przyczynków, pochodzących od wszystkich refleksów zarejestrowanych na zdjęciu rentgenowskim. Odpowiada to uwzględ-

nieniu faktu, że znajdujące się w tym punkcie elektrony mają swój udział w rozpraszaniu promieni rentgenowskich w każdym kierunku, a stała fazowa  $\alpha_{hkl}$  wyraża różne możliwości wpływania na amplitudę i natężenie każdego refleksu określonego wskaźnikami  $hkl$  (wzmacnianie lub osłabianie). Obliczeń rozkładu gęstości elektronowej dokonuje się metodą numeryczną, zmieniając  $x$ ,  $y$  i  $z$  odpowiednio co (dla przykładu)  $\frac{1}{80}a$ ,  $\frac{1}{80}b$  i  $\frac{1}{80}c$ . Niestety stała fazowa w znamienitej większości przypadków nie jest znana i dlatego stosuje się metody przybliżone wyznaczania jej wartości bądź też wyznacza się inne wielkości, do których określania znajomość stałej fazowej nie jest potrzebna. Przykład mapy gęstości elektronowej (dla grupy hemowej) pokazano na rysunku 4.



Rys. 4. Rozkład gęstości elektronowej dla grupy hemowej mioglobiny (synteza fourierowska z dokładnością do 2 Å)

### 3. Metody przybliżone rozwiązywania struktury przestrzennej

*Metoda prób i błędów.* Jeśli badamy przestrzenną strukturę niezbyt skomplikowanej cząsteczki i jeśli znana jest struktura chemiczna (wzór strukturalny wszystkich połączeń międzyatomowych) określa się, przy za-

łożeniu standardowych wartości dla długości i kątów wiązań międzyatomowych, kilka możliwych ze względów sterycznych struktur przestrzennych tej cząsteczki. Aby określić, która z nich odpowiada właściwej strukturze, dokonuje się dla każdej obliczeń stałych fazowych  $\alpha_{hkl}$ , na ich podstawie oblicza się amplitudy  $|F_c|$  i porównuje z amplitudami eksperymentalnymi  $|F_e| = \sqrt{I}$ . Jako kryterium poprawności wyniku przyjmuje się (1):

$$R = \frac{\sum | |F_e| - |F_c| |}{\sum |F_e|} < 0,2 \quad (8)$$

R osiąga przy bardzo precyzyjnych badaniach o dużej zdolności rozdzielczej wartość 0,05.

*Funkcja Pattersona.* Analiza struktury przy użyciu równania (7) była utrudniona faktem, że stała fazowa  $\alpha_{hkl}$  była nieznana i trudna (lub zupełnie niemożliwa) do wyznaczenia. Patterson (95, 96) ominął tę trudność, określając funkcję w oparciu o natężenia wiązki ugiętej I, a nie amplitudy  $|F_{hkl}|$ , ponieważ w przypadku natężeń problemy faz nie występują:

$$P(uvw) = \frac{1}{V^2} \sum_h \sum_k \sum_l \sum_{=I} |F_{hkl}|^2 \cos [2\pi(hu + kv + lw)] \quad (9)$$

gdzie:  $P(uvw)$  — funkcja Pattersona

$$u = x_1 - x_2, \quad v = y_1 - y_2, \quad w = z_1 - z_2$$

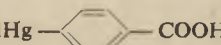

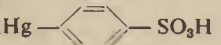

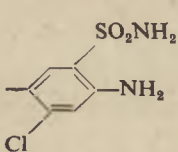
Funkcja Pattersona określona jest dla różnic między współrzędnymi dwu punktów, dlatego jej maksima przypadać będą dla takich wartości  $u, v, w$ , które odpowiadają różnicom współrzędnych dla położenia dwu różnych atomów, a wysokości maksimów proporcjonalne będą do iloczynu liczb atomowych  $Z_1 \cdot Z_2$ . Z tego względu łatwo można uchwycić maksima, zawierające ciężkie atomy. Metodę Pattersona stosuje się przynajmniej wstępnie w metodzie zamiany izomorficznej do określenia położenia ciężkich atomów.

*Metoda zamiany izomorficznej.* W stosunku do prostszych cząsteczek organicznych metoda ta była już dość dawno stosowana, ale dopiero w 1954 roku Green, Ingram i Perutz (46) dowiedli, że może być ona również stosowana do wielkich cząsteczek, jakimi są biopolimery (w szczególności do białek). W cząsteczkach organicznych występują same lekkie pierwiastki: węgiel ( $Z = 6$ ), azot ( $Z = 7$ ), tlen ( $Z = 8$ ), nie mówiąc już o wodorze ( $Z = 1$ ), który jest dla promieni rentgenowskich praktycznie niedostrzegalny. Występowanie ciężkich atomów (np. centralny atom żelaza w grupie hemowej) znacznie upraszcza zagadnienie, ponieważ rozpraszanie na takich atomach jest wyraźnie widoczne i łatwo je zidentyfikować w poszczególnych refleksach. Można też zastosować metodę Pattersona, opisaną już poprzednio. Natomiast rozwiązanie struktury cząsteczki złożonej z samych lekkich pierwiastków jest bardzo trudne i dla dużej

ilości atomów — jak to ma miejsce w biopolimerach — po prostu niemożliwe. Metoda zamiany izomorficznej polega na wprowadzeniu do cząsteczki grup zawierających ciężkie atomy (np. J, Cl, Ag, Au itp.) w taki sposób, że struktura kryształu nie ulega zmianie. Stąd nazwa: izomorficzna czyli jednopostaciowa wymiana (ang. *isomorphous replacement*). Spis grup, które mogą być zastosowane w tej metodzie, podano w tablicy 2. Kryształy zawierające ciężkie atomy analizuje się na ogół metodą Pattersona i przeprowadza w miarę możliwości pełną analizę strukturalną. Zależnie od potrzeb wykonuje się kilka kryształów z różnymi podstawieniami. Są to prace żmudne i długotrwałe; dość powiedzieć, że przy zastosowaniu tej metody rozszyfrowano od 1955 roku do chwili obecnej zaledwie kilka struktur dość prostych białek (patrz rozdział VII, część 2).

Tablica 2

Podstawniki zawierające ciężkie atomy, stosowane w metodzie zamiany izoformicznej  
(wg Holmes i Blow (56))

Podstawnik	Pozycja literatury
	9, 46
	11, 14, 102, 115, 127
	11, 14
	14
CICH (HgCl) COOH	45
ClHgCH (HgCl) COOH	31, 89
$[\text{CH}_3\text{COOHgCH}_2\text{CH}(\text{OCH}_3)]_2$	31
$\text{CH}_3\text{Hg}$	40
	127
$\text{CH}_3\text{HgSCH}_2\text{CONHSO}_2$	127
$\text{Hg}(\text{COOCH}_3)_2$	31, 45, 48, 127
$\text{HgCl}_2$	31, 89
$\text{HgO}_2$	14
$\text{K}_2\text{HgBr}_4$	102
$\text{K}_2\text{HgI}_4$	11, 13, 14, 38, 45, 78, 102, 115, 125
$\text{AgNO}_3$	14, 46, 48, 115
$\text{NaAuCl}_4$	14, 102, 115
$\text{UO}_2(\text{P}_2\text{O}_7)_n$	78
$\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$	11
$\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_6$	11, 57
Kwas uranylo-sulfosalicylowy (sól K)	68

Tablica 2 (c.d.)

Podstawniki	Pozycja literatury
$K_2PtCl_6$	38, 78, 125
$K_2PtCl_4$	13, 102
$K_2PtBr_4$	13, 102
$K_2PtI_4$	13
$K_2PdCl_4$	11, 102
$K_2PdBr_4$	11
$cis-Pt(NH_2CH_2COOH)_2$	68
$Pt(NH_2CH_2CH_2NH_2)_3Cl_3$	68
$Pt(NH_3)_2(NO_3)_2$	68
$IrCl_3$	38
$Na_3IrCl_6$	78
$Ta_6Cl_{12}Cl_2$	29
$Nb_6Cl_{12}Cl_2$	29
$Pb(CH_3COO)_2$	24
$Pb_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 3H_2O$	81
$I - \text{C}_6\text{H}_4 - SO_2F$	120

#### IV. Rozpraszanie przez włókna

Dodatkowym utrudnieniem przy badaniu przestrzennej struktury biopolimerów jest fakt, że wiele z nich nie tworzy kryształów. Są to między innymi białka fibrylarne i kwasy nukleinowe. Niemniej tworzą one struktury o pewnym stopniu uporządkowania — włókna, które dają efekty dyfrakcyjne przy naświetlaniu promieniami rentgenowskimi.

Ze względu na dużo mniejszą regularność struktury włókien, ich rentgenogramy zawierają znacznie mniej refleksów, bardziej rozmytych w porównaniu z refleksami otrzymanymi z monokryształów. Dlatego można z nich uzyskać niewiele informacji, a analiza strukturalna jest bardzo utrudniona i mało dokładna. Ponieważ jednak są to zazwyczaj struktury spiralne, ze zdjęć rentgenowskich otrzymuje się pewne wielkości charakteryzujące samą spiralę, na przykład długość jej skoku bądź ilość podstawników (reszt aminokwasowych czy par zasad) na jeden obrót spirali (skok). Nazewnictwo pochodzi od analogii technicznej, jaką jest dla heliksu śruba; jeden pełny obrót śruby daje przesunięcie zwane skokiem (jest to równocześnie odległość kolejnych gwintów).

Teoria rozpraszania promieniowania przez cząsteczki o strukturze helikalnej została ogłoszona w 1952 roku (26). Ponieważ heliks ma symetrię cylindryczną, dowolny punkt opisuje się za pomocą współrzędnych cylindrycznych ( $r$ ,  $\Phi$ ,  $z$ ). Ze względu na specyfikę metody rentgenowskiej stosuje się współrzędne ( $R$ ,  $\psi$ ,  $l/c$ ), gdzie:  $l$  — liczba całkowita,  $c$  — okres identyczności, tzn. odległość wzdłuż osi  $z$ , na której heliks powraca do sy-

tuacji wyjściowej. W przypadku współrzędnych kartezjańskich ( $x, y, z$ ) otrzymaliśmy dla fali ugiętej wzór (4); analogiczny wzór przy zastosowaniu współrzędnych cylindrycznych ma postać:

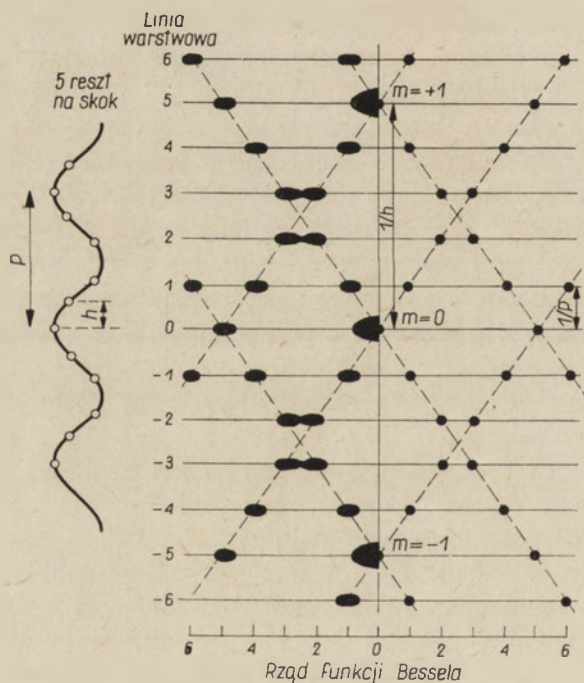
$$G\left(R, \psi, \frac{1}{c}\right) = \sum_n \sum_j f_j \cdot J_n(2\pi R r_j) \cdot \exp\left\{i\left[n\left(\psi - \varphi_j + \frac{\pi}{2}\right) + \frac{2lz_j}{c}\right]\right\} \quad (10)$$

gdzie:  $f_j$  — czynnik atomowy  $j$ -tego atomu o współrzędnych ( $r_j, \Phi_j, z_j$ )

$J_n(2\pi R r_j)$  — funkcja Bessela  $n$ -tego rzędu; pojawienie się tej funkcji wynika ze specyfiki zastosowanych współrzędnych cylindrycznych.

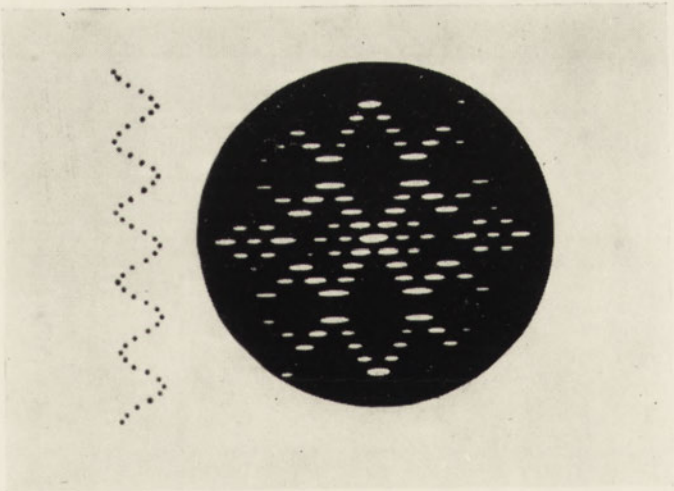
Na rysunku 5a pokazano rozkład maksimów dla funkcji Bessela, opisującej spiralę o skoku  $P$  i 5 podstawników na obrót.

Dotychczas była mowa o wyznaczaniu tylko niektórych charakterystycznych dla heliksu parametrów. Aby jednak móc wyznaczyć strukturę przestrzenną, trzeba posługiwać się specyficzną metodą eksperymentalną, zwaną metodą transformacji optycznej. Polega ona na skonstruowaniu hipotetycznego modelu cząsteczki, w którym poszczególne atomy reprezentowane są przez kulki o różnych rozmiarach, sfotografowaniu go i użyciu fotografii o odpowiednich wymiarach (na której cały model jest jasny, a tło ciemne) jako przeszkody na drodze promieniowania widzialnego.



Rys. 5 a) Rozkład maksimów dla funkcji Bessela, opisującej heliksu o skoku  $P$  i 5 grupach na skok





Rys. 5b. Zdjęcie transformacji optycznej heliksu o 10 grupach na skok



W ten sposób zwiększamy zarówno rozpraszający obiekt — fotografia modelu, jak i długość fali promieniowania naświetlającego. Otrzymany obraz dyfrakcyjny (optyczna dyfrakcja Fraunhofera), powinien być zgodny z obrazem rentgenowskim dla tego modelu, który odpowiada rzeczywistej konfiguracji badanego związku. Na rysunku 5b pokazano zdjęcie transformacji optycznej heliksu o 10 resztach na 1 skok.

Taką właśnie metodą posłużyli się Watson, Crick i Wilkins przy tworzeniu modelu struktury DNA.

## V. Rozpraszanie promieni rentgenowskich pod małymi kątami

Metoda rentgenowska jest bardzo dokładną metodą badania struktury przestrzennej, jednakże w odniesieniu do biopolimerów ma poważną wadę. Badane związki są w stanie krystalicznym lub włóknistym, co wiąże się ze środowiskiem bezwodnym (najwyżej pozostaje woda, wchodząca w strukturę kryształu lub włókna). Nie ma natomiast tak dokładnej metody badania struktury związku chemicznego w roztworze. Istnieje jednak metoda, pozwalająca określić dokładnie wymiary zewnętrzne cząsteczki i jej gęstość elektronową w roztworze. Jest to metoda rozpraszania promieni rentgenowskich pod małymi kątami. Teoria dotycząca tej metody została opisana w przeglądowym artykule K r a t k y' e g o (75). Ogólnie mówiąc w roztworze nie ma takiej regularności, jak w kryształach, a ze względu na stosunkowo duże odległości międzycząsteczkowe dodaniu ulegają nie amplitudy rozproszonych fal, lecz ich natężenia. Z analizy kąтового rozkładu natężeń można wyciągnąć wnioski co do zewnętrznego wyglądu rozpraszających cząsteczek. Omawiana metoda rozróżnia trzy kategorie cząsteczek: a) o trzech wymiarach istotnych (globularne); b) o dwóch wymiarach istotnych, a jednym małym w porównaniu z nimi (dyski, płytki, blaszki); c) o jednym wymiarze istotnym, a dwóch pozostałych małych (pałeczki). Metoda ta pozwala również wyznaczać ciężar cząsteczkowy oraz w przypadku cząsteczek pałeczkowatych średnią gęstość elektronową na jednostkę długości.

## VI. Aparatura doświadczalna

### 1. Źródło promieni rentgenowskich

Źródłem promieniowania rentgenowskiego jest lampa rentgenowska, a dokładniej mówiąc, jej dodatnia elektroda zwana antykatodą. Emitowana z katody lampy wiązka elektronów zostaje przyspieszona przez pole elektryczne rzędu kilkudziesięciu kilowoltów, a następnie mechanicznie zahamowana przez antykatodę. Energia kinetyczna elektronów zostaje zamieniona w energię cieplną albo w energię wzbudzenia atomów antykatody.

Wzbudzenie atomów polega na przeniesieniu elektronów z powłok K lub L na wyższe powłoki, co odpowiada absorpcji energii; atomy takie powracają do stanu niewzbudzonego (podstawowego) poprzez wypromieniowanie energii, co łączy się z powrotem elektronów na powłoki K lub L. To promieniowanie atomów antykatody nazywamy właśnie promieniowaniem rentgenowskim. Różne metale mają różne energie elektronów na powłokach; w zależności od materiału, z którego będzie wykonana antykatoda, otrzymamy promieniowanie rentgenowskie o różnych długościach fal. Najczęściej stosowana jest antykatoda miedziana, dająca tzw. linię  $\text{CuK}_\alpha$  o  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$  (K oznacza powrót elektronu na powłokę K,  $\alpha$  — że powrót nastąpił z najbliższej powłoki, tzn. z powłoki L). Ponieważ oprócz linii  $\text{CuK}_\alpha$  obserwuje się także inne — słabsze — linie energetyczne, stosuje się specjalne filtry tak, aby lampa rentgenowska dawała promieniowanie monochromatyczne o ściśle określonej długości fali.

## 2. Kamery

Jeśli rejestracji dokonuje się na błonie filmowej, wówczas stosuje się kamery. Na osi kamery umieszcza się w goniometrze monokryształ, na obwodzie zaś błonę fotograficzną. Goniometr pozwala obracać kryształem we wszystkich kierunkach, dzięki czemu można dokonywać rejestracji przy obrocie kryształu wokół dowolnie wybranej osi. Aby móc rozróżnić różne refleksy, które ze względu na obrót kryształu mają jeden wspólny obraz na błonie, stosuje się kamery z przesuwaną błoną filmową bądź drgającą oscylacyjnie próbką (kamera Weissenberga, kamera Buergera i kamera oscylacyjna).

## 3. Pomiary natężeń poszczególnych refleksów

Jeżeli rejestracji dokonano na błonie filmowej, wówczas do pomiaru natężeń stosuje się dwie metody: albo ustala się pewną skalę jasności refleksów i osoba posiadająca dobry wzrok ocenia natężenie każdego refleksu z osobna przez porównanie z wzorcem, albo też wykorzystuje się przyrząd zwany densytometrem. Problem techniczny polega na tym, że zwykle produkuje się densytometry liniowe, tutaj zaś potrzebny jest densytometr powierzchniowy (tzw. całkujący).

Ostatnio coraz częściej stosuje się dyfraktometry. Są to przyrządy bezpośrednio mierzące natężenia wiązek ugiętych na kryształach. Tu z kolei problemy techniczne związane są z porównywalnością otrzymanych wyników oraz z możliwością mierzenia natężeń refleksów w różnych płaszczyznach.

Do zalet metody filmowej należy rejestracja wszystkich refleksów na raz, podczas gdy w metodzie dyfraktometrycznej zarówno kryształ jak i licznik muszą być dokładnie ustawione dla każdego refleksu. Poza tym otrzymujemy wyniki uśrednione, ponieważ kryształ obraca się wielokrot-

nie podczas ekspozycji, natomiast w metodzie dyfraktometrycznej różne pomiary odpowiadają strukturze kryształu przy różnych stanach energetycznych.

Do zalet techniki dyfraktometrycznej należy przede wszystkim otrzymanie wyniku w postaci liczbowej, ponieważ elementem czułym na promieniowanie jest w dyfraktorze licznik jądrowy w rodzaju licznika Geigera-Müllera czy licznika scyntylacyjnego. Dzięki temu wyniki mogą być bezpośrednio podawane na maszynę liczącą. Poza tym zaletą dyfraktometru jest duża możliwość automatyzacji pomiaru.

## VII. Wyniki eksperymentalne

### 1. Białka fibrylarne i polipeptydy

Białka tworzące włókna były już dość dawno badane metodą rentgenowską. W latach trzydziestych Astbury i wsp. (3, 4, 5) wykonali szereg badań, na podstawie których wprowadzili ogólny podział białek fibrylarnych na dwie grupy: grupa k-m-e-f (keratyna-miozyna-epidermina-fibrynogen) oraz grupa kolagenu. Białka grupy k-m-e-f mogły występować w konfiguracji zwanej  $\alpha$ , nieraz w konfiguracji  $\beta$ , pozostałe zaś w konformacji  $\beta$ . Jako model konfiguracji  $\beta$  Astbury podał tzw. model pofałdowanej kartki, uznawany i obecnie. Natomiast model konformacji  $\alpha$  ustalili dopiero w 1951 roku Pauling, Corey i Branson (97, 98). Główne właściwości spirali  $\alpha$  są według tych autorów następujące:

- a. wszystkie reszty aminokwasowe są równoważne.
- b. każda grupa amidowa jest płaska. Wymiary długości i kątów wiązań można znaleźć w każdym elementarnym podręczniku biochemii.
- c. długości i kąty wiązań w cząsteczce białka fibrylarnego są takie same, jak dla substancji stosunkowo prostszych (dla których wielkości te otrzymano z badań monokryształów).
- d. każdy atom azotu tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu, należącym do innej grupy (np. reszty aminokwasowej). W szczególności wiązania wodorowe tworzą wszystkie atomy tlenu i azotu, należące do grup amidowych (z wyjątkiem kilku wolnych na obu końcach łańcucha), co zapewnia dość dużą sztywność cząsteczki.

Spirala  $\alpha$  Paulinga-Corey'a posiada 3,6 reszt aminokwasowych na skok wynoszący 5,4 Å. Strukturę tę posiadają sztuczne polipeptydy: np. poli- $\gamma$ -metylo-L-glutamina (PMG) (16) i poli-L-alanina (PLA) (17). Ich właśnie bezpośrednio dotyczył model spirali. Natomiast w przypadku naturalnych białek fibrylarnych sprawa się komplikuje w związku z występowaniem struktury czwartorzędowej. I tak na przykład kolagen tworzy spiralę złożoną z trzech równoległych łańcuchów również spiralnych (103). Jego struktura nie została do końca wyjaśniona, bowiem Rich i Crick (108) stwierdzili możliwość występowania kolagenu w dwu postaciach (kolagen I i II).

## 2. Białka globularne

Jak wiadomo białka globularne mogą tworzyć kryształy; można więc zastosować do nich całkowitą analizę struktury monokryształu.

Już w 1938 roku Bernal, Fankuchen i Perutz (10) otrzymali obrazy rentgenowskie z monokryształu hemoglobiny, ale analiza konfiguracji białka nie była możliwa ze względu na zbyt dużą ilość atomów o zbliżonych masach atomowych w komórce elementarnej. Dopiero po 1954 roku, kiedy Perutz wykazał możliwość zastosowania do białek metody zamiany izomorficznej (patrz rozdz. III cz. 3), analiza struktury przestrzennej hemoglobiny ruszyła naprzód.

Pierwszym białkiem globularnym, którego analiza strukturalna została uwieńczona powodzeniem, była mioglobina kaszalota. Ciężar cząsteczkowy mioglobiny wynosi około 17 000; posiada ona 152 aminokwasy o około 1 200 atomach (nie licząc wodoru). W komórce elementarnej występują 2 cząsteczki białka. Analizę przeprowadzono stopniowo. Wykonując syntezę Fouriera dla około 400 refleksów otrzymano model o dokładności 6 Å (15). Synteza 9 600 refleksów dała model o dokładności 2 Å (72); na jego podstawie poznano kierunek przebiegu łańcucha i położenie 825 atomów. Dopiero synteza około 25 000 refleksów dała jednoznaczny model o rozdzielczości 1,4 Å (71), z którego wynikało, że 118 aminokwasów tworzy prawoskrętną  $\alpha$ -spirale, składającą się z segmentów zawierających od 7 do 24 aminokwasów. Segmenty helikalne rozdzielone są segmentami o strukturze giętkiej (nie spiralnej) o długości od 1 do 9 aminokwasów. Określono też dokładnie położenie grupy hemowej. Należy pamiętać, że badano kilka kryształów z różnymi podstawnikami zawierającymi ciężkie atomy. Ostatnio (116) przedstawiono model o dokładności 6 Å i 5 Å dla mioglobiny izolowanej z foki.

Następnym zbadanym białkiem, znacznie większym niż mioglobina, była hemoglobina. Ma ona ciężar cząsteczkowy około 67 000, 10 000 atomów, z tego 4 atomy żelaza, należące do 4 grup hemowych, składa się z 4 łańcuchów dwu typów: po 2 łańcuchy  $\alpha$  i  $\beta$ . W komórce elementarnej występują 2 cząsteczki hemoglobiny. Zbadano 6 odmian kryształów o izomorficznym podstawieniu ciężkich atomów. Do chwili obecnej znany jest tylko model o dokładności 5,5 Å (89, 99). Stwierdzono duże podobieństwo w ogólnym kształcie łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  hemoglobiny oraz mioglobiny. Nie powinno to budzić zdziwienia, skoro oba białka mają przecież tę samą właściwość przenoszenia tlenu (hemoglobina w krwi, mioglobina w mięśniach). Ważną cechą hemoglobiny była uchwytne różnica w wymiarach cząsteczki w stanie utlenionym i zredukowanym. Była to pierwsza obserwacja różnicy strukturalnej, wynikającej z funkcji białka. Również za pomocą rentgenowskiego ugięcia pod małymi kątami stwierdzono ostatnio (28) występowanie różnic w pewnych parametrach charakterystycznych dla hemoglobiny utlenionej i zredukowanej.

Do chwili obecnej zbadano jeszcze kilka innych białek. Ustalono całkowitą strukturę przestrzenną lizozymu (11, 12, 51, 101). Badano kryształy chymotrypsynogenu (76, 78), rybonukleazy (model 5,5 Å (6) i 2 Å (67), sprzeczne wzajemnie), paramiozyny (27), karboksypeptydazy A (81), papainy (38) oraz konkanawaliny A (49).

### 3. Kwas dezoksyrybonukleinowy

Na podstawie wyników rentgenowskich Wilkinsa i wsp. (139, 140) oraz otrzymanych znacznie wcześniej danych biochemicznych, określających między innymi stosunki ilościowe między zasadami azotowymi, Watson i Crick (136) ogłosili w 1953 roku genialny w swej prostocie model podwójnej spirali DNA\*. Model ten wyjaśniał również zdolność materiału genetycznego do samoodtwarzania się, co ma istotne znaczenie zarówno przy przekazywaniu cech, jak i przy zmianach mutacyjnych. Według Watsona i Cricka DNA występuje w postaci podwójnej spirali o skoku 34 Å; w poszczególnych łańcuchach zasady azotowe, położone naprzeciw siebie, wiążą się w pary komplementarne: adenina z tyminą, tworząc dwa wiązania wodorowe, oraz guanina z cytozyną, tworząc trzy wiązania wodorowe (schemat 1a). W ten sposób zapewniono zarówno specyficzność (ze względu na ilość wiązań wodorowych i określone pozycje ich występowania nie ma możliwości aby np. cytozyna stała zamiast tyminy naprzeciw adeniny) jak i równoległość obu łańcuchów (naprzeciw dużej zasady purynowej w jednym łańcuchu stoi zawsze w drugim łańcuchu mała zasada pyrymidynowa; nie ma więc możliwość tworzenia wybrzuszeń lub zagłębień, łańcuchy znajdują się zawsze w jednakowej odległości od siebie). Na jeden skok podwójnej spirali przypada 10 par zasad komplementarnych, tak więc odległości między kolejnymi parami wynoszą 3,4 Å. Pary zasad ułożone są współpłaszczyznowo (wszystkie zasady azotowe mają płaską konformację), a płaszczyzny te są prostopadłe do osi heliksu.

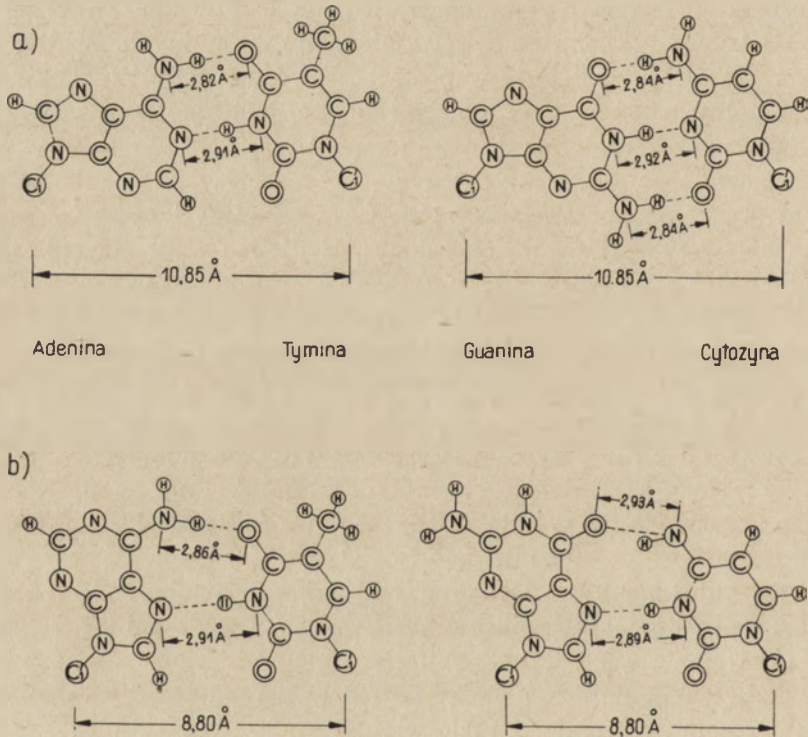
Opisana tutaj struktura DNA, nazywana konformacją B, występuje we włóknach soli sodowej lub potasowej DNA o 92% uwodnieniu. Przy zmniejszeniu uwodnienia włókna do 75% DNA zmienia konformację przyjmując kształt podwójnego heliksu o skoku 28 Å i 11 parach zasad na skok; płaszczyzny par komplementarnych odchylone są o 20° od kierunku prostopadłego do osi podłużnej heliksu. Taką strukturę DNA nazywa się konformacją A. Ze względów stereochemicznych przy konformacji A możliwy jest tylko heliks prawoskrętny, natomiast konformacja B mogła by występować w postaci heliksu i prawo- i lewoskrętnego. Stwierdzono jednak przechodzenie jednej konformacji w drugą wskutek uwodnienia lub odwodnienia

\* Niniejszy artykuł stanowi właściwą okazję do ustalenia jednorodnej nomenklatury polskiej dla struktur helikalnych (analogicznie do nomenklatury angielskiej): białek fibrylarnych —  $\alpha$ -spirala lub  $\alpha$ -heliks  
kwasów nukleinowych — podwójna spirala lub podwójny heliks (przyp. autora).

włókna; oznacza to, że DNA występuje zawsze w postaci prawoskrętnej podwójnej spirali.

Przy jeszcze mniejszym uwodnieniu i nieobecności soli DNA występuje w stanie semi-krystalicznym, zwanym formą C. Jest to podwójny heliks o skoku 31 Å i 9 1/3 par zasad na skok; odchylenie par od kierunku prostopadłego do osi heliksu wynosi 5° (85).

Potwierdzeniem modelu Watsona-Cricka są wyniki Luzzati'ego i wsp. (82, 83). Badając roztwory wodne DNA — czyli badając DNA w warunkach zbliżonych do naturalnych — metodą rozpraszania promieni rentgenowskich pod małymi kątami, opisaną w rozdziale V, wykazano, że cząsteczki DNA mają kształt pałeczkowaty o masie na jednostkę długości zgodnej z wartością wyznaczoną niejako teoretycznie na podstawie modelu Watsona-Cricka.



**Schemat 1.** Pary zasad komplementarnych z uwzględnieniem wiązań wodorowych: a) wg Watsona i Cricka b) wg Hoogsteena

Wolne zasady azotowe tworzą kryształy i dlatego ich struktura może być badana precyzyjnymi metodami, opisanymi w rozdziale III. Hoogsteen (60) zbadał kryształy, utworzone przez parę zasad komplementarnych: adeninę i tyminę. Pozycje, które biorą udział w tworzeniu wiązań glikozydowych, były zablokowane, tzn. analizowano kryształy 9-metyloadeniny i 1-metylotyminy. Hoogsteen stwierdził, że adenina i tymina two-



rzą parę komplementarną, ale wiązania wodorowe występują w innych miejscach, niż to podali Watson i Crick (schemat 1 a, b). Na podstawie tych wyników Hoogsteen opisał alternatywną hipotetyczną strukturę przestrzenną DNA. Była to również podwójna spirala, ale o innej średnicy i innych pozycjach wiązań wodorowych, niezbędnych dla utworzenia komplementarnych par zasad. Jak widać ze schematu 1a w modelu Watsona-Cricka odległość między atomami C', cząsteczek dezoksyrybozy, do których przyłączone były tworzące parę komplementarną zasady azotowe, wynosiła 10,85Å. Natomiast w parach Hoogsteena odległość ta jest mniejsza — 8,80 Å. Należy również zaznaczyć, że para guanina-cytozyna, pokazana na schemacie 1b (uwzględniona w modelu Hoogsteena), jest całkowicie spekulatywna i nie poparta żadnymi wynikami doświadczalnymi. Przeciwnie! Występowanie grupy iminowej przy atomie C-4 cytozyny (zamiast grupy aminowej) jest bardzo mało prawdopodobne i zostało, praktycznie biorąc, wykluczone. Natomiast stwierdzono doświadczalnie występowanie pary Watsona-Cricka zarówno w kryształach zasad: 9-etyloguaniny i 1-metylocytozyny (92), jak i w kryształach nukleozydów: dezoksyguanozyny i 5-bromodezoksycytydyny (53, 55). Oprócz tego stwierdzono, że model DNA zawierający pary Watsona-Cricka lepiej zgadza się z danymi doświadczalnymi, niż DNA zawierający pary Hoogsteena (2). W pracy tej do danych uzyskanych dla włókien DNA zastosowano analizę Fouriera, tzn. analizę stosowaną zazwyczaj do monokryształów. W następnych latach pojawiły się artykuły dyskusyjne o zaletach i wadach tej metody oraz realności jej stosowania wobec włókien DNA (1, 36, 37, 138).

#### 4. Kwas rybonukleinowy

Jak wynika z badań fizykochemicznych i biochemicznych RNA jest cząsteczką jednołańcuchową o niezbyt dużym stopniu uporządkowania. Znany jest model Fresco, Alberta i Doty (41), który określa cząsteczkę RNA jako łańcuch miejscami pozwijany, zawierający krótkie odcinki o strukturze podwójnej spirali; nie pasujące do komplementarnych par zasady tworzą w tym modelu pętle poza heliksem. Jest to jednak model hipotetyczny, ponieważ analiza rentgenowska nie dała dotychczas jednoznacznej odpowiedzi. Wprawdzie badania wskazują, że w formie replikatywnej RNA wirusów tworzy podwójną spiralę typu Watsona i Cricka (omówienie tych doświadczeń znaleźć można u Daviesa (33)), ale stopień nieuporządkowania rentgenogramów RNA innego pochodzenia jest tak duży, że analiza rentgenowska jest utrudniona. Ostatnio pojawiły się pierwsze prace nad tRNA w postaci krystalicznej (93). Na razie są to jednak tylko próby, gdyż kryształy są nietrwałe w warunkach wykonywania zdjęć rentgenowskich i psują się po kilku godzinach. Występują też duże trudności z uzyskaniem dobrych kryształów; otrzymywane kryształy zawierają cząsteczki soli, bądź też cząsteczki tworzą dimery\*.

### 5. Sztuczne polinukleotydy

Za tym, że RNA mogłyby tworzyć struktury spiralne, przemawiają wyniki eksperymentalne świadczące o występowaniu struktury podwójnej spirali w cząsteczkach sztucznych rybopolinukleotydów oraz ich kompleksów. Szczegółowe dane są podane w tablicy 3. Na schemacie 2 pokazano schematy wiązań wodorowych, występujących między zasadami tworzącymi komplementarną parę (lub trójkę dla spirali trójłańcuchowej) w helksie.

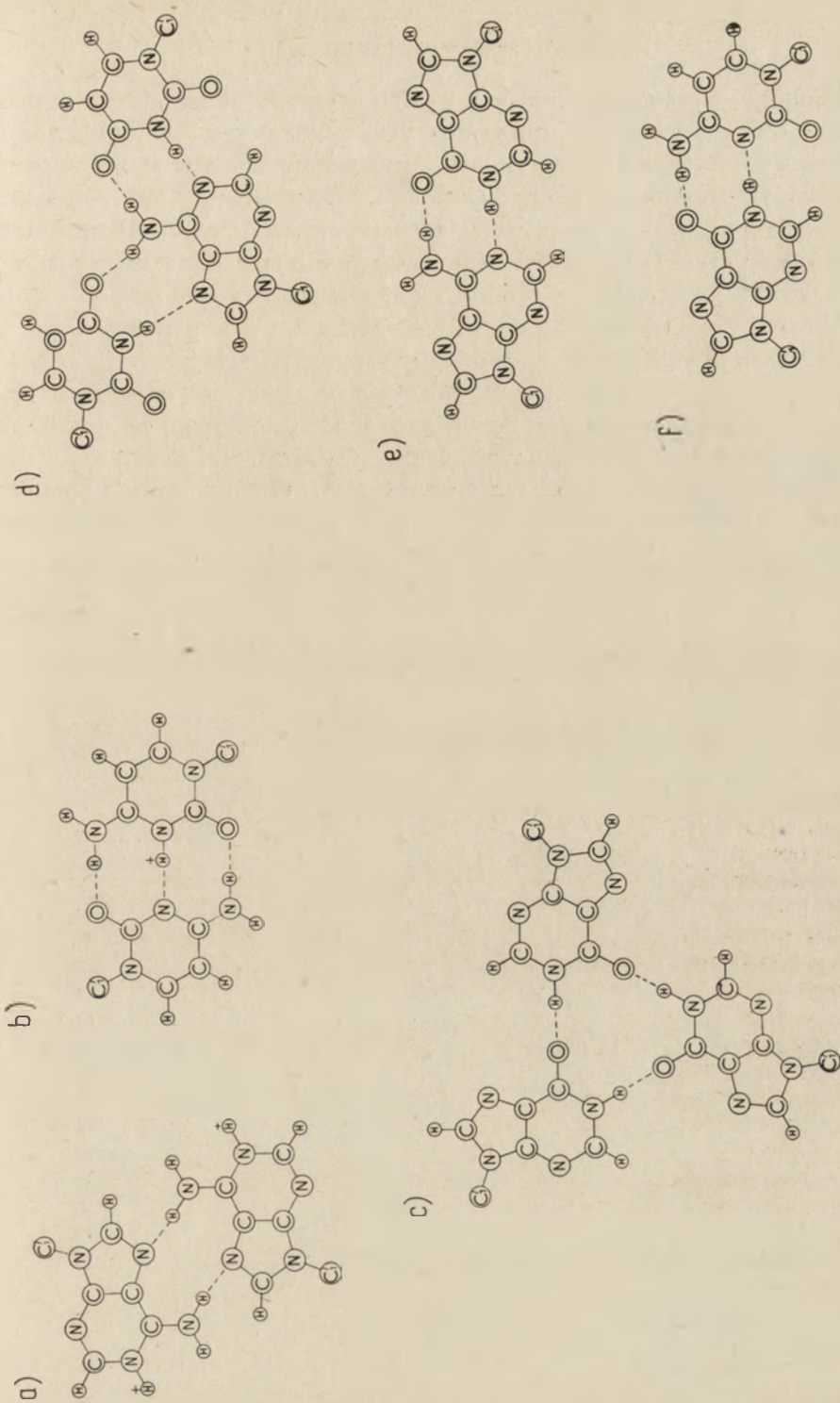
Tablica 3

Spiralne struktury sztucznych polinukleotydów i ich kompleksów (wg. D a v i e s a (33))

Polinukleotyd lub kompleks	Skok heliksu w Å	Liczba par zasad na skok	Odległość między kolejnymi parami zasad w Å	Nr schematu pokazującego układ wiązań wodorowych	Pozycja literatury
poli rA	30,4	8	3,8	2a)	109
poli rC	37,3	12	3,1	2b)	80
poli rI	29,4	8,7	3,4	2c)	106
poli (rA : rU)	30,9	10	3,1	1a)	114
poli (rA : 2rU)	31,1	10	3,1	2d)	113
poli (rA : rI)	38,8	11,4	3,4	2e)	107
poli (rI : rC)	36	12	3,0	2f)	34

Należy przy okazji zwrócić uwagę Czytelnika na fakt, że omawiane są tutaj jedynie wyniki prac rentgenowskich. Za pomocą innych metod badawczych, optycznych i hydrodynamicznych, stwierdzono występowanie wielu innych polinukleotydów i kompleksów polinukleotydów w formach spiralnych. Są to jednak badania innego rodzaju, w których wnioski dotyczące struktury są zawsze oparte na analogiach i rozważaniach porównawczych, są więc zawsze hipotetyczne; nie znaleziono bowiem dotychczas innej metody badań strukturalnych, niż dyfrakcja promieni rentgenowskich przez kryształy, ewentualnie uporządkowane struktury fibrylarne. Również występowanie polinukleotydów w postaci tzw. struktur obojętnych (jednołańcuchowych, podobnie jak RNA) stwierdzono za pomocą innych niż rentgenowska metod badawczych.

\* tRNA analizowano również za pomocą rozpraszania promieni rentgenowskich pod małymi kątami (patrz rozdz. V). Na podstawie tych wyników pod koniec lat sześćdziesiątych opublikowano tzw. model Holley'a, w którym cząsteczka tRNA ma kształt listka koniczyny.



**Schemat 2.** Pary (lub trójki) zasad występujące w helikalnych strukturach sztucznych polinukleotydów i ich kompleksów:  
 a) w poli rA; b) w poli rI; c) w poli rC; d) w poli (rA:2rU); e) w poli (rA:rI); f) w poli (rI:rC)

### 6. Zasady, nukleozydy i nukleotydy

Składniki kwasów nukleinowych tworzą kryształy, mogą więc być analizowane o wiele dokładniej, niż same kwasy nukleinowe i polinukleotydy. Donohue (35) omówił wymiary poszczególnych zasad azotowych. W tabelicy 4 zestawiono prace nad zasadami, nukleozydami i nukleotydami. Ostatnio opublikowano pracę przeglądową o krystalicznych strukturach puryn, pirymidyn i ich kompleksów, uwzględniającą dane uzyskane do 1969 roku (142). Natomiast w tabelicy 5 zestawiono prace nad parami i trójkami zasad. Na podstawie tych badań można było wyznaczyć pozycje wiązań wodorowych pokazanych między innymi na schemacie 2. Jest to równocześnie cenne uzupełnienie prac Watsona i Cricka, dotyczących struktury DNA, albowiem przy opracowywaniu modelu, opartego na wynikach rozpraszania promieni rentgenowskich przez włókna, nie można było dokładnie ustalić pozycji wiązań wodorowych tworzonych w parach komplementarnych; odel ten powstał przecież przy zastosowaniu metody transformacji optycznej, o której była mowa w rozdz. IV.

Tabela 4

Zbadane struktury krystaliczne zasad azotowych, nukleozydów i nukleotydów  
(wg Daviesa (33) — A; wg Sundaralingama (129) — B i C)

Badany związek	Pozycja literatura
<b>A. Zasady</b>	
Adenina. HCl	25
9-Metyloadenina	126
9-Metyloadenina. HBr	20
Guanina. HBr	18
Guanina. HCl. 2H <sub>2</sub> O	64
9-Metyloguanina. HBr	123
Cytozyna	8
Cytozyna. H <sub>2</sub> O	66
1-Metylocytozyna	87
1-Metylocytozyna. HBr	19
Kwas cytozyno-5-ocowy	84
Uracyl	94
1-Metylouracyl	47
5-Etylo-6-metylouracyl	105
1-Metylouracyl. HBr	122
Tymina. H <sub>2</sub> O	44
1-Metylotymina	59
<b>B. Nukleozydy</b>	
5-Fluoro-2'-dezoksyurydyna	50
5-Jodo-2'-dezoksyurydyna	23
5-Bromo-2'-dezoksyurydyna	62
5-Bromourydyna	62
Cytydyna	43

Tablica 4 cd

Badany związek	Pozycja literatury
Dezoksyadenozyna	137
5-[1-(2'-Dezoksy- $\alpha$ -D-rybofuranozyl)-uracylo]-dwusiarczek	118
6-Tiopuryny rybozyd	117
5-Bromourydyna + DMSO (kompleks)	63
Guanozyna	22
Inozyna	22
Chlorowodorek dezoksycytydyny	61
Dwuhydrotymidyna	773
Tymidyna	132
Jednowodny hydrobromek formycyny	74
5-[1-(2'-Dezoksy- $\beta$ -D-rybofuranozyl)-uracylo]-siarczek etylowy	39
5-[1-(2'-Dezoksy- $\alpha$ -D-rybofuranozyl)-uracylo]-siarczek metylowy	
<b>C. Nukleotydy</b>	39
3'-Fosforan cytydyny (kryształ ortorombowy)	130
3'-Fosforan cytydyny (kryształ jednoskośny)	21
3'-Fosforan adenozyne dwuwodny	128
5'-Fosforan tymidyny wapniowy (5'-TMP.Ca)	134
5'-Fosforan urydyny barowy (5'-UMP.Ba)	119
5' Fosforan inozyny sodowy (5'-IMP.Na)	104
5'-Fosforan inozyny dwusodowy (5'-IMP.2Na)	90
5'-Fosforan inozyny barowy (5'-IMP.Ba)	90
5'-Fosforan adenozyne jednowodny	77
5'-Fosforan rybozy barowy (5'-RP.Ba)	42
3', 5'-Cykliczny fosforan urydyny (sól trójetyloamoniowa)	30
3', 5'-Cykliczny fosforan adenozyne	135

### VIII. Zakończenie

Pomimo niezaprzeczalnych zalet rentgenowska analiza strukturalna ma cechy ujemne bądź niekorzystne przy badaniu biopolimerów. Jej wadą jest w odniesieniu do materiału biologicznego fakt, że wymaga ona próbek suchych lub prawie suchych. Poza tym najlepsze wyniki osiąga się na kryształach; jeśli badany obiekt jest tylko w miarę regularnym włóknem, ilość informacji jest ograniczona i niezbyt wielka. Nawet model Watsona-Cricka nie mówi nam (i nie może powiedzieć) nic o sekwencji DNA. Musimy ją odcyfrować za pomocą innych metod. Poza tym metoda rentgenowska nie jest metodą jednoznaczną. Trzeba się posługiwać różnymi informacjami dodatkowymi, biochemicznymi czy fizykochemicznymi, aby tę jednoznaczność osiągnąć. Dlatego też warto szukać innych metod badawczych. Wydaje się, że dużą przyszłość mają przed sobą metody optyczne, związane z aktywnością optyczną cząsteczek lub ich poszczególnych segmentów (dichroizm kołowy — CD i dyspersja rotacji optycznej — ORD) bądź też z absorpcją promieniowania spolaryzowanego.

Tablica 5

Zbadane dotychczas struktury krystaliczne par zasad i nukleozydów (wg Sakore, Tavaie i Sobell (112) oraz Daviesa (33))

Badany obiekt	Stosunek stechiometryczny składników	Typ tworzonych par	Pozycja literatury
9-Metyloadenina: <i>I</i> -metylotymina	1 : 1	H <sup>1</sup>	58, 60
9-Metyloadenina: <i>I</i> -metylo-5-bromouracyl	1 : 1	H	7
9-Etyloadenina: <i>I</i> -metylouracyl	1 : 1	H	86
9-Etyloadenina: <i>I</i> -metylo-5-fluorouracyl	1 : 1	H	133
9-Etyloadenina: <i>I</i> -metylo-5-bromouracyl	1 : 1	RH <sup>2</sup>	69, 70
9-Etylo-8-bromoadenina: <i>I</i> -metylo-5-jodouracyl	1 : 2	H, RWC <sup>4</sup>	112
Adenozyzna: 5-jodourydyna	1 : 1	RWC	131
Adenozyzna: 5-bromourydyna	1 : 1	RH	112
Adenozyzna: tymidyna	1 : 1	RH	52, 54
9-Etyloguanina: 5-bromo- <i>I</i> -metylocytozyna	1 : 1	RH	110
9-Etyloguanina: <i>I</i> -metylocytozyna	1 : 1	WC <sup>3</sup>	124
Dezoksyguanozyna: 5-bromodezoksycytydyna	1 : 1	WC	92
9-Etylo-2,6-dwuaminopuryna: <i>I</i> -metylotymina	1 : 1	WC	53, 55
9-Etylo-2,6-dwuaminopuryna: <i>I</i> -metylo-5-jodouracyl	1 : 2	WC, RH	111
9-Etylo-2-aminopuryna: <i>I</i> -metylo-5-fluorouracyl	1 : 2	RWC, H	79, 111
9-Etylo-2-aminopuryna: <i>I</i> -metylo-5-bromouracyl	1 : 1	WC	88, 121
9-Etylo-2-aminopuryna: <i>I</i> -metylo-5-bromouracyl	1 : 1	WC	88

1 para typu Hoogstecna

2 odwrotna para typu Hoogstecna (2-CO zamiast 4-CO uracylu)

3 para typu Watson i Cricka

4 odwrotna para typu Watsona i Cricka (2-CO zamiast 4-CO uracylu)

## LITERATURA

1. Arnott S., *Science* **167**, 1694 (1970).
2. Arnott S., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., Langridge R., *J. Mol. Biol.* **11**, 391 (1965).
3. Astbury W. T., *Trans. Faraday Soc.* **34**, 378 (1938).
4. Astbury W. T., Street A., *Phil. Trans. A* **230**, 75 (1931).
5. Astbury W. T., Woods H. J., *Phil. Trans. A* **232**, 333 (1933).
6. Avey H. P., Boles M. O., Carlisle C. H., Evans S. A., Morris S. J., Palmer R. A., Woolhouse B. A., Shall S., *Nature* **213**, 557 (1967).
7. Bakłagina J. G., Wolkenschtejn M. W., Kondraszew J. D., *Żurnal Strukt. Chim.* **7**, 399 (1966).
8. Barker D. L., Marsh R. E., *Acta Cryst.* **17**, 1581 (1964).
9. Bear R. S., *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 1625 (1945).
10. Bernal J. D., Fankuchen I., Perutz M. F., *Nature* **141**, 523 (1938).
11. Blake C. C. F., Fenn R. H., North A. C. T., Phillips D. C., Poljak R. T., *Nature* **196**, 1173 (1962).
12. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **167**, 348 (1967).
13. Blow D. M., Rossmann M. G., Jeffrey B. A., *J. Mol. Biol.* **8**, 65 (1964).
14. Bluhm M. M., Bodo G., Dintzis H. M., Kendrew J. C., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A*, **246**, 369 (1958).
15. Bodo G., Dintzis H. M., Kendrew J. C., Wyckoff H. W., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A* **253**, 70 (1959).
16. Bramford C. H., Brown L., Elliott A., Hanby W. E., Trotter I. F., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **141**, 49 (1953).
17. Bramford C. H., Brown L., Elliott A., Hanby W. E., Trotter I. F., *Nature* **173**, 27 (1954).
18. Broomhead J. M., *Acta Cryst.* **4**, 92 (1951).
19. Bryan R. F., Tomita K., *Acta Cryst.* **15**, 1174 (1962).
20. Bryan R. F., Tomita K., *Acta Cryst.* **15**, 1179 (1962).
21. Bugg C. E., Marsh R. E., *J. Mol. Biol.* **25**, 67 (1967).
22. Bugg C. E., Thewalt U. T., Marsh R. E., praca prezentowana na American Crystallography Association Meeting, Buffalo, New York, 12—16 sierpień 1968 r. (abstrakty).
23. Camerman N., Trotter J., *Acta Cryst.* **18**, 203 (1965).
24. Caspar D. L. D., *Nature* **177**, 928 (1956).
25. Cochran W., *Acta Cryst.* **4**, 81 (1951).
26. Cochran W., Crick F. H. C., Vand V., *Acta Cryst.* **5**, 581 (1952).
27. Cohen C., Holmes K. C., *J. Mol. Biol.* **6**, 423 (1963).
28. Conrad H., Mayer A., Thomas H. P., Vogel H., *J. Mol. Biol.* **41**, 225 (1969).
29. Corey R. B., Stanford R. H., Marsh R. E., Leung Y. C., Kay L. M., *Acta Cryst.* **15**, 1157 (1962).
30. Coulter C. L., *Science* **159**, 888 (1968).
31. Cullis A. F., Muirhead H., Perutz M. F., Rossmann M. G., North A. C. T., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A* **265**, 15 (1962).
32. Cullity B. D., Podstawy dyfrakcji promieni rentgenowskich, PWN Warszawa 1964.
33. Davies D. R., *Annual Rev. Biochem.* **36** (I), 321 (1967).
34. Davies D. R., Rich. A., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1003 (1958).
35. Donohue J., *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 591 (1968).

36. Donohue J., *Science* **165**, 1091 (1969).
37. Donohue J., *Science* **167**, 1700 (1970).
38. Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Marrink J., Mun-  
nik J., Wolthers B. G., *J. Mol. Biol.* **5**, 398 (1962).
39. Frank G. W., praca prezentowana na American Crystallography Association  
Meeting, Buffalo, New York, 12—16 sierpień 1968 r. (abstrakty).
40. Franklin R. E., Holmes K. C., *Acta Cryst.* **11**, 213 (1958).
41. Fresco J. R., Alberts B., Doty P., *Nature* **188**, 98 (1960).
42. Furberg S., Mostad A., *Acta Chem. Scand.* **16**, 1627 (1962).
43. Furberg S., Peterson C. S., Rømming Chr., *Acta Cryst.* **18**, 313  
(1965).
44. Gerdil R., *Acta Cryst.* **14**, 333 (1961).
45. Green D. W., Aschaffenburg R., Coppola J. C., Simmons R.  
M., Dunnill P. J., *Acta Cryst.* **16A**, 77 (1963).
46. Green D. W., Ingram V. M., Perutz M. F., *Proc. Roy. Soc. (London)*  
*Ser. A* **225**, 287 (1954).
47. Green D. W., Mathews F. S., Rich A., *J. Biol. Chem.* **237**, 3573 (1962).
48. Green D. W., North A. C. T., *Acta Cryst.* **13**, 1055 (1960).
49. Greer J., Kaufman H. W., Kalb A. J., *J. Mol. Biol.* **48**, 365 (1970).
50. Harris R. D., MacIntyre W. M., *Biophys. J.* **4**, 203 (1964).
51. Harte R. A., Rupley J. A., *J. Biol. Chem.* **243**, 1663 (1968).
52. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**,  
872 (1963).
53. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., *Nature* **202**, 969 (1964).
54. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., *Acta Cryst.* **18**, 525 (1965).
55. Haschemeyer A. E. V., Sobell H. M., *Acta Cryst.* **19**, 125 (1965).
56. Holmes K. C., Blow D. M., *Methods Biochem. Analysis* **13**, 113 (1965).
57. Holmes K. C., Leberman R., *J. Mol. Biol.* **6**, 439 (1963).
58. Hoogsteen K., *Acta Cryst.* **12**, 822 (1959).
59. Hoogsteen K., *Acta Cryst.* **16**, 28 (1963).
60. Hoogsteen K., *Acta Cryst.* **16**, 907 (1963).
61. Hunt J., Subramanian E., praca prezentowana na American Crystal-  
lography Association Meeting, Tuscon, Arizona, 4—7 luty 1968 r. (abstrakty).
62. Iball J., Morgan C. H., Wilson H. R., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A*  
**295**, 320 (1966).
63. Iball J., Morgan C. H., Wilson H. R., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A*  
**302**, 225 (1968).
64. Iball J., Wilson H. R., *Nature* **198**, 1193 (1963).
65. International Tables for X-ray Crystallography, tom I, Kynoch Press, Birming-  
ham 1952.
66. Jeffrey G. A., Kinoshita Y., *Acta Cryst.* **16**, 20 (1963).
67. Kartha G., Bello J., Harker D., *Nature* **213**, 862 (1967).
68. Kartha G., Bello J., Harker D., DeJarnette F. E., w Aspects of  
Protein Structure, red. G. H. Ramachandran, Academic Press, New York 1963,  
str. 13.
69. Katz L., Tomita K., Rich A., *J. Mol. Biol.* **13**, 340 (1965).
70. Katz L., Tomita K., Rich A., *Acta Cryst.* **21**, 754 (1966).
71. Kendrew J. C., *Science* **139**, 1259 (1963).
72. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. G.,  
Davies D. R., Phillips D. C., Shore V. C., *Nature* **185**, 422 (1960).
73. Konnert J., Karle I. L., Karle J., praca prezentowana na American  
Crystallography Association Meeting, Buffalo, New York, 12—16 sierpień 1968 r.  
(abstrakty).



74. Koyama G., Maeda K., Umezawa H., Iitaka Y., *Tetrahedron Letters* **6**, 597 (1966).
75. Kratky O., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **13**, 107 (1963).
76. Kraut J., High D. F., Sieker L. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 839 (1964).
77. Kraut J., Jensen L. H., *Acta Cryst.* **16**, 79 (1963).
78. Kraut J., Sieker L. C., High D. F., Freer S. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1417 (1962).
79. Labana L., Sobell H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 459 (1967).
80. Langridge R., Rich A., *Nature* **198**, 725 (1963).
81. Ludwig M. L., Paul I., Pawley G. S., Lipscomb W. N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 282 (1963).
82. Luzzati V., Luzzati D., Mason F., *J. Mol. Biol.* **5**, 375 (1962).
83. Luzzati V., Nicolaieff A., Mason F., *J. Mol. Biol.* **3**, 185 (1961).
84. Marsh R. E., Bierstedt R., Eichhorn E. L., *Acta Cryst.* **15**, 310 (1962).
85. Marvin D. A., Spencer M., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., *J. Mol. Biol.* **2**, 19 (1961).
86. Mathews F. S., Rich A. *J. Mol. Biol.* **8**, 89 (1964).
87. Mathews F. S., Rich A., *Nature* **201**, 179 (1964).
88. Mazza F., Sobell H. M., Kartha G., *J. Mol. Biol.* **43**, 407 (1969).
89. Muirhead H., Perutz M. F., *Nature* **199**, 633 (1963).
90. Nagashima N., Iitaka Y., *Acta Cryst.* **24B** 1136 (1968).
91. Nyburg S. C., *X-Ray Analysis of Organic Structures*, Academic Press, New York 1961.
92. O'Brien E. J., *J. Mol. Biol.* **7**, 107 (1963).
93. Paradies H., Hasko, Sjöquist J., *Nature* **226**, 159 (1970).
94. Parry G. S., *Acta Cryst.* **7**, 313 (1954).
95. Patterson A. L., *Phys. Rev.* **46**, 372 (1934).
96. Patterson A. L., *Z. Krist.* **90**, 517 (1935).
97. Pauling L., Corey R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **37**, 235, 241, 251, 256, 261, 271, 282, 729 (1951).
98. Pauling L., Corey R. B., Branson H. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **37**, 205 (1951).
99. Perutz M. F., Rossmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H., Will G., North A. C. T., *Nature* **185**, 416 (1960).
100. Phillips D. C., w *Advances in Structure Research by Diffraction Methods*, tom 2, red. R. Brill, R. Mason, Vieweg und Sohn, Braunschwig 1966, str. 75
101. Phillips D. C., *Sci. Am.* str. 78 (Nov. 1966).
102. Poljak R. J., *J. Mol. Biol.* **6**, 244 (1963).
103. Ramachandran G. N., Kartha G., *Nature* **174**, 269 (1954).
104. Rao S. T., Sundaralingam M., *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 1210 (1969).
105. Reeke G. N., Marsh R. E., *Acta Cryst.* **20**, 703 (1966).
106. Rich A., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 502 (1958).
107. Rich A., *Nature* **181**, 521 (1958).
108. Rich A., Crick F. H. C., *Nature* **176**, 915 (1955).
109. Rich A., Davies D. R., Crick F. H. C., Watson J. D., *J. Mol. Biol.* **3**, 71 (1961).
110. Sakore T. D., Sobell H. M., *J. Mol. Biol.* **43**, 77 (1969).
111. Sakore T. D., Sobell H. M., Mazza F., Kartha G., *J. Mol. Biol.* **43**, 385 (1969).
112. Sakore T. D., Tavale S. S., Sobell H. M., *J. Mol. Biol.* **43**, 361 (1969).
113. Sasisekharan V., Davies D. R., Sigler P. B. (dane nie publikowane, patrz 33).

114. Sasisekharan V., Sigler P. B., *J. Mol. Biol.* **12**, 296 (1965).
115. Scouloudi H., *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A* **258**, 181 (1960).
116. Scouloudi H., *J. Mol. Biol.* **40**, 353 (1969).
117. Shefter E., *J. Pharm. Sci.* (w druku).
118. Shefter E., Kotik M. P., Barolos T. J., *J. Pharm. Sci.* **5**, 1293 (1967).
119. Shefter E., Trueblood K. N., *Acta Cryst.* **18**, 1067 (1965).
120. Sigler P. B., Skinner H. C. W., Coulter C. L., Kallos J., Braxton H., Davies D. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1146 (1964).
121. Sobell H. M., *J. Mol. Biol.* **18**, 1 (1966).
122. Sobell H. M., Tomita K., *Acta Cryst.* **17**, 122 (1964).
123. Sobell H. M., Tomita K., *Acta Cryst.* **17**, 126 (1964).
124. Sobell H. M., Tomita K., Rich A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 885 (1963).
125. Steinrauf L. K., Reddy J. M., Dickerson R. E., *Acta Cryst.* **15**, 423 (1962).
126. Stewart R. F., Jensen L. H., *J. Chem. Phys.* **40**, 2071 (1964).
127. Strandberg B., Tilander B., Fridborg K., Lindskog S., Nyman P. O., *J. Mol. Biol.* **5**, 583 (1962).
128. Sundaralingam M., *Acta Cryst.* **21**, 495 (1966).
129. Sundaralingam M., *Biopolymers* **7**, 821 (1969).
130. Sundaralingam M., Jensen L. H., *J. Mol. Biol.* **13**, 914 (1965).
131. Tavale S. S., Sakore T. D., Sobell H. M., *J. Mol. Biol.* **43**, 375 (1969).
132. Tollin P., Wilson H. R., Young D. W., *Nature* **217**, 1148 (1968).
133. Tomita K., Katz L., Rich A., *J. Mol. Biol.* **30**, 545 (1967).
134. Trueblood K. N., Horn P., Luzzati V., *Acta Cryst.* **14**, 965 (1961).
135. Watenpaugh K., Dow J., Jensen L. H., Furberg S., *Science* **159**, 206 (1968).
136. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature* **171**, 737 (1953).
137. Watson J. D., Sutor D. J., Tollin P., *Acta Cryst.* **19**, 111 (1965).
138. Wilkins M. H. F., Arnott S., Marvin D. A., Hamilton L. D., *Science* **167**, 1693 (1970).
139. Wilkins M. H. F., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature* **172**, 759 (1953).
140. Wilkins M. H. F., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature* **171**, 737 (1953).
141. Wilson H. R., *Diffraction of X-rays by Proteins, Nucleic Acids and Viruses*, Edward Arnold Publishers, Londyn 1966.
142. Voet D., Rich A., *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **10**, 183 (1970).

BARBARA LUBAS\*

## Charakterystyka uwodnienia makromolekuł DNA i metody jego wyznaczenia

### The Hydration of DNA Macromolecules — Theory and Methods of Determination

Centres of hydration in DNA, types of DNA water bridges and interactions of DNA macromolecules with water molecules are characterized. Determination of DNA hydration by dielectric techniques, ultracentrifugation, selfdiffusion measurements, calorimetry, IR and UV spectrophotometry, X-ray scattering and nuclear magnetic resonance techniques are described and compared.

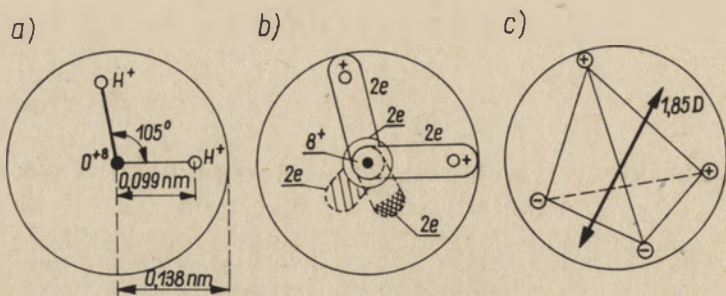
W żywych komórkach i w roztworach wodnych makromolekuły biologicznie aktywne oddziaływując z poszczególnymi drobinami wody, wiążą je strukturalnie, co prowadzi do tworzenia wokół makromolekuły warstwy hydratacyjnej określanej mianem uwodnienia. Ilościowe oznaczanie uwodnienia, szczególnie makromolekuł białek i kwasów nukleinowych, ułatwia zrozumienie przebiegu szeregu procesów fizjologicznych na poziomie molekularnym. Uwodnienie makromolekuł DNA odgrywa rolę czynnika stabilizującego jego strukturę. Brak monografii o uwodnieniu DNA zachęcał do opracowania tego tematu. Rozbieżne wyniki oznaczenia uwodnienia, uzyskiwane różnymi metodami przedyskutowano uwzględniając badania własne nad odróżnieniem stanu wody związanej z DNA strukturalnie od stanu wody uporządkowanej.

#### I. Struktura wody a makromolekuły biologicznie czynne

Strukturę pojedynczej drobinny wody według Bernala i Fowlera (6, 7) oraz Popple (88, 89) przedstawia schemat 1. Model planarny kuliastej drobinny wody (schemat 1a) uwzględnia rozkład mas i dodatnich ładunków w drobinie; model przestrzenny (schemat 1b) uwzględnia uproszczoną konfigurację elektronową. Konfiguracja ta prowadzi według Bjeruma (9) do pełnego ekranowania ośmiu dodatnich ładunków w jądrze atomu tlenu, lecz do niepełnego ekranowania dwóch protonów. Poza tym dwie odosobnione pary elektronowe podwyższają gęstość elektronową w po-

\* Dr, Katedra Chemii Ogólnej, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

blizu swych orbitali. Wskutek tego otrzymujemy w drobinie wody tetradryczny rozkład ładunków w postaci czterech biegunów na powierzchni drobiny i wypadkowy moment dipolowy wynoszący 1,85D (schemat 1c).



Schemat 1. Modele struktury drobiny wody wg (6, 7, 88, 89)

a — model planarny, b — model przestrzenny, c — z uwzględnieniem momentu dipolowego

Każdy z czterech biegunów drobiny wody może oddziaływać z przeciwnym biegunem drobiny sąsiedniej i w ten sposób powstaje konstrukcja złożona z jednej drobiny centralnej i czterech peryferyjnych, których środki tworzą również czworościan. Konstrukcja ta, powiązana wiązaniami wodorowymi, stanowi element strukturalny heksagonalnej sieci krystalicznej lodu.

Woda ciekła charakteryzuje się, podobnie jak heksagonalna struktura lodu, budową „azurową”. Trinczer (104) obliczył, że jedynie 37% objętości ciekłej wody zajmuje masa drobin, a pozostałą objętość stanowią labilne quasi-mikrokryształy lodu lub objętość efektywna dla obrotowego i translacyjnego ruchu drobin.

Według Samojłowa (95) elementy strukturalne wody stanowią mikrokryształiczne agregaty dwóch, czterech i ośmiu drobin. Podwyższenie temperatury prowadzi do zmniejszenia się liczby agregatów złożonych z ośmiu i czterech drobin i wzrostu liczby dimerów i drobin pojedynczych. Średni czas życia pojedynczego mikrokryształu jest rzędu  $10^{-9}$ s (41, 95).

Fluktuację krystalicznych „mikrofaz” wody tłumaczy fakt, że energia wiązania wodorowego, która warunkuje istnienie mikrofaz jest ilościowo porównywalna z energią cieplną wody, wynoszącą w temperaturze pokojowej około 20kJ/mol (104).

W badaniach wielu własności wody przyjmuje się także model Forslinda (33), według którego sieć wody złożona ze wspomnianych agregatów kilkudrobinowych, zawiera defekty Frenkla i pojedyncze przemieszczone drobinę wody w pustych przestrzeniach sieci.

Istnienie w wodzie strukturalnie różnych i przechodzących w siebie nawzajem mikrofaz, quasi-krystalicznej i niekrystalicznej, warunkuje oddziaływanie wody z rozpuszczonymi w niej związkami polarnymi i niepolarnymi.

Zgodnie z termodynamiczną zasadą le Chatellier-Browna w dwufazowym układzie będącym w równowadze zachodzą pod wpływem działania zewnętrznego takie zmiany, które działanie to osłabiają. A zatem związki polarne powinny rozpuszczać się w ciekłej mikrofazie wody, gdzie zachodzi osłabienie pola elektrycznego cząstki naładowanej ze względu na dowolną orientację swobodnych dipoli wodnych. Natomiast związki niepolarne powinny rozpuszczać się w mikrofazach związanej strukturalnie wody krystalicznej. Słuszność takich przewidywań potwierdzili doświadczalnie Frank i Wen (35) oraz Klotz (59).

Makromolekuły biologicznie czynne zawierają zarówno grupy polarne jak i niepolarne. W roztworach wodnych niepolarne grupy końcowe w łańcuchach bocznych makromolekuły będą stabilizować uporządkowaną mikrofazę krystaliczną, a grupy polarne będą otoczone stabilną wodą ciekłą. Uporządkowane ustawienie grup niepolarnych w łańcuchach bocznych daje ponadto efekt kooperacji: stabilizacja wody strukturalnie związanej wzdłuż tych grup może się zwiększać i rozprzestrzeniać także promieniście co powoduje, że makromolekuła wiąże dużo więcej peryferyjnych warstw wody niż ta sama liczba pojedynczych cząstek niepolarnych. Koncepcję tę wprowadził Klotz (59, 60) dla polipeptydów i białek.

Zgodnie z hipotezą Klotza niepolarne łańcuchy boczne w białkach tworzą z wodą, podobnie jak liczne węglowodory, układy krystalohydratów. Hydraty te połączone razem tworzą trwałe sieci „lodopodobne”, w których niepolarne grupy na zewnątrz makrodrobiny są w bezpośrednim kontakcie z wodą.

Inną koncepcję podał Kauzmann (55, 56). Uważa on, że grupy niepolarne wykazują tendencję do unikania kontaktu z fazą wodną i wskutek tego zlepiają się między sobą w postaci międzydrobinowych micelli. Dla oznaczenia sił, które te tendencje warunkują, Kauzmann wprowadził pojęcie wiązania hydrofobowego. Opierając się na danych termodynamicznych dla roztworów węglowodorów w rozpuszczalnikach polarnych i niepolarnych podanych przez Franka i Evansa (34), Kauzmann ocenił siłę wiązania hydrofobowego i doszedł do wniosku, że najbardziej stabilne będą takie konformacje polipeptydów, w których niepolarne łańcuchy boczne są w kontakcie między sobą w wewnętrznej części cząsteczki białka, gdzie zawartość wody jest względnie mała.

Szczegółowe rozważania teoretyczne oparte na rachunku termodynamiczno-statystycznym przeprowadzili dla wiązania hydrofobowego Nemethy i Scheraga (84, 85). Oceniając zmiany energii swobodnej przy powstawaniu wiązania hydrofobowego uwzględnili oni zmiany struktury wody, siły międzycząsteczkowe pomiędzy grupami oraz ograniczenie rotacji wokół wiązań. Obliczenia potwierdziły hipotezę Kauzmana (55, 56), która za główny czynnik określający siłę wiązania hydrofobowego uważa zmiany w strukturze wody.

Pomimo przeciwstawności koncepcji Klotza i Kauzmana obie potwierdzają ważność udziału w stabilizacji trzeciorzędowej struktury makromolekuł oddziaływania niepolarnych grup w łańcuchach bocznych z wodą. Obie koncepcje są uzasadnione z punktu widzenia termodynamiki, a rozbieżności między nimi, co wypukła Schachman (96), dotyczą właściwie natury wiązania hydrofobowego, a więc problemu o charakterze teoretycznym.

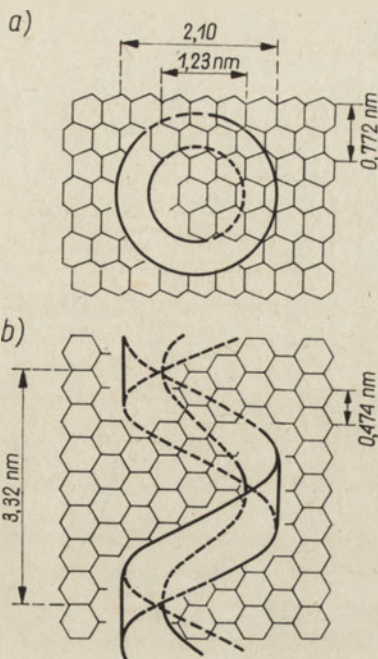
## II. Struktura uwodnienia DNA

### 1. Modele teoretyczne

Wpływ wody na strukturę DNA wykazano po raz pierwszy metodami rentgenowskimi (36, 113) jeszcze przed opublikowaniem przez Watsona i Cricka (112) modelu DNA w postaci podwójnej spirali łańcuchów polinukleotydowych. Wykazano, że rozkład natężeń w obrazach dyfrakcyjnych promieniowania X dla serii punktów równoodległych od osi spirali DNA jest określony przez kwadraty funkcji Bessela i że DNA istnieje w stanie stałym w trzech odmiennych formach strukturalnych, zależnych od nawilgocenia próbki. DNA w roztworze wodnym oraz DNA w stanie stałym przy wilgotności względnej otoczenia wyższej niż 85% występuje jako tzw. struktura B, w której pary zasad purynowo-pirymidynowych ułożone są prostopadle do osi podwójnej spirali. W zakresie wilgotności 75—80% stwierdzono dla DNA występowanie również bispiralnej formy A. Przy przejściu strukturalnym B → A występuje systematyczne nachylenie się par zasad w taki sposób, że kąt pomiędzy osią spirali i płaszczyzną wyznaczoną przez pary zasad jest w końcowym etapie przejścia równy około 70°. Przejściu strukturalnemu A ⇌ B towarzyszy również zmiana skoku spirali DNA. Odległość powtarzającego się elementu krystalograficznego wynosi w temperaturze 0°C dla formy B — 3,2 nm, a dla formy A, bardziej zwartej — 2,8 nm.

Przy jeszcze mniejszej wilgotności względnej rzędu 55—75% obraz dyfrakcyjny promieniowania X wskazuje na przejście DNA w stan nieuporządkowany we wszystkich kierunkach przestrzeni, czyli w tzw. strukturę C, która nie ma budowy krystalicznej.

Pierwszy model uporządkowania struktury wody wokół makromolekuły DNA podał Jacobson (50). Zauważył on, że objętość pustych przestrzeni w quasikrystalicznej tetraedrycznej strukturze wody charakteryzuje się uporządkowaniem podobnym do spirali i że podwójna spirala DNA w postaci zaproponowanej przez Watsona i Cricka jest dobrze dopasowana do struktury sieci wodnej. Model Jacobsona przedstawiony na schemacie 2 pokazuje dopasowanie sieci wodnej do struktury DNA w płaszczyźnie prostopadłej do osi podwójnej spirali (schemat 2a), oraz w płaszczyźnie wyznaczonej przez tę oś (schemat 2b).



**Schemat 2.** Dopasowanie struktury sieci wodnej do podwójnej spirali DNA wg Jacobsona (50)

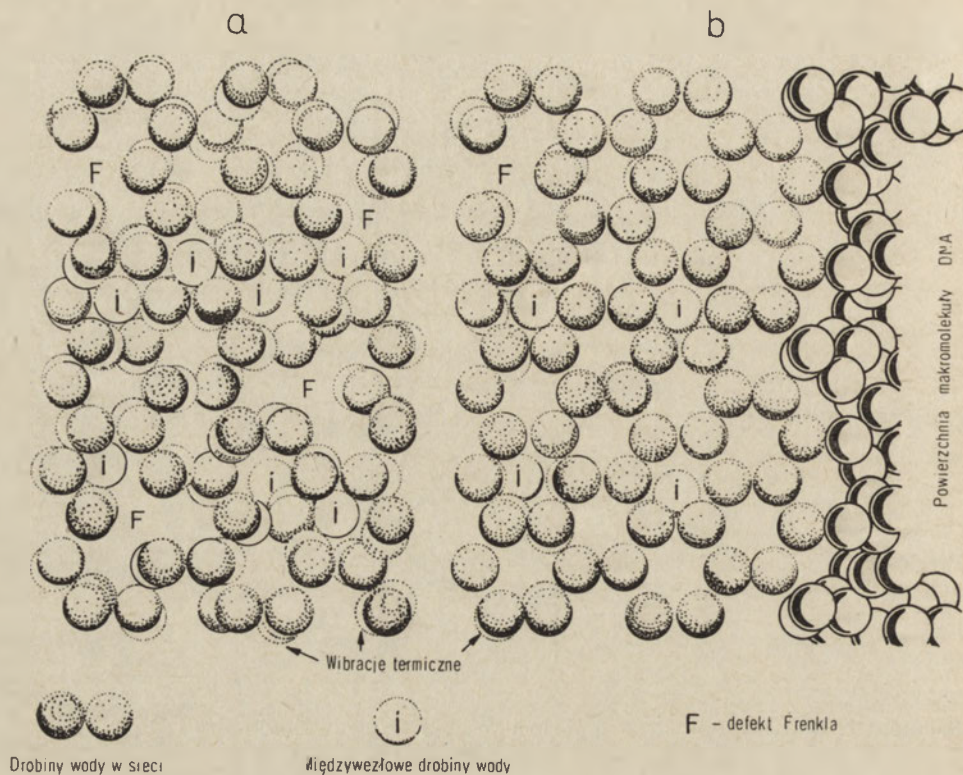
a — poprzecznie do osi łańcucha DNA, b — wzdłuż osi łańcucha

Jak wynika z obliczeń Jacobsona dla struktury DNA typu B odpowiedniość między siecią wodną i siecią makromolekuły jest idealna, gdyż odległość między nukleotydami wzdłuż osi spirali jest wtedy równa rozmiarom jednostkowej komórki sieci wodnej.

Dalsze rozważania nad modelem struktury powłoki wodnej DNA przeprowadzał Jacobson (51) dyskutując wyniki swych badań stałych dielektrycznych w wodnych roztworach DNA. Schemat 3 ilustruje wpływ, jaki makromolekuła DNA może wywierać na uporządkowanie quasi-kryształicznej struktury sieci wodnej.

Strukturalne wiązanie drobin wody przez DNA stabilizuje wg Jacobsona sieć wodną w sposób, który redukuje vibracje cieplne (zwłaszcza w okolicy makromolekuły) i powoduje zmniejszenie się liczby defektów Frenkla.

Obydwa modele Jacobsona stanowią analogię do hipotezy krystalohydratów makromolekuł (59, 60). Jacobson zaznaczył jednak, że mimo iż zaproponowana przez niego struktura określana jest jako „lodopodobna”, to jednak jej gęstość i własności termodynamiczne wskazują, że jest ona bliższa fazie ciekłej (choć zorganizowanej) wody niż fazie lodu.

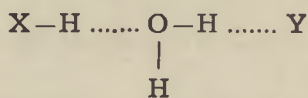


**Schemat 3.** Struktura wody wg modelu Forslinda (33, 51)

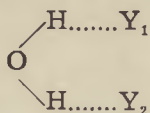
a — struktura wody ciekłej, b — struktura wody w okolicy makromolekuły

## 2. Typy i charakterystyka mostków wodnych

Podstawą hydratacji grup składowych DNA jest tworzenie mostków wodnych połączonych z daną grupą wiązaniem wodorowym. Mostki te mogą stanowić: 1. połączenie grupy protonodonorowej (X-H) z atomem tlenu wody i równocześnie połączenie atomu wodoru wody z grupą protonoakceptorową Y:



2. połączenie dwóch grup akceptorowych  $Y_1$  i  $Y_2$  zakładające równoczesne donorowanie w obydwu atomach wodoru wody:

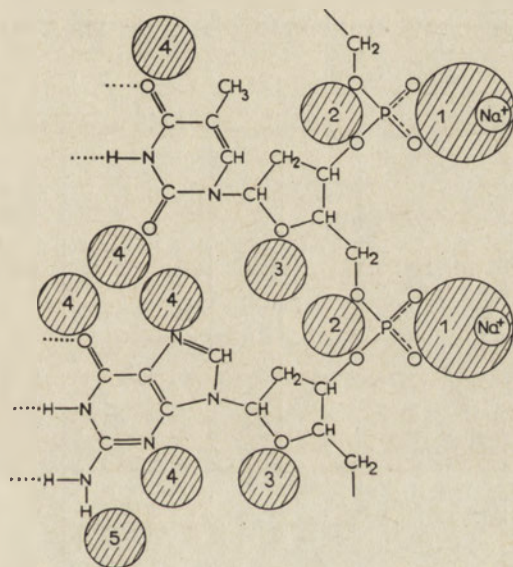


W obu rodzajach połączeń liczba związanych drobin wody może być różna i w zależności od niej mostki wodne określa się jako pojedyncze, podwójne, potrójne lub wielokrotne. Utworzenie pojedynczego mostka wo-



dnego typu 1 jest teoretycznie możliwe, jeżeli odległość między grupami X i Y nie przekracza 0,3 nm, a maksymalne odchylenie kątowe od jednej prostej dla odcinków X---H i H---Y nie przekracza  $15^\circ$  (25). W przypadku mostka podwójnego to ograniczenie kątowe jest nieco skompensowane. Ogólnie biorąc, siła wiązania mostków pojedynczych jest większa niż podwójnych lub wielokrotnych.

Tworzenie mostków wodnych w DNA można uzasadnić występowaniem w DNA grup donorowych i akceptorowych. Głównymi grupami donorowymi są protony w grupach aminowych zasad, zaś akceptorowymi — atomy tlenu w grupach fosforanowych, karbonylowych i w pierścieniu dezoksyrybozy oraz atomy azotu w grupach aminowych i w pierścieniach zasad (30, 31, 61, 74, 80, 81, 82). Pięć rodzajów możliwych centrów hydratacyjnych w drobinie DNA przedstawiono na schemacie 4. Kolejność hydratacji miejsc od 1 do 5 jest podyktowana siłą wiązania wody (31), maksymalną dla centrów 1 i zmniejszającą się stopniowo dla następujących centrów.



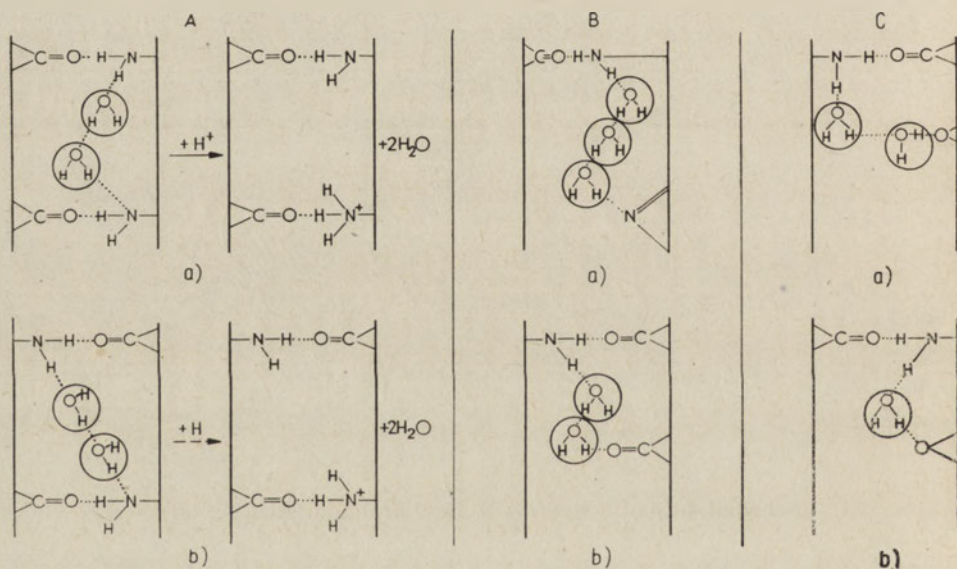
Schemat 4. Centra hydratacyjne w drobinie DNA wg (31)

Szczegółowe obliczenia dopuszczalnego stereochemicznie ułożenia i orientacji drobin wody względem DNA przeprowadził Lewin (66), dokonując pomiarów na modelu cząsteczki DNA zbudowanym z modeli atomowych Courtaulda. Lewin podzielił związane drobinny wody na położone w wąskich oraz w szerokich bruzdach podwójnej spirali DNA. Odległość między łańcuchami w wąskiej bruzdzie wynosi około 1 nm, a w szerokiej bruzdzie około 1,8 nm. Wg Lewina w wąskich bruzdach drobinny wody są związane silniej niż w bruzdach szerokich, a ponadto są bardziej odporne na działanie ciepła i oddziaływanie związków chemicznych. Mniejsza od-

ległość między łańcuchami polinukleotydowymi sprzyja w wąskiej bruzdzie silniejszemu wiązaniu i większej koncentracji konfiguracji charakterystycznej dla otoczonego wodą jonu  $\text{Na}^+$  (por. schemat 4). Poza tym w wąskiej bruzdzie mogą występować uwodnione grupy atomu tlenu z dezoksyrybozy i atomów tlenu grup fosforanowych, a pojedyncze mostki wodne mogą powstawać również między grupami aminowymi guaniny i karbonyłowymi tyminy.

Szerokie bruzdy w drobinie DNA Lewin dzieli pod względem wiązania wody na trzy strefy: górną hydrofobową strefę grup C-H, środkową hydrofilną strefę grup aminowych i karbonyłowych oraz atomów azotu z pierścieni i wreszcie dolną hydrofobową strefę grup C-H. Środkowa strefa ze względu na swoje grupy składowe może być silnie uwodniona podczas gdy hydrofobowe warstwy grup C-H są uwodnione bardzo słabo lub też zupełnie nie wiążą wody. Nie wyklucza się jednak istnienia słabych mostków z wielu drobin wody położonych skośnie w stosunku do warstw hydrofobowych.

Mostki wodne w DNA można podzielić na kilka typów zależnie od tego między jakimi ugrupowaniami molekularnymi DNA są usytuowane (62, 63, 64, 65, 66).



**Schemat 5.** Stereometrycznie możliwe mostki wodne w DNA, wg Lewina (64, 65, 66)

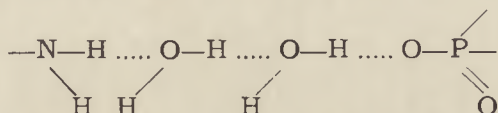
a — hydratacja nabudowania zasad, b — hydratacja sparowania zasad

A — mostki między zasadami, położone w szerokiej bruzdzie i labilne przy działaniu jonów  $\text{H}^+$ , B — mostki między zasadami odporne na działanie jonów  $\text{H}^+$ , C — mostki między atomem tlenu z pierścieni dezoksyrybozy a grupą aminową zasad

Podstawowe typy stanowią mostki wodne pomiędzy kolejnymi zasadami w tym samym łańcuchu polinukleotydowym (jest to tzw. hydratacja nabudowania zasad) oraz mostki pomiędzy komplementarnie sparowanymi

zasadami w obu łańcuchach polinukleotydowych (hydratacja sparowania zasad). Te typy mostków dzielą się na dwie podgrupy. Pierwsza z nich charakteryzuje się małą, a druga dużą odpornością na działanie jonów  $H^+$ . Mostki pierwszej podgrupy (schemat 5A) znajdują się głównie w szerokiej bruzdzie DNA, mostki drugiej podgrupy (schemat 5B) zarówno w bruzdzie szerokiej jak i wąskiej.

Drugi typ mostków wodnych w DNA stanowią mostki pomiędzy grupami aminowymi zasad i atomami tlenu w dezoksyrybozie (schemat 5c). Oprócz tego możliwe jest tworzenie się mostków podwójnych między grupami aminowymi zasad i grupami fosforanowymi:



Mostki takie mogą znajdować się zarówno w szerokiej jak i wąskiej bruzdzie.

### 3. Siły i energia wiązania mostków wodnych w DNA

Zwykle siły wiązania wodorowego są w przypadku mostków wodnych w DNA wspomagane przez siły elektrostatyczne wiązania kationu otoczonego powłoką wodną, np. kationu  $Na^+$  dla soli sodowej DNA oraz przez zamknięty obwód rezonansowy sił kooperatywnych wielokrotnego wiązania wodorowego. Fragmentem takich zamkniętych stereochemicznie obwodów rezonansowych mogą być w DNA zarówno wiązania wodorowe typu Watsona-Cricka jak i mostki wodne (66).

Energia wiązania poszczególnych mostków wodnych w DNA zależy w danym wiązaniu wodorowym od różnicy między potencjałem donorym i potencjałem akceptorowym wiązanych grup. Np. momenty dipolowe grup N-H oraz O-H wynoszą odpowiednio 1,5 i 1,6D (97), a więc potencjał donorowy protonu w grupie aminowej będzie nieco niższy od potencjału donorowego w grupie O-H i mostek wodny w DNA, w którym zaangażowana jest grupa N-H będzie słabszy niż mostek w wodzie swobodnej.

Wśród grup zawierających akceptory protonu najwyższy potencjał akceptorowy wykazuje atom tlenu w grupie fosforanowej, nieco niższy atom azotu w grupach aminowych zasad, jeszcze niższy atom tlenu w grupach karbonylowych a najniższy — atom azotu w pierścieniach zasad oraz atom tlenu w pierścieniu dezoksyrybozy.

Pierwotna siła wiązania mostka wodnego może być różna na obu jego końcach, gdyż potencjał donorowy donorów jest zwykle różny od potencjału akceptorowego akceptorów. Siła wiązania słabszego końca mostka może jednak wzrastać wskutek rozprzestrzeniania się wzdłuż mostka silniejszego oddziaływania z drugiego końca wiązania, co może prowadzić do

skompensowania różnicy między siłą wiązań obu stron mostka. Rezonansowy obwód sił kooperatywnych prowadzi do dalszej kompensacji tych różnic. W tabelicy 1 podano klasyfikację mostków wodnych w DNA przy uwzględnieniu siły wiązania.

Występowanie w DNA mostków wodnych podwójnych, potrójnych lub wielokrotnych, których siła wiązania jest odpowiednio mniejsza niż mostków pojedynczych, powoduje w zależności od ich usytuowania pewne przetasowania w stosunku do uporządkowania w tabelicy 1, co uwzględniono na schemacie 4.

Tabela 1

Klasyfikacja mostków wodnych w DNA od największej do najmniejszej wartości energii wiązania wodorowego, wg Le w i n a (66)

Akceptory	Donory
1 O w grupie $\text{PO}_4^{3-}$	proton w powłoce hydratacyjnej jonu $\text{Na}^+$
2 O w grupie $\text{PO}_4^{3-}$	
3 N w grupie $\text{NH}_2$	protony w grupach $\text{NH}_2$
4 O w grupie $\text{C} = \text{O}$	
5 N w pierścieniu zasady	
6 O pierścieniu dezoksyrybozy	

### III. Metody wyznaczania uwodnienia DNA

#### 1. Pomiary dielektryczne

Anomalia dyspersję stałej dielektrycznej roztworów DNA znaleziono w pasmie częstości rzędu 100 kHz, a moment dipolowy DNA — w kierunku poprzecznym do osi łańcucha (54). Od tego czasu badania DNA technikami dielektrycznymi są dość liczne (102, 103), a udane opracowanie oznaczania tą metodą uwodnienia białek (16, 19) spowodowały jej zastosowanie także do badania uwodnienia DNA (51, 86, 100).

J a c o b s o n (51) pracując w zakresie częstości 0,1—7 MHz zaobserwował wzrost wartości przenikalności dielektrycznej roztworów DNA w stosunku do czystej wody i wykazał, że wartości te nie zmniejszają się ze wzrostem gradientu prędkości albo spadają nieznacznie dla próbki o dużych własnościach tiksotropowych\*. Jacobson wykluczył możliwość interpretacji tego zjawiska na zasadzie teorii rotacji wewnętrznej grup molekularnych, teorii ruchliwych protonów Kirkwooda i Shumakera (57) oraz teorii Maxwella-Wagnera dotyczącej przegrupowania jonów w roztworze w pobliżu powierzchni makromolekuły. Wg Jacobsona zjawisko to może tłumaczyć jedynie uformowanie wokół DNA rozległej po-

\* tiksotropia — izotermiczna odwracalna przemiana żelu w zol pod wpływem czynników mechanicznych

włoki wodnej (patrz schemat 3). Sprężenie istniejące między idealną siecią wody i stabilizująca ją powierzchnia makromolekuły może ograniczać wibracje termiczne sieci, nawet w dużej odległości od drobiny i prowadzić do uporządkowania dipoli wodnych. Może to powodować zmiany w własnościach fizycznych całego układu podobne jakościowo do zmian uzyskiwanych dla czystej wody przy obniżeniu temperatury, a więc także do wzrostu przenikalności dielektrycznej.

Jacobson ocenia, że przy stężeniu DNA rzędu 0,05% makromolekuła o średnicy 2 nm i długości 600 nm wywiera stabilizujące działanie na drobiny wody położone jeszcze w odległości 50—100 nm od jej powierzchni, a więc, że grubość powłoki hydratacyjnej DNA sięga 1/4 długości makromolekuły. O uformowaniu szerokich powłok wodnych świadczyć mogłaby również obserwacja Jacobsona, że wodne roztwory DNA charakteryzują się dyspersją dielektryczną przy częstościach pośrednich między wartościami ustalonymi (3) dla lodu ( $10^2$ — $10^4$  Hz) i dla wody ( $10^{10}$  Hz). Wskazuje to, że woda przylegająca do drobiny DNA jest silniej uporządkowana w stosunku do wody swobodnej, chociaż słabiej zorganizowana niż w sieci krystalicznej lodu. Ponadto Jacobson znalazł, że przy wzroście stężenia roztworów DNA częstość krytyczna rośnie przesuwając się ku wartości charakterystycznej dla wody swobodnej. Zjawisko to Jacobson wyjaśnił zakładając, że ze wzrostem stężenia rozmiary powłok wodnych maleją wskutek wzajemnego oddziaływania makromolekuł, zaburzającego stopień uporządkowania dipoli wodnych.

Późniejsza analiza doświadczalna i teoretyczna (86, 100) doprowadziła jednak do wniosku, że przy interpretacji danych dotyczących przenikalności dielektrycznej, dyspersji dielektrycznej i przewodnictwa roztworów polielektrolitów należy uwzględnić procesy przenoszenia ładunku i polaryzację podwójnej warstwy cząstek rozpuszczonych. Uogólniony model O'Konskiego (86) uwzględniający te efekty pozwala wytłumaczyć przyrosty przenikalności dielektrycznej oraz zjawiska relaksacji dielektrycznej w roztworach białek, kwasów nukleinowych i innych makromolekuł biologicznie czynnych. Stellwangen, Shirai i O'Konski (100) badając przenikalność dielektryczną i dwójłomność elektryczną wodnych roztworów NaDNA znaleźli dwa obszary dyspersji dielektrycznej, jeden poniżej  $10^6$  Hz i drugi w zakresie  $10^6$ — $2 \cdot 10^7$  Hz. Uzyskano dużą zgodność wartości doświadczalnych z teorią O'Konskiego. W świetle tych wyników nie jest koniecznym zakładanie dla DNA istnienia obszernej lodopodobnej powłoki hydratacyjnej. O'Konski uważa (86), że powłoka ta jest cienka i stanowi kilkucząsteczkową warstwę.

## 2. Pomiary współczynników samodyfuzji

Metodę obliczania uwodnienia makromolekuł z pomiarów współczynników samodyfuzji wody opracował Wang (109, 110), wyprowadzając zależność teoretyczną stosunku współczynników samodyfuzji dla roztworu

makromolekuł i czystej wody od ich uwodnienia. Problem opracowano początkowo dla białek (109), a potem dla DNA (110). Stosując jako wskaźnik  $^{18}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$  analizowano próbki dyfuzyjne w spektrometrze masowym. Aparaturę pomiarową opisali Wang, Anfinsen i Polestra (111). Wykazano, że w  $25^\circ\text{C}$  ze wzrostem stężenia DNA w granicach 0—12% współczynniki samodyfuzji wody maleją od wartości  $2,57 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  do wartości  $2,021 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Uwodnienie DNA w roztworze, wyznaczone graficznie wynosiło 0,35 g  $\text{H}_2\text{O}/1 \text{ g DNA}$  i praktycznie nie zależało od obecności NaCl. Wartość ta odpowiadająca 6—8 cząsteczkom wody na nukleotydy stanowi statystycznie średnią ilość wody związanej bezpośrednio z ugrupowaniami molekularnymi DNA oraz przez jony  $\text{Na}^+$  przyłączone do DNA.

Współczynnik samodyfuzji roztworów można bardzo dokładnie oznaczać techniką echa spinowego (42, 43), co wg Biezrukowa (8) może być bardzo pomocne przy oznaczaniu uwodnienia DNA. Metodą tą posłużono się dotychczas jedynie przy badaniu wirusa mozaiki tytoniowej (26), znajdując jego znikome uwodnienie i nie potwierdzając 20% uwodnienia oznaczonego z widm rezonansu jądrowego (53).

### 3. Ultrawierowanie w gradiencie gęstości

Uwodnienie DNA obliczano z wartości gęstości unoszenia wyznaczonej przez ultrawierowanie w gradiencie gęstości (44, 45, 46, 47, 78, 90). Pierwszą metodą tę zastosowali Hearst i Vinograd (46, 47), którzy wykazali, że wprowadzone przez Goldberga (38) termodynamiczne równanie równowagi w polu ultrawierowania dla układu dwuskładnikowego można uogólnić dla układu trójskładnikowego. W układzie trójskładnikowym 1 — DNA, 2 — rozpuszczalnik, 3 — substancja tworząca gradient równanie to można zapisać przy stałej temperaturze i ciśnieniu w postaci:

$$M_1(1 - \bar{v}_1 \rho) \omega^2 r dr = \left( \frac{\partial \mu_1}{\partial m_1} \right)_{m_2} dm_1 - \Gamma \left( \frac{\partial \mu_1}{\partial m_1} \right)_{m_2} dm_3 \quad 1$$

$$M_3(1 - \bar{v}_3 \rho) \omega^2 r dr = \left( \frac{\partial \mu_1}{\partial m_1} \right)_{m_2} dm_3 - \Gamma \left( \frac{\partial \mu_1}{\partial m_1} \right)_{m_2} dm_1$$

gdzie  $M$  oznacza ciężary cząsteczkowe,  $v$  — cząstkowe objętości właściwe,  $m$  — molowości,  $\mu$  — potencjały chemiczne,  $\omega$  — prędkość kątową wirowania,  $r$  — promień wirowania, a  $\rho$  — gęstość roztworu. Parametr  $\Gamma$  reprezentuje solwatację sieciową DNA w molach rozpuszczalnika na mol DNA, równą  $\Gamma = \Gamma' \left( \frac{M_2}{M_1} \right)$  gdzie  $\Gamma'$  określa solwatację wagową.

Jeżeli przez  $\rho_0$  oznaczymy gęstość unoszenia, to warunek unoszenia wyznaczony z równania (1) w funkcji solwatacji przybiera postać

$$\frac{1}{\rho_1} = \frac{\bar{v}_3 + \Gamma \bar{v}_1}{1 + \Gamma'} = \frac{\bar{v}_3 + \Gamma \bar{v}_1}{1 + \Gamma'} \quad 2$$

która pozwala na wyznaczenie uwodnienia sieciowego. Hearst i Vinograd (46, 47) tą techniką oznaczali uwodnienie DNA z bakteriofaga T-4, stosując do gradientu sole cezowe o różnych współczynnikach aktywności wody. Gęstość unoszenia odwodnionej soli cezowej DNA określono jako równą 2,12 g/ml. Dla niskich współczynników aktywności wody (mniejszych od 0,9) uwodnienie DNA wzrasta dość wolno (od 0 do 0,5 g H<sub>2</sub>O/1 g CsDNA), dla współczynników wyższych (0,9 do 1,0) wzrost uwodnienia jest szybki (od 0,5 do 2,0 g H<sub>2</sub>O/1 g CsDNA). W chlorku cezu uwodnienie sieciowe CsDNA wynosi około 30% wagowych. Z przeliczenia wynika, że liczba drobin wody przypadających na jeden nukleotyd wzrasta ze wzrostem współczynników aktywności wody od około 3 do 50.

Dla DNA z *Escherichia coli* znaleziono przez wirowanie w CsCl wartość uwodnienia równą 0,22 g H<sub>2</sub>O/1 g CsDNA (78).

Według danych sedymentacyjnych duży wpływ na uwodnienie DNA wywiera stężenie soli w roztworze oraz rodzaj kationu (90). Na przykład w roztworze LiBr solwatacja sieciowa DNA jest bardzo niewielka i praktycznie niezależna od stężenia soli. W roztworach NaCl i NaBr liczba drobin wody związanych na nukleotyd jest rzędu 8 przy niskich stężeniach i zmniejsza się ze wzrostem stężenia. Przy niewielkich stężeniach CsCl w roztworze solwatacja DNA jest znikoma, następnie wzrasta osiągając maksimum przy stężeniu 3M, po czym stopniowo się zmniejsza. Uwodnienie DNA nie zależy od masy cząsteczkowej DNA i jest właściwe jedynie dla molekuł natywnych. Wyznaczając gęstość unoszenia DNA z ultrawiwrowania w gradiencie CsCl znaleziono różnice dla preparatów różniących się składem zasad (97). Można to przypisywać różnicom w uwodnieniu par zasad typu G-C i A-T. Według obliczeń Pouyeta i wsp. (90) na parę G-C przypada około 7 cząsteczek wody związanej, a na parę A-T 11,5 cząsteczki. Metodą ultrawiwrowania w gradiencie CsCl i LiCl wykazano ponadto (106), że cząstkowe objętości właściwe DNA są zależne od składu zasad w bardzo niewielkim stopniu dla sodowej soli DNA a zupełnie niezależne dla soli litowej. Według Tunisi Hearsta (106) zależność gęstości unoszenia DNA od składu zasad można przypisać conajmniej w 90% uwodnieniu, gdyż mol par A-T wiąże o około 2 mole wody więcej niż mol par G-C.

Stosując ultrawiwrowanie DNA z bakteriofaga T-7 w stężonym roztworze trójfluorooctanu potasowego (107), stwierdzono wzrost wartości gęstości unoszenia i spadek uwodnienia DNA ze wzrostem temperatury prowadzącym do zmian denaturacyjnych.

#### 4. Metody rentgenowskie

Przybliżone równanie Luzzatiego (72) uwzględniające zależność rozpraszania promieni X pod małymi kątami od uwodnienia DNA ma postać:

$$\left(\frac{A}{c_e}\right)^{1/2} = \mu^{1/2}[1 + w - \varrho_0(\psi - \psi_{H_2O})] \quad 3$$

gdzie  $A$  jest parametrem eksperymentalnym, a  $c_e$  oznacza stężenie DNA mierzone jako stosunek liczby elektronów w DNA do liczby elektronów w roztworze,  $\mu$  — liniową masę odwodnionego DNA, mierzoną liczbą elektronów DNA na jednostkowej długości,  $w$  — uwodnienie wyrażone jako stosunek liczby elektronów w wodzie związanej i w DNA,  $\psi$  i  $\psi_{H_2O}$  — cząstkowe objętości właściwe (na elektron) odpowiednio dla DNA i wody. Luzzatti i wsp. (73) obliczyli stosując to równanie, że uwodnienie DNA jest rzędu 67% i zaobserwowali, że przy wzroście stężenia NaCl maleje promień bezwładności DNA, co świadczyłoby o zmniejszeniu uwodnienia makromolekuły przy wzroście siły jonowej roztworu.

Tunis i Hearst (106) szczegółowo porównali wyniki oznaczeń uwodnienia metodą rozpraszania promieni X i wyniki analizy sedymentacyjnej Brunera i Vinograda (15) i znaleźli dużą zgodność obu metod, zwłaszcza przy niskich współczynnikach aktywności wody.

### 5. Kalorymetria

Metodę kalorymetryczną do oznaczania uwodnienia DNA zastosowali Priwałow i Mriewliszwili (91, 92). Główna idea tej metody polega na oznaczaniu temperaturowej zależności pojemności cieplnej 1 g substancji w obecności różnej ilości wody.

Silne maksimum na krzywej pochłaniania ciepła pojawia się dopiero przy dodaniu ponad 0,5 g wody na 1 g DNA co świadczy, że w wodzie istnieją już wówczas elementy, które przechodzą w stan lodu. Woda dodana w mniejszej ilości nie zamarza przy ochładzaniu i nie topi się następnie przy ogrzewaniu, a więc musi się znajdować w związanym, uporządkowanym stanie. Ponadto woda, która nie może już być uważana za związaną, wykazuje w stosunku do wody swobodnej większe uporządkowanie, wywołane obecnością makromolekuł o czym świadczy rozmycie i przesunięcie maksimum krzywej pochłaniania ciepła w kierunku temperatur niższych od 0°C.

Według Priwałowa i Mriewliszwili (91, 92) uwodnienie DNA w stanie natywnym wynosi 0,61 g H<sub>2</sub>O/1 g suchego DNA (średnio około 11 drobin wody na jeden nukleotyd), a po denaturacji wzrasta do 0,645 g H<sub>2</sub>O/1 g DNA. W 0,15 M roztworze NaCl uwodnienie DNA jest nieco mniejsze i wynosi w stanie natywnym 0,526 a po denaturacji 0,584 g H<sub>2</sub>O/1 g suchego DNA.

### 6. Metody wagowe

Metody wagowe nadają się jedynie do oznaczania ilości wody związanej przez suchy DNA, przy różnej wilgotności względnej atmosfery. W ten



sposób wyznaczono (30) dla sodowej i litowej soli DNA oraz DNA izolowanego z grasicy cielej i ze spermy łosia krzywe adsorpcji wody (przy wzrastającej wilgotności) oraz krzywe desorpcji (przy wilgotności malejącej). Okazało się, że w zakresie wilgotności względnej 10—80% adsorpcja wody wzrasta monotonicznie średnio o jedną drobinę na nukleotyd i wzrost wilgotności o 1% oraz, że krzywe desorpcji leżą powyżej krzywych adsorpcji tworząc swego rodzaju histerezę adsorpcyjno-desorpcyjną.

Badania uwodnienia składowych DNA metodą wagową (28) wykazały, że zasady purynowe i pirymidynowe oraz ich nukleozydy i nukleotydy nie tworzą stabilnych hydratów w zakresie wilgotności względnej od 0—92%. Tworzą natomiast stabilne hydraty liczne sole nukleotydów, co wytłumaczono większym powinowactwem do wody grup fosforanowych niż atomów tlenu w grupach karbonylowych i dezoksyrybozie oraz atomów azotu w pierścieniach zasad (por. schemat 4).

Znaleziono dużą zgodność doświadczalnych krzywych adsorpcji z teorią Brunauera, Emmetta i Tellera (14), która w ujęciu mechaniczno-statystycznym Hilla (49) podaje związek między całkowitą ilością wody zaadsorbowanej przy dużej wilgotności a maksymalną ilością wody zaadsorbowanej przez pierwotne centra hydratacji. Porównując teorię z danymi doświadczalnymi obliczono, że pierwotne centra adsorpcji w DNA mogą wiązać po dwie drobinę wody na nukleotyd.

Odstępstwa od modelu Brunauera, Emmetta i Tellera przy wilgotności względnej przekraczającej 80% wyjaśniono przyjmując tę wilgotność za graniczną, przy której wypełnione są wszystkie centra hydratacyjne w DNA o strukturze A i poniżej której zachodzi dla DNA przejście strukturalne  $A \rightleftharpoons B$ .

## 7. Spektrofotometria

Spektrofotometryczne badania uwodnienia DNA obejmują pomiary widm w podczerwieni (12, 13, 24, 31, 32, 101, 105) i nadfiolecie (29, 32).

W podczerwieni zaobserwowano zmiany w widmie próbek stałego DNA w funkcji wilgotności względnej atmosfery oraz zależność ułamka dichroicznego od zawartości wody w DNA. Dla danego pasma ułamek dichroiczny  $R$  oznacza stosunek absorpcji promieniowania spolaryzowanego równolegle i prostopadle do kierunku orientacji molekularnej DNA w błonach. Ts ub o i (105) stwierdził, że zmiany w widmach w podczerwieni przy dehydratacji DNA są podobne do zmian wywołanych przez denaturację cieplną, działanie DNazy i działanie formamidu.

Najważniejsze wnioski dotyczące uwodnienia DNA wynikają z pomiarów widm w zakresie  $4000\text{—}400\text{ cm}^{-1}$  dla cienkich błon NaDNA i LiDNA (31). Znaleziono w widmie zarówno wody jak i DNA charakterystyczne przesunięcia oraz zmiany w natężeniach pasm ze wzrostem wilgotności względnej i hydratacji DNA. Wykazano, że jako pierwsze, w zakresie wil-

gotności 0—60%, obsadzone są w DNA centra hydratacyjne 1 (schemat 4) i że ta pierwotna warstwa hydratacyjna zaadsorbowana jest dużo silniej niż następne. Centra 2 i 3 ulegają hydratacji przy wilgotności rzędu 60—65% a hydratacja zasad zaczyna się dopiero powyżej tego zakresu wilgotności. Przy wilgotności rzędu 92%, kiedy przypada około 20 zaadsorbowanych drobin wody na nukleotyd, w widmie DNA pojawiają się pasma bardzo bliskie pasmom charakterystycznym dla ciekłej wody, co świadczy o skompletowaniu pełnej powłoki hydratacyjnej. Nie znaleziono natomiast w uwodnionym DNA żadnych pasm charakterystycznych w podczerwieni dla lodu (37).

Przy wyznaczaniu w zorientowanych przestrzennie błonach DNA oraz NaDNA ułamka dichroicznego dla różnych pasm absorpcji znaleziono najbardziej reprezentatywne wyniki dla pasma  $1660\text{ cm}^{-1}$  w podczerwieni oraz dla długości fali 260 nm w nadfiolecie (32). W obydwu przypadkach przy wilgotności 92% wartość ułamka dichroicznego była bardzo niewielka i wzrastała powoli ze spadkiem wilgotności w zakresie 75—55%. Na podstawie widm w podczerwieni wydaje się, że przejścia konfiguracyjne  $B \rightleftharpoons A$  i  $A \rightleftharpoons C$  zachodzą w nieco innych zakresach wilgotności niż to wynikało z obrazu rentgenowskiego. Kąt nachylenia płaszczyzny par zasad przy przejściu  $A \rightarrow B$  obliczono w funkcji ułamka dichroicznego R według wzoru

$$\text{tg}^2\gamma = 2 \frac{(1+f) - R(1-f)}{R(1+f) - (1-f)} \quad 4$$

gdzie  $f$  jest frakcją drobin DNA zorientowanych w błonie w ściśle określonym kierunku a  $(1-f)$  jest frakcją drobin zorientowanych przypadkowo. Frakcję  $f$  oblicza się znając kąt  $\gamma = \pi/2$  oraz R przy wilgotności 92%, kiedy można założyć, że DNA istnieje jedynie w formie B.

Wzór 4 można stosować tylko zakładając systematyczne i równoczesne nachylanie się płaszczyzny wszystkich par zasad. Tymczasem wyniki świadczą o ograniczonym zastosowaniu tego wzoru, co wskazuje, że nachylanie się par zasad nie jest systematyczne, ale wybiórczo niektóre pary nachylają się od razu o duże kąty. Maksymalny kąt nachylenia wyznaczono jako równy  $65^\circ$ , podczas gdy w obrazie rentgenowskim jest on równy  $20\text{—}30^\circ$ . Wydaje się, że nachylają się te zasady, których centra hydratacyjne zostały właśnie odwodnione.

Współczynniki absorpcji promieniowania nadfioletowego o długości fali 260 nm nie zależą od orientacji DNA w błonach (32), ale również zmieniają się w funkcji wilgotności. Współczynnik absorpcji początkowo powoli wzrasta od 0,53 przy wilgotności 93% do 0,58 przy wilgotności 75%, po czym przy dalszym spadku wilgotności rośnie gwałtownie do 0,99. Dowodzi to, że dehydratacja natywnych molekuł DNA prowadzi do zmian denaturacyjnych.

Denaturację termiczną i dehydratację różnych preparatów RNA porównał F a l k (29) oznaczając widma absorpcji w zakresie 183—350 nm. Zmia-

ny w kształcie i przesunięciach w widmach przy odwadnianiu błon suchego RNA okazały się prawie identyczne jak przy wzroście temperatury roztworów DNA.

Nie znaleziono w podczerwieni żadnych zmian w widmie wody przy obecności DNA w roztworze (24) ale można przypuszczać, że silne pasmo absorpcyjne wody maskuje pasma absorpcyjne DNA (19). W widmie wody pasma DNA nie nakładają się jedynie na pasmo ramanowskie  $2170\text{ cm}^{-1}$ . Pasma to nie przesuwają się w niskiej temperaturze ku mniejszym długościom fali, czego możnaby oczekiwać przy dużym uwodnieniu DNA.

### 8. Magnetyczny rezonans jądrowy

Metody oparte o zjawisko rezonansu jądrowego są często stosowane do badania zarówno uwodnienia (4, 19, 24, 39, 52, 69, 70, 71, 83, 99) jak i struktury kwasów nukleinowych (75, 76, 77). Rezonans jądrowy (1, 2, 48, 67) związany jest z kwantową absorpcją energii w polu o częstości rezonansowej przez jądra atomowe o określonych momentach magnetycznych. Rezonans uzyskuje się praktycznie umieszczając badaną próbkę w stałym polu magnetycznym  $H_0$  i poddając ją dodatkowo działaniu prostopadłego do  $H_0$  pola  $H_1$  o częstości rezonansowej. Wektory momentów magnetycznych rezonujących jąder atomowych precesują wówczas wokół kierunku pola  $H_0$ , a absorpcja energii wywołuje przejścia między sąsiednimi poziomami energetycznymi. Częstotliwość rezonansowa zależy od chemicznego charakteru jąder atomowych i typu związku, w skład którego one wchodzi. Sygnały rezonansu jądrowego obserwować można przy pomocy metod naświetlania ciągłego i metod impulsowych. W metodach naświetlania ciągłego próbkę poddaje się działaniu pola wysokiej częstości w sposób ciągły i rejestruje się widma rezonansowe. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego o wysokiej zdolności rozdzielczej umożliwia rozdzielenie poszczególnych linii w złożonym widmie. Można też obserwować widma rezonansowe przy średniej zdolności rozdzielczej lub stosować spektroskopię szerokiej linii. W metodach impulsowych próbkę umieszczoną w stałym polu  $H_0$  poddaje się działaniu impulsów pola  $H_1$ , obserwując w przerwach między impulsami sygnały precesji swobodnej i sygnały echa spinowego (18, 42, 43).

Rozpatrując zjawisko rezonansu jądrowego uwzględnia się, poza oddziaływaniem jąder z zewnętrznym polem, ich oddziaływanie z otoczeniem, a więc z polami wytworzonymi przez elektronowe i jądrowe momenty magnetyczne oraz przez ładunki elektryczne sąsiednich atomów i drobin w próbce. Dodatkowy ruch wektora magnetyzacji (makroskopowego momentu magnetycznego jednostki objętości substancji) wywołany przez oddziaływanie z otoczeniem nazywamy procesem relaksacji. Teorie procesów relaksacji — fenomenologiczna (10) i kwantowo-mechaniczna (1, 11, 98) podają szczegółowy analityczny opis tych zjawisk. Głównymi parametrami charakteryzującymi procesy relaksacyjne są tzw. magnetyczne czasy re-

laksacji. Podłużny czas relaksacji  $T_1$  charakteryzuje zanik składowej wektora magnetyzacji równoległej do pola  $H_0$  i jest związany z oddziaływaniem danych jąder z zespołem innych atomów lub drobin w próbce (oddziaływanie spinowo-sieciowe). Poprzeczny czas relaksacji  $T_2$  charakteryzuje zanik składowej poprzecznej do pola  $H_0$  i odpowiada za sprzężenie rozważanych jąder pomiędzy sobą (oddziaływanie spinowo-spinowe).

A. *Widma rezonansowe*. Uwodnienie DNA próbowano oceniać z widm rezonansowych na podstawie kształtu i szerokości linii absorpcji (4, 24, 39, 52), z pomiarów znormalizowanych powierzchni pod krzywymi absorpcji (4, 24, 39, 52) oraz z wielkości przesunięć chemicznych dla protonów wody (39).

Przeważnie stosowano częstotliwości rezonansowe z zakresu od 10—60 MHz i posługiwano się DNA z komórek zwierzęcych. Wyniki zestawiono dla porównania w tablicy 2.

Ogólnie w miarę wzrostu stężenia DNA zawsze obserwowano poszerzenie linii absorpcji rezonansowej (4, 24, 39, 52) i poza jednym przypadkiem (52) brak zmiany w wartości znormalizowanej powierzchni pod krzywą absorpcji (4, 24, 39). Ponadto nie znaleziono zmian przesunięć chemicznych protonów w roztworach DNA w stosunku do protonów w wodzie swobodnej (39).

Obserwacje te tłumaczono przeważnie niewielkim uwodnieniem DNA i wymianą protonów między fazami wody swobodnej i związanej (4, 24, 39), choć niektórzy autorzy interpretowali je również w aspekcie anizotropii diamagnetycznej wywołanej przez elektrony  $\pi$  w łańcuchach DNA (4) oraz w aspekcie wpływu statystycznych niejednorodności pola, których zasięg działania przekracza rozmiary pojedynczych makromolekuł DNA i może być spowodowany ich agregacją lub obecnością w DNA cząstek ferromagnetycznego żelaza (83). Zmniejszenie powierzchni pod krzywą absorpcji zaobserwowane przez Jacobsona, Andersona i Arnolda (52) wyjaśnić można efektem aparaturowym, którego autorzy ci nie uwzględnili (8, 19, 39). W związku z tym interpretacja zjawiska oparta na zasadzie rozległego uwodnienia makromolekuły nie wydaje się właściwa.

Technikę widm rezonansu jądrowego wykorzystywano również do badania zorientowanych błon z DNA (5, 79, 94). Interpretując wyniki w aspekcie oddziaływań protonowo-protonowych dla formy A, B i C DNA można wnioskować o uwodnieniu molekuł DNA przy różnych konformacjach (79), co jednak nie jest na razie ujęte ilościowo.

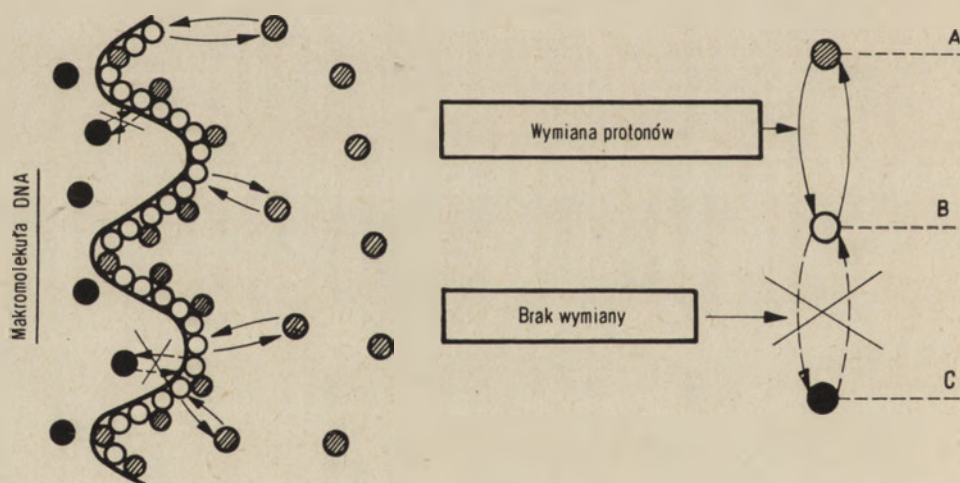
B. *Czasy relaksacji*. Istnienie powłoki hydratacyjnej DNA, co było szeroko dyskutowane w literaturze (8, 19, 39) powinno powodować skrócenie czasu relaksacji w roztworach DNA w stosunku do czystej wody ze względu na wymianę protonów między fazami wody swobodnej i związanej. Mimo to ocena uwodnienia DNA z pomiarów podłużnego ( $T_1$ ) i poprzecz-

Tablica 2

Porównanie wyników badań roztworów DNA metodami magnetycznego rezonansu jądrowego

Autorzy	Rok	Częstość rezonansowa dla protonów	Źródło DNA	Zmiana ze wzrostem stężenia DNA			Interpretacja
				Znormalizowane pole pod krzywą	Szerokość połowikowa krzywej absorpcji	Przesunięcia chemiczne	
Jacobson, Anderson, Arnold (52)	1954	30 MHz	Grasica cielęca	maleje	wzrasta	—	rozległe uwodnienie DNA
Balazs, Bothner-By, Gergely (4)	1959	40 MHz 60 MHz	Grasica cielęca	brak zmiany	wzrasta	—	niewielkie uwodnienie i anizotropia diamagnetyczna
Deptieux, Williams (24)	1962	40 MHz	Grasica cielęca	brak zmiany	wzrasta	—	niewielkie uwodnienie
Nabieruchin i wsp. (83)	1961	40 MHz	Bakterie Nowotwory Wątroba szczura	—	wzrasta	—	domieszki ferromagnetycznego żelaza i agregacja molekuł DNA
Gordon, Cornutte, Lark (39)	1965	60 MHz	Grasica cielęca	brak zmiany	wzrasta	brak zmiany	niewielkie uwodnienie, 35%

nego ( $T_2$ ) czasu relaksacji była początkowo dość sporadyczna i jedynie jakościowa. Balazs, Bothner-By i Gergely (4) pierwsi zaobserwowali spadek  $T_2$  ze wzrostem stężenia DNA w roztworach wodnych, ale nie znajdując spadku  $T_1$  poddali w wątpliwość istnienie powłoki hydratacyjnej DNA. Stosowali oni jednak do oznaczeń  $T_1$  metodę bezpośrednią Andrewa (2), której dokładność rzędu 25% nie wystarcza do tego typu pomiarów. Gordon, Curnutte i Lark (39) tłumaczą spadkiem czasu relaksacji  $T_2$  poszerzenie rezonansowej linii absorpcji, ale sami czasu relaksacji nie mierzyli. Eisinger, Shulman i Szymański (27) stwierdzili, że wiązanie różnych jonów paramagnetycznych przez DNA powoduje skrócenie podłużnego czasu relaksacji i są zdania, że obecność tych jonów powoduje skrócenie  $T_1$  w próbkach handlowego DNA. Monotoniczny spadek  $T_1$  i  $T_2$  ze wzrostem stężenia zaobserwowali Lubas (69) oraz Lubas i Wilczok (70), w roztworach DNA z grasicy cielęcej oraz Sprinz, Döllstadt i Hübner (99) w roztworach DNA z drożdży. Obie grupy autorów posługiwały się przy wyznaczaniu czasów relaksacji metodami impulsowymi, opartymi na zjawisku echa spinowego, przy zbliżonych częstościach rezonansowych 14 MHz (69, 70) i 16 MHz (99). O ile jednak Sprinz, Döllstadt i Hübner tłumaczą zaobserwowane zjawisko paramagnetycznymi domieszkami związanymi trwale z DNA, Lubas i Wilczok (70) przypisują je uwodnieniu DNA, gdyż analiza spektrograficzna wykluczyła obecność zanieczyszczeń paramagnetycznych w badanych próbkach (69).



Schemat 6. Model hydratacji DNA z uwzględnieniem różnych grup protonów wg (69, 70)

A — protony w wodzie związanej strukturalnie z drobiną DNA, B — protony w wodzie swobodnej lub związanej rotacyjnie z drobiną DNA, C — protony wchodzące w skład ugrupowań molekularnych DNA

Hipotezę struktury uwodnienia DNA tłumaczącą wyniki pomiarów czasów relaksacji można sprowadzić do założenia, że w rozważanym układzie makromolekuła — rozpuszczalnik wyróżnia się następujące grupy protonów:

- A — protony w drobinach wody związanych rotacyjnie z DNA lub w swobodnych drobinach wody (charakteryzują je czasy relaksacji  $T_{1w}$  i  $T_{2w}$ )  
 B — protony w drobinach wody związanych strukturalnie czyli nierotacyjnie (charakteryzują je czasy relaksacji  $T_{1n} < T_{1w}$  i  $T_{2n} < T_{2w}$ )  
 C — protony będące integralną częścią makromolekuły DNA (charakteryzują je czasy relaksacji ( $T_1/DNA > T_{1w}$  i ( $T_2/DNA > T_{2w}$ )).  
 Grupy te przedstawiono na schemacie 6.

Między drobinami wody związanej rotacyjnie i nierotacyjnie może zachodzić wymiana  $A \rightleftharpoons B$ . Wymiana protonów między grupami B i C nie jest wykluczona, nie mniej ze względu na silne związanie protonu w sieci krystalicznej makromolekuły jest ona dużo mniej prawdopodobna, a przynajmniej dużo wolniejsza.

Wpływ wymiany protonów na mierzone czasy relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  roztworów DNA opisano analitycznie (69, 70) w oparciu o teorię Z i m m e r m a n n a i B r i t t i n a (114) uzyskując końcową postać zależności dla uwodnienia nierotacyjnego:

$$W_1 = K_1 T_{1n} \quad W_2 = K_2 S_{2n} \quad 5$$

gdzie  $W_1$  i  $W_2$  oznaczają odpowiednio uwodnienie wyliczone z pomiarów podłużnego  $T_1$  i poprzecznego  $T_2$  czasu relaksacji w roztworach DNA a wartości  $K_1$  i  $K_2$  oznaczają stałe eksperymentalne, które oblicza się z pomiarów czasów relaksacji w roztworach DNA i w rozpuszczalniku.

Trzeciorzędowa struktura DNA wykazuje konfigurację zbliżoną do gaussowskiego kłębaka. Z pomiarów rozpraszania światła (93) wynika, że promień bezwładności molekuly DNA jest związany z jej ciężarem cząsteczkowym równaniem empirycznym:

$$R = 2,7 \cdot 10^{-9} \cdot M^{0,58} \quad 6$$

co świadczy, że elipsoidalny kształt, który przybierają dwuniciowe molekuly DNA w roztworze, tylko w niewielkim stopniu różni się od kształtu kulistego, dla którego zależność (6) przybierałaby postać  $R = A \cdot M^{0,5}$ , gdzie  $A = \text{const}$ .

Taki obraz trzeciorzędowej struktury DNA pozwala założyć, że ruch statystycznej makromolekuły DNA w roztworze jest ruchem izotropowym i można go opisać przez tzw. średni czas korelacji  $\tau$  wprowadzony w teorii relaksacji jądrowej w cieczach (11, 98) i zdefiniowany jako czas, w ciągu którego rotująca w roztworze molekula obraca się o kąt równy  $\sqrt{2/3}$  radiana (48). Przy takim założeniu czasy relaksacji  $T_{1n}$  i  $T_{2n}$  można wyrazić jako funkcję  $\tau$  przy pomocy równań S o l o m o n a (98), uzyskując na podstawie zależności (5) układ równań z niewiadomymi  $W$  i  $\tau$ . Układ ten najdo-

godniej rozwiązuje się metodą graficzną pozwalającą na wyznaczenie wartości uwodnienia nierotacyjnego w gramach wody związanej na 100 g DNA.

Hipoteza istnienia nierotacyjnej części uwodnienia została podana uprzednio również dla białek (21, 68).

Wyniki oznaczeń uwodnienia DNA i białek techniką echa spinowego porównano w tablicy 3.

Uwodnienie nierotacyjne DNA w stanie natywnym jest dużo wyższe niż w stanie zdenaturowanym i zmniejsza się w miarę spadku wartości ciężaru cząsteczkowego statystycznej makromolekuły. Dla białek uwodnienie nierotacyjne wykazuje wartości dużo mniejsze niż dla DNA i wyraźnie wzrasta po denaturacji.

**Tablica 3**

Porównanie uwodnienia nierotacyjnego wyznaczonego techniką echa spinowego dla DNA białek

Makromolekuła	Ciężar cząsteczkowy DNA $\times 10^{-6}$	Uwodnienie w procentach wagowych	
		Stan natywny	Stan zdenaturowany
DNA z grasicy cielejcej (69, 70)	8,66	11,25	6,07
	7,70	10,40	
	6,50	8,40	4,90
	6,00	8,55	5,95
	4,52	4,60	3,45
Białko jaja kurzego (68)		2,16	8,10
Owoalbumina (21)		1,60	12,3
Glikogen (17)		5,26	
Fibrynogen (22, 23)		0,238	
Fibryna (22, 23)		0,252	

### Podsumowanie

Wydaje się, że rozbieżności w ilościowych oznaczeniach uwodnienia DNA różnymi technikami można wyjaśnić specyficznym oddziaływaniem makromolekuł DNA z wodą. Ilość wody związanej strukturalnie może być niewielka, ale makromolekuła może wywierać wpływ porządkujący na inne nawet dość odległe dipole wodne. Każda z technik pomiarowych obcinała warstwę wody uporządkowanej w pewnym punkcie a wodę pozostałą traktowano jako warstwę związaną z drobiną. Tymczasem rozróżnienie dwóch stanów wody w roztworach DNA — drobin związanych strukturalnie i drobin jedynie uporządkowanych jest możliwe tylko przy zastosowaniu takich technik wysokiej częstości, które będą wprowadzały w ruch wszystkie upo-



rządkowane lub słabiej związane z DNA dipole wodne, nie odrywając od DNA warstwy wody związanej strukturalnie. Najlepiej nadają się do tego techniki z zakresu rezonansu jądrowego i techniki dielektryczne o częstościach rzędu megaherców lub metody ultrawiwrowania.

Jest najbardziej prawdopodobnym, że uwodnienie nierotacyjne a więc ta część całkowitej warstwy hydratacyjnej DNA, której dipole podobnie jak cała makromolekuła DNA nie mają swobody ruchu w polu wysokiej częstości stanowi rzeczywiste uwodnienie strukturalne DNA. Wartość uwodnienia nierotacyjnego DNA zaobserwowana w polu 14 MHz jest najmniejsza w porównaniu z uwodnieniem wyznaczonym innymi metodami (46, 47, 92, 110), co przemawia za słusznością podziału uwodnienia DNA na niewielką część nierotacyjną i część rotacyjną. Wartość ta jest zbliżona rzędem wielkości do wyników przemawiających za niewielkim uwodnieniem strukturalnym DNA (15, 24, 39, 73, 110). Jest ona również zbliżona do minimalnej wartości znalezionej przez Hearsta i Vinograda (46, 47) dla sieciowego uwodnienia DNA oraz do tej ilości wody która obsadza pierwotne centra hydratacyjne w bruzdach DNA (30, 31). Dlatego wydaje się słuszne przypuszczenie, że kolejność obsadzania centrów hydratacyjnych jest identyczna zarówno dla DNA w stanie stałym o różnej wilgotności jak i dla DNA w roztworach wodnych.

Wyniki oznaczeń uwodnienia nierotacyjnego nie wykluczają istnienia wokół makromolekuły DNA szerokich powłok wodnych typu Jacobsona (50, 51). Jednak jeśli woda uporządkowana w ten sposób wokół DNA istnieje, to jest ona związana rotacyjnie, a więc nie stanowi wody integralnie związanej z drobiną. Z tego punktu widzenia niezmiernie ciekawa jest obserwacja spadku stałej dielektrycznej DNA przy częstościach leżących powyżej zakresów dyspersji dielektrycznej (51). Fakt ten można przypisać niewielkiemu uwodnieniu drobin, które istnieje jeszcze przy takiej częstości i które ze względu na uporządkowanie sieciowe może stanowić obszar o niższej stałej dielektrycznej niż woda.

Porównaniu uwodnienia DNA w stanie natywnym i zdenaturowanym poświęcono tylko kilka prac (39, 70, 92, 106), przy czym przeważnie obserwowano zmniejszenie uwodnienia makromolekuł zdenaturowanych w stosunku do natywnych. Jedynie przy zastosowaniu metody kalorymetrycznej (92) znaleziono wzrost uwodnienia DNA po denaturacji i postulowano (91, 92), że ten oraz analogiczne wyniki dla niektórych białek przemawiają za hydratacją wszystkich makromolekuł biologicznie czynnych według modelu wiązań hydrofobowych K a u z m a n n a (55, 56). Autorzy metody kalorymetrycznej (91, 92) nie podają jednak w jaki sposób odróżniają stan wody hydratacyjnej od stanu wody przechłodzonej w niskich temperaturach. Wydaje się zatem, że przytoczone przez nich wyniki ujmują sumaryczną ilość wody przechłodzonej i hydratacyjnej. Ponieważ po denaturacji stosunek ilości wody przechłodzonej do hydratacyjnej może zmienić się a więc wzrost uwodnienia zaobserwowany dla stanu zdenaturowanego może być pozorny.

Uogólnianie poglądów na uwodnienie na wszystkie makromolekuły biologicznie czynne zwłaszcza zaś białka i kwasy nukleinowe wydaje się grubym uproszczeniem. Porównanie wartości uwodnienia nierotacyjnego DNA i niektórych białek wyznaczonych z pomiarów czasów relaksacji przy użyciu tej samej aparatury echa spinowego (20) wskazuje że przy denaturacji uwodnienie nierotacyjne białek kilkakrotnie wzrasta, a uwodnienie DNA wyraźnie maleje. Wzrost uwodnienia zdenaturowanych białek można wyjaśnić wprost hipotezą oddziaływań hydrofobowych K a u z m a n n a (55, 56). Spadek uwodnienia dla DNA przemawia za obsadzeniem w stanie natywnym podstawowych centrów hydratacyjnych w nienaruszonej strukturze drugorzędnej i uwolnieniem części związanych dipoli wodnych wskutek zmian denaturacyjnych.

#### ADDENDUM

Tuż przed oddaniem do druku niniejszego artykułu ukazała się praca (Dahlborg U., Rupprecht A. *Biopolymers* 10, 849 (1971)), w której po raz pierwszy analizuje się pod kątem uwodnienia wyniki rozpraszania neutronów na zorientowanych błonach z NaDNA z różną zawartością H<sub>2</sub>O i D<sub>2</sub>O. Analizując rozkłady kątowe sprężycie rozproszonych neutronów potwierdzono silne wiązanie przez makromolekuły DNA niewielkiej ilości wody, której uporządkowanie przestrzenne jest inne w kierunku równoległym i prostopadłym do osi spirali DNA i przypomina nieco strukturę lodu.

#### LITERATURA

1. Abragam A., *The Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, Oxford 1961.
2. Andrew E. R., *Nuclear Magnetic Resonance*, Cambridge University Press, Londyn 1955.
3. Auty R. D., Cole R. H., *J. Chem. Phys.* 20, 1309 (1952).
4. Balazs E. A., Bothner-By A. A., Gergely J., *J. Mol. Biol.* 1, 147 (1959).
5. Berendsen H. J. C., Migchelsen C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 125, 365 (1965).
6. Bernal J. D., *J. Chim. Phys. Phys. Chim. Biol.* 50, 7, 61 (1953).
7. Bernal J. D., Fowler R. A., *J. Chem. Phys.* 1, 515 (1933).
8. Biezrukow O. F., *Struktura i rol wody w żywym organizmie*, Izd. Leningrad, Uniw., 1966, str. 190.
9. Bjerrum N., *Dan. Mat. Fys. Medd.* 27, 1 (1951).
10. Bloch F., *Phys. Rev.* 70, 460 (1946).
11. Bloembergen N., Purcell E. M., Pound R. V., *Phys. Rev.* 73, 679 (1948).
12. Bradbury E. M., Price W. C., Wilkinson G. R., *J. Mol. Biol.* 3, 301 (1961).
13. Bradbury E. M., Price W. C., Wilkinson G. R., *J. Mol. Biol.* 4, 39 (1962).

14. Braunauer S., Emmett P. H., Teller E., *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309 (1938).
15. Bruner R., Vinograd J., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 18 (1965).
16. Buchanan T. J., Haggis G. H., Hasted J. B., Robinson B. G., *Proc. Roy. Soc., Ser. A* **213**, 379 (1952).
17. Caputa K., Daszkiewicz O. K., Hennel J. W., Lubas B., Szczepkowski T. W., Proc. XIII-th Colloque Ampère, Leuven, September 1964.
18. Carr H. Y., Purcell E. M., *Phys. Rev.* **94**, 630 (1954).
19. Cavanau J. L., Water and Solute-Water Interactions, Holden-Day, 1964.
20. Daszkiewicz O. K., Praca doktorska, U. J. Kraków, 1965.
21. Daszkiewicz O. K., Hennel J. W., Lubas B., Szczepkowski T. W., *Nature* **200**, 1006 (1963).
22. Daszkiewicz O. K., Jędrychowski A., Kirchmayer S., *Acta Med. Polon.* **6**, 95 (1965).
23. Daszkiewicz O. K., Jędrychowski A., Kirchmayer S., *Nuclear Energy* **4**, 131 (1966).
24. Depireux J., Williams D., *Nature* **195**, 699 (1962).
25. Donohue J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **42**, 60 (1956).
26. Douglas D. C., Frisch H. L., Anderson E. W., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 401 (1960).
27. Eisinger R., Shulman G., Szymański B. M., *J. Chem. Phys.* **36**, 1721 (1962).
28. Falk M., *Can. J. Chem.* **43**, 314 (1965).
29. Falk M., *Can. J. Chem.* **43**, 3151 (1965).
30. Falk M., Hartman K. A., Jr., Lord R. C., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3343 (1962).
31. Falk M., Hartman K. A., Jr., Lord R. C., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 387 (1963).
32. Falk M., Hartman K. A., Jr., Lord R. C., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 391 (1963).
33. Forslind E., *Acta Polytechnica* **3**, No 5 (1952).
34. Frank H. S., Evans M. W., *J. Chem. Phys.* **23**, 507 (1945).
35. Frank M. S., Wen W. Y., *Disc. Faraday Soc.* **24**, 133 (1957).
36. Franklin R. E., Gosling R. G., *Nature* **171**, 737 (1953).
37. Giguère P. A., Harvey K. B., *Can. J. Chem.* **34**, 798 (1956).
38. Goldberg R. J., *J. Phys. Chem.* **57**, 194 (1953).
39. Gordon D. E., Curnutte B., Lark K. G., *J. Mol. Biol.* **13**, 571 (1965).
40. Gray H. B., Jr, Bloomfield V. A., Hearts J. E., *J. Chem. Phys.* **46**, 1493 (1967).
41. Gross P. C., Burnham S., Leighton P. A., *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1134 (1938).
42. Hahn E. L., *Phys. Rev.* **77**, 297 (1950).
43. Hahn E. L., *Phys. Rev.* **77**, 746 (1950).
44. Hearts J. E., *Biopolymers* **3**, 57 (1965).
45. Hearst J. E., Stockmayer W., *J. Chem. Phys.* **37**, 1425 (1962).
46. Hearst J. E., Vinograd J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 825 (1961).
47. Hearst J. E., Vinograd J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1005 (1961).
48. Hennel J. W., Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego, PWN, Warszawa 1966.
49. Hill T. L., *J. Chem. Phys.* **14**, 263 (1946).
50. Jacobson B., *Nature* **172**, 666 (1953).
51. Jacobson B., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2919 (1955).

52. Jacobson B., Anderson W. A., Arnold J. T., *Nature* **173**, 772 (1954).
53. Jardetzky L., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 668 (1957).
54. Jungner G., Jungner J., Allgen L. G., *Nature* **63**, 849 (1949).
55. Kauzmann W., *J. Cell. Comp. Physiol.* **47**, 113 (1956).
56. Kauzmann W., *Advan. Protein Chem.* **14** (1959).
57. Kirkwood J. G., Shumaker J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **38**, 855 (1952).
58. Klotz J. M., *Science* **128**, 815 (1958).
59. Klotz J. M., *Brookhaven Symp.* **13**, 25 (1960).
60. Klotz J. M., *Horizons in Biochemistry*, rozdz. Water, Acad. Press, New York, Londyn 1962.
61. Langridge R., Marvin D. A., Seeds W. E., Wilson M. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., *J. Mol. Biol.* **2**, 38 (1960).
62. Lewin S., *J. Chem. Soc.* str. 1462 (1962).
63. Lewin S., *Biochem. J.* **93**, 16 (1964).
64. Lewin S., *Lab. Practice* **13**, 400 (1964).
65. Lewin S., *Lab. Practice* **13**, 824 (1964).
66. Lewin S., *J. Theoret. Biol.* **17**, 181 (1967).
67. Lösche A., *Kerninduktion*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1957.
68. Lubas B., *Praca magisterska*, IFJ i UJ, Kraków 1962.
69. Lubas B., *Praca doktorska*, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 1969.
70. Lubas B., Wilczok T., *Biochim. Biophys. Acta* **120**, 427 (1966).
71. Lubas B., Wilczok T., Daszkiewicz O. K., *Biopolymers* **5**, 967 (1967).
72. Luzzatti V., *Progress in Nucleic Acid Research*, Academic Press, New York 1963, tom 1, str. 347.
73. Luzzatti V., Nicolajeff A., Mason F., *J. Mol. Biol.* **3**, 185 (1961).
74. Marvin D. A., Wilkins M. H. E., Hamilton L. D., *Acta Cryst.* **20**, 663 (1966).
75. McDonald C. C., Philips W. D., Penman S., *Science* **144**, 1234 (1964).
76. McDonald C. C., Philips W. D., Penswick J., *Biopolymers* **3**, 609 (1965).
77. McTague J. P., Ross V., Gibbs J. H., *Biopolymers* **2**, 163 (1964).
78. Meselson M., Stahl F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **44**, 671 (1958).
79. Mighelsen C., Berendsen H. J. C., Rupprecht A., *J. Mol. Biol.* **37**, 235 (1968).
80. Miles H. T., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 46 (1959).
81. Miles H. T., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 353 (1960).
82. Miles H. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 791 (1961).
83. Nabieruchin J. N., Molin J. N., Knorre W. K., Rykova W. J., Salganik R. J., *Biofizika* **10**, 408 (1961).
84. Nemethy G., Scheraga H. A., *J. Chem. Phys.* **30**, 3382 (1962).
85. Nemethy G., Scheraga H. A., *J. Phys. Chem.* **66**, 1773 (1962).
86. O'Konski C. T., *J. Phys. Chem.* **64**, 605 (1960).
87. Pauling L., Corey R. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 164 (1964).
88. Pople J. A., *Proc. Roy. Soc. Ser. A* **202**, 323 (1950).
89. Pople J. A., *Proc. Roy. Soc. Ser. A* **205**, 163 (1951).
90. Pouyet G., Jacob M., Daune M., *J. Mol. Biol.* **13**, 817 (1965).
91. Priwałow P. L., Mriewliszwili G. M., *Biofizika* **11**, 951 (1966).
92. Priwałow P. Ł., Mriewliszwili G. M., *Biofizika* **12**, 25 (1967).
93. Rice S. A., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3937 (1957).
94. Rupprecht A., *Acta Chem. Scand.* **20**, 582 (1966).

95. Samojłow O. J., *Dokl. AN ZSRR* **95**, 587 (1957).
96. Schachman H., Tertiary Structure of the Proteins, Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, New York 1963.
97. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **4**, 430 (1962).
98. Solomon J., *Phys. Rev.* **99**, 559 (1955).
99. Sprinz H., Dollstädt R., Hübner G., *Biopolymers* **7**, 447 (1969).
100. Stellwagen N. C., Shirai M., O'Konski C. T., *Biophys. J.* **6**, 111 (1964).
101. Sutherland G. B. M., Tsuboi M., *Proc. Roy. Soc. Ser. A* **239**, 446 (1957).
102. Takashima S., *Biopolymers* **4**, 663 (1966).
103. Takashima S., *J. Phys. Chem.* **70**, 1372 (1966).
104. Trinczer K. S., *Usp. Sowl. Biol.* **61**, 338 (1966).
105. Tsuboi M., *Prog. Theoret. Phys. (Kyoto), Suppl.* **17**, 99 (1961).
106. Tunis M. J., Hearst J. E., *Biopolymers* **6**, 1325 (1968).
107. Tunis M. J., Hearst J. E., *Biopolymers* **6**, 1345 (1968).
108. Vinograd J., Hearst G., Equilibrium Sedimentation of Macromolecules and Viruses, Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe, Springer, Wiedeń 1962, tom 20.
109. Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4755 (1954).
110. Wang J. H., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 258 (1955).
111. Wang J. H., Anfinsen C. B., Polestra F. H., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4763 (1954).
112. Watson J. D., Crick F. C. H., *Nature* **171**, 737 (1953).
113. Wilkins M. F. H., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature* **172**, 739 (1953).
114. Zimmermann J. R., Brittin W. E., *J. Phys. Chem.* **61**, 1328 (1957).



URSZULA KOCEMBA-ŚLIWOWSKA\*

**Nierozpuszczalne w wodzie pochodne białek biologicznie czynnych**  
**Water-Insoluble Derivatives of Proteins with Biological Activities**

Some theoretical and practical aspects connected with water-insoluble enzymes, antigens and antibodies are reviewed.

W komórkach obok enzymów rozpuszczalnych istnieją enzymy „nierozpuszczalne”, tj. wbudowane w sposób trwały w struktury subkomórkowe. Dane uzyskane *in vitro* po wyosobnieniu enzymu z takiej struktury mogą nie odzwierciedlać właściwości i roli tego enzymu *in vivo*.

Komórka zawiera szereg nieotoczonych błonami organelli, np. jąderko, chromatyna jądrowa, rybosomy, które charakteryzują się obecnością specyficznych enzymów, i stanowią duże zagęszczenia polimerów o charakterystycznym składzie, wielkości i ładunku elektrycznym. Te naturalne polimery mogą prawdopodobnie otaczać białko enzymatyczne w sposób fizyczny lub wiązać je chemicznie do swoich grup funkcyjnych. Sposób powiązania enzymów z tymi nośnikami może wpływać na aktywności enzymatyczne, a od wielkości powstałego w ten sposób układu może zależeć dostępność substratu dla enzymu. W skrajnym przypadku układ taki mógłby być nawet magazynem enzymów czasowo „nieaktywnych”, odizolowanych od substratów materiałem stanowiącym zawadę przestrzenną.

Enzymy związane z błonami też można traktować jako „nierozpuszczalne”. Należą tu enzymy łańcucha oddechowego w błonie wewnętrznej mitochondrium, enzymy biorące udział w fotosyntezie, czy też w aktywnym transporcie przez błony. Związanie tych enzymów z błonami utrzymuje je w pewnym mikrośrodkowisku, które ma istotny wpływ na działanie i aktywność tych enzymów. Cytoplazma komórki również jest poprzedzielana błonami na szereg przestrzeni, które można uważać za swoiste mikrośrodkowiska. Wpływ mikrośrodkowiska jest dość trudno ustalić. Badanie tego wpływu na właściwości enzymu staje się możliwe dopiero wtedy, gdy dokładnie znana jest budowa i własności tych fragmentów struktur, do których enzym jest przyłączony.

Od dawna rozpatrywano możliwość trwałego połączenia enzymów ze scharakteryzowanymi chemicznie substancjami w ten sposób, aby powstały nierozpuszczalne w wodzie pochodne o zachowanej aktywności biologicznej. Takie nierozpuszczalne w wodzie pochodne enzymów byłyby świetnym modelem do badań.

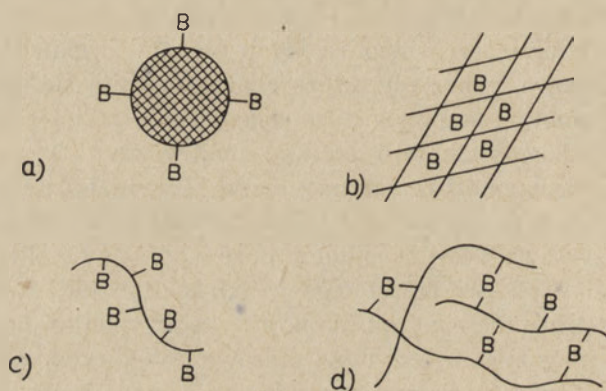
\* Mgr, Pracownia Cytofizjologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego oraz Instytut Biostruktury i Transplantologii, Akademia Medyczna, Warszawa

## I. Sposoby wiązania białek w nierozpuszczalne w wodzie pochodne

Jak dotychczas praktyczne próby otrzymania nierozpuszczalnych w wodzie pochodnych białek prowadzono za pomocą:

- fizycznej adsorpcji na obojętnych nośnikach jak szkło, celuloza, węgiel aktywny, albo adsorpcji na różnego typu wymiennicach jonowych
- zamknięcia białek w siateczce żelu, którego oczka były dostatecznie małe, aby względnie trwale „uwięzić” tam cząsteczkę białka
- kowalencyjnego wiązania cząsteczek białka z nośnikami nierozpuszczalnymi w wodzie, o odpowiednich grupach wiążących (funkcyjnych)
- kowalencyjnego wiązania białek przez odczynniki o odpowiednich dwóch grupach funkcyjnych.

Powyższe sposoby wiązania pokazano na schemacie 1.



**Schemat 1.** Sposoby wiązania białek (B) z nośnikami (wg 11)

a. fizyczna adsorpcja; b. zamykanie w oczkach siateczki żelu; c. kowalencyjne wiązanie cząsteczek białka z nośnikiem; d. kowalencyjne wiązanie cząsteczek białka z odczynnikami o dwóch grupach wiążących

Fizyczna adsorpcja enzymów lub przeciwciał na nośnikach i wymiennicach jonowych, jak wynika z całego szeregu wykonanych prac, (7, 31, 32) nie jest metodą zadawalającą, gdyż zazwyczaj następuje pewna desorbcja białka z adsorbentu.

Próby zamknięcia białek w oczkach żelu poliakrylamidowego prowadzili *Bernfeld i Wan* (8), ale i w tych doświadczeniach wykazano „uciekanie” białek z sieci żelu podczas przemywania.

*Campbell i wsp.* (9) badając kowalencyjne wiązanie białka albuminy surowicy wołu przez dwuazobenzylcelulozę wykazali, że jest to najlepsza metoda otrzymywania białek „nierozpuszczalnych”. Wiązanie białko-nośnik było trwałe w zmiennych warunkach pH i siły jonowej środowiska. Otrzymano sztuczne błony z wbudowanymi enzymami oraz kolumny o aktywności enzymatycznej lub antygenowej.



## II. Typy wiązań kowalencyjnych wykorzystywanych przy syntezie połączeń białko-nośnik

Wiązanie kowalencyjne między białkiem a nośnikiem powinno powstawać w warunkach nie powodujących chemicznej lub termicznej denaturacji białka. W pochodnych enzym-nośnik wiązanie kowalencyjne nie może tworzyć się z udziałem aminokwasu istotnego dla aktywności enzymatycznej.

Następujące grupy funkcyjne białek były wykorzystane do tworzenia wiązań kowalencyjnych w łagodnych warunkach:

- a) grupy  $\alpha$  i  $\epsilon$ -aminowe
- b) grupy hydroksylowe seryny i treoniny oraz układ fenolowy tyrozyny
- c) grupa sulfhydrylowa cysteiny
- d) grupa imidazolowa histydyny.

Grupy aminowe łatwo ulegają alkilacji i acylacji; mogą reagować z aldehydami i izocyjanianami lub wytwarzać sole dwuazoniowe. Grupy hydroksylowe seryny i treoniny oraz układ fenolowy tyrozyny mogą ulegać acylacji. Grupa sulfhydrylowa cysteiny może być alkilowana i łatwo tworzy organortęcziany. Grupa imidazolowa histydyny i grupa fenolowa tyrozyny dają się przeprowadzić w sole dwuazoniowe.

## III. Nośniki

Nośnikiem nazwano substancję, która związana z białkiem biologicznie czynnym tworzy nierozpuszczalny w wodzie kompleks. Grupa funkcyjna nośnika powinna wykazywać wysoką reaktywność wobec grup znajdujących się na powierzchni białka. Nieobojętne są też własności fizyczne nośnika, które decydują w znacznym stopniu o ilości białka związanego przez nośnik, a następnie o właściwościach fizykochemicznych uzyskanej pochodnej. Bierze się pod uwagę rozpuszczalność nośnika w wodzie, jego powierzchnię, pęcznienie, mechaniczną odporność, hydrofilność lub hydrofobowość, a także punkt izoelektryczny, które to cechy mogą w znacznym stopniu modyfikować własności związanego białka.

Nośniki o minimalnej rozpuszczalności w wodzie i wysokiej odporności mechanicznej tworzą pochodne białkowe, które łatwo można osadzać przez wirowanie lub sączenie. Dobrym nośnikiem będzie też tylko ten, który wiąże białko kowalencyjnym wiązaniem, nie wykazując dodatkowo zdolności wiązania niespecyficznego, na przykład wskutek fizycznej adsorpcji.

Ponieważ wiązania kowalencyjne między białkiem biologicznie czynnym a nośnikiem nie mogą obejmować reszt aminokwasowych istotnych dla aktywności tych białek, przy planowaniu syntezy nierozpuszczalnej pochodnej konieczna jest pewna znajomość miejsca aktywnego w danym białku.

Liczba nośników, naturalnych i syntetycznych polimerów, które speł-

niałyby większość powyżej postawionych warunków jest dotychczas niewielka. I s l i k e r (20) otrzymał pochodne antygenów przez wiązanie tych białek do wymienniczy jonowych o zaktywowanych grupach karboksylowych lub sulfonowych.

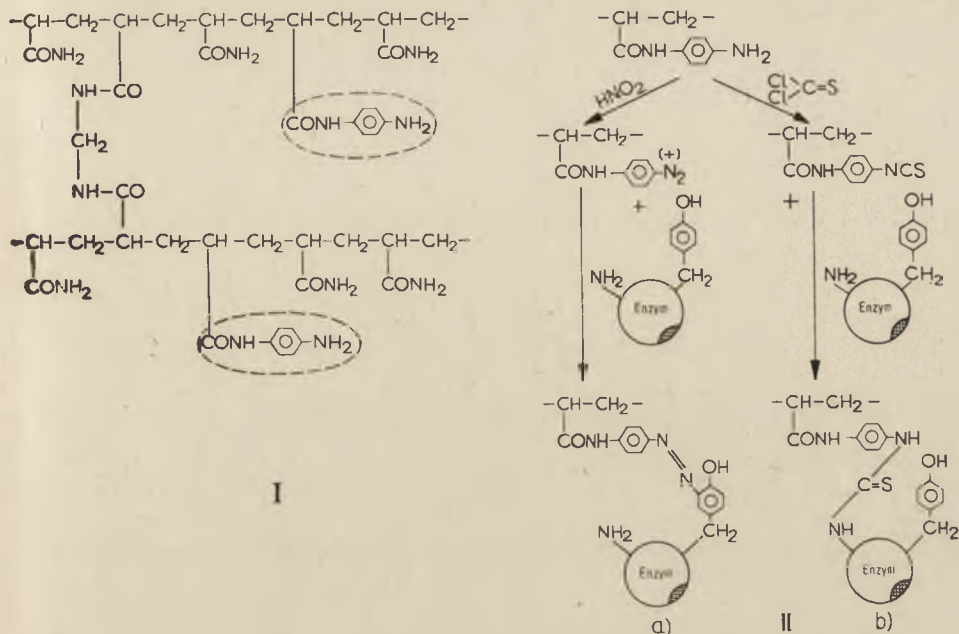
Wielu autorów (15, 31, 32, 39) próbowało wiązać białka (enzymy, antygeny i przeciwciała) do *CM*-celulozy o zaktywowanej grupie karboksylowej w formie azydru. Wiązano też białka do bromocelulozy jako nośnika (21).

Wielu autorów wykorzystało pochodne soli dwuazoniowych do wiązania białek. Tę metodę zastosowali po raz pierwszy C a m p b e l l i w s p. (9), wykorzystując polidwuazoniowe pochodne celulozy do wiązania antygenów.

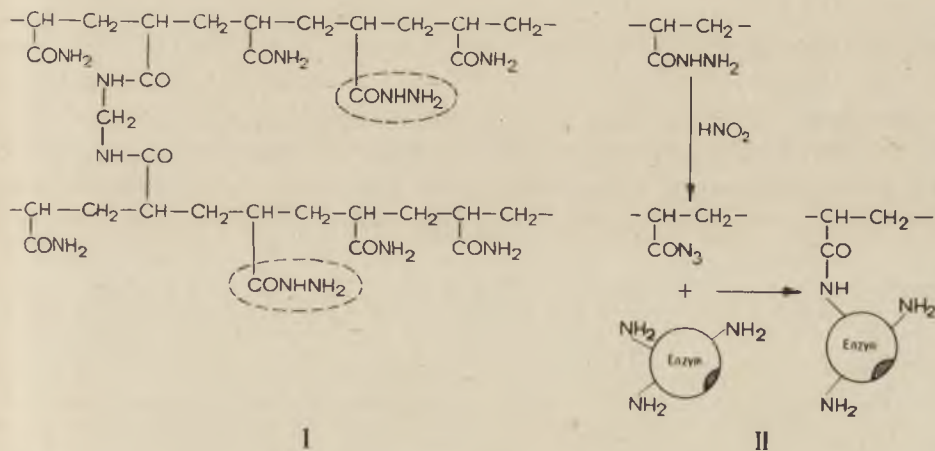
Inni autorzy (27, 37) posłużyli się reakcją dwuazowania przy wiązaniu przeciwciał i enzymów. Interesującym i dość często wykorzystywanym nośnikiem do wiązania białek jest syntetyczny kopolimer *p*-aminofenylalaniny i leucyny otrzymany przez dwuazowanie (3, 4, 5). Nośnik ten budową przypomina trochę białko i mikrośrodowisko, w którym działa enzym, jest bardziej zbliżone do warunków fizjologicznych niż w przypadku zastosowania innego nośnika. G r u b h o f e r i S c h l e i t h (18) pierwsi wykorzystali dwuazowany poli-*p*-aminostyren do kowalencyjnego wiązania białek. Wykazano jednak, że nośnik niespecyficznie adsorbuje białka, co powoduje duże różnice w fizycznych i chemicznych własnościach otrzymanych preparatów. Poli-*p*-aminostyren można przeprowadzić też w pochodną poliizotocyjanianową działając tiosfogenem. Tak zaktywowanym nośnikiem posłużyli się K e n t i S l a d e (22, 23) do otrzymania pochodnych przeciwciał. *Sephadex* zawierający izotocyjanianowe grupy stosowali A x e n i P o r a t h (1, 2). M a n e c k e i w s p. (28, 29, 30) użyli do wiązania białek kopolimeru kwasu metakrylowego i 3-fluoro-4,6-dwunitroanilidu kwasu metakrylowego. W handlu są dostępne dwa kopolimery oparte na akrylamidzie i jego pochodnych o handlowych nazwach — enzakryl-AA i enzakryl-AH.

Proces wiązania białka przez enzakryl-AA aktywuje się przez przemianę aromatycznych grup aminowych w grupy izocyjanowe lub przez ich dwuazowanie. Budowę chemiczną enzakrylu-AA i proces jego aktywacji przedstawia schemat 2.

Enzakryl-AH zawiera kwasowo-hydrazydowe reszty funkcyjne, które są potencjalnie aktywne przy wiązaniu białek. Budowę chemiczną tego nośnika, sposób jego aktywacji i wiązania z białkiem pokazuje schemat 3. Obydwa te kopolimery znalazły zastosowanie przy otrzymywaniu nierozpuszczalnych w wodzie pochodnych enzymów; do otrzymywania pochodnych przeciwciał i antygenów bardziej nadaje się polimer tiolaktonu *N*-acetylo-DL-homocysteiny. Innym acylującym nośnikiem jest kopolimer etylenu i bezwodnika kwasu maleinowego (24, 25). Grupy bezwodnikowe

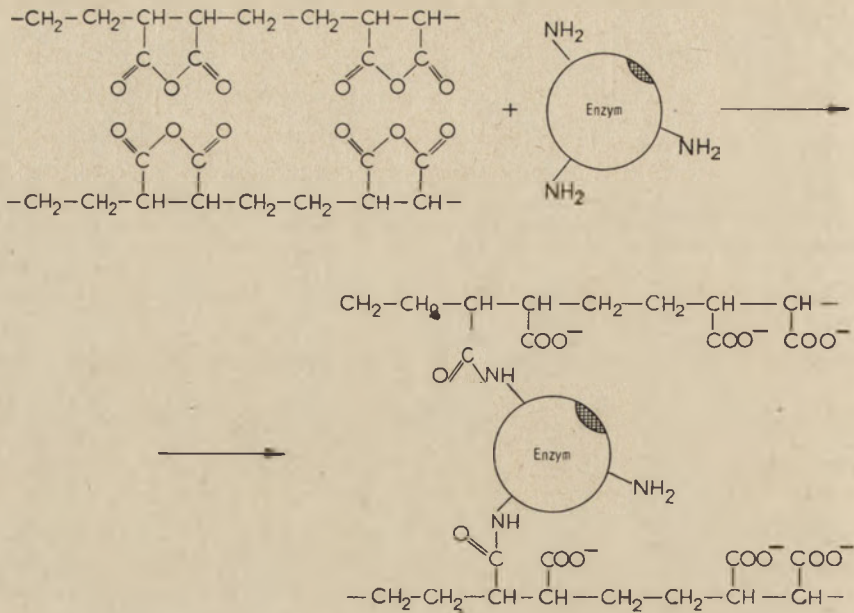


Schemat 2. Budowa (I) oraz sposoby aktywacji i wiązania enzymów (II) przez Enzakryl AA (wg 6)



Schemat 3. Budowa (I) oraz sposoby aktywacji i wiązania z białkiem (II) Enzakrylu AH (wg 6)

nośnika reagują z grupami aminowymi białka tworząc wiązanie peptydowe. Niezwiązane grupy bezwodnikowe ulegają wolnej hydrolizie do grup karboksylowych, co nadaje nierozpuszczalnej pochodnej kompleksu silnie anionowy charakter. Schemat wiązania białka z tym nośnikiem podaje schemat 4.



**Schemat 4.** Budowa i sposób wiązania z białkiem kopolimeru bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu (wg 24)

We et al (38) związał kowalencyjnie białko do porowatego szkła. Co prawda ilość białka, jaką udało mu się w ten sposób związać, była niewielka, 0,12—2,6 mg/g szkła, ale za to nośnik, w odróżnieniu od powszechnie stosowanych nośników organicznych, jest bardziej odporny na wiele czynników jak *pH*, siła jonowa, wykazuje większą stabilność termiczną, mniejszą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych i nieorganicznych, jest obojętny elektrycznie i ma mniejszą reaktywność uboczną. Poza tym nie jest atakowany przez bakterie, w odróżnieniu od nośników organicznych.

#### IV. Przegląd białek biologicznie czynnych związanych z nośnikami

Prawie wszystkie prace nad otrzymaniem nierozpuszczalnych pochodnych enzymów prowadzono na enzymach z grupy hydrolaz. Wykaz enzymów i nośników, z którymi je wiązano w nierozpuszczalne pochodne, podaje tablica 1. Otrzymano również szereg nierozpuszczalnych w wodzie pochodnych przeciwciał i białkowych antygenów (8, 14, 16, 20, 21, 22, 23, 27, 30, 35, 37). Jako nośników użyto w tych pracach: *CM*-celulozę, kopolimer *p*-aminofenyloalaniny i *L*-leucyny, dwuazo-*p*-aminobenzylcelulozę, poli-*p*-aminostyren, oraz tiolakton *N*-acetylo-*DL*-homocysteiny.

## V. Zmiany właściwości fizykochemicznych białek po związaniu ich z nośnikiem

Synteza nierozpuszczalnych w wodzie pochodnych białek biologicznie czynnych z nośnikami o różnych własnościach fizykochemicznych stwarza możliwość śledzenia wpływu sztucznie wytworzonego mikrośrodowiska na własności fizykochemiczne białek. Badając własności białek związanych z nośnikami stwierdzono, że:

- a) enzymy mogą być dłużej przechowywane w roztworach wodnych bez znacznej straty aktywności, np. w wodzie lub buforach przy 4°C przez szereg miesięcy,
- b) proteazy i peptydazy nie ulegają autolizie,
- c) enzymy są bardziej odporne na inaktywację termiczną.

Zauważono, że nośniki o charakterze hydrofilnym zwiększają, zaś hydrofobowe zmniejszają oporność enzymów na czynniki denaturujące białko np. mocznik. Pochodna papainy i kopolimeru *p*-aminofenyloalanino-*L*-leucyny jest stabilna w 4M roztworze wodnym chlorowodoru guanidyny (10). Kompleks trypsyny z kopolimerem etylenu i bezwodnika maleinowego jest aktywny w 8M roztworze mocznika (25), w którym rozpuszczalna trypsyna jest całkiem nieaktywna. Ładunek wytwarza wokół tej pochodnej mikrośrodowisko o charakterze silnie anionowym, chroniące enzym przed działaniem mocznika.

Nierozpuszczalne w wodzie pochodne proteaz i peptydaz wykazują dużą odporność na autolizę, na przykład nierozpuszczalna w wodzie polityrozylotrypsyna inkubowana przez 24 godziny w 25°C przy *pH* 9 zachowała 80% aktywności, podczas gdy trypsyna w roztworze jest po takiej inkubacji nieaktywna (5).

Odporność na autolizę zależy od ilości białka związanego z nośnikiem. Preparaty bogate w białko podczas inkubacji przy *pH* 10 zachowały 40%, a preparaty ubogie w białko aż 80% aktywności wyjściowej (24). Odporność na autolizę jest związana z zablokowaniem grup aminowych przez tyrozylację lub powiązanie z kopolimerem etylenu i bezwodnika kwasu maleinowego. Poszczególne cząsteczki białka enzymatycznego są przyczepiane do nośnika, a więc ich centra aktywne są odizolowane od siebie i nie mogą na siebie wzajemnie oddziaływać proteolitycznie. Podobna sytuacja mogłaby występować również w komórce.

Nośnik modyfikuje w znaczny sposób aktywność enzymatyczną. Zmiana ta jest związana z wielkością układu enzym-nośnik, a także z ładunkiem elektrycznym nośnika. Na przykład badając zależność aktywności trypsyny związanej z kopolimerem kwas maleinowy-etylen od *pH* środowiska zauważono, że przy niskiej sile jonowej profil krzywej był przesunięty o trzy jednostki *pH* w kierunku alkalicznym w stosunku do analogicznej krzywej wykonanej dla trypsyny w roztworze (25). Gdy zależność tę oznaczono

Tablica 1

## Pochodne enzym-nośnik i ich właściwości

Enzym	Nośnik	Właściwości otrzymanej pochodnej
Trypsyna	Kopolimer <i>p</i> -aminofenyloalanilo-L-leucyny (3, 4, 5)	Pochodna zawierała około 20% białka. Enzym zachował 15—30% aktywności esterolitycznej (BAEE*), niższą aktywność proteolityczną (miozyna, kazeina). Następowało częściowe zahamowanie enzymu przez duży nadmiar (90 : 1) inhibitora sojowego trypsyny
	Azydek <i>CM</i> -celulozy (15, 23)	Preparat o wysokim stosunku białko/nośnik. Wykazywał wyższą aktywność enzymatyczną wobec niskocząsteczkowych substratów, niż wobec wielkocząsteczkowych. Nie był hamowany przez inhibitor z krwi.
	Kopolimer bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu (24, 25)	Otrzymano preparaty o różnej zawartości białka (od 4,6 do 70%). Enzym zachował do 70% aktywności esterolitycznej (BAEE). Aktywność proteolityczna była niższa i bardzo zależała od wielkości substratu. Inhibitor z trzustki hamuje działalność enzymu, zaś inhibitor sojowy nie działała na enzym nawet w dużym nadmiarze.
	Bromoacetyloceluloza porowate szkło (21, 38)	W obu wypadkach otrzymano pochodne o bardzo niskim stosunku białko/nośnik. Zachowana była aktywność esterolityczna i proteolityczna.
Chymotrypsyna	Azydek <i>CM</i> -celulozy (33)	Pochodna zawierała około 30% białka. Enzym zachował 25% aktywności esterolitycznej. Aktywność proteolityczna była niższa i zależała od wielkości substratu.
	Aminobenzylceluloza (32, 33) Kopolimer <i>p</i> -aminofenyloalanilo-L-leucyny (3, 5)	Preparat o niskiej specyficznej aktywności. Preparaty chymotrypsyny z tymi nośnikami miały właściwości bardzo podobne do analogicznych pochodnych trypsyny
	Kopolimer bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu (36)	Wszystkie powyższe preparaty a szczególnie pochodna <i>CM</i> -celulozy, wykazały wyższą odporność na denaturację cieplną niż rozpuszczalna chymotrypsyna. Były też bardziej stabilne w alkalicznym <i>pH</i>
Papaina	Kopolimer <i>p</i> -aminofenyloalanilo-L-leucyny (10)  Dwufunkcyjny czynnik: <i>bis</i> dwuazobenzydyna (36)	Preparat zawierał około 28% białka. Aktywność esterolityczna (BAEE) była zachowana w 70%, zaś aktywność kazeinolityczna w 30%. Przez 1 miesiąc wodna zawiesina tej pochodnej w 4°C zachowała 75% aktywności. Preparat zachował aktywność esterolityczną w 10%, zaś kazeinolityczną w 5% w stosunku do rozpuszczalnego enzymu.

Tablica 1c. d.

Enzym	Nośnik	Własności otrzymanej pochodnej
	Kolagen (10)  Porowate szkło (38)	Tworzenie błony kolagenowo-papainowej za pośrednictwem <i>bis</i> -dwuazobenzyny. Wszystkie pochodne tego typu miały zachowaną częściowo aktywność esterolityczną. Preparat zawierał stosunkowo mało białka (2,6 mg/g szkła). Był bardzo odporny na denaturację termiczną.
Ficyna	CM-celuloza (26)	Własności podobne jak u wszystkich wyżej wymienionych CM-celulozo-pochodnych enzymów.
Pepsyna	Poli- <i>p</i> -aminostyren (18)  Kopolimer <i>p</i> -aminofenyloalanylo-L-leucyny (36)	Nierozpuszczalna w wodzie pochodna wykazywała aktywność proteolityczną. Pochodna zachowała 3—5% aktywności pr teolitycznej rozpuszczalnego enzymu.
Karboksy-peptydaza	Poli- <i>p</i> -aminostyren (18)	Pochodna wykazywała niską aktywność peptydazową.
Ureaza	Kopolimer <i>p</i> -aminofenyloalanylo-L-leucyny (34)	Nierozpuszczalne pochodne zachowały od 15 do 60% aktywności w stosunku do rozpuszczalnego enzymu.
Diastaza	Poli- <i>p</i> -aminostyren (12, 13) Enzakryl AA (6)	Nośniki te wiązały stosunkowo dużą ilość białka enzymatycznego
Streptokinaza i plazminogen	Kopolimer <i>p</i> -aminofenyloalanylo-L-leucyny (36)	Aktywność enzymatyczna w tych pochodnych enzymów była zachowana w 5—7%.
Dehydrogenaza alkoholowa	Kopolimer kwasu metakrylowego i 3-fluoro-4,6-dwunitroanilidu kwasu metakrylowego (36)	Preparat zachował aktywność enzymatyczną.

\* ester etylowy benzoilo-L-argininy

w roztworze o dużej sile jonowej, krzywe dla trypsyny związanej i dla trypsyny w roztworze były analogiczne. Świadczy to o możliwości zmniejszenia lokalnego wpływu licznych grup anionowych nośnika przez ich zobojętnienie ruchliwymi kationami.

Kopolimer kwasu maleinowego i etylenu jest nośnikiem o silnie anionowym charakterze, dlatego na jego powierzchni przy niskim stężeniu

jonów w środowisku występuje lokalne zakwaszenie. Tłumaczy to, dlaczego krzywa aktywności pochodnej trypsyny jest przesunięta w kierunku alkalicznym (25). Stosując obojętny elektrycznie nośnik często nie stwierdza się zmiany zależności aktywności związanego enzymu od *pH* środowiska.

Wartość stałej Michaelisa dla papainy związanej z estrem etylowym benzoilargininy jest bardzo zbliżona do stałej oznaczonej dla papainy w roztworze (19). Natomiast stała Michaelisa aktywności esterazowej dla pochodnej trypsyny z kopolimerem kwasu maleinowego i etylenu w sposób istotny różni się od stałej wyznaczonej dla trypsyny w roztworze. Wielkość tej różnicy zależy od siły jonowej roztworu (25) (tablica 2). Przy niskiej sile jonowej występuje aż 34-krotne obniżenie stałej Michaelisa dla pochodnej trypsyny. Takie znaczne zwiększenie powinowactwa substratu do układu enzym-nośnik jest prawdopodobnie związane ze zdolnością do przyciągania i wiązania substratu przez obdarzony ładunkiem elektrycznym nośnik. Im siła jonowa roztworu jest większa, tym bardziej ładunek nośnika jest zobojętniany przez jony środowiska i efekt zwiększenia powinowactwa jest mniejszy.

Tablica 2

Stałe Michaelisa dla trypsyny i jej pochodne przy różnej sile jonowej (wg 25)

Siła jonowa roztworu ( $\Gamma/2$ )	Dla trypsyny w roztworze $K_m \times 10^3 (M)$	Dla pochodnej trypsyny $K'_m \times 10^3 (M)$	$K_m/K'_m$
0,04	$6,85 \pm 1,0$	$0,2 \pm 0,005$	$34 \pm 10$
0,5	$6,85 \pm 1,0$	$5,2 \pm 0,5$	$1,32 \pm 0,3$

Zauważono, że aktywność enzymatyczna nierozpuszczalnych pochodnych enzymów zależy od wielkości stosowanego substratu. W grę wchodzi tu prawdopodobnie zjawisko zawady przestrzennej podczas oddziaływań między wielkocząsteczkową pochodną enzymu i dużą cząsteczką substratu. Stwierdzono na przykład zachowanie znacznie wyższej aktywności esterazowej niż proteolitycznej po związaniu niektórych proteaz z nośnikiem, co łatwo się tłumaczy tym, że estry są cząsteczkami mniejszymi i bardziej ruchliwymi niż substraty białkowe (patrz tablica 1).

Różne pochodne tego samego enzymu zapewniają niejednakową dostępność do aktywnego miejsca dla substratów. Na przykład polityrozylotrypsyna podobnie jak trypsyna w roztworze przeprowadza protrombinę w trombinę, natomiast trypsyna związana z kopolimerem kwasu maleinowego i etylenu przeprowadza aktywację protrombiny, a ponadto trawi powstałą trombinę. Dla pochodnych proteaz stosowano jako substraty różne białka: hemoglobinę, kazeinę, lizozym, owoalbuminę, albuminę surowicy



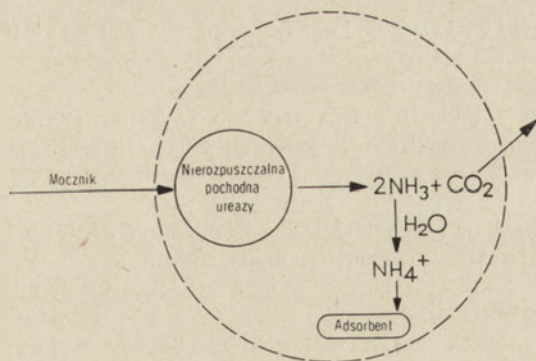
wołu i żelatynę. W każdym przypadku aktywność proteolityczna względem większego substratu była mniejsza niż wobec substratu o mniejszej cząsteczce.

Enzymy, których substraty mają małą cząsteczkę, są często wbudowane w błony biologiczne, na przykład enzymy łańcucha oddechowego. O zawadzie przestrzennej w takim przypadku raczej nie może być mowy. Natomiast enzymy, dla których substratami są większe cząsteczki, często występują w płynnej części cytoplazmy.

## VI. Praktyczne zastosowanie nierozpuszczalnych pochodnych białek

Możliwość syntezy nierozpuszczalnych w wodzie pochodnych białek biologicznie czynnych jest także bardzo ciekawa z praktycznego punktu widzenia. Nierozpuszczalne w wodzie pochodne białek można wbudowywać w błony i badać własności takich sztucznych, ale biologicznie aktywnych struktur (17).

Takie pochodne białek okazały się też bardzo wygodne w praktyce laboratoryjnej. Nierozpuszczalną pochodną enzymu można usunąć z mieszaniny reakcyjnej przez odwirowanie. Nie jest więc konieczna inaktywacja enzymu w celu zakończenia reakcji, jak to zwykle się praktykuje w pracy z enzymami w roztworze. Nierozpuszczalnych pochodnych enzymu można więc używać wielokrotnie. Kolumny zrobione z takich pochodnych enzymów nadają się do szybkiego i prostego przekształcania dużych ilości substratu. Można również otrzymać kolumny z nierozpuszczalnych w wodzie pochodnych przeciwciał czy antygenów, co pozwala na szybkie i selektywne wychwycenie odpowiednich antygenów czy przeciwciał nawet w przypadku dużego ich rozcieńczenia podobnymi związkami. Późniejsza elucja zaadsorbowanych na kolumnie białek pozwala na otrzymanie ich czystych frakcji.



Schemat 5. Działanie „sztucznej nerki” opartej na wykorzystaniu nierozpuszczalnej pochodnej ureazy (wg 11)

Ciekawą próbą zastosowania pochodnych enzymów w medycynie była praca Changa (11). Badacz ten otaczał nylonową błonką nierozpuszczalną w wodzie pochodną ureazy, tworząc mikrokapsułki o ściankach przepuszczalnych tylko dla związków niskocząsteczkowych. Te mikrokapsułki umieszczano w pojemniku włączonym do krwioobiegu psa. Mocznik z krwi dyfundował przez ściany mikrokapsulek i był rozkładany przez zawartą w nich ureazę. Wytworzony amoniak przedostawał się do krwi, skąd był wychwytywany przez wymiennicze jonowe, również zawarte w mikrokapsułkach. Schemat takiego układu podaje schemat 5. Mały substrat i produkt reakcji enzymatycznej z łatwością dyfundowały przez ścianki mikrokapsulek. Warto dodać, że zamknięcie białka w mikrokapsułkach zapobiega reakcji immunologicznej ze strony organizmu. Zastosowanie nierozpuszczalnej w wodzie pochodnej ureazy gwarantuje utrzymanie aktywności enzymatycznej przez dłuższy okres, a także zabezpiecza przed przechodzeniem ureazy przez pory mikrokapsulek. Powstaje więc możliwość stosowania w lecznictwie enzymów-proteż, pochodzących z różnych źródeł dla wyrównania pewnych wrodzonych czy nabytych bloków metabolicznych.

#### LITERATURA

1. Axen R., Porath J., *Acta Chem. Scand.* **18**, 2193 (1964).
2. Axen R., Porath J., *Nature* **210**, 367 (1966).
3. Bar-Eli A., Katchalski E., *Nature* **188**, 856 (1960).
4. Bar-Eli A., Katchalski E., *Nature* **188**, 1720 (1961).
5. Bar-Eli A., Katchalski E., *J. Biol. Chem.* **238**, 1690 (1963).
6. Barkes S. A., Somers P. J., Epton R., *Carbohydrate Res.* **8**, 491 (1968).
7. Barnett L. B., Bull H. B., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 244 (1959).
8. Bernfeld P., Wan J., *Science* **142**, 678 (1963).
9. Campbell D. H., Luescher E., Lerman L. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **37**, 575 (1951).
10. Cebra J. J., Gival D., Silman H. J., Katchalski E., *J. Biol. Chem.* **236**, 1720 (1961).
11. Chang T. M. S., *Science Tools* **16**, 35 (1969).
12. Childow J. W., Stephen J., Smith H., *Biochem. J.* **104**, 4 (1967).
13. Childow J. W., Stephen J., Smith H., *Nature* **218**, 773 (1968).
14. DeCarvalho S., Lewis A. J., Rand H. J., Uhrick J. R., *Nature* **204**, 265 (1964).
15. Epstein C. J., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* **237**, 2175 (1962).
16. Givol D., Sela M., *Biochemistry* **3**, 444 (1964).
17. Goldman R., Silman H. J., Caplan S. R., Kedem C., Katchalski E., *Science* **150**, 758 (1965).
18. Grundhofer N., Schleith L., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **297**, 108 (1954).
19. Hornby W. E., Lilly M., Crock E. M., *Biochem. J.* **98**, 420 (1966).
20. Isliker H. C., *Advan. Protein Chem.* **13**, 387 (1957).

21. Jagendorf A. T., Patchornik A., Sele M., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 516 (1963).
22. Kent L. H., Slade J. H. R., *Nature* **183**, 325 (1959).
23. Kent L. H., Slade J. H. R., *Biochem. J.* **77**, 12 (1960).
24. Levin Y., Pecht M., Goldstein L., Katchalski E., *Biochemistry* **3**, 1905 (1964).
25. Levin Y., Pecht M., Goldstein L., Katchalski E., *Biochemistry* **3**, 1915 (1964).
26. Lilly M., Money C., Hornby W., Crook E. M., *Biochem. J.* **95**, 459 (1965).
27. Malley A., Campbell D. H., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 487 (1963).
28. Manecke G., Gunzel G., *Nature* **54**, 531 (1967).
29. Manecke G., Singer S., *Makromol. Chem.* **37**, 119 (1960).
30. Manecke G., Singer S., *Makromol. Chem.* **39**, 13 (1960).
31. Mitz H. A., *Science* **123**, 1076 (1956).
32. Mitz H. A., Schneter R. G., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4025 (1959).
33. Mitz H. A., Summaria I. J., *Nature* **189**, 576 (1961).
34. Riesel E., Katchalski E., *J. Biol. Chem.* **239**, 1521 (1964).
35. Schon A. H., *Britt. Med. Bull.* **19**, 183 (1963).
36. Silman H., Katchalski E., *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 873 (1966).
37. Webb T., Lapresle C., *Biochem. J.* **91**, 24 (1964).
38. Weetall H. H., *Science* **166**, 3905 (1969).
39. Weliky N., Weezall H. H., Gilden R. V., Campbell D. H., *Im-munochemistry* **1**, 219 (1964).



JERZY CHUDZIK\*, ALEKSANDER KOJ\*\*

## Zastosowanie metody swoistej sorpcji (ang. *affinity chromatography*) do wyosabniania enzymów i inhibitorów enzymatycznych

### Application of the Specific Sorption Method (Affinity Chromatography) to Isolation of Enzymes and Enzyme Inhibitors

Principal features, advantages and drawbacks of affinity chromatography in the isolation of specific proteins are discussed and recent achievements in this field are briefly reviewed.

Wyodrębnianie i oczyszczanie białek konwencjonalnymi metodami preparatywnymi jest zwykle kłopotliwe i czasochłonne, a wydajność preparatyki często niezadowalająca. Metody te opierają się na wykorzystaniu fizykochemicznych własności białek, które mogą różnić się tylko nieznacznie od własności nieaktywnych składników w wyjściowych materiałach. Bardziej obiecujące wydaje się wykorzystanie do procesów wyosabniania określonego białka jego specyficznych własności biologicznych. Wybiórcza precypitacja kompleksu antygen — przeciwciało stanowi przykład takiej wysoce swoistej reakcji znanej od dawna. Ostatnie lata przyniosły znaczny rozwój techniki izolowania enzymów wykorzystującej zjawiska tworzenia dysocjujących kompleksów typu enzym-substrat czy enzym-inhibitor.

W metodzie swoistej sorpcji (ang. *affinity chromatography*) materiał zawierający wyosabniany enzym zostaje przepuszczony przez kolumnę z odpowiedniego materiału z wbudowanym substratem lub inhibitorem tego enzymu. Białka nie wykazujące powinowactwa do aktywnego czynnika związanego na kolumnie przechodzą bezpośrednio do wycieku, podczas gdy enzym tworzący mniej lub bardziej trwałe kompleksy z substratem lub inhibitorem zostaje opóźniony lub całkowicie zatrzymany na kolumnie. Wymycie związanego enzymu osiąga się zwykle przez dobranie odpowiedniego odczynu środowiska czy stężenia soli w płynie elucyjnym. Z reguły kolumna sorpcyjna może być używana wielokrotnie. Procesy sorpcji czy elucji

\* Mgr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

\*\* Doc. dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

mogą być przeprowadzane także bezpośrednio w zawieszynie (43), ale na ogół chromatografia kolumnowa stwarza lepsze możliwości rozdzielania. W korzystnych przypadkach niektórym autorom udało się uzyskać kilkasetkrotne oczyszczenie enzymu podczas jednostopniowego rozdzielania na kolumnie swoistego adsorbentu (1, 2).

Metodę swoistej sorpcji przy odpowiednim doborze ligandów zastosowano także do izolowania inhibitorów enzymatycznych (23, 27), przeciwciał lub antygenów (32, 38, 40), komplementarnych nici kwasów nukleinowych (9), przenośnikowego RNA (18, 20) czy oligo- i polinukleotydów (41).

Istnienie nierozpuszczalnych w wodzie pochodnych enzymów, antygenów czy przeciwciał znane było od wielu lat, jak to podają w obszernym przeglądzie Silman i Katchalski (42), jednakże zastosowanie tych materiałów dla preparatyki enzymów i ich inhibitorów nastąpiło stosunkowo niedawno. Za przełomowe należy uznać prace Arsenisa i McCormicka (1, 2) nad izolowaniem enzymów flawinowych, Cuatrecasasa, Wilcheka i Anfinsena (17) nad wyosobnianiem kilku hydrolaz, oraz Fritza i wsp. (24, 25) nad otrzymywaniem białkowych czy polipeptydowych inhibitorów enzymów proteolitycznych. Liczba prac dotyczących tego zagadnienia szybko rośnie i w 1970 roku ukazało się w światowym piśmiennictwie kilkanaście doniesień o skutecznym zastosowaniu „*affinity chromatography*” do izolowania enzymów lub inhibitorów enzymatycznych.

## I. Wiązanie białek z nierozpuszczalnymi nośnikami

### 1. Własności nośników

Warunkiem skutecznego stosowania metody swoistej sorpcji są odpowiednie cechy adsorbentu. Przede wszystkim nośnik musi się odznaczać jak najmniejszą zdolnością interakcji z cząsteczkami białek zarówno przed jak i po wprowadzeniu grup wiążących. Materiał kolumny powinien być porowaty i tworzyć dostatecznie luźną strukturę pozwalającą na łatwą wędrówkę makrocząsteczek, przy czym parametry przepływu cieczy muszą być możliwie stałe. Chemiczna struktura nośnika winna zezwalać na wydajne wbudowywanie specyficznych ligandów w dość łagodnych warunkach, poprzez wiązania, które pozostają trwałe w procesach sorpcji i elucji. Wreszcie grupy czynne wprowadzonych ligandów, biorące udział w procesach interakcji z białkiem ulegającym sorpcji, muszą być dostatecznie odległe od powierzchni nośnika dla zmniejszenia efektów sterycznych, które mogą hamować interakcję.

Do nośników stosowanych w dotychczasowych próbach uzyskiwania nierozpuszczalnych preparatów enzymów należą: żywice jonowymiennie, polimery aminokwasów, kopolimery bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu, kopolimery akrylamidu i jego pochodnych, polimery cukrów (celuloza,

agaroza, *Sephadex*) i inne. Niekorzystną cechą wielu z tych nośników jest obecność grup dysocjujących, co powoduje nieswoistą adsorpcję rozmaitych białek i może modyfikować kinetykę reakcji enzymatycznej. Ponadto trzeba pamiętać, że stopień porowatości nośnika wpływa nie tylko na szybkość przepływu cieczy ale i na penetrację cząsteczek białka. Wskutek tego na przykład enzymy proteolityczne związane z celulozą o małej porowatości wykazują słabą zdolność rozkładu białek. Przegląd rozmaitych materiałów i metod używanych do otrzymywania nierozpuszczalnych enzymów znajduje także czytelnik w artykule Gryszkiewicza (28).

W ostatnich latach coraz częściej używanym nośnikiem jest *Sepharoza* produkowana z agarozy przez szwedzką firmę *Pharmacia* według metody Hjerténa (29). Uzyskanie poprzecznych wiązań między cząsteczkami poligalaktozydu nadaje żelom *Sepharozy* dużą porowatość. Możliwość otrzymania tego żelu w formie granulowanej stawia go w grupie związków nadających się do frakcjonowania makrocząsteczek na zasadzie sączenia molekularnego. Określone wartości mas cząsteczkowych związków, które nie penetrują do tych żeli, wynoszą dla *Sepharozy* 6B, 4B, 2B odpowiednio  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$  dla polisacharydów, lub  $4 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $40 \times 10^6$  dla białek. Żele te mogą zatem stanowić uzupełnienie powszechnie już stosowanych sit molekularnych typu *Sephadex*. Należy dodać, że *Sepharoza* nie zawiera dysocjujących grup, a kolumna z niej uformowana ma korzystne parametry przepływu cieczy.

## 2. Grupy reaktywne białek i nośników

Łączenie białek z nośnikami za pomocą trwałych kowalencyjnych wiązań musi być przeprowadzone w możliwie łagodnych warunkach, aby uniknąć denaturacji i inaktywacji. Następujące grupy funkcjonalne białek wykorzystuje się do wiązania z nośnikami: końcowe grupy  $-NH_2$  i  $-COOH$  łańcucha peptydowego, wolne grupy  $-NH_2$  i  $-COOH$  aminokwasów zasadowych i kwaśnych, grupy  $-SH$  cysteiny i  $-OH$  seryny, rdzeń imidazolowy histydyny, aromatyczny pierścień i grupę  $-OH$  tyrozyny. Wiadomo, że grupy aminowe reagują z czynnikami acylującymi i alkilującymi, z aldehydami, izocyjanianami i solami dwuazoniowymi. Grupy hydroksylowe seryny i tyrozyny reagują z czynnikami acylującymi, grupa  $-SH$  cysteiny z organicznymi związkami rtęci i czynnikami alkilującymi, reszty imidazolowe i fenolowe ulegają reakcji sprzęgania z solami dwuazoniowymi. Oczywiście w reakcji łączenia z nośnikiem nie powinny uczestniczyć reszty aminokwasowe centrum aktywnego, gdyż uzyskany preparat będzie nieaktywny.

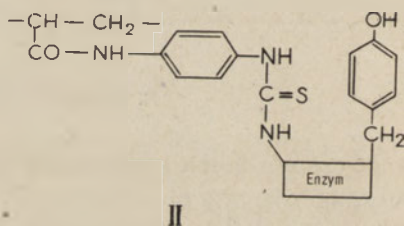
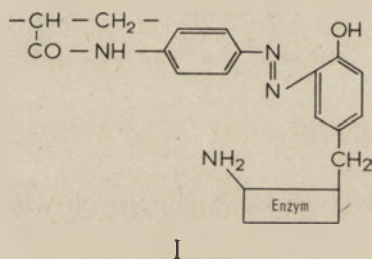
Do wytworzenia wiązań między białkiem i nośnikiem konieczna jest odpowiednia aktywacja nośnika. Zależnie od rodzaju grup funkcjonalnych nośnika aktywację można osiągnąć działaniem takich czynników jak izocyjaniany, tiofosgen, bromek bromoacetylu, kwas azotawy, związki triazy-

nowe, bromocyjan i inne. Przykładami zaktywowanych nośników mogą być azydkowe pochodne *CM*-celulozy (30, 37), bromoacetylowe pochodne celulozy (32), dwuazowane aminobenzylowe pochodne celulozy (12), dwuazowane polimery aminokwasów (7), pochodne *Sephadexu*, na przykład *p*-izotiocyjanofenoksyhydroksypropylo-*Sephadex* (5) i inne. Dalsze informacje na ten temat znajdzie zainteresowany czytelnik we wspomnianym już artykule Silmana i Katchalskiego (42), pracach Cuatrecasasa (14, 15) oraz Gryszkiewicza (28).

### 3. Przykłady aktywacji nośników

Reakcje aktywacji nośników można przedstawić na przykładzie handlowych preparatów używanych do przygotowywania nierozpuszczalnych form enzymów: *Enzacrylu* i *Sepharozy*.

*Enzacryl* jest hydrofilowym kopolimerem akrylamidu i jego pochodnych produkowanym przez firmę *Koch-Light*. *Enzacryl AA* zawiera jako podstawową grupę funkcjonalną resztę aminy aromatycznej, która może być aktywowana przez kwas azotawy (wzór I) lub tiofosgen (wzór II) dla wytworzenia kowalencyjnych wiązań z białkiem (8).



Inne formy *Enzacrylu* łączą się z białkiem poprzez grupy aminowe (*Enzacryl AH*, *Enzacryl Polyacetal*), poprzez grupy -OH aminokwasów alifatycznych lub tyrozyny (*Enzacryl Polythiolactone*), lub też odwracalnie poprzez grupy -SH cysteiny (*Enzacryl Polythiol*).

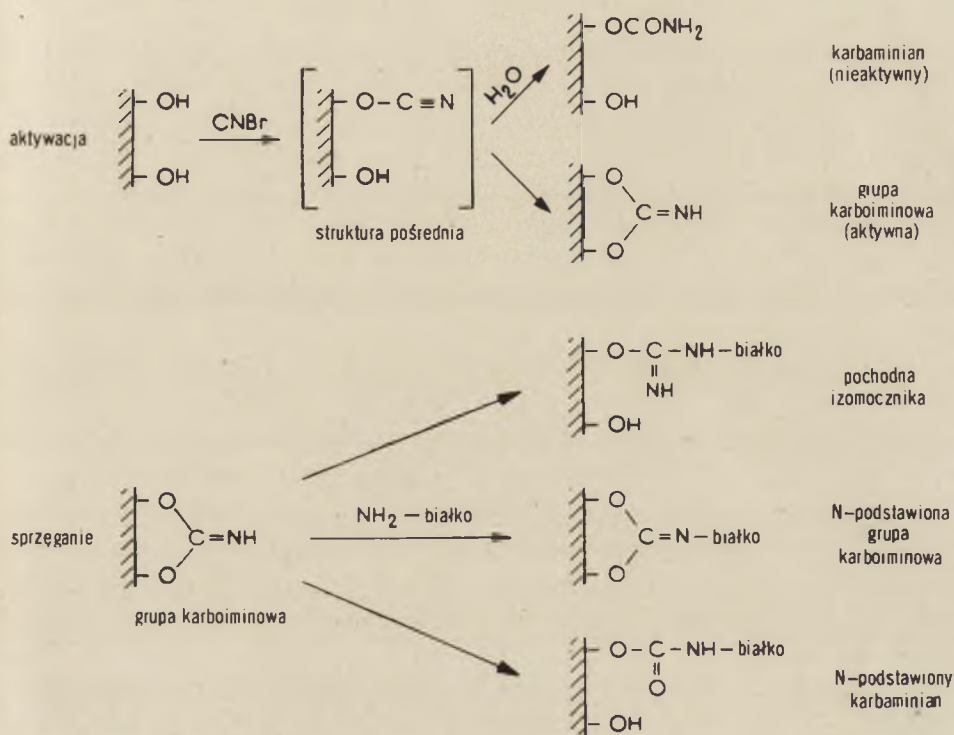
Przygotowanie i aktywację rozmaitych pochodnych ziarnistych preparatów poliakrylamidu do reakcji sprzęgania z białkami omawiają obszernie Inman i Dintzis (31) oraz Cuatrecasas (14).

Ostatnio dużego znaczenia nabrała metoda zaproponowana przez Axéna, Poratha i Ernbacka (6, 39), polegająca na aktywacji *Sephadexu* lub *Sepharozy* przy użyciu bromo- lub jodocyjanu. Pod wpływem tych czynników *Sepharoza* tworzy aktywne grupy karboiminowe, które łatwo reagują z niedysocjowanymi grupami -NH<sub>2</sub> białka lub innych związków według schematu 1 (4).

W typowej metodzie świeży roztwór bromocyjanu miesza się z zawiesiną *Sepharozy* (pod dobrze działającym wyciągiem) i doprowadza odczyn



mieszaniny do  $pH$  10—11 dodając porcjami 4M NaOH. Po około 15—20 minutach zawiesinę *Sepharozy* odmywa się na lejku Büchnera 10—20-krotną objętością zimnego 0,1M  $NaHCO_3$ . Białko lub inny związek mający ulec sprzężeniu z nośnikiem dodaje się do zaktywowanej *Sepharozy* i pozostawia w  $+4^\circ C$  przez 16—24 godzin łagodnie mieszając. Następnie mieszaninę sączy się i przemywa wielokrotnie roztworami używanymi do późniejszej sorpcji i elucji. Szczegóły postępowania podczas aktywacji i podstawiania *Sepharozy* podają między innymi Cuatrecasas (14) oraz Axén i Ernback (4).



**Schemat 1.** Aktywacja wielocukrów bromocyjanem i dalsze reakcje sprzężenia z białkiem wg Axéna i Ernbacka (4)

W naszych doświadczeniach przeprowadzaliśmy wielokrotnie łączenie rozmaitych białek (trypsyna, hemoglobina, białka ziarnistości leukocytów) z *Sepharozą* w wyżej opisany sposób, uzyskując z reguły pożądany preparat pod warunkiem użycia aktywnego bromocyjanu. Handlowe preparaty bromocyjanu są często nieaktywne wskutek zachodzącej hydrolizy lub powstawania nierozpuszczalnych w wodzie polimerów podczas długotrwałego przechowywania.

## II. Wiązanie niebiałkowych ligandów z nośnikiem

W wielu wypadkach dla wyosabniania enzymu metodą swoistej sorpcji korzystne jest związanie z nośnikiem niebiałkowych związków takich jak koenzymy czy inhibitory.

Arsenis i McCormick (1, 2) opisali wydajne oczyszczenie enzymów, dla których koenzymem jest mononukleotyd flawinowy, oraz flawokinazy wątrobowej za pomocą chromatografii kolumnowej wypełnionej produktem sprzęgnięcia ryboflawiny z celulozą. Aktywacja nośnika polegała na uzyskaniu chlorku kwasowego CM-celulozy lub użyciu dwuchlorofosforanowej pochodnej ryboflawiny w pirydynie.

Ciekawy sposób wyosabniania awidyny zaproponował McCormick (36). Najpierw zaktywowano biotynę przez zamianę na odpowiedni chlorek kwasowy, który został przyłączony estrowo do celulozy w roztworze pirydyny. Następnie awidynę oczyszczano na kolumnie biotyno-celulozy za pomocą węglanu amonu w malejącym liniowym gradiencie stężeń. Cuatrecasas i Wilchek (16) opisali jednostopniową metodą wyosabniania awidyny na kolumnie. *Sepharoza*-biotyna. Możliwe jest także izolowanie biotyny lub peptydów zawierających biotynę na kolumnie *Sepharozy* zawierającej wbudowaną awidynę (11).

W klasycznej już dzisiaj pracy Cuatrecasas i wsp. (17) opisali selektywne oczyszczenie nukleazy z bakterii *Staphylococcus*,  $\alpha$ -chymotrypsyny i karboksypeptydazy A za pomocą niskocząsteczkowych kompetywnych inhibitorów tych enzymów. Podobną metodę zastosowali Deutsch i Mertz (19) do wyosabniania plazminogenu. Inhibitory o wolnych grupach aminowych sprzęgano z *Sepharozą* przy użyciu bromocyjanu. Ostatnio Kristiansen i wsp. (34) donieśli o bardzo znacznym oczyszczeniu L-asparaginazy z *E. coli* przy użyciu inhibitora (D-asparaginy) sprzężonego z *Sepharozą* 6B. Ze względu na małą masę cząsteczkową inhibitora trzeba było dla uniknięcia efektów sterycznych zastosować pochodną D-asparaginy z cztero- lub sześciowęglowym łańcuchem bocznym, poprzez który przyłączono ją do *Sepharozy* zaktywowanej bromocyjanem. Cuatrecasas (14) podkreśla, że skuteczność metody specyficznej sorpcji zależy w wielu przypadkach od umieszczenia ligandu w znacznej odległości od powierzchni stałego nośnika. Autor ten opracował szereg metod pozwalających na uzyskiwanie pochodnych agarozy i poliakrylamidu z reaktywnymi łańcuchami bocznymi (14, 15).

Przy omawianiu niebiałkowych ligandów należy wspomnieć o próbach sprzęgnięcia kwasów nukleinowych i nukleotydów, zazwyczaj poprzez grupę fosforanową, do zaktywowanej celulozy. Otrzymane pochodne używano do izolowania komplementarnych nici kwasu nukleinowego (9), RNA przenoszącego (20) lub odpowiednich nukleotydów (41).

### III. Własności nierozpuszczalnych pochodnych enzymów

Dotychczas otrzymano już kilkadziesiąt enzymów w formie nierozpuszczalnej po związaniu ich z różnymi nośnikami, a szereg firm chemicznych dostarcza gotowe preparaty \*. Ogromna większość tych enzymów należy do grupy hydrolaz, przy czym szczególnie obficie reprezentowane są proteazy.

Na ogół wiązanie enzymu z nośnikiem zwiększa jego trwałość i odporność na działanie czynników denaturujących. Trypsyna, chymotrypsyna, papaina czy ureaza, sprzęgnięte z takim nośnikiem jak *Sepharoza* lub kopolimery fenyloalaniny i leucyny może być w formie zawiesiny przechowywane bez utraty aktywności przez wiele miesięcy w  $+4^{\circ}\text{C}$  w obecności czynników zapobiegających wzrostowi bakterii (4). Nasze nieopublikowane doświadczenia wskazują, że hydrolazy lizosomalne z ziarnistości obojętno-chłonnych granulocytów, sprzęgnięte z *Sepharozą* aktywowaną bromocyjanem, zachowują aktywność arylosulfatazy i kwaśnej *p*-nitrofenylofosfatazy przez kilka tygodni pomimo przemywania różnymi buforami w zakresie *pH* 5 do 9. Bar-El i Katchalski (7) zaobserwowali, że nierozpuszczalne pochodne trypsyny zachowują 80% aktywności po 25 godzinnej inkubacji w  $25^{\circ}\text{C}$  w *pH* 9, podczas gdy natywna trypsyna traci w tych warunkach całkowicie swoją aktywność. Z drugiej strony preparat ulegał inaktywacji przy liofilizacji. Nierozpuszczalne pochodne trypsyny wykazują aktywność proteolityczną i esterolityczną nawet w 8 M roztworze mocznika, podczas gdy wolna trypsyna jest w tych warunkach nieaktywna (26, 35).

Nie ulega wątpliwości, że wytworzenie wiązania między enzymem a obojętnym nośnikiem modyfikuje szybkość reakcji enzymatycznej, powinowactwo do substratu czy optimum *pH* reakcji itp. (4, 28, 42, 45, 46). Gribna i wsp. (27) zaobserwowali najsilniejsze wiązanie wątrobowego inhibitora rybonukleazy z nierozpuszczalną pochodną enzymu w *pH* 6, podczas gdy natywny enzym tworzy najłatwiej kompleks z inhibitorem w *pH* 7,5. Szczególnie uderzającą cechą nierozpuszczalnych pochodnych enzymów jest ich zmniejszona zdolność reagowania z makrocząsteczkowymi substratami i inhibitorami, co można tłumaczyć efektami przestrzennymi, wynikającymi z bliskości centrum aktywnego enzymu i stałego nośnika. Nierozpuszczalne pochodne trypsyny otrzymane przez Bar-El i Katchalskiego (7) czy też Axéna i Ernbacka (4) hydrolizowały kazeinę znacznie wolniej niż drobnocząsteczkowy syntetyczny substrat. Kay i Lilly (33) zaobserwowali podobną zmianę w przypadku chymotrypsyny i doszli do wniosku, że szybkość reakcji katalizowanej przez preparat nierozpuszczalnego enzymu jest ograniczona przez szybkość dyfuzji

\* Np. *Sephazyme* — pochodne papainy, trypsyny i chymotrypsyny produkcji firmy *Pharmacia Fine Chemicals*, nierozpuszczalne preparaty trypsyny, ficyny czy RNazy produkowane przez firmę *Merck*.

substratu i produktu. Ostatnio G a b e l i wsp. (26) donieśli, że preparaty trypsyny związane z żelem *Sephadex G-200* wykazywały różną aktywność proteolityczną zależnie od *pH* środowiska podczas aktywacji nośnika bromocyanem. Może to wynikać z faktu, że przy wyższym *pH* dochodzi do zwiększonego usieciowania żelu, co utrudnia dyfuzję substratów białkowych.

Kazeinolityczne działanie nierozpuszczalnych preparatów trypsyny ulega całkowitemu zahamowaniu w obecności polipeptydowego inhibitora z ziaren soi (35). W tych warunkach jednak znaczna część aktywności trypsyny wobec niskocząsteczkowych substratów pozostaje zachowana. W naszych nieopublikowanych doświadczeniach zaobserwowaliśmy, że inhibitor trypsyny z frakcji  $\alpha_1$ -globulin surowicy krwi hamuje tylko 40% aktywności proteolitycznej trypsyny związanej z *Sephazozą*. Prawdopodobnie wobec stosunkowo dużej masy cząsteczkowej  $\alpha_1$ -antytrypsyny (około 45 000) tylko część reaktywnych centrów nierozpuszczalnej trypsyny jest dostępna dla inhibitora.

#### IV. Dobór warunków swoistej sorpcji i desorpcji białek

Adsorpcja enzymu na substratach, koenzymach czy inhibitorach związanych z nośnikiem kolumny może zachodzić w dość ograniczonym przedziale *pH* i siły jonowej, a dobór warunków zależy w dużej mierze od własności enzymu. Na ogół te warunki dobiera się tak, aby adsorpcja zachodziła łatwo i ilościowo. Ze względu na możliwość nieswoistej interakcji między nośnikiem i wyosabnianym białkiem, należy zawsze przeprowadzić doświadczenie kontrolne używając niepodstawionego nośnika. W wyjątkowych przypadkach interakcja może okazać się korzystna, np. A u r i c c h i o i wsp. (3) wyosobnili na tej zasadzie lizosomalne  $\alpha$ -glikozydazy z tkanek zwierzęcych. Enzymy te w porównaniu z innymi białkami ulegały znacznie później wymyciu z kolumny wypełnionej niepodstawionym żelem *Sephadex G-100*, który wykazuje strukturalne podobieństwo do ich naturalnych substratów.

Oryginalny sposób adsorpcji opisali ostatnio S u n d b e r g i wsp. (43). W metodzie tej adsorbenty umieszczane są w woreczkach nieprzepuszczalnych dla ziaren *Sephazy*, ale przepuszczalnych dla soli czy białek. Stosując kilka adsorbentów można izolować z roztworu jednocześnie kilka substancji.

Elucję enzymu czy inhibitora można uzyskać działaniem bardzo rozmaitych czynników (tablica 1). Papaina zaadsorbowana na drobnocząsteczkowym inhibitorze Gli-Gli-Tyr-benzoilo-Arg ulegała wymyciu już pod wpływem wody destylowanej (10). Podobnie łagodne warunki elucji buforem adsorbującym z dodatkiem 0,9% NaCl zastosowali G r i b n a u i wsp. (27). Natomiast bardzo drastyczne warunki (6 M roztwór mocznika w *pH* 2) były

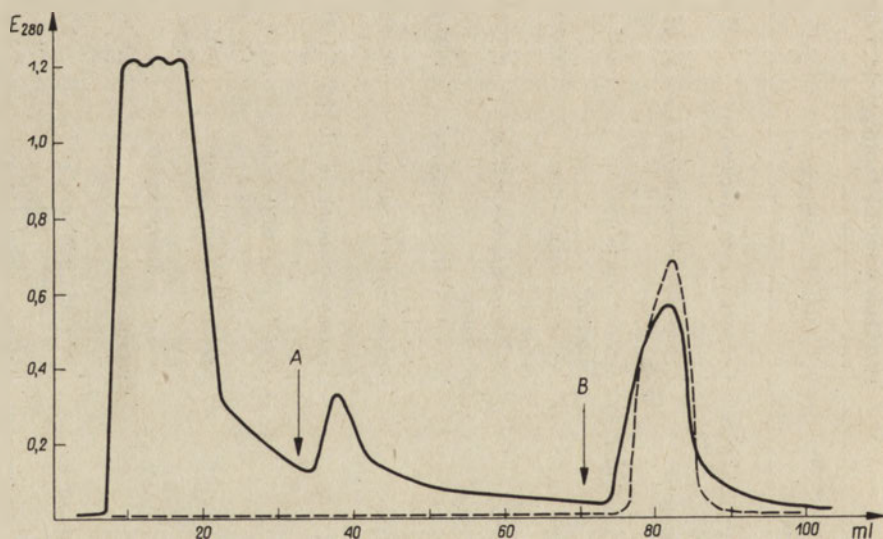
Przykłady warunków sorpcji i elucji enzymów i białkowych inhibitorów podczas swoistej sorpcji

Wyosabniany enzym lub inhibitor	Materiał sorpcyjny	Warunki sorpcji	Warunki elucji	Pozycja literatury
Oksydaza kwasu glikolowego z wątroby	Celuloza-flawina (koenzym)	0,005 M fosforan potasu, <i>pH</i> 8	Linowy gradient 0,005—0,5M fosforan potasu, <i>pH</i> 8	2
Flawokinaza z wątroby	Celuloza-flawina (substrat lub inhibitor)	0,005 M fosforan potasu, <i>pH</i> 7	Linowy gradient 0,005 M—0,1 M fosforan potasu, <i>pH</i> 7	1
Kwaśna proteaza roślinna	<i>Sepharoza</i> -hemoglobina (substrat)	0,05 M bufor octanowy, <i>pH</i> 5,5	0,1 M CH <sub>3</sub> COOH	13
Obojętna proteaza leukocytów	<i>Sepharoza</i> -hemoglobina (substrat)	0,05 M bufor octanowy, <i>pH</i> 6,0	0,1 M CH <sub>3</sub> COOH	Doświad. niepubl.
Nukleaza bakteryjna	<i>Sepharoza</i> -drobnocząsteczkowy inhibitor	0,05 M bufor boranowy, <i>pH</i> 8	0,1 M CH <sub>3</sub> COOH	17
$\alpha$ -chymotrypsyna	<i>Sepharoza</i> -drobnocząsteczkowy inhibitor	0,05 M Tris-HCl, <i>pH</i> 8	0,1 M CH <sub>3</sub> COOH	17
Karboksypeptydaza A	<i>Sepharoza</i> -drobnocząsteczkowy inhibitor	0,05 M Tris-HCl, <i>pH</i> 8	0,1 M CH <sub>3</sub> COOH	17
Trypsyna	<i>Sepharoza</i> -owomukoid (inhibitor)	0,1 M bufor TEA, <i>pH</i> 8,1	0,2 M bufor KCl-HCl, <i>pH</i> 2	22, 21
Piażminogen	<i>Sepharoza</i> -lizyna (inhibitor)	0,1 M bufor fosforanowy, <i>pH</i> 7,4+0,003 M EDTA	0,2 M kwas $\epsilon$ -aminokapronowy, <i>pH</i> 7,4+0,003 M EDTA	19
Papaina	<i>Sepharoza</i> -drobnocząsteczkowy inhibitor	0,025 M EDTA, <i>pH</i> 4,3+0,03 M merkaptotetanol	woda destylowana	10
L-asparaginaza	<i>Sepharoza</i> -drobnocząsteczkowy inhibitor	0,05 M bufor boranowy, <i>pH</i> 8,6+0,3 M NaCl+0,006% Na <sub>2</sub> S	bufor sorpcyjny + D-asparagina 0,001 M	34
Wątrobowy inhibitor RNazy	CM-celuloza-RNaza (enzym)	0,05 M bufor fosforanowy, <i>pH</i> 6+0,001 M EDTA	bufor sorpcyjny + 0,9% NaCl	27
Roślinne inhibitory trypsyny	Celuloza-trypsyna (enzym)	0,2 M bufor TEA, <i>pH</i> 7.8	6 M roztwór mocznika, <i>pH</i> 2	23

konieczne do uzyskania dysocjacji roślinnych inhibitorów trypsyny związanych z nierozpuszczalną pochodną tego enzymu (23). Można dodać, że w naszych doświadczeniach inhibitor trypsyny z frakcji  $\alpha_1$ -globulin surowicy ulegał trwałemu związaniu na kolumnie *Sepharoza*-trypsyna i nie udało się go odszczepić działaniem zbuforowanych roztworów 1 M NaCl w zakresie pH 2—10. Niewątpliwie tworzenie takich trwałych połączeń enzym-inhibitor, czy konieczność stosowania drastycznych warunków elucji, które mogą wywołać denaturację wyosobnianego białka, stanowi jedno z najważniejszych ograniczeń metody swoistej sorpcji.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że wiele enzymów proteolitycznych związanych na kolumnie zawierającej substrat czy inhibitor, ulega wymyciu pod wpływem 0,1 M roztworu kwasu octowego (kwaśna proteaza roślinna, obojętna proteaza leukocytów,  $\alpha$ -chymotrypsyna, karboksypeptydaza A). Oryginalnego sposobu elucji użyli Kristiansen i wsp. (34) przy otrzymywaniu L-asparaginazy. Enzym ulegał sorpcji na kompetycyjnym inhibitorze trwale związanym z kolumną, a wymycie następowało przez dodanie do buforu tego samego inhibitora w stężeniu  $10^{-3}$  M.

Należy zwrócić uwagę na pewne niebezpieczeństwo wynikające z używania kolumny ze związanym substratem białkowym przy wyosobnianiu niektórych proteaz. Enzymy te mogą hydrolizować substrat i w związku z tym pojemność sorpcyjna zmniejsza się podczas kolejnych rozdzielów. Ponadto produkty hydrolizy mogą być wymywane z enzymem podczas



**Rys. 1.** Wyosabnianie obojętnej proteazy leukocytów metodą swoistej sorpcji. Zawartość białka (linia ciągła) i aktywność neutralnej proteazy (linia przerywana) we frakcjach ekstraktu z ziarnistości leukocytów końskich rozdzielanego na kolumnie *Sepharoza*-hemoglobina. Bufor wyjściowy: 0,05M fosforan, pH 6,0. W punkcie A zmieniono płyn elucyjny na 1M roztwór NaCl w 0,1M buforze octanowym pH 4,0. W punkcie B zmieniono płyn elucyjny na 0,1M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

desorpcji i powodować wtórne zanieczyszczenie preparatu enzymatycznego. Aby temu zapobiec adsorpcję proteazy przeprowadza się w miarę możliwości w zakresie  $pH$  odległym od optymalnego, a przed właściwą elucją enzymu stosuje się dodatkowo bufor o pośrednich wartościach  $pH$  i siły jonowej. Zasadę tę może ilustrować zastosowana przez nas metoda izolowania obojętnej proteazy z ziarnistości leukocytów krwi końskiej na kolumnie *Sepharoza*-hemoglobina (rysunek 1).

## V. Uwagi końcowe

Metoda swoistej sorpcji stanowi niewątpliwie pewien postęp w izolowaniu enzymów i inhibitorów enzymatycznych, ale powinna być traktowana jako uzupełnienie innych klasycznych metod preparatyki biochemicznej. Dlatego z reguły stosuje się ją w połączeniu z takimi zabiegami jak sączenie molekularne, chromatografia jonowymienna czy elektroforeza preparatywna, przy czym swoista sorpcja stanowi najczęściej końcowy, krytyczny etap oczyszczania. Pewne ograniczenie metody swoistej sorpcji wynika z konieczności opracowania indywidualnego postępowania dla niemal każdego enzymu czy inhibitora, a także z dość kłopotliwego procesu sprzęgania ligandów z nośnikiem. Trzeba wreszcie dodać, że nie zawsze udaje się przeprowadzić elucję enzymu zaadsorbowanego na kolumnie, lub też niezbędne są drastyczne warunki wymywania prowadzące do uzyskania nieaktywnego preparatu. Pomimo tych ograniczeń można łatwo przewidzieć szybki rozwój metody swoistej sorpcji w najbliższych latach. Zastosowanie jej nie ograniczy się napewno do enzymologii, ale obejmie inne dziedziny biochemii i nauk biologicznych, jak o tym mogą świadczyć choćby próby użycia tej techniki do rozdziału komórek na zasadzie immunoadsorpcji (44). Nierozpuszczalne preparaty pewnych enzymów mogą zostać wykorzystane jako modele takich układów biologicznych, w których enzymy są trwale wbudowane w błony i organelle komórkowe (42, 46).

## LITERATURA

1. Arsenis C., McCormick D. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 3093 (1964).
2. Arsenis C., McCormick D. B., *J. Biol. Chem.* **241**, 330 (1966).
3. Auricchio F., Bruni C. B., Sica V., *Biochem. J.* **108**, 161 (1968).
4. Axén R., Ernback S., *European J. Biochem.* **18**, 351 (1971).
5. Axén R., Porath J., *Nature* **210**, 367 (1966).
6. Axén R., Porath J., Ernback S., *Nature* **214**, 1302 (1967).
7. Bar-Eli A., Katchalski E., *J. Biol. Chem.* **238**, 1690 (1963).
8. Barker S. A., Epton R., *Process Biochem.* **5**, No. 8 (1970).
9. Bautz E. K. F., Hall D. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 400 (1962).
10. Blumberg S., Schechter I., Berger A., *European J. Biochem.* **15**, 97 (1970).

11. Bodanszky A., Bodanszky M., *Experientia* **26**, 327 (1970).
12. Campbell B., Luescher E., Lerman L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **37**, 575 (1951).
13. Chua G. K., Bushuk W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 545 (1969).
14. Cuatrecasas P., *J. Biol. Chem.* **245**, 3059 (1970).
15. Cuatrecasas P., *Nature* **228**, 1327 (1970).
16. Cuatrecasas P., Wilchek M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 235 (1968).
17. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 636 (1968).
18. Denburg J., De Luca M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **67**, 1057 (1970).
19. Deutsch D. G., Mertz E. T., *Science* **170**, 1095 (1970).
20. Erhan S., Northrup L. G., Leach F. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 646 (1965).
21. Feinstein G., *Biochim. Biophys. Acta* **214**, 224 (1970).
22. Feinstein G., *FEBS Letters* **7**, 353 (1970).
23. Fritz H., Gebhardt M., Meister R., Illchmann K., Hochstrasser K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 571 (1970).
24. Fritz H., Schult H., Hutzl M., Wiedemann M., Werle E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 308 (1970).
25. Fritz H., Schult H., Neudecker M., Werle E., *Angew. Chem.* **78**, 775 (1969).
26. Gabel D., Vretblad P., Axén R., Porath J., *Biochim. Biophys. Acta* **214**, 561 (1970).
27. Gribnau A. A. M., Schoenmakers J. G., van Kraaikamp M., Bloemendal H., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **33**, 1064 (1970).
28. Gryszkiewicz J., *Folia Biol. (Kraków)* **19**, 119 (1971).
29. Hjertén S., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 393 (1964).
30. Hornby W. E., Lill M., Crook E. M., *Biochem. J.* **98**, 420 (1966).
31. Inman J. K., Dintzis H. M., *Biochemistry* **8**, 4074 (1969).
32. Jagendorf A. T., Patchornik A., Sela M., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 516 (1963).
33. Kay G., Lilly M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 276 (1970).
34. Kristiansen T., Einarsson M., Sundberg L., Porath J., *FEBS Letters* **7**, 294 (1970).
35. Levin Y., Pecht M., Goldstein L., Katchalski E., *Biochemistry* **3**, 1905 (1964).
36. McCormick D. B., *Analyt. Biochem.* **13**, 194 (1965).
37. Micheel F., Evers J., *Makromol. Chem.* **3**, 200 (1949).
38. Mougdal N. R., Porter R. R., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 185 (1963).
39. Porath J., Axén R., Ernback S., *Nature* **215**, 1491 (1967).
40. Porter R. R., Press E. M., *Annual Rev. Biochem.* **31**, 625 (1962).
41. Sander E. G., McCormick D. B., Wright L. D., *J. Chromatog.* **21**, 419 (1966).
42. Silman I., Katchalski E., *Annual Rev. Biochem.* **35**, 873 (1966).
43. Sundberg L., Porath J., Aspberg K., *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 394 (1970).
44. Truffa-Bachi P., Wofsy L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 685 (1970).
45. Wilson R. J. H., Kay G., Lilly M. D., *Biochem. J.* **108**, 845 (1968).
46. Wilson R. J. H., Kay G., Lilly M. D., *Biochem. J.* **109**, 137 (1968).



ANNA WILIMOWSKA-PELC \*

## Trzustkowe inhibitory enzymów proteolitycznych

### Pancreatic Inhibitors of Proteolytic Enzymes

The methods of isolation, properties and chemical structure as well as mode of action of two pancreatic inhibitors Kunitz's and Kazal's are reviewed.

Inhibitory enzymów proteolitycznych występują zarówno w tkankach roślinnych jak i zwierzęcych. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania budową tych substancji, mechanizmem ich reakcji z enzymami proteolitycznymi oraz ich rolą fizjologiczną. Inhibitory zbudowane są na ogół wyłącznie z aminokwasów, z wyjątkiem inhibitorów występujących w surowicy i w białkach jaj ptasich, oraz niektórych inhibitorów roślinnych, zawierających składnik węglowodanowy. W zależności od ciężaru cząsteczkowego, który waha się w granicach od 6 000 do 60 000, inhibitory można podzielić na polipeptydowe i białkowe.

Trzustka bydlęca jest źródłem dwóch polipeptydowych inhibitorów: inhibitora Kunitza, znanego jako zasadowy inhibitor z trzustki (BPTI) i inhibitora Kazala, nazwanego również kwaśnym inhibitorem trzustkowym (APTI). Oba inhibitory różnią się znacznie zarówno własnościami biologicznymi jak i fizykochemicznymi.

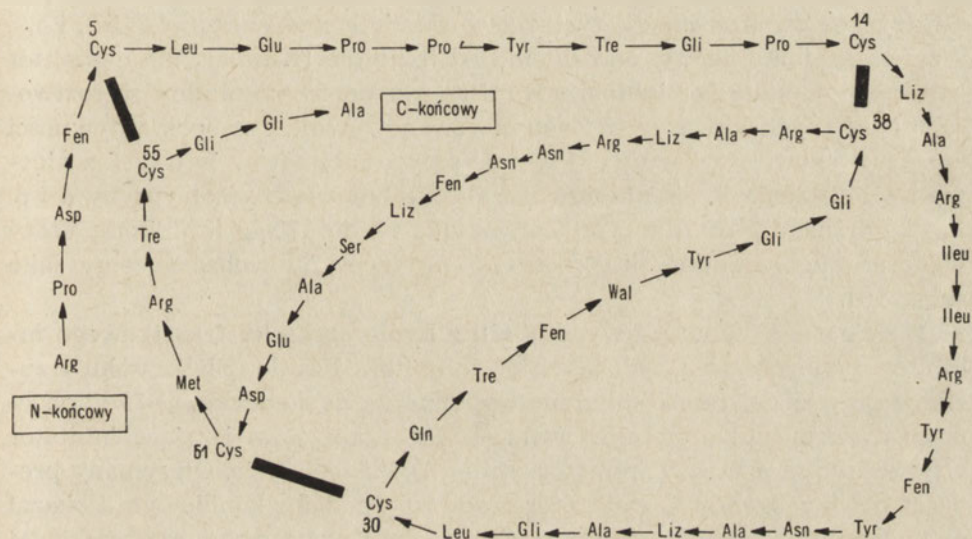
Badania nad trzustkowymi inhibitorami enzymów proteolitycznych rozpoczęły się w roku 1933, w którym Willstätter i Rhodewald (50) wykazali, że wyciąg z trzustki bydlęcej zawiera substancje o właściwościach antytrypsynowych. W roku 1936 Kunitz i Northrop (43) otrzymali inhibitor trypsyny w postaci krystalicznej. Autorzy ci zastosowali 0,25 N  $H_2SO_4$  do ekstrakcji białek ze świeżych trzustek bydlęcych, a następnie siarczan amonu i magnezu do ich frakcjonowania i otrzymali krystaliczny chynotrypsynogen, trypsynogen i jako ostatni produkt, inhibitor. Wyodrębniono go w postaci krystalicznego kompleksu z trypsyną, dysocjującego pod wpływem 2,5% kwasu trójchlorooctowego. Uzyskano

\* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Botaniki i Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Wykaz stosowanych skrótów: BPTI — zasadowy inhibitor trzustki, APTI — kwaśny inhibitor trzustki, BAFE — ester etylowy benzoilo-L-argininy, DFP — dwuizopropylodifluorofosforan

polipeptyd o masie cząsteczkowej 6 000 który wolno dyfundował przez błony półprzepuszczalne. Preparat jest termostabilny w wodzie i w środowisku kwaśnym. W środowisku zasadowym ulega powolnej inaktywacji. Kunitz i Northrop wykazali również, że inhibitor tworzy nieaktywne kompleksy z trypsyną w  $pH$  3 do 7. Kompleksy inhibitora z trypsyną powstają w stosunkach stechiometrycznych i dysocjują w  $pH$  1. Ferguson (17) zaobserwował właściwości antytrombinowe i antyplazminowe inhibitora, a Wu i Laskowski (52) właściwości hamowania chymotrypsyny B. Inhibitor otrzymany przez Kunitza i Northropa był niejednorodny. De Barbieri (12) za pomocą elektroforezy bibułowej w  $pH$  9 uzyskał 4 frakcje. Jedna z nich o ruchliwości katodowej wykazywała aktywność tylko wobec trypsyny i stanowiła 71% całości. Spośród trzech frakcji przesuwających się do anody, tylko jedna frakcja, stanowiąca 25% całości, wykazywała aktywność zarówno wobec trypsyny jak i chymotrypsyny, pozostałe były nieaktywne. Green i Work (26, 28) uzyskali inhibitor Kunitza ekstrahując 0,25 N  $H_2SO_4$  pozostałość z trzusek bydłych po wyosobnieniu insuliny. Inhibitor oczyszczano przez frakcjonowanie białek siarczanem amonu, kwasem trójchlorooctowym oraz chlorkiem sodu, a następnie po elektrodializie krystalizowano go metodą Kunitza. Green i Work rozpoczęli także badania nad skądem aminokwasowym inhibitora i stwierdzili, że nie zawiera on tryptofanu i histydyny, oraz że aminokwasem C-końcowym jest arginina. Stwierdzono, że inhibitor jest zasadowym polipeptydem o dość wysokiej aktywności antytrypsynowej, gdyż 1  $\mu g$  preparatu hamuje aktywność 2,5  $\mu g$  trypsyny w teście, w którym jako substratu używano hemoglobiny. Kassel i wsp. (36) do wyodrębnienia inhibitora metodą Kunitza włączyli chromatografię jonowymienną. Kompleksy inhibitora z trypsyną oczyszczali na kolumnie z *Dowex 1-X2*. Inhibitor oddzielano od trypsyny, po uprzedniej dysocjacji kompleksu, na kolumnie z *Sephadexu G-25* w  $pH$  1.7. Końcowy produkt oczyszczano stosując dwukrotną chromatografię na *Amberlicie IRC-50*. Uzyskany tą metodą inhibitor był jednorodny i w ilości 1  $\mu g$  hamował esterazową aktywność 3 do 3,7  $\mu g$  trypsyny wobec estru etylowego benzoilo-L-argininy (BAEE) jako substratu. Z oznaczeń składu aminokwasowego wynika, że inhibitor zbudowany jest z 58 aminokwasów. Kassel i wsp. potwierdzili dane Greena i Worka o braku tryptofanu i histydyny, a znaleźli metioninę, serynę i walinę jako pojedyncze aminokwasy. Inhibitor zawiera w swym składzie 10 aminokwasów zasadowych i 8 dwukarboksylowych, przy czym 4 spośród nich występują jako amidy. Znaczna przewaga aminokwasów zasadowych decyduje o własnościach zasadowych tego polipeptydu. Ciężar cząsteczkowy obliczony na podstawie składu aminokwasowego inhibitora wynosi 6513. Kassel i Laskowski (35) ustalili sekwencję aminokwasów w cząsteczce inhibitora Kunitza oraz wykazali obecność trzech mostków dwusiarczkowych utworzonych przez reszty cysteiny w poz. 5 i 55, 14 i 38 oraz 30 i 51.

W tym samym czasie badania nad strukturą pierwszorzędową inhibitora prowadzili Chauvet i wsp. (10, 11) oraz Dlouhá i wsp. (14, 15). Znalezione przez nich nieznaczne odchylenia od sekwencji aminokwasów, ustalonej przez Kassel i Laskowskiego, wynikają prawdopodobnie ze stosowania odmiennej metody badania. Kassel i Laskowski (35) zredukowaną karboksymetylową pochodną inhibitora poddawali trawieniu trypsyną i chymotrypsyną B i oznaczyli sekwencję aminokwasów w powstających peptydach. Chauvet i wsp. (10, 11) oraz Dlouhá i wsp. (14, 15) hydrolizowali inhibitor utleniony kwasem nadmrowkowym za pomocą trypsyny i chymotrypsyny  $\alpha$ . Uzyskano zgodne dane o składzie aminokwasowym i ilości aminokwasów w cząsteczce inhibitora oraz o rodzaju aminokwasów na końcu łańcucha z wolną grupą aminową (arginina) i wolną grupą karboksylową (alanina) (schemat 1).



**Schemat 1.** Struktura zasadowego inhibitora trypsyny z trzustki bydlęcej wg Kassel i Laskowskiego (35)

Trzustka bydlęca nie jest jedynym źródłem inhibitora Kunitza. W roku 1960 Kraut i wsp. (40) oczyszczili inhibitor kalikreiny z bydlęcej ślinianki przyusznej, a w roku 1964 (39) inhibitor kalikreiny z płuc bydlęcych. Obie substancje tworzyły bardzo podobne postacie krystaliczne zarówno same jak i w kompleksie z trypsyną, hamowały w tym samym stopniu trypsynę, chymotrypsynę, kalikreinę i plazminę, miały ten sam skład aminokwasowy i podobne właściwości fizyko-chemiczne. Anderer i Hörnle (1, 3, 4) wykazali, że inhibitor kalikreiny z płuc bydlęcych, podobnie jak inhibitor z trzustki bydlęcej (35), zbudowany jest z 58 aminokwasów i ma identyczną strukturę pierwszorzędową. Anderer (2) potwierdził również dane Krauta o identyczności inhibitora z płuc bydlęcych

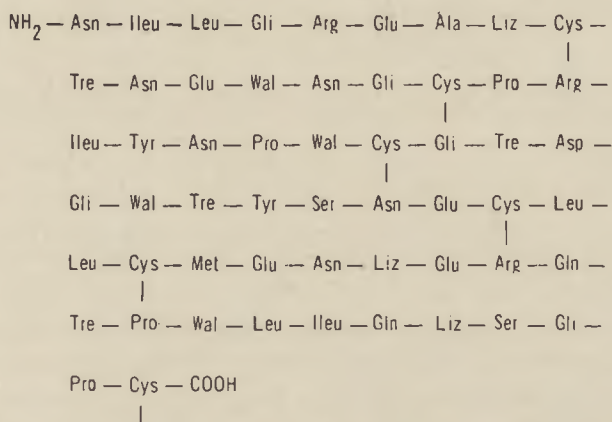
i ślinianki przyusznej. Werle (48) oraz Fritz i wsp. (19) wykazali inhibitor Kunitza w płucach owcy, natomiast nie znaleziono go w płucach innych zwierząt przeżuujących oraz w płucach człowieka, konia, świnki morskiej i myszy (48). Werle (48) donosi, że inhibitor o własnościach inhibitora Kunitza występuje także w błonie śluzowej tchawicy, przełyku i żołądka wołu. Wilusz (51) otrzymał z tarczycy bydłowej, a Fritz i wsp. (21) z wątroby bydłowej krystaliczny inhibitor trypsyny, wykazujący własności podobne do własności inhibitora Kunitza.

W trzustce bydłowej występuje również inhibitor różniący się znacznie aktywnością antyproteolityczną i własnościami fizykochemicznymi od inhibitora Kunitza. Kazal i wsp. (37) otrzymali go w roku 1948 jako produkt uboczny przy preparatyce insuliny. Inhibitor krystalizowano z 2,5% kwasu trójchlorooctowego po doprowadzeniu pH roztworu do 3,25. W elektroforezie swobodnej preparat dzielił się na trzy frakcje. Punkty izoelektryczne wyznaczone dla tych trzech składników wynoszą: 4,8, 5,2, i 5,9, a zatem inhibitor ten, w odróżnieniu od inhibitora Kunitza, ma charakter kwaśny. Podobnie jak inhibitor Kunitza jest on termostabilny w roztworach obojętnych i kwaśnych. Zaobserwowano również, że obok aktywności antytrypsynowej wykazuje aktywność antytrombimową. Wu i Laskowski (52) donieśli, że inhibitor Kazala nie hamuje chymotrypsyny  $\alpha$  i  $\beta$ . Z 1 kg trzustki Kazal otrzymywał jedynie 12 do 172  $\mu\text{g}$  inhibitora, który w ilości 1  $\mu\text{g}$  hamował aktywność 2,57  $\mu\text{g}$  trypsyny wobec kazeiny jako substratu.

Greene i wsp. (32) wyodrębnili z bydłowego soku trzustkowego inhibitor o własnościach podobnych do inhibitora Kazala. Białka soku trzustkowego rozdzielano na kolumnie wypełnionej *Sephadexem G-75* w obecności dwuizopropylodifluorofosforanu (DFP). Frakcję zawierającą inhibitor oczyszczano za pomocą chromatografii na DEAE-celulozie. Otrzymany preparat był homogeny w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym i okazał się polipeptydem zbudowanym z 56 aminokwasów o masie cząsteczkowej 6155. Wykazano, że inhibitor wydzielany jest do soku trzustkowego w formie wolnej i stanowi 0,06% zawartych w nim białek. W rok później Cerwinsky i wsp. (7) oraz Burck i wsp. (6) ogłosili wyniki badań nad inhibitorem Kazala otrzymanym z trzustek bydłowych. Autorzy podwyższyli znacznie wydajność preparatyki, stosując chromatografię jonowymienną na *CM-celulozie* do oczyszczenia inhibitora. Preparat wykazywał identyczne właściwości fizykochemiczne, skład aminokwasowy i aktywność antyproteolityczną jak inhibitor uzyskany z soku trzustkowego. Inhibitor Kazala w odróżnieniu od inhibitora Kunitza występuje zatem zarówno w soku trzustkowym jak i w trzustce bydłowej. Zarówno inhibitor Kunitza jak i Kazala zawierają dużo cysteiny i proliny, mają po jednej reszcie metioniny, nie wykazują obecności tryptofanu i histydyny. W inhibitorem Kazala nie znaleziono wolnych grup -SH, a zatem zawiera on, podobnie jak inhibitor Kunitza, mostki dwusiarczkowe.

Wilimowska-Pelc i Mejbaum-Katzenellenbogen (49) zastosowały do ekstrakcji inhibitora trypsyny z trzustki bydłej 5% kwas trójchlorooctowy. Rozpuszczalne w tym kwasie białka trzustki zagęszczane metodą taninowo-kofeinową (45), a frakcję w której zlokalizowano aktywność antytrypsynową, strącano za pomocą siarczanu amonu. Uzyskano inhibitor, który w ilości 1 mg hamował aktywność 90 do 125  $\mu$ g krystalicznej trypsyny w teście Kunitza oraz wykazywał własności charakterystyczne dla inhibitora Kazala.

Greene i Giordano (31) oraz Greene i Bartelt (29) stosując enzymatyczną hydrolizę zmodyfikowanej chemicznie cząsteczki inhibitora Kazala z trzustki bydłej ustalili jego strukturę pierwszorzędową. Inhibitor zbudowany jest z jednego łańcucha polipeptydowego, w którym aminokwasem N-końcowym jest asparagina, a C-końcowym cysteina. Na schemacie 2 przedstawiono strukturę pierwszorzędową inhibitora Kazala z trzustki bydłej.



Schemat 2. Sekwencja aminokwasów w cząsteczce inhibitora Kazala wg Greenea i Giordano (31)

Inhibitory typu inhibitora Kazala występują dość powszechnie w trzustce i soku trzustkowym u różnych zwierząt. Stwierdzono ich obecność u człowieka (24, 38), psa (20, 22), świni (22, 24, 30), owcy (23) i szczura (33). Wspólną cechą tych inhibitorów jest niski ciężar cząsteczkowy oraz wybiórcze hamowanie trypsyny. W odróżnieniu od inhibitora Kunitza nie wykazują one aktywności wobec chymotrypsyny, plazminy i kalikreiny, nie wymagają preinkubacji z trypsyną i tworzą nietrwałe kompleksy z tym enzymem. Laskowski i Wu (44) nazwali ten typ hamowania inhibicją przejściową (ang. *temporary inhibition*), ponieważ trypsyna początkowo hamowana przez inhibitor po pewnym czasie uwalnia się z kompleksu i trawi inhibitor. Proces ten zachodzi tym szybciej, im większy jest nadmiar trypsyny w stosunku do inhibitora. Inną cechą odróżniającą oba

typy inhibitorów jest ich oporność na działanie enzymów proteolitycznych. Kassel i Laskowski (34), wykazali, że pepsyna bardzo szybko trawi inhibitor Kazala, podczas gdy inhibitor Kunitza nie traci aktywności nawet po trzech tygodniach inkubacji z pepsyną. Feeney i wsp. (16) podają, że inhibitor Kazala z trzustki bydłowej i wieprzowej w przeciwieństwie do inhibitora Kunitza nie hamuje trypsyny człowieka.

Oba inhibitory tworzą stechiometryczne kompleksy z trypsyną. Green (25) zaobserwował, że inhibitor Kunitza nie tworzy kompleksów z DFP-trypsyną, a więc prawdopodobnie łączy się z centrum aktywnym enzymu. Finckenstadt i Laskowski (18) oraz Ozawa i Laskowski (46) przypuszczają, że mechanizm reakcji inhibitor-trypsyna jest wspólny dla wielu inhibitorów i polega na przerwaniu wrażliwego na działanie trypsyny wiązania w inhibitorze, a następnie utworzeniu wiązania między uwolnioną grupą karboksylową inhibitora a resztą seryny w centrum aktywnym enzymu.

Rigbi i Greene (47) zaobserwowali, że trypsyna inkubowana z inhibitorem Kazala w  $pH$  2,7 powoduje hydrolizę wiązania peptydowego utworzonego przez argininę w pozycji 18 i izoleucynę w pozycji 19 inhibitora. Zmodyfikowany inhibitor jest aktywny, ale traci aktywność po odłączeniu argininy przez karboksypeptydazę B. Można stąd wnioskować, że w reakcji inhibitora z trypsyną bierze udział arginina w pozycji 18. Wiązanie peptydowe między argininą (w pozycji 17) i izoleucyną (w pozycji 18) występuje także w inhibitorze Kunitza, nie stwierdzono jednak, aby było ono hydrolizowane przez trypsynę podczas jej reakcji z inhibitorem. Green i Work (28) oraz Anderer i Hörnle (4) wykazali, że inhibitor Kunitza traci aktywność po redukcji wszystkich mostków dwusiarczkowych, zaś Chauvet i Acher (8) oraz Avineri-Goldman i wsp. (5) zaobserwowali, że także acetylacja wolnych grup aminowych inaktywuje inhibitor Kunitza. Kress i Laskowski (41) wykazali, że selektywne rozerwanie wiązania dwusiarczkowego utworzonego między resztami cysteiny w pozycjach 4 i 38 nie ma wpływu na aktywność inhibitora. Jeżeli jednak podda się grupy  $-SH$  karboksymetylacji, inhibitor traci aktywność, co wiąże się prawdopodobnie z wzajemnym elektrostatycznym oddziaływaniem nowoutworzonej, ujemnie naładowanej karboksymetylowej pochodnej reszty cysteiny w pozycji 14 i niezbędnej dla aktywności inhibitora  $\epsilon$ -aminowej grupy lizyny w pozycji 15. Chauvet i Acher (9) modyfikowali wolne grupy aminowe inhibitora za pomocą pochodnej alaniny. W przypadku, gdy inhibitor związany był w kompleksie z trypsyną modyfikacji ulegały wszystkie wolne grupy aminowe z wyjątkiem grupy aminowej lizyny w pozycji 15. Tak zmodyfikowany inhibitor jest aktywny. Można było zatem przypuszczać, że właśnie ta reszta lizyny bierze udział w reakcji inhibitora z trypsyną. Przypuszczenie to potwierdzili Kress i Laskowski (42), którzy wykazali, że trypsyna

reagując z inhibitorem hydrolizuje wiązanie między lizyną w pozycji 15 i alaniną w pozycji 16, znajdujące się w centrum aktywnym inhibitora. Dlouha i wsp. (13) sądzą, że właśnie reszta lizyny w pozycji 15 inhibitora Kunitza łączy się z enzymem, jednak nie z seryną, a kwasem asparaginowym w pozycji 182.

W badaniach nad typem inhibicji Green i Work (27) stwierdzili, że znaczne wahania w stężeniu substratu białkowego nie wpływają na aktywność inhibitora Kunitza, co świadczyłoby o inhibicji niekompetytywnej. Natomiast w przypadku drobnocząsteczkowych, syntetycznych substratów inhibitor ten zachowuje się jak kompetytywne (25). Rozbieżność tę tłumaczy się tym, że w obecności wielkocząsteczkowego substratu białkowego enzym będzie zawsze łatwiej reagować z drobnocząsteczkowym inhibitorem, co utrudnia wykazanie efektu konkurencyjności. Fritz i wsp. (22) donieśli, że inhibitor Kazala z trzustki bydłowej jest niekompetycyjnym inhibitorem trypsyny, natomiast inhibitory tego typu obecne w trzustce człowieka, świni i psa zachowują się jak kompetytywne.

Fizjologiczna rola inhibitora Kunitza nie jest znana. Preparaty tego inhibitora otrzymywane z trzustki bydłowej znane są pod nazwą iniprolu, a z płuc bydłych trasylołu. Znalazły one zastosowanie w leczeniu skaz krwotocznych fibrynolitycznych, stanów zapalnych, a zwłaszcza ostrej martwicy trzustki. Inhibitor Kazala nie znalazł dotychczas zastosowania w lecznictwie. Inhibitor ten, występujący zarówno w soku trzustkowym jak i w trzustce, ze względu na czasowy charakter inhibicji, może pełnić rolę regulatora aktywacji trypsynogenu i chymotrypsynogenu, zwłaszcza że Fritz i wsp. (22) wykazali zależność pomiędzy zawartością tego inhibitora, a zawartością trypsynogenu w soku trzustkowym i trzustce psa.

#### LITERATURA

1. Anderer F. A., *Z. Naturforsch. Sect. B* **20**, 462 (1965).
2. Anderer F. A., *Z. Naturforsch. Sect. B* **20**, 499 (1965).
3. Anderer F. A., Hörnle S., *Z. Naturforsch. Sect. B* **20**, 457 (1965).
4. Anderer F. A., Hörnle S., *J. Biol. Chem.* **241**, 1568 (1966).
5. Avineri-Goldman R., Snir I., Blauer G., Rigbi M., *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 107 (1967).
6. Burck P. J., Hamil R. L., Cerwinsky E. W., Grinnan E. L., *Biochemistry* **6**, 3183 (1967).
7. Cerwinsky E. W., Burck P. J., Grinnan E. L., *Biochemistry* **6**, 3175 (1967).
8. Chauvet J., Acher R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 230 (1967).
9. Chauvet J., Acher R., *J. Biol. Chem.* **242**, 4274 (1967).
10. Chauvet J., Nouvel G., Acher R., *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 200 (1964).
11. Chauvet J., Nouvel G., Acher R., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 121 i 130 (1966).

12. De Barbieri A., *Enzymes in Clinical Chemistry*, Elsevier Publ. Company Amsterdam, Londyn, New York 1965, tom 4, str. 32
13. Dlouha V., Keil B., Sörm F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 66 (1968).
14. Dlouha V., Pospisilova D., Meloun B., Sörm F., *Chem. Abstr.* **64**, 11500 b (1966)
15. Dlouha V., Pospisilowa D., Meloun B., Sörm F. *Ref. Žurn.* **8**, 215 (1966).
16. Feeney R. E., Means G., Bigler J. C., *J. Biol. Chem.* **244**, 1957 (1969).
17. Ferguson J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **51**, 373 (1942).
18. Finkenstadt W. R., Laskowski M. Jr., *J. Biol. Chem.* **240**, 962 (1965).
19. Fritz H., Greif B., Schramm W., Hochstrasser K., Werle E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 140 (1970).
20. Fritz H., Hartwisch G., Werle E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **345**, 150 (1966).
21. Fritz H., Hutzler M., Werle E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 150 (1967)
22. Fritz H., Hüller I., Wiedemann M., Werle E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 405 (1967).
23. Fritz H., Schramm W., Grief B., Hochstrasser K., Fink E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 145 (1970).
24. Fritz H., Woitinas F., Werle E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **345**, 168 (1966).
25. Green N. M., *J. Biol. Chem.* **205**, 535 (1953).
26. Green N. M., Work E., *Biochem. J.* **49**, XXXVI (1951)
27. Green N. M., Work E., *Biochem. J.* **54**, 347 (1953).
28. Green N. M., Work E., *Biochem. J.* **54**, 257 (1953).
29. Greene L. J., Bartelt D. C., *J. Biol. Chem.* **244**, 2646 (1969)
30. Greene L. J., DiCarlo J. J., Sussman A. J., Bartel D. C., Roark D. E., *J. Biol. Chem.* **243**, 1804 (1968).
31. Greene L. J., Giordano J. S. Jr., *J. Biol. Chem.* **244**, 285 (1969).
32. Greene L. J., Rigbi M., Fackre D. S., *J. Biol. Chem.* **241**, 5610 (1966).
33. Grossman M. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **99**, 304 (1958).
34. Kassel B., Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **219**, 203 (1956)
35. Kassel B., Laskowski M. Sr., *Acta Biochim. Polon.* **13**, 378 (1966)
36. Kassel B., Radicevic M., Berlow S., Peanasky R. J., Laskowski M. Sr., *J. Biol. Chem.* **238**, 3274 (1963).
37. Kazal L. A., Spicer D. S., Brahinsky R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 3034 (1948).
38. Keller P. J., Allan J. B., *J. Biol. Chem.* **242**, 281 (1967).
39. Kraut H., Bhorgawa N., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **338**, 231 (1964).
40. Kraut H., Köbel W., Scholtan W., Schultz F., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **321**, 91 (1960).
41. Kress L. F., Laskowski M. Sr., *J. Biol. Chem.* **242**, 4925 (1967).
42. Kress L. F., Laskowski M. Sr., *J. Biol. Chem.* **243**, 3548 (1968).
43. Kunitz M., Northrop J. H., *J. Gen. Physiol.* **19**, 991 (1936).
44. Laskowski M., Wu F. Ch., *J. Biol. Chem.* **204**, 797 (1953).
45. Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 375 i 385 (1959).
46. Ozawa K., Laskowski M. Jr., *J. Biol. Chem.* **241**, 3955 (1966).
47. Rigbi M., Greene L. J., *J. Biol. Chem.* **243**, 5457 (1968).
48. Werle E., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **338**, 228 (1964).



49. Wilimowska-Pelc A., Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Polon. Pharm.* **26**, 609 (1969).
50. Willstätter R., Rhodewald M., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **213**, 77 (1933).
51. Wilusz T., *Materiały VII Krajowego Zjazdu P. P. Bioch.* str. 81 (1969).
52. Wu F. Ch., Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **213**, 609 (1955).



EWA MACHOWICZ\*, MARIA SARNECKA-KELLER\*\*

## Papaina

### Papain

The structure and physico-chemical properties of papain are described. The actual views on the active centre and mechanism of enzymatic action of this enzyme are presented.

Papaina (EC 3.4.4.10), występująca w lateksie drzewa *Carica papaya*, jest najlepiej poznanym przedstawicielem wewnątrzkomórkowych roślinnych enzymów proteolitycznych, których wspólną cechą jest obecność grupy -SH w centrach aktywnych. Do enzymów tych należą również: towarzysząca papainie chymopapaina (EC 3.4.4.11), występująca w lateksie roślin rodzaju *Ficus*, ficyna (EC 3.4.4.12), bromelaina (EC 3.4.4.24) z soku owoców i łodygi *Ananas comosus* oraz o wiele mniej scharakteryzowane proteazy jak pinguinaina z *Bromelia pinguin*, meksykaina z lateksu *Pileus mexicanus* i asklepaina z lateksu korzenia *Asclepias speciosa* (94).

Obszerne piśmiennictwo dotyczące papainy zestawili do roku 1959 Kimmel i Smith (70, 120). Z tego względu w artykule uwzględniono jedynie najważniejsze pozycje z tego okresu, natomiast głównie omówiono prace lat ostatnich.

### I. Występowanie i otrzymywanie

Termin „papaina”, wprowadzony przez Wurtza i Bouchuta (140) dla określenia czynnika proteolitycznego lateksu melonowca, stosuje się zarówno do krystalicznego enzymu jak i do nieoczyszczonego handlo-

\* Mgr, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

\*\* Doc. dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wykaz stosowanych skrótów: BAA — amid benzoilo-L-argininy, BAEE — ester etylowy benzoilo-L-argininy, BCME — ester metylowy benzoilo-L-cytruliny, BGEE — ester etylowy benzoiloglicyny, CGG — benzyloksykarbonylo-glicyloglicyna, CHA — amid benzyloksykarbonylo-L-histydyny, CIG — benzyloksykarbonylo-L-izoglutamina, EDTA — etylenodwuaminoczeroctan, HA — amid kwasu hipurowego, PCMB — *p*-chlorortęciobenzoesan, TCA — kwas trójchlorooctowy, TLCK — chlorometyloketon  $\alpha$ -N-tosylo-L-lizyny, TPCK — chlorometyloketon  $\alpha$ -N-tosylo-L-fenylalaniny.

wego lateksu (120). Lateks gromadzi się w naczyniach mlecznych pod skórą dojrzałych owoców. Po zrobieniu powierzchniowego nacięcia wypływa z nich jako przezroczysty, wodnisty płyn, szybko mętniejący na powietrzu. Ten tzw. świeży lateks po wysuszeniu i sproszkowaniu daje preparat określany jako lateks suchy. Przeciętnie z jednego drzewa można otrzymać rocznie około 100 g suchego lateksu (120).

Krystaliczną papainę otrzymuje się ze świeżego lateksu metodą Ballsa i Lineweavera (5), lub częściej z suchego lateksu metodą Kimmela i Smitha (69, 71). Wydajność tej ostatniej metody wynosi około 1 g krystalicznego enzymu na 180 g suchego lateksu. Papaina krystalizuje z wodnych roztworów  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lub NaCl, a także z 70% etanolu w obecności soli litu (69). Kryształy mają formę drobnych igieł, a po dłuższym stanie — heksagonalnych płytek.

Homogenność preparatów papainy sprawdzono elektroforetycznie i przez ultrawierowanie (121), chromatograficznie (40) oraz immunologicznie (120). Pozorna heterogenność może być wywołana częściową autolizą (40) lub agregacją enzymu (121). Aktywność papainy oznacza się najczęściej metodą Kirscha i Igelströma (73).

## II. Własności fizyko-chemiczne

Papaina jest białkiem z grupy prolamin o  $pI$  8,75 (94). Zawiera 16% azotu i 1,2% siarki (70), co odpowiada 8 atomom siarki w drobinie. Glazer i Smith (45) wykazali jednak obecność tylko trzech mostków dwusiarczkowych obok grupy -SH aktywnego centrum.

Masa cząsteczkowa papainy wyznaczona różnymi metodami zawiera się w granicach 20 700 do 23 000 (35, 120). Białko wykazuje dużą skłonność do agregacji i dlatego tylko w odpowiednich warunkach daje monodispersyjny obraz sedymentacji. Przy nieskończonej dużej rozcieńczeniu stała sedymentacji  $S$  nie zależy od  $pH$ . W  $pH$  4,0 w obecności cysteiny i EDTA  $S$  nie zależy od stężenia enzymu (121). Przy wyższych wartościach  $pH$   $S$  rośnie wraz ze stężeniem enzymu, co potwierdza tworzenie agregatów. W  $pH$  8,0 jeden ze składników widocznych w obrazie sedymentacyjnym jest heksamerem (121). Obecność związków redukujących, na przykład cysteiny, znosi tendencję do agregacji w zakresie  $pH$  od 5,0 do 7,0 co wskazywałoby, że białko agreguje przez tworzenie międzycząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych. Również EDTA w  $pH$  8,0 powoduje rozpad agregatów. Przepuszczalnie więc zanieczyszczenie jonami ciężkich metali także sprzyja agregacji (120).

Krystaliczna papaina rozpuszczona w 70% etanolu zawierającym 0,01 M HgCl tworzy po 2—3 dniach krystaliczną, nieaktywną enzymatycznie tzw. rtęciopapainę (71). Ulega ona w pełni reaktywacji w obecności EDTA i cysteiny. Początkowo przypuszczano, że rtęciopapaina jest dime-

rem, w którym atom rtęci wiąże grupy -SH aktywnych centrów obu cząsteczek (69). Stwierdzono jednak, że preparaty rtęciopapainy różnią się zawartością rtęci, a ich aktywność jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości tego metalu (40). Prawdopodobnie więc rtęciopapaina tworzy mieszanę kryształy zawierające w różnych proporcjach papainę i jej rtęciową pochodną o strukturze papaina-S-HgCl.

Papaina wykazuje znaczną trwałość w podwyższonych temperaturach (25, 87), ale jej stabilność zależy od pH. Przy pH niższych od 4,0 denaturuje się szybko i nieodwracalnie. Zarówno aktywna jak i nieaktywna papaina jest stabilna w roztworach wodnych zawierających rozpuszczalniki organiczne w dużych stężeniach. Izomorficzne kryształy uzyskano z 70% etanolu (69), 66% wodnego metanolu oraz 15% wodnego dwumetylosulfotlenku (33). Spadek aktywności enzymatycznej następuje dopiero w stężeniach metanolu większych od 50% (113). Również fluorescencyjne widmo nieaktywnej papainy nie zmienia się w 50% metanolu, 40% glikolu etylenowym lub 20% dioksanie (7), co potwierdza trwałość natywnej konformacji cząsteczki.

Poglądy na wpływ mocznika są rozbieżne. Lineweaver i Schwiimmer (87) stwierdzili, że papaina wykazuje pełną aktywność nawet w obecności 9 M mocznika, Hill i wsp. (54) podają natomiast, że mocznik już w stężeniu 0,1 M w pewnym stopniu hamuje papainę, a w stężeniu 4 M hamuje wprawdzie odwracalnie, ale prawie zupełnie. Różnice te wynikają prawdopodobnie z tego, że Hill i wsp. stosowali substraty syntetyczne, natomiast Lineweaver i Schwimmer substraty białkowe, które mogły stabilizować enzymatycznie czynną konformację papainy. Slyterman (113) wykazał pewną aktywność papainy w 8 M moczniku oraz nie stwierdził w tych warunkach zasadniczej zmiany dyspersji skręcalności optycznej. Również Hill i wsp. (54) wykazali, że mocznik w stężeniu powodującym nawet nieodwracalną inaktywację, nie wywołuje większych zmian lepkości i skręcalności optycznej enzymu. Natomiast maksymalne rozfałdowanie cząsteczki i nieodwracalna inaktywacja enzymu następuje pod działaniem 5 M chlorowodoru guanidyny lub kwasu trójchlorooctowego (TCA) (54, 113).

### III. Aktywatory, inhibitory i mechanizm aktywacji

Papaina zawarta w lateksie a także krystaliczna, izolowana metodą Kimmela i Smitha (69), jest nieaktywna i może być zaktywowana H<sub>2</sub>S, cysteiną i innymi związkami tiolowymi (40, 45, 69, 97, 101, 120), cyjankiem (45, 101, 120), borowodorkiem sodu (45) lub tiofosforanem sodu (97). Złożony układ wymienników jonowych (40) również aktywuje papainę, ale aktywacja bez dodatku czynników redukujących lub chelatujących jest przemijająca. Jak dotąd jedynie Sanner i Pihl (101) uzys-

kali metodą Kimmel i Smitha aktywną papainę. Autorzy ci twierdzą, że aktywacja enzymu nie jest potrzebna do wiązania substratu, a aktywatory tiolowe nie wpływają na tworzenie kompleksu ES, lecz przyspieszają jego rozkład. Pogląd ten zgadza się z wynikami Slu y t e r m a n a (110, 112), który stosując jako substrat ester etylowy benzoilo-L-argininy (BAEE) stwierdził, że nie wiąże się on z grupą -SH aktywnego centrum.

Substancje utleniające cysteinę, na przykład  $J_2$ ,  $H_2O_2$  i czterotioian (50, 101), metale ciężkie (79), jodoocetan i jodoacetamid (40, 45, 81, 142), chlorooctan i chloroacetamid (26), bromooctan (142), fluorek fenylometylosulfonylu (135), *p*-chlorortęciobenzoesan (PCMB) (39, 40, 101), a także chlorometyloketon- $\alpha$ -N-tosylo-L-fenylalaniny (TPCK) (11, 107, 135) oraz chlorometyloketon  $\alpha$ -N-tosylo-L-lizyny (TLCK) (135) inaktywują odwracalnie papainę. Według Ch a i k e n a i S m i t h a (26, 27) chloroacetamid i chlorooctan blokują grupę -SH aktywnego centrum, ale krzywe zależności alkilacji tej grupy od *pH* różnią się znacznie. Dla chloroacetamidu krzywa jest sigmoidalna, dla chlorooctanu dzwonowa. W tym drugim przypadku prawdopodobnie prócz grupy -SH zmienia się jeszcze inna grupa aktywnego centrum. Bromooctan i jodoocetan hamują papainę w *pH* 5,0 nawet w obecności cysteiny (141, 142), blokując histydynę w miejscu aktywnym. Kwasy benzyloksykarbonyloglutaminowy i benzyloksykarbonyloasparaginowy są inhibitorami papainy, przy czym hamowanie jest odwracalne i niekompetetywne (124). Związki kondensujące z grupami karbonyłowymi, jak fenylhydrazyna, hydroksylamina i semikarbazyd, mogą również hamować enzym (20, 21, 95). S c h e c h t e r i B e r g e r (102, 103) określili charakter pewnych kompetetywnych inhibitorów peptydowych. A r n o n i S h a p i r a (3, 105) przypuszczają natomiast, że papainę hamują swoiste dla niej przeciwciała.

Już w roku 1933 H e l l e r m a n i w s p. (51) oraz B e r s i n i L o g e m a n n (23) wysunęli przypuszczenie, że aktywność papainy warunkują wolne grupy -SH, a B a l l s i L i n e w e a v e r (6) wykazywali niezbędność jednej takiej grupy. Obecnie nie ulega już wątpliwości, że grupa -SH stanowi integralną część aktywnego centrum papainy (10, 113, 114, 115), ale sposób jej blokowania w nieaktywnej papainie oraz mechanizm aktywacji enzymu są nadal dyskusyjne.

Zaproponowana (22) dla nieaktywnej papainy struktura dimeru związanego dwusiarczkowo okazała się niesłuszna (45). W ostatnich latach sugeruje się różne struktury nieaktywnej papainy i w konsekwencji odmienne mechanizmy jej aktywacji (schemat 1).

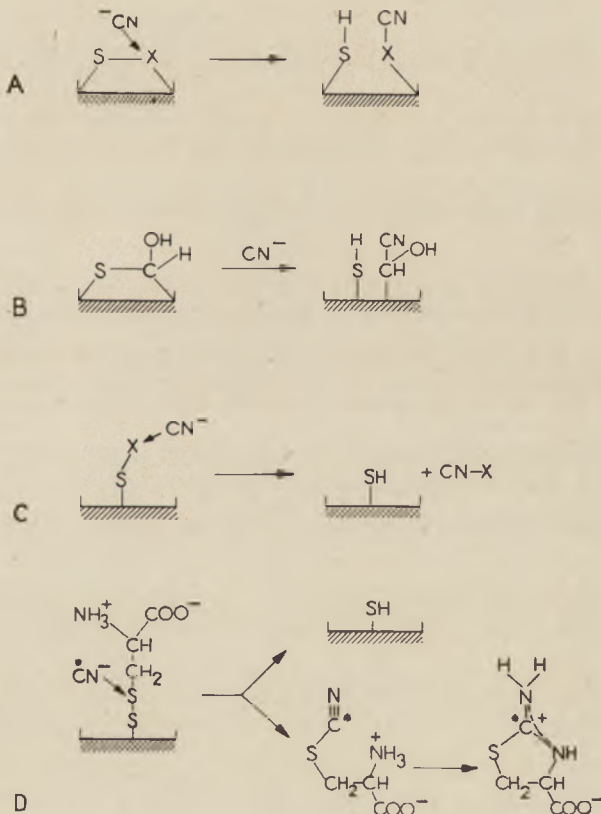
Według N e u m a n n a i w s p. (97) grupa -SH aktywnego centrum jest związana w nieaktywnej papainie z nieznanym ugrupowaniem X przyłączonym dodatkowo w innym miejscu łańcucha polipeptydowego (schemat 1, A). Tiofosforan sodu aktywując papainę przyłącza się do niej odwracalnie i w stosunku równomolowym, a obliczona z danych kinetycznych entalpia reakcji wynosi  $-9,8$  kcal/mol. W związku z tym autorzy sugerują

obecność wysokoenergetycznego wiązania między cysteiną aktywnego centrum a podstawnikiem X. Tego rodzaju wiązanie, typu acyloliolu, zaproponował wcześniej Smith (118).

Bergmann i Ross (20, 21) oraz Morihara (95) twierdzą, że aktywny tiol jest związany jako wewnętrzny hemitioacetal (schemat 1, B), za czym przemawia hamowanie papainy przez związki blokujące grupy karbonylowe.

Sluyterman (113) przyjmuje, że grupa -SH aktywnego centrum jest w nieaktywnej papainie zablokowana niezwiązanym z resztą drobin podstawnikiem, którym najprawdopodobniej jest cysteina (schemat 1, C). Autor wykazał, że kinetyka aktywacji papainy otrzymanej metodą Kimmel i Smitha jest identyczna z kinetyką aktywacji syntetycznego dwusiarczku papainy i cysteiny.

Ostatnio Klein i Kirsch (77, 78) przedstawili dane potwierdzające poglądy Sluytermana. Przeprowadzając aktywację papainy cyjankiem, cysteiną, borowodorkiem sodu i tiofosforanem (78) nie stwierdzili przyłą-



**Schemat 1.** Proponowane struktury nieaktywnej papainy i mechanizmu aktywacji pod wpływem cyjanku (wg 77)

Objaśnienie w tekście

czenia tych substancji do enzymu. Zbadali także hamowanie papainy, zaktywowanej uprzednio cyjankiem, przez odczynniki wiążące grupy karbonylowe i nie stwierdzili przyłączenia ich do białka. Klein i Kirsch (77) uważają, że dominującą formą nieaktywnej papainy jest jej mieszany dwusiarczek z cysteiną, ponieważ podczas redukcji lub nukleofilnego rozbitcia wiązania blokującego uwalniają się reszty tiolowe enzymu w ilości stechiometrycznej do pojawiającej się równocześnie cysteiny wolnej lub związanej z nukleofilem. Występowanie podobnego typu mieszanych dwusiarczków połączeń wielkocząsteczkowych z drobnocząsteczkowymi stwierdzono uprzednio w nieaktywnej proteazie hemolitycznych streptokoków (38) oraz w merkaptoalbuminie ludzkiego osocza (72).

Klein i Kirsch przypuszczają, że podczas aktywacji papainy pod wpływem cyjanku cysteina blokująca aktywną grupę -SH odszczepia się w formie 2-imino-4-karboksylo-tiazolidyny (schemat 1, D). Autorzy zaznaczają jednak, że 2-imino-4-karboksylo-tiazolidyna może tworzyć się nie tylko z labilnej cysteiny związanej w aktywnym centrum i że mieszany dwusiarczek nie jest prawdopodobnie jedyną postacią nieaktywnej papainy. Według Glazera i Smitha (45) w nieaktywnej papainie grupa -SH aktywnego centrum występuje częściowo jako reszta kwasu sulfenowego. Fakt, że nie wszystkie drobin papainy ulegają aktywacji (9, 45, 78, 114, 116) może wynikać właśnie z różnego mechanizmu ich zablokowania. Ostatnio Sluyterman i De Graff (116) stwierdzili, że preparaty papainy zawierają zawsze trzy rodzaje drobin: aktywne, nieaktywne ale zdolne do aktywacji oraz nieaktywne i niezdolne do aktywacji. Po rozdzieleniu tych frakcji wykazali różnice w ich widmach fluorescencyjnych.

Shinitzky i Goldman (109) badali zależność fluorescencji papainy od pH i stwierdzili, że aktywacja wiąże się ze zmianami konformacyjnymi. Wyniki te są sprzeczne z danymi Sluytermana (112), uzyskanymi z pomiarów dyspersji skręcalności optycznej w bliskim ultrafioletcie. Również badania Barela i Glazera (7) fluorescencyjnych widm emisyjnych, różnicowych widm w ultrafioletcie oraz dichroizmu kołowego nie wykazały zmian konformacyjnych towarzyszących aktywacji.

Jak dotąd nie znaleziono naturalnego aktywatora papainy. Dikson i Tappel (32) zwracają uwagę na możliwą rolę selenu w procesie aktywacji enzymów tiolowych w układach biologicznych.

#### IV. Struktura papainy i zależność funkcji od struktury

Smith i wsp. (123) pierwsi oznaczyli skład aminokwasowy papainy, a Hill i wsp. (52) wprowadzili do ich wyników pewne poprawki. Thompson (125) wykazał w enzymie jeden tylko łańcuch polipeptydowy zakończony od N-końca sekwencją Ileu-Pro-Glu-. W pracowni



E. L. Smitha (67, 68, 80, 83, 84, 85, 86, 93, 125) przeprowadzono dalsze badania struktury pierwszorzędowej białka, w których wyniku Leight i wsp. (82) sformułowali pierwszy próbny model sekwencji 200 reszt aminokwasowych.

Drenth i wsp. (34, 35) przeprowadzili badania rentgenograficzne kryształów papainy i wykazali niesłuszność modelu Leighta i wsp. Autorzy ci uzupełnili sekwencję aminokwasową białka fragmentem trzynastoaminokwasowym o nieznanym składzie a umieszczonym pomiędzy  $\text{Fen}_{28}$  a  $\text{Arg}_{31}$  modelu pierwotnego. Podaną przez nich sekwencję obejmującą 211 reszt aminokwasowych przedstawia schemat 2, natomiast zaproponowany model konformacyjny cząsteczki (35) — schemat 3.

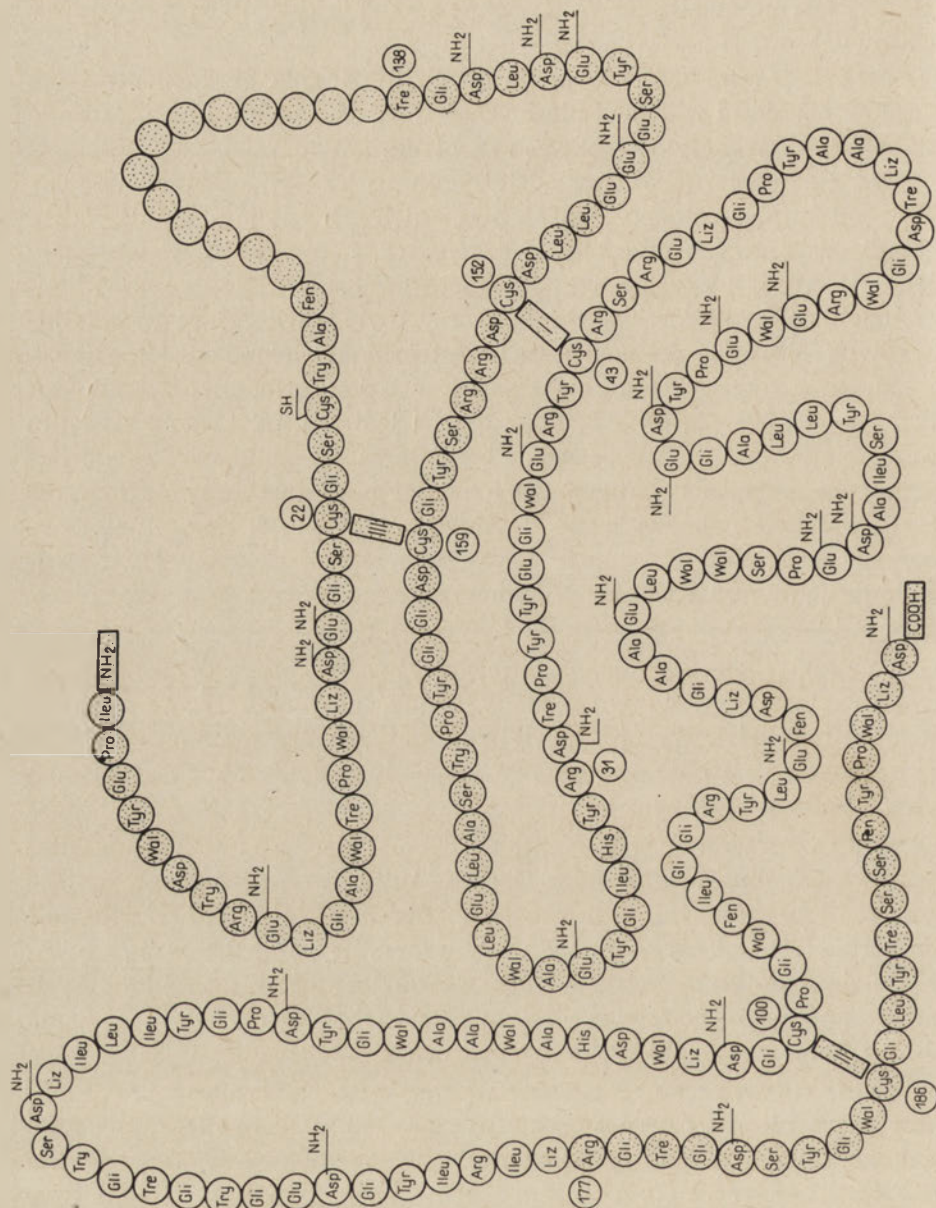
Łańcuch polipeptydowy papainy tworzy dwie, zawierające w przybliżeniu równą ilość aminokwasów części cząsteczki oddzielone od siebie szczyliną. Oprócz czterech krótkich fragmentów o konformacji  $\alpha$ -spiralii (pomiędzy 26—41, 50—56, 64—78, 116—126)\* i jednego krótkiego fragmentu o konformacji  $\beta$  (163—172)\* pozostała część łańcucha polipeptydowego jest nieregularna.  $\alpha$ -Spirala stanowi 20% całości łańcucha, przy czym dane rentgenograficzne pokrywają się z pomiarami dyspersji skręcalności optycznej (36, 113). Aktywne centrum leży na brzegach szczeliny,  $\text{Cys}_{25}$  znajduje się na jednym a  $\text{His}_{158}$  na drugim brzegu, zaś odległość między pierścieniem imidazolowym i atomem siarki wynosi 4 Å.

Nieco zmodyfikowany model konformacyjny krystalicznej papainy podaje Perutz (99). I w tym modelu jednak centrum aktywne znajduje się w szczelinie, gdzie występuje wiele aromatycznych reszt aminokwasów odgrywających zasadniczą rolę przy wiązaniu niepolarnych ugrupowań substratu polipeptydowego.

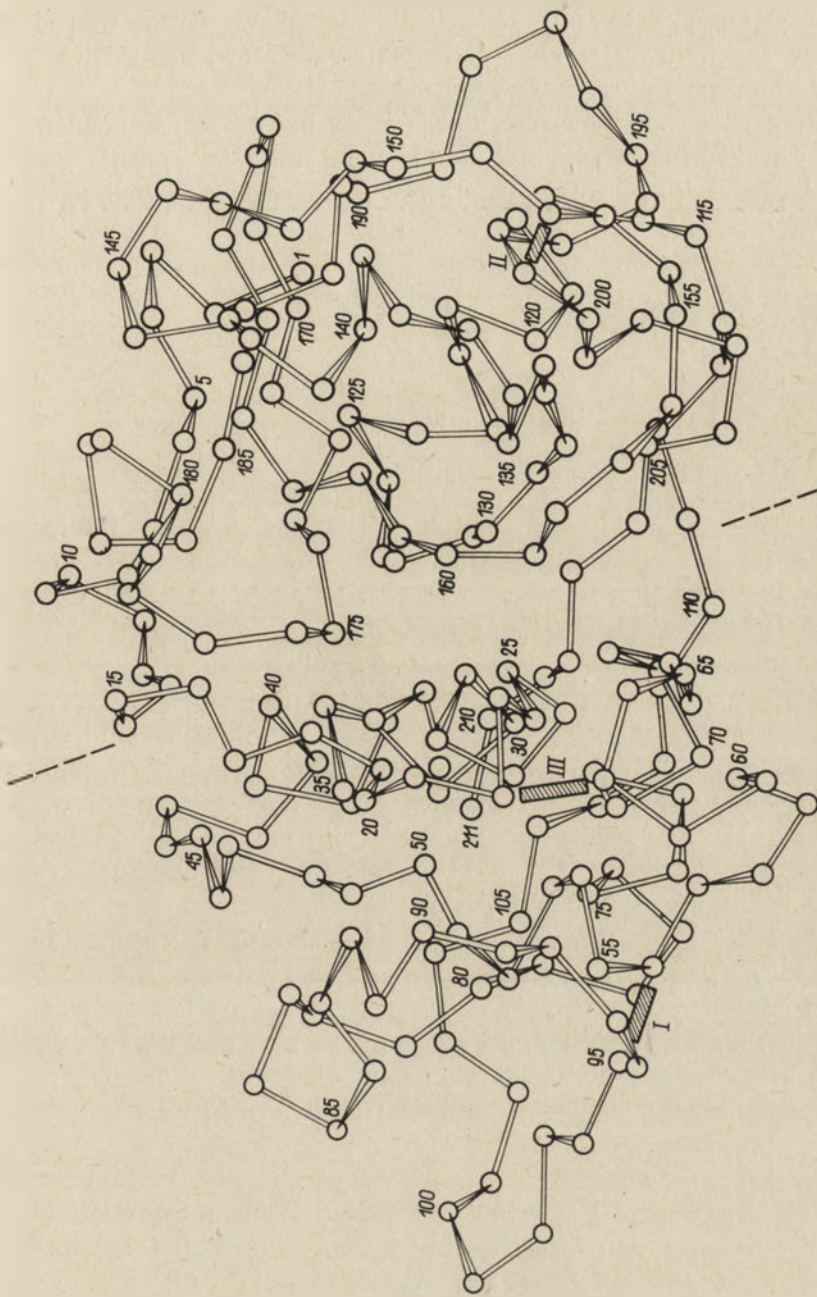
Ostatnio w pracowni E. L. Smitha (100) potwierdzono sekwencję aminokwasową papainy podaną przez Drentha i wsp. i oznaczono następującą kolejność 13 brakujących aminokwasów: Ser-Ala-Wal-Wal-Tre-Ileu-Glu-Gli-Ileu-Ileu-Liz-Ileu-Arg-. Ponadto wykazano, że pomiędzy  $\text{Pro}_{77}$  a  $\text{Ser}_{78}$  znajduje się dodatkowo reszta waliny. Całkowita ilość reszt aminokwasowych w papainie wynosi więc aktualnie 212. Obecnie rozpoczęto badania struktury konformacyjnej enzymu w roztworze (131).

Wiązania dwusiarczkowe papainy wykazują różną trwałość i mają odmienne znaczenie dla czynności katalitycznej (96). 0,32 M merkaptoetanol w 8 M moczniku rozkłada tylko wiązanie dwusiarczkowe występujące na powierzchni cząsteczki (106). Tak zredukowana papaina po alkilacji tworzy trójalkilopochodną o takim samym powinowactwie do substratów jak natywna papaina. 6 M chlorowodorek guanidyny rozkłada dwa pozostałe wiązania dwusiarczkowe, a otrzymana po alkilacji siedmioalkilopochodna jest enzymatycznie nieaktywna.

\* numeracja reszt wg modelu Drentha, reszta oznaczeń kolejności aminokwasów wg Leighta



**Schemat 2.** Sekwencja aminokwasowa papainy wg Drentha i wsp. (35)  
 Liczby oznaczają numerację reszt aminokwasowych wg modelu Lighta



Schemat 3. Model konformacyjny cząsteczki papainy wg Drentha i wsp. (35)

Dwurtęciowa pochodna papainy z atomami rtęci wbudowanymi w centrum aktywne (Cys<sub>25</sub>) oraz w mostek dwusiarczkowy Cys<sub>43</sub>-Cys<sub>152</sub> jest aktywna w stosunku do szeregu badanych substratów, ale różni się nieco stałymi kinetycznymi od natywnego enzymu (4).

Pewne grupy ε-aminowe lizyny nie mogą być zastąpione grupami -OH bez straty aktywności enzymatycznej (108). Natomiast guanidynacja papainy O-metyloizomocznikiem jak również acetylacja większości grup aminowych (29) nie zmienia aktywności enzymu. Końcowa grupa aminowa izoleucyny nie uczestniczy w procesie katalizy (117), co wyraźnie różni papainę od chymotrypsyny (59). Bez znaczenia dla aktywności są Liz<sub>54</sub>, Tyr<sub>161</sub>, Tyr<sub>176</sub>, Tyr<sub>183</sub> (117).

## V. Typy reakcji katalizowanych przez papainę

Papaina jest endopeptydazą katalizującą hydrolizę typowych wiązań peptydowych oraz amidowych. Optimum pH dla substratów nie mających wolnej grupy karboksylowej jest bliskie 6,0, dla tych, które zawierają taką grupę, wynosi 4,0 (69). Papaina wywołuje bardziej rozległą degradację substratów białkowych niż znane proteazy (120). Była pierwszą poznaną proteazą zdolną do hydrolizy syntetycznego substratu (137), a jej swoistość jest mniejsza niż innych proteaz pochodzenia zwierzęcego. Oprócz typowych substratów dla trypsyny (na przykład amidu benzoilo-L-argininy) (BAA), pepsyny (benzyloksykarbonylo-L-glutamylotyrozyny), chymotrypsyny (np. amidu acetylo-L-tyrozyny) papaina trawi jeszcze szereg innych substratów (120). Hydrolizuje ona na przykład amid benzoilo-L-homoargininy z szybkością równą 75% szybkości dla BAA (108), podczas gdy trypsyna nie jest zdolna do hydrolizy tego związku.

Papaina wykazuje stereochemiczną specyficzność w stosunku do form L-substratów (30, 31, 129). Według Bergmana i wsp. (17, 18, 19) najbardziej odpowiednie substraty dla papainy mają po jednej stronie rozkładanego wiązania silnie kationową grupę, na przykład resztę arginylową lub lizynową. Z nich najszybciej rozkładany jest BAA. Cohen i Petra (28) nie potwierdzili jednak niezbędności kationowej grupy w substracie, natomiast przypuszczają, że substrat musi mieć określoną strukturę przestrzenną. Ester metylowy benzoilo-L-cytruliny (BCME), izosteryczny z estrem etylowym benzoilo-L-argininy (BAEE), ale nie mający ładunku dodatniego, jest lepszym substratem dla papainy niż BAEE, natomiast jest zupełnie nieodpowiednim substratem dla trypsyny. Sluysterman (110, 111) porównując hydrolizę BAEE i estru etylowego benzoiloglicyny (BGEE) stwierdził, że boczny łańcuch BAEE nie ma wpływu na wiązanie substratu z enzymem. Porównanie hydrolizy kwasu benzyloksykarbonylo-izoglutaminowego i benzyloksykarbonylo-L-izoglutaminy (CIG) wykazało, że CIG jest lepszym substratem dla papainy. Zgadza się to z poglądem, że zjoni-

zowana grupa  $\gamma$ -karboksylowa hamuje wiązanie enzymu z substratem (120). Niezdolność papainy do hydrolizowania w  $pH$  4,0 wiązań peptydowych utworzonych z udziałem kwasu glutaminowego ma znaczenie w badaniu sekwencji peptydów (53).

Pewne związki, zwane kosubstratami, umożliwiają często hydrolizę syntetycznych substratów przez papainę. Tak działają rozmaite peptydy, na przykład produkty rozkładu albuminy końskiej (64), które tworzą przejściowe połączenia z substratem i ułatwiają proces katalizy (120). Przypuszcza się, że kosubstraty tworzą się także podczas enzymatycznej hydrolizy białek i mogą modyfikować swoistość enzymu.

Papaina wykazuje, podobnie jak trypsyna i chymotrypsyna, działanie esterazowe (17), przy czym *Johnston* (65) stwierdził, że enzym rozkłada także estry tiolowe. Autor porównał względne szybkości hydrolizy w  $pH$  5,0 estru etylowego kwasu hipurowego (HA) oraz estru tioetylowego kwasu hipurowego i wykazał, że ester tiolowy jest hydrolizowany około 7 razy szybciej niż ester tlenowy i około 21 razy szybciej niż amid. W  $pH$  5,0 ester tiolowy działa jako czynnik aktywujący enzym.

Papaina wykazuje także aktywność transferazową (66). Może katalizować reakcje transpeptydacji i transamidynacji, w czym jest aktywniejsza od trypsyny (37). Pierwszym dowodem syntezy wiązania peptydowego pod wpływem papainy było otrzymanie przez *Bergmana* i *Fraenkel-Conrata* (18) anilidu benzyloksykarbonyloglicyny w wyniku inkubacji benzyloksykarbonyloglicyny i aniliny z aktywnym lateksem w  $40^\circ$  i w  $pH$  4,6. W reakcjach syntezy katalizowanych przez papainę grupa  $-NH_2$  aminokwasu musi być zacylowana, gdyż wolne aminokwasy nie kondensują z aniliną ani fenylohydrazyną. Swoistość nieoczyszczonych preparatów papainy w stosunku do *N*-acylowej reszty nie jest ograniczona i przy udziale tego enzymu wszystkie aminokwasy oprócz *Arg*, *Pro*, *Liz*, *His*, *Asp-NH\_2*, *Glu-NH\_2* i *Cys* tworzą anilidy. Badania z *N*- i *C*-metylowymi pochodnymi acyloglicyn (42) oraz analogami i izosterami kwasu hipurowego (76) ustaliły, że minimalnym niezbędnym fragmentem strukturalnym w substracie acyloaminowym jest reszta karbonylowa lub sulfonylowa.

Wiele aromatycznych amin może uczestniczyć w syntezie wiązania amidowego, przy czym i w tym wypadku enzym nie wykazuje selektywności. Obok aniliny substratami mogą być jej pochodne z podstawnikami w pierścieniu (75) a także hydrazyna i jej pochodne (1, 2).

Swoistość nieoczyszczonych preparatów papainy w reakcjach syntezy nie jest absolutna względem form *L*-aminokwasów (8, 16), ale w pewnych przypadkach enzym stosowano do rozdziału antypodów optycznych (46). *Abernethy* i wsp. (1) podali przykłady otrzymywania produktów racemicznych. Wykazali również, że ficyna może czasem z powodzeniem zastąpić papainę (2). Steryczne ograniczenia w stosunku do substratów uczestniczących w reakcjach syntezy badali *Fox* i wsp. (42), natomiast *Carty* i *Kirschbaum* (25) stwierdzili, że chymopapaina jest bar-

dziej aktywna w reakcjach syntezy od papainy. Stosując jako substrat BAA w reakcji hydrolizy oraz anilinę i kwas hipurowy jako produkty wyjściowe do syntezy, autorzy wykazali, że papaina jest ponad 1000 razy aktywniejsza w procesie hydrolizy niż syntezy.

## VI. Aktywne centrum papainy i mechanizm działania w reakcjach hydrolizy

Charakter chemiczny aktywatorów i inhibitorów papainy oraz hamowanie enzymu w wyniku karboksymetylacji jednej grupy -SH (6, 11, 81) potwierdziły niezbędność reszty cysteinowej Cys<sub>25</sub> w aktywnym centrum (82). Z badań kinetyki hydrolizy różnych syntetycznych substratów uzyskano dane o mechanizmie działania papainy oraz o rodzaju innych grup uczestniczących bezpośrednio w czynności enzymatycznej.

Pierwsze badania kinetyczne przeprowadzili Stockell i Smith (124) dla substratu BAA. Autorzy przyjęli dwustopniowy mechanizm reakcji zgodny z ogólnym równaniem Michaelisa i Mentena:

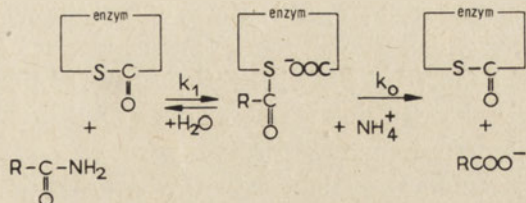


z uwagi na bardzo niską wartość jest praktycznie bez znaczenia.

Autorzy analizowali w różnych temperaturach  $k_{+1}$  jako funkcję  $pH$  i wykazali, że pierwszy etap reakcji wymaga obecności w aktywnym centrum dwóch grup uczestniczących w reakcji prototropowej. Są nimi przypuszczalnie zjonizowana grupa karboksylowa i niezjonizowana grupa -SH. Stockell i Smith (124) zaproponowali mechanizm reakcji hydrolizy przyjmujący tworzenie estru tiolowego w kompleksie ES. Ten etap, wiążący się z tworzeniem wiązania kowalencyjnego, ogranicza — ich zdaniem — szybkość katalizy. Autorzy podkreślają jednak, że dla wytłumaczenia stereochemicznej swoistości enzymu konieczne jest przyjęcie trypunktowego zetknięcia enzymu z substratem. Tego typu odziaływanie stwierdzili A b e r n e t h y i wsp. (1) w reakcjach przeniesienia przy syntezie.

Smith i wsp. (119, 122) przeprowadzili dalsze badania kinetyki dla BAEE, HA, amidu benzyloksykarbonylo-L-histydyny (CHA) oraz benzyloksykarbonylo-glicyloglicyny (CGG). Wykresy zależności  $k_1$  od  $pH$  dla BAEE, CHA i HA dały pokrywające się krzywe dzwonowe. Z nich obliczono, że w czynności enzymatycznej uczestniczą dwie zjonizowane grupy o wartości  $pK$  4,30, niezależnej od temperatury i o  $pK$  8,02 (dla 37°) zależnej od temperatury. Pierwszą zidentyfikowano jako grupę  $\omega$ -karboksylową kwasu asparaginowego lub glutaminowego, drugą jako grupę tiolową (118). Ze zbadanych przez Smitha i wsp. (119, 122) zależności pomiędzy  $k_{+1}$  i  $k_0$  wynikałoby, że ta sama grupa karboksylowa uczestniczy w tworzeniu jak i w rozkładzie kompleksu ES.

Smith (118) uzupełnił zaproponowany uprzednio schemat uzasadniając, że obie czynne katalitycznie grupy (-COOH i -SH) są związane w aktywnej papainie wysokoenergetycznym wiązaniem tioestrowym. Reakcja hydrolizy substratu przebiega zgodnie ze schematem 4.



**Schemat 4.** Mechanizm hydrolizy amidu acylo-aminokwasu wg Smitha (118)

Udział jonów wody w pierwszym etapie reakcji potwierdzono przy użyciu D<sub>2</sub>O, która spowodowała zmianę wartości  $k_1$  (118, 124).

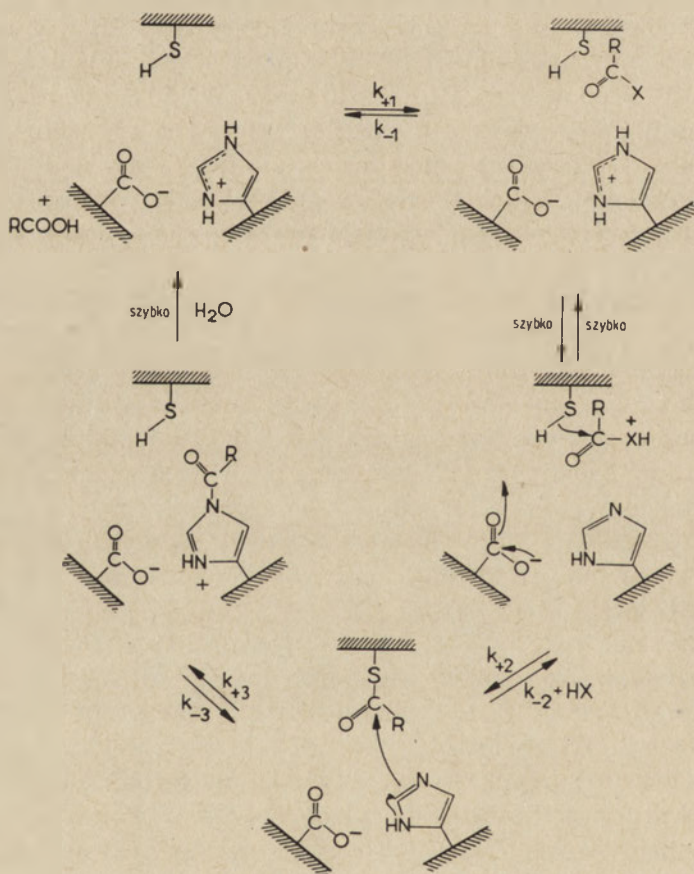
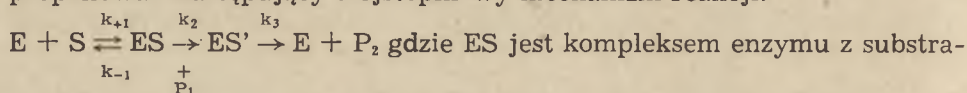
Grupa tiolowa Cys<sub>25</sub> w przeciwieństwie do grupy -SH wolnej cysteiny nie reaguje z nitroprusydkiem (6), natomiast wiąże cyjanian 3000 razy szybciej (115). Sanner i Pihl (101) oraz Wollenfels i Eisele (130) wykazali, że grupa ta jest bardziej reaktywna od wielu grup tiolowych w białkach i prostych połączeniach, ale nie potwierdzili występowania wewnętrznego wiązania tioestrowego. Wiązanie wodorowe pomiędzy acylem i grupą -SH enzymu jest mało prawdopodobne, gdyż wykluczono jego obecność w ficynie (58).

Lowe i Williams (89) badali absorpcję w ultrafioletcie tionohipurylopapainy i uzyskali bezpośredni dowód na tworzenie acyloenzymu w wyniku przyłączenia substratu do grupy -SH aktywnego centrum zarówno papainy jak i ficyny (90). Powstawanie acyloenzymu potwierdzono dalszymi badaniami spektrofotometrycznymi (10, 24), badaniami kinetyki reakcji (11, 60, 74) oraz izotopowo (47). Istnienie acylowego związku pośredniego wykazano także w reakcjach hydrolizy katalizowanych przez proteazy serynowe (12, 13, 14, 15). Wolthers i Kalk (138) wysunęli przypuszczenie, że acylopapaina jest również pośrednikiem w wiązaniu kompetetywnych inhibitorów.

Sluyterman (110) badał kinetykę hydrolizy BGEE i potwierdził udział w czynności enzymatycznej dwóch grup o  $pK$  4,0 i 8,0. Pierwszą zidentyfikował, zgodnie z poprzednimi danymi, jako grupę -COOH, drugą natomiast określił alternatywnie jako -SH lub resztę imidazolową. Lowe i Williams (91) przypuszczając, że nukleofilowy pierścień imidazolowy histydyny warunkuje deacylację acylopapainy, zaproponowali mechanizm działania papainy w reakcjach hydrolizy N-acyloaminokwasowych pochodnych (92) (schemat 5).

Shaw i wsp. (107) sądzą, że pod tym względem papaina zachowuje się identycznie jak trypsyna. Whitaker i Bender (134), badając kine-

tykę hydrolizy BAEE i BAA w szerszym niż poprzednio zakresie  $pH$  zaproponowali następujący trójstopniowy mechanizm reakcji:



Schemat 5. Mechanizm hydrolizy amidu acylo-aminokwasu wg Lowe i Williamsa (92)



hydrolizy BAEE przez ficynę, a Whitaker (132, 133) wykazał, że właśnie etap acylacji warunkuje hydrolizę.

Według Whitakera i Bendera (134) mechanizmy działania proteaz tiolowych i hydroksylowych są identyczne. Pogląd ten potwierdzają Bender i Brubacher (11) oraz Husain i Lowe (61). Whitaker i Perez-Villasenor (135) stwierdzili jednak, że chlorometyloketon  $\alpha$ -N-tosylo-L-feniloalaniny (TPCK) i chlorometyloketon  $\alpha$ -N-tosylo-L-lizyny (TLCK) reagują wybiórczo z grupą -SH Cys<sub>25</sub> w papainie, podczas gdy w chymotrypsynie (104) i trypsinie (107) blokują histydyne aktywne centrum.

Mechanizm działania papainy w reakcjach hydrolizy nie jest zatem całkowicie wyjaśniony. Cohen i Petra (28) zastosowali do badań BCME, substrat neutralny i izosteryczny do BAEE, i podali kinetyczny dowód na zależność  $k_{\text{kat}}$  i  $k_3$  od grupy o  $pK$  7,0. Fakt ten interpretują jako tworzenie się drugiej aktywnej formy acyloenzymu przypuszczalnie z udziałem imidazolu histydyny. Wyników tych nie potwierdzili Williams i Whitaker (136).

Husain i Lowe (61, 63) wykazali udział histydyny w aktywnym centrum papainy i próbują nawet interpretować mechanizm katalizy bez uczestnictwa grupy karboksylowej. Stosując jako inhibitor 1,3-dwubromo(<sup>24</sup>C)aceton, autorzy wykazali że odległość między grupą -SH Cys<sub>25</sub> a N<sub>1</sub> pierścienia imidazolowego wynosi około 5 Å, co zgadza się z wynikami rentgenograficznych badań Drentha i wsp. (35). Przypuszczają zatem, że między grupą tiolową a resztą imidazolową ustala się równowaga prototropowa.

Selektywna alkilacja N<sub>1</sub> imidazolu wskazuje na ograniczoną orientację pierścienia względem -SH Cys<sub>25</sub>, co wywołuje stereochemiczną wybiórczość wobec asymetrycznych substratów czy inhibitorów (130).

Husain i Lowe (62) ustalili, że imidazol uczestniczący w aktywnym centrum należy do His<sub>106</sub>. Zgadza się to z modelem konformacyjnym papainy podanym przez Drentha i wsp. (35). Przypuszcza się także, że Try<sub>128</sub> odgrywa rolę w procesie katalizy (109), gdyż odległość pomiędzy His<sub>106</sub> i Try<sub>128</sub> pozwala na wzajemne oddziaływanie tych ugrupowań. Również GluNH<sub>2,19</sub>, Asp<sub>105</sub> i Asp<sub>160</sub> będące w odległości około 10 Å od grupy -SH Cys<sub>25</sub> mogą brać udział w wiązaniu substratu.

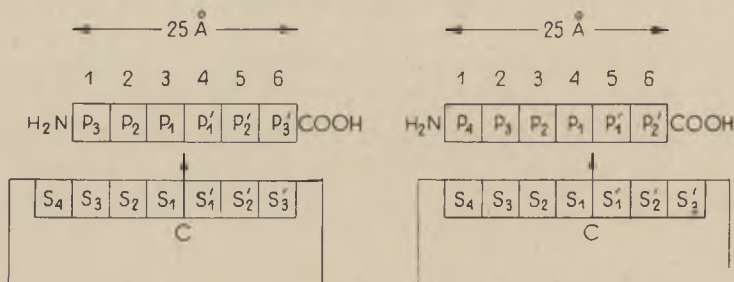
Schechter i Berger (102) zaproponowali model aktywnego centrum papainy przedstawiony na schemacie 6.

Centrum aktywne jest obszerne, długości około 25 Å i wyróżnia się w nim siedem podcentrów, z których każde mieści jedną resztę aminokwasową substratu. Podcentrum S<sub>2</sub> oddziałuje swoiście z resztami feniloalaniny. Obecność Fen w pozycji 3 lub dalszej od C-końca peptydu zwiększa jego podatność na hydrolizę. Feniloalanina kieruje atak enzymu na drugie poprzedzające ją od C-końca wiązanie. Peptydy zawierające Fen jako drugą resztę od C-końca są silnymi kompetytywnymi inhibitorami papainy, gdyż

zajmują część aktywnego centrum ( $S_1S_2$  itd.) w taki sam sposób jak substraty. Są to np. peptydy: Ala-Ala-Fen-Ala, Ala-Ala-Fen-Liz, Ala-Fen-Ala, Ala-Fen-Liz.

W h i t a k e r (133) przyjmuje możliwość indukowanych przez substrat zmian konformacyjnych w obrębie aktywnego centrum.

Doniesienia Hilla i Smitha (55, 56) jakoby 76-cio aminokwasowy fragment łańcucha papainy wykazywał aktywność proteolityczną okazały się niesłuszne i zostały sprostowane przez Fratera i wsp. (43).



**Schemat 6.** Model aktywnego centrum papainy wg Schechtera i Bergera (102)

## VI. Uwagi końcowe

Aktywne centrum papainy oraz jej mechanizm działania nie są dokładnie poznane, mimo że enzym jest najbardziej wszechstronnie zbadaną proteazą roślinną.

Nie jest wyjaśnione znaczenie fizjologiczne tak dużej ilości papainy lub podobnych proteaz w gatunkach roślin należących do różnych rodzin. Podobną aktywność enzymatyczną stwierdzono w sferosomach pewnych komórek roślinnych i są pewne dowody na udział ich w trawieniu wewnątrzkomórkowym (98). Otwarte jest jednak zagadnienie, czy sferosomy występują w komórkach zawierających lateks i czy obecne w nim proteazy tiolowe są związane z tymi strukturami przynajmniej w początkowych stadiach rozwoju tych komórek. Obecność natomiast proteaz w lateksie pozostającym w zetknięciu z cytoplazmą wymaga jakiegoś mechanizmu hamującego. Nie jest wykluczone, że naturalnymi inhibitorami mogą być kompetetywnie działające peptydy, czy fragmenty łańcuchów polipeptydowych o określonej sekwencji i strukturze przestrzennej, podobne do syntetycznych, badanych przez Schechtera i Bergera (102, 103).

Zagadnienie powyższe wiąże się z ogólnym mechanizmem regulującym czynność enzymatyczną wewnątrzkomórkowych proteaz tiolowych, również pochodzenia zwierzęcego. Papaina może stanowić enzym modelowy do badań w tym zakresie, szczególnie wobec wykazanych już podobieństw do innych proteaz tkankowych nawet pochodzenia zwierzęcego. Gerwin (44) stwierdził na przykład, że w proteazie grupy A streptokoków, podobnie

jak w papainie, grupa -SH aktywnego centrum jest 50—100 razy bardziej reaktywna od grupy -SH glutationu, a krzywa zależności  $k_2$  od  $pH$  jest sigmoidalna, gdy czynnikiem alkilującym jest chloroacetamid, natomiast jest krzywą dzwonową w przypadku zastosowania wolnego kwasu. H a y a - s h i i wsp. (48, 49, 126, 128) badając uwalnianie pewnej proteazy w kulturach monocytów tkankowych zaobserwowali regulowanie jej aktywności przez tkankowy inhibitor polipeptydowy, który hamuje również papainę, a nie wpływa zupełnie na czynność  $\alpha$ -chymotrypsyny i trypsyny. F o s s u m i W h i t a k e r (41) wyizolowali i częściowo oczyścili z białka jaja inhibitor peptydowy o masie 12 700, który nie hamuje trypsyny i chymotrypsyny, a hamuje papainę i ficynę.

Interesujące są również porównania budowy proteaz przeprowadzone przez L o w e ' a (88), z których wynika, że często dwie proteazy, roślinna i zwierzęca (np. papaina i trypsyna) wykazują większe podobieństwo niż dwie proteazy pochodzenia roślinnego (np. papaina i chymopapaina) (127). W związku z tym możnaby przypuszczać, że te roślinne i zwierzęce enzymy proteolityczne pochodzą od wspólnej pierwotnej proteazy, lub też, że ich podobieństwo strukturalne jest wynikiem selekcji w kierunku utworzenia czynnej enzymatycznie sekwencji związanej z taką samą funkcją.

#### LITERATURA

1. Abernethy J. L., Kientz M., Johnson R., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3944 (1959).
2. Abernethy J. L., Yengoyan L., Seay J., Abu-Samra J., *J. Org. Chem.* **27**, 2528 (1962).
3. Arnon R., Shapira E., *Biochemistry* **6**, 3942 (1967).
4. Arnon R., Shapira E., *J. Biol. Chem.* **244**, 1033 (1969).
5. Balls A. K., Lineweaver H., *J. Biol. Chem.* **130**, 669 (1939).
6. Balls A. K., Lineweaver H., *Nature* **144**, 513 (1939).
7. Barel A. O., Glazer A. N., *J. Biol. Chem.* **244**, 268 (1969).
8. Behrens O. K., Doherty D. G., Bergmann M., *J. Biol. Chem.* **136**, 61 (1940).
9. Bender M. L., Beque-Cauton M. L., Blakely R. L., Brubacher L. J., Feder J., Gunter C. R., Kezdy F. J., Killheffer I. V., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. K., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5890 (1966).
10. Bender M. L., Brubacher L. J., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5333 (1964).
11. Bender M. L., Brubacher L. J., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5880 (1966).
12. Bender M. L., Kemp K. C., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 111 (1956).
13. Bender M. L., Kemp K. C., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 116 (1956).
14. Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2540 (1962).
15. Bender M. L., Zerner B., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2550 (1962).
16. Bennet E. L., Niemann C., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 2610 (1948).
17. Bergmann M., *Advan. Enzymol.* **2**, 49 (1942).
18. Bergmann M., Fraenkel-Conrat H., *J. Biol. Chem.* **119**, 707 (1937).

19. Bergmann M., Fruton J. S., *Advan. Enzymol.* **1**, 63 (1941).
20. Bergmann M., Ross W. F., *J. Biol. Chem.* **111**, 659 (1935).
21. Bergmann M., Ross W. F., *J. Biol. Chem.* **114**, 717 (1936).
22. Bersin T., *Ergeb. Enzymforsch.* **4**, 68 (1935).
23. Bersin T., Logemann N., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **220**, 209 (1933).
24. Brubacher L. J., Bender M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5871 (1966).
25. Carty R. P., Kirschenbaum D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 446 (1964).
26. Chaiken I. M., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **244**, 5087 (1969).
27. Chaiken I. M., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **244**, 5095 (1969).
28. Cohen W., Petra P. H., *Biochemistry* **6**, 1047 (1967).
29. Darlington W. A., Keay L., *Can. J. Biochem.* **43**, 1171 (1965).
30. Davis N. C., *J. Biol. Chem.* **223**, 935 (1956).
31. Dekker C. A., Taylor S. P., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **180**, 155 (1949).
32. Dickson R. C., Tappel A. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 100 (1969).
33. Drenth J., Hol W. G. J., Vissar J. W. E., Sluyterman L. A. A., *J. Mol. Biol.* **34**, 369 (1968).
34. Drenth J., Jansonius J. N., *Nature* **184**, 1718 (1959).
35. Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Swen H. M., Wolthers B. G., *Nature* **218**, 929 (1968).
36. Drenth J., Jansonius J. N., Wolthers B. G., *J. Mol. Biol.* **24**, 449 (1967).
37. Durell J., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **207**, 487 (1954).
38. Ferdinand W., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **240**, 1150 (1965).
39. Finkle B. J., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **223**, 157 (1956).
40. Finkle B. J., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **230**, 669 (1958).
41. Fossum K., Whitaker J. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 367 (1968).
42. Fox S. W., Winitz M., Petlinga C. W., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5539 (1953).
43. Frater R., Light A., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **240**, 253 (1965).
44. Gerwin B. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 451 (1967).
45. Glazer A. N., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **240**, 201 (1965).
46. Greenstein J. P., *Advan. Protein Chem.* **9**, 121 (1954).
47. Gvisaro V., Sharon N., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 152 (1964).
48. Hayashi H., Miyoshi H., Nitla R., Udaka K., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **43**, 564 (1962).
49. Hayashi H., Tokuda A., Udaka K., *J. Exptl. Med.* **112**, 237 (1960).
50. Hellerman L., Perkins M. E., *J. Biol. Chem.* **107**, 241 (1934).
51. Hellerman L., Perkins M. E., Clark W. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **19**, 855 (1933).
52. Hill R. L., Schmidt W. R., Kimmel J. R., Smith E. L., dane niepubl. wg 120.
53. Hill R. L., Schwartz H. C., *Nature* **184**, 641 (1959).
54. Hill R. L., Schwartz H. C., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 572 (1959).
55. Hill R. L., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **231**, 117 (1958).
56. Hill R. L., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 2332 (1960).
57. Hollaway M. R., *European J. Biochem.* **5**, 366 (1968).
58. Hollaway M. R., Mathias A. P., Rabin B. R., *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 111 (1964).
59. Hoon A. Y., Sturtevant I. M., Hess G. P., *J. Biol. Chem.* **240**, 4204 (1965).
60. Hubbard C. D., Kirsch J. F., *Biochemistry* **7**, 2569 (1968).
61. Husain S. S., Lowe G., *Biochem. J.* **108**, 855 (1968).
62. Husain S. S., Lowe G., *Biochem. J.* **108**, 861 (1968).

63. Husain S. S., Lowe G., *Chem. Comm.* str. 310 (1968).
64. Johnson A. C., Herriott R. M., *J. Biol. Chem.* **222**, 855 (1956).
65. Johnston R. B., *J. Biol. Chem.* **221**, 1037 (1956).
66. Johnston R. B., Mycek M. J., Fruton J. S., *J. Biol. Chem.* **185**, 629 (1950).
67. Kimmel J. R., Kato G. K., Paira A. C. M., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2525 (1962).
68. Kimmel J. R., Rogers H. J., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **240**, 266 (1965).
69. Kimmel J. R., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **207**, 515 (1954).
70. Kimmel J. R., Smith E. L., *Advan. Enzymol.* **19**, 267 (1957).
71. Kimmel J. R., Smith E. L., *Biochem. Prep.* **6**, 61 (1958).
72. King T. P., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 5 (1961).
73. Kirsch J. F., Igelström M., *Biochemistry* **5**, 783 (1966).
74. Kirsch J. F., Katchalski E., *Biochemistry* **4**, 884 (1965).
75. Kirschenbaum D. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 55 (1961).
76. Kirschenbaum D. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 249 (1963).
77. Klein I. B., Kirsch J. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 575 (1969).
78. Klein I. B., Kirsch J. F., *J. Biol. Chem.* **244**, 5928 (1969).
79. Krebs H. A., *Biochem. Z.* **220**, 289 (1930).
80. Light A., *J. Biol. Chem.* **237**, 2535 (1962).
81. Light A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 781 (1964).
82. Light A., Frater R., Kimmel J. R., Smith E. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 1276 (1964).
83. Light A., Glazer A. N., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 3159 (1960).
84. Light A., Greenberg J., *J. Biol. Chem.* **240**, 258 (1965).
85. Light A., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 3151 (1960).
86. Light A., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2537 (1962).
87. Lineweaver H., Schwimmer S., *Enzymologie* **10**, 81 (1941/42).
88. Lowe G., *Nature* **212**, 1263 (1966).
89. Lowe G., Williams A., *Proc. Chem. Soc.*, str. 140 (1964).
90. Lowe G., Williams A., *Biochem. J.* **96**, 189 (1965).
91. Lowe G., Williams A., *Biochem. J.* **96**, 194 (1965).
92. Lowe G., Williams A., *Biochem. J.* **96**, 199 (1965).
93. McDowall M. A., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **240**, 281 (1965).
94. McKee H. S., *Nitrogen Metabolism in Plants*, Clarendon Press, Oxford 1962, str. 329.
95. Morihara K., *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 250 (1967).
96. Neumann H., *Israel J. Chem.* **5**, 87 (1967) cyt. wg 77.
97. Neumann H., Shinitzky M., Smith R. A., *Biochemistry* **6**, 1421 (1967).
98. Olszewska J., *Wiadomości Botaniczne* **11**, 9 (1967).
99. Perutz M. F., *European J. Biochem.* **8**, 455 (1969).
100. Ronald M. E. J., Chaiken J. M., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **245**, 3485 (1970).
101. Sanner T., Pihl A., *J. Biol. Chem.* **238**, 165 (1963).
102. Schechter I., Berger A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 157 (1967).
103. Schechter I., Berger A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 1898 (1968).
104. Schoellmann G., Shaw E., *Biochemistry* **2**, 252 (1963).
105. Shapira E., Arnon R., *Biochemistry* **6**, 3951 (1967).
106. Shapira E., Arnon R., *J. Biol. Chem.* **244**, 1026 (1969).
107. Shaw E., Mares-Guia M., Cohen W., *Biochemistry* **4**, 2219 (1965).
108. Shields G. S., Hill R. L., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 1747 (1959).
109. Shinitzky M., Goldman R., *European J. Biochem.* **3**, 139 (1967).

110. Sluyterman L. A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 305 (1964).
111. Sluyterman L. A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 316 (1964).
112. Sluyterman L. A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 577 (1966).
113. Sluyterman L. A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 418 (1967).
114. Sluyterman L. A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 430 (1967).
115. Sluyterman L. A. A., *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 439 (1967).
116. Sluyterman L. A. A., De Graff M. Y. M., *Biochim. Biophys. Acta* **200**, 595 (1970).
117. Sluyterman L. A. A., Wijdenes J., Wolthers B. G., *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 392 (1969).
118. Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **233**, 1392 (1958).
119. Smith E. L., Chavré V. J., Parker M. J., *J. Biol. Chem.* **230**, 283 (1958).
120. Smith E. L., Kimmel J., *The Enzymes* **4**, 133 (1960).
121. Smith E. L., Kimmel J. R., Brown D. M., *J. Biol. Chem.* **207**, 533 (1954).
122. Smith E. L., Parker M. J., *J. Biol. Chem.* **233**, 1387 (1958).
123. Smith E. L., Stockell A., Kimmel J. R., *J. Biol. Chem.* **207**, 551 (1954).
124. Stockell A., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **227**, 1 (1957).
125. Thompson E. O. P., *J. Biol. Chem.* **207**, 563 (1954).
126. Tokuda A., Hayashi H., Matsuba K., *J. Exptl. Med.* **112**, 249 (1960).
127. Tsunoda J. N., Yasunobu K. T., *J. Biol. Chem.* **241**, 4610 (1966).
128. Udaka K., Hayashi H., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 251 (1965).
129. Van Orden H. O., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **208**, 751 (1954).
130. Wallenfels K., Eisele B., *European J. Biochem.* **3**, 267 (1968).
131. Weinryb I., Steiner R. F., *Biochemistry* **9**, 135 (1970).
132. Whitaker J. R., *Biochemistry* **8**, 1896 (1969).
133. Whitaker J. R., *Biochemistry* **8**, 4591 (1969).
134. Whitaker I. R., Bender M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2728 (1965).
135. Whitaker J. R., Perez-Villasenor I., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 70 (1968).
136. Williams D. C., Whitaker J. R., *Biochemistry* **6**, 3711 (1967).
137. Willstätter R., Grassman W., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **138**, 184 (1924).
138. Wolthers B. G., Kalk H. K., *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 556 (1970).
139. Wong R. C., Liener I. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 470 (1964).
140. Wurtz A., Bouchut E., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **89**, 425 (1879).
141. Yu-Kun S., Chen-Lu T., *Sci. Sinica Peking* **12**, 879 (1963).
142. Yu-Kun S., Chen-Lu T., *Sci. Sinica Peking* **12**, 1845 (1963).

JEREMIASZ TOMASZEWSKI \*

## Hydroksylaza proliny protokolagenu

### Protocollagen Proline Hydroxylase

The sources, activity and biochemical properties of protocollagen proline hydroxylase are reviewed.

Enzymatyczna hydroksylacja proliny jest źródłem hydroksyproliny w kolagenie (60, 63), a prawdopodobnie i w innych białkach zawierających ten aminokwas (2, 5, 58). Liczne badania poświęcone głównie wyjaśnieniu biosyntezy kolagenu, dostarczyły wielu danych o naturze i właściwościach enzymu katalizującego hydroksylację. Dla jego określenia przyjęła się, wprowadzona przez Kivirikko i Prockopa (34) nazwa „hydroksylaza proliny protokolagenu” (ang. *Protocollagen Proline Hydroxylase*, PPH), wywodząca się z faktu, że naturalnym substratem tego enzymu są polipeptydowe prekursory kolagenu o dużej zawartości proliny.

### I. Lokalizacja i aktywność PPH w tkankach

Istotny postęp w badaniach nad PPH wniosły metody pozwalające na określanie aktywności enzymu w materiale biologicznym. W roku 1965 Prockop i Juva (47) oraz Hurych i Chvapil (19), inkubując tkanki embrionalne w obecności 2,2'-dwupirydylu, otrzymali prekursor kolagenu o dużej zawartości proliny, a nie zawierający hydroksyproliny. Inkubując oczyszczony prekursor z supernatantem wyciągu tkankowego 15 000 g, można było oznaczyć szybkość tworzenia hydroksyproliny, proporcjonalną do aktywności enzymu w tkance. Obecnie stosowane metody oznaczania podzielić można na dwie grupy:

a) polegające na oznaczaniu szybkości hydroksylacji proliny znakowanej  $^{14}\text{C}$  w naturalnym lub syntetycznym substracie (31, 33), b) opierające się na oznaczaniu radioaktywności wody powstałej w czasie hydroksylacji proliny znakowanej trytem na węglu 3 i 4 w polipeptydowym substracie (22, 23).

\* dr. Ośrodek Naukowo-Badawczy, Akademia Medyczna, Lublin

Wykaz stosowanych skrótów: PPH — hydroksylaza proliny protokolagenu

W pierwszej grupie metod, po przeprowadzeniu inkubacji odpowiednio przygotowanego wyciągu tkankowego z oczyszczonym substratem w obecności kofaktorów (34), oznacza się  $^{14}\text{C}$ -hydroksyprolinę w hydrolizowanych produktach reakcji. W drugiej grupie, po podobnie przeprowadzonej inkubacji, strąca się białka, a wodę znakowaną trytem oddestylowuje pod próżnią i oznacza jej aktywność.

Istniejąca dotychczas dowolność w stosowanych parametrach reakcji enzymatycznej i sposobie wyrażania aktywności PPH utrudnia w pewnym stopniu interpretację wyników różnych autorów. Mimo to wiemy już dzisiaj sporo na temat rozmieszczenia tego enzymu w wielu tkankach i narządach.

PPH jest enzymem wewnątrzkomórkowym, szeroko, jak się wydaje, rozpowszechnionym w świecie zwierzęcym. Jego obecność stwierdzono w tkankach kręgowców i bezkręgowców (10, 16, 24, 27, 41, 57). Szczególnie wysoką aktywność PPH wykazują tkanki embrionalne (25, 40) oraz tkanki o dużej aktywności metabolicznej, na przykład gojących się ran (39), ziarniniaka (25, 56) i niektórych innych tkanek nowotworowych (53). W obrębie gatunku aktywność PPH różnych tkanek jest różna (9, 15) i prawdopodobnie związana z nasileniem syntezy kolagenu (tablica 1).

Tablica 1

Aktywność PPH w różnych tkankach 14-dniowych embrionów kurzych, mierzona metodą inkubacji z substratem znakowanym  $^{14}\text{C}$  proliną według H a l m e (15)

Tkanka	Aktywność PPH w imp. /min/mg białka
Kości	989
Skóra	811
Płuca	521
Serce	412
Nerki	367
Wątroba	240

W badaniach na zwierzętach (26, 36) stwierdzono, że aktywność PPH, wysoka u osobników młodych, szybko spada w okresie dojrzewania, po czym wykazuje nieznaczną tendencję spadkową równoległą z wiekiem.

Według Goldberga i Greena (11) PPH jest obecna we wszystkich komórkach zdolnych w mniejszym lub większym stopniu do syntezy kolagenu. Autorzy ci (12), badając fibroblasty i komórki hepatoma linii  $\text{H}_4\text{II EC}_2$ , stwierdzili w tych ostatnich tylko sześciokrotnie niższą aktywność PPH, przy niemal zupełnym braku syntezy kolagenu. Wyniki te przemawiałyby za brakiem korelacji między aktywnością enzymu a nasileniem syntezy kolagenu. Z drugiej strony istnieją doniesienia o wyraźnym związku tych dwóch procesów, sugerujące, że synteza obu białek jest sprze-



zona na zasadzie indukcji lub kontrolowana przez genetycznie wspólny operon.

Różnice aktywności PPH w różnych okresach życia komórki były przedmiotem badań *Mussini'ego i wsp.* (39). Porównując aktywność PPH i szybkość syntezy kolagenu w tkankach gojących się ran u szczura, stwierdzili oni wzrost aktywności enzymu zbieżny z przejściem fibroblastów z fazy podziałowej w sekrecyjno-stacjonarną. Ponieważ wzrost aktywności enzymu poprzedza pojawienie się w tkankach kolagenu, autorzy przypuszczają, że enzym może odgrywać rolę regulatora syntezy kolagenu. Badania hodowli komórkowych przeprowadzone ostatnio w pracowni *Udenfrienda* (7, 14) wykazały, że synteza łańcuchów polipeptydowych protokolagenu przebiegała w czasie szybkiego wzrostu komórki, równoległe z nasiloną syntezą białek. Natomiast aktywność PPH wzrasta 3 do 10 razy dopiero pod koniec fazy wstępnej, już po nagromadzeniu w komórce bogatego w prolinę substratu. Ponieważ wzrost aktywności przypada na fazę obniżonej syntezy białek komórkowych, można przypuszczać, że nie jest on związany z syntezą PPH *de novo*, a raczej z uczynnianiem istniejącego wcześniej proenzymu. Istnieją przypuszczenia, że rolę taką może spełniać „zagęszczenie” komórki, lub przesunięcie *pH* w kierunku kwaśnym (7), jednak mechanizm aktywacji PPH *in vivo* nie został dotychczas wyjaśniony.

Przypuszcza się, że PPH zlokalizowana jest w mikrosomach (1, 44, 45). Wprawdzie w homogenatach komórkowych 80 do 95% aktywności PPH można odzyskać w supernatancie 150 000 *g*, (10, 27, 32, 42), nie wyklucza to jednak luźnych związków enzymu z strukturami mikrosomów w nieuszkodzonej komórce.

Postęp w badaniach nad PPH rzuca pewne światło na zmiany aktywności tego enzymu w niektórych stanach fizjologicznych i patologicznych. Stwierdzono znamienne wzrost aktywności PPH w tkance macicy w ciąży i okresie poporodowym (16), w punktach skóry u większości pacjentów ze sklerodermią (59, 61), w aterosklerotycznie zmienionych aortach królika (36) oraz w niektórych tkankach nowotworowych (53). Ostatnio ukazały się prace dotyczące obecności PPH w surowicy krwi. Okazuje się, że podobnie jak inne enzymy tkankowe, PPH uwalniana jest w niewielkim stopniu do krwiobiegu. Kilkakrotnie podwyższone wartości znaleziono w surowicy myszy z transplantowanym guzem linii sarkoma (53). *Stein i wsp.* (55), stosując metodę *Huttona i wsp.* (22), oznaczali aktywność PPH w surowicy krwi u ludzi zdrowych i w stanach patologicznych (tablica 2).

Nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności PPH w chorobach tkanki łącznej. Jest interesujące, że najwyraźniejszy wzrost aktywności ma miejsce w przypadkach nowotworu lub uszkodzenia tkanki wątroby, narządu stosunkowo ubogiego w tkankę łączną. Źródła i mechanizmy uwalniania PPH do krwi nie są znane i wymagają dalszych badań.

Tablica 2

Aktywność PPH surowicy w niektórych chorobach u ludzi według Steina i wsp. (55)

	Liczba przypadków	Aktywność średnia w imp/ml/godz	Zakres
Zdrowi	20	323	700—150
Choroby nowotworowe			
Hepatoma	3	3736	4412—2820
Białaczka limfatyczna	15	623	2046—150
Rak a) zlokalizowany	7	330	408—207
b) przerzutowy	5	584	1337—207
Choroby wątroby			
Ostre zapalenie wątroby	4	963	1617—219
Zapalenie przewlekłe	2	312	357—268
Marskość wątroby	2	744	1085—404
Choroby tkanki łącznej			
Twardzina skóry	17	344	600—167
Gościec przewlekły postępujący	5	371	529—185
Zapalenie wielostawowe	2	322	357—286
Inne choroby			
Nadciśnienie	10	356	774—116

## II. Oczyszczanie i własności fizyko-chemiczne PPH

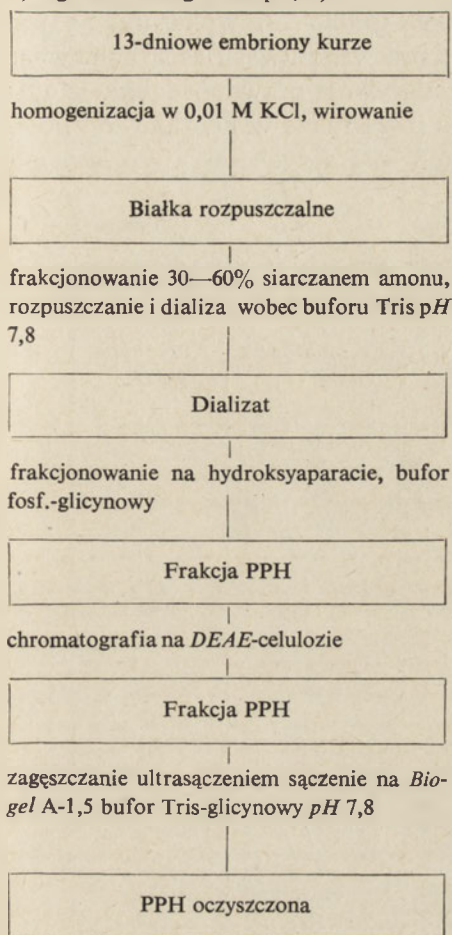
Częściowo oczyszczone preparaty PPH otrzymano z embrionów kurzych (17, 23, 32, 33) oraz ze skóry nowonarodzonych szczurów (50). Ostatnio opisano dwie podobne metody (18, 52), pozwalające na otrzymanie enzymu o czystości około 90%. Porównanie tych metod przedstawiono na schemacie 1.

W obu przypadkach otrzymano preparaty o aktywności około 3  $\mu$ g hydroksyproliny/mg białka enzymatycznego/godzinę, homogenne w ultrawirowaniu i wykazujące tylko nieznaczne zanieczyszczenia w elektroforezie na żelu poliakrylamidowym.

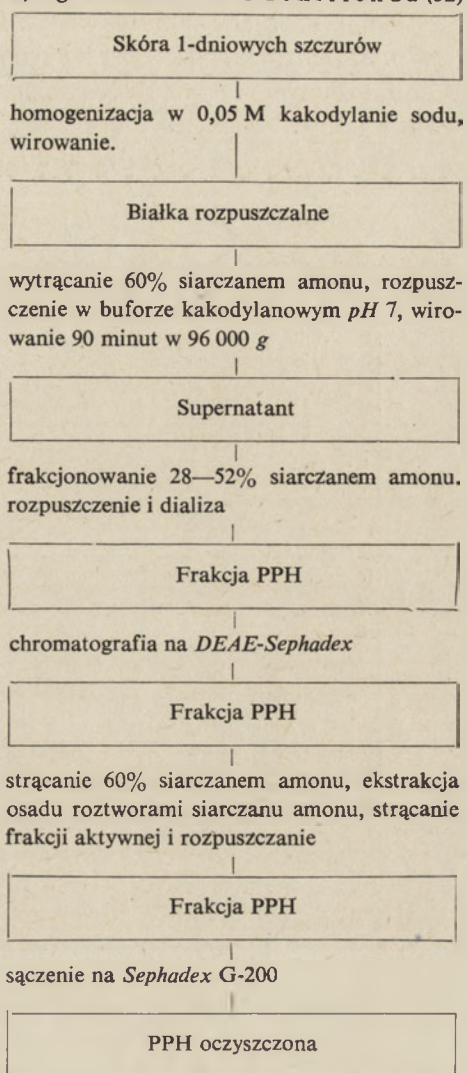
PPH jest białkiem ciepłochwiejnym, jednak w temperaturze od -20 do 0°C może być przechowywana przez miesiąc z zachowaniem około 80% aktywności. Przed utratą aktywności w czasie oczyszczania zabezpiecza obecność glicyny w buforze o pH około 8 (18), a także dodatek albuminy. Ciężar cząsteczkowy PPH oznaczali Hallmei i wsp. (18). Metodą sączenia molekularnego uzyskali wartości rzędu 300 000, natomiast w ultrawirowaniu o połowę niższe. Różnica ta może być spowodowana albo bardzo wysoką asymetrią cząsteczki PPH, albo wyższym stopniem spolimeryzowania enzymu w warunkach sączenia na żelu. Rhoads i wsp. (25) działając dodecylanem sodu i dwumerkaptanołem, uzyskali rozdział PPH na dwie

## Schemat 1. Metody oczyszczania PPH z embrionów kurzych i skóry młodych szczurów

a) wg. H a l m e g o i w s p. (18)



b) wg R h o a d s a i U d e n f r i e n d a (52)



podjednostki o bardzo zbliżonej ruchliwości elektroforetycznej i ciężarze około 65 000. Według tych autorów natywny enzym mógłby być dimerem o masie około 130 000.

Ostatnio ciekawe badania przeprowadzili w pracowni Prockopa O l s e n i w s p. (43). Badając strukturę cząsteczki PPH w mikroskopie elektronowym wykazali, że przyjmuje ona postać płaskiego pierścienia, niekiedy o obrysie heksagonalnym i wymiarach  $100 \times 30$ — $35 \text{ \AA}$ . Cząsteczki te, o ciężarze około 200 000, asocjują tworząc dimery, a głównie tetramery w formie walca o wymiarach  $100 \times 140 \text{ \AA}$  i ciężarze cząsteczkowym około 800 000.

Zagadnienie czy pojedynczy pierścień zbudowany jest z mniejszych podjednostek pozostaje sprawą otwartą.

Badania składu aminokwasowego PPH (tablica 3) wykazały, że jest ona białkiem o charakterze kwaśnym i z przewagą kwasu asparaginowego i glutaminowego. Aminokwasy siarkowe odgrywają prawdopodobnie istotną rolę w aktywności enzymatycznej, a być może także w konfiguracji przestrzennej cząsteczki. Liczby wolnych grup -SH dotychczas nie oznaczono.

Tablica 3

Skład aminokwasowy PPH izolowanej z embrionów kurzych i skóry młodych szczerów

Aminokwas	Reszt na 1000	
	PPH embrionów wg (18)	PPH skóry wg (52)
Kwas asparaginowy	95	107
Treonina	50	57
Seryna	100	66
Kwas glutaminowy	180	149
Prolina	35	50
Glicyna	100	69
Alanina	75	83
Walina	50	63
1/2 Cystyna	nie oznaczono	12
Metionina	15	11
Izoleucyna	35	40
Leucyna	65	95
Tyrozyna	20	28
Fenylalanina	30	42
Lizyna	85	77
Histydyna	25	19
Amoniak	nie oznaczano	84
Arginina	35	44

### III. Własności enzymatyczne PPH

Uważa się, że naturalnym substratem PPH jest protokolagen o budowie odpowiadającej podjednostce tropokolagenu i ciężarze cząsteczkowym około 100 000 (13, 19, 34, 37). Nie wiadomo jednak czy *in vivo* nie dochodzi do hydroksylacji mniejszych fragmentów łańcucha polipeptydowego. Szereg badań wskazuje na to, że możliwości takie istnieją. Bekhor i Bavetta (4) stwierdzili, że w skórze embrionów królika hydroksylacji ulega prolina polipeptydów o odpowiedniej sekwencji aminokwasowej i ciężarze nie przekraczającym 10 000. Według Huttona i wsp. (21), PPH działa na polipeptydy o masie powyżej 1 000. W badaniach nad hydroksylacją polipeptydów syntetycznych wykazano, że substratem PPH mogą być po-

litrójpeptydy o powtarzającej się sekwencji Gli-L-Pro-L-Pro i Gli-L-Ala-L-Pro (29, 33, 48). Hydroksylacji nie ulegają natomiast trójpeptydy i poli-L-prolina.

Suzuki i Koyama (56), używając jako źródła PPH supernatantu 105 000 g z homogenatów ziarniniaka, a jako substratów różnej długości politrójpeptydy (Pro-Pro-Gli)<sub>n</sub>, wykazali, że stopień hydroksylacji proliny rośnie od n = 3 do n = 10 i powyżej tej wielkości spada. Ogrzewanie wyższych politrójpeptydów (28), wyraźnie zwiększa stopień hydroksylacji w wyniku termicznej konformacji cząsteczek. Ponieważ natywne politrójpeptydy (Pro-Pro-Gli)<sub>n</sub> o n większym od 10, mogą tworzyć strukturę trójskrętną (54), prawdopodobnie nieuporządkowana forma substratu jest optymalna dla reakcji enzymatycznej. Podobne wnioski wynikają z obserwacji Fujimoto i Prockopa (10), którzy wykazali wyższy stopień hydroksylacji zdenaturowanego protokolagenu *Ascaris lumbricoides* pod wpływem PPH, niż jego formy natywnej. Natomiast według innych autorów konfiguracja przestrzenna substratu nie ma wpływu na aktywność enzymu (23, 29, 40, 41).

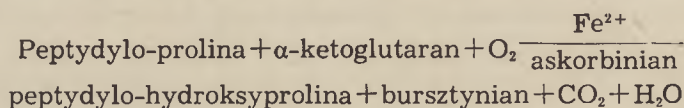
Z badań nad hydroksylacją proliny w polipeptydach syntetycznych można przypuszczać, że specyficzną dla PPH jest sekwencja typu: Gli-Pro-Pro-Gli, lub Gli-X-Pro-Gli (gdzie X może być leucyną, proliną, alaniną lub glicyną), charakterystyczna dla apolarnych odcinków łańcucha kolagenu. Badania Rhoadsa i Udenfrenda (51), wskazują na jeszcze niższą specyficzność substratową enzymu. Przy użyciu PPH ze skóry nowonarodzonych szczurów, uzyskali oni hydroksylację drugiej reszty prolinowej bradykininy o sekwencji: H-Arg-Pro-Pro-Gli-Pen-Ser-Pro-Pen-Arg-OH. W tym przypadku, dla działania enzymu wystarczałaby już kolejność -X-Pro-Gli. Ponieważ taka sekwencja występuje w wielu białkach, z których nie wszystkie zawierają hydroksyprolinę, jest interesujące czy i jakie inne czynniki determinują specyficzną hydroksylację określonych reszt prolinowych.

Początkowo przypuszczano, że ten sam enzym katalizuje hydroksylację proliny i lizyny (20, 34). Okazało się jednak, że wysoko oczyszczone preparaty PPH nie hydroksylują <sup>14</sup>C-lizyny.

Weinstein i wsp. (62), badając hydroksylację protokolagenu znakowanego <sup>14</sup>C-proliną i <sup>14</sup>C-lizyną, przy udziale częściowo oczyszczonej PPH z embrionów kurzych i w obecności specyficznych inhibitorów (23, 30), stwierdzili wybiórcze hamowanie hydroksylacji proliny i brak wpływu na hydroksylację lizyny. Przemawia to za odrębnością enzymów katalizujących hydroksylację obu aminokwasów, lub co najmniej za udziałem różnych centrów aktywnych tego samego enzymu, specyficznych dla substratu. Nie wiadomo dotychczas czy hydroksyprolina elastynu powstaje pod wpływem tego samego enzymu.

Dotychczasowe badania nie wyjaśniły specyficzności gatunkowej PPH. Według Nordwiga i Pfab (42) PPH bezkręgowców jest mniej specyficzna, a nadto powoduje tworzenie więcej 3-OH-proliny niż PPH kręgowców. Stwierdzono również, że PPH bezkręgowców wykazuje optymalne działanie w znacznie niższym stężeniu  $O_2$ , niż PPH zwierząt wyższych (6, 10).

Niezbędnym warunkiem działania PPH jest obecność tlenu cząsteczkowego, jonu żelazawego, askorbinianu i  $\alpha$ -ketoglutaranu (3, 19, 23, 32). PPH jest klasyfikowana jako oksydaza o mieszanej funkcji (38), a hydroksylacja proliny przebiega prawdopodobnie według równania:



Z dotychczasowych badań wynika, że jon  $Fe^{2+}$  jest luźno związany z enzymem i w czasie reakcji nie zmienia stopnia utlenienia (29). Askorbinian nie tworzy kompleksów z enzymem, ponieważ może być częściowo zastąpiony innymi substancjami redukującymi (23), a jego stereoizomery są katalitycznie równocenne (35). Badania z dehydroaskorbinianem wskazują, że nie działa on jako cykliczny przenośnik elektronów, a raczej warunkuje utrzymanie jonu  $Fe^{2+}$  w stanie zredukowanym. Nie można również wykluczyć udziału askorbinianu w redukcji drugiego atomu tlenu cząsteczkowego do powstającej w wyniku reakcji  $H_2O$ .

Stechiometryczna dekarboksylacja  $\alpha$ -ketoglutaranu (50) przemawia za tym, że jest on w tej reakcji donatorem elektronów, tak jak podczas jego oksydatywnej dekarboksylacji. Nie stwierdzono jednak wpływu kofaktorów dehydrogenazy  $\alpha$ -ketoglutaranu (FAD, NAD, TPP, Co-A, kwas liponowy) na enzymatyczną hydroksylację proliny przy udziale PPH (52).

Inhibitorami PPH są związki wiążące metale dwuwartościowe: 2,2'-dwupirydył, o-fenantrolina i EDTA (19, 20). Kivirikko i wsp. (30) stwierdzili, że inhibitorem PPH jest poli-L-prolina II (o strukturze spirali lewoskrętnej z wiązaniami peptydowymi w pozycji *trans*), działająca prawdopodobnie na drodze kompetycji substratowej. Okazało się również, że reakcję hydroksylacji hamują związki blokujące grupy sulfhydrylowe (18). Popenoe i wsp. (46) przypuszczają, że enzym zawiera grupy -SH warunkujące aktywne wiązanie  $\alpha$ -ketoglutaranu, a także, że jeden lub więcej mostków dwusiarczkowych stabilizuje czynną strukturę enzymu. Mimo względnie dużej zawartości seryny, nie wydaje się, aby grupy hydroksylowe odgrywały rolę w aktywności PPH (18).

W badaniach *in vitro* stwierdzono aktywujący wpływ albuminy i dwutiotretolu (49), katalazy (33) i mleczanu D i L (8). Nie wiadomo jednak jaki jest mechanizm aktywacji i jaka jest rola aktywatorów PPH w procesach zachodzących *in vivo*.

## LITERATURA

1. Bachra B. N., Van der Eb A. J., *Biochemistry* **9**, 3001 (1970).
2. Bańkowski E., Gołasiński W., Rogowski W., *Materiały VIII Zjazdu PTBioch* poz. D-20 (1970).
3. Barnes M. J., *Bibl. Nutr. Diet.* **13**, 86 (1969).
4. Bekhor I., Bavetta L. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 2351 (1967).
5. Bentley J. P., Hanson A. N., *Biochim. Biophys. Acta* **175**, 339 (1969).
6. Chvapil M., Ehrlich E., *Biochim. Biophys. Acta* **208**, 467 (1970).
7. Comstock J. P., Gribble T. J., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 115 (1970).
8. Comstock J. P., Udenfriend S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **66**, 552 (1970).
9. Frey J., Farianel J., Crouzet B., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 471 (1969).
10. Fujimoto D., Prockop D. J., *J. Biol. Chem.* **244**, 205 (1969).
11. Goldberg B., Green H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 1110 (1968).
12. Goldberg B., Green H., *Nature* **221**, 267 (1969).
13. Gottlieb A. A., Peterkofsky B., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **240**, 3099 (1965).
14. Gribble T. J., Comstock J. P., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 308 (1969).
15. Halme J., *Biochim. Biophys. Acta* **192**, 90 (1969).
16. Halme J., Jaaskelainen M., *Biochem. J.* **116**, 367 (1970).
17. Halme J., Kivirikko K. I., *FEBS Letters* **1**, 223 (1968).
18. Halme J., Kivirikko K. I., Simons K., *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 460 (1970).
19. Hurych J., Chvapil M., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 361 (1965).
20. Hurych J., Nordwig A., *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 168 (1967).
21. Hutton J. J., Marglin A., Witkop B., Kurtz J., Berger A., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 779 (1968).
22. Hutton J. J., Tappel A. L., Udenfriend S., *Anal. Biochem.* **16**, 384 (1966).
23. Hutton J. J., Tappel A. L., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 231 (1967).
24. Hutton J. J., Udenfriend S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 198 (1966).
25. Juva K., *Acta Physiol. Scand. Supl.* str. 308 (1968).
26. Kao K-Y. T., McGavack T. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **30**, 491 (1969).
27. Kao K-Y. T., Treadwell C. R., Previll J. M., McGavack T. H., *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 568 (1968).
28. Kikuchi Y., Fujimoto D., Tamiya N., *Biochem. J.* **115**, 569 (1969).
29. Kivirikko K. I., Bright H. J., Prockop D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 558 (1968).
30. Kivirikko K. I., Ganser V., Engel J., Prockop D. J., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 1341 (1967).
31. Kivirikko K. I., Laitinen O., Prockop D. J., *Anal. Biochem.* **19**, 249 (1967).
32. Kivirikko K. I., Prockop D. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 611 (1967).
33. Kivirikko K. I., Prockop D. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 4007 (1967).
34. Kivirikko K. I., Prockop D. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 782 (1967).
35. Kutnink M. A., Tolbert B. M., Richmond V. L., Baker E. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **132**, 440 (1969).
36. Langner R. O., Fuller G. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 559 (1969).

37. Lukens L. N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1235 (1966).
38. Mason H. S., *Annual Rev. Biochem.* **34**, 595 (1965).
39. Mussini E., Hutton J. J., Udenfriend S., *Science* **157**, 927 (1967).
40. Nordwig A., Kobrle V., Pfab F. K., *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 487 (1967).
41. Nordwig A., Pfab F. K., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 603 (1968).
42. Nordwig A., Pfab F. K., *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 52 (1969).
43. Olsen B. R., Jimenez S. A., Kivirikko K. I., Prockop D. J., *J. Biol. Chem.* **245**, 2649 (1970).
44. Peterkofsky B., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **238**, 3966 (1963).
45. Peterkofsky B., Udenfriend S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 335 (1965).
46. Popenoe E. A., Aronson R. B., Van Slyke D. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 286 (1969).
47. Prockop D. J., Juva K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 54 (1965).
48. Prockop D. J., Juva K., Engel J., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 553 (1967).
49. Rhoads R. E., Hutton J. J., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 805 (1967).
50. Rhoads R. E., Udenfriend S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 1473 (1969).
51. Rhoads R. E., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 108 (1969).
52. Rhoads R. E., Udenfriend S., *Arch. Biochem. Biophys.* **139**, 329 (1970).
53. Roberts N. E., Udenfriend S., *J. Nat. Cancer Inst.* **45**, 277 (1970).
54. Sakakibara S., Kishida Y., Kikuchi Y., Sakai R., Kakiuchi K., *Bull. Chem. Soc. Japan* **41**, 1273 (1968).
55. Stein H. D., Keiser H. R., Sjoerdsma A., *Lancet* **1**, 106 (1970).
56. Suzuki F., Koyama E., *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 154 (1969).
57. Takeuchi T., Kivirikko K. I., Prockop D. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 940 (1967).
58. Tomaszewski J., *Acta Biochim Polon.* **18**, 277 (1971).
59. Uitto J., Halme M., Hannuksela P., Peltokallio P., Kivirikko K. I., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **23**, 241 (1969).
60. Udenfriend S., *Science* **152**, 1335 (1966).
61. Uitto J., Hannuksela M., Rasmussen O. G., *Ann. Clin. Res.* **2**, 235 (1970).
62. Weinstein E., Blumenkrantz N., Prockop D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 747 (1969).
63. Wojtecka-Lukasik E., *Post. Biochem.* **12**, 235 (1966).



TOMASZ GOŁASZEWSKI\*, MARIA A. SIWECKA\*\*,  
JAN W. SZARKOWSKI\*\*\*

## Podstawowe procesy biochemiczne podczas kiełkowania nasion

### The Principal Biochemical Processes during Seed Germination

The literature data and the authors' experiments on the principal biochemical events occurring in germinating plant seeds are reviewed. The nucleic acid and protein metabolism as well as mitochondria and ribosome formation processes during seed germination are discussed. The fact that in the early stages of germination high turnover of plastidial and mitochondrial DNA in opposite to the low activity of nuclear DNA can be observed, is emphasized.

Dojrzały zarodek, stanowiący część nasienia roślinnego, jest układem biologicznym, którego zdolności rozwojowe pozostają w stanie utajenia przez krótszy lub dłuższy okres czasu, zależnie od warunków ekologicznych (29, 45). Zdolności te ujawniają się w chwili rozpoczęcia kiełkowania nasienia lub wyizolowanego zarodka. Boddźcem niezbędnym, choć nie zawsze wystarczającym dla zapoczątkowania procesów związanych z kiełkowaniem jest wnikięcie wody do nasienia (55). Po przekształceniu hydrożelu nasienia w hydrosol, które można uważać za proces bierny, nasienie przechodzi ze stanu spoczynku w aktywny stan przemian biochemicznych (74).

Dotychczasowe wyniki wskazują, że między kiełkowaniem nasion przetrwalników drobnoustrojów, jak również zarodników roślin niższych istnieje wiele analogii. Można też dostrzec pewne podobieństwa między kolejnością procesów aktywacji różnych szlaków metabolicznych podczas kiełkowania nasion i podczas rozwoju zarodkowego organizmów zwierzęcych (83).

### I. Uwagi ogólne

W początkowym okresie życia rośliny można wyodrębnić dwie fazy: rozwój embrionalny czyli dojrzewanie nasienia i kiełkowanie nasienia dojrzałego. Faza życia embrionalnego poprzedzona jest procesami rozwoju

\* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

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

\*\*\* Prof. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

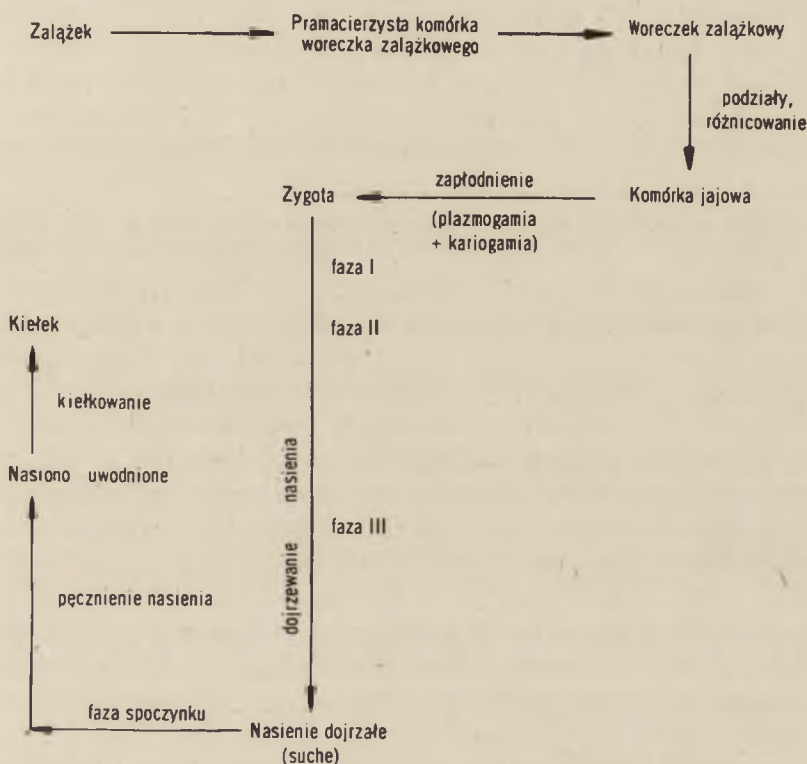
zależka, w których wyniku powstaje woreczek zalążkowy. Kolejne podziały pramacierzystej komórki woreczka doprowadzają do powstania komórki jajowej i zawiązka tkanki bielmowej (47). W rozwoju embrionalnym, rozpoczynającym się w momencie powstania zygoty, wykształcają się kolejno tzw. prazarodki oraz zróżnicowany układ złożony z zarodka właściwego i tkanek zapasowych: liścieni (kotyledonów) i bielma (endospermy). Niekiedy procesy dojrzewania nasienia wyprzedzają proces jego różnicowania (64). Procesy biochemiczne zachodzące w czasie dojrzewania nasienia są stosunkowo mało poznane (40). Znacznie intensywniej badane były przemiany biochemiczne w nasieniu po rozpoczęciu kiełkowania.

O ile w końcowej fazie dojrzewania nasienia zachodzi stopniowe odwadnianie układu (dojrzałe nasiona zawierają jedynie 5—10% wody w przeliczeniu na masę nasienia (55)), w związku z czym intensywność przemian biochemicznych zmniejsza się (39, 53, 62) (por. schemat 1), to podczas kiełkowania zachodzi proces odwrotny. Powszechnie wiadomo, że we wczesnych okresach kiełkowania procesy rozpadu różnych związków przeważają nad procesami ich syntezy (46). Jest to związane z metabolicznym uruchamianiem podczas kiełkowania materiałów nagromadzonych w czasie dojrzewania nasienia w tkankach zapasowych i przynajmniej częściowym ich przekazywaniem rozwijającemu się zarodkowi (29, 33). Sam zarodek ma rezerwy materiałów zapasowych w liścieniach (47). W związku z tym, po rozpoczęciu kiełkowania obserwuje się spadek zawartości różnych metabolitów w liścieniach i w endospermie (33, 58). Stwierdza się wtedy również uaktywnienie i syntezę *de novo* enzymów hydrolitycznych w nasieniu: rybonukleaz (33, 54), proteaz (24, 69), peptydaz (24), enzymów hydrolizujących kilku- i wielocukrowce (37, 66, 72) a także enzymów biorących udział w procesach degradacji tłuszczu (81) i ich przemianie w cukrowce (17, 25).

Podczas kiełkowania intensywność metabolizmu różnych związków jest różna w poszczególnych częściach nasienia: w zarodku, w tkankach zapasowych oraz w poszczególnych organach rozwijającego się zarodka — w zawiązku korzenia (*radicula*) i pędu. Dla uzyskania właściwego obrazu przemian biochemicznych zachodzących podczas kiełkowania niekiedy prowadzi się badania na wyizolowanych zarodkach (36, 71, 76), stanowiących w porównaniu do nasienia układ uproszczony. Często śledzi się metabolizm w tzw. osiach zarodkowych uzyskiwanych przez odcięcie liścieni od kiełka (10, 48, 56). Przedmiotem wielu prac jest metabolizm liścieni (7, 16, 19, 60), bielma (58), części podliścieniowej pędu — hipokotylu (44, 59), części nadliścieniowej — epikotylu (44) lub wreszcie — poszczególnych organów rosnącej rośliny (5, 35, 57). Istotny jest też wybór odpowiedniej rośliny — nasiona różnych gatunków roślin wykazują bowiem odmienną budowę anatomiczną. Badania nad metabolizmem w liścieniach prowadzi się najczęściej na nasionach roślin strączkowych, w których liścienie stanowią poważną część suchej masy zarodka. Do badań nad metabolizmem

bielma często używane są nasiona roślin zbożowych. Zarodki tych nasion zawierają bowiem znacznie zredukowany pojedynczy liścień w formie tzw. tarczki (*scutellum*) (47). Stosunkowo mało poznany jest metabolizm poszczególnych organelli komórkowych w rozwijających się kiełkach.

Znaczne różnice zaobserwowane w metabolizmie kiełkujących nasion roślin oleistych (w których podstawowym materiałem zapasowym są tłuszcze) i zbożowych (materiał zapasowy — cukry) (46). Białka występują w nasionach w mniejszych ilościach (46). Badania porównawcze przeprowadzone przez *Castelfranco* i wsp. (9) wykazały, że w zależności od typu nasienia różne grupy enzymów ulegają aktywacji, bądź też są syntetyzowane w czasie kiełkowania.



**Schemat 1. Wczesne etapy rozwoju rośliny**

Proces dojrzewania nasion (fazy I, II, III) omówiono na podstawie danych *Kolöffela* (39) uzyskanych dla nasion grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*), *Marre'go* (53) — dla bielma nasion rącznika pospolitego (*Ricinus communis*), *Payne'a* i *Boltera* (62) dla liścieni zarodków bobu (*Vicia faba*) oraz dyskusji *Ghetie'go* (24).

Faza I. Szybkie podziały komórkowe, różnicowanie organów (62) spadek względnej zawartości wody (do 60% suchej masy), wzrost aktywności enzymów oddechowych (39) i innych, synteza materiałów zapasowych, wzrost suchej masy nasienia (24, 53, 62).

Faza II. Brak podziałów komórkowych, dalszy wzrost suchej masy, gromadzenie materiałów zapasowych (53, 62), spadek względnej zawartości wody do 50% (39), powolny spadek aktywności enzymów (53), formowanie enzymów związanych z błonami (62).

Faza III. Gwałtowne odwodnienie nasienia do około 10%, spadek aktywności enzymów, zahamowanie procesów anabolicznych (39, 53, 62)

## II. Metabolizm RNA i białek

Metabolizm kwasów nukleinowych i udział tych związków w syntezie białek w czasie kiełkowania jest przedmiotem szczególnie intensywnych badań. Stwierdzono, że intensywność metabolizmu RNA w poszczególnych częściach nasienia w określonych okresach kiełkowania nie jest jednakowa. Przykładem mogą tu być różnice w intensywności znakowania rybosomowych kwasów rybonukleinowych zawartych w osiach zarodkowych i w liścieniach bawełny (*Gossypium hirsutum*) podczas początkowych 16 godzin kiełkowania (23, 78, 79). Na uwagę zasługują też wyniki badań prowadzonych przez Botóșăneanu i Vasu (5) nad heterogennością kwasów nukleinowych w nasionach grochu (*Pisum sativum*). O ile przed kiełkowaniem zarówno kwasy nukleinowe osi zarodkowych jak i liścieni rozdzielają się elektroforetycznie na jednakową ilość frakcji, to po 7 dniach kiełkowania profile rozdzielowe tych związków otrzymanych z łodygi, liści i korzeni są odmienne niż analogiczne profile dla RNA i DNA liścieni. Wyniki te świadczą, że procesy różnicowania kwasów nukleinowych przebiegają inaczej w tkankach rosnących i zapasowych.

Głównym zagadnieniem metabolizmu kwasów nukleinowych i białek podczas kiełkowania jest jednak kolejność rozpoczynania syntezy poszczególnych rodzajów RNA (rRNA, tRNA, mRNA), a także niezbędność syntezy białek do zapoczątkowania metabolizmu kwasów nukleinowych.

Wyniki Dure'a i Watersa (23) wskazują, że w nasionach bawełny już podczas początkowych 16 godzin kiełkowania zachodzi synteza rybosomalnych kwasów rybonukleinowych, czego dowodem jest ich znakowanie się radioaktywnym fosforem. Sasaki i Brown (64) stwierdzili, że w kiełkujących zarodkach sosny (*Pinus resinosa*) synteza rRNA rozpoczyna się wcześniej niż synteza tRNA. Zgodnie z wynikami uzyskanymi przez Vold i Spherda (76, 77) między 10 i 15 godziną kiełkowania ilość tRNA w nasionach pszenicy zmniejsza się o połowę, po 20 godzinach natomiast rozpoczyna się intensywna resynteza tego związku, doprowadzająca do przywrócenia ilości początkowej. Zmianom ilościowym tRNA towarzyszą pewne zmiany we wzajemnych proporcjach poszczególnych tRNA przenoszących określone aminokwasy. Zdaniem cytowanych autorów zjawisko to może odgrywać pewną rolę w procesach regulujących syntezę białek podczas kiełkowania nasion.

Intensywnie również badano syntezę mRNA podczas kiełkowania i półokres jego trwania. W kilku pracowniach (50, 52, 65, 67) zaobserwowano, że ilość rybosomów związanych w agregaty polisomalne zwiększa się pokaźnie w komórkach po napęcznieniu nasion. Agregaty te, wykazujące wysokie wartości stałych sedymentacji, badane *in vitro* rozpadają się pod wpływem rybonukleazy, co wskazuje, że w procesie ich formowania bierze udział mRNA (50, 67). Ponieważ agregaty te powstają bezpośrednio po napęcznieniu nasienia, wielu autorów sądzi (14, 52), że programowanie rybo-

somów odbywa się przy udziale mRNA powstałego już podczas dojrzwania nasienia. W suchym nasieniu informacyjny RNA występowałby więc w formie latentnej (14, 70).

Zgodnie z poglądami Marcusa i Feeley'a (50) mRNA w suchym nasieniu nie jest dostępny rybosomom. Dla jego aktywacji konieczne jest, być może, usunięcie bliżej nieznanymi inhibitorów. Ci sami autorzy (51) wykazali później, że RNA izolowany z suchych nasion pszenicy, podobnie jak RNA nasion napęczniałych, może pobudzać procesy inkorporacji znakowanych aminokwasów do białek w układzie z *Escherichia coli*. Autorzy ci (49) sądzą, że synteza mRNA we wczesnym okresie kiełkowania nasienia jest nieznaczna.

Podobny wniosek wyciągnęli Chen i wsp. (15) z doświadczeń nad odwodnianiem kiełkujących nasion pszenicy. Stwierdzili oni, że kiełkujące nasiona są wrażliwe na odwodnienie dopiero po 48 godzinach napęcznienia. Gdy odwodniano 24-godzinne kiełki, a następnie ponownie poddawano je pęcznieniu, wzrost ich nie był zakłócony. Analogiczne doświadczenia z użyciem kiełków 48-godzinnych wykazały, że dalsze kiełkowanie było wstrzymane. Chen i wsp. (15) stwierdzili ponadto, że odwodnienie 48-godzinnych kiełków nie doprowadzało ani do uszkodzenia struktury rybosomów ani do dezaktywacji mRNA. W okresie początkowych 24 godzin kiełkowania jest zatem wykorzystywany mRNA istniejący w nasieniu. Po 48 godzinach kiełkowania odwodnienie uszkadza matrycę DNA i wstrzymuje procesy syntezy informacyjnego RNA. Zdaniem Chroboczek i Cherry'ego (20, 21) najintensywniejsza synteza mRNA zachodzi od 7 do 14 dnia kiełkowania.

Z drugiej jednak strony wyniki uzyskane niedawno przez Rejman i Buchowicza (63) świadczą, że już po 8 godzinach pęcznienia nasion pszenicy jest w nich syntetyzowana pewna frakcja RNA, która — zdaniem autorów — może odgrywać rolę w procesach przekazywania informacji genetycznej dla syntetyzowanych później białek.

Na uwagę zasługuje praca Weeksa i Marcusa (80), w której autorzy donoszą o wyodrębnieniu za pomocą frakcjonowanego wirowania tzw. informacyjnej frakcji komórkowej z homogenatów suchych, nie poddanych uprzednio napęcznieniu, zarodków pszenicy. Frakcja ta, przypominająca tzw. informosomy, otrzymane z innych układów biologicznych (por. 27), spełnia rolę stymulatora procesu łączenia monosomów w układy polisomalne oraz wykazuje aktywność matrycową — katalizuje włączanie aminokwasów do białek. Dwa główne składniki tej frakcji: mRNA i białka są niezbędne do jej działania, które ujawnia się jedynie w ciągu paru początkowych godzin kiełkowania. Autorzy zauważyli ściśle zależność między zanikaniem informacyjnej frakcji komórkowej a zwiększaniem się puli polisomów w komórce. Są oni zdania, że podstawową funkcją informacyjnej frakcji komórkowej jest zapoczątkowanie syntezy białek we wczesnym

okresie kiełkowania zarodków, kiedy procesy transkrypcji mRNA są jeszcze wstrzymane.

Autoradiograficzne badania *Deltoura* (22) wskazują, że między czwartą a ósmą godziną od rozpoczęcia pęcznienia nasion kukurydzy (*Zea mays*) synteza RNA w komórkach korzonków zachodzi jedynie we frakcji chromatyny jądrowej — w nukleoplazmie. Po 8—12 godzinach od rozpoczęcia kiełkowania można wykryć znakowany RNA w jąderku, a po 32 godzinach — w cytoplazmie.

*Waters i Dure* (78, 79) zauważyli, że we wczesnym okresie kiełkowania nasion bawełny aktynomycyna D hamuje syntezę rRNA, nie wpływa natomiast na procesy translacji, zachodzące przy udziale obecnego w suchym nasieniu mRNA. Ponieważ nasiona wielu gatunków roślin mogą pozostawać w spoczynku przez bardzo długi okres czasu (46) można przypuszczać, że mRNA występujący w suchym nasieniu jest stabilnym kwasem rybonukleinowym o długim półokresie trwania.

Dojrzałe nasiona nie poddane pęcznieniu zawierają wszystkie składniki niezbędne do syntezy białek, między innymi tRNA (2, 64, 76). Zdaniem *Andersona i Fowdena* (2) podczas pierwszych trzech dni kiełkowania nasion grochu syntetazy aminoacylo-tRNA nie powstają. Ponieważ jednak białka są syntetyzowane nawet we wcześniejszym okresie kiełkowania (14, 35, 76), należy sądzić, że enzymy te znajdują się już w suchym zarodku. Badania *Henshalla i Goodwina* (30) wskazywałyby jednak, że podczas kiełkowania następuje niemal 10-ciokrotny wzrost aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA.

*Legocki i Marcus* (43) wykryli w ekstraktach zarodków pszenicy, a *App* (3) w ekstraktach zarodków ryżu dwa czynniki niezbędne do wbudowywania fenyloalaniny do białek przy udziale poliU. Są nimi: czynnik biorący udział w procesie wiązania aminoacylo-tRNA z kompleksem mRNA-rybosom i czynnik o własnościach translokazy.

Niemniej jednak wyniki wielu autorów (literatura — patrz 6) świadczą, że rybosomy izolowane z nienapęczniałych nasion wykazują niską aktywność włączania aminokwasów. Aktywność rybosomów wyodrębnionych z liścieni suchych nasion grochu zwiększa się znacznie po działaniu trypsyną (34). Najprawdopodobniej uwolniona zostaje wówczas pula aktywnego mRNA tworzącego w suchym nasieniu nieaktywne kompleksy nukleoproteidowe. Dodatek egzogenego RNA informacyjnego z suchych nasion wzmaga znacznie inkorporację fenyloalaniny do frakcji nierozpuszczalnej w kwasie (6, 50). Zdaniem *Boultera* (6) w suchym nasieniu albo ilość mRNA jest zbyt mała, albo też ten RNA ma niedostateczną aktywność. Pracownicy grupy *Katchalskiego* (14) wyrazili niedawno przypuszczenie, że uwodnienie zarodków odgrywa rolę „spustu” w procesach aktywacji stabilnego i zarazem latentnego RNA informacyjnego, dzięki czemu już we wczesnym okresie kiełkowania możliwa jest synteza białek, mimo że genom komórki pozostaje jeszcze nieaktywny.

### III. Aktywacja genomu

Badania nad aktywnością genomu w nasionach i kiełkach nie są jeszcze kompletne. Jakob i Bovey (35) wykazali, że we wczesnym okresie kiełkowania zarodków grochu (*Vicia faba*) procesy replikacji DNA są zahamowane. Włączanie znakowanej tymidyny do DNA korzonków grochu autorzy ci stwierdzili dopiero po 25 godzinach pęcznienia. Najintensywniej synteza DNA zachodzi między 30 i 40 godziną od rozpoczęcia kiełkowania, a po 45 godzinach jej szybkość maleje.

Autorzy zwracają uwagę, że szczyt aktywności metabolicznej DNA przypada bezpośrednio po dwóch okresach syntezy białka obserwowanych między 14—20 i 23—27 godziną od rozpoczęcia pęcznienia. Być może, białka wówczas syntetyzowane są niezbędne do pełnej aktywacji genomu.

W naszej pracowni badaliśmy syntezę DNA *in vivo* w różnych organelach komórek zarodków żyta w początkowych 48 godzinach kiełkowania (26). Stwierdziliśmy, że DNA jądrowy i DNA występujący w organellach lekkich (promitochondria i proplastydy) różnią się między sobą aktywnością metaboliczną. O ile DNA jądrowy zarówno po 24 jak i po 48 godzinach od rozpoczęcia kiełkowania zarodków wykazuje niską aktywność włączania znakowanej tymidyny, to w tym samym okresie kwasy dezoksyrybonukleinowe mitochondriów i plastydów włączają ten prekursor stosunkowo intensywnie. Można przypuszczać, że w zarodku żyta istnieją dwie pule kwasu dezoksyrybonukleinowego o różnej aktywności metabolicznej. Podobny wniosek nasuwa praca Kulki i Rejowskiego (42), którzy stwierdzili, że podczas kiełkowania nasion jęczmienia mitochondrialne kwasy nukleinowe znakują się radioaktywnym fosforem znacznie intensywniej niż jądrowe. Zagadnienie to poruszymy jeszcze przy omawianiu rozwoju mitochondriów podczas kiełkowania. Przytoczone dane pozostają w zgodzie z poglądem przyjmowanym już dzisiaj powszechnie, że aktywacja DNA jądrowego nie jest najwcześniejszym procesem zachodzącym podczas kiełkowania.

Zdaniem Chena i Osborne'a (13) unieczynnienie genomu podczas dojrzewania nasienia polega na równoczesnym zahamowaniu jego replikacji i transkrypcji. Badacze ci stwierdzili, że DNA suchych i kiełkujących zarodków pszenicy różnią się pewnymi własnościami fizyko-chemicznymi. Na przykład tzw. temperatura topnienia ( $T_m$ ) DNA z nasion suchych jest o 2° wyższa niż DNA z kiełków 48-godzinnych, zaś wartość efektu hiperchromowego jest o 7% niższa dla DNA nasion suchych. Dane te świadczą, że skład nukleotydotowy obu kwasów dezoksyrybonukleinowych jest odmienny — DNA w nasionach suchych wykazuje wyższą zawartość guaniny i cytozyny. Chen i Osborne (13) stwierdzili, że znakowane rRNA z suchych i napęczniałych zarodków hybrydują z większą wydajnością z DNA suchych zarodków niż z DNA kiełków 48-mio godzinnych. Zgodnie z obliczeniami tych autorów, w ciągu 48 godzin kiełkowania zachodzi dele-

cja około 30% genów warunkujących syntezę rRNA. Autorzy sądzą, że podczas dojrzwania nasienia — zapewne przed ukończeniem tego procesu — zachodzi zjawisko uwielokrotnienia (amplifikacji) genów chromosomowych kierujących syntezą rRNA. Znaczenie tego zjawiska nie jest jeszcze znane. Być może, wiąże się ono z koniecznością przygotowania dużej ilości rRNA w czasie dojrzwania nasienia jako materiału rezerwowego wykorzystywanego podczas kiełkowania. Zachodząca wówczas delecja genów doprowadzałyby do przywrócenia stanu istniejącego przed osiągnięciem przez nasienie dojrzałości metabolicznej.

Na uwagę zasługuje fakt, że DNA występujący w dojrzałych zarodkach pszenicy charakteryzuje się dużą zawartością 5-metylo-cytozyny (12). Wiadomo, że stopień zmetylowania kwasów nukleinowych decyduje w poważnej mierze o drugorzędowej strukturze tych związków, wpływając na konformację ich cząsteczek (4). Bardziej zmetylowane cząsteczki mogą być odporniejsze na działanie endogennych dezoksyrybonukleaz (4). Nie jest więc wykluczone, iż wysoki stopień zmetylowania DNA zarodków pszenicy zapewnia im dłuższą żywotność dzięki zabezpieczeniu integralności genomu.

#### IV. Rozwój organelli komórkowych

Procesy powstawania i rozwoju organelli podczas kiełkowania są mało poznane. Przyjmuje się, że w suchym zarodku prócz rybosomów występują niedojrzałe strukturalnie i metabolicznie formy plastydów i mitochondriów — proplastidy i promitochondria (8, 31). Na obrazach mikroskopowo-elektronowych widoczne są również tzw. ciała białkowe (24, 58).

Stosunkowo dużo uwagi poświęcono rozwojowi mitochondriów w rosnących kiełkach. Wiadomo, że po rozpoczęciu pęcznienia nasion wzrasta znacznie ich aktywność oddechowa (7, 61). Natężenie przemian oddechowych w suchym nasieniu jest na ogół bardzo niskie (7, 8, 74). Według danych Kollöffela (39) w dojrzałym nasieniu grochu zwyczajnego (*Pisum sativum*) nie ma mitochondriów o typowej zróżnicowanej strukturze. Cherry (17) zaobserwował jedynie niewielką liczbę struktur mitochondrialnych w liścieniach nasion orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*) w stanie spoczynku. Nieliczne mitochondria występują również w suchych zarodkach nasion żyta (*Secale cereale*) (68).

Podczas kiełkowania liczba mitochondriów znacznie zwiększa się, czemu towarzyszy znaczny wzrost aktywności oddechowej kiełkującego ziarna. Zdaniem Breidenbacha i wsp. (7) wzrost aktywności oddechowej jest wówczas tak szybki, że należy wykluczyć możliwość syntezy *de novo* białek enzymatycznych biorących udział w procesach utleniania. Według Abdula-Baki (1) wzrost aktywności oddechowej kiełków zachodzi równolegle ze wzrostem syntezy białek. Najprawdopodobniej w grę wchodzi zarówno proces aktywacji białek znajdujących się w nasieniu jak też i synteza nowych białek.



Breidenbach i wsp. (8) wykazali, że po 4 dniach kiełkowania nasion orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea*) frakcja komórkowa, z którą jest związana oksydaza bursztynianowa, zawiera jedynie 10% białka homogenatu, natomiast po 9 dniach — już około 40% białek komórki. Między 1 i 9 dniem kiełkowania aktywność oksydazy bursztynianowej wzrasta kilkanaście razy. Dane te obrazują intensywność rozwoju struktur mitochondrialnych. Potwierdzają one zarazem dane o aktywności metabolicznej kwasów nukleinowych mitochondriów w czasie kiełkowania. Dodamy, że zgodnie z wynikami Breidenbacha i wsp. (7), ilość DNA związanego z mitochondriami w liścieniach orzecha ziemnego wzrasta wówczas 2 razy szybciej niż ilość DNA całkowitego. Jednocześnie w mitochondriach powstaje układ cytochromowy, co przypominałoby proces zachodzący u drożdży w czasie adaptacji tlenowej (por. 28). Jednakże z badań prowadzonych w naszej pracowni wynika (41), że frakcja mitochondrialna z suchych zarodków żyta zawiera zarówno oksydazę cytochromową (EC 1.9.3.1.), głównie w podfrakcji błon wewnętrznych, jak też dehydrogenazę zredukowanego NAD (EC 1.6.99.3.) — przede wszystkim w podfrakcji błon zewnętrznych.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że podczas kiełkowania nasienia tkanki zapasowe: liścienie zarodkowe i bielmo wykazują zwiększanie się liczby mitochondriów, mimo że same nie wzrastają, o czym świadczy brak figur mitotycznych (17, 18). Wzrost liczby mitochondriów w liścieniach soi zaobserwował Howell (32). Zdaniem Younga i wsp. (82) u grochu funkcjonalna integralność mitochondriów liścienia pozostaje pod kontrolą rozwijających się osi zarodkowych. Mitochondria z odciętych liścieni wykazują bowiem niewielką aktywność oddechową.

Znacznie skromniejsze są dane o rozwoju rybosomów podczas kiełkowania nasion. Za pomocą mikroskopu elektronowego ustalono, że podczas kiełkowania dochodzi do zmian w rozmieszczeniu rybosomów w cytoplazmie. Zgodnie z danymi Chapmana i Rieberta (11) oraz Siweckiej i Szarkowskiego (68) w suchych zarodkach rybosomy są gęsto i beładnie rozmieszczone w całej cytoplazmie, choć jednocześnie tworzą charakterystyczne zgrupowania wokół zawiązków mitochondriów. Po napęcznieniu nasion obserwuje się rozproszenie rybosomów, przy czym część z nich układa się w zespoły łańcuchowe (11, 68). Jednocześnie pojawiają się w komórkach błony reticulum endoplazmatycznego (11). Jest to obraz odmienny od obserwowanego w późnej fazie dojrzewania nasion, w której następuje spadek ilości rybosomów związanych z błonami i wzrost puli rybosomów wolnych (62). Przypuszcza się (60, 62), że wolne i związane rybosomy biorą udział w syntezie odmiennych białek.

Waters i Dure (78, 79) wykazali, że zarówno synteza rRNA jak i formowanie rybosomów zachodzi już w okresie początkowych 16 godzin kiełkowania nasion bawełny. W późniejszym okresie stwierdza się pewne różnice w intensywności procesów formowania rybosomów w osiach zarodkowych i liścieniach: po 40 godzinach kiełkowania w kotyledonach, a po

48 godzinach — w osiach zarodkowych pojawiają się cząstki 40—50 S. Choć ilość tych cząstek, w porównaniu do całej populacji rybosomów, jest niewielka, tylko one włączają znakowany fosfor do RNA. Cząstki te, zdaniem Watersa i Dure'a (78), są prekursorami rybosomów i zawierają głównie RNA, prawdopodobnie odpowiadający prekursorowemu rRNA u drobnoustrojów (por. 27). Jeśli po 72 godzinach kiełkowania osie zarodkowe i liścienie inkubuje się ze znakowanym fosforanem, a następnie prowadzi się około 20-godzinną ich inkubację w środowisku pozbawionym radioaktywności w warunkach zaciemnienia, piętno znakowanego RNA cząstek prekursorowych przemieszcza się do rybosomów dojrzałych. Światło wpływa hamująco na proces formowania prekursorów rybosomowych. Zdaniem cytowanych autorów (78, 79) w różnych okresach kiełkowania zarodków zachodzi represja i derepresja cistronów warunkujących syntezę rRNA.

Podobne cząstki prekursorowe rybosomów zaobserwował Chakravorty (10) w osiach zarodkowych rośliny motylkowej *Vigna unguiculata*. Między 16-tą a 24-tą godziną kiełkowania w osiach zarodkowych zachodzi synteza dojrzałych rybosomów, hamowana całkowicie po 30—40 godzinach wzrostu. Około 60 godziny od rozpoczęcia pęcznienia pojawiają się w komórkach osi zarodkowych cząstki zawierające rRNA charakteryzujące się współczynnikami sedymentacji około 28 S, 18 S i 5 S (10). RNA tych cząstek pojawia się następnie w rybosomach dojrzałych. Cykloheksimid, hamując syntezę białek rybosomowych, blokuje zarazem proces przekształcania cząstek prekursorowych w dojrzałe rybosomy. Można więc sądzić, że cząstki wykryte w kiełkach bawełny i u *Vigna unguiculata* są rzeczywiście prorybosomami. Nie wiadomo jednak, jaka część populacji rybosomów u tych roślin wykształca się z tego typu prekursorów (10, 78, 79).

## V. Uwagi końcowe

Niektóre procesy zachodzące podczas kiełkowania nasion przebiegają w kierunku odwrotnym niż podczas dojrzewania nasienia, kiedy następuje stopniowe odwodnienie układu. Obserwuje się wówczas spadek aktywności metabolicznej ziarna (39, 53, 62). Mamy tu na myśli jedynie końcowe etapy tego procesu, gdyż we wcześniejszych stadiach dojrzewania nasion aktywność wielu szlaków metabolicznych naprzemian zwiększa się i maleje (40). Po napełnieniu dojrzałego nasienia, co może nastąpić już w ciągu kilku godzin, rozpoczynają się różnorodne procesy biochemiczne i z kolei — podziały komórkowe. W ten sposób zostaje zapoczątkowany proces kiełkowania.

Kiełkowanie można uważać za zakończone, gdy kiełek wykształci odpowiednio dużą powierzchnię asymilacyjną, która umożliwi prowadzenie fotosyntezy o natężeniu zapewniającym pełny autotrofizm (29). Podczas kiełkowania funkcje asymilacyjne może niekiedy spełniać także tkanka

liścieniowa (29, 78). Dla pełnego autotrofizmu niezbędna jest odpowiednia liczba dojrzałych chloroplastów, mających wysoko uorganizowaną substrukturę. Procesy doprowadzające do jej wykształcenia u roślin kiełkujących przypominają — w ogólnych zarysach — zjawisko transformacji etioplastów w chloroplasty zachodzące po oświetleniu rośliny hodowanej uprzednio w warunkach zaciemnienia. Podczas rozwoju struktury plastydów u roślin kiełkujących w warunkach fizjologicznego oświetlenia nie obserwuje się jednak tzw. ciała prolamelarnego. Pisaliśmy o tym szerzej w innym artykule (73), nowsze dane na temat biochemii powstawania substruktury plastydów można znaleźć w artykule Kirka (38). Być może, w rozwoju plastydów podczas kiełkowania roślin odgrywa rolę fitochrom, który w suchym nasieniu wykryli Tobin i Briggs (75). Stwierdzono również jego syntezę podczas kiełkowania (56, 75). Zewnętrznym objawem zaawansowanego rozwoju struktury plastydów zielonych u roślin kiełkujących jest zielona barwa ich pędów pochodząca od chlorofilu w komórkach, a pojawiająca się w kilkadziesiąt godzin po rozpoczęciu pęcznienia nasienia (79).

## LITERATURA

1. Abdul-Baki A. A., *Plant Physiol.* **44**, 733 (1969).
2. Anderson J. W., Fowden L., *Plant Physiol.* **44**, 60 (1969).
3. App A. A., *Plant Physiol.* **44**, 1132 (1969).
4. Borek E., Srinivasan P. R., w *Transmethylation and Methionine Biosynthesis*, Red. S. K. Shapiro, F. Schlenk, The University of Chicago Press, Chicago-Londyn 1965, str. 115.
5. Botóșăneanu L., Vasu S., *Rev. Roum. Biochem.* **6**, 263 (1969).
6. Boulter D., *Annual Rev. Plant Physiol.* **21**, 91 (1970).
7. Breidenbach R. W., Castelfranco P., Criddle R. S., *Plant Physiol.* **42**, 1035 (1967).
8. Breidenbach R. W., Castelfranco P., Peterson C., *Plant Physiol.* **41**, 803 (1966).
9. Castelfranco P., Lott J., Sabar N., *Plant Physiol.* **44**, 789 (1969).
10. Chakravorty A. K., *Biochim. Biophys. Acta.* **179**, 67, 83 (1969).
11. Chapman J. A., Rieber M., *Biochem. J.* **105**, 1201 (1967).
12. Chargaff E., w *Nucleic Acids*, Red. E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, New York 1955, tom 1, str. 307.
13. Chen D., Osborne D. J., *Nature* **225**, 336 (1970).
14. Chen D., Sarid S., Katchalski E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **60**, 902 (1968).
15. Chen D., Sarid S., Katchalski E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 1378 (1969).
16. Cherry J. H., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 193 (1963).
17. Cherry J. H., *Plant Physiol.* **38**, 440 (1963).
18. Cherry J. H., *Proceedings of Seed Protein Conference*, January 21—23<sup>rd</sup>, 1963, New Orleans, Louisiana, str. 115, cyt. wg 8.
19. Cherry J. H., Chroboczek H., Carpenter W. J. G., Richmond A., *Plant Physiol.* **40**, 582 (1965).

20. Chroboczek H., Cherry J. H., *Plant Physiol.* **39**, LIV (1964), Abstracts of Annual Meeting of Plant Physiologists, August 24—27th, 1964.
21. Chroboczek H., Cherry J. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 774 (1965).
22. Deltour R., *Planta* **92**, 235 (1970).
23. Dure L., Waters L. C., *Science* **147**, 410 (1965).
24. Ghetie V., w Mechanism of Mutation and Inducing Factors, Proceedings of the Symposium on the Mutational Process, Prague, August 9—11th, 1965, Academia Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, 1965, str. 489.
25. Gientka-Rychter A., Cherry J. H., *Plant Physiol.* **43**, 653 (1968).
26. Gołaszewski T., Rytel M., Kuligowska E., Szarkowski J. W., Streszczenia prac, IX Zjazd PTBioch., Katowice 8—11, IX.1971, str. 70.
27. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **12**, 413 (1966).
28. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., Rytel M., *Post. Biochem.* **15**, 323 (1969).
29. Grzesiuk S. Fizjologia nasion, PWRiL, Warszawa 1967.
30. Henshall J. D., Goodwin T. N., *Phytochemistry* **3**, 677 (1964).
31. Hotta Y., Bassel A., Stern H., *J. Cell Biol.* **27**, 451 (1965).
32. Howell R. W., *Physiol. Plantarum* **14**, 89 (1961).
33. Ingle J., Hageman R. R., *Plant Physiol.* **40**, 48 (1965).
34. Jachymczyk W., Zawierucha R., Sieliwanowicz B., *Acta Biochim. Polon.* **18**, 129 (1971).
35. Jakob K. M., Bovey F., *Exptl. Cell Res.* **54**, 118 (1969).
36. Johnston F. B., Stern H., *Nature* **179**, 160 (1957).
37. Juliano B. O., Varner J. E., *Plant Physiol.* **44**, 886 (1969).
38. Kirk J. T. O., *Annual Rev. Plant Physiol.* **21**, 11 (1970).
39. Kollöffel C., *Planta* **91**, 321 (1970).
40. Konopska L., *Wiad. Botan.* **14**, 281 (1970).
41. Kuligowska E., Szarkowski J. W., Gołaszewski T., dane niepublikowane.
42. Kulka K., Rejowski A., *Acta Soc. Botan. Polon.* **39**, 21 (1970).
43. Legocki A. B., Marcus A., *J. Biol. Chem.* **245**, 2814 (1970).
44. Legocki A. B., Wojciechowska K., *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.* **18**, 7 (1970).
45. Listowski A., O rozwoju roślin, PWRiL, Warszawa 1970.
46. Lityński M. (Red.), *Biologia nasion i nasiennictwa*, PWN, Warszawa 1970.
47. Malinowski E., *Anatomia roślin*, PWN, Warszawa 1968.
48. Marcus A., Feeley J., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 830 (1962).
49. Marcus A., Feeley J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1075 (1964).
50. Marcus A., Feeley J., *J. Biol. Chem.* **240**, 1675 (1965).
51. Marcus A., Feeley J., Volcani T., *Plant Physiol.* **41**, 1167 (1966).
52. Marcus A., Feeley J., Volcani T., *Plant Physiol.* **41**, 1167 (1966).
53. Marré E., *Curr. Top. Dev. Biol.* **2**, 75 (1967).
54. Matsushita S., *Mem. Res. Ins. Food Sci. Kyoto Univ.* **14**, 30 (1958).
55. Mayer A. M., Poljakoff-Mayber A., *The Germination of Seeds*, Pergamon Press, Londyn, 1963.
56. McArthur J. A., Briggs W. R., *Planta* **91**, 146 (1970).
57. Miassod R., Penon P., Teissere M., Ricard J., Cecchini J. P., *Biochim. Biophys. Acta* **224**, 423 (1970).
58. Mitsuda H., Murakami K., Kusano T., Yasumoto K., *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 678 (1969).
59. Nevins D. J., *Plant Physiol.* **46**, 458 (1970).
60. Öpik H., *J. Exptl. Botany* **19**, 64 (1968).

61. Öpik H., w *Plant Cell Organelles*, Red. J. B. Pridham, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 47.
62. Payne P. J., Boulter D., *Planta* **84**, 263 (1969).
63. Rejman E., Buchowicz J., *Phytochemistry* **10**, 2951 (1971).
64. Sasaki S., Brown G. N., *Plant Physiol.* **44**, 1729 (1969).
65. Sasaki S., Brown G. N., *Plant Physiol.* **46** Supplement, 17 (1970).
66. Simpson G. M., Naylor J. M., *Can. J. Botany* **40**, 1659 (1962).
67. Siwecka M. A., Szarkowski J. W., Streszczenia, VIII Zjazd PTBioch., Szczecin, 28—30 maja 1970, str. 77. (Komunikat Nr D 26).
68. Siwecka M. A., Szarkowski J. W., dane niepublikowane.
69. Soedigdo R., Gruber M., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 315 (1960).
70. Spirin A. S., *Curr. Top. Dev. Biol.* **1**, 1 (1966).
71. Stern H., Johnston F. B., Setterfield G., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 57 (1959).
72. Swain R. R., Dekker E. E., *Plant Physiol.* **44**, 319 (1969).
73. Szarkowski J. W., Gołaszewski T., *Post. Biochem.* **13**, 275 (1967).
74. Szmidt P. J., *Anabioza*, PWN, Warszawa 1960, str. 44.
75. Tobin E. M., Briggs W. R., *Plant Physiol.* **44**, 148 (1969).
76. Vold B. S., Sypherd P. S., *Plant Physiol.* **43**, 1221 (1968).
77. Vold B. S., Sypherd P. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **59**, 453 (1968).
78. Waters L. C., Dure L. S., *Science* **149**, 188 (1965).
79. Waters L. C., Dure L. S., *J. Mol. Biol.* **19**, 1 (1966).
80. Weeks D. P., Marcus A., *Biochim. Biophys. Acta* **232**, 671 (1971).
81. Yamada M., Stumpf P. K., *Plant Physiol.* **40**, 653 (1965).
82. Young J. L., Huang R. C., Vanecko S., Marks J. D., Varner J. E., *Plant Physiol.* **35**, 288 (1960).
83. Zagórska L., *Post. Biochem.* **14**, 537 (1968).



ANDRZEJ KAHL \*, MARIA GROSS \*\*, WOJCIECH TURSKI \*\*\*

## Peroksysomy

### Microbodies

Biochemical and morphological characteristics of microbodies, as well as current concepts concerning the origin and role of these organella are reviewed.

W ostatnich latach stwierdzono istnienie nowego rodzaju organelli komórkowych — peroksysomów (ang. *microbodies*). O odrębności nowego typu cząstek subkomórkowych decydują trzy grupy kryteriów:

- 1) morfologiczne (wielkość, kształt, budowa wewnętrzna, związek z innymi organellami),
- 2) biochemiczne i biofizyczne (skład chemiczny, skład enzymatyczny, gęstość pozorna, oporność osmotyczna),
- 3) czynnościowe (swoiste zespoły reakcji biochemicznych zachodzących wewnątrz cząstek i ich stosunek do pozostałych przemian komórkowych).

Trudności w otrzymywaniu peroksysomów sprawiły, że jak dotąd kryteria te udało się zastosować jedynie częściowo.

Pragniemy tu przedstawić dane wskazujące, że peroksysomy nie są artefaktem (morfologicznym lub „myślowym”), lecz tworem rzeczywiście występującym w żywej komórce.

W 1954 r. R h o d i n (93) wprowadził termin „*microbody*” dla określenia widocznych w mikroskopie elektronowym cytoplazmatycznych ziarnistości w komórkach kanalików krętych myszy. Sądził on, że jest to nowy rodzaj organelli nie należący ani do mitochondriów, ani do lizosomów. Terminem „*microbodies*” posłużył się następnie w 1960 r. D e D u v e (34), wysuwając hipotezę o istnieniu nowej klasy cząstek subkomórkowych. Hipoteza ta uwzględniająca wyniki badań N o w i k o f f a (83) oraz d e D u v e' a i wsp. (37) nad homogenatami wątroby szczura opierała się na następujących przesłankach:

- 1) aktywność oksydazy moczanowej przesuwająca się w gradiencie sacharozy na ogół razem z zespołem kwaśnych hydrolaz lizosomalnych, nie

\* Lek. med., mgr biochemii, Katedra Chemii Ogólnej i Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Łódź

\*\* Dr med., Katedra Chemii Ogólnej i Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Łódź

\*\*\* Dr, Katedra Chemii Ogólnej i Fizjologicznej, Akademia Medyczna Łódź

- wzrasta pod wpływem czynników rozbijających błony lizosomalne, co pozwala przypuszczać, że enzym ten znajduje się w innym rodzaju organelli (83);
- 2) po dobraniu odpowiednich warunków rozdziału w gradiencie sacharozy udało się nieznacznie oddzielić aktywność oksydazy moczanowej od aktywności hydrolaz lizosomalnych (17, 18, 36);
  - 3) istnieje grupa enzymów (oksydaza-L- $\alpha$ -hydroksykwasów, oksydaza D-aminokwasów, katalaza i inne (86, 101), które występują zawsze w tej samej frakcji homogenatów, co oksydaza moczanowa;
  - 4) frakcja bogata w poprzednio wymienione enzymy wykazuje w mikroskopie elektronowym wielokrotne zagęszczenie cząstek identycznych z „microbodies” (12, 13).

5 lat później — gdy nieco lepiej poznano biochemię i znaczenie biologiczne nowych organelli — de Duve zrezygnował z pierwotnego, morfologicznego określenia na rzecz nazwy „peroksysomy” wskazującej na ich czynność. Słuszność tej zmiany, co wykazemy w dalszej części artykułu, skłania nas do przyjęcia terminu peroksysomy, aczkolwiek w literaturze obydwaj terminy są dotychczas używane wymiennie.

## I. Występowanie i budowa

Obecność peroksysomów stwierdzono w komórkach tkanek roślinnych i zwierzęcych oraz u pierwotniaków. Wykryto je w wątrobie szczura (50), myszy (107), świnki morskiej, psa (17), kury (8), żaby (111) i człowieka (8), w nerce myszy (95) i szczura (16); w liściach szpinaku (102), w bielmie rącznika (26), u drożdży (9, 47) i u pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* (15). W homogenatach tkanki kostnej (105, 106) oraz w cytoplazmie leukocytów (66), opisano również ziarnistości, jeszcze ostatecznie nie określone, ale morfologicznie i biochemicznie podobne do peroksysomów. Dotychczas nie stwierdzono występowania peroksysomów u bakterii (35).

Najlepiej poznano peroksysomy wątroby szczura. Podczas wirowania różnicowego osiadają one razem z lizosomami we frakcji tzw. „lekkich mitochondriów”\*. Było to i jest nadal największą przeszkodą w otrzymaniu i oczyszczaniu peroksysomów, niezależnie od ich pochodzenia.

Częściowe oddzielenie peroksysomów od lizosomów stało się łatwiejsze dzięki zastosowaniu *Tritonu WR 1339*. Detergent ten podany dootrzewnowo szczurom gromadzi się w lizosomach obniżając ich gęstość równoważną w gradiencie sacharozy (110) nie wpływa natomiast na gęstość peroksysomów (1,215—1,250). W tak uzyskanej frakcji, choć znacznie zanieczyszczonej lizosomami, stwierdza się w mikroskopie elektronowym zagęszczenie cząstek o średnicy 0,5 do 1,0  $\mu$  wypełnionych drobnoziarnistym zrębem

\* Nazwa myląca, historyczna; frakcja ta nie ma nic wspólnego z jakimś szczególnym typem mitochondriów.



i otoczonych pojedynczą błoną. Na przekrojach hepatocytów widać jej połączenia z błonami siateczki gładkiej, wzdłuż których peroksysony skupiają się czasem na kształt gronek. Wewnątrz peroksysonów wątroby szczura znajduje się podłużny twór zwany rdzeniem, krystaloidem, lub nukleoidem. Pod działaniem *Tritonu X 100* błona peroksysonów ulega zniszczeniu i rdzenie uwalniają się. Rdzenie te przedstawiają nadzwyczaj regularne, niemal krystaliczne układy równoległe ułożonych rurek (stąd nazwa ang. *crystalloid core*). Na przekrojach poprzecznych powstają dzięki temu obrazy podobne do plastra miodu (35, 61, 103). Tak regularne układy w żywych komórkach dają się porównać — pod względem precyzji — jedynie do budowy rzęsek, witek plemników i wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Obecność lub brak krystaloidów zależy od organizmu i narządu, z którego pochodzą peroksysony. Krystaloidy występują w peroksysonach wątroby szczura (8), myszy (16, 35), psa (8), żaby (15) i drożdży (9, 47); natomiast peroksysony wątroby kurczęcia (8) i nerki szczura (15, 35) nie zawierają krystaloidów. Dane dotyczące peroksysonów wątroby ludzkiej są skąpe. Większość autorów uważa, że nie zawierają one rdzeni (8, 35). *Biem pica* (22) znalazł wprawdzie typowe rdzenie w peroksysonach wątroby jednego z dwóch pacjentów cierpiących na żółtaczkę zastoinową, cukrzycę i anemię sierpowatą, jednak taka mnogość chorób a i fakt, że u drugiego pacjenta krystaloidów nie znaleziono obniża wartość tego spostrzeżenia. Skąpe też są dane o peroksysonach w komórkach nowotworowych. Organelle te zauważono w wolno rosnących guzach, a nie znaleziono ich w nowotworach szybko rosnących. Nie ma ich w wątrobiakach *Morrisona* 3683 i *Novikoffa*. W tym ostatnim nowotworze stwierdzono całkowity brak oksydazy moczanowej (62, 68, 110). W regenerującej wątrobie i tkankach embrionalnych ilość peroksysonów jest raczej zwiększona (94, 95).

Dane na temat składu chemicznego peroksysonów są nieliczne i bardzo niepewne. Wynika to przede wszystkim stąd, że nie udało się dotychczas otrzymać tych organelli w postaci oczyszczonej. Zdaniem *de Duve'a* i *Baudhuina* (35) peroksysony mają stanowić 0,3% mokrej masy wątroby zawierają 1,4% całkowitego białka komórki wątrobowej, byłyby zatem prawie pięciokrotnie bogatsze w białko, niż cała komórka. Nic nie wiadomo o udziale innych składników chemicznych w budowie tych organelli. Ponieważ wszelkie błoniaste struktury komórkowe mają budowę lipoproteidową — jest mało prawdopodobne, aby błony peroksysonów stanowiły wyjątek.

## II. Własności biochemiczne i skład enzymatyczny

Z danych literaturowych wynika, że białka peroksysonów — to prawie wyłącznie enzymy (35, 70). Wykaz enzymów, których aktywność znaleziono w peroksysonach zawiera tablica 1.

Tablica 1

## Enzymy peroksysomów

Nazwa enzymu	Źródło peroksysomów								
	Wątroba szczura	Nerka szczura	Wątroba myszy	Wątroba żaby	Tetrahymena pyriformis	Acanthoameba	Drożdże piekarskie	Kiełkujące nasiona rącznika	Liście szpinaku pszenicy i tytoniu
Gęstość równoważna frakcji peroksysomów w gradiencie sacharozy	1,23	1,24	1,23	1,278* 1,266	1,24	1,20	—	1,25	1,24
Oksydaza D-aminokwasowa (EC 1. 4. 3. 3)	+	+	+	+	+	—	n	n	—
Oksydaza L- $\alpha$ -hydrokys kwasowa**	+	+	+	+	+	—	n	n	n
Oksydaza L-aminokwasowa (EC 1. 4. 3. 2)	±	+	n	n	n	n	n	n	n
Katalaza (EC 1. 11. 1. 6)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Liaza izocytrynianowa (EC 4. 1. 3. 1)	—	n	—	n	+	n	n	+	n
Syntaza jabłczanowa (EC 4. 1. 3. 2)	—	n	n	n	+	n	n	+	n
Dehydrogenaza jabłczanowa (EC 1. 1. 1. 37)	—	n	n	n	—	n	n	+	n
Syntaza cytrynianowa (EC 4. 1. 3. 7)	—	n	n	n	—	n	n	+	n
Oksydaza glikolanowa	+	+	n	n	+	n	n	+	+
Dehydrogenaza glioksalanowa (EC 1. 2. 1. 17)	n	n	n	n	+	n	n	n	n
Reduktaza glioksalanowa (EC 1. 1. 1. 26)	n	n	n	n	—	n	n	n	+
Oksydaza moczanowa (EC 1. 7. 3. 3, Alantoinaza	+	—	n	+	—	+	—	n	—
(EC 3. 5. 2. 5)	n	n	n	+	n	n	n	n	n
Dehydrogenaza izocytrynianowa (EC 1. 1. 1. 41)	+	n	n	n	+	n	n	—	—
Syntetaza acetylo-CoA (EC 6. 2. 1. 1)	n	n	n	n	+	n	n	n	n

n—enzym nie był badany w tym materiale

\*—wg Vinsentin i Allen (109)

\*\*—patrz tekst

Dla wszystkich peroksysomów, niezależnie od ich pochodzenia, najbardziej charakterystyczna jest grupa enzymów metabolizmu nadtlenu wodoru. Do grupy tej należy między innymi oksydaza moczanowa, nie jest ona jednak głównym enzymem tych organelli, co więcej — może nawet w nich

nie występować. W peroksysomach występuje też grupa enzymów cyklu glioksalowego, oraz niektóre enzymy katabolizmu puryn. Nie rozstrzygnięto natomiast czy cztery enzymy związane z metabolitami cyklu glioksalowego: syntetaza acetylo-CoA, dehydrogenaza (NADP) oraz dehydrogenaza i reduktaza glioksalanowa rzeczywiście znajdują się w omawianych organelach.

### 1. Enzymy metabolizmu nadtlenu wodoru

Grupa ta obejmuje: oksydoreduktazy z  $O_2$  jako akceptorem (oksydazy lub „dehydrogenazy tlenowe”) wytwarzające nadtlenek wodoru oraz enzymy rozkładające go — katalazę i peroksydazę, a wśród nich — peroksydazę glutationową. W peroksysomach występują oksydazy flawoproteidowe (oksydaza L- $\alpha$ -hydroksykwasowa, oksydaza glikolanowa, oksydaza D-aminokwasowa, oksydaza moczanowa i prawdopodobnie oksydaza L-aminokwasowa) oraz katalaza. Wymienione oksydazy mają stosunkowo niskie powinowactwo do tlenu (35), którego stężenie jest praktycznie czynnikiem ograniczającym ich aktywność w żywych komórkach (35).

W wykazie enzymów (41) oksydaza L- $\alpha$ -hydroksykwasowa nie ma swojego numeru. Jest to prawdopodobnie grupa enzymów różniących się swoistością wobec substratu oraz jego izomerów optycznych. Flawoproteidowa oksydaza L- $\alpha$ -hydroksykwasowa z peroksysomów wątroby szczura (35) jest prawdopodobnie identyczna z enzymem Blancharda wykrytym wcześniej w nerce (23,24). Utlenia ona L- $\alpha$ -hydroksykwasy i L-aminokwasy, jest wybiórcza wobec stereoizomerów L, natomiast nie wykazuje swoistości co do długości łańcucha węglowego substratów. W peroksysomach *T. pyriformis* występuje kilka spokrewnionych oksydaz, które utleniają L- $\alpha$ -hydroksykwasy. Dwie z nich poznano lepiej. Są to: mało swoista oksydaza L- $\alpha$ -hydroksykwasowa bardziej aktywna wobec L- $\alpha$ -hydroksymaślanu, niż L-mleczanu (15, 39) oraz niewrażliwa na cyjanki, flawoproteidowa oksydaza L-mleczanowa (EC 1.1.3.2) (40). E i c h e l (39) przypuszcza, że obie te oksydazy mogą być jednym enzymem.

Drugim charakterystycznym dla peroksysomów flawoproteidowym enzymem jest oksydaza glikolanowa, występująca w peroksysomach roślin, zwierząt i pierwotniaków (80). Utlenia ona dobrze glikolan, słabiej L-mleczan i glioksalan, bardzo słabo D-mleczan (35). Biologiczna rola tego enzymu — oprócz wytwarzania nadtlenu wodoru — polega na utlenieniu jednego lub kilku metabolitów fotosyntezy u roślin oraz na uczestniczeniu w pozamitochondrialnym utlenianiu zred. NAD obecnego w hyaloplazmie (35, 80).

Obok oksydaz kwasów 2-hydroksy-monokarboksyłowych występują w peroksysomach dwa enzymy, katalizujące reakcję dezaminacji oksydatywnej, a mianowicie: oksydazy D-aminokwasowa i L-aminokwasowa. Pierwsza zawiera FAD i występuje we wszystkich dotąd poznanych pe-

roksysomach, niezależnie od ich pochodzenia. Enzym z wątroby i nerek ssaków utlenia glicynę do kwasu glioksalowego i amoniaku (19). Aktywność tej oksydazy wobec D-aminokwasów jest biologiczną zagadką. Możliwe, że u ssaków enzym spełnia rolę „odtruwającą”, gdyż znane są uszkodzenia nerek i płuc wywołane podawaniem niektórych D-aminokwasów (np. D-seryny) w diecie (31). Oksydaza L-aminokwasowa z peroksysomów jest słabo poznana. Znalaziono ją w peroksysomach nerki szczura, nie ma pewności czy znajduje się w peroksysomach wątroby (80), a brak danych co do jej obecności w peroksysomach z innych źródeł.

Omówionym wyżej enzymom oraz oksydazie moczanowej przypisuje się główną rolę w wytwarzaniu nadtlenu wodoru w peroksysomach. W skład komórkowej puli tego związku wchodzi poza tym  $H_2O_2$  wytworzony przez oksydazę ksantynową (EC 1.2.3.2) w hyaloplazmie (7, 68, 92, 96, 108, 109) i przez oksydazę monoaminową (EC 1.4.3.4) w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (14, 32, 35, 56, 114).

Nadtlenek wodoru jest rozkładany przez peroksydazę glutationową (73) i katalazę, która, wg różnych autorów, ma stanowić 16% (70) lub 40% (35) białka peroksysomów wątroby szczura. Olbrzymia aktywność tego enzymu zapewnia szybkie rozłożenie nadtlenu wodoru zarówno powstałego w peroksysomach jak i poza nimi.

Nie ma zgodności poglądów w sprawie przepuszczalności błon peroksysomów dla katalazy. Zdaniem de Duve'a i Baudhuina (35) katalaza nie przenika przez nieuszkodzoną błonę peroksysomów, wg innych badaczy (104) zaś uwalnia się ona z peroksysomów nawet w izotonicznym roztworze sacharozy. Brak danych, czy w żywych komórkach enzym ten wydostaje się z peroksysomów do hyaloplazmy. Stwierdzenie nawet niekiedy dość znacznych ilości katalazy we frakcji cytoplazmy podstawowej (35, 97) nie rozstrzyga tych wątpliwości, gdyż peroksysomy ulegają zapewne uszkodzeniu podczas rozdzielania homogenatów.

Cząsteczki nadtlenu wodoru swobodnie dyfundują przez błonę peroksysomów. Nie stanowi to jednak niebezpieczeństwa zatrucia komórki tym metabolitem; co więcej — słaba aktywność tlenowych oksydaz peroksysomowych przy ogromnej aktywności katalazy może sprzyjać przenikaniu do wnętrza peroksysomów tej części  $H_2O_2$ , która powstaje poza tymi organelami. Dodatkowe zabezpieczenie stanowi peroksydaza glutationowa (73), której lokalizacja nie jest jeszcze poznana.

Rozkład nadtlenu wodoru w peroksysomach zachodzi wg dwóch różnych mechanizmów (81):

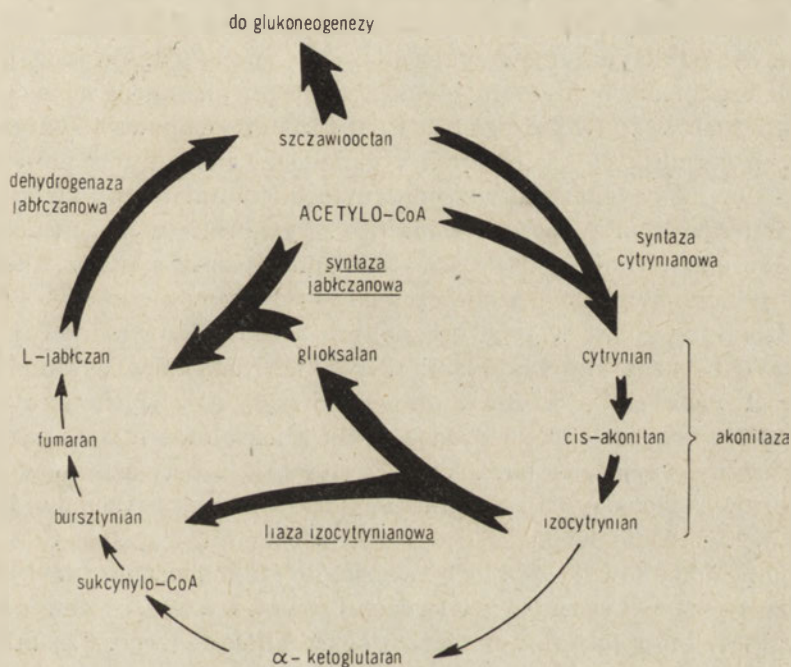
- 1) katalazowego — donorem elektronów dla redukcji  $H_2O_2$  jest druga cząsteczka  $H_2O_2$ ,
- 2) peroksydazowego — donorem elektronów jest inny substrat (np. alkohole, aldehydy, niektóre fenole, azotyny).

Drugi mechanizm jest *in vivo* bardziej prawdopodobny. O tym, że w żywych komórkach katalaza może spełniać czynność peroksydazową, świadczy

zdolność różnych tkanek do utleniania metanolu (5, 6, 29), azotynów (57) i mrówczanu (4, 5, 6, 89), przy jednoczesnym rozkładzie nadtlenu wodoru. Mechanizm katalazowy natomiast stanowi zapewne w komórce jedynie kłopot bezpieczeństwa, gdy zbyt szybko nagromadza się nadtlenek wodoru i nie wystarcza odpowiednich donorów elektronów (35).

W literaturze nie ma dotychczas wzmianek o obecności „prawdziwej” peroksydazy w peroksydach. Jednakże enzym ten stwierdzono w spokrewnionych z nimi ziarnistościach granulocytów (20, 46, 48, 69, 82), nie ma on jednak prawdopodobnie nic wspólnego ze wspomnianą peroksydazą glutationową.

## 2. Enzymy cyklu glioksalowego



Schemat 1. Cykl glioksalowy

Cykl glioksalowy (schemat 1) występuje w mikroorganizmach i w nasionach roślin oleistych — a więc w komórkach, które używają octanu jako głównego źródła węgla i energii. Natomiast w tkankach ssaków, gdzie metabolizm węglowy opiera się w znacznym stopniu na wykorzystaniu heksoz, cykl ten nie przebiega i u organizmów tych nie stwierdzono aktywności liazy izocytrynianowej ani syntazy jabłczanowej (67, 80).

Lokalizację enzymów omawianego cyklu poznano szczegółowo w komórkach *Tetrahymena pyriformis*. Zanim jeszcze wykryto peroksydomy w komórkach tego pierwotniaka, Hogg i Kornberg (60) stwierdzili

w nich cząstki bogate w liazę izocytrynianową oraz syntazę jabłczanową i nazwali je *glyoxylate cycle granules*. Autorzy ci początkowo sądzili, że jest to „szczególny typ cząstek mitochondrialnych”, które zawierają tylko część enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych i są całkowicie pozbawione enzymów łańcucha oddechowego. Gdy później wykryto peroksosomy u *Tetrahymena* (15), okazało się, że są one identyczne z „cząstkami cyklu glioksalowego”. Obecność tego typu organelli stwierdzono również w bielmie kiełkujących nasion roślin oleistych (26), u zielenic (*Chlorellae*) zaś wykryto cząstki bogate w liazę izocytrynianową (54).

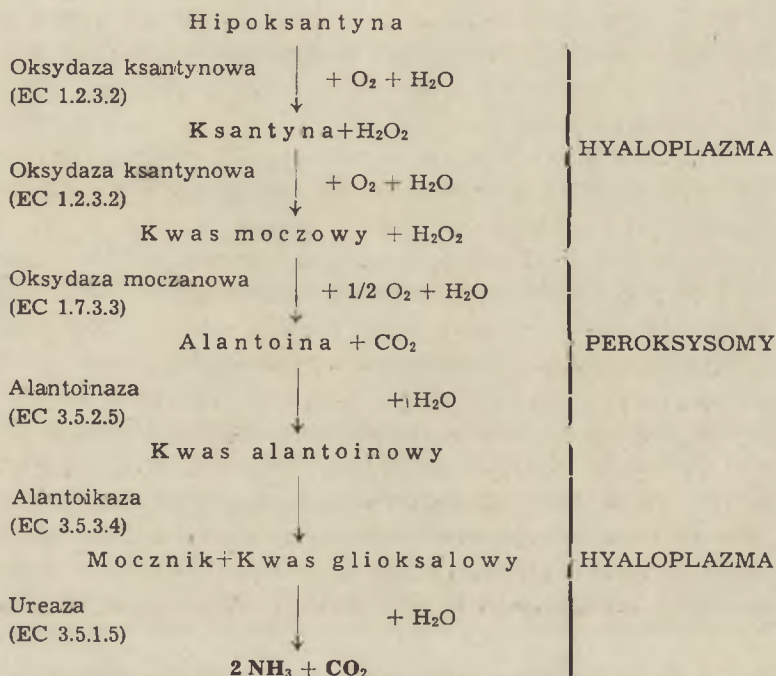
W komórkach *Tetrahymena pyriformis* liaza izocytrynianowa i syntaza jabłczanowa są wytworzone konstytucyjnie, lecz w bardzo małych ilościach. Octan dodany do pożywki jest silnym induktorem, a glukoza — represorem syntezy obu enzymów. Według H o g g a i K o r n b e r g a (60) zdolność do wytwarzania glikogenu z tłuszczów jest uwarunkowana występowaniem wszystkich enzymów cyklu glioksalowego w jednym rodzaju organelli; w organizmach niezdolnych do tego typu glukoneogenezy enzymy cyklu glioksalowego (w szczególności liaza izocytrynianowa i syntaza jabłczanowa) znajdują się w różnych organellach. Pogląd ten potwierdziły również nowsze badania nad wspomnianym pierwotniakiem i kiełkującymi nasionami rącznika. W peroksosomach *T. pyriformis* wykazano obecność hydratazy akonitynowej, liazy izocytrynianowej oraz syntazy i dehydrogenazy jabłczanowej (80), a oprócz tego — syntetazy acylo-CoA (72). Nie stwierdzono natomiast w tych organellach syntazy cytrynianowej, której aktywność (wraz z aktywnościami wszystkich enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych) wykryto w mitochondriach. Aby wytłumaczyć przemiany aktywnego octanu na drodze cyklu glioksalowego u *T. pyriformis* należy zatem przyjąć, że bursztynian dyfunduje z peroksosomów do mitochondriów, a izocytrynian — z mitochondriów do peroksosomów. Umożliwia to wytworzenie większej ilości szczawiooctanu z acetylo-CoA i wykorzystanie dodatkowej ilości tego związku do glukoneogenezy (80). W kiełkujących nasionach rącznika stwierdzono również występowanie peroksosomów, które biorą udział w reakcjach cyklu glioksalowego. Cząstki te nazywano glioksysomami (26). Obecnie wiadomo, że w przeciwieństwie do peroksosomów u *T. pyriformis*, mają one również aktywność syntazy cytrynianowej (80), dzięki czemu mogą przeprowadzać wszystkie reakcje cyklu glioksalowego. Współdziałanie tych organelli z mitochondriami polegałoby więc jedynie na dostarczaniu mitochondriom bursztynianu do dużego cyklu Krebsa i glukoneogenezy.

### 3. Enzymy katalizujące rozpad puryn

Udział peroksosomów w metabolizmie puryn przedstawiono na schemacie 2. Rozpatrując go należy jednak pamiętać, że w rozwoju filogenetycznym niektóre z etapów katabolizmu puryn (na przykład oksydaza mo-

czanowa) zanikają, a dotychczas nie przeprowadzono szerzej zakrojonych badań nad peroksyssomami u niższych kręgowców.

W peroksyssomach wykazano obecność dwóch enzymów tej grupy, a mianowicie oksydazy moczanowej i alantoinazy. Pierwszy enzym występuje u ryb, płazów, większości ssaków (między innymi u gryzoni), natomiast brak go u gadów, ptaków, psów dalmatyńskich i naczelnych (włącznie z człowiekiem) (8) oraz u *T. pyriformis* (80). Oksydaza moczanowa jest bardzo nierównomiernie rozmieszczona w organizmie np. u szczura i myszy znaczne ilości tego enzymu występują w wątrobie, nie ma go natomiast w nerkach (15, 78, 80, 93). Zestawienie wyglądu peroksyssomów z wystę-



**Schemat 2.** Udział peroksyssomów w metabolizmie puryn

powaniem oksydazy moczanowej u różnych grup organizmów i w różnych narządach nasunęło przypuszczenie, że enzym ten znajduje się jedynie w krystaloidach peroksyssomów. Wydaje się to słuszne, gdyż 80-krotnie oczyszczone preparaty oksydazy moczanowej z wątroby szczura składają się z uwolnionych rdzeni peroksyssomów (13). H r u b a n i S w i f t (61), na podstawie identyczności mikroskopowych obrazów krystaloidów wątroby szczura z handlowymi preparatami wieprzowej oksydazy moczanowej, doszli do wniosku, że nukleoid jest zbudowany z krystalicznej postaci tego enzymu. B a u d h u i n i w s p. (13) kwestionują jednak słuszność ich wniosku, gdyż tzw. „krystaliczna” handlowa oksydaza moczanowa prawdopo-

dobnie składa się jedynie z oczyszczonych rdzeni peroksysomów wątroby wieprzowej, a jest 10-krotnie mniej aktywna od znacznie lepiej oczyszczonego, choć jeszcze niekrystalicznego enzymu otrzymanego przez Ma h l e r a i wsp. (75). Pod działaniem *Tritonu X-100* w środowisku alkalicznym (pH 9) można usunąć z krystalloidów znaczną ilość białek, które nie wykazują aktywności oksydazy moczanowej, a pozostałe frakcje białkowe zawierają prawie całą aktywność pierwotną (70). Frakcji tych nie zbadano niestety w mikroskopie elektronowym. Zupełnie nie wiadomo, dlaczego komórka gromadzi oksydazę moczanową w jednym miejscu ani też, w jakim stopniu regularna budowa rdzeni jest spowodowana zagęszczeniem w nich tego enzymu. Cząsteczki oksydazy moczanowej niewątpliwie biorą udział w wytworzeniu pseudokrystalicznej budowy rdzeni, gdyż w centralnej części peroksysomów nerki szczura (narząd pozbawiony tego enzymu) występuje jedynie nieznaczne zagęszczenie, pozbawione regularnej struktury krystaloidu (44).

Obecność alantoinazy w peroksysomach wątroby żaby wykazali V i s e n t i n i A l l e n (109). Ich zdaniem w skład populacji peroksysomów tego narządu wchodzi dwa rodzaje cząstek:

- 1) peroksysomy lżejsze (gęstość równoważna = 1,266), zawierające katalazę, oksydazę D-aminokwasową i alantoinazę;
- 2) peroksysomy cięższe (gęstość równoważna = 1,278), zawierające oksydazę moczanową i oksydazę L- $\alpha$ -hydroksykwasową.

Zwraca uwagę „rozszczerzenie” katalazy i oksydazy moczanowej — dwóch podstawowych markerów omawianych cząstek. Ponieważ aktywność alantoinazy podczas rozdzielania homogenatu wątroby żaby towarzyszy zawsze katalazie, nie można mieć wątpliwości co do jej lokalizacji w peroksysomach. Nie znaleziono dotąd morfologicznych różnic między dwoma rodzajami peroksysomów wątroby płazów, a w literaturze brak danych, o enzymatycznej heterogenności frakcji peroksysomów u innych organizmów.

#### 4. Enzymy związane z metabolitami cyklu glioksalowego

Syntetaza acetylo-CoA, dehydrogenaza izocytrynianowa (NADP), reduktaza glioksalanowa i dehydrogenaza glioksalanowa nie tworzą jednolitego zespołu pod względem rodzaju katalizowanych reakcji, ich lokalizacja w peroksysomach budzi, jak już wspomniano, wątpliwości. Trzy spośród nich (syntetazę acetylo-CoA (72), dehydrogenazę izocytrynianową (NADP) i dehydrogenazę glioksalanową (80) znaleziono w peroksysomach *T. pyriformis*. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej (NADP) wykazano również w peroksysomach wątroby szczura (80), a reduktazy glioksalanowej — w liściach roślin zielonych (74).

Godnym zastanowienia jest fakt, że w peroksysomach znajduje się kilka enzymów metabolizmu kwasu glioksalowego. W peroksysomach liści roślin zielonych wykryto oksydazę glikolanową, której produktem jest glio-



ksalan, oraz dehydrogenazę i reduktazę glioksalanową (80, 102). W peroksysomach *T. pyriformis* stwierdzono dehydrogenazę glioksalanową, której przypisuje się znaczenie w przemianie glioksalanu do mrówczanu i dwutlenku węgla.

Fizykochemiczne własności błon organelli utrudniające zetknięcie enzymu z substratem sprawiają, że pełną aktywność niektórych enzymów na przykład lizosomalnych można oznaczyć *in vitro* dopiero po zastowaniu detergentów, szoków hipoosmotycznych, lub zamrożenia i rozmrożenia. Aktywność enzymów peroksysomowych nie wzrasta jednak po poddaniu peroksysomów szokom hipoosmotycznym (11, 13). Miller (78) tłumaczy to dobrą przepuszczalnością błony peroksysomów dla substratów o rozmiarach cząsteczki sacharozy.

Enzymy peroksysomowe uwalniają się przy kilkakrotnie wyższym stężeniu digitoniny w porównaniu z enzymami lizosomowymi (35). Może to dowodzić mniejszej zawartości lipidów w błonach peroksysomów, lub też tego że lipidy te mogą być mniej dostępne dla detergentów. Uszkodzenie peroksysomów jest wprost proporcjonalne do zastosowanych stężeń detergentów, co wyraża się stopniowym uwalnianiem enzymów do środowiska. Podobne zjawisko obserwuje się podczas zamrażania i rozmrażania peroksysomów (70). Tylko oksydazy moczanowej nie udało się tą drogą ani nawet działaniem tak silnych detergentów, jak *Triton X-100* i *Triton WR 1339* przeprowadzić w postać rozpuszczalną (70).

### III. Wpływ niektórych syntetycznych związków chemicznych i hormonów na populację peroksysomów

W badaniach nad peroksysomami dużą rolę odegrały trzy związki: clofibrat (*p*-chloro-fenoksy-izomaślan etylowy — oznaczany również skrótem CPiB), alliloizopropyloacetamid (AiA) i 3-amino-1,2,4-triazol (AT). Pierwszy jest znanym lekiem przeciwmiażdżycowym, obniżającym stężenie lipidów i cholesterolu w krwi, prawdopodobnie dzięki wypieraniu tyroksyny z jej połączeń z białkami osocza (21, 90) a podawany przewlekle zwierzętom doświadczalnym wywołuje hepatomegalię (21). Punktem uchwytu dwóch pozostałych związków jest katalaza: AiA hamuje syntezę tego enzymu (35, 98), a AT jest jego nieodwracalnym inhibitorem (25, 35, 76, 77).

W 1965 roku Hess, Stäubli i Reiss (58) zauważyli zwiększenie ilości peroksysomów w hepatocytach szczurów po podaniu im CPiB. Związek ten dzięki pracom szkoły Svobody i Azarnoffa stał się głównym narzędziem w badaniu regulacji biogenezy, rozwoju i rozpadu peroksysomów. Preparat ten wywołuje również wzrost liczebności peroksysomów u *T. pyriformis* (25), co sugeruje, że działa on na wspólne dla wszystkich organizmów i bardzo stare ewolucyjne ogniwo w regulowaniu stanu po-

pulacji tych organelli. Ponieważ w wątrobie szczura zmiany peroksysomów pod wpływem CPiB zależą od płci (100), uzyskano dogodny model do badania wpływu niektórych hormonów na te organelle.

Już po kilku dniach podawania CPiB szczurom — samcom stwierdza się dziesięciokrotne zwiększenie ilości peroksysomów we wszystkich komórkach wątrobowych, rozrost błon gładkiej siateczki endoplazmatycznej i powstawanie wzdłuż nich drobnych zagęszczeń przypominających niedojrzałe kryształoidy (99) a także zmiany w mitochondriach i lizosomach (85).

Początkowo „nowe” peroksysomy nie różnią się od peroksysomów w grupie kontrolnej. Pod wpływem dalszego podawania CPiB powstają jednak postacie o prążkowanym zrębie, nie zawierające kryształoidów. Zagęszczenia o podobnym prążkowaniu pojawiają się jednocześnie wzdłuż siateczki gładkiej. Po 30-tu dniach podawania CPiB peroksysomy przybierają dziwaczne, kleksowate kształty, co prawdopodobnie świadczy o ich zwyrodnieniu, aczkolwiek ich ilość pozostaje w dalszym ciągu zwiększona. Zaprzestanie podawania CPiB w tym okresie nasila zmiany degeneracyjne: wewnątrz peroksysomów pojawiają się duże, jasne wodniczki, często wypełnione kłaczkami zrębu; organelle te przerastają, ich średnica przekracza długość mitochondrium i w końcu wyglądają jak pierścienie, gdyż wielkie, centralne wodniczki spychają na obwód wszystkie pozostałe składniki (55). Opisanym zmianom morfologicznym towarzyszą od początku głębokie zmiany biochemiczne:

- 1) aktywności katalazy (91, 99) i dehydrogenazy izocytrynianowej (88, 89) wzrastają proporcjonalnie do zwiększania się liczby peroksysomów (91, 99);
- 2) aktywności oksydaz D-aminokwasowej i L- $\alpha$ -hydroksykwasowej ulegają kilkakrotnemu obniżeniu (10);
- 3) aktywność oksydazy moczanowej zmniejsza się nieznacznie (99).

Przedstawione zmiany morfologiczne i biochemiczne mogą świadczyć o proliferacji ale również mogą wynikać z zahamowania rozpadu tych organelli. Za proliferacją przemawia to, że pod wpływem CPiB zmniejsza się stosunek ilości peroksysomów z kryształoidem do peroksysomów bez kryształoidu i równocześnie nieco zmniejsza się aktywność oksydazy moczanowej (99), ponadto pojawiają się małe peroksysomy a jednocześnie podawanie cykloheximidu — znanego jako inhibitor syntezy białka w szorstkiej siateczce komórek eukariotycznych (51) — całkowicie znosi wpływ CPiB. Aczkolwiek „nowe” peroksysomy różnią się nieco morfologicznie i biochemicznie od „starych”, to jednak — przynajmniej w pierwszym okresie działania CPiB — rozrost peroksysomów może być dobrym modelem ich naturalnego powstawania w komórce.

W związku z wielokierunkowym działaniem CPiB (prolifерacja peroksysomów, zwiększenie aktywności katalazy i inne zmiany enzymatyczne, hipolipidemia, hipocholesterolemia (83), hepatomegalia) pojawia się pytanie, czy i jak wymienione objawy są powiązane ze sobą. Ponieważ katala-

laza stanowi znaczną część białek peroksysomów i przyrost jej aktywności pod wpływem CPiB jest proporcjonalny do zwiększenia ilości tych organeli, możnaby sądzić, że przynajmniej dwa pierwsze z wymienionych objawów są współzależne.

Tymczasem okazało się, że:

- 1) u myszek  $C_{3}^b$  z genetycznym defektem tworzenia katalazy CPiB powoduje proliferację peroksysomów, mimo, że synteza enzymu pozostaje zahamowana (90);
- 2) proliferacja peroksysomów występuje u szczurów podczas równoczesnego podawania im CPiB oraz AiA (91), który hamuje syntezę katalazy;
- 3) podanie AT — (nieodwracalnego inhibitora katalazy) — razem z CPiB nie zakłóca proliferacji peroksysomów (91).

należy zatem sądzić, że proliferacja peroksysomów i synteza katalazy są regulowane niezależnie.

Nie udało się również wykazać współzależności między proliferacją peroksysomów, a hepatomegalią oraz obniżeniem stężenia cholesterolu i lipidów w osoczu pod wpływem CPiB gdyż:

- 1) po odstawieniu preparatu długo jeszcze utrzymuje się wybitne zwiększenie ilości peroksysomów, gdy tymczasem ciężar wątroby powraca do normy (58);
- 2) CPiB wywołuje proliferację peroksysomów również po usunięciu tarzczy, mimo, że zabieg ten znosi hipolipidemiczne działanie tego leku (100);
- 3) Novobiocyna i błękit trypanu (które podobnie jak CPiS wypierają tyroksynę z jej połączeń z białkami osocza i w ten sposób obniżają stężenie lipidów w krwi) nie powodują proliferacji peroksysomów (90);
- 4) u kastrowanych szczurów — samców utrzymuje się hipolipidemiczne działanie CPiB, aczkolwiek zniesiony jest wpływ tego związku na aktywność katalazy i proliferację peroksysomów (100).

Ponieważ w żywej komórce zmiany biochemiczne wyprzedzają zmiany morfologiczne powstaje pytanie jakie odchylenie metaboliczne, wywołane przez CPiB poprzedza proliferację peroksysomów. Wydaje się, że poszukiwaną zmianą jest nasilenie syntezy jakiegoś białka — gdyż cykloheximid znosi morfogenetyczny wpływ CPiB. Białkiem tym nie jest oksydaza L- $\alpha$ -hydroksykwasowa, oksydaza D-aminokwasowa, ani oksydaza moczanowa (gdyż aktywność tych enzymów — bardziej lub mniej — obniża się pod wpływem CPiB), ani też katalaza (gdyż przy zahamowaniu jej syntezy może zachodzić proliferacja peroksysomów). Reddy i wsp. (91) przypuszczają, że może to być dehydrogenaza izocytrynianowa, gdyż stanowi ona prawie 1/3 białka peroksysomów, a jej aktywność wzrasta pod wpływem CPiB. Naszym zdaniem jednak uzasadnienie to jest niewystarczające, gdyż należałoby tak jak w przypadku katalazy — wykazać, że proliferacja peroksysomów pod wpływem CPiB odbywa się przy zahamowaniu syntezy

dehydrogenazy izocytrynianowej. Należy również rozważyć możliwość, że poszukiwanym białkiem nie jest enzym. Niestety nic nie wiadomo o nie-enzymatycznych białkach peroksysomów.

Jak już wspomniano wpływ CPiB na proliferację peroksysomów zależy od płci (100). Wcześniej zaś wykazano (1) różnice w aktywności katalazy między samcami i samicami. Skierowało to uwagę na wpływ hormonów płciowych na regulację tworzenia i rozpadu peroksysomów w tkankach zwierzęcych. Dotychczasowe badania w tym kierunku zmierzały do poznania wpływu kastracji i terapii substytucyjnej (estrogeny, testosteron) na aktywność katalazy i liczebność populacji peroksysomów w wątrobach szczurów i myszy (100). Stwierdzono mianowicie, że aktywność katalazy w wątrobach dojrzałych szczurów samców jest zawsze większa niż u samic i nie zmienia się po usunięciu jajników lub jąder (100). CPiB podwyższa prawie trzykrotnie aktywność katalazy w wątrobach szczurów — samców, a prawie nie wpływa na ten enzym u samic; podawanie CPiB kastrowanym szczurom obu płci powoduje wzrost aktywności katalazy wątrobowej o około 1/3 wartości wyjściowych (100). Pod wpływem CPiB i propionianu testosteronu u kastrowanych samic następuje trzykrotny wzrost aktywności katalazy wątrobowej, natomiast u kastrowanych samców benzoesan estradiolu znosi wpływ CPiB na ten enzym (100). Wszelkie zmiany aktywności katalazy wątrobowej są w przybliżeniu wprost proporcjonalne do ilości peroksysomów (100). Przedstawione różnice płciowe w zachowaniu się katalazy pod wpływem CPiB ujawniają się tylko u szczurów dojrzałych (różnice te nie występują u płodów i osesków) (100, 104).

Z danych tych wynika, że testosteron i estradiol wpływają przeciwnie na spowodowane przez CPiB zmiany zarówno aktywności katalazy, jak i liczebności populacji peroksysomów w wątrobie. Wspomniane hormony zmieniają oddziaływanie tej populacji na CPiB w sposób dla siebie swoisty lecz niezależny od płci zwierzęcia, od którego peroksysomy pochodzą. Wydaje się zatem, że nie ma peroksysomów „męskich” i „żeńskich”, a różnice płciowe w oddziaływaniu na CPiB zależą od rodzaju hormonu. Brak różnic płciowych w zachowaniu się aktywności katalazy u płodów szczurycy, którym w czasie ciąży podawano CPiB, jest prawdopodobnie przejawem niezdolności peroksysomów „płodowych” do oddziaływania na testosteron lub estradiol, względnie nałożeniem wpływu progesteronu (o działaniu tego hormonu na peroksysomy nic niestety dotąd nie wiadomo). Hipoteza fizjologicznej niedojrzałości peroksysomów wydaje się bardziej wiarygodna, niż pogląd, że estradiol i testosteron działają w okresie płodowym w niewystarczających stężeniach, co na pewno jest fałszywe dla estradiolu.

Dane na temat wpływu innych hormonów na peroksysomy są skąpe: usunięcie tarczycy lub nadnerczy u szczurów — samców prawie nie wpływa na aktywność katalazy wątrobowej. CPiB powoduje u takich zwierząt

dwukrotne zwiększenie aktywności omawianego enzymu. Wzrost ten jest nieco mniejszy niż u zwierząt nieoperowanych, którym podawano CPiB (100).

#### IV. Biogeneza i rozpad peroksysonów

Wszelkie hipotezy na temat powstawania peroksysonów muszą być stawiane bardzo ostrożnie, gdyż nasza wiedza o tych organellach jest jeszcze skąpa. Co więcej znajomość innych organelli nie jest jednakowo zaawansowana. Mitochondria na przykład są poznane lepiej niż lizosomy, a te — lepiej niż aparat Golgi'ego. Utrudnia to ustalanie powiązań między peroksysonami i innymi strukturami subkomórkowymi, a więc pośrednio — naszych sądów o biogenezie peroksysonów.

Wszelkie hipotezy o powstawaniu peroksysonów (i organelli w ogóle) opierają się głównie na interpretacji obrazów uzyskanych w mikroskopie elektronowym, ta zaś wymaga przyjmowania dodatkowych założeń, wybieranych zazwyczaj intuicyjnie. Tak na przykład wielokrotnie stwierdzone przylegania peroksysonu do błony gładkiej siateczki endoplazmatycznej skłania do poglądu, że powstał on przez pączkowanie tej błony. Pogląd taki należałoby poprzeć stwierdzeniem podobieństwa składu błon peroksysonów i siateczki gładkiej, co wykracza jednak poza dotychczasowe wiadomości o omawianych strukturach. Niżej zestawimy morfologiczne i biochemiczne dane dotyczące komórki wątrobowej szczura, na których można oprzeć hipotezy o powstawaniu peroksysonów:

- 1) Błona peroksysonów wykazuje ciągłość z błonami gładkiej siateczki endoplazmatycznej (13, 63, 65, 84) a peroksysony skupiają się czasem wzdłuż nich w postaci gronek (99).
- 2) CPiB, wywołujący proliferację peroksysonów, wpływa również na wzrost błon gładkich siateczki endoplazmatycznej, wzdłuż których pojawiają się we wczesnym okresie grudki przypominające krystaloidy, a w okresie zwyrodnienia peroksysonów — grudki o prążkowanej, blaszkowatej budowie. Oba rodzaje tworów pojawiają się później wewnątrz peroksysonów (99). Podczas podawania CPiB powstają wzdłuż błon gładkiej siateczki peroksysony o mniejszych średnicach — prawdopodobnie postaci młode (35, 99). Dotychczas nie stwierdzono połączeń peroksysonów z błonami siateczki szorstkiej (35).
- 3) Badania nad kinetyką biosyntezy katalazy przy użyciu  $^{14}\text{C}$ -leucyny (59) wskazują, że znakowany enzym pojawia się najpierw w mikrosomach, następnie w cytoplazmie podstawowej a najpóźniej, po 30 min. w peroksysonach.
- 4) Cykloheksimid, który silnie hamuje syntezę białka w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej komórek jądrzastych (51), całkowicie znosi jak już wspomniano pobudzający wpływ CPiB na proliferację peroksysonów (91).

Z przedstawionych danych wyłania się następująca hipoteza biogenezy peroksysomów: poszczególne składniki białkowe tych organelli (m.in. katalaza (35), dehydrogenaza izocytrynianowa (91)) są syntetyzowane w błonach szorstkiej siateczki endoplazmatycznej, a następnie są przenoszone do błon gładkich (35, 59) (etap ten odpowiada pojawianiu się znakowanej katalazy w cytoplazmie podstawowej). Tu zostają otoczone fragmentami tych błon, lub wnikają do już wytworzonych uwypukleń. W ten sposób powstaje „młody” peroksysom, połączony za pomocą szypuły z błonami siateczki gładkiej. Połączenie to zazwyczaj ulega przerwaniu podczas otrzymania frakcji peroksysomów. W okresie dojrzewania peroksysomy powiększają się prawdopodobnie bogacąc się o nowe składniki białkowe. W końcu dojrzałe peroksysomy tracą łączność z błonami siateczki gładkiej i spoczywają swobodnie w cytoplazmie podstawowej. Równoczesny brak reticulum endoplazmatycznego i peroksysomów u bakterii przemawia za taką hipotezą. Przedstawiony model biogenezy peroksysomów wyróżniają trzy cechy:

- 1) każdy peroksysom powstaje *de novo* ze składników morfologicznie nieorganizowanych i z fragmentu błony siateczki gładkiej (33, 42, 45, 53, 64, 65, 71, 84),
- 2) w procesie tym poważną rolę odgrywa przenoszenie wzdłuż błon siateczki gładkiej niektórych substancji z miejsca ich syntezy w siateczce szorstkiej (podobny mechanizm przyjmuje Novikoff (38) dla biogenezy lizosomów),
- 3) w zintegrowaniu i dojrzewaniu peroksysomu nie uczestniczy — poza błonami siateczki gładkiej — żadna inna struktura subkomórkowa.

Ostatnia cecha różni zasadniczo wyżej przedstawiony model od hipotez, które zakładają pośrednictwo bądź aparatu Golgi’ego, bądź dwóch innych rodzajów cząstek subkomórkowych (ang. *dense bodies* i *multivesicular bodies*) w powstawaniu peroksysomów. Hipotezy te przyjmują, że białka peroksysomów zsyntetyzowane w błonach siateczki szorstkiej są przenoszone za pośrednictwem pęcherzyków pochodzących ze strefy Golgi’ego do aparatu Golgi’ego (27, 35, 43, 112, 113), do *dense bodies* (35, 38, 112) lub do *multivesicular bodies* (35, 38, 112). Wymienione struktury subkomórkowe przekształcają się następnie bezpośrednio w peroksysomy. Stosunkowo najmniej prawdopodobny wydaje się udział *multivesicular bodies*, gdyż cząstki te są zbliżone do lizosomów (79). Novikoff (cyt. wg 38) wysunął hipotezę, która łączy w jeden morfologiczno-czynnościowy układ siateczkę endoplazmatyczną, aparat Golgi’ego, peroksysomy *dense bodies* i lizosomy (GERL — ang. *Golgi endoplasmic reticulum lysosomes*). Zwrócił on uwagę, na związek błon wszystkich elementów omawianego układu z błonami siateczki gładkiej oraz, że wzdłuż tych błon są przenoszone białkowe składniki tego układu z miejsc ich syntezy do poszczególnych organelli GERL. W badaniach nad kinetyką tworzenia i rozpadu katalazy stwierdzono, że od chwili powstania peroksysomu (a ściślej — zsyntetyzowania cząsteczki ka-

talazy) do chwili jego rozpadu upływa w komórce wątroby szczura średnio 4,4 doby (35). Jest to więc okres dojrzewania i dojrzałości tej organelli, w czasie którego spełnia ona swą czynność biologiczną. Jakie są jej dalsze losy? Rouiller i Bernhard (94) wysuwali hipotezę o przekształcaniu się peroksysonów w mitochondria biorąc za jej podstawę wykrycie tworów przypominających grzebienie mitochondrialne wewnątrz niektórych peroksysonów. Okazało się jednak, że pogląd ten wyniknął z błędnej oceny preparatów frakcji wzbogaconej w peroksysony, która zawierała również mitochondria. Obecnie przyjmuje się, że peroksysony nie są prekursorami mitochondriów podczas chondriokinezy, towarzyszącej podziałom komórkowym.

Brak jest również danych potwierdzających przekształcanie się peroksysonów w mitochondria podczas ontogenezy. U szczurów peroksysony pojawiają się w komórkach wątroby dopiero w 15—16 dniu życia płodowego, a więc gdy już są obecne normalne mitochondria; pod koniec ciąży — ilość peroksysonów w wątrobach płodów znacznie wzrasta, a po urodzeniu — maleje (35, 100, 113). Wahania te jednak nie mają związku ze stanem mitochondriów. W wątrobach płodów mysich peroksysony pojawiają się wprawdzie wcześniej (35, 87), lecz również i u tego zwierzęcia istnieje już wówczas dobrze wykształcona populacja mitochondriów. W różnych częściach kanalika nerkowego u dojrzałych myszy stwierdza się wprawdzie odwrotną zależność między ilością i wielkością peroksysonów, a analogicznymi parametrami mitochondriów (16), nie upoważnia to jednak do wnioskowania o wzajemnych przekształceniach między tymi organellami. Przeciwno takim przekształceniom przemawiają też dane biochemiczne. Trudno przypuścić, aby peroksysonalny typ utleniania, którego produktem jest  $H_2O_2$ , mógł stopniowo (lub skokowo) przechodzić w mitochondrialny, którego produktem jest  $H_2O$ .

Ponieważ peroksysony zawierają duże ilości katalazy, a ponadto mogą mieć genetyczny związek z aparatem Golgi'ego (27, 95, 113), należy rozważyć, czy mogą one uwalniać swą zawartość na zewnątrz komórki, tak jak typowe ziarnistości wydzielnicze. Ta hipoteza znikania peroksysonów wydaje się jednak mało prawdopodobna (84), gdyż w płynach międzykomórkowych i w osoczu nie ma katalazy, a w żółci występuje ona w bardzo niewielkich ilościach (35). Bardziej prawdopodobne wydaje się wewnątrzkomórkowe opróżnianie zawartości peroksysonów (2, 3), nie wiadomo jednak czy jest to związane z ich rozpadem. Bruni i Porter (27) oraz Greenfield i Price (52) przypuszczają, że peroksysony mogą zlewać się z lizosomami, wzbogacając je w nowe enzymy. Pochłanianie peroksysonów (na równi z innymi organellami) przez lizosomy na drodze autofagii (38), jest możliwe, mało prawdopodobne jest jednak aby enzymy peroksysonowe, które mają optimum działania w pH 7 mogły współpracować z kwaśnymi enzymami lizosomalnymi (39). Autofagia peroksysonów jest naturalnym kresem ich życia (38). Przemawia za tym kinetyka rozpa-

du katalazy rozkładanej z szybkością proporcjonalną do aktualnego stężenia enzymu w komórce w drodze przypadkowego procesu, któremu może podlegać każda cząsteczka katalazy bez względu na swój „wiek” (35).

### V. Biologiczna rola peroksyosomów

Przekonanie o niezbędności organelli dla komórki, lub organizmu opiera się zwykle na stwierdzeniu powszechności jej występowania w pewnej grupie, lub nawet u prawie wszystkich organizmów, lub w ich określonych narządach. Peroksysomy stanowiłyby pod tym względem wyjątek, gdyż według najwybitniejszych znawców tych organelli — de Duve'a i Baudhuina (35) oraz Bearda i Novikoffa (16) nie występują one powszechnie. Autorzy nie podają niestety, na jakich danych doświadczalnych oparli to przekonanie a dostępna nam literatura również nie zawiera danych, które by ten pogląd uzasadniały. Według de Duve'a (35) peroksyosomy znajdują się przede wszystkim w komórkach, w których aktywnie przebiega glukoneogeneza zwłaszcza z tłuszczów (26, 80), natomiast węglowodany utleniane są słabo. Wskazuje na to również skład enzymatyczny peroksyosomów, gdyż enzymy cyklu glioksalowego katalizują wstępne etapy glukoneogenezy z tłuszczów. Obecność peroksyosomów w niektórych tylko komórkach może być zatem wynikiem ewolucyjnego przystosowania się tych komórek do określonego typu przemiany węglowodanowej. Dotyczy to jednak tylko roślin, gdyż w peroksyosomach komórek zwierzęcych dotychczas nie stwierdzono obecności enzymów cyklu glioksalowego.

W jaki sposób można pogodzić niepowszechność występowania peroksyosomów z ich kluczową rolą w metabolizmie nadtlenu wodoru? Utlenianie z wytworzeniem  $H_2O_2$  jako końcowego produktu jest bardzo starą filogenetycznie reakcją, która prawdopodobnie pojawiła się jeszcze w epokach prebiotycznych i przetrwała do chwili obecnej u prawie wszystkich komórek. Wraz z pojawieniem się morfologiczno-biochemicznej integracji — co doprowadziło do powstania organelli komórkowych — właśnie peroksyosomy mogły stać się siedliskiem powstawania i rozkładu nadtlenu wodoru. Niektóre reakcje peroksyosomowe reprezentowałyby więc pierwotny typ oddychania, które nie było jeszcze sprzężone z fosforylacją oksydacyjną, a uzyskana energia mogła być przekazana komórce jedynie w postaci ciepła. Istnieje pogląd, że dostarczanie tego rodzaju energii może być również funkcją peroksyosomów i obecnie (35).

Jest wątpliwe, czy wystarczającym powodem do powstania peroksyosomów mogła być ich rola w metabolizmie nadtlenu wodoru. Związek ten bowiem powstaje i jest rozkładany także w reakcjach pozaperoksyosomowych. Znany jest fakt przeżywania organizmów z genetycznym defektem wytwarzania katalazy (mysz (90), człowiek (91)), lub po zahamowaniu jej



syntezy przez AIA (91). Szkoda, że brak dotychczas danych o wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu katalazy w narządach pozbawionych peroksysomów. Nic nie wiadomo również o lokalizacji peroksydazy glutationu.

W tym miejscu musimy powrócić raz jeszcze do zagadnienia stosunku peroksysomów do mitochondriów, tym razem w aspekcie filogenetycznym. Pogląd, że mitochondria z ich doskonalszym mechanizmem oddychania rozwinęły się jako organelle konkurencyjne wobec peroksysomów (być może na drodze endosymbiotycznej), jest bardziej prawdopodobny niż przyjęcie, że peroksysomalny typ oddychania (obejmujący jedynie flawoproteidy) wzbogacał się o NAD-dehydrogenazy z jednej strony, a z drugiej — o koenzymy o coraz wyższych potencjałach oksydo-redukcyjnych wraz z oksydazą cytochromową. Mitochondria, jako lepiej odpowiadające potrzebom komórki, mogły po prostu wyprzeć peroksysomy w czasie filogenezy. Jeżeli przyjąć pogląd o niepowszechności występowania peroksysomów należy uznać, że wypieranie to zachodziło nie wszędzie z jednakowym nasileniem. W pewnych komórkach peroksysomy zanikły (?), a w innych przystosowały się do nowych czynności. Czynności te mogły być następujące:

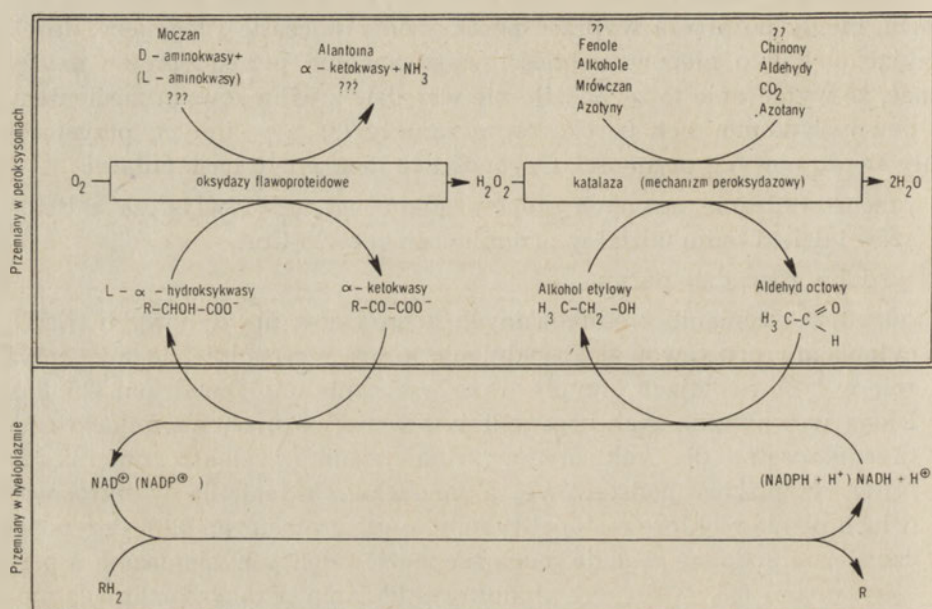
- 1) przeprowadzanie pewnych etapów glikoneogenezy, zwłaszcza z tłuszczów i dzięki temu udział w przemianach acetylo-CoA,
- 2) udział w rozpadzie puryn,
- 3) udział w utlenianiu zredukowanych koenzymów pirydynowych (NAD) cytoplazmy podstawowej. Zagadnienie to jest szczególnie ciekawe, gdyż rolę w tych reakcjach przypisywano wyłącznie mitochondriom (28, 35). Błona wewnętrzna tych organelli jest w normalnych warunkach nieprzepuszczalna dla nukleotydów. Rolę nośników elektronów między NAD cytoplazmy podstawowej a łańcuchem utleniania w mitochondriach pełnią niektóre metabolity m.in.  $\alpha$ -glicerofosforan (28). Przypuszcza się, że podobne reakcje mogą zachodzić między hyaloplazmą a peroksysomami (35, 102), gdyż produkty utleniania peroksysomalnego mogą być zredukowane przez współdziałające z NAD dehydrogenazy hyaloplazmy (35).

W ten sposób peroksysomy mogą brać udział w tlenowych przemianach koenzymów cytoplazmy podstawowej dzięki takim donatorom elektronów jak etanol lub  $\alpha$ -hydroksykwas (schemat 3).

Oksydazy peroksysomowe mają jednak niskie powinowactwo do tlenu, a jego stężenie w komórce zależy z kolei od aktywności oddechowej mitochondriów. Zatem przy nasileniu utleniania mitochondrialnego zmniejsza się aktywność peroksysomów, co powoduje przesunięcie stosunku stężeń  $\text{NAD}^+/\text{zred.NAD}$  w cytoplazmie na korzyść formy zredukowanej. Wówczas w komórce powstają warunki korzystne dla syntezy węglowodanów. Przy niskiej aktywności oddechowej mitochondriów elektrony ze zredukowanych koenzymów hyaloplazmy mogą odpływać do peroksysomów co stwarza warunki korzystne dla tlenowej przemiany węglowodanów. Me-

tabolizm tych związków jest zatem regulowany w komórce poprzez mechanizm homeostacyjny, w którym uczestniczą mitochondria, hyaloplazma i peroksysony (35),

4) W liściach roślin zielonych peroksysony pozostają w bardzo ścisłym kontakcie anatomicznym z chloroplastami; często są wręcz wpuklone do ich wnętrza (49). Fakt ten sugeruje jakąś rolę peroksysonów w fotosyntezie (80, 102). Obecnie wiadomo, że peroksysony utleniają glikolan — jeden z głównych metabolitów przyswajania  $\text{CO}_2$ . Reakcja ta objawiająca się jako kapilarne pochłanianie tlenu podczas fotosyntezy (fotorespiracja) może być sprzężona z utlenianiem zredukowanych NAD — derydgenaz hyaloplazmy (80, 83).



Schemat 3. Udział peroksysonów w tlenowym metabolizmie hyaloplazmy

W peroksysonach oprócz peroksydazowego utleniania mrówczanu może zachodzić również jego powstawanie (utlenianie glicyny przez oksydazę D-aminokwasów, utlenianie glioksalanu). Jednakże udział tych organelli w metabolizmie fragmentów jednowęglowych jest wątpliwy, ponieważ enzymy tej przemiany znaleziono jedynie w mitochondriach i cytoplazmie podstawowej a wg *Baudhuina* (cyt. za 35) peroksysony nie zawierają dehydrogenaz dwu i tetrahydrofolianowych (EC 1.5.1.3) i (EC 1.5.1.4).

5) Niektórym organellom zbliżonym do peroksysonów — a mianowicie bogatym w peroksydazę ziarnistościom leukocytów i innych komórek fagocytykujących — przypisuje się rolę w oporności przeciwwirusowej. Stwierdzono bowiem silne własności wirusobójcze układu:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -jony

chlorowców-peroksydaza (20, 30, 66, 69). Istnieją dane, że taki układ może rzeczywiście występować we wspomnianych ziarnistościach leukocytów. Jeżeli założy się — co naszym zdaniem jest bardzo prawdopodobne, że ziarnistości te mają filogenetyczny lub ontogenetyczny związek z peroksysonami, to należy wnioskować, że niektóre torę ewolucji peroksysonów mogły doprowadzić do przekształcenia się tych organelli w narządy obronne komórki (98).

Przedstawione tu hipotezy dotyczące stopniowego nabywania nowych czynności przez peroksysony mogą tłumaczyć przetrwanie tych cząstek w jednych a zanik ich w innych organach w zależności od potrzeby. Czy rzeczywiście peroksysony są „kopalnymi organellami” (ang. *fossil organelles*) — wykażą badania nad biochemią porównawczą tych cząstek.

U podstaw wszelkich wątpliwości, które dotyczą zagadnienia niezbędności peroksysonów dla organizmów spoczywa jednak zasadnicze pytanie: czy rzeczywiście istnieją poza bakteriami komórki pozbawione peroksysonów?

#### LITERATURA

1. Adams D. H., Burgess E., *Brit. J. Cancer* **11**, 310 (1957).
2. Adams D. H., Burgess E., *Biochem. J.* **71**, 340 (1959).
3. Adams D. H., Burgess E., *Biochem. J.* **77**, 247 (1960).
4. Aebi H., Frei E., Knab R., Siegen-Thaler P., *Helv. Physiol. Acta* **15**, 150 (1957).
5. Aebi H., Kablet H., von Vartburg J. P., *Helv. Physiol. Acta* **15**, 384 (1957).
6. Aebi H., Portwich F., *Helv. Physiol. Acta* **17**, 180 (1959).
7. Aebi H., Quitt J., Hassan A., *Helv. Physiol. Acta* **20**, 148 (1962).
8. Afzelius B. A., *J. Cell. Biol.* **26**, 835 (1965).
9. Avers Ch., Federman M., *J. Cell. Biol.* **37**, 555 (1968).
10. Azarnoff D. L., Svoboda D. J., *J. Lab. Clin. Med.* **68**, 854 (1966).
11. Baudhuin P., Abstr. 6th Intern. Congr. Biochem. N. Y. (1964) p. 296.
12. Baudhuin P., Beaufay H., *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* **71**, 119 (1963).
13. Baudhuin P., Beaufay H., de Duve C., *J. Cell. Biol.* **26**, 219 (1965).
14. Baudhuin P., Beaufay H., Rahman-Li Y., Sellinger O. Z., Wattiaux R., Jacques P., de Duve C., *Biochem. J.* **92**, 179 (1964).
15. Baudhuin P., Müller M., Poole B., de Duve C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 53 (1965).
16. Beard M. E., Novikoff A. B., *J. Cell. Biol.* **42**, 501 (1969).
17. Beaufay H., Bendall D. S., Baudhuin P., de Duve C., *Biochem. J.* **73**, 623 (1959).
18. Beaufay H., Jacques P., Baudhuin P., Sellinger O. Z., Berthet J., *Biochem. J.* **92**, 184 (1964).
19. Beinert H., *J. Biol. Chem.* **225**, 465 (1957).
20. Belding M. E., Klebanoff S. J., *Science* **167**, 194 (1970).
21. Best M., Duncan C., *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 634 (1964).
22. Biempica L., *J. Cell. Biol.* **29**, 383 (1966).

23. Blanchard M., Green D. E., Nocito V., Ratner S., *J. Biol. Chem.* **155**, 421 (1944).
24. Blanchard M., Green D. E., Nocito-Carroll V., Ratner S., *J. Biol. Chem.* **163**, 137 (1946).
25. Blum J., Wexler J., *Mol. Pharmacol.* **4**, 155 (1968).
26. Breidenbach R. W., Beevers H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 462 (1967).
27. Bruni C., Porter K. R., *Am. J. Pathol.* **46**, 691 (1965).
28. Bucher T., Klingenberg M., *Angew. Chem.* **70**, 552 (1958).
29. Chance B., *Acta Chem. Scand.* **1**, 236 (1947).
30. Cline N. J., Lahrer R. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **62**, 756 (1969).
31. Corrigan J. J., *Science* **164**, 142 (1969).
32. Cotzias G. C., Dole V. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **78**, 157 (1951).
33. Dalton A. J., *Cellular Control Mechanisms and Cancer*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1964.
34. de Duve C., *Nature* **187**, 836 (1960).
35. de Duve C., Baudhuin P., *Physiol. Rev.* **46**, 323 (1966).
36. de Duve C., Beaufay H., Jacques P., Rahman-Li Y., Sellinger O. Z., Wattiaux R., de Coninck S., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 186 (1960).
37. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., *Biochem. J.* **60**, 604 (1955).
38. De Duve C., Wattiaux R., *Ann. Rev. Physiol.* **28**, 324 (1966).
39. Eichel H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 183 (1966).
40. Eichel H. J., Goldenberg E. K., Rem L. T., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 172 (1964).
41. Enzymy; Nomenklatura i Klasyfikacja, PWN, Warszawa 1967.
42. Ericsson J. L. E., *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **168**, 1 (1964).
43. Ericsson J. L. E., Gliksmann W., *J. Lab. Invest.* **15**, 750 (1966).
44. Ericsson J. L. E., Trump B. F., *Lab. Invest.* **13**, 1427 (1968).
45. Essner E., *Federation Proc.* **25**, 361 (1966).
46. Fahini H. D., *J. Cell. Biol.* **39**, 42<sup>a</sup> (1968).
47. Federman M., Avers C. J., *J. Bacteriol.* **88**, 1762 (1964).
48. Felberg N. T., Petterman G. J., Schultz J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 213 (1969).
49. Frederick S. E., Newcomb E. H., *Science* **163**, 1353 (1969).
50. Gänssler H., Rouiller C., *Schweiz Z. Allgem. Pathol. Bacteriol.* **19**, 217 (1956).
51. Godechaux W., Adamson S. D., Herbert E., *J. Mol. Biol.* **27**, 57 (1967).
52. Greenfield R. E., Price V. E., *J. Biol. Chem.* **220**, 607 (1956).
53. Hagiwara A., Suzuki T., Takaki F., *Jikeikai Med. J.* **8**, 51 (1961).
54. Harrop L. C., Kornberg H. L., *Proc. Roy. Soc.* **116**, 11 (1966).
55. Hartman H. A., Tousimis A. J., *Experientia* **25**, 1248 (1969).
56. Hawkins J., *Biochem. J.* **50**, 577 (1952).
57. Heppel L. H., Porterfield V. T., *J. Biol. Chem.* **178**, 549 (1949).
58. Hess R., Stäubli W., Reiss W., *Nature* **208**, 856 (1965).
59. Higashi T., Peters T. Jr., *J. Biol. Chem.* **238**, 3952 (1963).
60. Hogg J. F., Kornberg H. L., *Biochem. J.* **86**, 462 (1963).
61. Hruban Z., Swift H., *Science* **146**, 1316 (1964).
62. Hruban Z., Swift H., Recheigl M., *Federation Proc.* **23**, 335 (1964).
63. Hruban Z., Swift H., Recheigl M., *J. Nat. Cancer Inst.* **35**, 459 (1965).

64. Hruban Z., Swift H., Slesero A., *Cancer Res.* **25**, 708 (1965).
65. Hruban Z., Swift H., Wissler R., *J. Ultrastruct. Res.* **8**, 236 (1963).
66. Jacobs A. A., Paul B. B., Strauss R. R., Sbarra A. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **39**, 284 (1970).
67. Karlson P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, IV Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.
68. de Lamirande G., Allard C., Cantero A., *Cancer Res.* **18**, 952 (1958).
69. Lehrer R. J., Hanifin J., Cine M. J., *Nature* **223**, 78 (1969).
70. Leighton F., Poole B., Lazarov P. B., de Duve C., *J. Cell. Biol.* **41**, 521 (1969).
71. Léséquel M., Arakawa W., Steinar J., *J. Lab. Invest.* **14**, 1894 (1965).
72. Levy M. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **39**, 1 (1970).
73. Little C., Olinescu R. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41**, 287 (1970).
74. Mahler H., Cordes E. H., Biological Chemistry, A. Harper Int. Edition, Harper and Row, 1969, str. 395.
75. Mahler H. R., Hübscher G., Baum H., *J. Biol. Chem.* **216**, 625 (1965).
76. Margoliash E., Novogrodsky A., *Biochem. J.* **68**, 468 (1958).
77. Margoliash E., Novogrodsky A., Scheijter A., *Biochem. J.* **74**, 339 (1960).
78. Miller L. A., *Exptl. Cell. Res.* **34**, 283 (1964).
79. Miller F., Palade G. E., *J. Cell. Biol.* **23**, 519 (1964).
80. Müller M., Hogg J. F., de Duve C., *J. Biol. Chem.* **243**, 5385 (1968).
81. Nicholls P., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 286 (1965).
82. Novikoff A. B., Biempica L., Quintana N., Albala A., Dominitz R., *J. Cell. Biol.* **39**, 100 (1968).
83. Novikoff A. B., Podber E., Ryan J., Noe E., *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 27 (1953).
84. Novikoff A. B., Skin W. Y., *J. Microscopie* **3**, 187 (1964).
85. Paget G., *J. Atherosclerosis Res.* **3**, 729 (1963).
86. Paigen K., *J. Biol. Chem.* **206**, 945 (1954).
87. Peters V. B., Kelly G. W., Dembitzer H. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **111**, 87 (1960).
88. Platt D., Cockrill B., *Biochem. Pharmacol.* **15**, 929 (1966).
89. Portwich F., Aebi H., *Helv. Physiol. Acta* **18**, 312 (1960).
90. Reddy J., Bunyaratvey S., Svoboda D., *J. Cell. Biol.* **42**, 587 (1969).
91. Reddy J., Chiga M., Bunyaratvey S., Svoboda D., *J. Cell. Biol.* **44**, 226 (1970).
92. Reid E., O'Neal M. A., Lewin J., *Biochem. J.* **64**, 730 (1956).
93. Rhodin J., Ph. D. Dissertation, Karolinska Institute, Stockholm 1954.
94. Rouiller C., Bernhard W., *J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl.* **2**, 355 (1956).
95. Rouiller C., Jézéquel A. M., w The Liver red. C. Rouiller, Academic Press, Londyn 1963, tom 1, str. 210.
96. Schein A. H., Young E. M., *Federation Proc.* **11**, 282 (1952).
97. Schmid R., Figen J. F., Schwartz S., *J. Biol. Chem.* **217**, 263 (1955).
98. Skarnes R. C., *Nature* **225**, 1072 (1970).
99. Svoboda D. J., Azarnoff D. L., *J. Cell. Biol.* **30**, 442 (1966).
100. Svoboda D. J., Azarnoff D. L., Reddy J., *J. Cell. Biol.* **40**, 734 (1969).
101. Thomson J. F., Klipfel F. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 224 (1957).
102. Tolbert N. E., Oeser A., Kasaki T., Hageman R. H., Yamazaki R. K., *J. Biol. Chem.* **243**, 5179 (1968).
103. Tsukada H., Mochizuki Y., Fujiwara S., *J. Cell. Biol.* **28**, 444 (1966).

104. Tsukada H., Mochizuki Y., Konihi T., *J. Cell. Biol.* **37**, 231 (1968).
105. Vaes G., *Biochem. J.* **97**, 393 (1965).
106. Vaes G., Jacques P., *Biochem. J.* **97**, 389 (1965).
107. Verity M. A., Reith A., Ho Y. K., Brown W., *Federation Proc.* **24**, 3042 (1965).
108. Villela G. G., Mitidieri E., Affonso O. R., *Nature* **175**, 1087 (1957).
109. Visentin L. P., Allen J. M., *Science* **163**, 1463 (1969).
110. Wattiaux R., Wattiaux S. C., de Connick L., Dijek J. M., Morris P. H., *Eur. J. Cancer* **6**, 261 (1970).
111. Wattiaux R., Wibon N., Baudhuin P., Lysosomes, red. A. V. S. de Renneck; M. P. Cameron, J. and A. Churchill Ltd. Londyn 1963, str. 176.
112. Wood R., *J. Cell. Biol.* **23**, 1047 (1964).
113. Wood R. L., *Anat. Record* **151**, 507 (1965).
114. Zile M., Lardy H. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 411 (1959).

## Recenzje

### **E. Ginter: The role of ascorbic acid in cholesterol metabolism Vydavateľstvo Slovenskej Akadémie Vied, Bratislava, 1970, stron 96**

Opracowanie wydano jako zeszyt serii *Biologické Práce* napisane w języku angielskim obejmuje poza tekstem 20 tabel, 27 rycin i 316 pozycji piśmiennictwa. Autor omawia udział kwasu askorbinowego w metabolizmie cholesterolu w powiązaniu ze zmianami miażdżycowymi.

Miażdżyca jest jedną z najgroźniejszych chorób świata cywilizowanego. W roku 1966 w USA 50% zgonów zostało spowodowane miażdżycopochodnymi chorobami serca, w Polsce w tym samym czasie wskaźnik ten wynosił ok. 30%. Miażdżyca (*atherosclerosis*) jest to zwyrodnieniowe schorzenie tętnic, polegające na odkładaniu się w błonie wewnętrznej cholesterolu i lipidów z ogniskowym rozrostem tkanki łącznej oraz powstawaniem ognisk martwicy i złogów wapnia. W następstwie tych zmian dochodzi do zgrubienia błony wewnętrznej i zwężenia światła tętnicy. Miażdżyca jest jednostką chorobową o wielu czynnikach etiologicznych i złożonej patogenezie, a czynniki żywieniowe uznane są za jedne z istotnych w jej powstawaniu. Szczególnie podkreśla się nadmierne spożycie kalorii w stosunku do ich wydatków, za małą ilość niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych i zbyt wysoki stosunek kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych, za duży udział w pożywieniu węglowodanów, głównie cukrów prostych, niedobory potasu i magnezu, niedobory witamin z grupy B, witaminy E i witaminy C jako czynnika układu redukcyjno-utleniającego niezbędnego w metabolizmie naczyń.

Rozdział 1-szy opracowania Gintera obejmuje przegląd piśmiennictwa dotyczącego udziału kwasu askorbinowego w różnych funkcjach metabolicznych, a zwłaszcza zaburzeń metabolizmu lipidów w ostrym niedoborze witaminy C. W przeglądzie piśmiennictwa autor omawia również zagadnienie współzależności między kwasem askorbinowym a powstawaniem miażdżycy. W rozdziale 2-gim Ginter przeprowadza krytykę dotychczasowych prac innych autorów w tej dziedzinie. Krytykuje sam model wywoływania ostrych niedoborów witaminy C, a następnie stosowane metody badań eksperymentalnych i klinicznych nad wpływem witaminy C na miażdżycę. Zwraca uwagę na kontrowersyjne wyniki badań, które są spowodowane różnymi warunkami przeprowadzanych doświadczeń. Metabolizm lipidów przebiega zupełnie inaczej przy ostrym niedoborze witaminy C niż przy przewlekłej hypowitaminozie C. Obecnie, u ludzi rzadko spotyka się ostre niedobory witaminy C (gnilec), a znacznie częściej stany długotrwałej hypowitaminozy. W rozdziale 3-cim autor proponuje nowy model badań, który polega na wywoływaniu u świnek morskich chronicznego niedoboru witaminy C wraz z miażdżycą i hypercholesterolemią. Badania nad miażdżycą prowadzono dotychczas na królikach, które w przeciwieństwie do człowieka i świnki morskiej, mogą same syntetyzować kwas askorbinowy i w ten sposób są niezależne od pobrania witaminy C w pożywieniu. Dalsze rozdziały opracowania stanowią przegląd dorobku autora i jego współpracowników z Zakładu Biochemii Instytutu Żywności w Bratysławie. Uzyskane wyniki i zdobyte doświadczenie w pracach na zwierzętach autor wykorzystuje następnie w badaniach epidemiologicznych

nad oceną stanu odżywienia ludzi w Słowacji. Ginter podkreśla rolę żywienia w etiologii miażdżycy i udowadnia, że długotrwała niedobór witaminy C zwiększa ryzyko powstawania uszkodzeń naczyń. Ponadto omawia sposób w jaki kwas askorbinowy wpływa na metabolizm cholesterolu.

Ginter w swoich doświadczeniach przeprowadzonych na świnkach morskich wykazał statystycznie istotną bezpośrednią korelację między poziomem cholesterolu w tkankach a zawartością w nich witaminy C. Niskie zawartości witaminy C są związane z wysokimi poziomami cholesterolu, a w przypadku wysokiej zawartości witaminy C, poziomy cholesterolu są niskie. Zmiany patomorfologiczne w układzie naczyniowym, a zwłaszcza w tętnicach wieńcowych są wyraźniejsze u zwierząt z hypowitaminozą C, karmionych dietą wywołującą miażdżycę niż u świnek morskich z wysokim poziomem tej witaminy w tkankach. Badania nad wpływem niedoboru witaminy C na metabolizm cholesterolu, przeprowadzone za pomocą techniki izotopowej wykazały, że zwiększenie nagromadzania cholesterolu w tkankach świnek morskich z hypowitaminozą C nie było spowodowane ani przez zwiększenie syntezy endogenego cholesterolu z octanu, ani przez zwiększenie wchłaniania cholesterolu egzogenego. Natomiast niedobór witaminy C interferuje z metabolizmem cholesterolu na poziomie przemiany cholesterolu do kwasów żółciowych. Mechanizm działania kwasu askorbinowego w tym procesie na poziomie molekularnym jest jeszcze nieznanym. Autor sądzi, że funkcja kwasu askorbinowego w katabolizmie cholesterolu polega na działaniu katalitycznym witaminy C na hydroksylację pierścienia cholesterolu. Ginter opiera swoją hipotezę na podstawie znanych faktów, że kwas askorbinowy stanowiąc część układu enzymatycznego katalizującego hydroksylację wielu związków cyklicznych, uczestniczy w hydroksylacji węgla C<sub>7</sub> i C<sub>12</sub> cholesterolu, reakcji zapoczątkowującej przemianę cholesterolu do kwasów żółciowych.

Książka Gintera świadczy o dużej znajomości zagadnienia. Autor, który wiele lat pracował w tej dziedzinie, opisuje szczegółowo metody badań, zwłaszcza przeprowadzanych na zwierzętach i dlatego z metodycznego punktu widzenia opracowanie to przedstawia również dużą wartość. Książka zawiera cenny materiał dla specjalistów, zwłaszcza lekarzy i biologów zajmujących się miażdżycą oraz metabolizmem lipidów i kwasu askorbinowego.

*B. Dietl*

### **Biopolimery — Fizyko-chemiczne metody oczyszczania, rozdzielania i badania**

Praca zbiorowa pod redakcją E. Samsonowa. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1971, str. 356

Tłumaczenie: E. Czuryło i Z. Kazimierzuk

Autorami książki są pracownicy dwu instytutów w ZSRR, Instytutu Związków Wielkocząsteczkowych i Instytutu Biologii Molekularnej.

W 11 rozdziałach autorzy podali podstawowe wiadomości teoretyczne z dziedziny elektroforezy i chromatografii oraz praktyczne zastosowania tych metod do oczyszczania, rozdzielania, identyfikowania i oznaczeń ilościowych białek, polipeptydów i kwasów nukleinowych.

Czytelnik otrzymuje w sześciu rozdziałach krótkie streszczenia podstawowych wiadomości z: miareczkowania potencjometrycznego, elektroforezy, zasad chromatografii, dwukierunkowej chromatografii na bibule, chromatografii gazowej i gazowo-cieczowej, i chromatografii cienkowarstwowej. W pozostałych rozdziałach miesz-



czą się działy specjalne jak chromatografia peptydów na celulozowych wymiennicach, sorpcja i chromatografia białek na jonitach celulozowych, sorpcja i chromatografia białek na żywicach jonowymiennych oraz na sefadeksach, chromatografia białek na jonitach celulozowych, zastosowanie chromatografii do badań kwasów nukleinowych i automatyczna analiza chromatograficzna aminokwasów.

W każdym rozdziale po krótkim wstępie teoretycznym znajdują się przykłady i opisy zastosowań praktycznych do badań biopolimerów. Piśmiennictwo zebrano oddzielnie dla każdego rozdziału. Tabele, wykresy, rysunki aparatury, wzory chemiczne i matematyczne ilustrują tekst. Niewątpliwie wydanie tłumaczenia tej książki przez PWN wyrównuje nasze niedobory w tej dziedzinie. Nasz zestaw oryginalnych wydawnictw z dziedziny chromatografii, elektroforezy jest jak dotychczas bardzo skromny. Oprócz kilku monografii-podręczników, które ukazały się w ramach wydawnictw PWN, PIWRiL i PZWL, materiały informacyjne o metodach oczyszczania, rozdzielania białek, polipeptydów, kwasów nukleinowych ukazują się sporadycznie w *Postęпах Biochemii*. Zebranie informacji o metodyce badań biopolimerów w całości w jednej monografii jest korzystne dla czytelnika, i tym też kierowała się Redakcja PWN podejmując decyzję wydania tłumaczenia. Między innymi cenny jest dla naszego czytelnika rozdział o automatycznej analizie chromatograficznej aminokwasów w analizatorach kolumnowych, których już jest coraz więcej w naszych laboratoriach. Racjonalna obsługa tej aparatury, jej konserwacja, umiejętność wykorzystania, zabezpieczenia przed uszkodzeniami, wprowadzanie wariantów dla rzadkich aminokwasów wymaga oprócz jednorazowego przeszkolenia i krótkich informacji firmowych, obszerniejszych objaśnień na przykładach.

Niewątpliwie podejmując decyzję wydania tłumaczenia tego rodzaju wydawnictwa trzeba było zrezygnować z jego aktualności. Książka była jednak wydana w Moskwie w 1965 roku a jej tłumaczenie ukazało się w Warszawie w 1971 roku. Czytelnik nasz uzyskuje więc materiał informacyjny z co najmniej 6-letnim opóźnieniem. Lata 1965—1971 przyniosły w dziedzinie analityki biopolimerów wiele wariantów w metodach, uproszczeń, udoskonalień, nowych modeli aparatury i modyfikacji. Na 400 pozycji bibliograficznych zebranych w danej monografii tylko 20 odnosi się do lat 1964—65, reszta zaś pochodzi z okresu wcześniejszego. W bibliografii książki nie ma ani jednej pozycji autorów polskich. Nasuwa się pytanie, czy przy podejmowaniu tłumaczeń z dziedziny metodyki badań z tych dziedzin, w których postęp jest szczególnie dynamiczny nie należałoby dodać addendum polskiego uzupełniającego bibliografię, z okresu dzielącego wydanie oryginalne i tłumaczenie.

Niezależnie od tych uwag podkreślić należy użyteczność tej książki dla naszego czytelnika. Jak zwykle w wydaniach PWN ocenić należy pozytywnie staranne opracowanie, wygodny dla czytelnika układ, wyraźne rysunki, poprawne język i terminologię.

J. Opieńska-Blauth

### **Nagrody przyznane w 1971 roku**

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

#### **Nagroda Imienia Bolesława Skarżyńskiego**

została przyznana dr Grażynie Palamarczyk i dr Joannie Rytka za artykuł pt. „Metody badania centrum aktywnego enzymów” opublikowany w *Postęпах Biochemii*, **16**, (1970)

#### **Nagroda Imienia Jakuba Parnasa**

została przyznana dr. S. Szali, dr W. Kilar-skiemu i prof. dr M. Chorążemu za pracę pt. „The Fast Renaturing Fraction of *Calf Thymus* DNA” opublikowaną w *Acta Biochimica Polonica* **17**, (1970)

## Sprawozdania

### Sprawozdanie z Konferencji roboczej na temat „Fracje subkomórkowe a składniki ustrastrukturalne komórki”

Łódź, 7—8 maja 1971 r.

Myśl zorganizowania konferencji roboczej, która pozwoliłaby skonfrontować stanowisko morfologów i biochemików wobec otrzymywanych frakcji subkomórkowych, a szczególnie ich relacji do realnie istniejących w komórce struktur, powstała podczas kularowych dyskusji na VIII Zjeździe P.T. Bioch. w Szczecinie.

Konferencję zorganizował Oddział Łódzki P.T. Bioch., przy współudziale Oddziału Łódzkiego P.T.H.C. i Komisji Ultrastruktury Komórek i Tkanek VI Wydziału

Spotkanie odbyło się w Łodzi w dniach 7 i 8 maja 1971 roku w nowym gmachu PAN Wydziału Farmacji AM. Patronat nad Konferencją objął i powitał zebranych Rektor Akademii Medycznej w Łodzi prof. T. Pawlikowski.

O zainteresowaniu tematyką obrad świadczy udział ponad 150 osób, w tym blisko 100 spoza Łodzi, reprezentujących niemal wszystkie placówki biochemiczne i morfologiczne z całego kraju.

Zasadniczo tematykę Konferencji ograniczono do struktury i frakcjonowania komórek zwierzęcych.

Pierwszy dzień obrad poświęcony był tematyce morfologicznej. Obradom tym przewodniczyli prof. J. Groniowski (Warszawa) i prof. A. Vorbrodt (Gliwice). Wygłoszone w tym dniu referaty doc. J. Michejdy (Poznań) i doc. W. Rossowskiego (Warszawa) stanowiły pewien pomost między tematyką morfologiczną a tematyką biochemiczną. Tej ostatniej poświęcono w całości drugi dzień obrad. Obradom drugiego dnia przewodniczyli prof. B. Filipowicz (Łódź) i prof. M. Żydowo (Gdańsk).

W pierwszym dniu po zagajeniu prof. Filipowicza — doc. W. Fortak (Łódź) zaapelował do zebranych o jednoznaczne definiowanie używanych nazw i pojęć i przedstawił uprzednio przygotowaną przez organizatorów, zapewne niepełną, listę najczęstszych wieloznacznych terminów.

Zasadniczy referat wygłosił prof. A. Vorbrodt na temat: „Ultrastruktura organelli komórkowych i ich znaczniki (markery) wykrywane metodami cytochemicznymi”. Uzupełnieniem były koreferaty doc. T. Zawrockiej-Wrzołkowej (Gdańsk) o ultrastrukturze mitochondriów i doc. W. Rossowskiego o strukturze, składzie chemicznym i enzymatycznym różnego rodzaju błon. Po referatach nastąpiła dyskusja programowa, to znaczy uzgodnione wcześniej krótkie wystąpienia, które miały na celu podkreślenie ważnych, a często kontrowersyjnych, problemów i zasadniczo nie nosiły charakteru zwykłych doniesień z prac własnych.

W drugim dniu ta forma dyskusji dominowała, gdyż program nie przewidywał dłuższych referatów. Punktem wyjścia dyskusji były referaty doc. J. Michejdy (z pierwszego dnia) na temat „Fracjonowanie komórki do badań biochemicznych” oraz szersze wprowadzenie prof. M. Żydowo: „Problemy metodyczne biochemicznych badań frakcji subkomórkowych”. Dyskusję w trzech kolejnych grupach tematycznych homogenizacji, frakcjonowania i metod charakterystyki otrzymanych frakcji zagaili

prof. T. Borkowski (Lublin), prof. L. Wojtczak (Warszawa) i doc. A. Koj (Kraków). Na zakończenie dr W. Turski (Łódź) przedstawił próbę matematycznej interpretacji oznaczeń ilościowych, definiując współczynniki określające wydajność otrzymania struktur, czystość frakcji oraz współczynnik rozdziału dwóch struktur od siebie.

Krótkiego podsumowania obrad dokonał prof. Żydowo.

Konferencja przyniosła szereg wyczerpujących przeglądów literaturowych, uwzględniających także prace własne. Zaliczyć do nich należy referaty prof. A. Vorbrodta oraz doc. W. Rossowskiego, prof. M. Olszewskiej (Łódź) i doc. J. Michejdy, który ponadto zapoznał zebranych z głównymi wątkami dyskusji na kursie mikroskopii elektronowej w Evice na Sycylii.

Uwagę zwróciły szczególnie zagadnienia enzymatycznych markerów jądra komórkowego (Vorbrodt), jakościowego składu lipidów jako markera dla różnego rodzaju błon (Rossowski) oraz możliwości zastosowania elektroforezy swobodnej i wirowania głowicy krążkowo-dyskowej do preparatywnego uzyskiwania frakcji subkomórkowych (Michejda).

Przedstawiono szereg zagadnień nowoczesnych co niewątpliwie może wywrzeć znaczny wpływ inspirujący. Należy do nich zastosowanie badania aktywności oksydazy egzogennej cytochromu c do ilościowego określania dezintegracji mitochondriów (Wojtczak), zastosowanie bardzo szybkiego (około 1 sekundy) utrwalania mitochondriów w bardzo niskich temperaturach, co pozwala uchwycić ich struktury w określonym stanie czynnościowym, który można monitorować i kontrolować (Michejda). Bardzo obiecujące wydaje się też tworzenie matematycznych układów symulacyjnych, które pomimo olbrzymich trudności w ich konstrukcji, jak i interpretacji otrzymanych wyników, być może dadzą w przyszłości lepsze wyniki niż żmudne dążenia do idealnego oczyszczania struktur subkomórkowych (Żydowo).

Poruszano też zagadnienia, które, obok aspektów metodycznych, mają duże znaczenie jako elementy ważnych biologicznych układów regulacyjnych. Wspomnieć tu można naturalne inhibitory enzymów lizosomalnych, które biorą udział w pewnej niwelacji skutków urazu (Koj).

Interesującym studium porównania ultrastruktury mitochondriów z ich stanem czynnościowym był referat doc. T. Wrzołkowej, który dał równocześnie dobrą ilustrację „fleksyjności” struktury mitochondrialnej.

Przy badaniu lokalizacji enzymów metodą mikroskopii elektronowej, wielkie trudności powoduje przemieszczenie się produktów reakcji enzymatycznych. Zagadnienie to, na przykładzie artefaktów w badaniach nad lokalizacją enzymów o typie fosfataz, krytycznie ujął doc. W. Bartoszewicz (Warszawa).

Jednym z najciekawszych rozwiązań zaproponowanych przez ośrodki morfologiczne było zastosowanie testu hamowania migracji makrofagów, jako znacznika struktur subkomórkowych (Ostrowski i wsp., Warszawa). Zastosowanie tego testu wymaga dalszych badań nad budową antygenową struktur subkomórkowych i nakładaniem się na nią antygenowości narządowej.

Szczupłość czasu nie pozwoliła na wyczerpujące omówienie metod wyodrębniania i charakteryzowania, a także indywidualnych cech analogicznych elementów ultrastrukturalnych pochodzących z różnych tkanek. Pewne sprawy poruszano jednak w obradach Konferencji. Okazuje się np., że dla mitochondriów łożyska zamiast testów klasycznych lepszym wskaźnikiem czystości i integralności jest hydroksylacja sterydów (Aleksandrowicz — Gdańsk), a dla siateczki endoplazmatycznej mięśni — zależna od ATP akumulacja jonów  $Ca^{2+}$  (Sarżała-Drabikowska — Warszawa).

Wbrew powszechnym obawom, Konferencja nie całkowicie została zmajoryzowana przez badaczy mitochondriów. Poruszono bowiem problemy wyodrębniania i charakteryzowania jądra i jego funkcjonalnych subfrakcji (Malec — Warszawa, Toczko — Warszawa), lizosomów (Koj, Chudzik — Kraków) oraz rybosomów i ich pod-

jednostek (Gašior — Lublin). Nie pominięto też kilku, często niedocenianych zagadnień jak wahania dobowe w aktywności enzymów (Surowiak — Kraków), bakteriologiczne zanieczyszczenie frakcji (Kłyszajko — Łódź, Michejda) oraz udział izoenzymów w aktywności markerów (Więckowski — Szczecin).

Zaprezentowano też próby nowych na gruncie polskich rozwiązań metodycznych, jak otrzymywanie mikrosomów przez sączenie na żelu sefrazowym (Staroń — Warszawa), heparynowa metoda izolowania ziarnistości leukocytów (Koj, Chudzik — Kraków), czy zastosowanie do charakteryzowania błon elektronowego rezonansu paramagnetycznego (Koter — Łódź).

Szereg wystąpień miało charakter przekrojowy, dotyczący wielu frakcji i kompleksowych oznaczeń enzymatycznych. Dr J. Gregorczyk (Szczecin) przedstawił wyniki badań nad aktywacją szeregu enzymów i próbował ustalić warunki maksymalnego ujawnienia ich aktywności przy minimalnej destrukcji enzymów, wiążąc te problemy z zagadnieniem bilansu. Dyskutowany problem całkowitej aktywacji markerów, jak i ich bilansu, był podstawą przedstawionej przez dr W. Turskiego próby jednolitej matematycznej interpretacji danych doświadczalnych. Zaproponowana metoda pozwala przy przyjęciu pewnych założeń, porównywać dane różnych autorów i to zarówno dotyczące czystości frakcji jak i lokalizacji enzymów i substancji w komórce.

Przebieg obrad wykazał znaczne przenikanie się wzajemnie prezentowanej tematyki morfologicznej z biochemiczną co należy ocenić pozytywnie. Przeważały prace typu morfologicznego nad frakcjami subkomórkowymi, brakowało natomiast badań całych komórek, weryfikujących np. wiarygodność pewnych enzymów-markerów i prac lokalizujących te enzymy *in situ* techniką mikroskopii elektronowej. Zawinił tu być może temat Konferencji, trudności, o których mówił doc. Bartoszewicz a także wpływ badań zagranicznych sugestywnie narzucających poglądy na wiarygodność markerów. Konferencja wykazała konieczność korelacji badań morfologicznych i biochemicznych oraz potrzebę kompleksowych badań „wielomarkerowych” uwzględniających także testy funkcjonalności i integralności badanych frakcji. Obrady nie spełniły może w pełni pokładanej w nich nadziei, głównie z uwagi na duży zakres i zbyt małą ilość czasu do dyskusji, były jednak krokiem naprzód na wspólnej drodze biochemików i morfologów, a proponowane przez prof. Filipowicza poświęcenie tematu frakcjonowania subkomórkowego jednej z sekcji na Zjeździe P.T. Bioch. w 1972 r. zapewni ciągłość tej ważnej tematyce.

W. Turski

W konkursie dla młodych biochemików za prace przedstawiona na IX Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Katowicach w 1971 roku przyznane zostały na wniosek Komisji następujące wyróżnienia:

- J. Wojcierowski* — Metabolizm kwasów nukleinowych stymulowanych limfocytów
- J. Łomako* — Preparacja i własności krystalicznych inhibitorów trypsyny z serc i mięśni szkieletowych wołu; Białka śledziony bydłowej i ich aktywność antyproteolityczna
- B. Sieliwanowicz* — Badania nad oddziaływaniem histonów na polisomy
- R. Zawierucha* — Oczyszczanie i własności cytoplazmatycznej dehydrogenazy 3-hydroksymaślanowej z kory nerki owcy
- M. Kołaczkowska* — Interferon z mózgu myszy
- J. Osada* — Własności immunochemiczne sukcyntylowanej haptoglobiny
- E. Próchniewicz* — Zależność między polimeryzacją G-aktyny a wiązaniem dwuwartościowych kationów
- W. Wnuk* — Oddziaływanie niejonowych polimerów z fosfolipidowymi błonami
- J. Szopa* — Interakcja histonów z DNA

## SPIS TREŚCI

M. Tichy — Badanie konfiguracji przestrzennej biopolimerów za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich . . . . .	3
B. Lubas — Charakterystyka uwodnienia makromolekuł DNA i metody jego wyznaczania . . . . .	31
U. Kocemba-Śliwowska — Nierozpuszczalne w wodzie pochodne białek biologicznie czynnych . . . . .	59
J. Chudzik, A. Koj — Zastosowanie metody swoistej sorpcji (ang. <i>affinity chromatography</i> ) do wyosabniania enzymów i inhibitorów enzymatycznych . . . . .	73
A. Wilimowska-Pelc — Trzuskowe inhibitory enzymów proteolitycznych . . . . .	85
E. Machowicz, M. Sarnecka-Keller — Papaina . . . . .	95
J. Tomaszewski — Hydroksylaza proliny protokolagenu . . . . .	115
T. Gołaszewski, M. Siwecka, J. W. Szarkowski — Podstawowe procesy biochemiczne podczas kiełkowania nasion . . . . .	125
A. Kahl, M. Gross, W. Turski — Peroksysomy . . . . .	139
Recenzje książek (B. Dietl, J. Opieńska-Blauth) . . . . .	163
Sprawozdanie z konferencji roboczej na temat „Fracje subkomórkowe a składniki ultrastrukturalne komórki”, Łódź, 7—8 maja 1971 r. (W. Turski) . . . . .	167

W 2-gim zeszycie 18-tego tomu ukaza się:

1. Udział adenozy-no-3',5'-monofosforanu w regulacji czynności genów u zwierząt — I. Szumiel, M. E. Zajdel
2. Cykliczny 3',5'-adenozy-nomonofosforan — A. Kahl
3. Struktura peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii — A. Klein, A. Rais
4. Biosynteza peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii — A. Rais, A. Klein
5. Biosynteza steroli roślinnych — G. Turowska
6. Występowanie i biosynteza poliprenylowych chinonów roślinnych — A. Jerzmannowski
7. Biosynteza karotenoidów — Z. Wojciechowski
8. Współczesne poglądy na mechanizm działania auksyn — A. Rychter
9. Połączenie hemoglobina-polifosforan i jego rola w organizmie — R. Gondko

## POSTĘPY BIOCHEMII

January 1971

### ARTICLES IN POLISH

Volume 18

Number 1

M. Tichy — The Study of Configuration of Biopolymers by the Use of X-ray Diffraction (Army Techn. Academy, Warszawa) . . . . .	3
B. Lubas — The Hydration of DNA Macromolecules — Theory and Methods of Determination (Dep. Gen. Chem., High Med. School, Katowice) . . . . .	31
U. Kocemba-Sliwowska — Water-Insoluble Derivatives of Proteins with Biological Activities (Cytophysiol. Lab., Center Med. Postgrad. Educ., Inst. Biostructure and Transplantol., Warszawa) . . . . .	59
J. Chudzik, A. Koj — Application of the Specific Sorption Method (Affinity Chromatography) to Isolation of Enzymes and Enzyme Inhibitors (Dep. Animal Biochem., Inst. Molecular Biol, Univ., Kraków) . . . . .	73
A. Wilimowska-Pelc — Pancreatic Inhibitors of Proteolytic Enzymes (Dep. Biochem., Inst. Botany and Biochemistry, Univ. Wrocław) . . . . .	85
E. Machowicz, M. Sarnecka-Keller — Papain (Dep. Plant Biochem. and Dep. Animal Biochem., Inst. Molecular Biol., Univ., Kraków) . . . . .	95
J. Tomaszewski — Protocollagen Proline Hydroxylase (Research Center, High Med. School, Lublin) . . . . .	115
T. Gołaszewski, M. Siwecka, J. W. Szarkowski — The Principal Biochemical Processes during Seed Germination (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	125
A. Kahl, M. Gross, W. Turcki — Microbodies (Dep. Gen. and Physiol. Chem. High Med. School, Łódź) . . . . .	139
Chronicle . . . . .	163



Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalnej), 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

M. Tichy — Badanie konfiguracji przestrzennej biopolimerów za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich . . . . .	3
B. Lubas — Charakterystyka uwodnienia makromolekuł DNA i metody jego wyznaczania . . . . .	31
U. Kocemba - Śliwowska — Nierozpuszczalne w wodzie pochodne białek biologicznie czynnych . . . . .	59
J. Chudzik, A. Koj — Zastosowanie metody swoistej sorpcji (ang. <i>affinity chromatography</i> ) do wyosabniania enzymów i inhibitorów enzymatycznych . . . . .	73
A. Wilimowska - Pelc — Trzustkowe inhibitory enzymów proteolitycznych . . . . .	85
E. Machowicz, M. Sarnecka-Keller — Papaina . . . . .	95
J. Tomaszewski — Hydroksylaza proliny protokolagenu . . . . .	115
T. Gołaszewski, M. Siwecka, J. W. Szarkowski — Podstawowe procesy biochemiczne podczas kiełkowania nasion . . . . .	125
A. Kahl, M. Gross, W. Turski — Peroksysomy . . . . .	139
Recenzje książek ( <i>B. Dietl, J. Opieńska-Blauth</i> ) . . . . .	163
Sprawozdanie z konferencji roboczej na temat „Fracje subkomórkowe a składniki ultrastrukturalne komórki”, Łódź, 7—8 maja 1971 r. ( <i>W. Turski</i> ) . . . . .	167