

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 22 (2)
121-244 (1976)

1976

tom 22 nr 2



PW²

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązują korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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; nie może też zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu i więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa nie numerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu korzystny jest często podział na rozdziały oznaczone liczbami rzymskimi. Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin, schematów, reakcji czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych do różnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

Malinowski

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

KWARTALNIK

1976 TOM 22 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 22(2)
(121-244) (1976)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Członkowie: M. Bagdasarian (Warszawa), M. Chorąży (Gliwice)

J. Gregorczyk (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellebogen (Wrocław),

A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman-Balińska

KOMITET REDAKCYJNY

W. Ardelt (Warszawa), B. Czartoryska (Warszawa), M. Fikus (Warszawa),

B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa),

S. Lewak (Warszawa), J. Skankiel-Kramska (Warszawa),

I. Szumieli (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1976

Nakład 2150 (2045+105)

Ark. wyd. 10,0, ark. druk. 8,75

Pap. druk. sat. imp. kl. V, 65 g, 70×100

Zam. nr 107/76

J-113

Oddano do składania 22.I.76.

Podpisano do druku w czerwcu 1976 r.

Druk ukończono w czerwcu 1976 r.

Cena zł 20,—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAZDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

BARBARA RZESZOTARSKA *, STANISŁAW WIEJAK **

Struktura i funkcja zasadowego inhibitora trypsyny

Structure and Function of Basic Trypsin Inhibitor

W ostatnich latach obserwuje się duży wzrost zainteresowania naturalnymi inhibitorami proteaz. Poświęcono im dwie międzynarodowe konferencje, jedną w roku 1970 (1), a drugą w roku 1973 (2). W latach 1971 (3) i 1974 (4) ukazały się obszernie artykuły przeglądowe na ten temat. Wśród inhibitorów proteaz największe zainteresowanie ze względu na własności i co się z tym wiąże, ze względu na zastosowanie w medycynie (5—12), budzi zasadowy inhibitor trypsyny, zwany dalej w artykule inhibitorem trypsyny lub krócej inhibitorem ***. Jest to peptyd złożony z pięćdziesięciu ośmiu reszt aminokwasowych o znanej sekwencji (13, 14)****. Przeprowadzono dwie syntezy inhibitora i produkty syntetyczne wykazywały reaktywność charakterystyczną dla naturalnego związku (15, 16).

Nadal, podobnie jak w przypadku wielu innych inhibitorów (4, 17), nie znamy roli fizjologicznej inhibitora trypsyny. Występowanie inhibitora trypsyny wykazano, jak do tej pory, tylko w narządach pewnych zwierząt przeżuwających, a mianowicie wołu i owcy (3), przy czym nie stwierdzono jego obecności w płodach (4). Nasuwa to przypuszczenie, że rola fizjologiczna inhibitora trypsyny wiąże się ze specjalnym metabolizmem przeżuwaczy, przebiegającym z udziałem mikroorganizmów przewodu pokarmowego (4). W badaniach *in vitro* stwierdzono natomiast, że inhibitor

* Doc. dr hab., ** dr, Instytut Chemii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna ul. Oleska 48, 45-052 Opole.

Wykaz stosowanych skrótów: BPTI — zasadowy inhibitor trypsyny, E — trypsyna.

*** W literaturze naukowej spotyka się wiele nazw inhibitora trypsyny: inhibitor trypsyny, inhibitor Kunitza, czynnik Kunitza-Northropa, inaktywator trypsyny, inaktywator trypsyny-kalikreiny, inaktywator kalikreiny, trypsynowy inhibitor z trzustki, inhibitor kalikreiny z narządów wołu, wołowy inhibitor trypsyny-kalikreiny Kunitza, zasadowy inhibitor trypsyny z trzustki (BPTI), poliwalentny inhibitor z narządów wołu. Tak wielka liczba nazw wynika z historii izolowania zarówno tego, jak i innych inhibitorów (3), stwierdzania reaktywności względem różnych proteaz oraz niejednorodnych poglądów na temat mechanizmu efektu terapeutycznego inhibitora trypsyny. W dalszym ciągu artykułu będziemy posługiwali się w tekście nazwą pierwszą, a na rycinach skrótem nazwy inhibitora: BPTI.

**** Sekwencję tę czytelnik artykułu odnajdzie na rycinie 2.

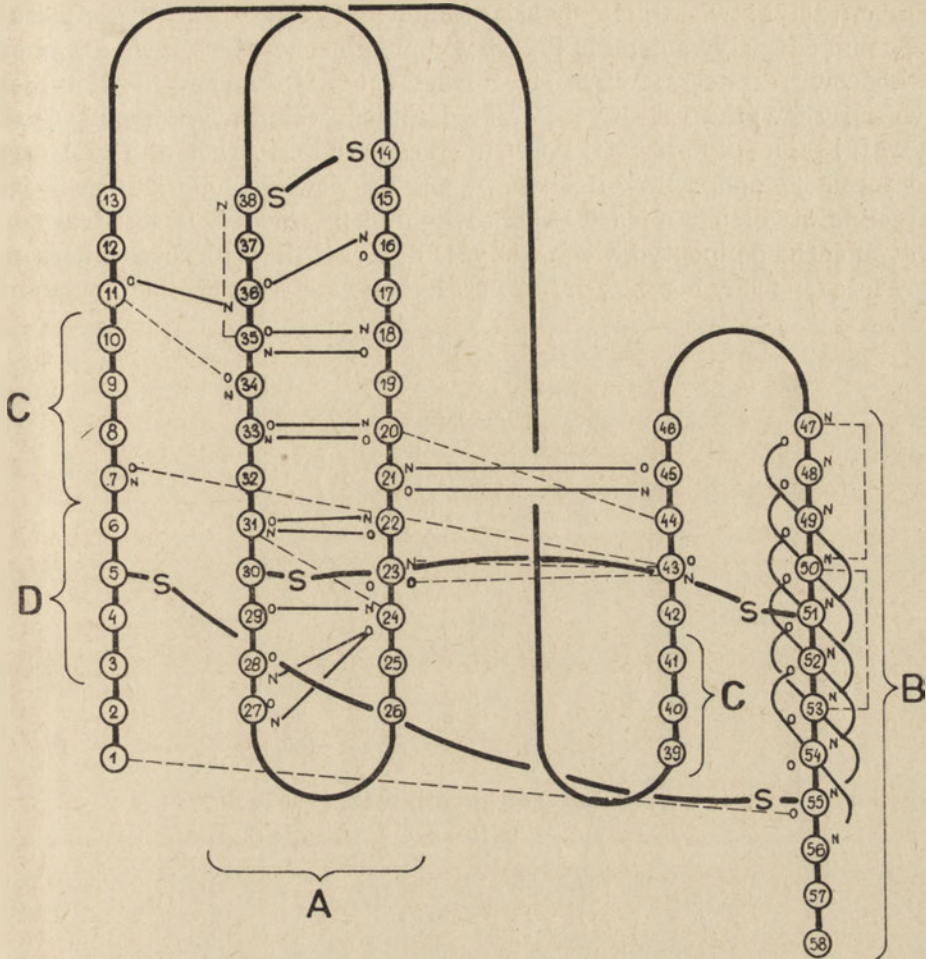
trypsyny jest inhibitorem poliwalentnym, tzn. posiadającym zdolność hamowania wielu proteaz. Hamuje aktywność trypsyny, chymotrypsyny, aktywność trzech układów enzymatycznych krwi: kininowego, fibrynolitycznego i układu krzepnięcia — a oprócz tego hamuje niektóre enzymy lizozomalne i inne proteazy aktywowane przy rozpadzie tkanek (6, 10). Z punktu widzenia medycznego duże znaczenie ma fakt, że inhibitor trypsyny hamuje niektóre ludzkie enzymy proteolityczne i nie wywołuje przy tym reakcji alergicznych i zapalnych, co miało miejsce w próbach zastosowania innych inhibitorów (8, 9). W medycynie inhibitor znalazł zastosowanie w leczeniu stanów chorobowych, charakteryzujących się wzmożoną aktywnością proteaz, szczególnie w przypadkach zapalenia i martwicy trzustki, zapalenia otrzewnej, krwawień śródczaszkowych, różnego rodzaju wstrząsów jak endotoksycznych, urazowych i homolitycznych oraz w chirurgii i położnictwie (5, 6, 10). Inhibitor trypsyny w Polsce produkuje się z płuc bydłęcych w Jeleniogórskich Zakładach Farmaceutycznych „Polfa” pod nazwą „Traskolan”.

Występowanie, izolowanie, struktura pierwszorzędowa oraz niektóre właściwości inhibitora trypsyny były już przedmiotem artykułu w *Postęпах Biochemii* (18). Celem artykułu niniejszego jest przedstawienie struktury drugo- i trzeciorzędowej inhibitora oraz mechanizmu molekularnego jego interakcji z proteazami.

I. Struktura drugo- i trzeciorzędowa inhibitora trypsyny

Strukturę drugo- i trzeciorzędową inhibitora trypsyny (Ryc. 1 i 2) podali w latach 1970—1971 H u b e r i wsp. (19—21), którzy opisali ją na podstawie badań rentgenograficznych. Strukturę tę potwierdzono w dalszych badaniach rentgenograficznych (22) oraz na drodze pomiaru widm Ramana wodnych roztworów inhibitora (23). Długość cząsteczki inhibitora trypsyny wynosi 29Å, a średnica w najszerszym miejscu 19Å. Cechą charakterystyczną struktury inhibitora trypsyny jest duży stopień uporządkowania wynikający ze znacznej zawartości odcinków łańcucha peptydowego o całkowicie regularnych strukturach drugorzędowych lub bardzo do nich zbliżonych. Udział struktury β w cząsteczce inhibitora szacuje się na około 50%, a α -heliksu na około 20% (Ryc. 1).

Głównym elementem cząsteczki inhibitora trypsyny jest środkowy segment między Cys14 a Cys38 (Ryc. 1, A) biegnący wzdłuż cząsteczki (Ryc. 2) dwoma antyrównoległymi odcinkami, połączonymi wiązaniami wodorowymi. Segment ten w połowie długości skręcony jest o kąt 180°, a w miejscu zwanym szczytem cząsteczki łączy się wiązaniem dwusiarczkowym Cys14—Cys38. W dwóch miejscach segment rozszerza się w krótkie struktury trójodcinkowe przyłączając N- i C-końcowe fragmenty cząsteczki. Przyłączenie następuje przez wiązanie wodorowe pomiędzy Gly36 i Thr11



Ryc. 1. Diagram struktury drugorzędowej BPTI (20,22)

— wiązania kowalentne

- - - wiązania wodorowe pomiędzy atomami głównego łańcucha peptydowego

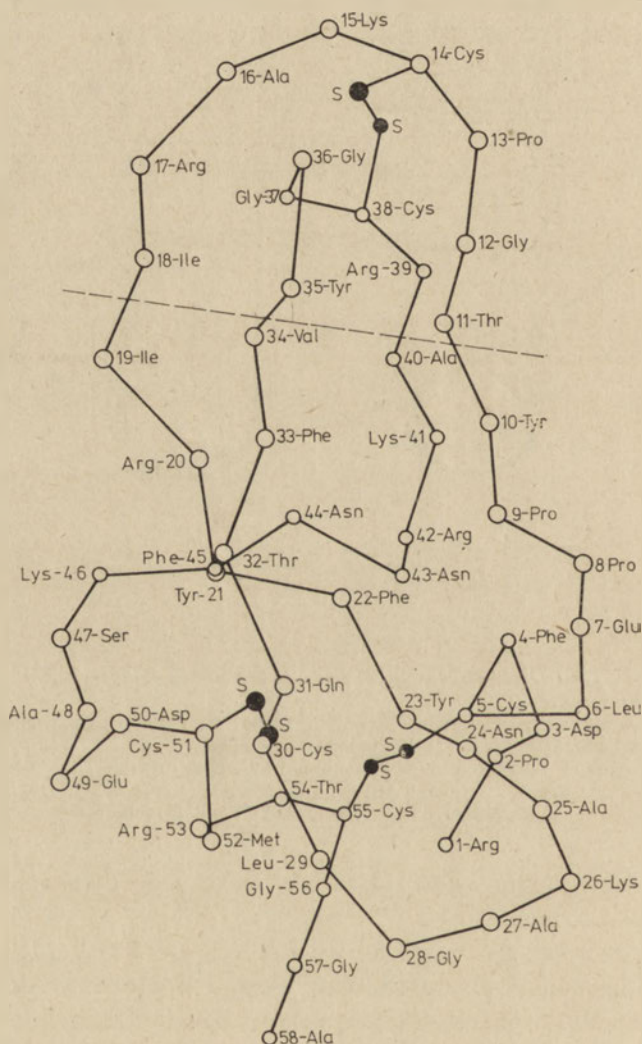
---- pozostałe wiązania wodorowe wymienione w tabeli 1

A — środkowy segment BPTI o budowie podobnej do struktury- β , B — C-końcowy odcinek BPTI o budowie α -heliksu, C — odcinki BPTI o budowie poliproliny II, D — N-końcowy odcinek BPTI o budowie podobnej do α -heliksu

(układ łańcuchów równoległy) i dwa wiązania wodorowe pomiędzy Tyr21 i Phe45 (układ łańcuchów antyrównoległy).

Fragment N-końcowy cząsteczki od Asp3 do Leu6 (Ryc. 1, D) ma strukturę podobną do α -heliksu, ale bez wewnętrznych wiązań wodorowych i zaburzoną z powodu wiązania wodorowego pomiędzy sąsiednią resztą Glu7 a Asp43. Fragment ten kontaktuje się ze środkowym segmentem cząsteczki oddziaływaniami hydrofobowymi łańcuchów bocznych. Fragment C-końcowy cząsteczki od Ser47 do Ala58 (Ryc. 1, D) ma strukturę regularnego α -heliksu, mieszczącego trzy zwoje. Wiąże się on ze środkowym segmen-

tem cząsteczki wiązaniem dwusiarczkowym Cys30—Cys51 i kontaktuje się z nim oddziaływaniami hydrofobowymi łańcuchów bocznych. Fragment N-końcowy cząsteczki wiąże się z fragmentem C-końcowym wiązaniem dwusiarczkowym Cys5—Cys55 oraz wiązaniem wodorowym między Cys55 i Arg1. Fragmenty cząsteczki od Glu7 do Tyr10 i od Arg39 do Lys41 mają konformację poliproliny II (Ryc. 1, C). Na powierzchni cząsteczki jest szczelina utworzona między C-końcowym odcinkiem α -heliksu i fragmentem łańcucha polipeptydowego od Lys41 do Lys46 (Ryc. 2). Na skraju szczeliny leżą łańcuchy boczne Tyr10 i Tyr21, a jej wnętrze wypełniają wiązanie



Ryc. 2. Rzut trójwymiarowego modelu cząsteczki BPTI ukazujący położenie atomów węgla α w łańcuchu peptydowym (19, 20).

Część cząsteczki nad linią przerywaną stanowi obszar przypuszczalnie istotny dla funkcji inhibitora (24)

dwusiarczkowe Cys5—Cys55 i duże łańcuchy boczne czterech reszt Phe4, Phe22, Phe33 i Phe45 oraz reszty Tyr23 i reszty Asn43. Te dwie ostatnie łączą się między sobą dwoma wiązaniami wodorowymi. Szczyt cząsteczki tworzą dwie antyrównoległe biegnące pętle od Pro9 do Tyr21 i od Thr32 do Asn43, połączone wiązaniem dwusiarczkowym Cys14—Cys38 i wiązaniem wodorowym między Ala16 i Gly36. Jego wnętrze wypełnia łańcuch Tyr35 o niezwykle małej swobodzie obrotu (25), połączony wiązaniem wodorowym z Cys38 (Ryc. 1, A, Tabela 1).

W niewielkiej cząsteczce, jaką jest inhibitor trypsyny stwierdzono ogółem 29 wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, w tym 19 wiązań pomiędzy atomami głównego łańcucha polipeptydowego, 7 pomiędzy głównym łańcuchem i łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych oraz 3 — między tymi ostatnimi. Wszystkie te wiązania przedstawiono na rycinie 1, a dodatkowe informacje o niektórych z nich w tabeli 1.

Tabela 1

Uzupełniające informacje o wiązaniach wodorowych w cząsteczce BPTI, nie umieszczone na rycinie 1 (22).

Atomy głównego łańcucha peptydowego		Atomy łańcuchów reszt aminokwasowych		
Glu 7	C = O	}	NH ₂	Asn43
Tyr23	C = O		O = C	Asn43
Tyr23	NH	OH	Thr11
Val34	C = O	OH	Tyr35
Cys38	NH	OH	Ser47
Asp50	NH	NH	Arg 1
Cys55	C = O		
Atomy łańcuchów reszt aminokwasowych		Atomy łańcuchów reszt aminokwasowych		
Arg20	NH ₂	O = C	Asn44
Asn24	O = C — NH ₂	O = C — NH ₂	Gln31
Asp50	C = O	NH ₂	Arg53

Całą cząsteczkę inhibitora, a szczególnie jej szczyt, cechuje zwartość i sztywność. Cechy te wynikają z obecności w cząsteczce omówionych powyżej elementów struktury i ich powiązań, a więc: z dużego udziału struktury uporządkowanej, występowania trzech wiązań dwusiarczkowych i licznych wiązań wodorowych oraz usytuowania dużych łańcuchów bocznych kilku reszt aminokwasowych we wnętrzu cząsteczki i oddziaływań hydrofobowych między nimi. Znajdujące się na szczycie cząsteczki cztery wiązania peptydowe Cys14—Lys15—Ala16—Arg17—Ile18 są mocno naprężone, gdyż osie orbitali wiązań σ węgiel—tlen są odchyłone od płaszczyzny, w której normalnie leżą atomy tworzące wiązanie peptydowe. Od-

chylenie wynosi odpowiednio: -11° , $+20^\circ$, -12° i -12° . Wiązania peptydowe tego fragmentu cząsteczki, a zwłaszcza wiązanie Lys15—Ala16, mają więc budowę pośrednią pomiędzy stanem płaskim a tetraedrycznym, co znajduje odbicie w reaktywności inhibitora.

II. Modyfikacje chemiczne i enzymatyczne inhibitora trypsyny

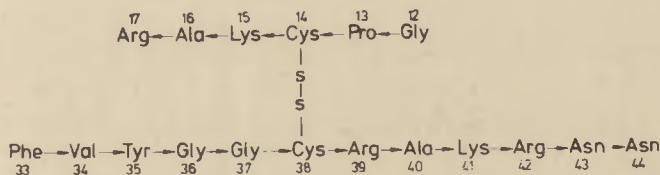
Modyfikacje chemiczne i enzymatyczne inhibitora trypsyny pozwalają na badanie zależności między jego strukturą a funkcją. Duża oporność inhibitora na czynniki denaturujące (3, 21) umożliwia przeprowadzenie wielu modyfikacji chemicznych, co nie jest bez znaczenia wobec oporności inhibitora na trawienie proteazami (26, 27) utrudniającej przeprowadzenie modyfikacji w drodze hydrolizy enzymatycznej. Dlatego w większości przypadków modyfikacje struktury w drodze enzymatycznej hydrolizy przeprowadza się na uprzednio chemicznie zmodyfikowanej cząsteczce.

Inhibitor trypsyny jest inhibitorem poliwalentnym. W pierwszym rzędzie nasuwa się więc pytanie: czy w cząsteczce występuje tylko jedno centrum reaktywne*) identyczne wobec wszystkich hamowanych przez inhibitor enzymów, czy też jest wiele centrów reaktywnych, każde charakterystyczne dla innego enzymu? W drugim przypadku można rozważać dwie sytuacje, czy centra reaktywne są w cząsteczce odizolowane od siebie, tzn. w ogóle się nie pokrywają, czy centra te częściowo zachodzą na siebie (3, 12)? Odpowiedzi na te pytania poszukuje się przez badanie reakcji inhibitora na razie tylko z trypsyną i chymotrypsyną, ponieważ mechanizm ich działania jest stosunkowo dobrze poznany, a dotąd brak informacji o fizjologicznych partnerach inhibitora trypsyny. Stwierdzenie, że kompleks inhibitora z trypsyną nie hamuje chymotrypsyny, a kompleks inhibitora z chymotrypsyną nie hamuje trypsyny (28, 29) wyklucza występowanie w cząsteczce dwóch nie pokrywających się centrów. Rozróżnienie między dwoma pozostałymi możliwościami, na podstawie posiadanych danych, nie jest tak jednoznaczne.

Działanie na inhibitor trypsyny N-karboksybezwodnikiem D,L-alaniny daje zmodyfikowany inhibitor zawierający pięć łańcuchów polialanylowych na następujących grupach aminowych: Arg1, Lys15, Lys21, Lys41 i Lys46 — i nie hamujący trypsyny. Działanie tym samym odczynnikiem na kompleks inhibitora z trypsyną daje podobnie zmodyfikowany inhibitor, zawierający cztery łańcuchy polialanylowe, wolną grupę aminową Lys15, i hamujący trypsynę (30). Analogicznie wygląda sytuacja w przypadku maleinoilowania i sukcyntyloowania inhibitora (11, 31, 32). Wiązanie

*) Centrum reaktywnym inhibitora nazywa się tą część cząsteczki, która wchodzi w bezpośredni kontakt molekularny z centrum aktywnym enzymu przy tworzeniu trwałego kompleksu enzym—inhibitor (3).

dwusiarczkowe Cys14—Cys38 można łatwo zredukować w cząsteczce samego inhibitora (33—35), w kompleksie zaś inhibitora zarówno z trypsyną, jak i z chymotrypsyną jest ono maskowane przez enzym przed redukcją (35—38). Karboksymetylowanie grup tiolowych Cys14 i Cys38, powstałych w wyniku redukcji inhibitora, pozbawia inhibitor reaktywności wobec obydwu enzymów (33). Na zdolność hamowania trypsyny lub chymotrypsyny nie ma wpływu żadna z poniższych modyfikacji chemicznych inhibitora: usunięcie N-końcowego trójpeptydu (39), dobudowanie do C-końcowej alaniny amidu glicyny (40), utlenienie reszty Met52 (41) i nitrowanie reszty Tyr10 i Tyr21 (42). Trawienie inhibitora trypsyny termolizyną prowadzi przede wszystkim do oddzielenia dwóch fragmentów czteropeptydowych Ile19—Arg20—Tyr21—Phe22 i Ala40—Lys41—Arg42—Asn43. Tak zmodyfikowany inhibitor zachowuje zdolność hamowania trypsyny i chymotrypsyny. Dalsze trawienie termolizyną prowadzi do powstania szeregu peptydów. Jeden z nich składający się z osiemnastu reszt aminokwasowych (Ryc. 3) posiada najprawdopodobniej niewielką reaktywność (26).



Ryc. 3. Osiemnasto-peptyd powstały z BPTI po trawieniu termolizyną (26). Strzałka w wiązaniu peptydowym wskazuje grupę α -aminową aminokwasu

Opisane fakty pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków. Centrum reaktywne inhibitora tak wobec trypsyny, jak i wobec chymotrypsyny stanowi Lys15 i położone w jej sąsiedztwie przestrzennym reszty aminokwasowe. W kompleksie enzym—inhibitor łańcuch boczny Lys15 znajduje się prawdopodobnie w kieszeni enzymu specyficznie wiążącej substrat.

W świetle powyższego rola Lys15 stała się przedmiotem szczegółowych dociekań. Według najnowszych badań, wykonanych w porównywalnych warunkach, stała dysocjacji kompleksu inhibitora z trypsyną wynosi $6,0 \times 10^{-14}$ M, a stała dysocjacji kompleksu z chymotrypsyną — $9,0 \times 10^{-9}$ M i jest identyczna ze stałą dysocjacji kompleksu inhibitora z pseudotrypsyną (36—38), tj. trypsyną z rozszczepionym, między innymi, wiązaniem Lys188—Asp189^{*}). Przyjmuje się wobec tego, że podczas oddziaływania trypsyna—inhibitor tworzy się między Lys15 inhibitora a Asp189 trypsy-

^{*}) Numeracja reszt aminokwasowych w trypsynie według propozycji Hartleya i Kauffmana (43).

ny mostek solny, którego nie ma w dwóch ostatnich oddziaływaniach. Dalej, na podstawie tych danych całą różnicę między stałymi dysocjacji kompleksów można przypisać udziałowi tego mostka w energii tworzenia kompleksu inhibitora z trypsyną i, jak widać, udział ten jest duży. Wniosek powyższy zdaje się uzyskiwać potwierdzenie w wielkości stałej dysocjacji kompleksu trypsyny z butyloaminą (44—46), którą można traktować jako dobry model łańcucha bocznego lizyny. Ostatnia stała jest równa różnicy pomiędzy stałą dysocjacji kompleksu inhibitora z chymotrypsyną a stałą dysocjacji kompleksu inhibitora z trypsyną. Jeżeli te wnioski są słuszne, to rodzi się sugestia, że inhibitor ma jedno i to samo centrum reaktywne identyczne wobec trypsyny i chymotrypsyny (27).

Stała dysocjacji kompleksu trypsyny z pochodną inhibitora zawierającą w miejsce Lys15 homoargininę wynosi $5,0 \times 10^{-11}$ M, tzn. zwiększa się około 800 razy w stosunku do stałej dysocjacji kompleksu trypsyna—natywny inhibitor; modyfikacja zaś ta nie ma wpływu na stałą dysocjacji kompleksu z chymotrypsyną (38, 47). Ostatnio stwierdzono w sposób jednoznaczny (11), w odróżnieniu od poprzednich badań (48), że selektywne usunięcie grupy α -aminowej tylko z Lys15 (bez naruszenia takich grup na pozostałych resztach lizylowych inhibitora) i zastąpienie jej grupą hydroksylową zachowuje reaktywność antytrypsynową i antychymotrypsynową. Na stałą dysocjacji kompleksu z trypsyną nie ma wpływu wprowadzenie czterech reszt maleinoilowych na grupy aminowe Arg1, Lys21, Lys41 i Lys46 inhibitora. Wprowadzenie natomiast jeszcze reszty karbonylowej na grupę aminową Lys15 powoduje zwiększenie stałej dysocjacji kompleksu trypsyna—modyfikowany inhibitor $6,0 \times 10^4$ razy w porównaniu ze stałą kompleksu trypsyna—natywny inhibitor, a tylko 10-krotne zwiększenie stałej dysocjacji kompleksu chymotrypsyna—modyfikowany inhibitor w porównaniu ze stałą kompleksu chymotrypsyna—natywny inhibitor (27). Podobnie wprowadzenie pięciu grup acetylowych na grupy aminowe Arg1, Lys15, Lys21, Lys41 i Lys46 inhibitora wywiera bardzo duży wpływ na stałą dysocjacji kompleksu trypsyna—modyfikowany inhibitor, tak że zwiększa się ona $1,2 \times 10^5$ razy w porównaniu ze stałą dysocjacji kompleksu trypsyna—natywny inhibitor^{*)}. Natomiast stała dysocjacji kompleksu chymotrypsyna—modyfikowany inhibitor pozostaje prawie bez zmian w stosunku do kompleksu chymotrypsyna—natywny inhibitor (27). Jak z powyższego widać niewielkie modyfikacje długości łańcucha bocznego Lys15 wpływają niewiele lub nie wpływają wcale na stałe dysocjacji kompleksów modyfikowany inhibitor—chymotrypsyna, ale wywierają duży wpływ na stałe dysocjacji kompleksów inhibitor—trypsyna w porównaniu ze stałymi dysocjacji kompleksów natywny inhibitor—odpowiedni enzym.

^{*)} Według Tschescheho (11) pochodna czterosukcynylo-(Arg1, Lys21, Lys41, Lys46)-acetylowa-(Lys15) inhibitora nie hamuje ani trypsyny, ani chymotrypsyny.

Świadczyłyby to o lepszym dopasowaniu strukturalnym inhibitora do trypsyny niż do chymotrypsyny.

W pobliżu Lys15 znajduje się w cząsteczce inhibitora wiązanie dwusiarczkowe Cys14—Cys38. Redukcja tego wiązania powoduje wzrost stałej dysocjacji kompleksu trypsyna—zredukowany inhibitor do poziomu stałej dysocjacji kompleksu chymotrypsyna—natywny inhibitor, stała dysocjacji zaś kompleksu chymotrypsyna—zredukowany inhibitor wzrasta tylko dwa razy w porównaniu ze stałą dysocjacji kompleksu chymotrypsyna—natywny inhibitor (36). Wpływ wiązania dwusiarczkowego Cys14—Cys38 na wielkość stałej dysocjacji kompleksu inhibitora z trypsyną jest więc bardzo duży, równy wpływowi mostka solnego między Lys15 inhibitora a Asp189 trypsyny, wpływ zaś jego na wielkość stałej dysocjacji kompleksu inhibitora z chymotrypsyną niewielki. Te wyniki określane są w obecnym stanie wiedzy jako „fascynujące i zagadkowe” (38, 49). Modyfikacje chemiczne polegające na alkilowaniu grup tiolowych Cys14 i Cys38, powstałych w wyniku redukcji wiązania dwusiarczkowego, w dalszym ciągu sprawy nie wyjaśniają. Mianowicie, wprowadzenie dwóch grup β -aminoetylowych powoduje zwiększenie stałej dysocjacji kompleksu trypsyna—zmodyfikowany inhibitor tylko 5-krotnie, a wprowadzenie dwu grup metylokarbamidowych 10-krotnie w porównaniu ze stałą dysocjacji kompleksu trypsyna—inhibitor ze zredukowanym wiązaniem dwusiarczkowym Cys14—Cys38 (36, 38). Pochodna dwumetylokarbamidowa inhibitora zaś w ogóle nie hamuje chymotrypsyny (50, 51). Zjawiska te interpretuje się jako przemawiające za poglądem, że centrum reaktywne inhibitora wobec trypsyny nie jest identyczne z centrum wobec chymotrypsyny (3, 27).

W chemicznie zmodyfikowanym inhibitorze trypsyny ze zredukowanym wiązaniem dwusiarczkowym Cys14—Cys38 zarówno trypsyna, jak i różniąca się od niej specyficznością działania chymotrypsyna powodują hydrolizę przede wszystkim wiązania Lys15—Ala16, a następnie wiązania Arg39—Ala40. Jako trzecie w kolejności wiązanie peptydowe trypsyna hydrolizuje wiązanie Arg17—Ile18 (11, 27, 50—54). Inhibitor o dwóch rozszczepionych wiązaniach dwusiarczkowym Cys14—Cys38 i peptydowym Lys15—Ala16 jest niereaktywny (11, 54). Utlenienie grup tiolowych na powrót do wiązania dwusiarczkowego daje inhibitor znowu reaktywny (11, 54). Do działania inhibitora konieczne jest więc minimum jedno z wiązań: Lys15—Ala16 lub Cys14—Cys38. Zarówno trypsyna, jak i chymotrypsyna a także plazmina powodują w inhibitorze o zhydrolizowanym wiązaniu Lys15—Ala16 resyntezę tego wiązania (11, 55). Usunięcie z inhibitora o zhydrolizowanym wiązaniu Lys15—Ala16 albo reszty Lys15 (56) albo dwupeptydu Ala16—Arg17 (57) pozbawia inhibitor reaktywności wobec trypsyny (badań wobec innych enzymów nie przeprowadzono). Wbudowanie zaś na miejsce Lys15 reszty Arg prowadzi do inhibitora reaktywnego tak wobec chymotrypsyny i trypsyny, jak i wobec plazminy, a wbudowanie Trp lub Phe daje inhibitor o niewielkiej reaktywności wo-

bec trypsyny i dużej wobec chymotrypsyny (56). Przytoczone powyżej dane: hydroliza tego samego wiązania peptydowego przez enzymy o różnej specyficzności, reaktywność tak otrzymanego zhydrolizowanego inhibitora wobec tych enzymów i jej brak po usunięciu reszt aminokwasowych N- i C-końcowych powstałych w miejsce hydrolizy oraz resynteza przez te enzymy zhydrolizowanego wiązania peptydowego — sugerują pogląd, że centrum reaktywne inhibitora wobec różnych enzymów jest to samo (12, 27, 55). Problem nadal jednak pozostaje otwarty.

Dla uzupełnienia zagadnienia należy dodać, że w oddziaływaniu między czteromaleinoilo-(Arg1, Lys21, Lys26, Lys46)-antranoilo-(Lys15)-inhibitorem trypsyny i trypsyną oraz między czteromaleinoilo-(Arg1, Lys21, Lys26, Lys46)-dansylo-(Lys15)-inhibitorem a zarówno trypsyną, jak i chymotrypsyną nie dochodzi do ulokowania reszty acylo-Lys15 w kieszeni enzymu specyficznie wiążącej substrat, a mimo to pochodne inhibitora hamują enzymy (27, 58). W sytuacji więc, gdzie nie ma możliwości reakcji inhibitora z proteazą przez jego resztę Lys15 następuje reakcja przy pomocy innego centrum: być może jest nim Arg39 (27).

Opisane fakty wskazują na istotność w oddziaływaniu inhibitor—enzym proteolityczny fragmentu inhibitora o sekwencji aminokwasowej —Arg17—Ala16—Lys15—Cys14(Cys38—Arg39)—. Fragment ten w strukturze trzeciorzędowej inhibitora znajduje się na szczycie cząsteczki (Ryc. 2) a z analizy struktury drugorzędowej inhibitora wynika ważność dla sztywności jego konformacji reszt: Ile18 i Tyr35 oraz Thr11 (Ryc. 1). W konsekwencji wydaje się, że obszar istotny dla funkcji inhibitora znajduje się w cząsteczce w sekwencji aminokwasowej —Thr11—Gly12—Pro13—Cys14—Lys15—Ala16—Arg17—Ile18— w jednej pętli peptydowej oraz w sekwencji —Tyr35—Gly36—Gly37—Cys38—Arg39— w drugiej pętli peptydowej szczytu cząsteczki (Ryc. 2). Wydaje się więc, że nie obejmuje on więcej niż 13 następujących aminokwasów —Ile18—Arg17—Ala16—Lys15—Cys14—Pro13—Gly12—Thr11—Tyr35—Gly36—Gly37—Cys38—Arg39—.

Tabela 2

Fragmenty kilku lizylowych inhibitorów trypsynowych homologiczne z obszarem cząsteczki BPTI istotnym dla jego funkcji. Fragmenty sekwencji (12)

	11	12	13	14	15	16	17	18	35	46	37	38	39			
BPTI	...	-Thr	-Gly	-Pro	-Cys	-Lys	-Ala	-Arg	-Ile	...	-Tyr	-Gly	-Gly	-Cys	-Arg	...
Inhibitor z białka jaja zółwia	...	-Gln	-Gly	-Pro	-Cys	-Lys	-Gly	-Arg	-Ile	...	-Tyr	-Gly	-Gly	-Cys	-Lys	...
Inhibitor z siary bydłowej	...	-Arg	-Gly	-Pro	-Cys	-Lys	-Ala	-Ala	-Leu	...	-Tyr	-Gly	-Gly	-Cys	-Glu	...
Inhibitor K z wątrobotrzustki ślimaka	...	-Thr	-Gly	-Pro	-Cys	-Lys	-Ala	-Ser	-Phe	...	-Tyr	-Gly	-Gly	-Cys	-Arg	...

W obszarze tym, naszym zdaniem, powinno znajdować się centrum reaktywne inhibitora. Pogląd ten znajduje potwierdzenie w fakcie, że obszar istotny dla funkcji inhibitora okazuje się homologiczny z fragmentami kilku innych lizylowych inhibitorów trypsynowych (12) (Tabela 2).

III. Struktura kompleksu inhibitor trypsyny—trypsyna i mechanizm molekularny jego tworzenia

Znajomość struktury trzeciorzędowej inhibitora i struktury trzeciorzędowej chymotrypsyny pozwoliła na konstrukcję atomowego modelu kompleksu inhibitor trypsyny—chymotrypsyna charakteryzującego się następującymi cechami ogólnymi: miejscem kontaktu inhibitora z proteazą był szczyt jego cząsteczki, łańcuch boczny Lys15 inhibitora usytuowano w kieszeni enzymu specyficznie wiążącej substrat, a wiązanie peptydowe Lys15—Ala16 inhibitora w pobliżu His57 i Ser195, wchodzących w skład centrum katalitycznego enzymu. Szczegółowa analiza modelu prowadziła do wniosku o istnieniu 400 kontaktów van der Waalsa między 18 resztami aminokwasowymi enzymu i 19 resztami aminokwasowymi inhibitora (21, 59—62).

Badania rentgenograficzne kompleksu inhibitora trypsyny z trypsyną (62, 63) potwierdziły ogólne wnioski z analiz modeli atomowych oraz dostarczyły szeregu informacji szczegółowych. Stwierdzono, przede wszystkim, że długość mostka solnego między azotem N ζ Lys15 inhibitora z tlenem O δ_1 i O δ_2 Asp189 znajdującego się na dnie kieszeni enzymu specyficznie wiążącej substrat wynosi 3,3Å i że azot ten wiąże się jeszcze wiązaniami wodorowymi z tlenem O γ Ser190 (3,0Å) i z jej tlenem karbonylowym C=O (2,6Å). Dalej, w całym kompleksie stwierdzono w sumie 200 kontaktów van der Waalsa i 11 (ewentualnie nawet 13) wiązań wodorowych między resztami aminokwasowymi enzymu i resztami aminokwasowymi inhibitora (Tabela 3). Ze strony enzymu w kontakt z inhibitorem wchodzi przede wszystkim katalitycznie aktywne reszty aminokwasowe His57 i Ser195, a następnie reszty aminokwasowe Phe41, Gln192 i Gly193, sąsiadujące z nimi przestrzennie oraz reszty aminokwasowe Ser214, Tyr215 i Gly216, wyścielające kieszeń enzymu specyficznie wiążącą substrat. Ze strony inhibitora w kontakt z enzymem wchodzi przede wszystkim Lys15, a następnie Ala16 i Arg 17 oraz Cys14 i Arg39.

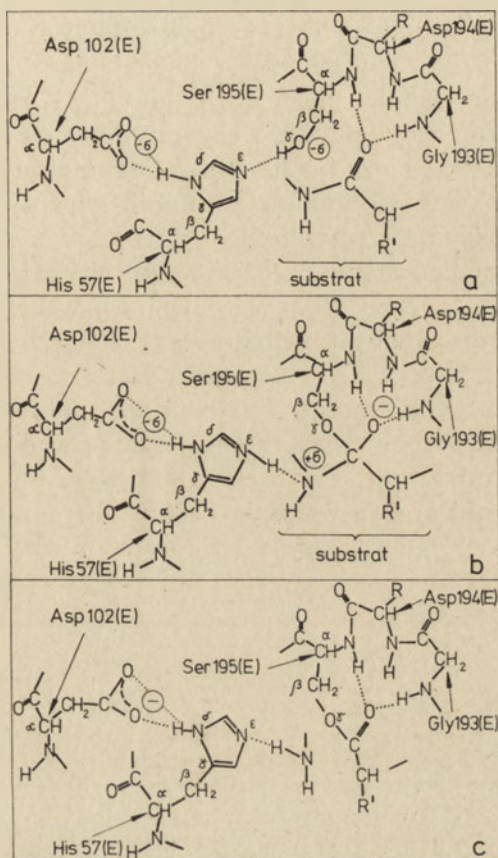
Przy hydrolitycznym działaniu trypsyny po utworzeniu kompleksu enzym—substrat (Ryc. 4a) zachodzi w cząsteczce enzymu przeniesienie wodoru z tlenu O γ Ser195 na azot N ϵ His57 (Ryc. 4b), zmiana orientacji tlenu O γ Ser195 do pozycji tzw. „związanej” i utworzenie wiązania kowalentnego między nim a węglem karbonylowym zasadowego aminokwasu wchodzącego w skład hydrolizowanego wiązania peptydowego. W ten sposób to ostatnie wiązanie przechodzi w stan tetraedryczny. Zerwanie w przejściu-

Oddziaływanie między BPTI i trypsyną w kompleksie BPTI-trypsyna w stanie krystalicznym

Trypsyna	BPTI	Thr11	Gly12	Pto13	Cys14	Lys15	Ala16	Arg17	Ile18	Val34	Tyr35	Gly36	Gly37	Cys38	Arg39
Tyr39								V							
His40								H							
Phe41							V	H, V	V						
Cys42							V					V			
His57					V		V						V		
Cys58							V								
Tyr59															
Lys60									V						
Ser96															
Asn97															H, V
Thr98															V
Leu99														V	
Tyr151															
Gln175								V, CT		V					H
Asp189															
Ser190															
Cys191															
Gln192		H?	H ^{TV}		H		V								
Gly193							V								
Asp194							V								
Ser195							C?, V								
Ser214							V, H								
Trp215							H								V
Gly216															

C — wiązanie kowalenne; H — wiązanie wodorowe; V — oddziaływanie van der Waalsa; CT — przesunięcie ładunku; S — mostek solny.

wym stanie tetraedrycznym wiązania węgiel—azot prowadzi do rozszczępienia wiązania peptydowego z równoczesnym połączeniem nowo utworzonego peptydowego N-końca wiązaniem wodorowym z azotem N ϵ His57 enzymu i acylowaniem tlenu O γ Ser195 enzymu nowo utworzonym C-końcem peptydowym (Ryc. 4c). Hydroliza acyloenzymu kończy proces hydrolizy substratu (64).



Ryc. 4. Schemat powstawania acyloenzymu podczas hydrolizy wiązania peptydowego wg. (64).

a — kompleks enzym-substrat,

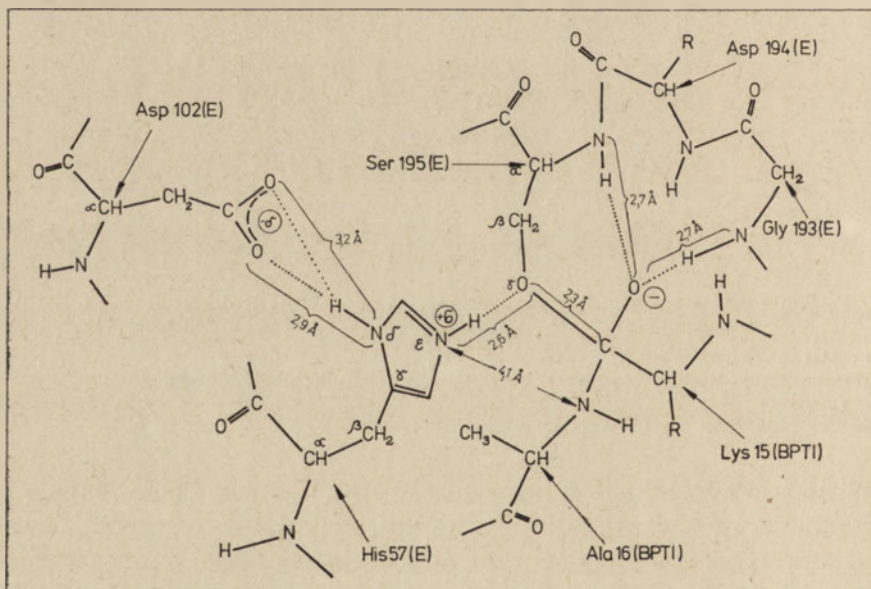
b — tetraedryczny stan przejściowy hydrolizowego wiązania peptydowego,

c — acyloenzym.

Strzałkami oznaczono węgle α reszt aminokwasowych

W kompleksie inhibitor trypsyny—trypsyna stwierdzono (63), że tlen O γ Ser195 trypsyny zajmuje pozycję pośrednią między pozycją „związaną” charakteryzującą acyloenzym a pozycją charakteryzującą aktywny wolny enzym. Jego odległość od węgla karbonylowego Lys15 inhibitora wynosi 2,3Å czyli jest większa niż długość wiązania kowalentnego. Nie dochodzi więc tu do wytworzenia typowo kowalentnego wiązania acyl—

enzym, a zachodzi jedynie silne oddziaływanie nukleofilowego tlenu O γ Ser195 trypsyny z elektrofilowym węglem karbonylowym Lys15 inhibitora. W kompleksie inhibitor trypsyny—trypsyna nie dochodzi także do zerwania wiązania wodorowego pomiędzy tlenem O γ Ser195 i azotem N ϵ His57 enzymu, a tylko przemieszczenie w nim wodoru w kierunku azotu i długość tego wiązania wynosi 2,6Å. Dalsze przeniesienie tego wodoru na azot reszty Ala16 inhibitora i utworzenie acyloenzymu jest niemożliwe, ponieważ bliskie sąsiedztwo reszt aminokwasowych —Tyr35—Gly36—Gly37—Cys38(Cys14—)— inhibitora, a wśród nich zwłaszcza β -węgla Cys14 (4,5Å) unieruchamia pierścień imidazolowy His57 trypsyny. Na skutek tego odległość azotu N ϵ His57 enzymu do azotu reszty Ala16 inhibitora wynosi 4,1Å i nie może się zmniejszyć do minimum niezbędnego do przejścia wodoru. Tak więc kompleks inhibitor trypsyny—trypsyna nie ma budowy acyloenzymu z rozszczepionym wiązaniem Lys15—Ala16, ale budowę tetraedrycznego stanu przejściowego, chociaż bez wiązania kowalentnego między tlenem O γ Ser195 enzymu a węglem karbonylowym Lys15 inhibitora, gdyż atomy te odległe są od siebie o 2,3Å. Charakterystyczne dla stanu przejściowego odległości podaje rycina 5. W bliskim sąsiedztwie wiązania peptydowego Lys15—Ala16 inhibitora znajdują się jeszcze inne nie zaznaczone na rycinie 5 wiązania wodorowe między łańcuchem głównym inhibitora a łańcuchem głównym trypsyny (Tabela 3). Są to przede wszystkim: dwa wiązania krótkiego fragmentu β -antyrównoległej struktury inhibitor trypsyny—trypsyna, między tlenem karbony-



Ryc. 5. Niektóre odległości międzyatomowe w kompleksie BPTI—trypsyna w stanie krystalicznym (63).

Strzałkami oznaczono węgle α reszt aminokwasowych

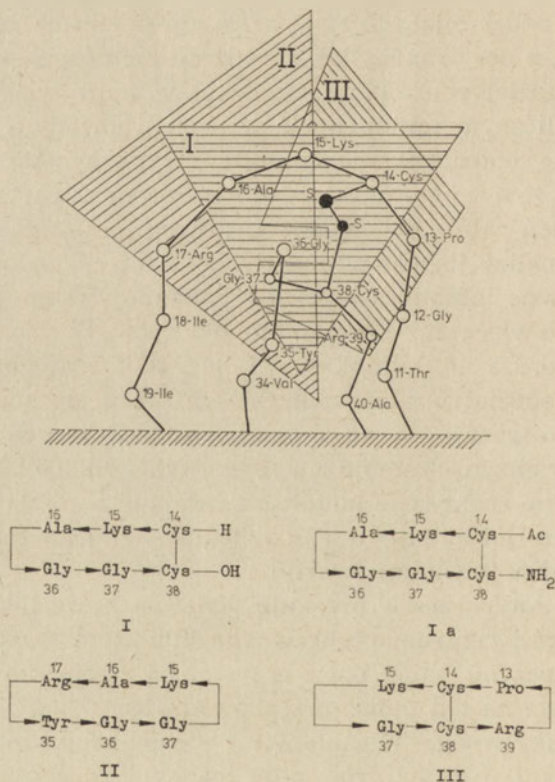
lowym Pro13 inhibitora a azotem Gly 216 trypsyny i między azotem Lys15 inhibitora a tlenem karbonylowym Ser214 trypsyny (3,3Å) oraz wiązania pomiędzy azotem Arg17 inhibitora a tlenem karbonylowym Phe41 enzymu (2,6Å). Wszystkie wiązania wodorowe z sąsiedztwa wiązania peptydowego Lys15—Ala16 stabilizują jego tetraedryczny stan przejściowy i tłumaczą trwałość kompleksu inhibitora trypsyny z trypsyną.

IV. Uwagi końcowe

Poprzedzająca badania rentgenograficzne analiza modeli atomowych kompleksu inhibitor trypsyny—chymotrypsyna sugerowała, że inhibitor oddziałuje molekularnie z trypsyną przez 19 swoich reszt aminokwasowych (62). W badaniu rentgenograficznym kompleksu inhibitor trypsyny—trypsyna ustalono, że oddziaływanie to zamyka się w obszarze 14 aminokwasów ze szczytu cząsteczki inhibitora (Tabela 3). Obraz kompleksu uzyskany z badań rentgenograficznych różni się od obrazu pierwotnego z analiz modeli atomowych nie tylko mniejszą liczbą reszt aminokwasowych inhibitora oddziałujących z trypsyną, ale i znacznie zmniejszoną liczbą kontaktów van der Waalsa, jak i brakiem niektórych wiązań wodorowych. Liczba oddziaływań okazała się więc w rzeczywistym kompleksie w stanie krystalicznym mniejsza niż w skonstruowanym wcześniej modelu. Faktycznie oddziaływanie inhibitor trypsyny—proteaza zachodzi w roztworze i może być przeto jeszcze mniej złożone. Z chemicznych i enzymatycznych badań zależności między strukturą inhibitora trypsyny a jego funkcją i z analizy jego struktury drugo- i trzeciorzędowej wynika, że centrum reaktywne inhibitora trypsyny powinno występować w obszarze obejmującym nie więcej niż 13 reszt aminokwasowych (24) (Ryc. 2). W rzeczywistości stwierdza się, że inhibowanie jest skuteczne nawet wtedy, gdy nie wszystkie oddziaływania inhibitor—proteaza dochodzą do skutku (27, 58). Ostatnio szacuje się, że promienie oddziałujących ze sobą w roztworze obszarów enzym—inhibitor wynoszą tylko 5Å (65). Jak wielkie jest naprawdę centrum reaktywne inhibitora, lub jaka najmniejsza liczba reszt aminokwasowych inhibitora jest niezbędna dla jego funkcji pozostaje w chwili obecnej problemem otwartym.

Przytoczone dotychczas w artykule dane, na których oparto hipotezy na temat wielkości centrum reaktywnego inhibitora trypsyny, uzyskano metodami badawczymi, które operują natywną cząsteczką. Można próbować uzyskać dane na ten temat przeprowadzając syntezę chemiczną modeli centrum reaktywnego. Właśnie w ten sposób zajęliśmy się problemem w naszej pracowni. Jedną z dróg może być synteza peptydów, stanowiących fragmenty istotnego dla funkcjonowania inhibitora obszaru cząsteczki, o podobnej do niego strukturze przestrzennej. Wymóg ten spełniają przede wszystkim cykliczne peptydy o liczbie reszt aminokwasowych

większej niż 6 (66). Podjęliśmy wobec tego syntezę cyklicznych sześćiopeptydów (67—69). Ideę ich konstrukcji pokazuje rycina 6. Każdy cykliczny sześćiopeptyd (I, Ia, II i III) zawiera Lys15 — reaktywny aminokwas inhibitora i składa się z dwóch trójpeptydów, pochodzących z dwóch antyrównoległych pętli, tworzących szczyt cząsteczki inhibitora trypsyny. W cyklosześćiopeptydzie Ia w celu zniesienia stanu jonu obojnacznego, nie występującego w naturalnym inhibitorze, zacetylowano grupę aminową Cys14 i przeprowadzono w amid grupę karboksylową Cys38. Żaden spośród zsyntezowanych cyklopeptydów nie wykazywał reaktywności inhibitorowej wobec trypsyny, chymotrypsyny lub kalikreiny (66—68) testowanej w obecności estru etylowego benzoilo-L-argininy lub estru etylowego benzoilo-L-tyrozyny. Spośród zsyntezowanych cyklosześćiopeptydów interesujące wydają się peptydy I i Ia, gdyż zawierają wszystkie te reszty aminokwasowe, które — jak stwierdzono w badaniu kompleksu inhibitor trypsyny—trypsyna w stanie krystalicznym (Tabela 3) — wchodzi w kontakt molekularny z His57 i Ser195, aktywnymi resztami aminokwasowymi tryp-



Ryc. 6. Konstrukcja syntetycznych cyklosześćiopeptydowych modeli I—III centrum reaktywnego BPTI (24).

Strzałka w wiązaniu peptydowym wskazuje grupę α -aminową aminokwasu

syny. Cyklosześcieopeptyd I ma strukturę $-\beta$ (70), jednakże tlen karbonylowy Lys15 zwrócony jest w nim do wewnątrz pierścienia a nie na zewnątrz cząsteczki jak to ma miejsce w naturalnym inhibitorze. Ponieważ cyklosześcieopeptyd nie hamuje proteaz można wnosić, że albo podczas oddziaływania proteaza—cyklosześcieopeptyd I nie następuje przybranie przez cyklosześcieopeptyd „konformacji inhibitorowej”, albo że jest on za mały, aby zapewnić niezbędną do inhibowania liczbę kontaktów inhibitor—proteaza. Bardziej prawdopodobne wydaje się tłumaczenie drugie, gdyż proteaza — jak można przypuszczać — narzuca fragmentom inhibitora lub jego modyfikowanym formom taką „konformację inhibitorową” (26, 27, 58). Syntezę modeli centrum reaktywnego inhibitora trypsyny kontynuuje się i zmierza ona obecnie do cyklopeptydów większych (71) od dotychczas otrzymanych i przebadanych *).

Artykuł nadszedł 31.1.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 8.12.1975.

W czasie składania artykułu do druku ukazała się publikacja Webera i Schmidta (Weber U., Schmid H., (1975), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356, 1505 - 1515.) na temat syntezy peptydowych modeli reaktywnego centrum zasadowego inhibitora trypsyny i badania ich własności inhibitorowych oraz zawierająca wnioski identyczne ze sformułowanymi w końcowej części niniejszej pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. (1971), Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, red. Fritz H., Tschesche H., str. 1—304, Walter de Gruyter, Berlin—New York.
2. (1974), Bayer Symposium V—Proteinase Inhibitors. Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 1—751, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
3. Laskowski M. Jr., Sealock R. W., (1971) w *The Enzymes* 3rd Ed., red. Boyer P. D., t. 3, str. 375—473, Academic Press, New York—London.
4. Tschesche H., (1974), *Angew. Chem.*, 13, 10—28.
5. Kokot F., (1967), w *Enzymologii klinicznej*, Szczeklik E., str. 615—618, PZWL, Warszawa.
6. Mörl F. K., (1968), *Klinik der Protinaseinhibitoren in der Chirurgie. Ergebnisse einer alternierenden Applikation des Proteinaseinhibitors Trasylol*, str. 1—89, Schattauer F. K., Stuttgart—New York.
7. Fritz H., Oppitz K. H., Meckel D., Kemkes B., Haendle H., Schult H., Werle E., (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350, 1541—1550.
8. Werle E., (1971), w Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, red. Fritz H., Tschesche H., str. 23—27, Walter de Gruyter, Berlin—New York.

*) Ostatnio zakomunikowano (72) o podobnym do opisanego powyżej podejściu do badania centrum reaktywnego inhibitora Bowmana-Birka. Zsyntetyzowano mianowicie cykliczny dziewięciopeptyd i stwierdzono, że wykazywał on pewną reaktywność inhibitorową.

9. Coan M. H., Travis J., (1971), w Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, red. Fritz H., Tschesche H., str. 294—298, Walter de Gruyter, Berlin—New York.
- 10. Trasylol—materiały informacyjne firmy Bayer, str. 1—9.
11. Tschesche H., Jering H., Schorp G., Dietl T., (1974), w Bayer Symposium V—Proteinase Inhibitors. Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 362—377, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
12. Laskowski M. Jr., Kato I., Leary T. R., Schrode J., Sealock R. W., (1974), w Bayer Symposium V—Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 597—611, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
13. Kassel B., Laskowski M. Jr., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 463—468.
14. Anderer F. A., Hörnle S., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 1568—1572.
15. Noda K., Terada S., Mitsuyasa N., Waki M., Kato T., Izumija N., (1971), *Naturwissenschaften*, **58**, 147—148.
16. Yajima H., Kiso Y., Okada Y., Watanabe H., (1974), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 106—107.
17. M. Laskowski, Jr., (1974), w Bayer Symposium V—Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 679—684, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
- 18. Wilimowska-Pelc A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 85—93.
19. Huber R., Kukla D., Rühlmann A., Epp O., Formanek H., (1970) *Naturwissenschaften*, **17**, 389—392.
20. Huber R., Kukla D., Rühlmann A., Steigemann W., (1971), w Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, red. Fritz H., Tschesche H., str. 56—65, Walter de Gruyter, Berlin—New York.
21. Huber R., Kukla D., Rühlmann A., Steigemann W., (1971), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 141—148.
22. Deisenhofer J., Steigemann W., (1974), w Bayer Symposium V—Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 484—496, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
23. Brunner H., Holz M., (1974), w Bayer Symposium V—Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 454—457, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
24. Wiejak S., (1975), Synteza peptydów z istotnego dla biochemicznej reaktywności obszaru cząsteczki zasadowego trzustkowego inhibitora tripsyny, praca doktorska, str. 1—121 Opole.
25. Gelin B. R., Karplus M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2002—2006.
26. Kassell B., Wang T. W., (1971), w Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, red. Fritz H., Tschesche H., str. 89—94, Walter de Gruyter, Berlin—New York.
27. Rigbi M., (1971), w Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, red. Fritz H., Tschesche H., str. 74—88, Walter de Gruyter, Berlin—New York.
28. Wu F. C., Laskowski M. Sr., (1955), *J. Biol. Chem.*, **213**, 609—619.
29. Kraut H., Bhargava N., (1967), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1500—1501.

30. Chauvet J., Acher R., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4274—4275.
31. Fritz H., Fink E., Gebhardt M., Hochstrasser K., Werle E., (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 933—944.
32. Fritz H., Schult H., Meister R., Werle E., (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1531—1540.
33. Kréss L. F., Laskowski M. Sr., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4925—4929.
34. Liu W. K., Meienhofer J., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 467—473.
35. Liu W. K., Trzeciak H., Schüssler H., Meienhofer J., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2849—2855.
36. Vincent J. P., Lazduński M., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2967—2977.
37. Vincent J. P., Lazduński M., (1973), *Eur. J. Biochem.* **38**, 365—372.
38. Lazduński M., Vincent J. P., Schweitz H., Péron-Renner M., Pudles J., (1974), w Bayer Symposium V—Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 420—431, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
39. Kassell B., Chow R. B., (1966), *Biochemistry*, **5**, 3449—3453.
40. Chauvet J., Acher R., (1968), *FEBS Letters*, **2**, 17—19.
41. Kassell B., (1964), *Biochemistry* **3**, 152—155.
42. Meloun B., Fritz I., Šorm F., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 112—117.
43. Hartley B. S., Kauffman D. L., (1966), *Biochem. J.*, **101**, 229—231.
44. Inagami T., Murahai T., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, PC 1905—1907.
45. Inagami T., (1964), *J. Biol. Chem.* **239**, 787—791.
46. Heideberg J., Holler E., Hartmann H., (1967), *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **71**, 19—29.
47. Vincent J. P., Schweitz H., Lazduński M., (1974), *Eur. J. Biochem.* **42**, 505—510.
48. Anderer F. A., Hörnle S., (1968), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **146**, 381—385.
49. Laskowski M. Jr., (1974), w Bayer Symposium V—Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 679—684, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
50. Kress L. F., Wilson K. A., Laskowski M. Sr., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1758—1762.
51. Kress L. F., Laskowski M. Sr., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3548—3550.
52. Laskowski M. Sr., Schneider S. L., Wilson K. A., Kress L. F., Mozejko J. H., Martin S. R., Kucich U., Andrews M., (1971), w Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, red. Fritz H., Tschesche H., str. 66—73, Walter de Gruyter, Berlin—New York.
53. Wilson K. A., Laskowski M. Sr., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3555—3561.
54. Jering H., Tschesche H., (1974), *Angew. Chem.*, **86**, 702—703.
55. Jering H., Tschesche H., (1974), *Angew. Chem.*, **86**, 703.
56. Jering H., Tschesche H., (1974), *Angew. Chem.*, **86**, 704.
57. Jering H., Tschesche H., (1974), *Angew. Chem.*, **86**, 705.
58. Elkana I., (1974), w Bayer Symposium V—Proteinase Inhibitors. Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 445—453, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
59. Stroud R. M., Kay L. M., Dickerson R. E., (1971), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 125—140.
60. Blow D. M., Wright C. S., Kukla D., Rühlmann A., Steigemann W., Huber R., (1972), *J. Mol. Biol.*, **69**, 137—144.

61. Huber R., (1972) w 23. Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 13.—15. April in Mosbach/Boden, str. 111—128, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg.
62. Rühlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 417—436.
63. Huber R., Kukla D., Steigemann D., Deisenhofer J., Jones A., (1974), w Bayer Symposium V—Proteinase Inhibitors. Proceedings of the 2nd International Research Conference, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 497—512, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
64. Henderson R., Wright C. S., Hess G. P., Blow D. M., (1971), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 63—70.
65. Quast U., Engel J., Heumann H., Krause G., Steffen E., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2512—2520.
66. Schwyzer R., Ludescher U., (1969), *Helv. Chim. Acta*, **52**, 2033—2040.
67. Siemion I. Z., Konopińska D., Wiejak S., Rzeszotarska B., Najbar Z., (1972), w Peptides 1972, Proceedings of the Twelfth European Peptide Symposium, Reinhardsbrunn Castle, German Democratic Republic, September (1972), red. Hanson H., Jakubke H. D., str. 210—213, North—Holland Publishing Company, Amsterdam—London.
68. Wiejak S., Rzeszotarska B., (1974), *Roczniki Chem.*, **48**, 2207—2215.
69. Wiejak S., Rzeszotarska B., (1975), *Roczniki Chem.*, **49**, 1105—1112.
70. Siemion I. Z., Kliś W. A., (1974), *Roczniki Chem.*, **48**, 1941—1949.
71. Wiejak S., prace w toku.
72. Nishino N., Aoyagi H., Kato T., Izumija N., (1975), *Experientia*, **31**, 410—412.

MAŁGORZATA MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA *)

Biochemiczne aspekty biologicznych rytmów dobowych

Biochemical Aspects of Diurnal Biological Rhythms

Zjawisko „mierzenia” czasu przez organizmy żywe wykryto w początkach XVIII wieku, a więc ma już ono ponad dwuwiekową historię. Dopiero jednak ostatnie dwudziestolecie przyniosło niezwykły wzrost zainteresowania rytmami biologicznymi (biorytmami). Składa się na to kilka przyczyn. Przede wszystkim zaczęto sobie zdawać sprawę z faktu, że rytmy biologiczne odgrywają zasadniczą rolę w adaptacji istot żywych do warunków otoczenia, a po wtóre biorą udział w utrzymaniu homeostazy w organizmie. Poznanie rytmów biologicznych, oprócz znaczenia czysto teoretycznego, ma zatem olbrzymie znaczenie praktyczne (medycyna, podróże transkontynentalne czy kosmiczne). Nie powinien zatem budzić zdziwienia fakt, że można dziś mówić o powstaniu nowej dziedziny wiedzy zajmującej się rytmami biologicznymi — chronobiologii. Co więcej, chronobiologia stanowi już poważnie rozbudowany dział biologii, a w jej zakres wchodzi kilka specjalności, między innymi chronofizjologia, chronofarmakologia, czy chronopatologia.

Badacz pragnący zapoznać się z problematyką rytmów biologicznych jest obecnie w o wiele szczęśliwszej sytuacji niż przed kilkunastu laty. W ostatnim okresie opublikowano bowiem kilka obszernych monografii traktujących o rytmach biologicznych (1—6), jak również wydano w formie książkowej szereg sprawozdań z międzynarodowych sympozjów i konferencji, na których wielu uczonych wypowiadało się na temat biorytmów badanych pod różnymi aspektami (7—12). Ponadto ukazują się regularnie trzy czasopisma naukowe: *Chronobiology*, *Journal of Interdisciplinary Cycle Research* i *Cycles* zamieszczające prace na temat zjawisk i procesów rytmicznych.

Obecnie nie można ignorować wyników badań nad rytmami biologicznymi wskazującymi na to, że biorytmy występują na wszystkich możli-

*) Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Stosowane skróty: LL — warunki stałego światła; DD — warunki stałej ciemności; LD — warunki zmiennego światła i ciemności.

wych poziomach organizacji żywej materii, począwszy od komórki, a skończywszy na organizmie jako całości. Konieczność uwzględniania czynnika czasu przy standaryzacji technik histochemicznych, tak często stosowanych do celów diagnostycznych, podkreśla M a y e r s b a c h przytaczając jako przykład dobowe zmiany zawartości glikogenu w wątrobie szczurów, gdzie amplituda wahań jest duża — wynosi od 0,1 do 8,0 mg glikogenu w przeliczeniu na 100mg wątroby (13). Podobnie H a l b e r g, w swoim wykładzie otwierającym konferencję na temat rytmów biologicznych i funkcji układu endokrylnego, która odbyła się w Missouri w 1973, podkreśla, że w medycynie brak analizy wyników pod kątem rytmiki dobowej badanego procesu jest stratą czasu i pieniędzy oraz wyrządzić może nieobliczalne szkody! (14)

I. Podstawowe problemy i pojęcia

I-1. Zegar biologiczny

Liczne doświadczenia i obserwacje ptaków i pszczół, a także wcześniejsze o dwa wieki badania Linneusza dotyczące ruchów płatków kwiatów i wykorzystanie tego zjawiska do „budowy” słynnego zegara kwiatowego w Uppsali, pozwoliły na stwierdzenie, że rośliny i zwierzęta posiadają zdolność mierzenia wpływającego czasu. Jeśli tak, to organizmy żywe posiadają rodzaj mechanizmu zegarowego, który nazwano zegarem biologicznym. Początkowo wyobrażano sobie, że sygnałem uruchamiającym zegar biologiczny jest bodziec pochodzący ze środowiska, na przykład wschód słońca, a więc, że mechanizm zegara funkcjonuje na prostej zasadzie: bodziec-reakcja. Owego bodźca szukano umieszczając badane zwierzę czy roślinę w stałych warunkach światła, temperatury, wilgotności (np. w głębokich jaskiniach). W przypadku wielu rytmicznych procesów bodźca takiego nie udało się jednak znaleźć. Kontrola zegara biologicznego przez czynniki zewnętrzne (zegar egzogeny) nie tłumaczy też w jaki sposób zwierzę może „przewidywać” pewne zjawiska, które będą dopiero zachodzić w środowisku. Jak wytłumaczyć np. fakt, że świerszcze rozpoczynają aktywność ruchową tuż przed zapadnięciem ciemności (15), lub że raptowny wzrost poziomu glukozy we krwi kurcząt wyprzedza o kilkanaście minut ich wzmożoną aktywność ruchową? (16).

Obecnie przyjmuje się powszechnie, że zegar biologiczny organizmów żywych działa dzięki wewnętrznym (endogennym) procesom cyklicznym powtarzającym się co dobę. Dla ich funkcjonowania nie jest potrzebny bodziec pochodzący ze środowiska zewnętrznego.

Molekularne modele endogennej kontroli rytmów okołodobowych zostaną przedstawione w rozdziale VI.

Przeciwną koncepcję — egzogenne zegara biologicznego — lansuje F. A. B r o w n, który przypisuje pewnym czynnikom zewnętrznym (ruchy gwiazd i planet, promieniowanie kosmiczne, czynniki geofizyczne) zasadniczą rolę w uruchamianiu zegara biologicznego (17).

I-2. Rytmu endogenne i egzogenne. Kryteria ich klasyfikacji

Koncepcja endogennej kontroli zegara biologicznego nie jest oczywiście równoznaczna z negowaniem dobowych rytmów egzogennych. Te ostatnie nie pozostają pod kontrolą zegara biologicznego, a powstają na skutek cyklicznie powtarzających się zmian środowiska zewnętrznego. Koncepcja endogennej kontroli nie oznacza również, że odrzuca się wpływ środowiska zewnętrznego na endogenne zegar biologiczny. Przeciwnie, środowisko (światło, ciemność, temperatura, wilgotność, bodźce akustyczne, pożywienie) jest bardzo istotnym czynnikiem synchronizującym rytmy. To właśnie synchronizatory powodują, że na przykład w danej grupie, czy populacji wszystkie zwierzęta są zsynchronizowane w fazie w stosunku do czasu lokalnego, co oznacza, że maksima i minima intensywności danego procesu przypadają o tej samej porze dnia i nocy u wszystkich osobników. W literaturze światowej na oznaczenie synchronizatorów używa się terminu *Zeitgeber* zaproponowanego przez Aschoffa.

Jakie kryteria przyjęto zatem dla oznaczenia endogenne charakteru badanego rytmu dobowego? Otóż rytm można nazwać endogenne jeśli będzie spełniał następujące warunki:

- będzie się utrzymywać w stałych warunkach środowiska, po wyeliminowaniu możliwie wszystkich rytmicznie powtarzających się bodźców;
- w stałych warunkach, na skutek usunięcia synchronizatora, ujawni się rytm spontaniczny (*free running rhythm*) będący „czystym” rytmem endogenne. Długość okresu rytmu wynosić będzie wówczas nie jak poprzednio 24 godz., lecz będzie się wahać w zależności od rodzaju procesu i organizmu od 20 do 28 godz.;
- na skutek skracania lub wydłużania okresu rytmu wystąpi tzw. zjawisko dryfowania rytmu polegające na tym, że początek i koniec rytmu przesuwa się każdej doby o pewną, stałą wartość w stosunku do czasu lokalnego (porównaj Ryc. 3).

I-3. Niejednoznaczność terminów „okołodobowy” i „dobowy”

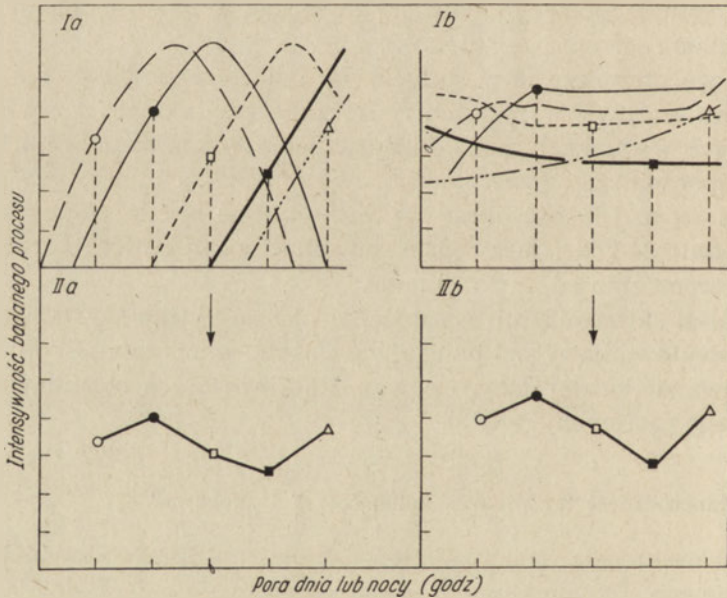
W celu uniknięcia nieporozumień Komitet do Spraw Słownictwa Międzynarodowego Towarzystwa Chronobiologicznego zalecił w 1973 stosowanie terminu „okołodobowy” (*circadian*; *circa* — około, *dies* — dzień) jedynie do rytmów mających endogenne charakter. O rytmach egzogennych, lub też w przypadkach wątpliwych należy mówić „rytmu dobowe” (*diurnal*, *24 hours rhythm*).

I-4. Niektóre problemy metodyczne badań rytmów dobowych

W badaniach rytmu dobowego danego procesu istotna jest umiejętność śledzenia jego przebiegu w czasie w tym samym zwierzęciu czy roślinie. W przypadku takich procesów jak na przykład aktywność ruchowa szczura, składanie jaj przez owady, czy ruchy liści roślin nie stwarza to trudności — obserwacje można prowadzić przez dowolnie długi okres czasu. Należy jedynie zwracać uwagę na to, aby warunki środowiska zewnętrznego były ściśle kontrolowane. Tego ostatniego warunku trzeba przestrzegać zwłaszcza gdy chodzi o wyeliminowanie synchronizatorów i zbadanie rytmu spontanicznego ujawniającego się w stałych warunkach środowiska.

Sprawa znacznie się komplikuje, gdy zbadanie danego procesu wiąże się z koniecznością uśmiercenia zwierzęcia, jak na przykład w przypadku badania pewnych procesów biochemicznych. Najczęściej schemat doświadczenia wygląda wówczas następująco: grupę zwierząt synchronizuje się przez kilka dni hodując w zmiennych warunkach światła i ciemności na przykład 12 godz. światła (L) i 12 godz. ciemności (D) — LD 12:12. Następnie co kilka godzin w ciągu doby zabija się jedno lub więcej zwierząt, izoluje potrzebną tkankę i przeprowadza oznaczenia.

Hodowanie zwierząt w stałych warunkach środowiska, w nieobecności synchronizatora prowadzi do ich rozsynchronizowania w stosunku do cza-



Ryc. 1. Schemat przebiegu zjawiska (I) oraz wyników otrzymanych z doświadczenia (II) przeprowadzonego na grupie zwierząt rozsynchronizowanych pod względem badanego procesu w stosunku do czasu lokalnego.

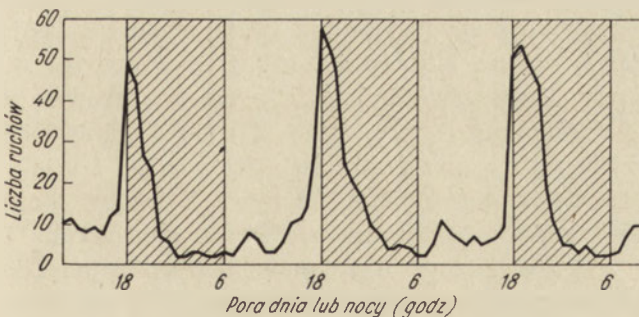
a — poszczególne osobniki grupy rytmicznej; b — poszczególne osobniki grupy nierytmicznej.
Intensywność procesu wyrażona w jednostkach umownych

su lokalnego. Grupa jako całość staje się arytmiczna nawet wówczas, gdy poszczególne osobniki nie utraciły rytmu. To pozornie paradoksalne stwierdzenie wyjaśnia rycina 1, z której widać, że wyniki doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach rozsynchronizowanych w stosunku do czasu lokalnego nie są miarodajne. Bardzo zbliżone wyniki otrzymano w przypadku obydwu badanych grup zwierząt, chociaż osobniki pierwszej grupy były rytmiczne, a drugiej nierytmiczne pod względem badanego procesu. Dopóki więc nie potrafimy badać danego procesu przez okres co najmniej 24 godz. na tym samym zwierzęciu (w przypadku badania rytmu aktywności enzymu wyjściem z sytuacji byłoby zastosowanie biopsji), dopóty nie możemy stwierdzić metodami bezpośrednimi, czy jego rytm ma charakter endogenny. Metody pośrednie stosowane w badaniach rytmu aktywności enzymów zostaną omówione w rozdziale II-2.

I-5. Przykłady procesów charakteryzujących się rytmiką dobową

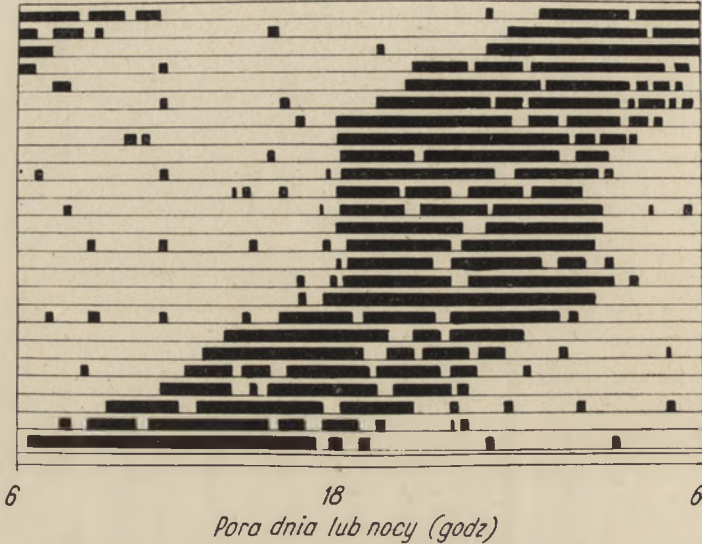
Z rytmami okołodobowymi czy dobowymi spotykamy się przy omawianiu bardzo wielu (choć nie wszystkich) procesów zachodzących w roślinach i zwierzętach — ogólniej — we wszystkich organizmach eukariotycznych. Dlatego też niemożliwe będzie tutaj choćby wymienienie wszystkich procesów charakteryzujących się rytmem dobowym. Zainteresowani znajdą obszerny ich opis w opracowaniach monograficznych (4). Tutaj ograniczymy się do przedstawienia procesów najlepiej poznanych pod względem rytmiki dobowej.

Organizmy jednokomórkowe, pomimo swej prostej budowy, wykazują rytm dobowy różnych procesów. I tak na przykład stwierdzono istnienie dobowego rytmu fototaksji *Euglena gracilis* (18), koniugacji *Paramecium* (19, 20), czy bioluminescencji, podziałów komórkowych i fotosyntezy *Gonyaulax polyedra* (21). Okazało się także, że wiele gatunków wchodzących w skład zooplanktonu charakteryzuje się rytmem dobowym przemieszczeń pionowych (22).



Ryc. 2. Aktywność ruchowa świerszcza w warunkach LD 12:12 (23). Zakreśkowany obszar oznacza okres ciemności.

Wśród rytmów dobowych organizmów wielokomórkowych bodajże najlepiej poznano rytm aktywności ruchowej (Ryc. 2 i 3). Piśmiennictwo związane z tym zagadnieniem jest olbrzymie — zarówno dotyczące zwierząt bezkręgowych jak i kręgowych. Na rycinie 3 przedstawiono aktywność ruchową chomika syryjskiego w stałych i zmiennych warunkach świetlnych. W warunkach stałej ciemności widać dryfowanie rytmu, zastosowanie zmiennych warunków światła i ciemności synchronizuje rytm aktywności ruchowej.



Ryc. 3. Rytm aktywności i spoczynku chomika syryjskiego w warunkach DD (1—6 doba) LD (7—16 doba) i ponownie w DD (17—25 doba) (24). Pola zaciemnione oznaczają okresy aktywności; linie poziome — kolejne doby doświadczenia

Z innych badanych od lat powtarzających się rytmicznie procesów wymienić można dobowy rytm snu i czuwania zwierząt (25), czy rytm orientacji przestrzennej zwierząt (26).

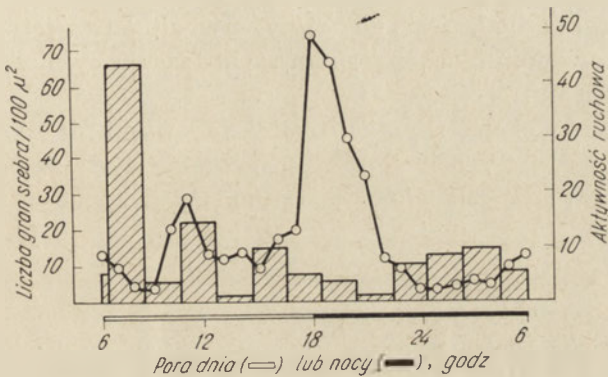
Wszystkie wspomniane powyżej rytmy dotyczyły zwierzęcia jako całości. Rytmu dobowe zachodzą jednak także w obrębie pojedynczej komórki. Od dawna znano fakt istnienia rytmu dobowego podziałów komórkowych, przy czym stwierdzano to zjawisko zarówno w przypadku organizmów jednokomórkowych (27, 28, 29) jak i w niektórych tkankach roślinnych i zwierzęcych (przegląd literatury według 1 i 2).

Rytmu dobowe zmian morfologicznych komórek obejmują zmiany wielkości jądra komórkowego, oraz zmiany zachodzące na terenie cytoplazmy (30, 31, 32). Wyraźny rytm dobowy wielkości jądra komórkowego stwierdzono między innymi w komórkach wyizolowanych z gruczołów śliniankowych *Drosophila* (33), jak również w hodowanych *in vitro* ludzkich i szczurzych komórkach prawidłowych i stransformowanych (34). Te

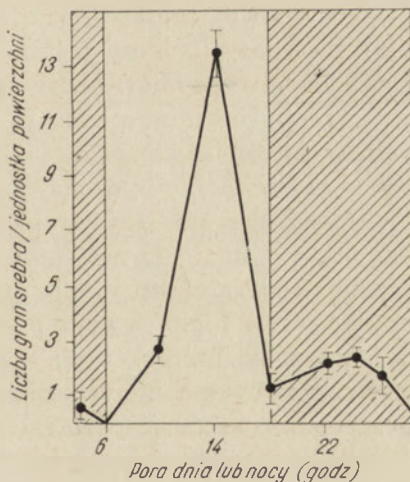
ostatnie badania miały na celu stwierdzenie czy transformowane komórki różnią się od prawidłowych dobowymi zmianami wielkości jądra.

Przykładem dobowego rytmu procesów metabolicznych komórek jest — stwierdzony przy zastosowaniu metody autoradiograficznej — rytm syntezy RNA na terenie komórek neurosekrecyjnych *pars intercerebralis* mózgu i zwoju podprzłykowego świerszczy (Ryc. 4) (35). Dobowy rytm syntezy białek na terenie wspomnianych powyżej komórek wykazano również metodą autoradiograficzną stosując mieszaninę znakowanych aminokwasów (Ryc. 5) (36).

Dobowe rytmy biochemiczne od lat stanowiły przedmiot zainteresowania badaczy. Zgromadzono olbrzymią ilość obserwacji, które nie zawsze



Ryc. 4. Dobowe zmiany poziomu syntezy RNA w komórkach neurosekrecyjnych *pars intercerebralis* mózgu świerszczy hodowanych w warunkach LD 12:12 (35). Linia ciągła zaznaczono aktywność ruchową świerszczy wyrażoną jako liczbę ruchów/godz; słupki odpowiadają intensywności syntezy RNA



Ryc. 5. Dobowe zmiany poziomu syntezy białka w komórkach neurosekrecyjnych *pars intercerebralis* mózgu świerszczy hodowanych w warunkach LD 12:12 (36). Zakreskowany obszar oznacza okres ciemności

jeszcze można interpretować w ramach jednej, spójnej koncepcji. Dysponujemy obecnie wieloma danymi eksperymentalnymi na temat dobowych zmian poziomu glukozy i innych cukrów, cholesterolu, wolnych kwasów tłuszczowych czy hormonów w surowicy krwi i w innych cieczach ciała (16, 37—42), oraz poziomu hormonów i amin biogennych w mózgu i przysadce mózgowej kręgowców i w innych tkankach zwierząt bezkręgowych (43—48).

Główny przedmiot niniejszego artykułu stanowią jednak rytmy dobowe aktywności enzymów, oraz teorie molekularnego podłoża rytmów biologicznych, które należy dziś przede wszystkim traktować jako pożyteczne robocze hipotezy. Ich rozwiązanie ma niezwykle doniosłe znaczenie dla współczesnej chronobiologii. Problem ten łączy się bowiem ściśle z zagadnieniem zegara biologicznego, który — według przyjętych założeń — działa dzięki reakcjom biochemicznym zachodzącym cyklicznie na terenie komórek organizmu.

Badania nad biochemicznymi rytмами dobowymi nie są dziś kompletne, ani zakończone. Przeciwnie. Przedstawienie tych zagadnień ma na celu zasygnalizowanie jak wiele jeszcze należy dokonać w tej dziedzinie w przeszłości.

II. Rytmy dobowe aktywności enzymów

Badania nad dobowymi rytмами aktywności enzymów datują się od niedawna; ich wyniki są fragmentaryczne i obejmują stosunkowo niewielką liczebnie grupę enzymów. Punkt wyjścia badań tego typu stanowi stwierdzenie występowania wyraźnych, charakterystycznych zmian aktywności enzymu w różnych porach dnia i nocy, co obserwowano w przypadku dekarboksylazy ornitynowej, glukokinazy, reduktazy hydroksymetyloglutaryloCoA (49), histydazy (50), czy fosfatazy kwaśnej (51).

W przypadku jedynie niewielu enzymów badano mechanizm dobowych zmian ich aktywności. Do grupy tej można zaliczyć: O-metylotransferazę hydroksyindolu izolowaną z szyszynki szczurów (52), pirolazę tryptofanową (53), transaminazę tyrozynową (54), α -hydroksylazę cholesterolu (55) — wszystkie izolowane z wątroby szczurów, czy wreszcie lucyferazę izolowaną z jednokomórkowego organizmu *Gonyaulax polyedra* (56).

Grupę najlepiej poznaną pod względem rytmiki dobowej stanowią enzymy izolowane z wątroby szczurów i innych gryzoni, a wśród nich enzymy katalizujące przemiany aminokwasów (Tabela 1).

W dalszym ciągu tego rozdziału omówionych zostanie szczegółowiej kilka enzymów, z uwypukleniem złożoności problemów na jakie napotyka badacz rytmów dobowych. Wyboru tych enzymów dokonano zatem nie pod kątem ich szczególnej roli w metabolizmie komórkowym, ale pod kątem znajomości mechanizmu odpowiedzialnego za powstawanie dobowego rytmu ich aktywności.

Tabela 1

Dobowe rytmy enzymów katalizujących przemiany aminokwasów w wątrobie gryzoni (zmodyfikowana, według 54)

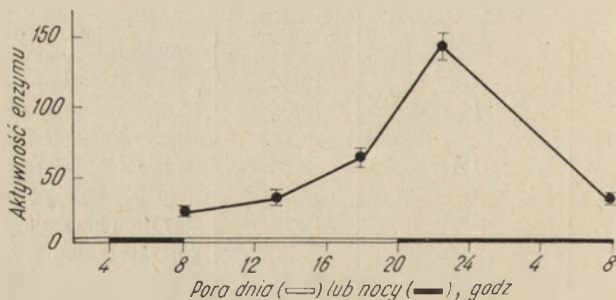
Enzym	Maksymalna aktywność		Obserwacje
	pora występowania	amplituda	
Pirolaza tryptofanowa(57)	D8	100%	Usunięcie nadnerczy zmniejsza amplitudę o połowę.
Pirolaza tryptofanowa(50)	D1 — D6	100%	Rytm jest prawdopodobnie odbiciem syntezy enzymu <i>de novo</i> .
Pirolaza tryptofanowa(58)	D1	80%	Podawanie zwierzętom jednego posiłku dziennie powoduje przesunięcie rytmu bez zmiany rytmu poziomu kortykosteronu w osoczu krwi.
Pirolaza tryptofanowa(59)	D1	100%	Zmiana pory posiłku białkowego ma mniejszy wpływ niż na rytm transaminazy tyrozynowej.
Pirolaza tryptofanowa(60)	D4	30%	Wzrost aktywności enzymu poprzedza porę pobierania przez zwierzę pokarmu.
Transaminaza argininowa(61)	L2 — L6	25%	Rytm ulega zmianie przy zmienionych warunkach świetlnych.
Transaminaza ornitynowa(62)	okres ciemności	—	Stwierdza się rytm tylko wówczas, gdy zawartość białka w diecie większa niż 60%.
Dekarboksylaza ornitynowa(63)	D2	8—10x	Rytmu brak u zwierząt odżywiających się pokarmem bezbiałkowym, oraz po usunięciu nadnerczy lub przysadki mózgowej.
Dekarboksylaza ornitynowa(64)	D6	6x	Szczyt aktywności przesunięty po podaniu pokarmu w środku okresu ciemności.
Aminotransferaza alaninowa(65)	D1 — D6	50%	—
Aminotransferaza alaninowa(65)	D1 — D3	80%	—
Hydroksylaza fenylalaninowa(66)	D4	100%	Amplituda zmniejsza się o połowę po 24-godz. głodzeniu.
Transaminaza tyrozynowa(54)	D3	300%	Porównaj rozdz. II-1.

D1, L2 — kolejne godziny okresu ciemności(D) lub światła(L).

II-1. Dobowy rytm aktywności transaminazy tyrozynowej

Badania nad dobowym rytmem aktywności transaminazy tyrozynowej, enzymu katalizującego dezaminację tyrozyny, datują się od szeregu lat; ostatnio ukazał się też na ten temat wyczerpujący artykuł przeglądowy (54). Badana *in vitro* aktywność transaminazy tyrozynowej z wątroby szczu-

rów hodowanych w zmiennych warunkach światła i ciemności (LD 12:12) różni się znacznie w zależności od pory doby, w której pobierano wątrobę do oznaczeń (Ryc. 6). Wyraźny szczyt aktywności enzymu obserwuje się po około 4 godzinach od momentu zapadnięcia ciemności.



Ryc. 6. Dobowy rytm aktywności transaminazy tyrozynowej z wątroby szczurów (54). Aktywność enzymu wyrażono w μM produktu/g wątroby/godz.

Na istotne pytanie czy zmiany aktywności enzymu są efektem zmian ilości białka enzymatycznego dały odpowiedź badania, w których oznaczano poziom antygeny w wyciągach wątrobowych za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko temu enzymowi (67). Wyniki immunoiareczkowania jak i pulsowego piętnowania transaminazy tyrozynowej, a następnie jej immunoprecypitacji wykazały, że dobowe zmiany aktywności enzymu spowodowane są zmiennym tempem jego syntezy. Badając wpływ 5-azytydyny i cykloheksimidu stwierdzono ponadto, że zwiększona synteza białka enzymatycznego jest wynikiem stymulacji zarówno na poziomie transkrypcyjnym jak i posttranskrypcyjnym (68).

Próbując wyjaśnić pochodzenie i mechanizm rytmu aktywności transaminazy tyrozynowej zwrócono uwagę, że jej aktywność wzrasta po podaniu zwierzęciu tyrozyny lub tryptofanu (69). Zbadano więc w różnych porach doby aktywność enzymu, oraz równolegle poziom wolnej tyrozyny i tryptofanu w wątrobie. W przypadku tryptofanu wykazano, że jego poziom wzrasta wyraźnie na kilka godzin przed wzrostem aktywności transaminazy tyrozynowej (70).

W wątrobie, w odróżnieniu od innych narządów, stężenie aminokwasów wzrasta gwałtownie po zjedzeniu przez zwierzę pokarmu białkowego. Stwierdzono, że w wątrobie szczurów hodowanych na diecie nisko- lub bezbiałkowej obserwuje się obniżenie o 90% dobowych zmian aktywności transaminazy tyrozynowej, a czasami nawet ich całkowity zanik. Upředni rytm aktywności enzymu pojawiał się, gdy szczurom podawano dietę zawierającą białko lub mieszaninę podstawowych aminokwasów. Opuszczenie tryptofanu w diecie powodowało jednak zanikanie rytmu (70). Szczególną rolę tryptofanu w fizjologicznej regulacji aktywności trans-

aminazy tyrozynowej daje się wytłumaczyć udziałem tego aminokwasu w kontroli stopnia agregacji polisomów wątroby. Jak wykazano bowiem, w komórkach wątroby tryptofan powoduje agregację wolnych rybosomów z mRNA tworząc polisomy — jednostki syntezy białka (71, 72, 73). Badania agregacji polisomów wątroby szczura wykazały występowanie ściśle określonego rytmu dobowego tworzenia tych struktur. Rytm ten, podobnie jak rytm aktywności transaminazy tyrozynowej, zanikał w komórkach wątroby zwierząt karmionych pokarmem bezbiałkowym pozbawionym tryptofanu (74). Słuszna zatem wydaje się sugestia, że zmiany aktywności transaminazy tyrozynowej są odbiciem cyklicznej syntezy enzymu następującej na skutek rytmicznych zmian agregacji polisomów (70).

Wyniki powyższych badań sugerują, że głównym czynnikiem zapoczątkowującym rytm aktywności transaminazy tyrozynowej jest cykliczny wpływ aminokwasów pokarmu do wątroby zwierzęcia. Ten egzogeny czynnik zależy z kolei zarówno od składu pokarmu jak i od tendencji zwierzęcia do odżywiania się w pewnych, ściśle określonych porach doby (behawioralny czynnik endogeny).

Ciekawe w tym kontekście są badania transaminazy tyrozynowej w wątrobie noworodków szcurzych (75). Po 48 godz. od momentu urodzenia obserwuje się wyraźny rytm aktywności tego enzymu przesunięty jednak w fazie w stosunku do rytmu obserwowanego w wątrobie dorosłych szcurów. Jak się wydaje, jest to wynik odżywiania się młodych szcurów w dzień, w przeciwieństwie do dorosłych osobników głównie żerujących nocą.

Drugim czynnikiem, obok pokarmowego, mającym wpływ na cykliczną syntezę transaminazy tyrozynowej jest czynnik hormonalny — poziom glukokortykoidów we krwi. Udział jego jest niewątpliwie mniejszy niż czynnika pokarmowego, na co wskazują wyniki badań na zwierzętach, którym usunięto nadnercza, a w wątrobie których w dalszym ciągu stwierdzano rytm dobowy aktywności transaminazy tyrozynowej (76). Dobrze uchwytne, choć zmniejszone o 90%, dobowe zmiany aktywności transaminazy tyrozynowej obserwowane w wątrobie zwierząt karmionych dietą bezbiałkową związane są właśnie ze zmianami ilości glukokortykoidów uwalnianych przez nadnercza do krwi.

W u r t m a n (54), rozważając fizjologiczne znaczenie rytmu dobowego transaminazy tyrozynowej wskazuje, że jego kontrola może być dwojaka w zależności od stanu fizjologicznego zwierzęcia. Aktywność enzymu w wątrobie szcurów nie głodzonych i nie będących pod wpływem stresu wzrasta po spożyciu przez zwierzę pokarmu białkowego. Enzym, rozkładając tyrozinę, zapobiega nagromadzeniu się tego toksycznego związku. Inaczej jest w wątrobie szcurów pozbawionych pokarmu lub pozostających w stanie stresu, gdzie po 18—24 godz. głodzenia obserwuje się gwałtowny wzrost aktywności transaminazy tyrozynowej. Wzrost ten następuje pod wpływem kortykoidów nadnerzy (których poziom we krwi zwierzęcia

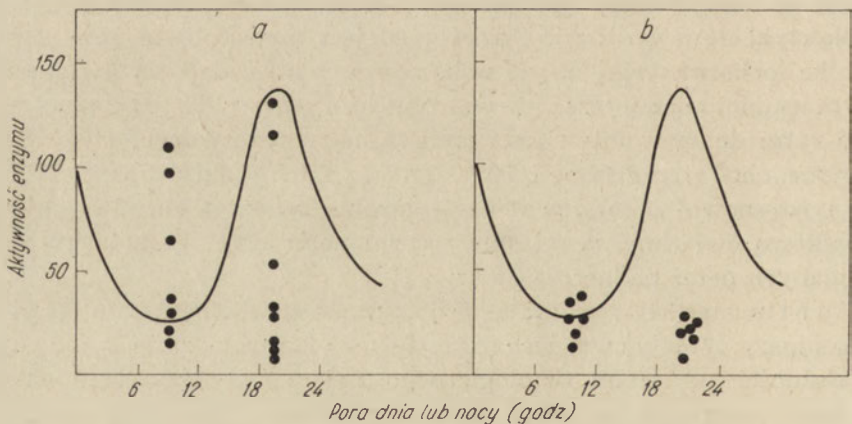
wzrasta wielokrotnie), a enzym katalizując dezaminację tyrozyny daje związek, który może być dalej metabolizowany z wytworzeniem energii.

II-2. Dobowy rytm aktywności 7 α -hydroksylazy cholesterolu

7 α -hydroksylaza cholesterolu, jako enzym limitujący szybkość przemiany cholesterolu w kwasy żółciowe, posiada kluczowe znaczenie w metabolizmie cholesterolu. Enzym ten wykazuje bardzo wyraźny dobowy rytm aktywności (Ryc. 7), który wydaje się być następstwem syntezy *de novo* zachodzącej przy końcu dnia i na początku nocy, oraz krótkiego okresu półtrwania (77).

Van Cantfort badający od szeregu lat regulację dobowego rytmu aktywności 7 α -hydroksylazy cholesterolu wykazał, że na poziom aktywności enzymu wpływa stężenie kortykosteronu w osoczu krwi, natomiast pora odżywiania się zwierzęcia (warunkowana przez okres światła) działa jako główny czynnik synchronizujący rytm aktywności tego enzymu (78).

Endogenny charakter rytmu aktywności 7 α -hydroksylazy cholesterolu wykazano w sposób pośredni, używając do badań szczurów z wrodzoną ślepotą (*genetically blind rats*), co pozwoliło na wyeliminowanie czynnika synchronizującego (światło) (55). Aktywność enzymu oznaczano 2 razy w ciągu doby, w porach kiedy obserwuje się minimum i maksimum aktywności enzymu z wątroby zdrowych szczurów (Ryc. 7a). Otrzymano wów-



Ryc. 7. Aktywność 7 α -hydroksylazy cholesterolu w wątrobie szczurów z wrodzoną ślepotą badana przed wycięciem nadnerczy (a) i w 24 godz. po wycięciu nadnerczy (b) (55).

Czarnymi punktami oznaczono aktywność enzymu w wątrobie poszczególnych osobników; dla porównania zaznaczono linią ciągłą dobowy rytm aktywności tego enzymu zdrowych szczurów hodowanych w warunkach LD (6.00—18.00 światło; 18.00—6.00 ciemność). Aktywność enzymu wyrażono w nmolach produktu/g wątroby/godz.

czas duży rozrzut aktywności enzymu, co przemawia za istnieniem rytmu, który nie został zsynchronizowany przez warunki świetlne. Badając szczury z wrodzoną ślepotą, którym usunięto nadnercza (zabieg ten u zdrowych osobników prowadził do zaniku rytmu aktywności enzymu) stwierdzano natomiast niską aktywność (Ryc. 7b). Tak więc zarówno w przypadku zdrowych szczurów jak i zwierząt z wrodzoną ślepotą hormony kory nadnercza wydają się być odpowiedzialne za wzrost aktywności 7 α -hydroksylazy cholesterolu. Potwierdzają to doświadczenia wskazujące na liniową zależność między aktywnością enzymu a poziomem kortykosteronu w osoczu krwi.

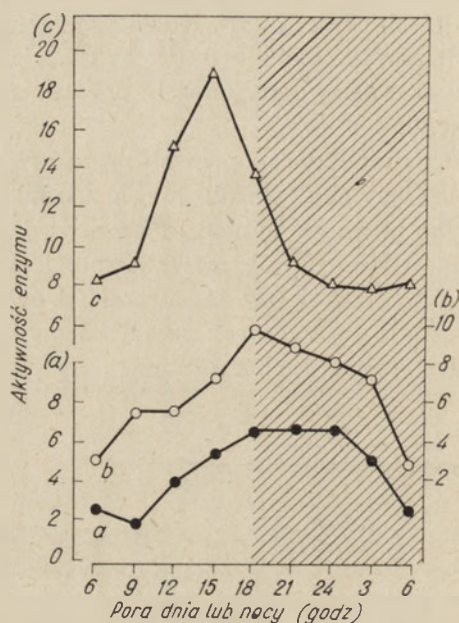
Wyniki powyższych doświadczeń pozwalają na stwierdzenie, że rytm aktywności 7 α -hydroksylazy cholesterolu nie jest indukowany przez czynniki środowiska, a tylko przez nie synchronizowany; oraz że światło, a nie jakieś inne niekontrolowane czynniki zewnętrzne, jest synchronizatorem rytmu. Zasadniczą różnicą pomiędzy szczurami zdrowymi i zwierzętami z wrodzoną ślepotą wydaje się być brak synchronizacji rytmu aktywności 7 α -hydroksylazy cholesterolu u tych ostatnich.

II-3. Dobowy rytm aktywności pirolazy tryptofanowej

Pirolaza tryptofanowa z wątroby szczurów hodowanych w zmiennych warunkach światła i ciemności (LD 12:12), podobnie jak szereg innych enzymów pochodzących z tego samego źródła (porównaj Tabela 1), wykazuje dobowy rytm aktywności (Ryc. 8). We wcześniejszych badaniach (57) stwierdzono, że rytm aktywności tego enzymu zależy od poziomu kortykosteroidu we krwi; nie udało się jednak znaleźć ścisłego związku pomiędzy stężeniem tego hormonu a aktywnością enzymu.

Przedstawione poniżej badania rytmu dobowego pirolazy tryptofanowej (53) miały na celu wykrycie czynników odpowiedzialnych za wzrost i spadek aktywności tego enzymu w czasie doby (na przykład synteza enzymu *de novo*, szybkość degradacji, wpływ inhibitorów, efekty allosteryczne). Rycina 8 obrazuje rytm aktywności pirolazy tryptofanowej badany po podaniu szczurom tryptofanu. Wiadomo, że związek ten nie ma wpływu na syntezę enzymu, natomiast zmniejsza szybkość jego degradacji poprzez stabilizację cząsteczki. Jeśli tak, to można oczekiwać wysokiej aktywności pirolazy tryptofanowej w czasie wzmożonej syntezy białka enzymatycznego. Ponieważ szczyt aktywności enzymu po podaniu tryptofanu przypada na okres kiedy wzrasta aktywność pirolazy tryptofanowej w wątrobie zwierząt nie poddawanych zabiegom, stąd wniosek, że wzrost ten jest rezultatem syntezy *de novo* enzymu. A jaki czynnik powoduje spadek aktywności widoczny w drugiej połowie okresu ciemności (Ryc. 8a)? W przypadku inhibicji allosterycznej enzymu jak i inaktywacji spowodowanej oddysocjowaniem koenzymu podobny spadek aktywności

obserwowano by również po podaniu szczurom tryptofanu. Tymczasem w tym przypadku (Ryc. 8c) w okresie ciemności aktywność utrzymuje się na stałym poziomie. Tak więc najprawdopodobniej aktywność pirolazy tryptofanowej obniża się na skutek degradacji enzymu; proces ten zostaje zahamowany po podaniu czynnika stabilizującego (tryptofan).

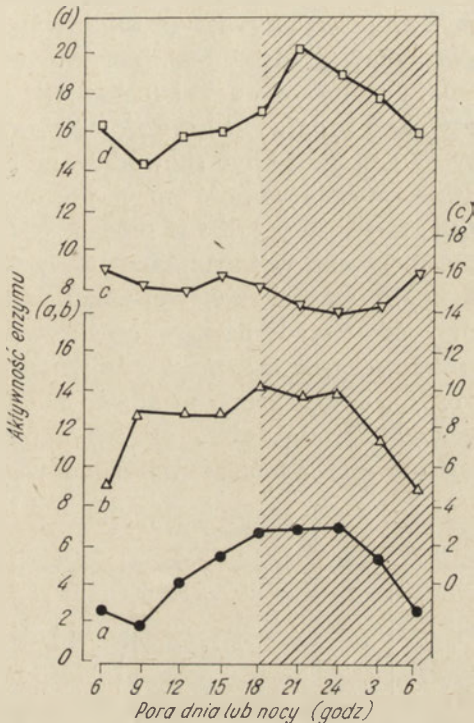


Ryc. 8. Dobowy rytm aktywności pirolazy tryptofanowej badany w wątrobie szczurow nie poddawanych zabiegom (a), oraz w 4 godz. po wstrzyknięciu roztworu NaCl jako kontroli (b), lub tryptofanu (c) (53).

Zakreskowany obszar oznacza okres ciemności. Aktywność enzymu wyrażona w μM kinureniny/g wątroby/godz.

By odpowiedzieć na pytanie jaki czynnik (lub czynniki) kontrolują szybkość syntezy pirolazy tryptofanowej na przestrzeni 24 godz. badano wpływ różnych dawek hydroksykortyzonu (hormonu stymulującego syntezę enzymu) na aktywność enzymu. Zakładano, że odpowiednio wysokie stężenie hormonu będzie stymulować syntezę enzymu, niezależnie od pory dnia czy nocy, w przeciwieństwie do niższych stężeń hydroksykortyzonu, gdzie szybkość syntezy powinna być zależna również od pojawiania się inhibitora (represora) syntezy. Zgodnie z przewidywaniami przebieg dobowych zmian aktywności enzymu po podaniu dużej dawki hormonu był zbliżony charakterem do normalnie obserwowanych. Natomiast w przypadku niższych dawek hormonu nie obserwowano wzrostu aktywności enzymu w okresie ciemności. A zatem w tym czasie stymulacja pirolazy tryptofanowej przez hydroksykortyzon obniża się na skutek obecności inhibitora syntezy czy represora.

Podsumowując otrzymane wyniki zaproponowano następujący hipotetyczny przebieg wydarzeń dający w konsekwencji dobowe zmiany aktywności badanego enzymu: obserwowany między godziną 9 a 18 wzrost aktywności jest wynikiem syntezy enzymu *de novo*. Po osiągnięciu maksymalnego tempa synteza zostaje zahamowana na przykład przez represor, a białko enzymatyczne podlega stopniowej degradacji. W wyniku tego aktywność pirolazy tryptofanowej ulega obniżeniu (między godz. 24 a 9), aż do momentu rozpoczęcia ponownej syntezy.



Ryc. 9. Dobowy rytm aktywności pirolazy tryptofanowej badanej w wątrobie szczurów nie poddawanych zabiegom (a), oraz w 4 godz. po wstrzyknięciu różnych dawek bursztynianu hydrokortyzonu: 2,5 mg/100 g wagi ciała (b); 10 mg/100 g wagi ciała (c); 20 mg/100 g wagi ciała (d).

Zakreskowany obszar oznacza okres ciemności (53). Aktywność enzymu wyrażona w μM kinureniny/g wątroby/godz.

II-4. Dobowy rytm aktywności esterazy acetylocholinowej

Badania dobowego rytmu aktywności esterazy acetylocholinowej z tkanek owadów stanowią dobry przykład, jak trudności metodyczne ograniczają możliwości badacza, a w konsekwencji zmuszają do ostrożnego wyciągania wniosków z otrzymywanych wyników (4).

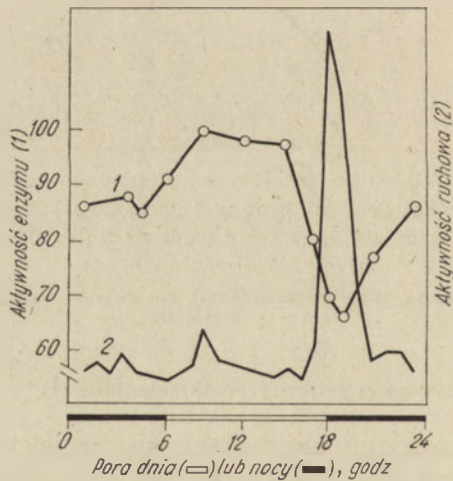
Badając esterazę acetylocholinową w ekstraktach z całych owadów *Anthonomus grandis* hodowanych w zmiennych warunkach światła i ciem-

ności (LD 14:10) stwierdzono dobowy rytm aktywności tego enzymu (79). Szczyt aktywności esterazy acetylocholinowej przypadał na okres światła, a więc wówczas gdy owady te wykazywały maksymalną ruchliwość. Natomiast w warunkach stałego światła nie obserwowano dobowego rytmu aktywności tego enzymu.

Ponieważ do badań użyto dużej ilości osobników trudno jest stwierdzić, czy brak dobowych wahań aktywności esterazy acetylocholinowej w warunkach stałego światła został spowodowany jedynie przesunięciem fazy rytmu u poszczególnych osobników (grupa jako całość rytmiczna), czy też mamy do czynienia z rzeczywistym zanikiem rytmu u poszczególnych osobników (porównaj (rozdział I-4). Ponadto brak jest informacji o aktywności ruchowej owadów w warunkach stałego światła.

Inne wyniki otrzymano badając aktywność esterazy acetylocholinowej w mózgu świerszczy (80), co może być spowodowane między innymi tym, że w przypadku *Anthonomus* aktywność enzymu oznaczano w całych owadach, zaś w przypadku świerszczy tylko w mózgu.

Grupa świerszczy hodowana w warunkach LD 12:12 charakteryzowała się wyraźnym rytmem aktywności ruchowej z maksimum w okresie ciemności. W mózgu tych owadów stwierdzono rytm aktywności esterazy acetylocholinowej przesunięty jednak w fazie w porównaniu z rytmem aktywności ruchowej (Ryc. 10). Druga grupa owadów, hodowana w warunkach stałego światła, nie wykazywała rytmu aktywności ruchowej, a esteraza acetylocholinowa izolowana z mózgu tych owadów nie posiadała rytmu aktywności.



Ryc. 10. Dobowy rytm aktywności esterazy acetylocholinowej w mózgu świerszczy hodowanych w warunkach LD 12:12, (80).

Aktywność ruchową wyrażono jako ilość ruchów/godz. Aktywność enzymu wyrażono jak aktywność względną, przyjmując za 100% najwyższą stwierdzoną aktywność tzn. aktywność o godz. 9

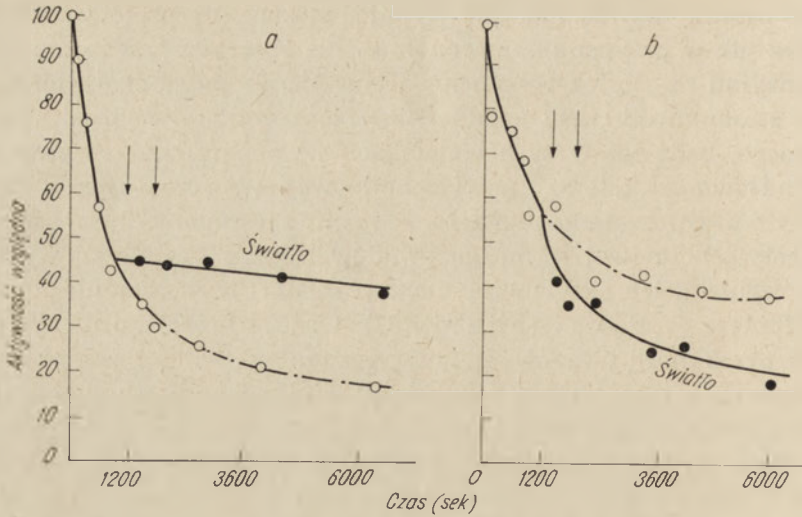
Ten ostatni wynik, jak się wydaje, można interpretować dwojako: bądź, tak jak w przypadku *Anthonomus*, nie obserwowano rytmu aktywności enzymu na skutek rozsynchronizowania się poszczególnych osobników w stosunku do czasu lokalnego w nieobecności synchronizatora zewnętrznego, bądź też w tych warunkach występował rzeczywisty zanik rytmu aktywności esterazy acetylocholinowej. Wówczas usprawiedliwione by było przypuszczenie mówiące, że rytmiczne zmiany aktywności esterazy acetylocholinowej w mózgu owadów mogą uczestniczyć w mechanizmie regulacji ich aktywności ruchowej (80). Przypuszczenie to zgadza się z hipotezą Venkatachari (81), według której hormony produkowane przez mózg owadów regulują poziom aktywności esterazy acetylocholinowej, a tym samym wpływają na układ nerwowy kontrolujący bezpośrednio rytm aktywności ruchowej.

Te same wyniki można by jednak także wytłumaczyć zakładając, że obydwa rytmy (rytm aktywności esterazy acetylocholinowej i rytm aktywności ruchowej) pozostają pod kontrolą wspólnego ośrodka nadrzędnego i przebiegają równolegle, zupełnie od siebie niezależnie.

III. Model regulacji aktywności enzymów przez zmienne warunki świetlne

Ze względu na szczególną rolę światła w synchronizacji rytmów dobowych ciekawe wydaje się omówienie tutaj układu, który służyć może jako model regulacji aktywności enzymów przez zmienne warunki świetlne (82). W układzie tym reakcja enzymatyczna sama w sobie niewrażliwa na światło może podlegać regulacji przez wrażliwy na światło niskocząsteczkowy efektor. Stwierdzono, że w przypadku chymotrypsyny rolę takiego efektora może odgrywać chlorek *p*-azafenylodwufenylokarbamylu występujący w postaci dwóch izomerów *cis* i *trans*, które przechodzą w sobie odwracalnie przy różnych długościach światła. Izomer *cis* jest 5 razy silniejszym inhibitorem niż izomer *trans*. Tak więc używając światła o odpowiedniej długości fali można regulować szybkość inaktywacji chymotrypsyny.

Podobnie aktywność esterazy acetylocholinowej może być odwracalnie regulowana przez światło za pośrednictwem fotochromowego inhibitora — fluorku *N-p*-fenyloazafenylo-*N*-fenylokarbamylu (83). Mieszaninę reakcyjną zawierającą esterazę acetylocholinową i inhibitor wystawiano na działanie światła widzialnego lub UV i badano aktywność enzymu. Kontrolę stanowiła aktywność enzymu badana w nieobecności inhibitora. Jak widać na rycinie 11, w zależności od rodzaju światła, na działanie którego wystawiono mieszaninę enzym—inhibitor, aktywność esterazy acetylocholinowej obniżała się lub wzrastała w stosunku do próby nienaświetlonej.



Ryc. 11. Wpływ światła na reakcję fluorku N-fenylazafenylo-N-fenylkarbamylu z esterazą acetylocholinową (83).

a — reakcja z izomerem cis; b — reakcja z izomerem trans. Dokładny opis doświadczenia znajduje się w tekście

Zdaniem autorów omawianych prac fototropowy inhibitor może być odpowiedzialny za dobowy rytm aktywności esterazy acetylocholinowej omawiany w rozdziale II-4, czy O-metylotransferazy hydroksyindolu (rozdział IV).

IV. Dobowe rytmy biochemiczne w niektórych narządach organizmu

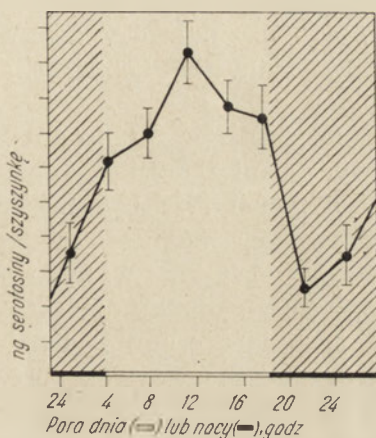
Wpływ światła na „zegar biologiczny” roślin i zwierząt nie jest, jak się wydaje, bezpośredni. U kręgowców, obok drogi wzrokowej, stwierdzono istnienie pozasiatkówkowej drogi recepcji światła w mózgu czy w pewnych jego rejonach. Szczególną rolę pełni w tym procesie szyszynka będąca niezwykle bogatym źródłem serotoniny i noradrenaliny. Zdaniem większości badaczy melatonina, uważana za hormon (syntetyzowana według schematu 1), a także enzym katalizujący ostatni etap jej biosyntezy — O-metylotransferaza hydroksyindolu są specyficzne dla szyszynki.

tryptofan → hydroksytryptofan → serotonina → N-acetyloserotonina → melatonina (1)

Stwierdzono, że w szyszynce poziom melatoniny, oraz takich amin biogennych jak serotonina (Ryc. 12), noradrenalina (85) i histamina (86) cechuje rytm dobowy zależny od warunków świetlnych. Poziom melatoniny w szyszynce szczurów wyższy jest w okresie ciemności (87); podobnie dobowy rytm aktywności O-metylotransferazy hydroksyindolu, obserwo-

wany w zmiennych warunkach światła i ciemności, charakteryzuje maksimum aktywności występujące w ciemności (52). Uważano zatem, że enzymem limitującym syntezę melatoniny jest O-metylotransferaza hydroksyindolu.

Istnieją jednak dane wskazujące, że zawartość melatoniny w szyszynce w stałych warunkach świetlnych również zmienia się cyklicznie choć nie obserwuje się wówczas rytmu aktywności O-metylotransferazy hydroksyindolu. Stwierdzono ten fakt zarówno w szyszynce zwierząt oślepionych jak i hodowanych w ciemności, przy czym obserwowano korelację w fazie rytmu poziomu melatoniny z rytmem dobowej aktywności zwierzęcia (88).



Ryc. 12. Dobowy rytm poziomu serotoniny w szyszynce dorosłych szczurów (samców) (84).

Zakreskowany obszar oznacza okres ciemności

Za tym, że wzrost zawartości melatoniny w szyszynce nie zawsze jest następstwem podwyższonej aktywności O-metylotransferazy hydroksyindolu przemawiają również wyniki poniższych eksperymentów. Noradrenalina oraz cAMP stymulują nawet 10-krotnie przemianę znakowanego tryptofanu w znakowaną melatoninę (89, 90). Hipotetyczny ciąg wydarzeń przedstawia się następująco: noradrenalina stymulując cyklazę adenylową powoduje wzrost stężenia komórkowego cAMP. Nukleotyd ten zwiększa syntezę *de novo* N-acetylotransferazy katalizującej N-acetylację serotoniny (schemat 1). W ten sposób w komórce podwyższeniu ulega poziom N-acetyloserotoniny będącej bezpośrednim prekursorem melatoniny. Obserwowany zwiększony poziom melatoniny nie jest zatem wynikiem wzrostu aktywności O-metylotransferazy hydroksyindolu (aktywność tego enzymu pozostaje prawie niezmienną), ale znacznie podwyższonej ilości substratu (89, 90).

Poziom cAMP w komórkach szyszynki wzrasta nie tylko pod wpływem noradrenaliny. Sześciokrotny wzrost stężenia cAMP pod wpływem światła stwierdzono w szyszynce zdrowych szczurów; zjawiska tego nie obser-

wowano w przypadku zwierząt oślepionych (91). Wydaje się, że stwierdzony pod wpływem światła wzrost stężenia cAMP w szyszynce był wynikiem szybszego tempa jego syntezy w okresie światła niż w okresie ciemności.

Osobne zagadnienie stanowi problem w jaki sposób impulsy świetlne przekazywane są do szyszynki. W przypadku amin biogennych stymulacja ich syntezy w szyszynce ssaków pod wpływem światła zachodzi poprzez układ: oko—sympatyczny układ nerwowy. W przeciwieństwie do dorosłych osobników impuls świetlny dociera do szyszynki młodych szczurów drogą pozasiatkówkową (92). Nie znamy jednak dotąd dokładnego miejsca występowania receptora tej drogi.

Szyszynka jest tylko jednym z narządów dokrewnych, na terenie których obserwuje się dobowe rytmy biochemiczne. O pozostałych wspomnimy w dużym skrócie.

Jednym z najdokładniej zbadanych spośród dobowych rytmów endokrynalnych jest rytm wydzielania kortykosteronu przez korę nadnerczy (przegląd literatury według 93). W surowicy szczurów hodowanych w zmiennych warunkach światła i ciemności, nie pozostających pod wpływem stresu obserwuje się 2—6-krotnie wyższy poziom kortykosteronu w godzinach popołudniowych w stosunku do rannych. W warunkach stałego światła rytm ten ulega zaburzeniu. Podobnie zahamowaniu ulega również rytmiczna sekrecja hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) z przysadki mózgowej.

Dobowe wahania poziomu hormonu wzrostu i prolaktyny stwierdzono w przysadce mózgowej i surowicy krwi kręgowców.

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat badano ponadto dobowy rytm sekrecji gonadotropin, który jest dobrze widoczny w przysadce mózgowej i krwi samców szczurów. Natomiast u samic rytm ten jest zamaskowany przez cykliczne zmiany związane z owulacją.

V. Niektóre zagadnienia dobowych rytmów biochemicznych roślin

Omawiane dotychczas dobowe rytmy biochemiczne dotyczyły materiału zwierzęcego. W ostatnich latach ukazało się jednak szereg prac traktujących o tych zjawiskach u roślin.

Jak się wydaje fizjologiczne i metaboliczne rytmy mają znaczenie adaptacyjne synchronizując roślinę z okresowymi zmianami klimatu (94). Znaczenie adaptacyjne rytmów dobowych roślin podkreślają również Wagner i Frosch (95) zakładając jednak, że jest to ewolucyjna adaptacja organizmów roślinnych do cyklicznego dziennego dopływu energii ze środowiska. Badacze ci (96), w poszukiwaniu mechanizmu endogennej rytmiki *Chenopodium rubrum* stwierdzili rytmiczne zmiany wielu różnorodnych procesów (Tabela 2).

W tym miejscu należy też wspomnieć o hipotezie mówiącej, że rytmy

Tabela 2

Zjawiska rytmiczne u *Chenopodium rubrum* (96)

Zjawisko	Długość okresu rytmu badanego zjawiska (godz)
Zakwitanie (97)	30
Akumulacja betacjanin (97)	24—30
Przemiana betacjanin (98)	24—30
Aktywność kinazy adenylowej (99, 100)	30
Zmiany stosunku NADPH/NADP (95)	21—24
Oddychanie w ciemności (101)	21—24
Akumulacja chlorofilu (97)	15
Fotosynteza (101)	15
Aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (99, 100)	15
Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej (102)	12—15
Aktywność dehydrogenazy glutaminianowej (102)	12—15
Aktywność dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej (103)	12—15
Zmiany puli nukleotydów pirydynowych NAD(H); NADP(H) (95, 103)	12—15

pewnych procesów biochemicznych o częstotliwościach rzędu sekund czy minut mogą stanowić podstawowy zegar kontrolujący zmiany o niższej częstotliwości na przykład dobowe (104). Hipoteza ta, zwana również teorią sprzężeń, dokładnie dyskutowana przez Pavlidisa (105), stanowiła punkt wyjścia w badaniach rytmu dobowego aktywności siedmiu różnych enzymów wchodzących w skład różnych szlaków metabolicznych w czasie kiełkowania nasion *Chenopodium rubrum* (106). Stwierdzono istnienie dwóch typów rytmów aktywności poszczególnych enzymów — o niskiej i o wysokiej częstotliwości.

Wpływ długiego i krótkiego dnia na dobowy rytm procesów metabolicznych szlaku prowadzącego od fosfoenolopirogronianu do cyklu kwasów trójkarboksylowych badano u *Kalanchoe blossfeldiana* (94). Roślina ta, tak jak wszyscy przedstawiciele rodziny *Crassulaceae*, charakteryzuje się zdolnością do akumulacji w pewnych warunkach kwasu jabłkowego w okresie nocy. Stwierdzono, że po przeniesieniu *Kalanchoe* w warunki krótkiego dnia następuje stopniowy wzrost aktywności kilku enzymów, między innymi karboksylazy fosfoenolopirogronianowej. Szczególną cechą tych zmian jest to, że wzrostowi aktywności enzymatycznej towarzyszy powstawanie dobowego rytmu aktywności enzymu.

Rozpatrując szereg hipotez wyjaśniających powstawanie dobowych zmian aktywności karboksylazy fosfoenolopirogronianowej podkreślano, że enzym ten odpowiedzialny jest za regulację całego rozpatrywanego szlaku metabolicznego.

VI. Endogenna kontrola rytmów okołodobowych

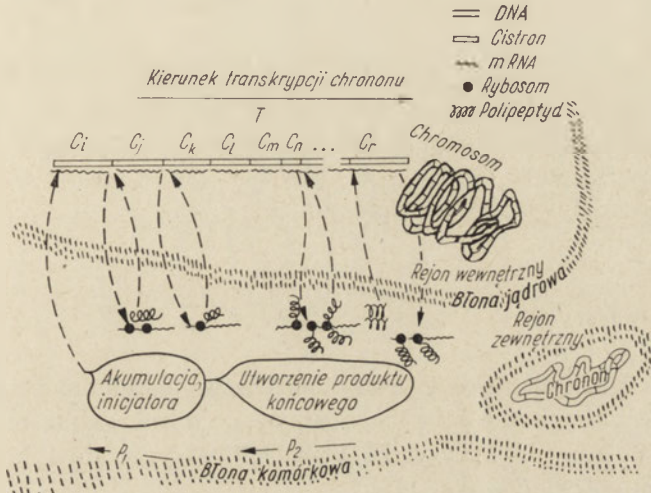
VI-1. Model Ehreta i Trucco

Rytmiczne procesy obserwowane w jednokomórkowych organizmach eukariotycznych wskazują, że mechanizmu rytmów dobowych należy poszukiwać na poziomie komórkowym. Jaki jest zatem udział poszczególnych organelli komórkowych w sterowaniu powtarzającymi się rytmicznie procesami? Usunięcie jądra z komórki glonu *Acetabularia* nie prowadzi do ustania rytmu fotosyntezy ani jego zaburzeń, co wskazywałoby na kluczową rolę cytoplazmy (107, 108). W tak uszkodzonej komórce stwierdza się w dalszym ciągu syntezę RNA (109). Można przypuszczać, że zachodzi ona na DNA chloroplastów. Powyższe doświadczenia nie przeczą więc hipotezie mówiącej, że u podłoża mechanizmu rytmów okołodobowych leży cyklicznie powtarzająca się transkrypcja mRNA z DNA (110). Rozwijająca tę sugestię koncepcja chrononu Ehreta i Trucco (110), wykazująca pewne podobieństwa z kilkoma wcześniejszymi hipotezami (111, 112) jest najpełniejszym modelem zaproponowanym dla wytłumaczenia endogennego charakteru rytmów dobowych w eukariotycznych organizmach.

„Sercem” omawianej koncepcji jest pojęcie chrononu. Zgodnie z hipotezą Ehreta i Trucco przyjmuje się, że każda komórka zawiera setki chrononów umiejscowionych w jądrze (chronony wewnątrzjądrowe), oraz w takich organellach komórkowych jak mitochondria czy plastydy (chronony pozajądrowe). Chronon w przedstawionym modelu jest policistronowym fragmentem DNA (200—2000 cistronów), którego transkrypcja przebiega jednokierunkowo i kolejno — począwszy od cistronu inicjującego C_i , a kończąc na cistronie terminalnym C_t (Ryc. 13). Przyjmuje się ponadto, że etapy poprzedzające kontrolują etap transkrypcji zachodząc na danym cistronie (na przykład regulacja przez specyficzne enzymy, o których informacja została zakodowana w poprzednim cistronie). Po zakończonej transkrypcji kolejnego cistronu następować mają tzw. międzycistronowe wydarzenia posttranskrypcyjne, na które składa się migracja mRNA z jądra (rejon wewnętrzny) do rybosomów położonych w rejonie zewnętrznym, translacja mRNA i migracje utworzonych cząsteczek enzymu w kierunku odwrotnym — do jądra. O ile proces transkrypcji jest niezwykle szybki ($0,1$ — $1,0$ cistrona sek^{-1}), o tyle następujące po nim wydarzenia międzycistronowe są stosunkowo bardzo wolne dzięki istnieniu podwójnej błony oddzielającej wewnętrzny rejon, w którym znajdują się chronony od rejonu zewnętrznego, w którym zachodzi translacja. Czas trwania całego procesu miałyby zatem kontrolować w pierwszym rzędzie szybkość dyfuzji.

Omówiono powyżej tylko transkrypcyjną (T) fazę cyklu okołodobowego. Według Ehreta i Trucco po jej zakończeniu ma miejsce tzw. przerwa

posttranskrypcyjna (P_2), w czasie której zachodzi synteza białka, oraz przerwa pretranskrypcyjna, w czasie której zakumulowane substancje inicjujące dyfundują do rejonu wewnętrznego, aby dać sygnał do rozpoczęcia transkrypcji na cistronie inicjującym (Ryc. 13). W ten sposób cały proces rozpoczyna się od nowa. Czas jego trwania, począwszy od transkrypcji cistronu inicjującego do końca przerwy pretranskrypcyjnej zbliżony jest do 24 godzin.



Ryc. 13. Hipotetyczny model transkrypcji chrononu Ehreta i Trucco (110)

P_1 — faza pretranskrypcyjna, T — faza transkrypcyjna, P_2 — faza posttranskrypcyjna; przerywane linie wskazują drogę dyfuzji makrocząsteczek.

W świetle omówionego modelu bezprzedmiotowe wydają się, wspomniane na wstępie, rozważania na temat umiejscowienia „zegara” zawiadującego rytmem procesów zachodzących w komórce. W utrzymaniu rytmu bierze bowiem udział zarówno jądro jak i cytoplazma, a po usunięciu jądra z komórki rolę wewnątrzjądrowych chrononów przejmują chronony pozajądrowe umożliwiając normalne funkcjonowanie procesów rytmicznych. Tak więc odczytywanie pewnych policistronowych fragmentów chloroplastowego DNA w komórkach pozbawionych jąder glonu *Acetabularia* mogłoby tłumaczyć ich niezmienny rytm fotosyntezy. Hipotezę tę sprawdzano badając wpływ rifampicyny, antybiotyku hamującego specyficznie polimerazę RNA zależną od DNA w chloroplastach, na rytm fotosyntezy komórek glonu *Acetabularia* (113). Zarówno w nie uszkodzonych jak i pozbawionych jąder komórkach glonu rifampicyna nie zmieniała rytmu fotosyntezy, pomimo wyraźnego zahamowania syntezy RNA. Wydaje się więc, że w przypadku *Acetabularia* rytm fotosyntezy nie zależy od powtarzanej co 24 godziny transkrypcji chloroplastowego czy jądrowego DNA.

Twórcy koncepcji chrononu przytaczają i dyskutują wiele danych eksperymentalnych potwierdzających model endogennej kontroli rytmów dobowych (110). Pozostaje jeszcze jednak szereg wyników badań nie dających się wytłumaczyć w oparciu o koncepcję chrononu. Niektórzy badacze odrzucają model Ehreta i Trucco twierdząc, że dotychczasowe hipotezy o biochemicznych czy biofizycznych podstawach „zegara biologicznego” nie są w pełni zadawalające (114, 115). Zdaniem B ü n n i n g a, jednego z pionierów chronobiologii, najbardziej obiecujące mogą okazać się badania zjawisk rytmicznych zachodzących w błonach biologicznych (115).

W dwu zaproponowanych ostatnio modelach kluczową rolę w powstawaniu rytmów przypisuje się właśnie błonom, zakładając kompartmentację i transport przez błony związków niskocząsteczkowych, które dzięki sprzężeniu zwrotnemu regulują własny transport poprzez zmiany stężeń. Modele te przedstawimy w skrócie poniżej.

VI-2. Model Sweeney

Dobowe rytmiczne procesy zachodzące w jednokomórkowym glonie *Acetabularia* dały S w e e n e y podstawę do opracowania modelu przedstawionego po raz pierwszy w 1971 na II Międzynarodowym Sympozjum poświęconemu *Acetabularia* (116).

Zgodnie z modelem Sweeney rytmy okołodobowe powstają na skutek zmian w składzie wewnątrzkomórkowym dwóch małych, niebiałkowych cząsteczek — X i Y migrujących odpowiednio z organelli do cytoplazmy lub z cytoplazmy do organelli. Hipotetyczny przebieg wydarzeń jest następujący: w momencie wyjściowym niestabilne cząsteczki X znajdują się wewnątrz organelli, do których wykazują duże powinowactwo. Cząsteczki X powodują, że błona staje się nieprzepuszczalna dla X i Y, a ponadto indukują one syntezę Y wewnątrz organelli.

Autorka zakłada, że cząsteczki X są niestabilne, a zatem ich stężenie wewnątrz organelli stopniowo spada, powodując wzrost przepuszczalności błony. Cząsteczki Y mogą więc dyfundować do cytoplazmy gdzie z kolei indukowałyby syntezę cząsteczek X. Nowo syntetyzowane cząsteczki X akumulują się w organellach, których błona staje się ponownie nieprzepuszczalna. Następuje powrót do fazy wyjściowej.

Przedstawiony model wydaje się dobrze tłumaczyć między innymi wpływ światła o dużej intensywności na dobowe rytmiczne procesy zachodzące w *Acetabularia*. Światło miałoby zmieniać własności błony, tak że byłaby ona przepuszczalna lub nie dla cząsteczek X i Y, uniemożliwiając tym samym zachodzenie dobowego rytmu, co istotnie obserwuje się w tych warunkach.

VI-3. Model Njusa, Sulzmana i Hastingsa

Zgodnie z modelem zaproponowanym w 1974 roku przez Njusa, Sulzmana i Hastingsa (117), rytmy okołodobowe powstają w wyniku czasowych różnic we własnościach błon. W następstwie obserwuje się zmiany w transporcie jonów przez błony. Z kolei jony wpływają na zmiany stanu konformacyjnego składników błon.

Przepływ jonów przez błony miałyby odbywać się za pośrednictwem białek, a różnice w intensywności transportu związane byłyby z aktywacją lub inhibicją białek uczestniczących w transporcie na skutek zmian w ich rozmieszczeniu i ilości.

Autorzy hipotezy przyjmują, że fotoreceptory — również znajdujące się w błonach — są światłoczułymi „furtkami” dla jonów, a zwłaszcza dla jonów potasu. Dzięki temu środowisko zewnętrzne może oddziaływać na „zegar nadrzędny”, czy powodować przesunięcie faz, lub synchronizację rytmu. Ten regulacyjny mechanizm może działać bądź bezpośrednio (organizmy jednokomórkowe), bądź pośrednio — poprzez hormony.

Z molekularną koncepcją „zegara biologicznego” wiąże się problem „zegara nadrzędnego” (*master clock*) w organizmie wielokomórkowym. Uważa się, że na przykład mózg lub pewne jego rejony, przysadka mózgowa, czy nadnercza mogłyby pełnić nadrzędną rolę w regulacji rytmiki dobowej w organizmie. Jednakże żaden z tych narządów nie może być w całej rozciągłości przyrównany do zegara nadrzędnego.

VII. Uwagi końcowe

Istnienie rytmiki dobowej wielu procesów biochemicznych, niezależnie od jej endogennego czy egzogenego pochodzenia, pociąga za sobą konieczność bardzo starannego i świadomego wyboru warunków prowadzenia eksperymentów. Biochemik badający na przykład wybrany układ enzymatyczny nie powinien zapominać, że układ ten tworzy integralną całość z organizmem roślinnym czy zwierzęcym, z którego został wyizolowany. Aktywność i własności enzymu mogą ulegać drastycznym zmianom w zależności od warunków hodowania zwierzęcia, rośliny czy komórek *in vitro*, oraz w zależności od pory dnia i warunków świetlnych w jakich pobierano materiał do doświadczeń.

Uwzględnienie czynnika czasu wydaje się być również konieczne przy interpretowaniu wyników badań, oraz potrzebne dla pełnego zrozumienia wzajemnych zależności pomiędzy różnymi procesami metabolicznymi w organizmie.

Artykuł nadszedł 10.4.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 17.11.75.

PIŚMIENICTWO

1. Bünning E., (1964), *The Physiological Clock*, Academic Press, New York.
2. Sollberger A., (1965), *Biological Rhythm Research*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—London—New York.
3. Rensing L., (1973), *Biologische Rhythmen und Regulation*, Gustav Fisher Verlag, Jena.
4. Cymborowski B., (1976), *Zegary Biologiczne*, PWN, Warszawa.
5. Manaker M., (red.), (1971), *Biochronometry*, National Academy of Sciences, Washington.
6. Mills J. N., (red.), (1973), *Biological Aspects of Circadian Rhythms*, Plenum Press, London—New York.
7. Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology 25, (1960).
8. Aschoff J., (red.), (1965), *Circadian Clocks*, Proceedings of the Feldaafing Summer School, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
9. Mayersbach H., (red.), (1967), *The Cellular Aspects of Biorhythms. Symposium on Rhythm Research*, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
10. *Circadian Rhythmicity*, (1972), Proceedings of the International Symposium on Circadian Rhythm, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
11. Scheving L. E., Halberg F., Pauly J. E., (red.), (1974), *Chronobiology*, Proceedings of the International Society for the Study of Biological Rhythms, Igaku Shoin, Ltd., Tokyo.
12. Hedlund L. W., Franz J. M., Kenny A. D., (red.), (1975), *Biological Rhythms and Endocrine Function*, *Adv. Exp. Med. Biol.* 54.
13. Mayersbach H., (1975), *Acta Histochem. Suppl.*, 14, 207—220.
14. Halberg F., (1975), w *Biological Rhythms and Endocrine Function*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 54, 1—32.
15. Cymborowski B., (1973), *J. Insect Physiol.*, 19, 1423—1440.
16. Twiest G., Smith C. J., (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, 32, 371—375.
17. Brown F. A. Jr., (1960), *Cold Spr. Harb. Quant. Biol.*, 25, 57—71.
18. Pohl R., (1948), *Z. Naturforsch.*, 3b, 367—374.
19. Ehret C. F., (1953), *Physiol. Zool.*, 26, 274—300.
20. Ehret C. F., (1959), w *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, str. 541—550, Withrow, Washington: Am. Assoc. for Advancement of Science.
21. Hastings J. W., Sweeney B. M., (1959), w *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, str. 567—584, Withrow, Washington: Am. Assoc. for Advancement of Science.
22. Enright J. T., Hamner W. M., (1967), *Science* 157, 937—941.
23. Cymborowski B., (1970), *Zool. Pol.*, 20, 103—125.
24. Cymborowski B., (1975), *Wiad. Ekol.*, 21, 77—94.
25. Narębski J., Tymicz J., Cymborowski B., Tęgowska E., (1972), *1st Eur. Congr. Sleep Res.*, str. 289—292, (Karger, Basel).
26. Reuner M., (1957), *Z. Vergl. Physiol.*, 40, 85—118.
27. Wille J. J. Jr., Ehret C. F., (1968), *J. Protozool.*, 15, 785—789.
28. Sweeney B. M., Hastings J. W., (1958), *J. Protozool.*, 5, 217—224.
29. Edmunds L. N. Jr., (1966), *Z. Cell Physiol.*, 67, 35—43.
30. De Bessé N., (1965), *Conte Rendu Hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris* 260, 7014—7017.
31. Cymborowski B., (1970), *Zool. Pol.*, 20, 127—149.

32. Dutkowski A. B., Cymborowski B., Przełęcka A., (1971), *J. Insect Physiol.*, **17**, 1763—1772.
33. Rensing L., (1969), *J. Insect Physiol.*, **15**, 2285—2303.
34. Rensing L., Goedeke K., Wassman G., Broich G., (1974), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **5**, 267—276.
35. Cymborowski B., Dutkowski A. B., (1969), *J. Insect Physiol.*, **15**, 1187—1197.
36. Cymborowski B., Dutkowski A. B., (1970), *J. Inset Physiol.*, **16**, 341—348.
37. Gill J., Skwarło K., Flisińska-Bojanowska A., (1972), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **3**, 305—311.
38. Turner R. B., Acree F. Jr., (1967), *J. Insect Physiol.*, **13**, 519—522.
39. Laird C. W., Fox R. R., (1970), *Life Sci.*, **9**, 191—202.
40. Leatherland J. F., McKeown B. A., John T. M., (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, **47A**, 821—828.
41. McKeown B. A., John T. M., George J. C., (1973), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **4**, 221—227.
42. Hodges J. R., Mitchley S., (1970), *British J. Pharmacol.*, **38**, 719—724.
43. Howe A., Thody A. J., (1969), *Nature* **222**, 781.
44. Asano Y., (1971), *Life Sci.*, **10**, 883—894.
45. Hanin J., Massarelli R., Costa E., (1970), *Science* **170**, 341—342.
46. Salanki J., Hiripi L., (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, **32**, 629—636.
47. Hinks C. F., (1967), *Nature* **214**, 386—387.
48. Fowler D. J., Goodnight C. J., LaBrie M. M., (1972), *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **65**, 138—141.
49. Walker P. R., Potter W. R., (1974), w *Chronobiology* str. 17—22. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, Igaku Shoin Ltd. Tokyo.
50. Hardeland R., (1975), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **6**, 163—166.
51. Surowiak J., (1969), *Folia Biol.*, **17**, 105—140.
52. Axelrod J., Wurtman R. J., Snyder S. H., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 949—954.
53. Hardeland R., Rensing L., (1968), *Nature*, **219**, 619—621.
54. Wurtman R. J., (1974), *Life Sci.*, **15**, 827—847.
55. Van Cantfort J., (1974), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **5**, 89—94.
56. Hastings J. W., McMurry L., (1974), w *Chronobiology*, str. 42—43. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, Igaku Shoin Ltd., Tokyo.
57. Rapoport M. I., Feigin R. D., Bruton J., Beisel W. R., (1966), *Science* **153**, 1642—1644.
58. Fuller R. W., (1970), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133**, 620—622.
59. Girard-Globa A., Bourdel G., (1973), *J. Nutr.*, **103**, 251—256.
60. Ross D. S., Fernstrom J. D., Wurtman R. J., (1973), *Metabolism*, **22**, 1175—1184.
61. Van Pilsum J. F., Halberg F., (1964), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **117**, 337—353.
62. Potter V. R., Gebert R. A., Pitot H. C., (1966), *Adv. Enzymol.*, **4**, 247—265.
63. Hayashi S., Arakami Y., Noguchi T., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 795—800.
64. Hopkins H. A., Bonney R. J., Walker P. R., Yager J. D. Jr., Potter V. R., (1973), *Adv. Enzym. Reg.*, **11**, 169—191.
65. Hardeland R., Hohmann D., Rensing L., (1973), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **4**, 89—118.

66. Castells S., Shiralli S., (1971), *Life Sci.*, **10**, 233—239.
67. Civen M., Brown C. B., Granner D. K., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 290—295.
68. Hardeland R., Stephan E., (1974), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*
69. Lin E. C. C., Knox W. E., (1957), *Biochim Biophys. Acta* **26**, 85—89.
70. Wurtman R. J., Shoemaker W. J., Larin F., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 800—807.
71. Wunner W. H., Bell J., Munro H. N., (1966), *Biochem. J.*, **101**, 417—428.
72. Sidransky H., Bongiorno M., Sarma D. S. R., Verney E., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 242—248.
73. Baliga B. S., Pronczuk A. W., Munro H. N., (1968), *J. Molec. Biol.*, **34**, 199—218.
74. Fishman B., Wurtman R. J., Munro H. N., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 677—682.
75. Honova E., Miller S. A., Ehrenkranz R. A., Woo A., (1968), *Science* **162**, 999—1001.
76. Wurtman R. J., Axelrod J., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1594—1598.
77. Gielen J., Van Cantfort J., Robaye B., Renson J., (1969), *Conte Rendu Acad. Sci. (Paris)*, **269**, 731—732.
78. Van Cantfort J., (1973), *Biochemie* **55**, 1171—1173.
79. Bull D. L., Lindquist D. A., (1968), *Comp. Biochem. Physiol.*, **25**, 639—649.
80. Cymborowski B., Skangiel-Kramska J., Dutkowski A., (1970), *Comp. Biochem. Physiol.*, **32**, 367—370.
81. Venkatachari S. A. T., (1971), *J. Exp. Biol.*, **9**, 338—344.
82. Kaufman H., Vratsanos S. M., Erlanger B. F., (1968), *Science* **162**, 1487—1489.
83. Bieth J., Vratsanos S. M., Wassermann N., Erlanger B. F., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 1103—1106.
84. Quay W. B., (1963), *Gen. Comp. Endocrinol.*, **3**, 473—479.
85. Wurtman R. J., Axelrod J., Kelly D. E., (1963), *The Pineal*. Academic Press, New York.
86. Garbarg N., Julien Ch., Schwartz J. Ch., (1974), *Life Sci.*, **14**, 539—543.
87. Lynch H. J., (1971), *Life Sci.*, **10**, 791—795.
88. Ralph Ch. L., Mull D., Lynch H. J., Hedlund L., (1971), *Endocrinology* **89**, 1361—1366.
89. Klein D. C., Berg G. R., Weller J., (1970), *Science* **168**, 979—980.
90. Klein D. C., Berg G. R., Weller J., Glinsmann W., (1970), *Science* **167**, 1738—1740.
91. Ebadi M. S., Weiss B., Costa E., (1970), *Science* **170**, 188—190.
92. Machado C. R. S., Wragg L. E., Machado A. B. M., (1969), *Science* **164**, 442—443.
93. Reiter R. J., (1975), w *Biological Rhythms and Endocrine Function*, str. 43—78, L. W. Hedlund i J. M. Franz (red.), Plenum Press, New York—London.
94. Morel C., Queiroz O., (1974), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **5**, 206—216.
95. Wagner E., Frosch S., (1974), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **5**, 231—239.
96. Wagner E., Frosch S., Deitzer G. F., (1974), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **5**, 240—246.
97. Wagner E., Cumming B. G., (1970), *Canad. J. Bot.*, **48**, 1—18.
98. Wagner E., Frosch S., (1971), *Canad. J. Bot.*, **49**, 1981—1985.

99. Frosch S., Wagner E., (1973), *Canad. J. Bot.*, **51**, 1521—1528.
100. Frosch S., Wagner E., Cumming B. G., (1973), *Canad. J. Bot.*, **51**, 1355—1367.
101. Cumming B. G., (1971), Proc. Int. Symp. Circad. Rhythm (Wageningen) 38—85.
102. Deitzer G. F., Kempf O., Fischer S., Wagner E., (1973), *Planta* (Berl.), **117**, 29—41.
103. Wagner E., Frosch S., Kempf O., (1974), *Plant Sci. Letters* **3**, 43—48.
104. Hess B., Boiteux A., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 237—258.
105. Pavlidis T., (1969), *J. Theor. Biol.*, **22**, 418—436.
106. Deitzer G. F., Haertle U., Wagner E., (1974), *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, **5**, 187—198.
107. Sweeney B. M., Haxo F. T., (1961), *Science* **134**, 1361—1363.
108. Vanden Driessche T., (1966), *Biochim. Biophys. Acta* **126**, 456—470.
109. Schweiger H. G., Bremer H. J., (1961), *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 50—59.
110. Ehret C. F., Trucco E., (1967), *J. Theor. Biol.*, **15**, 240—262.
111. Ehret C. F., Barlow J. S., (1960), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **25**, 217—220.
112. Strumwasser F., (1965), w Circadian Clock str. 442—462. J. Aschoff (red.), North Holland, Amsterdam.
113. Vanden Driessche T., Bonotto S., Brachet J., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **224**, 631—634.
114. Schweiger H. G., (1972), w Circadian Rhythmicity str. 157—174, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
115. Bünning E., (1972), w Circadian Rhythmicity str. 11—32, centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.
116. Sweeney B. M., (1972), *Protoplasma* **75**, 488.
117. Njus D., Sulzman F. M., Hastings J. W., (1974), *Nature* **248**, 116—120.

Redakcja kwartalnika „Postępy Biologii Komórki” uprzejmie zawiadamia, że w zeszytcie 1/1976 ukazały się następujące artykuły:

B. GRZELAKOWSKA-SZTABERT — Efekty biologiczne niedoboru aminokwasowego w hodowli *in vitro* komórek ssaków

H. MICHNIEWICZ — Najnowsze hipotezy dotyczące interakcji DNA-histony

Z. KILIAŃSKA, L. KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ — Specyficzność białek niehistonowych

K. WOROWSKI — Inhibitory komórkowych enzymów proteolitycznych

NIKODEM GRANKOWSKI *)

Rola białek rybosomowych *Prokariota* w procesie translacji

The Role of Ribosomal Proteins in Translation in *Procaryota*

Pomimo znacznego postępu w badaniach translacji kodu genetycznego, nadal brakuje wyczerpujących danych o mechanizmie procesu. Przyczyną tego jest niewystarczająca znajomość struktury rybosomu i funkcji jego składników (rybosomowych RNA i białek rybosomowych). Dlatego od kilku lat, uwaga wielu badaczy zajmujących się problemami translacji, skierowana jest na rybosom. Wyrazem tego jest rosnąca ciągle ilość prac doświadczalnych, na podstawie których ukazało się szereg artykułów przeglądowych i monografii w czasopismach zagranicznych (1—14). Opracowania te dotyczą głównie struktury rybosomu. Funkcję cząstek składowych tej organelli omawia w bardzo skróconej formie tylko jeden artykuł przeglądowy (15). Autorzy skupili w nim uwagę na aktywnych w biosyntezie białka miejscach na rybosomie.

W piśmiennictwie krajowym na przestrzeni ostatnich kilku lat również ukazało się szereg opracowań przeglądowych (16—26) poświęconych mechanizmowi translacji oraz strukturze RNA. Brak jest przedstawienia (poza nielicznymi wzmiankami) zagadnień struktury i funkcji rybosomu. Z tego względu artykuł niniejszy omawia rolę białek rybosomowych podczas kolejnych etapów biosyntezy białka. Temat zasadniczy uzupełniono podstawowymi wiadomościami o strukturze białek rybosomowych. Ułatwi to lepsze zrozumienie roli omawianych cząsteczek składowych rybosomu.

I. Ogólna charakterystyka białek rybosomowych *Prokariota*

Białka w rybosomach organizmów prokariotycznych stanowią około 33% ogólnej masy całego rybosomu (10). Pozostałe 67% to różniące się stałą sedymentacji trzy klasy rRNA. Mniejsza podjednostka rybosomu

*) Dr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biochemii, UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

Wykaz stosowanych skrótów: fMet-tRNA — formylometionyno-tRNA, AA-tRNA — aminoacylo-tRNA, SP — białka powierzchniowe rybosomu 70S, SP30 — białka powierzchniowe podjednostki 30S, SP50 — białka powierzchniowe podjednostki 50S, IF-1, IF-2, IF-3 — enzymatyczne czynniki inicjujące, EF-Tu, EF-G — enzymatyczne czynniki elongacyjne, RF-1, RF-2. S — enzymatyczne czynniki terminacyjne.

30S zawiera jedną cząsteczkę rRNA — 16S, zaś w większej podjednostce 50S znajdują się dwie cząsteczki rRNA: 23S i 5S (27). Poznanie funkcji indywidualnych białek wymagało ustalenia ich ilości w obydwu podjednostkach rybosomowych. Uzyskane początkowo wyniki różniły się między sobą (28—34), gdyż brak było odpowiedniej metody ekstrakcji białek i ich rozdziału.

W roku 1970 Kaltschmidt oraz Wittmann opublikowali nową metodę dwukierunkowego rozdziału i identyfikacji białek rybosomowych na żelu akryloamidowym (35). Ustalono, że rybosom 70S zawiera 55 indywidualnych białek z czego 21 przypada na podjednostkę 30S, zaś 34 białka na podjednostkę 50S (36). Masa cząsteczkowa poszczególnych białek waha się w granicach 10 000—65 000 (37). Oznaczono także pod względem ilościowym i jakościowym skład aminokwasowy białek (38). W większości białek rybosomowych przeważają aminokwasy o charakterze zasadowym, co powoduje, że ich punkt izoelektryczny znajduje się w pobliżu $pH = 10,0$ i wyższym (39).

Opracowano preparatywną metodę otrzymywania poszczególnych białek (40—41) charakteryzujących się wysokim stopniem czystości (97%—

Tabela 1

Charakterystyka białek rybosomowych podjednostki 30S

	Ciężar cząsteczkowy (37)a	Punkt izoelektryczny (39)b	Stechiometria (47)
S1	65000		F
S2	28300	6,7	F
S3	28200	12,0	M
S4	26700	10,4	U
S5	19600	9,9	U
S6	15600	4,9	F
S7	22100	12,2	U
S8	15500	9,1	U
S9	16200	12,0	U
S10	12400	7,8	F
S11	15500	12,0	F
S12	17200	12,0	F
S13	14900	12,0	M
S14	14000	11,0	F
S15	12500	12,0	U
S16	11700	11,6	U
S17	10900	9,7	U
S18	12200	12,0	F
S19	13100	12,0	F
S20	12000	12,0	M
S21	12200	12,0	F

a — ciężar cząsteczkowy oznaczano metodą elektroforezy na żelu akryloamidowym w obecności SDS.

b — punkt izoelektryczny oznaczano metodą dwukierunkowej elektroforezy na żelu akryloamidowym.

Tabela 2

Charakterystyka białek rybosomowych podjednostki 50S

	Ciężar cząsteczkowy (37)a	Punkt izoelektryczny (39)b	Stechiometria (47)
L1	26700	9,2	U
L2	31500	12,0	U
L3	27000	9,7	FR
L4	25800	7,6	U
L5	22000	9,4	FR
L6	22600	10,0	U
L7	12200	4,8	FR
L8	17300	6,3	U
L9	17300	6,4	F
L10	19000	7,5	U
L11	19600	9,7	U
L12	12200	4,9	F
L13	17800	10,0	FR
L14	16200	12,3	U
L15	17500	12,0	U
L16	17900	12,0	U
L17	16700	11,0	U
L18	14300	12,0	R
L19	14900	12,0	U
L20	17200	12,0	F
L21	13900	8,2	U
L22	14800	11,5	R
L23	12700	9,6	U
L24	14300	10,7	FR
L25	12000	9,4	FR
L26	12000	B.D.	F
L27	12700	12,0	M
L28	12300	B.D.	F
L29	10000	10,0	U
L30	11200	12,0	U
L31	10000	B.D.	F
L32	10500	11,3	F
L33	10500	12,0	F
L34	9600	B.D.	F

a, b — jak w objaśnieniach do tabeli 1.

B.D. — brak danych.

100%). Umożliwiło to zastosowanie białek rybosomowych jako jednorodnych antygenów do otrzymania surowic monowalentnych (42—43). Surowice te wykorzystano do badań funkcji białek rybosomowych w procesie translacji.

Autorzy powyższych metod (35—43) zaproponowali nową nomenklaturę oznaczając białka mniejszej podjednostki literą „S” (od ang. *small*) i kolejnymi cyframi od S1—S21 oraz białka podjednostki 50S literą „L”

(od ang. *large*) oraz cyframi od L1 do L34. Nomenklatura ta nosi nazwę Nomenklatury Berlińskiej. Ponieważ stosowano kilka znacznie różniących się sposobów oznaczania białek rybosomowych, dlatego zaistniała konieczność uregulowania sprawy nazewnictwa. Dokonano tego opublikowaniem wspólnej pracy przez cztery największe ośrodki naukowe zajmujące się omawianą problematyką. Uzgodniono nazewnictwo białek i przyjęto Nomenklaturę Berlińską jako obowiązującą dla oznaczania białek rybosomowych podjednostki 30S (44). Nomenklaturę tę powszechnie przyjęto również dla oznaczeń białek rybosomowych podjednostki 50S.

Zebranie danych o właściwościach fizyko-chemicznych białek stanowiło podstawę wyjściową do badań stechiometrycznych. Początkowe sugestie o występowaniu po jednej cząsteczce każdego białka na podjednostkę (45) okazały się nieścisłe, gdyż suma mas cząsteczkowych wszystkich białek rybosomowych jest większa od masy komponenty białkowej rybosomu (37). Przeprowadzono przeto rozdział białek rybosomowych i stwierdzono, że rzeczywiście niektóre z nich występują w liczbie jedna cząsteczka na podjednostkę inne zaś w liczbie większej lub mniejszej. To z kolei oznaczało, że pewne białka występują nie na wszystkich podjednostkach (46—49). Wyróżniono przy tym następujące klasy białek rybosomowych:

I klasa określana w języku angielskim jako *fractional proteins* — „F” występuje w 0,1—0,6 cząsteczki na podjednostkę;

II klasa białek — *unit proteins* — „U” występuje w 0,8—1,2 cząsteczki

III klasa białek — *fractional repeated* — „FR” występuje w 1,4—1,7 cząsteczki;

IV klasa to białka występujące w 1,8—2,2 cząsteczki na podjednostkę a nazwana jest *repeated* — „R”.

Obok wymienionych klas białek wydzielono jeszcze jedną — *marginal proteins* — „M”. Należą do niej białka występujące w 0,65—0,75 cząsteczki.

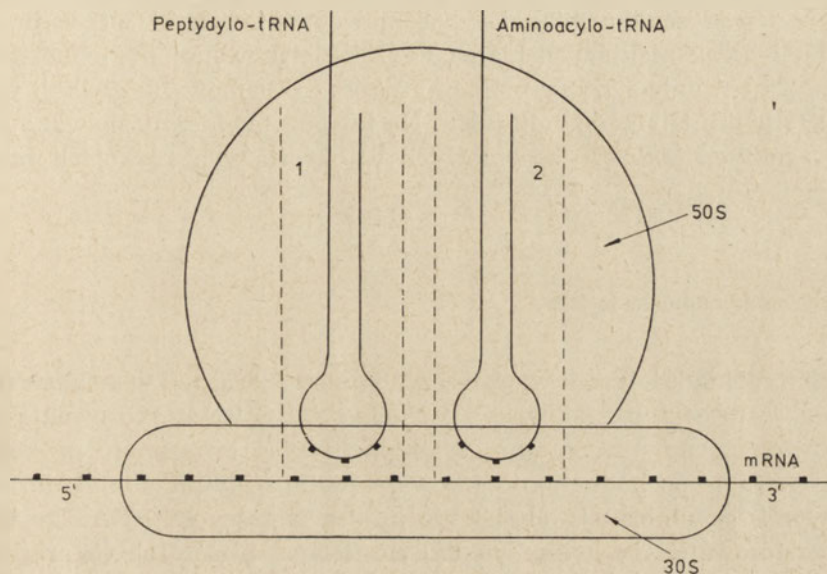
Ta klasa białek reprezentowana jest tylko przez trzy białka podjednostki 30S i jedno białko podjednostki 50S.

Stechiometrię oraz inne dane o białkach rybosomowych zawiera tabela I i II.

II. Metody badania funkcji białek rybosomowych

Rybosom, podczas kolejnych etapów biosyntezy białka ulega ciągłym zmianom konformacyjnym. Jest to wynikiem oddziaływania szeregu cytoplazmatycznych czynników enzymatycznych i RNA (mRNA, tRNA). Muszą zatem istnieć określone miejsca na rybosomie wykazujące powinowactwo względem swoistych czynników i różnych RNA. Według obecnie przyjmowanego modelu, rybosom posiada dwa miejsca wiążące tRNA: peptydylowe (donatorowe) i aminoacylowe zwane też aminokwasowym

(Schemat 1). Do pierwszego miejsca oznaczanego literą P, przyłącza się inicjatorowy tRNA a w następnych etapach translacji peptydylo tRNA. Drugie oznaczane literą A, swoiście wiąże aminoacylo tRNA. Zarówno miejsce P jak i A obejmują zasięgiem swoim szereg białek należących do obydwu podjednostek rybosomowych. Istnieją ponadto inne aktywne miejsca w strukturze rybosomu, które uczestniczą w takich reakcjach jak: przyłączenie mRNA, synteza wiązania peptydowego, czy hydroliza GTP.



Schemat 1. Model rybosomu

1. miejsce donatorowe lub peptydowe, 2. miejsce akceptorowe lub aminokwasowe

Do identyfikacji białek stanowiących miejsca aktywne rybosomu zastosowano szereg metod, które zostaną omówione w kolejnych podrozdziałach.

II-1. Rekonstrukcja rybosomu

Pierwsze dane o funkcji białkowej komponenty rybosomu w procesie translacji pochodzą z pracowni N o m u r y (28), gdzie opracowano metodę rekonstrukcji rybosomu. Metoda polega na przywróceniu rybosomowi pierwotnej struktury i aktywności w syntezie polipeptydu *in vitro* po uprzednim rozfrakcjonowaniu na rRNA i białka rybosomowe.

W obecności wysokich stężeń LiCl lub CsCl zarówno od podjednostki 30S jak i 50S uwalnia się szereg białek strukturalnych, które oznaczono

symbolami SP—30 i SP—50 (od ang. *split proteins*). Pozostałe białka w kompleksie z rRNA stanowią rdzeń podjednostki. Stała sedymentacji rdzenia podjednostki 30S wynosi 23S, a stała sedymentacji rdzenia podjednostki 50S wynosi 40S. Częsteczki 23S i 40S są nieaktywne w biosyntezie białka *in vitro*. Przywrócenie tej aktywności odbywa się na drodze częściowej rekonstrukcji podjednostki z białek uwolnionych oraz rdzenia w odpowiednich warunkach.

Przeprowadzenie rekonstrukcji całkowitej z 16S rRNA i poszczególnych białek rybosomowych podjednostki (50) pozwoliło wykazać rolę jaką pełnią poszczególne białka rybosomowe podjednostki 30S w procesie translacji. Brak niektórych białek w zrekonstruowanej podjednostce powodował obniżenie syntezy polipeptydu oraz zahamowanie reakcji wiązania mRNA lub tRNA do rybosomu. Na tej podstawie wnioskowano o roli poszczególnych białek rybosomowych w określonych reakcjach procesu translacji (10).

II-2. Pochodne aminoacylo-tRNA

Celem dokładniejszego wyznaczenia miejsc wiążących w strukturze rybosomu zastosowano znakowane pochodne AA—tRNA, które mają zmodyfikowane grupy funkcyjne w aminokwasie związanym z końcem 3'-tRNA. Takie pochodne tworzą kowalencyjne wiązania z białkami rybosomowymi, co umożliwia określenie miejsc wiążących tRNA. Do badań tych zastosowano pochodne peptydylo-tRNA: p-nitrofenylokarbamyl-³H-fenylalanylo-tRNA (PNPC-³H-Fen-tRNA) (51—52) i N-bromoacetyl-³H-fenylalanylo-tRNA (BrAc-³H-Fen-tRNA) (53—56) oraz pochodną inicjatorowego tRNA: p-nitrofenylokarbamyl-³⁵S-formylometionylo-tRNA (57). Identyfikację białek rybosomowych uczestniczących w reakcji wiązania pochodnych poprzedza enzymatyczna hydroliza niezwiązanego z rybosomami tRNA. Aktywność RNazy przejawia się nie tylko względem tRNA ale również względem rybosomowych RNA. Powoduje to rozluźnienie struktury rybosomu, a tym samym stwarza możliwość utworzenia nieswoistych połączeń białek rybosomowych z pochodnymi tRNA. Ewentualność taką wyklucza wprowadzenie do badań związków fotolabilnych, których przykładem jest: 2-nitro-4-azydofenoksy-4-fenylacetyl-³H-fenylalanina, określana skrótem SNAP-³H-Phe (58). Związek ten w połączeniu z tRNA daje pochodną peptydylo-tRNA: SNAP-³H-Phe-tRNA, ulegający hydrolizie do tRNA i zmodyfikowanej fenylalaniny pod wpływem światła o długości fali 340nm. Wykrycie radioaktywnego piętna w określonych białkach pozwala przypuszczać, że stanowią one jeśli nie całość to przynajmniej część miejsca P na rybosomie, do którego wiąże się peptydylo-tRNA.

II-3. Modyfikacja rybosomów

Do badania roli komponent rybosomowych stosuje się zmodyfikowane rybosomy (59). Metoda oparta jest na właściwościach niektórych związków organicznych i nieorganicznych zdolnych do reagowania z rybosomami za pośrednictwem wolnych grup funkcyjnych białek lub rybosomowych RNA. Zablokowanie tych grup powoduje spadek aktywności rybosomu. Czynnikiem blokującymi są: formaldehyd, kwas azotawy, 2-nitrofluorobenzen, które reagują z grupami aminowymi. Traktowanie rybosomów tymi związkami powoduje zahamowanie syntezy polifenyloalaniny w obecności poliU (10).

Związkiem reagującym specyficznie z tyrozyną lub cysteiną jest czteronitrometan wpływający na proces inicjacji syntezy polipeptydu. W jego obecności rybosomy tracą zdolność do przyłączenia zarówno naturalnego jak i syntetycznego mRNA (60).

Najwięcej danych uzyskano przy zastosowaniu związków reagujących z grupami sulfhydrylowymi, jak na przykład: N-etylomaleimid, p-chlorobenzoesan rtęciowy i amid kwasu jodoctowego (61—67). Obecność tych związków wpływa praktycznie na wszystkie etapy procesu translacji, gdyż od obecności wolnych grup —SH uzależniona jest aktywność zarówno rybosomów jak i czynników enzymatycznych uczestniczących w poszczególnych reakcjach biosyntezy białka (2).

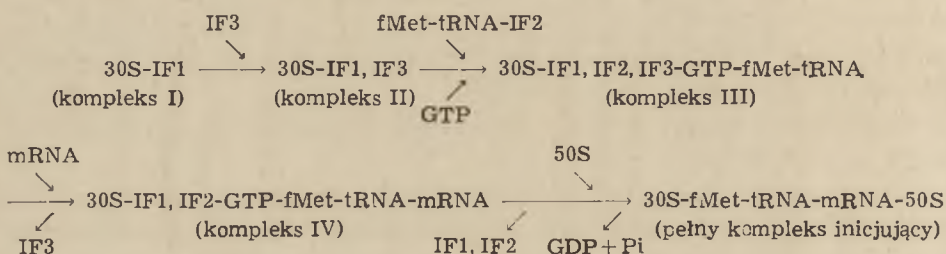
Reaktywność grup sulfhydrylowych wykorzystana została również do badań przestrzennego rozmieszczenia białek w rybosomie, czyli do badań topografii rybosomu. W tym przypadku zastosowano tzw. związki wielofunkcyjne, które odznaczają się właściwościami krzyżowego wiązania dwu lub więcej białek rybosomowych sąsiadujących ze sobą w strukturze rybosomu. Imid kwasu fenylmaleinowego oraz 2-metyloadypinian posiadają zdolność tworzenia dimerów białkowych poprzez grupy sulfhydrylowe, gdy odległość między grupami —SH wynosi około 12Å (68—71). Czteronitrometan może połączyć krzyżowo trzy a nawet cztery różne białka rybosomowe (72). Ostatnio zastosowano do badań topografii rybosomu 4-merkaptomaślan, który przewyższa możliwościami poprzednie związki wielofunkcyjne, może on bowiem tworzyć wiele par białkowych w obydwu podjednostkach rybosomowych (73). Traktowanie rybosomów takimi związkami wielofunkcyjnymi pociąga za sobą również spadek określonych funkcji biologicznych rybosomu. Ponieważ związki te blokują aktywne biologicznie grupy —SH kilku białek blisko siebie leżących, to należy przypuszczać, że określona funkcja rybosomu zależy nie od jednego, ale od kilku sąsiadujących ze sobą białek rybosomowych. Identyfikację białek tworzących dimery lub trimery poprzedza chromatografia jonowymienna wszystkich białek podjednostki.

Do modyfikacji rybosomów wprowadzono z wielkim powodzeniem surowice monowalentne, które blokują określone białka znajdujące się na

powierzchni rybosomu. W efekcie obserwuje się spadek lub zupełny brak aktywności rybosomu. Uzyskane wyniki pokrywają się z danymi, które otrzymano przy zastosowaniu innych metod. Ze względu na szybką identyfikację białek oraz wysoką specyficzną reakcji antygen — przeciwciała, metodę tą poleca grupa Wittmanna do badania roli białek rybosomowych (74, 75—76).

III. Inicjacja syntezy białka

Zapoczątkowanie syntezy łańcucha polipeptydowego jest procesem bardzo złożonym, gdyż obok podjednostki 30S, mRNA i fMet—tRNA uczestniczą również trzy enzymatyczne czynniki inicjujące: IF—1, IF—2, IF—3 (od ang. *initiation factor*). Rola czynników inicjujących jest na ogół znana (2, 5), natomiast kolejność reakcji podczas tworzenia się kompleksu inicjującego jest zagadnieniem, któremu w dalszym ciągu poświęca się wiele uwagi. W świetle najnowszych badań (77) kolejność reakcji podczas tworzenia się pełnego kompleksu inicjującego przedstawia się następująco:



Schemat powyższy zakłada, że przyłączanie mRNA następuje dopiero wtedy, gdy podjednostka 30S utworzy kompleks ze wszystkimi czynnikami inicjującymi oraz inicjatorowym tRNA (kompleks III). Stanowi to zasadniczą różnicę w porównaniu z dotychczas przyjmowanym schematem, który sugerował, że reakcja wiązania mRNA do podjednostki 30S odbywa się na samym początku inicjacji (2, 5).

III-1. Wiązanie mRNA do podjednostki 30S

W pracowni Kurlanda wykazano, że w reakcji przyłączania mRNA do podjednostki 30S oprócz czynnika IF—3 bierze udział również białko S1. Uważa się, że pełni ono funkcję stabilizatora kompleksu 30S—mRNA o czym świadczył wyraźny spadek wiązania naturalnego i syntetycznego mRNA w obecności IF—3 do podjednostki 30S pozbawionej białka S1. Przywrócenie aktywności wiążącej odbywa się poprzez uzupełnienie w podjednostce 30S brakującego białka S1 (78). Obserwacje te zostały

potwierdzone badaniami z fotolabilnym kwasem ^3H poli-4-tiourydylowym (79), który posiada takie same wlaściwości syntetycznego mRNA dla fenylalaniny jak poliU (80). Omawiany kwas tworzy w odpowiednich warunkach inkubacji kowalencyjne wiązanie z białkiem S1. Zdaniem wielu autorów, białko to charakteryzuje się szczególnym powinowactwem względem mRNA w porównaniu z pozostałymi białkami rybosomowymi podjednostki 30S. Uzupełnieniem przedstawionego problemu były doświadczenia z kwasem aurynotrójkarboksylowym, który jest inhibitorem omawianej reakcji (3). Kwas ten hamuje zarówno wytwarzanie kompleksu podjednostki 30S z mRNA jak i powstawanie połączeń białka S1 z poliU (81).

Podjednostka 30S nie zawsze zawierała białko S1 w jednakowej ilości cząsteczek. Czasami białko to występuje w ilościach, które kwalifikują go do klasy „F”, innym zaś razem występuje w ilościach około 1,0 cząsteczki/30S i wtedy zalicza się go do klasy „U” (47, 82). Obserwowano również, że uformowany kompleks podjednostki 30S z mRNA pozbawiony jest białka S1 (83). Dane te skłoniły niektórych autorów do przypuszczeń, że białko to w zależności od etapu cyklu rybosomowego ulega odszczepieniu, bądź przyłączeniu do podjednostki 30S (78). Sprawa ta nie została dotychczas definitywnie wyjaśniona.

Wcześniejsze niż mRNA, wiązanie się czynnika inicjującego IF-3 z podjednostką 30S (patrz Schemat Inicjacji) świadczy o tym, że w strukturze rybosomu musi istnieć określone miejsce wiążące ten czynnik enzymatyczny. Z jednego, jak dotychczas, doniesienia na ten temat wynika, że związek chemiczny o nazwie 2-metylosuberimid używany do badania topografii rybosomu, łączy czynnik enzymatyczny IF-3 z białkiem S12. Sądzi się, że białko to jest akceptorem IF-3 w procesie inicjacji biosyntezy polipeptydu (84). Dane te stają się jeszcze bardziej interesujące, gdy uwzględną się dodatkową funkcję IF-3 w rozpoznawaniu kodonów startowych AUG lub GUG na mRNA (5). Informacyjny RNA przyłącza się w takim miejscu do rybosomu, by kodony te umiejscowione były w miejscu P, do którego wiąże się inicjatorowy tRNA. Łącząc ze sobą te dane można sądzić, że białko S12 znajduje się na rybosomie w miejscu peptydylowym. Potwierdziły to również badania z surowicami anty S12, które w znacznym stopniu hamują przyłączenie inicjatorowego tRNA do podjednostki 30S (patrz rozdział III-2.).

Oddzielnego omówienia wymaga czynnik interferujący — i (od ang. *interference factor*), który razem z czynnikiem IF-3 uczestniczy w reakcji wiązania mRNA do podjednostki 30S. Czynnikowi interferującemu przypisuje się rolę selektywnego rozpoznawania określonych cistronów na mRNA. Świadczy o tym brak wiązania rybosomów *E. coli* w obecności czynnika interferującego do jednego z trzech cistronów RNA faga *E. coli* — MS2, który jest odpowiedzialny za syntezę białka płaszczka fagowego. Translacja pozostałych cistronów odbywa się normalnie (5). Istniało przy-

puszczenie, że czynnik ten może być białkiem rybosomowym wykazującym aktywność w specyficznym rozpoznawaniu naturalnych mRNA. Wynikało to z obserwacji nad translacją RNA faga *E. coli* — R17 w obecności rybosomów izolowanych z dwóch różnych przedstawicieli organizmów prokariotycznych. Rybosomy z *E. coli* rozpoznawały w tym przypadku wszystkie trzy cistrony, podczas gdy rybosomy z *Bacillus stearothermophilus* tylko jeden cistron RNA fagowego (85). Ostatnie eksperymenty dostarczyły jednak dowodów utożsamiających czynnik interferujący z białkiem rybosomowym S1. Zarówno czynnik i, jak też białko S1 wykazują identyczną ruchliwość elektroforetyczną. Krzyżowa reakcja immunoprecypitacji w obecności surowic anty S1 oraz anty i wykazała także identyczność obydwu antygenów. Obserwowano ponadto jednakowo hamujący wpływ białka S1 oraz czynnika i na wiązanie się rybosomów *E. coli* ze wspomnianym cistronem białka płaszcza RNA faga MS2 (86). Fakty te skłaniają do przypuszczeń, że białko S1 pełni funkcję regulacyjną w procesie translacji (87).

Ostatnie dane na temat funkcji białka S1 wskazują, że uczestniczy ono nie tylko w reakcji tworzenia kompleksu: 30S-mRNA, ale również w reakcji wiązania inicjatorowego tRNA (88).

III-2. Wiązanie fMet-tRNA

Inicjatorowy tRNA przyłączając się do podjednostki 30S w miejscu peptydylowym tworzy komplementarne wiązanie typu kodon — antykodon z informacyjnym RNA. O specyficzności wiązania decyduje kodon startowy AUG lub GUG znajdujący się na początku każdego cistronu mRNA (5).

Badania nad rekonstrukcją rybosomów wykazały, że brak pewnych białek w podjednostce 30S znacznie utrudnia reakcję wiązania tRNA inicjatorowego (89). Identyfikację białek przeprowadzono z zastosowaniem surowic monowalentnych (74). Na podstawie uzyskanych wyników podzielono je na dwie grupy różniące się zakresem udziału w reakcji wiązania fMet-tRNA. Obecność surowic anty: S3, S10, S14, S19 oraz S21 hamuje reakcję prawie w 100%. Surowice monowalentne dla drugiej grupy białek: S1, S2, S5, S6, S12, S13 i S20 hamują przyłączanie inicjatorowego tRNA w około 50%. Zdaniem autorów, białka należące do pierwszej grupy stanowią centrum miejsca P na podjednostce 30S co jest potwierdzeniem i uzupełnieniem wcześniejszych obserwacji (89).

Zaistniały rozbieżności w poglądach na rolę białka S21 w procesie inicjacji. Pierwsze dane na temat jego funkcji pochodzą z pracowni N o m u r y, gdzie wykazano, że białko S21 jest konieczne dla pełnej aktywności podjednostki 30S w procesie inicjacji (89). Odmienne stanowisko w tej

sprawie reprezentuje grupa Kurlanda (90). Zdaniem tych badaczy, podjednostki 30S tylko wtedy zdolne są do utworzenia kompleksu inicjującego, jeśli nie posiadają w swoim składzie białka S21. Wskazują na to zarówno wyniki doświadczeń o hamującym wpływie omawianego białka na wiązanie się fMet-tRNA do kompleksu inicjującego w obecności podjednostek 50S jak i obserwacje o braku białka S21 w natywnych podjednostkach 30S. Te ostatnie spostrzeżenia pokrywają się z wynikami innych autorów, którzy wykazali brak białka S21 w natywnych podjednostkach 30S w odróżnieniu od monosomów czy polirybosomów (91). Przypuszcza się, że przyczyną takiego stanu jest bliżej nie wyjaśniona tendencja białka S21 do zmian liczby cząstek w podjednostce 30S, co wykazano w badaniach nad stechiometrią białek (49). Ostatnie wyniki z pracowni Nometry (92) potwierdzają słuszność pierwotnych założeń. Podjednostki 30S pozbawione białka S21 w porównaniu z podjednostkami o pełnym składzie białkowym wykazują zaledwie 33%—44% aktywności wiążącej dla fMet-tRNA. Wyniki te jak również doświadczenia z surowicami monowalentnymi (74) i rekonstrukcją rybosomów (89) dostarczyły przekonujących dowodów o istotnym znaczeniu białka S21 w reakcji wiązania inicjatorowego tRNA.

Przyjmując pogląd, że miejsce A oraz miejsce P zasięgiem swoim obejmują zarówno podjednostkę 30S jak i 50S, przeprowadzono badania zmierzające do wyznaczenia, które białka podjednostki 50S uczestniczą w wiązaniu fMet-tRNA. Zastosowanie znakowanej pochodnej inicjatorowego tRNA wykazało, że jest on wiązany przez kilka białek. Największą radioaktywność wykrywano w białku L27, mniejszą w L13, L14, L15 (57). Można więc przypuszczać, że białka te razem z białkami podjednostki 30S stanowią miejsce P na rybosomie, do którego zostaje przyłączany fMet-tRNA.

Enzymatyczny czynnik IF—2 pełni podwójną rolę w procesie inicjacji. Pierwsza, to wiązanie fMet-tRNA do rybosomów. IF—2 w kompleksie z podjednostką 30S umożliwia tRNA inicjatorowemu przyłączanie się do miejsca P. Aktywność ta zależy od obecności wolnych grup sulfhydrylowych, gdyż N-etylomaleimid pozbawia czynnik IF—2 zdolności wiążącej fMet-tRNA do podjednostki 30S (2).

Za swoistość interakcji IF—2 z rybosomem odpowiada białko S12. Wskazują na to wyniki doświadczeń z podjednostkami 30S z *E. coli*, w których podczas rekonstrukcji zamieniono białko S12 dając na jego miejsce białko S12 pochodzące z rybosomów z *Bacillus stearothermophilus*. W wyniku takiej kombinacji obserwowano znaczny spadek zdolności wiązania tRNA inicjatorowego do podjednostki w obecności czynnika IF—2 pochodzącego z komórek *E. coli*. Jeżeli do badań tych użyto czynnika IF—2 izolowanego z komórek *Bacillus stearothermophilus*, wtedy nie obserwowano spadku zdolności wiązania fMet-tRNA do rybosomu (93). Uzyskane wyniki świadczą nie tylko o istotnym znaczeniu białka S12 w enzymatycznej reakcji wiązania tRNA inicjatorowego do rybosomu, ale jedno-

czeńście wskazują jak wielką rolę odgrywa swoistość gatunkowa składników uczestniczących w inicjacji łańcucha polipeptydowego.

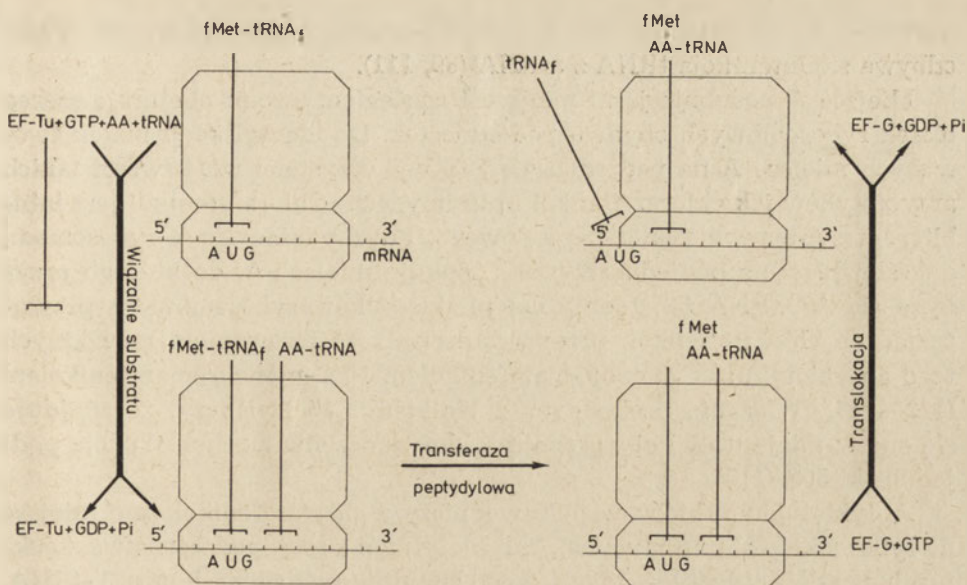
Druga rola czynnika IF—2 dotyczy udziału w hydrolizie GTP (5). Podczas reakcji tej zachodzi odszczepienie IF—2 od rybosomów. Uważa się, że hydrolityczne uwolnienie IF—2 z kompleksu inicjującego potrzebne jest, by czynnik ten mógł powtórnie uczestniczyć w następnym procesie inicjacji (94—97). Aktywność GTP-azowa czynnika IF—2 uwidacznia się po przyłączeniu podjednostki 50S do kompleksu inicjującego (patrz Schemat Inicjacji). W wyniku badań ustalono, że na omawianą reakcję hydrolizy GTP zasadniczy wpływ wywierają dwa białka podjednostki 50S: L7 i L12. Usunięcie tych białek z rybosomu powoduje prawie 100% zahamowanie aktywności GTP-azowej czynnika IF—2 (97—101). Białka L7 i L12 stanowią jednocześnie centrum hydrolizy GTP w etapie elongacji łańcucha polipeptydowego. Zagadnienie to oraz bliższa charakterystyka białek L7 i L12 zostaną omówione w rozdziale VI-3.

Zakończenie procesu inicjacji, to asocjacja podjednostek 30S i 50S. Z wcześniejszych obserwacji wynikało, że na połączenie się obydwu podjednostek do pełnego rybosomu 70S duży wpływ mają wiązania wodorowe (102) i mostki S—S (103). Późniejsze badania immunochemiczne wykazały, że w asocjacji podjednostek uczestniczą powierzchniowe białka zarówno mniejszej jak i większej podjednostki. Obecność przeciwciał dla białek S9, S11, S12, S14 i S20 oraz dla białek podjednostki 50S — LI, L6, L14, L15, L20, L23, L26 i L27, uniemożliwia powstawanie rybosomu 70S (104—105). Szczególną rolę przypisuje się grupie białek mniejszej podjednostki, ponieważ każde z nich posiada zdolność tworzenia kompleksu z podjednostką 50S.

IV. Elognacja łańcucha peptydowego

Do utworzonego kompleksu inicjującego przyłącza się aminoacylo-tRNA. Proces ten katalizuje czynnik elongacyjny EF—Tu, a energii dostarcza reakcja hydrolizy GTP.

Po przyłączeniu fMet-tRNA do miejsca P oraz AA-tRNA do miejsca A na rybosomie, następuje synteza wiązania peptydowego między grupą karboksylową fMet-tRNA a grupą aminową aminokwasu należącego do AA-tRNA. Następnie, reszta N-formylometioniny zostaje przeniesiona z inicjatorowego tRNA na AA-tRNA w wyniku czego powstaje peptydylo-tRNA. By mógł przyłączyć się kolejny AA-tRNA musi być zwolnione miejsce A, dlatego w reakcji zwanej translokacją peptydylo-tRNA ulega przemieszczeniu z miejsca A do miejsca P. Jednocześnie nic mRNA przesuwa się o jeden tryplet w kierunku końca 3'. Reakcji tej towarzyszy hydroliza GTP w obecności czynnika elongacyjnego EF—G (2, 7).



Schemat 2. Elongacja łańcucha peptydowego wg Haenni (7)

IV-1. Wiązanie aminoacylo-tRNA

Badanie kwestii, które z białek rybosomowych stanowią miejsce A zapoczątkowano w pracowni N o m u r y (89). Stosując metodę rekonstrukcji rybosomu wykazano, że brak w podjednostce 30S takich białek jak S3, S10, S14 powoduje spadek wiązania się aminoacylo-tRNA. Badania te zostały w znacznej mierze potwierdzone przez innych badaczy, którzy zaobserwowali stymulujący wpływ białek S2, S3, S14 na przyłączenie się aminoacylo-tRNA do rybosomów w obecności czynnika EF—Tu (106). Ostatnie doświadczenia z surowicami monowalentnymi wykazały, że miejsce A jest jeszcze większe. Surowice anty S3, S9, S11, S18, S19 oraz S21 silnie hamują enzymatyczne wiązanie fenyloalanylo-tRNA do rybosomów w obecności poliU (74).

Dalszych informacji o miejscu rybosomowym wiążącym AA-tRNA dostarczyły badania z zastosowaniem streptomycyny. Antybiotyk ten powoduje zaburzenia w prawidłowej translacji kodu genetycznego (107—108). Doświadczenia ze znakowaną pochodną antybiotyku oraz z zastosowaniem metody rekonstrukcji podjednostki 30S wykazały, że za wiązanie streptomycyny do rybosomu odpowiedzialne jest białko S12 (74, 109—110). Białko to decyduje równocześnie o rozmiarze pomyłek translacyjnych pod wpływem omawianego antybiotyku (89). Rolę uzupełniającą przypisuje się białkom S3, S4, S5 i S11.

Udział białka S12 w omawianym procesie jak również w reakcji wiązania kompleksu IF—2 — fMet-tRNA (rozdz. III.) daje podstawę do przy-

puszczeń, że znajduje się ono w takim obszarze podjednostki 30S, gdzie odbywa się interakcja tRNA z mRNA (89, 111).

Miejsce A podobnie jak i miejsce P zasięgiem swoim obejmuje szereg białek rybosomowych obydwu podjednostek. Do identyfikacji białek tworzących miejsce A na podjednostce 50S wykorzystano właściwości takich antybiotyków jak chloramfenikol i puromycyna. Chloramfenikol jest inhibitorem syntezy wiązania peptydowego, gdyż wiążąc się z rybosomem, a ściślej biorąc z podjednostką 50S, blokuje miejsce A, do którego przyłącza się AA-tRNA (3). Identyfikację składników rybosomowych przyłączających chloramfenikol, przeprowadzono z zastosowaniem pochodnych tego antybiotyku: ^{14}C -monojodoamfenikolem i ^{14}C -monobromamfenikolem (112—114). Wiązanie pochodnych z białkiem L16 świadczy, że znajduje się ono w miejscu A. Potwierdzają to doświadczenia z rekonstrukcją podjednostki 50S (115).

Antybiotykiem, który współzawodniczy z chloramfenikolem o miejsce na rybosomie jest puromycyna. Antybiotyk ten z racji podobieństwa strukturalnego do nukleotydu adenilowego znajdującego się na końcu 3'-tRNA, może być wbudowany do łańcucha polipeptydowego poprzez utworzenie wiązania peptydowego między wolną grupą aminową puromycyny a grupą karboksylową ostatniego aminokwasu w syntetyzującym się łańcuchu polipeptydowym. W wyniku reakcji następuje uwolnienie polipeptydu zakończonego puromycyną. Podobnie jak dla streptomycyny czy chloramfenikolu tak i tu zastosowano znakowane pochodne puromycyny, dzięki którym uzyskano możliwość identyfikacji białek rybosomowych tworzących miejsce A. N-jodoacetylopuromycyna (116) oraz N-bromoacetylopuromycyna (117) wiążą się z białkami L2 i L6.

IV-2. Synteza wiązania peptydowego

Reakcję syntezy wiązania peptydowego katalizuje enzym zwany transferazą peptydylową, która jest integralnym składnikiem rybosomu. Stwierdzenie to oparte jest na wynikach badań z puromycyną, która może wbudować się do łańcucha białkowego poprzez utworzenie wiązania peptydowego z C-końcowym aminokwasem syntetyzowanego polipeptydu (rozdział II-2.). Omawiana reakcja odbywa się w obecności rybosomów lecz niezbędne są podjednostki 50S (118).

W tak zwanej reakcji cząstkowej (ang. *fragment reaction*) można badać *in vitro* aktywność transferazy peptydylowej (119). Reakcja ta zachodzi przy udziale podjednostki 50S i odbywa się w obecności alkoholu oraz kationów jedno- i dwuwartościowych. W tych warunkach wiązanie peptydowe powstaje między grupą aminową puromycyny a grupą karboksylową aminokwasu związanego z pięcionukleotydowym fragmentem tRNA, który otrzymuje się na drodze enzymatycznej hydrolizy acetyloleucylo-tRNA.

Możliwość syntezy wiązania peptydowego świadczy, że transferaza peptydylowa jest strukturalnym składnikiem większej podjednostki rybosomu.

Badając aktywność transferazy peptydylowej w naturalnych prekursorach podjednostki 50S wykazano, że prekursor 43S, w którym brakowało kilku białek był nieaktywny w reakcji cząstkowej (120). Podobne wyniki uzyskano z rybonukleoproteidowymi cząsteczkami otrzymanymi z podjednostek 50S poprzez płukanie ich wysokimi stężeniami LiCl (0,4—0,8M). W tych warunkach odczepiała się od rybosomu pewna grupa białek określana mianem białek powierzchniowych. Otrzymany rdzeń podjednostki 50S o stałej sedymentacji zbliżonej wartością do prekursorów naturalnych, był również nieaktywny w reakcji cząstkowej. Analiza chromatograficzna białek odczepionych od rybosomu wykazała między innymi obecność trzech białek L6, L11 i L16. Dodanie tych białek do rdzenia podjednostki powodowało przywrócenie aktywności transferazowej. Badania struktury przestrzennej podjednostki wykazały, że białka te nie tylko sąsiadują ze sobą, ale również z miejscem rybosomowym, do którego wiąże się AA-tRNA (121, 122). Istnieją przypuszczenia, że do grupy białek uczestniczących w syntezie wiązania peptydowego należy również L15 (123). Dokładna analiza roli wymienionych białek wykazała, że białko L11 wpływa zasadniczo na aktywność transferazy peptydylowej i dlatego uważa się je za centrum aktywności transferazowej na rybosomie (124). Z wyników analizy aminokwasowej białka L11 można sądzić, że o jego aktywności enzymatycznej decyduje duża zawartość grup metylowych dołączonych głównie do ϵ -N-lizyny a także do innych aminokwasów dotąd nie zidentyfikowanych (125).

IV-4. Translokacja

Translokacji peptydylo-tRNA z miejsca A do miejsca P towarzyszy reakcja hydrolizy GTP, która zachodzi przy udziale czynnika elongacyjnego EF—G. Ponieważ odbywa się to na rybosomie, dlatego zachodziło więc pytanie: które białka rybosomowe uczestniczą w hydrolizie GTP? Doświadczenia z rekonstrukcją podjednostek wykazały, że o aktywności GTP-azowej podczas elongacji łańcucha peptydowego decydują dwa powierzchniowe białka podjednostki 50S: L7 i L12 (126—129). Białka te stanowią ogniwo łączące EF—G z podjednostką 50S (130—131), gdyż obecność surowic anty-L7 i L12 zapobiega interakcji czynnika elongacyjnego z rybosomami oraz hamuje aktywność GTP-azową w procesie elongacji (132).

Ze względu na budowę chemiczną oraz funkcję białek L7 i L12 porównuje się je z białkami kurczliwymi. Analiza aminokwasowa wykazała w nich dużą zawartość alaniny, kwasu glutaminowego, waliny i lizyny przy jednoczesnym braku lub znikomej zawartości tyrozyny, tryptofanu, cysteiny i histydyny (127—128, 133—134). Ponadto białka te cechuje duża

zawartość struktury α -heliksowej (50⁰/₀—60⁰/₀) w porównaniu z pozostałymi białkami rybosomu (135—136). Łańcuchy obydwu białek składają się ze 120 aminokwasów o tej samej sekwencji i masach cząsteczkowych, która wynosi 12200 (137), lecz różnią się od siebie aminokwasem N-końcowym. W białku L7 występuje acetyloseryna natomiast w białku L12 — seryna. Acetylowanie białka L12 do L7 zachodzi jeszcze przed przyłączeniem L7 do rybosomu (138). Punkty izoelektryczne obydwu białek różnią się nieznacznie i przypadają w pH = 4,7 i pH = 4,85 (128). Te pozornie niewielkie różnice w budowie i właściwościach omawianych białek odgrywają decydującą rolę w aktywności GTP-azowej podczas elongacji łańcucha peptydowego (127, 129, 137).

Badania procesu translokacji przy użyciu fotolabilnej pochodnej GDP: ³H-azydofenolo-GDP oznaczoną skrótem APh—GDP dostarczyły danych o miejscu rybosomowym wiążącym kompleks EF—G — GDP (139). Autoradiograficzna analiza elektroforogramów białek rybosomowych znakowanych ³H-APh—GDP wykazała radioaktywne piętno w L5, L11, L18 i L30. Trzy z wymienionych białek: L5, L18 i L30 tworzą kompleks z 5S rRNA (140), co decyduje zapewne o określonej strukturze podjednostki 50S pełniącej kluczową rolę w translokacji peptydylo-tRNA (141).

W ostatnim czasie zwrócono uwagę na białka L6 i L10. Nie uczestniczą one co prawda bezpośrednio w hydrolizie GTP, lecz ich obecność w rdzeniu podjednostki 50S jest niezbędna do rekonstrukcji rybosomu pozbawionego białek L7 i L12 (131, 142). Potwierdzają to doświadczenia z surowicami anty- L6 i L10, które hamują proces rekonstrukcji podjednostki 50S pozbawionej białek L7 i L12 (143—145).

Hydroliza GTP zachodzi również w procesie inicjacji. Sugeruje to, że w reakcji uczestniczy podjednostka 30S. Uzyskane wyniki wskazują, że kilka białek tej podjednostki: S5, S9 i S2 warunkuje aktywność GTP-azową kompleksu 70S — EF—G (146—147). Białka te wpływają zapewne tylko na odpowiednią konformację rybosomu, gdyż centrum GTP-azowe znajduje się na podjednostce 50S. O tym czy hydroliza GTP odbywa się w etapie inicjacji czy elongacji łańcucha peptydowego decydują czynniki enzymatyczne, ponieważ tiostrepton hamuje aktywność GTP-azową czynnika EF—G nie powodując zakłóceń w hydrolizie GTP przy udziale czynnika inicjującego IF—2 (97—101).

Identyfikację białek tworzących miejsce P na podjednostce 50S wykonano przy użyciu fotolabilnych pochodnych peptydylo-tRNA, okazało się, że centrum miejsca P na podjednostce 50S stanowią białka L2 i L27. Kilka innych białek: L15, L16, L24, i L26 pełni rolę kooperatywną (52—56). Dane te znacznie pokrywają się z wynikami jakie otrzymano przy użyciu pochodnej inicjatorowego tRNA (rozdział III-2.).

Badania z erytromycyną opornymi mutantami *E. coli* wykazały, że w miejscu P znajduje się białko L4, które aktywnie uczestniczy w wiązaniu peptydylo-tRNA (148).

V. Zakończenie syntezy łańcucha peptydowego

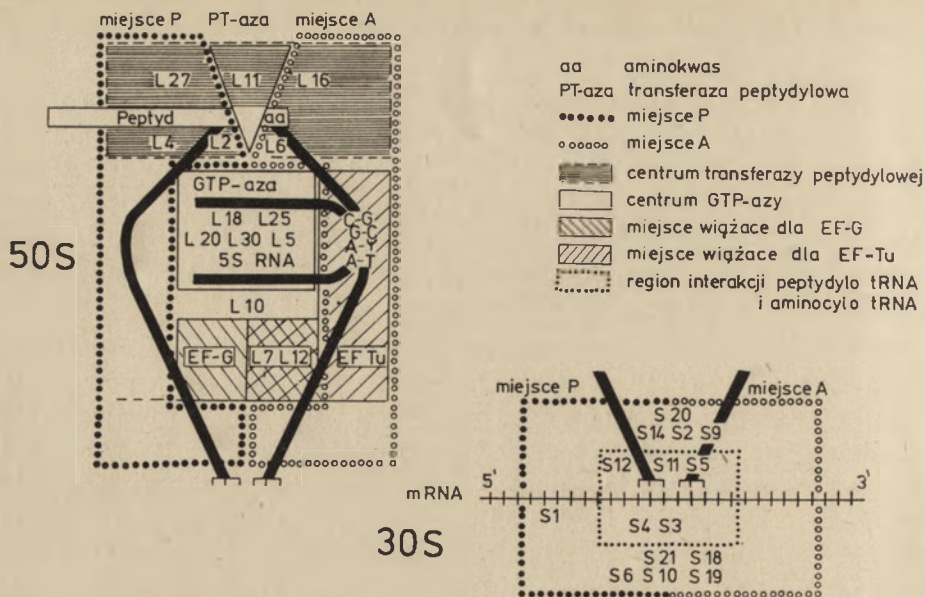
Synteza łańcucha peptydowego kończy się tzw. kodonami nonsensownymi: UAA, UAG oraz UGA. Proces ten zwany inaczej terminacją, wymaga obecności GTP a katalizują go czynniki białkowe: RF—1 i RF—2 (od ang. *release factor*). Czynniki RF—1 rozpoznaje kodony nonsensowne UAA i UAG, a czynniki RF—2 rozpoznaje kodony UAA lub UGA. Istnieje również trzeci czynnik — S, któremu przypisuje się rolę pośrednika, bądź stymulatora RF—1 i RF—2 w procesie terminacji (6).

Mechanizm terminacji polega na przyłączeniu czynników RF do kompleksu peptydylo-tRNA — kodon nonsensowny — rybosom, powodując hydrolizę wiązania estrowego między tRNA a peptydem, co prowadzi do uwolnienia łańcucha peptydowego. Aktywność czynników RF zależy od obecności na rybosomie białek L7 i L12. Wskazują na to doświadczenia z inhibitorem elongacji — tiostreptonem, który wpływa tak samo na proces terminacji jak usunięcie z podjednostki 50S białek L7 i L12 (149). Dysocjacja składników kompleksu terminacyjnego odbywa się kosztem energii czerpanej z hydrolizy GTP przy udziale czynnika S (150—151). Mimo podobieństwa w aktywności GTP-azowej czynników EF—Tu i EF—G z czynnikami terminacyjnymi, brak jest dowodów świadczących o identyczności czynników terminacyjnych i czynników elongacyjnych (152—153).

VI. Uwagi końcowe

Pewne wyobrażenie o usytuowaniu i budowie miejsc aktywnych rybosomu daje Schemat 3. Należy jednak pamiętać, że rybosom podczas kolejnych etapów translacji ulega zmianom konformacyjnym. Prowadzi to z jednej strony do wyeksponowania białek rybosomowych aktywnie zaangażowanych w określoną reakcję, z drugiej zaś strony do „maskowania” miejsc rybosomowych nie uczestniczących w tym etapie biosyntezy białka. Tylko niektóre białka takie jak L7 i L12, znajdują się w ciągłym „pogotowiu”, gdyż od ich obecności zależy hydroliza GTP począwszy od tworzenia się kompleksu inicjującego a skończywszy na reakcji kompleksu terminacyjnego.

Wyjaśnienie związku między strukturą rybosomu a funkcją jego składników zależy od dokładnej znajomości topografii tej organelli. Wiele danych na ten temat dostarczyły badania prowadzone w laboratorium Normury (154), dotyczące mapowania (przestrzennego rozmieszczenia) białek rybosomowych w podjednostce 30S. Badania te zostały w ostatnim czasie poszerzone o zagadnienia biogenezy podjednostki (155). Dalszego postępu w badaniach struktury rybosomu można spodziewać się po zastosowaniu techniki immunoelektromikroskopii. Pozwala ona na fotografo-



Schemat 3. Schemat miejsc aktywnych rybosomu (zmodyfikowany (15))

wanie kompleksów antygen (białko rybosomowe) — przeciwciało (156—157).

Omawiając strukturę i funkcję białek rybosomowych nie należy zapominać o rybosomowych rRNA. Udział tego składnika w procesie translacji kodu genetycznego jest nie mniej istotny od udziału białek rybosomowych.

Bardzo dziękuję Panu Profesorowi dr Eugeniuszowi Gąsiorowi za przeczytanie rękopisu i poczynienie cennych uwag, które wykorzystałem przy redagowaniu niniejszego artykułu.

Artykuł nadszedł 26.7.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 2.12.1975.

Po oddaniu pracy do druku ukazał się artykuł przeglądowy Wittmanna (Wittmann H. G., (1976), *Eur. J. Biochem.*, 61, 1—13.) uwzględniający wiele nowości dotyczących struktury, funkcji i ewolucji rybosomów.

PIŚMIENNICTWO

1. Lengyel P., Söll D., (1969), *Bacteriol. Rev.*, 33, 264—301.
2. Lucas-Lenard I., Lipmann F., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 409—448.
3. Pestka S., (1971), *Ann. Rev. Microbiol.*, 25, 487—552.
4. Rudland P. S., Clark B. F. C., (1972), w *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation*, red. Bosch L. t. 27, str. 55—86, Amsterdam: North Holland Publ. Co.
5. Revel M., (1972), w *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation*, red. Bosch L. t. 27, str. 87—131, Amsterdam: North Holland Publ. Co.

6. Beaudet A. L., Caskey C. T., (1972), w *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation*, red. Bosch L. t. 27, str. 133—172, Amsterdam: North Holland Publ. Co.
7. Haenni A. L., (1972), w *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation*, red. Bosch L. t. 27, str. 33—54, Amsterdam: North Holland Publ. Co.
8. Spirin A. S., Gawrilowa L. P., (1969), *The Ribosomes*, Springer—Verlag, Berlin and New York.
9. Wittmann H. G., Stöffler G., (1972), w *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation*, red. Bosch L. t. 27, str. 285—351, Amsterdam: North Holland Publ. Co.
10. Nomura M., (1970), *Bacteriol. Rev.*, **34**, 228—277.
11. Traub P., (1970), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **52**, 1—93.
12. Kurland C. G., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 377—408.
13. Nomura M., (1973), *Science*, **179**, 864—873.
14. Garrett R. A., Wittmann H. G., (1973), *Advanc. Protein Chem.*, **27**, 277—347.
15. Pongs O., Nierhaus K. H., Erdmann V. A., Wittmann H. G., (1974), *FEBS Letters*, **40** Suppl., S28—S37.
16. Gąsior E., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 485—507.
17. Grzelakowska-Sztabert B., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 509—522.
18. Zagórska L., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 537—549.
19. Szumiel I., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 565—589.
20. Krajewska E., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 119—144.
21. Gąsior E., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 515—524.
22. Koj A., (1974), *Post. Biol. Kom.*, **1**, 177—191.
23. Perzyński S., Zagórska L., Klita S., (1974), w *Antybiotyki w badaniu procesów biochemicznych*, red. Raczyńska-Bojanowska K. t. 28, str. 35—72, P.W.N. Warszawa.
24. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 553—567.
25. Gołaszewski T., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 393—422.
26. Szafranski P., (1974), w *Molekularne podstawy biosyntezy białka*, red. Bober B., str. 1—73, Ossolineum Wrocław.
27. Monier R., (1972), w *The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation*, red. Bosch L. t. 27, str. 353—394, Amsterdam: North Holland Publ. Co.
28. Nomura M., Traub P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **34**, 609—619.
29. Craven G. R., Voynow P., Hardy S. I. S., Kurland C. G., (1969), *Biochemistry*, **8**, 2906—2915.
30. Traut R., R., Delius H., Ahmad-Zadeh C., Bickle T. A., Pearson P., Tissierés A., (1969), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 25—38.
31. Waller J. P., Harris J. I., (1961), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 18—23.
32. Spitnik-Elson P., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 557—562.
33. Fogel S., Sypherd P. S., (1968), *J. Bacteriol.*, **96**, 358—364.
34. Hardy S. I. S., Kurland C. G., Voynow P., Mora G., (1969), *Biochemistry*, **8**, 2897—2905.
35. Kaltschmidt E., Wittmann H. G., (1970), *Anal. Biochem.*, **36**, 401—412.
36. Kaltschmidt E., Wittmann H. G., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1276—1282.
37. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittmann H. G., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1909—1913.

38. Kaltschmidt E., Dzionara M., Wittmann H. G., (1970), *Mol. Gen. Genet.*, **109**, 292—297.
39. Kaltschmidt E., (1971), *Anal. Biochem.*, **43**, 25—31.
40. Hindennach I., Stöffler G., Wittmann H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 7—11.
41. Hindennach I., Kaltschmidt E., Wittmann H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 12—16.
42. Stöffler G., Wittmann H. G., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**, 407—409.
43. Stöffler G., Wittmann H. G., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2283—2287.
44. Wittmann H. G., Stöffler G., Hindennach I., Kurland C. G., Randall-Hazelbauer L., Birge E. A., Nomura M., Kaltschmidt E., Mizushima S., Traut R. R., Bickle T. A., (1971), *Mol. Gen. Genet.*, **111**, 327—333.
45. Moore P. B., Traut R. R., Noller H., Pearson P., Delius H., (1968), *J. Mol. Biol.*, **31**, 441—461.
46. Kurland C. G., Voynow P., Hardy S. I. S., Randall L., Lutter L., (1969), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 17—24.
47. Weber H. J., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 233—248.
48. Thammana P., Kurland C. G., Deusser E., Weber I., Maschler R., Stöffler G., Wittmann H. G., (1973), *Nature, New Biology*, **242**, 47—49.
49. Deusser E., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 249—258.
50. Traub P., Nomura M., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 777—784.
51. Czernilofsky A. P., Kuechler E., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, **272**, 667—671.
52. Czernilofsky A. P., Collatz E. E., Stöffler G., Kuechler E., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 230—234.
53. Pellegrini M., Oen H., Cantor C. R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 837—841.
54. Oen H., Pellegrini M., Eilat D., Cantor C. R., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2799—2803.
55. Pellegrini M., Oen H., Eilat D., Cantor C. R., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 809—829.
56. Eilat D., Pellegrini M., Oen H., Lapidot Y., Cantor C. R., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 831—840.
57. Hauptmann R., Czernilofsky A. P., Voorma H. O., Stöffler G., Kuechler E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 331—337.
58. Hsiung N., Reines S. A., Cantor C. R., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 841—855.
59. Moore P. B., (1966), *J. Mol. Biol.*, **22**, 145—163.
60. Craven G. R., Gavin R. H., Fanning T. G., (1969), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 129—137.
61. Heintz R. L., Mc Allister H. C., Arlinghaus R., Schweet R. S., (1966), *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.*, **31**, 633—639.
62. Traut R. R., Haenni A. L., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 64—73.
63. Tamaoki T., Miyazawa F., (1967), *J. Mol. Biol.*, **23**, 35—46.
64. Ratsema J. A., Conway T. W., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **179**, 369—380.
65. Moore P. B., (1971), *J. Mol. Biol.*, **60**, 169—184.
66. Kahan L., Held W. A., Nomura M., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 797—808.
67. Gavrilowa L. P., Spirin A. S., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 13—16.

68. Chang F. N., Flaks I. G., (1972), *J. Mol. Biol.*, **68**, 177—180.
69. Lutter L. C., Zeichhardt H., Kurland C. G., Stöffler G., (1972), *Molec. Gen. Genet.*, **119**, 357—366.
70. Bickle T. A., Hershey J. W. B., Traut R. R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1327—1331.
71. Slobin L., (1972), *J. Mol. Biol.*, **64**, 297—304.
72. Shih C. Y. T., Craven G. R., (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 651—663.
73. Sommer A., Traut R. R., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3946—3950.
74. Lelong I. C., Gros D., Gros F., Bollen A., Maschler R., Stöffler G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 248—252.
75. Stöffler G., Hasenbank R., Bodley J. W., Highland J. H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 171—174.
76. Highland J. H., Ochsner E., Gordon J., Hasenbank R., Stöffler G., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 175—178.
77. Noll M., Noll H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **89**, 477—494.
78. Van Duin J., Kurland C. G., (1970), *Mol. Gen. Genet.*, **109**, 169—176.
79. Fiser I., Scheit K. H., Stöffler G., Kuechler E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1112—1118.
80. Bähr W., Faerber P., Scheit K. H., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 535—544.
81. Tal M., Aviram M., Kanarek A., Weiss A., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **281**, 381—392.
82. Voynow P., Kurland C. G., (1971), *Biochemistry*, **10**, 517—524.
83. Petre J., Bollen A., Nokin P., Grosjean H., (1972), *Biochimie*, **54**, 823—827.
84. Hawley D. A., Slobin L. I., Wahba A. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 494—500.
85. Lodish H. F., (1970), *Nature*, **226**, 705—708.
86. Inouye H., Pollack Y., Petre J., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **45**, 109—117.
87. Hermoso J. M., Szer W., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4708—4712.
88. Van Duin J., Van Knippenberg P. H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **84**, 185—195.
89. Nomura M., Mizushima S., Ozaki M., Traub P., Lowry C. V., (1968), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 49—61.
90. Van Knippenberg P. H., Dieben M., Kurland C. G., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **116**, 181—191.
91. Bickle T. A., Howard G. A., Traut R. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4862—4864.
92. Held W. A., Nomura M., Hershey J. W. B., (1974), *Mol. Gen. Genet.*, **128**, 11—22.
93. Held W. A., Gette W. R., Nomura M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2115—2122.
94. Dubnoff I. S., Lockwood A. H., Maitra U., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2884—2894.
95. Lockwood A. H., Sarkar P., Maitra U., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3602—3605.
96. Fakunding J. L., Hershey J. W. B., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4206—4212.
97. Kay A., Sander G., Grunberg-Manago M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 979—986.

98. Hamel E., Koka M., Nakamoto T., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 805—814.
99. Mazumder R., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1939—1942.
100. Fakunding J. L., Traut R. R., Hershey J. W. B., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8555—8559.
101. Lockwood A. H., Maitra U., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1213—1218.
102. Miyazawa F., Tamaoki T., (1967), *J. Mol. Biol.*, **24**, 485—489.
103. Tamaoki T., Miyazawa F., (1967), *J. Mol. Biol.*, **23**, 35—46.
104. Morrison C. A., Garrett R. A., Zeichardt H., Stöffler G., (1973), *Mol. Gen. Genet.*, **127**, 359—368.
105. Stöffler G., Daya L., Rak K. H., Garrett R. A., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**, 411—414.
106. Randall-Hazelbauer L. L., Kurland C. G., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **115**, 234—242.
107. Davies I., Gilbert W., Gorini L., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**, 883—890.
108. Gorini L., Davies I., (1968), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **44**, 100—122.
109. Cox E. C., White J. R., Flaks J. G., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**, 703—709.
110. Kaji H., Tanaka Y., (1968), *J. Mol. Biol.*, **32**, 221—230.
111. Schreiner G., Nierhaus K. H., (1973), *J. Mol. Biol.*, **81**, 71—82.
112. Bald R., Erdmann V. A., Pongs O., (1972), *FEBS Letters*, **28**, 149—152.
113. Pongs O., Bald R., Erdmann V. A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2229—2233.
114. Sonenberg H., Wilchek M., Zamir A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1423—1426.
115. Nierhaus D., Nierhaus K. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2224—2228.
116. Pongs O., Bald R., Wagner T., Erdmann V. A., (1973), *FEBS Letters*, **35**, 137—140.
117. Harris R. I., Greenwell P., Symons R. M., (1973), *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **55**, 117—124.
118. Monro R. E., (1967), *J. Mol. Biol.*, **26**, 147—151.
119. Monro R. E., (1971), w *Methods in Enzymology*, t. 20, str. 472—481, Academic Press, New York.
120. Nierhaus K. H., Bordasch K., Homann H., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 587—597.
121. Dietrich S., Schrandt I., Nierhaus K. H., cyt. za poz. 15.
122. Wittmann H. G., Apirion D., komunikat, cyt. za poz. 15.
123. Ballesta J. P. G., Montejo V., Hernandez F., Vazquez D., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 167—175.
124. Nierhaus K. H., Montejo V., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1931—1935.
125. Alix J. H., Hayes D., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 139—159.
126. Kischka K., Möller W., Stöffler G., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 62—63.
127. Möller W., Groene A., Terhorst C., Amons R., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 5—12.
128. Terhorst C., Wittmann-Liebold B., Möller W., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 13—19.
129. Sander G., Marsh R. C., Parmeggiani A., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 866—873.

130. Hamel E., Koka M., Nakamoto T., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 805—814.
131. Brot N., Yamasaki E., Redfield B., Weissbach H., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 148—155.
132. Highland J. H., Bodley J. W., Gordon J., Hasenbank R., Stöffler G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 147—150.
133. Hindennach F., Kaltschmidt E., Wittmann H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 7—11.
134. Hindennach F., Kaltschmidt E., Wittmann H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 12—16.
135. Möller W., Castleman H., Terhorst C. P., (1970), *FEBS Letters*, **8**, 192—196.
136. Dzionara M., (1970), *FEBS Letters*, **8**, 197—200.
137. Terhorst C., Möller W., Laursen R., Wittmann-Liebold B., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 138—152.
138. Brot N., Weissbach H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 673—679.
139. Maassen I. A., Möller W., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1277—1280.
140. Horne I. R., Erdmann V. A., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 337—344.
141. Horne I. R., Erdmann V. A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2870—2873.
142. Highland I. H., Ochsner E., Gordon I., Bodley I. W., Hasenbank R., Stöffler G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 627—630.
143. Schrier P. I., Maassen I. A., Möller W., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 90—98.
144. Acharya A. S., Moore P. B., Richards F. M., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3108—3114.
145. Stöffler G., Hasenbank R., Bodley I. W., Highland I. H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 171—174.
146. Marsh R. C., Parmeggiani A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 151—155.
147. Sandar G., Marsh R. C., Parmeggiani A., (1973), *FEBS Letters*, **33**, 132—134.
148. Wittmann H. G., Stöffler G., Apirion D., Rosen L., Tanaka K., Tamaki M., Takata R., Dekio S., Otaka E., Osawa S., (1973), *Mol. Gen. Genet.*, **127**, 175—189.
149. Brot N., Tate W. P., Caskey C. T., Weissbach H., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 89—92.
150. Goldstein I. L., Caskey C. T., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 537—543.
151. Beaudet A. L., Caskey C. T., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 619—624.
152. Tate W. P., Beaudet A. L., Caskey C. T., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2350—2352.
153. Caskey C. T., Scolnick E., Tompkins R., Goldstein I. L., Milman G., (1969), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 479—488.
154. Mizushima S., Nomura M., (1970), *Nature*, **226**, 1214—1218.
155. Kaltschmidt E., Kahan L., Nomura M., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 446—450.
156. Tischendorf G. W., Zeichardt H., Stöffler G., (1974), *Mol. Gen. Genet.*, **134**, 187—208.
157. Tischendorf G. W., Zeichardt H., Stöffler G., (1974), *Mol. Gen. Genet.*, **134**, 209—223.

Redakcja kwartalnika „Postępy biologii Komórki” uprzejmie zawiadamia, że w zeszytcie 2/1976 ukażą się następujące artykuły:

J. KOPEĆ — Struktura i funkcja mastcytów ssaków

S. FABCZAK — Pobudliwość i skurcz ciała niektórych orzęsków

P. JANIK — Niektóre aspekty immunologii nowotworów

A. B. DUTKOWSKI, A. WARTOŃ — II konferencja Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN.

BOŻENA BORKOWSKA *)

Cytokininy

Cytokinins

Cytokininy stanowią grupę regulatorów wzrostu roślin. Uczestniczą one w regulacji licznych procesów biologicznych, ale ich najbardziej charakterystycznym działaniem fizjologicznym jest stymulacja podziałów komórkowych (cytokineza). Pod względem chemicznym cytokininy należą do grupy związków purynowych.

I. Odkrycie cytokinin

Już w roku 1913 *Haberlandt* postulował istnienie hormonów roślinnych, innych niż auksyny, których działanie przejawiałoby się stymulacją podziałów komórkowych. Wyizolowanie w roku 1938 ze zranionej tkanki roślinnej kwasu tłuszczowego — traumatyny, która lokalnie stymulowała podziały komórkowe, potwierdziło przypuszczenie *Haberlandta* (1).

Dopiero jednak w roku 1955 *Miller* (2) wyizolował z materiału zwierzęcego i następnie zidentyfikował związek, który silnie stymulował podziały komórkowe. Związek ten został nazwany kinetyną.

Odkrycie cytokinin w materiale roślinnym było wynikiem rozwoju badań nad roślinnymi kulturami tkankowymi. W latach 50-tych zauważono, że stosując w kulturach *in vitro* pożywki z dodatkiem mleka kokosowego lub wyciągu z niedojrzałych ziarn zboża obserwuje się wyraźną stymulację podziałów komórkowych hodowanej tkanki (3). Świadczy to o tym, że zarówno mleko kokosowe jak i wyciąg z niedojrzałych nasion zawierają hormony stymulujące cytokinezę i można izolować z nich te związki.

W latach 1961—1963 wyodrębniono z niedojrzałych ziarn kukurydzy i ustalono strukturę chemiczną związku, który bardzo silnie stymulował podziały komórkowe. Związek ten nazwano zeatyną (3, 4).

*) Dr, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Sadownictwa, 96-100 Skierniewice.

Wykaz stosowanych skrótów: BA — benzyloaminopuryna; 2iP — 6-(γ,γ ,dwumetyloaliloamino)-puryna; 2iPA — rybozyd 2iP; SD 8339 — 6-benzyloamino-9-tetrahydropranylopuryna; U — uracyl.

Całą grupę związków o właściwościach zbliżonych do kinetyny nazwano pierwotnie kininami. Ponieważ nazwą tą określono już białka zwierzęce, zaistniała konieczność znalezienia nowego terminu. Proponowano różne nazwy jak np. kinetenoidy czy fitokininy. Najbardziej trafny okazał się termin „cytokininy”, ponieważ odzwierciedla charakterystyczne działanie tych związków — stymulację cytotkinezy.

II. Budowa chemiczna i aktywność biologiczna

Cytokininy są pochodnymi adeniny, podstawionej przy atomie azotu w pozycji 6(N⁶) (wzór I).

Aktywność biologiczna cytokinin jest ściśle związana z budową cząsteczki i zależy od:

- miejsca przyłączenia bocznych podstawników do adeniny,
- rodzaju podstawnika (łańcuchy alkilowe lub pierścienie)
- długości dołączonego łańcucha alkilowego,
- liczby i rozmieszczenia podwójnych wiązań i grup hydroksylowych w podstawniku alkilowym,
- długości mostka pomiędzy adeniną a podstawnikiem pierścieniowym,
- modyfikacji cząsteczki adeniny (5, 6, 7).

Stwierdzono, że również niektóre związki niepurynowe, np. mocznik i jego pochodne, szczególnie dwufenylomocznik wykazują aktywność biologiczną charakterystyczną dla cytokinin. Nie wiadomo jednak czy funkcja, oraz mechanizm działania tych związków jest taki sam jak pochodnych adeniny.

III. Cytokininy endogenne oraz syntetyczne

Pierwszą zidentyfikowaną endogenną cytokininą była zeatyna (wzór II). Zeatynę znajdowano zarówno w roślinach wyższych jak i niższych (grzybach, drożdżach). Zeatyna występuje jako wolna zasada oraz w połączeniu z rybozą (rybozyd zeatyny) i jej fosforanem (rybotyd zeatyny), (wzór I). Najaktywniejszą biologicznie formą jest wolna zasada. Aktywność jej zależy od konfiguracji grupy hydroksylowej w bocznym łańcuchu. Grupa ta w wolnej zeatynie izolowanej z roślin występuje w pozycji *trans*, natomiast w zeatynie i jej pochodnych wyodrębnionych z produktów hydrolizy tRNA występuje w pozycji *cis*. Forma *trans* zeatyny wykazuje wyższą aktywność biologiczną od formy *cis* (8).

Naturalnie występującą pochodną zeatyny jest dwuhydrozeatyna (wzór IV). Związek ten nie posiada podwójnego wiązania w bocznym łańcuchu i dlatego aktywność jego jest znacznie niższa niż zeatyny.

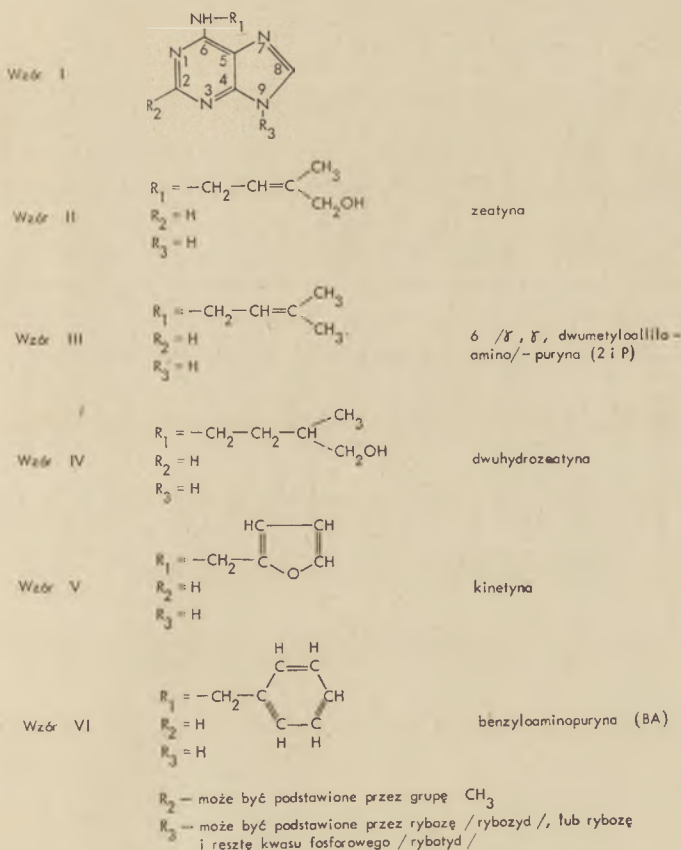
Drugą szeroko rozpowszechnioną naturalną cytokininą jest N⁶/γ,γ,dwu-metyloalliloamino/-puryna, oznaczona w skrócie 2iP (wzór III). Związek

ten występuje przede wszystkim w formie związanej z tRNA. Może występować jako rybozyd i rybotyd.

Z materiału roślinnego wyizolowana została również N⁶-metyloamino-puryna, która występuje w tRNA. Związek ten wykazuje aktywność biologiczną w niektórych testach, mimo to przynależność jego do grupy cytokinin jest wątpliwa.

Do endogennych cytokinin jest zaliczana również triakantyna: 3-(γ,γ , dwumetyloalliloamino)-puryna. Sama triakantyna nie wykazuje aktywności biologicznej, ponieważ boczny łańcuch jest przyłączony do adeniny poprzez heterocykliczny atom azotu w pozycji 3. Pozycja bocznego łańcucha ulega jednak bardzo łatwo konwersji do N⁶ przez co związek staje się aktywny biologicznie. Konwersja może zachodzić *in vitro* oraz *in vivo*. Triakantynę uważa się za „formę zapasową” cytokinin.

W ostatnich latach stwierdzono, że w ziarnach kukurydzy obok wcześniej zidentyfikowanej zeatyny występuje 10 innych związków — pochodnych adeniny, które posiadają aktywność cytokininową. Niektóre z tych



Ryc. 1. Budowa chemiczna cytokinin

związków powstają prawdopodobnie w wyniku enzymatycznych przekształceń cząsteczki zeatyny (9).

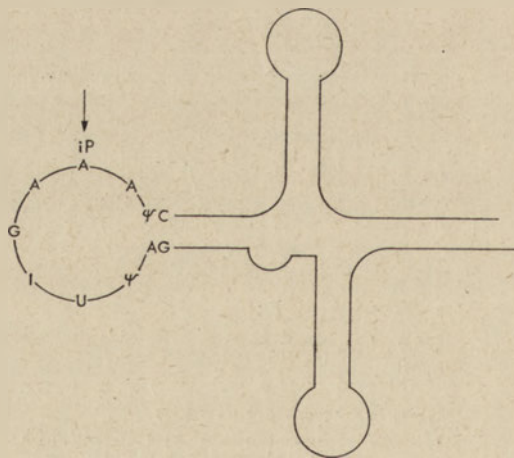
Najbardziej rozpowszechnionymi syntetycznymi cytokininami są kinetyna (wzór V), oraz benzyloaminopuryna (wzór VI). Kinetynę wyizolowano z materiału zwierzęcego, ale była prawdopodobnie artefaktem (produktem degradacji DNA) i nie jest uznawana za związek endogenny. Kinetyna i benzyloaminopuryna wykazują wysoką aktywność w różnych testach biologicznych. Zarówno kinetyna jak i benzyloaminopuryna syntetyzowane są jako wolne zasady i rybozydy.

Trzecią cytokininą syntetyczną jest 6-benzyloamino-9-tetrahydropyrynylopuryna (SD 8339). Aktywność jej w testach biologicznych jest niższa niż benzyloaminopuryny.

Oprócz wymienionych wyżej cytokinin zsyntetyzowano około 70 innych pochodnych purynowych. Ponieważ związki te posiadają tylko niewielką aktywność biologiczną lub są całkowicie nieaktywne nie znajdują praktycznego zastosowania (7).

IV. Cytokiny występujące w tRNA

W roku 1966 stwierdzono, że w tRNA specyficznym dla seryny znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie antykodonu rybozyd 6-(γ,γ ,dwumetyloalliloamino)-puryny (2iPA), (Ryc. 2), (10). Od tego czasu wielokrotnie znajdowano rybozyd 2iP w produktach hydrolizy tRNA z szeregu organizmów, a więc bakterii, drożdży, roślin wyższych, a nawet ssaków (6, 10, 11). Nie stwierdzono występowania cytokinin w mRNA, rybosomalnym RNA, oraz DNA.



Ryc. 2. Propozycja Holley'a budowy tRNA (liść koniczyny). W pętli sekwencja zasad antykodonu seryny. Strzałką oznaczono miejsce przyłączenia 2iPA

Cytokininy występują tylko w niektórych rodzajach tRNA specyficznego wobec seryny, rzadziej izoleucyny, tyrozyny i cysteiny. Spośród sześciu tRNA soi specyficznych wobec seryny tylko dwa zawierają 2iP. Nigdy nie stwierdzono cytokinin w tRNA specyficznych dla argininy, glicyny oraz waliny. Wydaje się, że cytokininy występują w strukturze tych tRNA, w których sekwencja trzech zasad antykodonu zaczyna się od U.

Główną cytokininą, która występuje w tRNA jest rybozyd 2iP. W roślinach wyższych np. w niedojrzałych ziarnach zboża stwierdzono również obok rybozydu 2iP rybozyd zeatyny i ich pochodne tiometylowe.

Pochodzenie cytokinin występujących w tRNA nie jest dokładnie znane. Najprawdopodobniej reszta izopentylowa, która powstaje z kwasu mewalonowego poprzez izopentylpirofosforan, zostaje dołączona do adeniny występującej w tRNA.

Niewiele wiemy jaką rolę spełniają cytokininy w tRNA (12). Jedna z istniejących hipotez mówi, że cytokininy związane z tRNA działają jak regulatory wzrostu, druga przypisuje im działanie nie związane z hormonalną regulacją (10). Zgodnie z tą hipotezą rybozyd 6-(γ,γ ,dwumetyloalliloamino)-puryny (2iPA) spełnia w tRNA rolę zmetylowanej zasady, a więc wpływa na syntezę białka poprzez ułatwienie właściwego odczytania informacji oraz przez wybranie i dołączenie odpowiedniego aminokwasu. Wydaje się jednak, że hipoteza ta jest zbyt ogólna — cytokininy występują bowiem tylko w niektórych formach tRNA, a więc rola ich powinna być bardziej specyficzna.

V. Biosynteza i metabolizm cytokinin

Głównym miejscem biosyntezy cytokinin są korzenie. Ukorzenie roślin wywołuje takie same efekty jak potraktowanie ich egzogennymi cytokininami. W obu przypadkach obserwowano stymulację syntezy tRNA i białka (14, 15). Stwierdzono również, że wytworzenie korzeni opóźnia starzenie rośliny oraz zwiększa jej odporność na wysoką temperaturę (16). Są to typowe efekty wywoływane przez cytokininy.

Istnieje ścisły związek pomiędzy powstawaniem korzeni a zawartością endogennych cytokinin w roślinie (17). Wielokrotnie zostało stwierdzone, że zarówno w korzeniach jak i w soku wypływającym z korzeni występują związki cytokininopodobne (18, 19, 20, 21, 22). Szczególnie wysoką zawartość cytokinin stwierdzano w młodych korzeniach oraz w wierzchołkach korzeni (23).

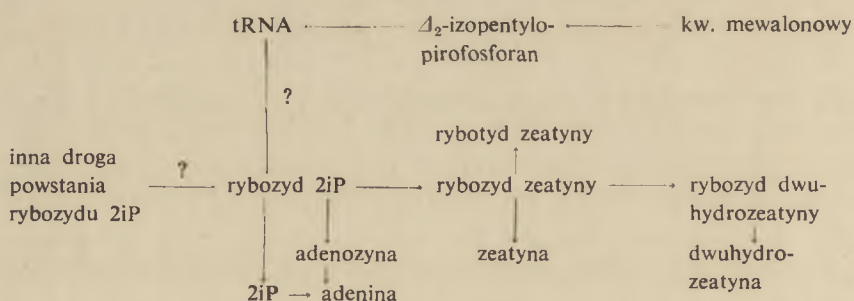
Korzenie nie są najprawdopodobniej jedynym miejscem syntezy cytokinin. Bogatym źródłem tych hormonów są młode, rozwijające się owoce i nasiona (24, 25, 26, 27), nasiona wymagające posprzętnego dojrzwania (28, 29, 30) oraz sok otrzymywany z pędów pozbawionych korzeni (31). Można więc sądzić, że cytokininy są produkowane również w tych tkankach.

Biosynteza cytokinin zachodzi także w tkance kalusowej, która do swojego wzrostu nie potrzebuje egzogennych cytokinin. Kalus taki nazywa się kalusem autonomicznym (32).

Droga biosyntezy cytokinin jest poznana bardzo słabo. Prekursorem bocznego łańcucha izoprenoidowego zarówno cytokinin występujących w tRNA jak i cytokinin wolnych jest kwas mewalonowy i mewaloniany. Cytokiny wolne mogą powstawać niezależnie od form związanych w tRNA lub też są uwalniane z tRNA (33). Większość badaczy uważa, że podczas biosyntezy cytokinin najpierw powstaje 6-(γ,γ ,dwumetyloallilo-amino)-puryna (wzór III) i jej rybozyd (32, 34, 35). Następnie związki te ulegają w roślinach dalszym przemianom. W tkance tytoniu oraz w ziarnach kukurydzy znaleziono dwa systemy enzymatyczne kierujące tymi przemianami. Jeden z nich katalizuje przemiany bocznego łańcucha, drugi hydrolizuje wiązanie glikozydowe. W wyniku działania tych enzymów 2iP i rybozyd 2iP zostają przekształcone do zeatyny i do rybozydu zeatyny. Zeatyna i jej rybozyd mogą być dalej przekształcane do adeniny i adenozyiny (34, 35, 36). Wśród produktów przekształceń znajdowano też dwuhydrozeatynę (37).

Bardzo prostym modelem nadającym się do badania metabolizmu cytokinin jest kalus autonomiczny (syntetyzujący cytokiny) i kalus wymagający cytokinin w pożywce. W kalusie autonomicznym istnieje aktywny system enzymatyczny przekształcający radioaktywną adeninę do cytokinin czynnych biologicznie, przede wszystkim do 2iP. W kalusie wymagającym cytokinin w pożywce adenina nie ulega przekształceniu w 2iP, a inne cytokiny (zeatyna i jej rybozyd) pojawiają się w znacznie mniejszych ilościach niż w kalusie autonomicznym (32).

Hall (33) zaproponował schemat biosyntezy i przemian cytokinin w tkance roślinnej (schemat 1).



Schemat 1. Droga biosyntezy oraz przemian cytokinin w roślinie (Hall, 1973)

System enzymatyczny katalizujący włączanie kwasu mewalonowego (poprzez Δ^2 -izopentylopirofosforan) do adeniny związanej w tRNA został częściowo oczyszczony. Jest to podstawowa reakcja prowadząca do powstania tRNA zawierającego 2iP.

Wielokrotnie stwierdzono, że w łańcuchu przemian cytokinin oprócz wymienionych wyżej związków występuje 7-glukozyd zeatyny (38, 39, 40, 41). Związek ten może być „zmagazynowaną formą” zeatyny.

Cytokiny syntetyczne (benzyloaminopuryna i kinetyna) ulegają w roślinie podobnym przemianom jak cytokiny naturalne (41, 42, 43, 44). Po potraktowaniu roślin radioaktywną benzyloaminopuryną lub kinetyną obok adeniny pojawiają się pochodne 7-glukozydowe tych związków. Świadczyłoby to o tym, że przyłączenie glukozy do cytokinin zachodzi w roślinach często i to zarówno do cytokinin syntetycznych jak i naturalnych.

Przemiany metaboliczne cytokinin zależą od rodzaju rośliny i stanu fizjologicznego. Np. inaczej zachodzą one w nasionach spoczynkowych niż po wyjściu nasion z okresu spoczynku. Skład pochodnych badanej cytokiny zmienia się również w czasie (37, 45).

Przemiany metaboliczne cytokinin prowadzą do powstania mniej lub bardziej aktywnych form, w zależności od „aktualnej potrzeby” rośliny. Ponieważ w roślinie występuje równocześnie cały szereg cytokinin należy sądzić, że wszystkie pochodne powstające w wyniku intensywnych przemian, wzajemnie współdziałają tworząc system czynny biologicznie.

VI. Biologiczne działanie cytokinin

Działanie hormonów roślinnych jest w przeciwieństwie do hormonów zwierzęcych niespecyficzne. Wzrost i różnicowanie roślin zależy nie od obecności lub braku specyficznego regulatora wzrostu, ale od współdziałania cytokinin, auksyn, giberelin i inhibitorów wzrostu.

Najlepiej poznano współdziałanie cytokinin z auksynami. Typowym przykładem synergizmu obydwu hormonów jest stymulacja podziałów komórkowych. Ani sama cytokinina, ani sama auksyna nie pobudza do dzielenia niemerystematycznych tkanek, wyizolowanych z roślin. Dopiero wspólne zastosowanie cytokinin i auksyn indukuje intensywne podziały komórkowe. Tkanki merystematyczne oraz tkanki z różnych narośli nie wymagają obecności cytokinin do rozpoczęcia i kontynuowania podziałów komórkowych. Można to tłumaczyć obecnością w komórkach merystematycznych systemu syntetyzującego cytokininy, który w czasie postępującego różnicowania i przejścia w region podmerystematyczny zostaje zablokowany w wyniku działania represora genowego.

Cytokiny i auksyny nie tylko stymulują podziały komórkowe tkanki roślinnej hodowanej *in vitro*, ale mogą również indukować jej morfogenezę. Stosunek cytokininy do auksyny decyduje w jakim kierunku nastąpi różnicowanie. Przy wysokim stężeniu cytokininy w stosunku do auksyny występuje stymulacja tworzenia pąków. Gdy stężenie cytokininy w stosunku do auksyny jest niskie wytwarzane są głównie korzenie. Indukcja

zarówno pąków jak i korzeni następuje tylko wtedy kiedy utrzymany jest odpowiedni stosunek tych dwóch hormonów.

Cytokininy i auksyny odgrywają również kluczową rolę w kontrolowaniu dominacji wierzchołkowej. Rozwój pąków bocznych jest hamowany przez auksyny, a stymulowany przez cytokininy (46). Rola cytokinin w dominacji wierzchołkowej może polegać na stymulowaniu różnicowania połączeń naczyniowych pomiędzy pąkiem, który będzie się rozwijał, a pozostałą częścią rośliny. Lepsze odżywienie pąka (dzięki rozwojowi elementów przewodzących) byłoby bezpośrednią przyczyną jego rozwoju.

Również typowym efektem działania cytokinin jest opóźnianie starzenia liści. Cytokininy hamują rozpad chlorofilu dzięki czemu tkanka nie traci zielonej barwy. Zjawisko to można wyjaśnić w różny sposób. Cytokininy łącznie z auksyną i gibereliną wytwarzają niszę fizjologiczną, a więc wpływają na lepsze odżywianie tkanki, co może opóźniać starzenie (47). Rola cytokinin w opóźnianiu starzenia może być związana z regulowaniem przez nie metabolizmu RNA. W starzejącej tkance poziom DNA, RNA oraz białek spada, a stosunek RNA:DNA ulega zmianie. Stwierdzono, że cytokininy zahamowują te procesy, oraz stabilizują, a nawet podwyższają stosunek RNA:DNA. Cytokininy mogą również opóźnić starzenie poprzez zahamowanie syntezy specyficznego mRNA odpowiedzialnego za tworzenie enzymów biorących udział w starzeniu jak np. RN-aza, peptydaza czy celulaza (10).

Cytokininy są jednym z czynników regulujących spoczynek nasion jak również pąków roślin drzewiastych. Poziom endogennyh cytokinin zmienia się w nasionach w zależności od stopnia przejścia przez nie posprzętnego dojrzewania. Maksimum zawartości cytokinin nie łączy się jednak z kiełkowaniem ale występuje znacznie wcześniej (28, 29, 30). Rola cytokinin w spoczynku pąków roślin drzewiastych jest mało poznana. Podobnie jak w nasionach maksymalna aktywność endogennyh cytokinin wyprzedza rozwój pąków (31, 48, 49). W regulacji spoczynku nasion i pąków cytokininy nie odgrywają więc roli stymulatora podziałów komórkowych, które zaczynają zachodzić dopiero w czasie rozpoczęcia wzrostu. Zastosowanie egzogennyh cytokinin może skrócić czas spoczynku nasion i pąków (50, 51, 52), ale nie może całkowicie zastąpić działania niskiej temperatury, niezbędnego dla ustąpienia spoczynku.

Zupełnie nowym zagadnieniem jest rola cytokinin w determinacji płci. W dotychczasowych pracach badano rolę giberelin jako czynnika stymulującego powstawanie kwiatów męskich oraz auksyn i etylenu jako czynników pobudzających powstawanie kwiatów żeńskich. Wyniki badań Negi i Olmo (53, 54) wykazały, że również cytokininy odgrywają rolę w determinacji płci roślin. Wydaje się, że mogą one być pierwotnym czynnikiem kierującym rozwojem kwiatów w kierunku żeńskości. Cytokinina SD 8339 przyśpiesza u winorośli *Vitis vinifera* (*silvestris*) podziały redukcyjne komórek macierzystych woreczka zalążkowego, oraz podziały mito-

tyczne megaspor. W wyniku potraktowania zawiązka kwiatowego egzogenną cytokininą powstaje woreczek zalążkowy o normalnej budowie, podczas gdy bez cytokininy woreczek zalążkowy jest mały i zawiera zdegenerowaną komórkę jajową. Występowanie endogennych cytokinin również jest związane z cechą żeńskości (55, 56). Kwiaty żeńskie i hermafrodytyczne syntetyzują cytokininy, podczas gdy w kwiatach męskich ich synteza jest zahamowana. Endogenne cytokininy mogą regulować rozwój kwiatów żeńskich poprzez stymulację syntezy enzymów potrzebnych do ich rozwoju (54).

W niektórych procesach morfogenetycznych cytokininy mogą spełniać tę samą funkcję co światło. Synteza niektórych enzymów cyklu Calvina odbywa się niezależnie od światła ale naświetlenie daleką czerwień może stymulować ich syntezę. Taki sam efekt jak naświetlenie może wywołać potraktowanie roślin cytokininą. Mechanizm działania cytokinin i dalekiej czerwieni jest inny, ale działanie ich jest wzajemnie uzależnione (33).

Najbardziej wyraźnym przykładem współdziałania fitochromu z cytokininami jest synteza beta-cyjaniny. Barwnik ten powstaje na świetle białym, ale w obecności cytokinin jest syntetyzowany również w ciemności.

VII. Oznaczanie cytokinin

Podstawową metodą wykrywania i oznaczania cytokinin, podobnie jak i innych hormonów roślinnych są testy biologiczne. W testach wykorzystuje się najbardziej charakterystyczne działanie tych związków na tkankę roślinną. W tabeli 1 zestawiono niektóre cechy najczęściej stosowanych testów.

Test biologiczny wykonywany na tkance kalusowej zarówno tytoniu jak i soi jest najbardziej specyficzną i najczulszą metodą oznaczania cytokinin. W teście kalusa wykorzystuje się zdolność cytokinin do stymulowania podziałów komórkowych. Miarą aktywności cytokinin jest przyrost świeżej masy tkanki kalusowej (57, 58, 59).

Inną metodą oznaczania cytokinin jest test wykonywany na siewkach amarantusa (60, 61). Test ten jest oparty na zdolności cytokinin do stymulacji syntezy beta-cyjaniny w siewkach szkarłatu *Amaranthus caudatus* hodowanych w ciemności. Test ten jest łatwiejszy do wykonania i znacznie krótszy niż test kalusa, ale czułość jego jest 10-100 razy niższa (Tabela 1).

Ponadto cytokininy można oznaczać wykorzystując zdolność tych hormonów do hamowania rozpadu chlorofilu w starzejącej się tkance liściowej, np. rzepienia (*Xanthium pensylvanicum*) (62).

W teście liścieni rzodkiewki wykorzystana jest zdolność cytokinin do stymulacji wzrostu blaszki liścienia (63). Analogiczny test może być wykonywany na liścieniach fasoli.

Cytokiny stymulują masowe pojawienie się pączków gametoforowych w splątku *Ceratodon purpureus* i *Funaria hygrometrica*. Fakt ten został wykorzystany do opracowania specyficznego testu na cytokiny (64, 65).

Test kiełkowania nasion wykonuje się najczęściej na nasionach sałaty. Test ten jest niespecyficzny, odpowiedniejszy raczej dla giberelin niż dla cytokinin.

Tabela 1

Porównanie kilku ważniejszych testów do oznaczania cytokinin

Test	Czas trwania w dniach	Najniższe wykrywalne stężenie kinetyny w mg/l	Inne substancje na które reaguje	Źródła informacji
kalusa tytoniu	28—35	0,001	niektóre gibereliny — nie GA ₃	24
kalusa soi	16—21	0,001—0,004	—	24
amarantusa	10—12	0,1—0,2	giberel., CCC	60, 61
chlorofilowy <i>Xanthium</i>	2	0,1	cukry, adenina adenozyzna	24
liścieni rzodkiewki	3	0,01	GA ₃	63
kiełkowania nasion sałaty	2	nieokreślone	giber., pochodne mocznika	24
pączków gametoforowych mchu	5—7	0,002	IAA, GA ₃ , 2,4-D z cytokin. dają efekt synerg. podwyższając wrażliwość testu	64, 65

Ponieważ metoda oznaczania cytokinin przy pomocy testów biologicznych jest obciążona błędem wskazane jest równoczesne stosowanie przynajmniej dwóch testów.

Równoległe z testami cytokiny można oznaczać przy pomocy metod chemicznych. Niektóre cytokiny można wykryć na bibule przy pomocy barwnej reakcji z odczynnikiem Dischego (66). Nie jest to jednak reakcja selektywna dla cytokinin, zabarwienie występuje bowiem z większością związków purynowych. Użyta łącznie z testem biologicznym może dać dodatkowe informacje o miejscu cytokinin na bibule. Po dokładnym rozdzieleniu związków cytokinino-podobnych metodą chromatografii bibulowej i cienkowarstwowej mogą one być oznaczane przy pomocy spektrofotometru. Nie jest to również metoda specyficzna, gdyż cały szereg związków purynowych posiada maksimum absorpcji podobne do zeatyny. Maksimum absorpcji zeatyny w wodnym roztworze kwasu wynosi 275m μ , w etanolowym 278m μ . Wykreślenie krzywej spektrofotometrycznej jest

możliwe dopiero wtedy, gdy stężenie cytokinin w roztworze jest nie mniejsze niż 10—20µg/1 ml rozpuszczalnika (67).

Jak już zostało powiedziane cytokininy występują w formie wolnej lub związanej. Aktywność biologiczna cytokinin związanych jest na ogół niższa niż odpowiednich form wolnych. Cytokininy uwalnia się z form związanych przez zastosowanie hydrolizy enzymatycznej lub kwaśnej. Hydrolizę enzymatyczną stosuje się głównie do uwolnienia cytokinin z tRNA, używając fosforylaze rybonukleozydową lub fosfatazę zasadową (11).

Hydroliza kwaśna jest niespecyficzna i może prowadzić nie tylko do odszczyepienia np. cząsteczki cukru, ale również do rozłożenia wolnej cytokininy (68).

Cytokininy łącznie z innymi regulatorami wzrostu roślin kierują wieloma procesami biologicznymi. Dokładne poznanie mechanizmu działania regulatorów wzrostu może stworzyć możliwość kierowania przez człowieka całym szeregiem zjawisk.

Mechanizm działania cytokinin jest poznany znacznie mniej niż innych hormonów roślinnych i dlatego konieczne jest prowadzenie intensywnych badań nad tą grupą regulatorów wzrostu. Szczególnie ważne jest poznanie ich roli w tRNA.

Artykuł nadszedł 11.10.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 15.12.1975.

PIŚMIENNICTWO

- Weaver R. J., (1972), *Plant Growth Substances in Agriculture*, str. 1—318, Freeman W. H. and Company, San Francisco.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M., (1956), *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1375—1381.
- Wilkins M. B., (1969), *The Physiology of Plant Growth and Development*, str. 85—194, Mc Graw-Hill, London.
- Miller C. O., (1961), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 170—174.
- Rogozińska J. H., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 435—445.
- Skoog F., Armstrong D. J., (1970), *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **21**, 359—384.
- Skoog F., Hamzi H. Q., Szweykowska A. M., Leonard N. J., Carraway K. L., Fujii T., Helgeson J. P., Loepky R. N., (1967), *Phytochemistry*, **6**, 1169—1192.
- Schmitz R. Y., Skoog F., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 702—705.
- Letham D. S., (1973), *Phytochemistry*, **12**, 2445—2455.
- Leshem Y., (1973), *The Molecular and Hormonal Basis of Plant Growth Regulation*, str. 121—129, Pergamon Press Ltd., Oxford.
- Armstrong D. J., Burrows W. J., Evans P. K., Skoog F., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 451—456.
- Richmond A., Back A., Sachs B., (1970), *Planta*, **90**, 57—65.
- Letham D. S., (1969), *Bio-Science*, **19**, 309—316.
- Mothes K., (1960), *Naturwissenschaften*, **47**, 337—351.
- Osborne D. J., (1962), *Plant Physiol.*, **37**, 595—602.

16. Monthes K., Engelbrecht L., (1963), *Life Sci.*, **2**, 852—857.
17. Engelbrecht L., (1972), *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **163**, 335—343.
18. Kende H., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **53**, 1302—1307.
19. Skene K. G. M., Kerridge G. H., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 1131—1139.
20. Skene K. G. M., (1972), *J. Exp. Bot.*, **23**, 768—774.
21. Skene K. G. M., (1972), *Planta*, **104**, 89—92.
22. Jones O. P., (1973), *J. Hort. Sci.*, **48**, 181—188.
23. Weiss C., Vaadia Y., (1965), *Life Sci.*, **4**, 1323—1326.
24. Letham D. S., (1967), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **18**, 349—364.
25. Letham D. S., Williams M. W., (1969), *Physiol. Plant.*, **22**, 925—936.
26. Letham D. S., (1966), *Life Sci.*, **5**, 1999—2004.
27. Zwar J. A., Bruce M. I., (1970), *Austr. J. Biol. Sci.*, **23**, 289—297.
28. Borkowska B., Rudnicki R., (1975), *Fruit Sci. Rep.*, **2**, 1—16.
29. Brown N. A. C., Van Staden J., (1973), *Physiol. Plant.*, **28**, 388—392.
30. Van Staden J., Webb D. P., Wareing P. F., (1972), *Planta*, **104**, 110—114.
31. Hewett E. W., Wareing P. F., (1974), Mechanisms of Regulation of Plant Growth, red. Bielecki R. L., Ferguson A. R., Cresswell M. M., Bull. 12, str. 693—701. The Royal Society of New Zealand, Wellington.
32. Einset J. W., Skoog F., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 658—660.
33. Hall R. H., (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 415—444.
34. Miura G. A., Miller C. O., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 372—376.
35. Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H., (1971), *Plant Physiol.*, **48**, 775—778.
36. Miura G., Hall R. H., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 563—569.
37. Sondheimer E., Tzou D. S., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 516—520.
38. Parker C. W., Letham D. S., (1973), *Planta*, **113**, 119—218.
39. Parker C. W., Letham D. S., (1974), *Planta*, **115**, 337—344.
40. Fox E. J., Cornette J., Deleuze G., Dyson W., Giersak C., Niu P., Zapata J., Mc Chesney J., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 627—632.
41. Parker C. W., Wilson M. W., Letham D. S., Cowley D. E., McLeod J. K., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1370—1376.
42. Deleuze G. G., McChesney J. D., Fox J. E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1426—1432.
43. El-Saidi M. T., (1971), *Ann. Bot.*, **35**, 1073—1083.
44. El-Saidi M. T., (1972), *Ann. Bot.*, **36**, 99—107.
45. Tzou D. S., Galston E. C., Sondheimer E., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 894—897.
46. Usciati M., Coddacioni M., Guern J., (1972), *J. Exp. Bot.*, **23**, 1009—1020.
47. Fletcher R. A., Hofstra G., Adedipe O., (1970), *Physiol. Plant* **23**, 1144—1148.
48. Domański R., Kozłowski T. T., (1968), *Can. J. Bot.*, **46**, 397—403.
49. Engelbrecht L., (1971), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **162**, 547—558.
50. Rudnicki R., Saniewski M., Millikan D. F., (1973), *Prace Inst. Sad. Ser. E.*, 539—551.
51. Pieniżek J., Jankiewicz L. S., (1966), *Bull. Acad. Polon. Sci.* **14**, 805—808.
52. Friedrich A., Chvojka L., Bulgakov R., Kolin J., (1970), *Biol. Plant*, **12**, 342—347.
53. Negi S. S., Olmo H. P., (1966), *Science*, **152**, 1624—1625.
54. Negi S. S., Olmo H. P., (1972), *Am. J. Bot.*, **8**, 851—857.
55. Engelbrecht L., (1973), *Prace Inst. Sad. Ser. E.*, 389—397.

56. Borkowska B., Borkowski J., (1975), *Bull. Polon. Acad. Sci.* **23**, 291—294.
57. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, **15**, 473—497.
58. Rogozińska J. H., (1966), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **35**, 425—435.
59. Miller C. O., (1963), *Modern Methods of Plant Analysis*, **6**, 194—202.
60. Conrad K., Köhler K. H., (1967), *Wiss. Zeit. Univ. Rostock*, **16**, 657—659.
61. Biddington N. L., Thomas T. H., (1973), *Planta*, **111**, 183—186.
62. Osborne D. J., Mc Calla D. R., (1961), *Plant Physiol.*, **36**, 219—221.
63. Letham D. S., (1971), *Physiol. Plant*, **25**, 391—396.
64. Szweykowska A., Schneider J., Prusińska U., (1970), *Zesz. Nauk. Uniw. M. Kopernika w Toruniu*, **13**, 289—292.
65. Szweykowska A., Korcz I., Jaśkiewicz-Mroczkowska B., Metelska M., (1972), *Acta. Soc. Bot. Polon.*, **41**, 401—409.
66. Michalski L., (1967), *Zastosowanie chromatografii w fitochemii*, red. Opieńska-Blauth J., Trojanowski J. str. 275—353, PWRiL, Warszawa.
67. Helgeson J. P., (1968), *Science*, **161**, 974—981.
68. Letham D. S., Shannon J. S., Mc Donald I. R. C., (1967), *Tetrahedron*, **23**, 479—486.

JAN SĘDZIK *)

Niektóre aspekty rentgenostrukturalnych badań mieliny

Some Aspects of Rentgenostructural Investigation of the Myelin Membrane

Promieniowanie rentgenowskie zastosowane do badań strukturalnych jest podstawowym narzędziem otrzymywania informacji o uporządkowaniu molekuł w kryształach. Zakres badań nie ogranicza się jednak do wąskiego przedziału materii, określanego mianem ciał stałych. Ostatnio coraz śmieiej stosuje się metody dyfrakcyjne do badań substancji biologicznych.

Rentgenowskie metody badawcze zastosowano owocnie do badań tak różnych struktur jak: ciało szkliste gałki ocznej (1), włókien mięśniowych (2), kolagenu (3), fotoreceptorów (4), chloroplastów (5), błon komórkowych bakterii *Proteus vulgaris* (6), wirusów (7), mitochondriów (8) i mieliny (10, 11).

Niniejszą pracę poświęcono niektórym aspektom niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na mielinie. Przedstawiono podstawowe założenia eksperymentalne i teoretyczne, omówiono elementy teorii dyfrakcji na strukturze typu mieliny, oraz proponowane obecnie modele błony mielinowej.

Przedstawione tutaj badania (aczkolwiek dalekie od ścisłości i precyzji jaka konieczna jest w badaniach kryształów) doprowadzają do odpowiedzi na dwa, bardzo ściśle związane ze sobą pytania: (A) — jaki jest jednowymiarowy, radialny rozkład funkcji gęstości elektronowej w mielinie, (B) — jaki jest najbardziej prawdopodobny jednowymiarowy rozkład makrocząsteczek w pojedynczej lameli mielinowej.

I. Uwagi wstępne o technice dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego **

Jeżeli pojedyncze atomy lub cząsteczki są uporządkowane w taki sposób, że tworzą równoległe, w jednakowy sposób obsiane warstwy, to promieniowanie rentgenowskie ulega rozproszeniu na takim układzie w kierunkach, dla których spełniona jest następująca zależność (12):

$$2d \sin \Theta = n\lambda \quad (1.1)$$

*) Mgr, Klinika Neurologii Akademii Medycznej w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

***) Autor zakłada elementarną znajomość pojęć i zagadnień dyfrakcji promienio-

d — odległość między sąsiednimi warstwami, Θ — kąt Bragga, λ — długość fali promieniowania rentgenowskiego, n — rząd interferencji (liczby całkowite: 1, 2, 3, 4, ...).

Równanie (1.1) jest matematycznym wyrazem prawa Bragga. Zostało ono wyprowadzone dla ciał o strukturze trójperiodycznej, tym niemniej może być z powodzeniem stosowane do analizy obrazów dyfrakcyjnych obiektów dwu- lub nawet jednoperiodycznych, jakimi często są preparaty biologiczne. Przekształcając równanie (1.1) do postaci:

$$\Theta = \arcsin \frac{n\lambda}{2d} \quad (1.2)$$

wykazuje się, że ze wzrostem odległości międzywarstwowej d , maleje kąt Bragga Θ , oraz że musi być spełniony warunek: $2d > n\lambda$ aby wystąpiło zjawisko dyfrakcji.

W preparatach biologicznych odległości między periodycznie rozmieszczonymi warstwami są często rzędu setek angstromów. Związane to jest z dużymi wymiarami makrocząsteczek np. białek. Dla tych substancji pierwszy kąt Bragga jest z reguły mniejszy aniżeli 1° . Promieniowanie rentgenowskie Cu K_α użyte do badania kryształu o stałej sieci 100\AA , daje odbicie braggowskie pierwszego rzędu dla kąta $\Theta = 0,45^\circ$, gdy natomiast period identyczności wynosi 1000\AA , odpowiadający tej wartości kąt Bragga jest równy $0,045^\circ$. Liczby te najlepiej ukazują poważne zagadnienia techniczne związane z pomiarem tak małych kątów. Trudności te można by ominąć, stosując promieniowanie rentgenowskie o dłuższej fali (13), jednakże nie jest to na ogół możliwe z uwagi na dość znaczne pochłanianie promieniowania przez badany materiał, co utrudnia lub nawet uniemożliwia przeprowadzenie pełnej analizy strukturalnej. W związku z tym rozwinięto technikę niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (14, 15).

Teoria dyfrakcji niskokątowej jest dobrze opracowana w przypadku prostych nieskomplikowanych układów (16) i przeprowadzenia całkowitej analizy strukturalnej dla prostych układów, jak na przykład układy: lipidy—woda (17), białka—lipidy—woda (18) nie sprawia wielu trudności. Rozszyfrowanie jednak struktury materiału biologicznego o skomplikowanej budowie jest nadal bardzo trudne. Przykładem takiego materiału może być mielina, w skład której wchodzi różne rodzaje białek (19), lipidów (20) i woda. Dodatkowa trudność występująca w badaniach strukturalnych mieliny wynika z małej ilości rejestrowanych refleksów braggowskich (patrz rozdział VI) oraz konieczności ograniczenia rozważań strukturalnych do jednego wymiaru (patrz rozdział V-1).

wania rentgenowskiego na kryształach. Ponieważ dla niektórych czytelników poruszane zagadnienia mogą być niejasne, autor poleca jako uzupełnienie: Ch. Kittel „Wstęp do fizyki ciała stałego” PWN, Warszawa 1974, str. 3—90, oraz artykuł M. Tichego, *Post. Biochem.*, (1972), 1, 3—30.

Rozpatrując zatem strukturę mieliny jako całości, należałoby przeto poznać najpierw strukturę poszczególnych składników. Nie wdając się jednak w szczegóły stwierdzić należy, że o własnościach zarówno fizycznych jak i chemicznych poszczególnych składników mieliny wiadomo dość mało. Z tego powodu pełne i wyczerpujące rozpatrzenie struktury błony mielinowej jest — przy aktualnym stanie badań — rzeczą praktycznie niemożliwą. Ograniczenie to nie umniejsza jednak wagi i osiągnąć dotychczasowych badań.

II. Rys historyczny badań struktury mieliny metodą niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego

Badania mieliny metodą niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego zapoczątkowali F. O. S c h m i d t i wsp. w 1935 r. (10), przedstawiając obserwacje dotyczące dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na nerwach w pełnym zakresie kątów Θ . Badania takie w zakresie małych kątów kontynuowali początkowo E l k e s i F i n e a n (21), a później F i n e a n, którego badania w tej dziedzinie mają podstawowe znaczenie i stanowią punkt wyjścia do rentgenostrukturalnych badań osłony mielinowej przez późniejszych badaczy. F i n e a n dobrał przede wszystkim najbardziej optymalne warunki przygotowania preparatu do badań rentgenostrukturalnych (22), skonstruował specjalnego typu kamerę do niskokątowych badań mieliny nazwaną kamerą F i n e a n a (14), podał przypuszczalny model błony mielinowej (23), podjął próbę wyznaczania fazy amplitudy promieniowania rozproszonego i jednowymiarowego rozkładu funkcji gęstości elektronowej (24), badał wpływ czterotlenku osmu na strukturę mieliny (25), podał interpretację obrazów mieliny, uzyskiwanych przy pomocy mikroskopu elektronowego (26), badał również wpływ temperatury (27) oraz roztworów hiper- i hipotonicznych na uzyskane efekty dyfrakcyjne (28). Prace późniejszych badaczy są właściwie dalszym rozwinięciem tych podstawowych danych. B l a u r o c k i W o r t h i n g t o n (29) skupili swoje zainteresowania na podstawach teorii dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na mielinie, do interpretacji danych eksperymentalnych zastosowali analizę P a t t e r s o n a (30), podjęli próbę usystematyzowania dotychczasowych badań rentgenostrukturalnych (31). Rewelacyjne okazały się wyniki P a r s o n s a i wsp. (32, 33, 34), którzy w rozwinięciu obserwacji F i n e a n a (35, 36), przedstawili wpływ preparatyki stosowanej w badaniach mikroskopowo-elektronowych na uzyskiwane efekty dyfrakcji, a tym samym i na strukturę mieliny, sugerując, że każdy krok preparatyki zmienia i przebudowuje rozkład lipidów i białek w mielinie.

Model struktury mieliny zaproponowany przez C a s p a r a i K i r s c h n e r a (37) jest ukoronowaniem dotychczasowych badań rentgeno-

strukturalnych. Model ten uwzględnia wzajemne stosunki wagowe poszczególnych składników mieliny, i dlatego uważać go można za najbardziej poprawny (patrz rozdział VII, Ryc. 3).

Odmienne wyniki przedstawił K r e u t z (38), kwestionując dotychczasowe poglądy na strukturę mieliny i zaproponował model struktury mieliny fizjologicznie aktywnej różny od proponowanych dotychczas modeli (patrz rozdział VII, Ryc. 4).

III. Właściwości mieliny i jej rola w układzie nerwowym

Zanim przejdziemy do omawiania zagadnień bezpośrednio związanych z zastosowaniem niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego do badania struktury mieliny, omówimy obecnie jej podstawowe własności i rolę w układzie nerwowym.

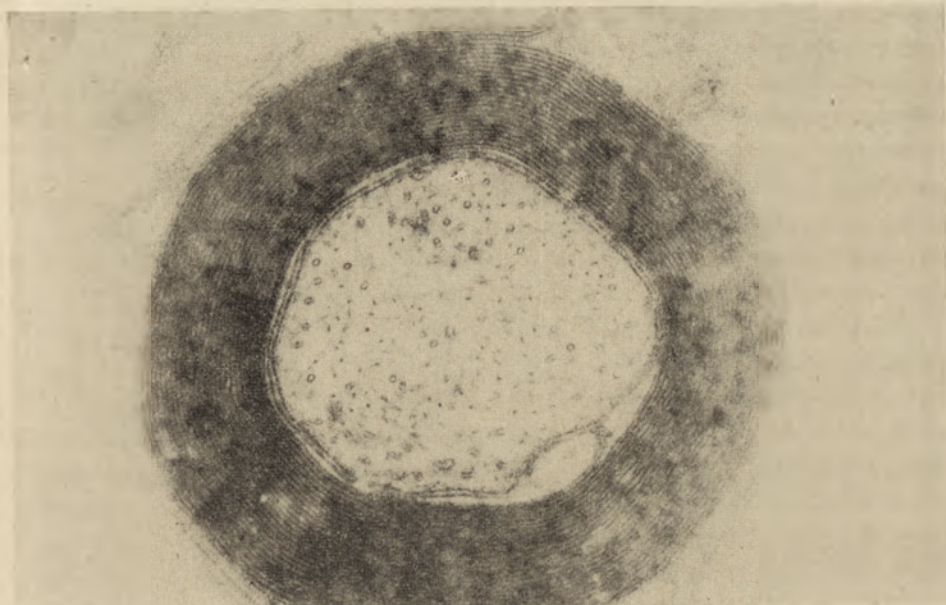
W badaniach rentgenostrukturalnych najbardziej istotne jest, aby badana substancja wykazywała periodyczne uporządkowanie molekuł przynajmniej w jednym kierunku, wówczas dopiero można rejestrować braggowskie efekty dyfrakcyjne. Przykładem takiej substancji jest właśnie mielina, jest to bowiem wielowarstwowy układ lipidowo—białkowy o bardzo wysokim stopniu przestrzennego uporządkowania. Uporządkowanie to występuje w mielinie obecnej w obwodowym jak i ośrodkowym układzie nerwowym. Jakość obrazów dyfrakcyjnych mieliny nie ustępuje rentgenogramom substancji niebiologicznych. Możliwość uzyskania obrazów dyfrakcyjnych w zakresie niskich kątów wynika z bardzo dużego — rzędu kilkudziesięciu angstromów — podstawowego periodu identyczności w strukturze mieliny.

Oślonka mielinowa dookoła aksonu pełni podobną rolę jak izolator w przewodniku elektryczności (39, 40). Jest ona nieciągła na całej długości włókna nerwowego, co pewien odstęp zwęża się i zanika. Długość międzywęźła — czyli odległość pomiędzy przerwami ciągłości osłonki mielinowej (odległość pomiędzy dwoma przewężeniami Ranviera) — zależy od średnicy włókna nerwowego, na przykład w nerwach żaby długość międzywęźła włókien grubych o średnicy około 15μ , wynosi 2,5mm, długość zaś międzywęźła włókien cienkich o średnicy 4μ wynosi 0,2mm (39). Dzięki tym własnościom osłony mielinowej przewodzenie impulsów bioelektrycznych ma charakter skokowy (41, 42).

Oślona mielinowa powstaje poprzez „nawijanie” się na akson warstw wytwarzanych przez komórki Schwanna w obwodowym układzie nerwowym (43) i komórki oligodendroglejowe w ośrodkowym układzie nerwowym. Pojedyncze włókno nerwowe z „nawiniętą” spiralnie mielina przedstawiono na rycinie 1. Zmielinowane włókna nerwowe oraz włókna niezmielinowane tworzą tak zwane pnie nerwowe. W pniu nerwu wzrokowego

człowieka na przykład występuje około 900.000 pojedynczych włókien, a w pniu nerwu słuchowego około 30.000.

Mielina pochodząca z ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego wykazuje wyraźne różnice; dotyczą one zarówno składu chemicznego (44, 45, 46, 47), jak i wartości podstawowego periodu identyczności (patrz Tab. 2).



Ryc. 1. Nerw kulszowy szczura — pojedynczy akson z „nawiniętą” spiralnie mieliną, powiększenie $30.000 \times$ (dzięki uprzejmości dr A. Goncerzewicza)

IV. Przygotowanie preparatu do badań rentgenostrukturalnych

Zasada dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego polega na przepuszczeniu równoległej wiązki promieniowania X przez badany materiał i zarejestrowaniu promieniowania ugiętego na płycie fotograficznej (technika zdjęciowa), lub za pomocą licznika Geigera-Millera (technika dyfraktometryczna). Obrazy dyfrakcyjne — (np. zaczerwienie na błonie filmowej), są odwzorowaniem rozkładu gęstości elektronowej (czyli wzajemnego uporządkowania molekuł) w komórce elementarnej materiału badanego. Odwzorowanie to związane jest transformacją fourierowską (48).

Z tego powodu każde przemieszczanie molekuł, które zakłóca periodyczność rozkładu gęstości elektronowej, odbija się ujemnie na rejestrowanych obrazach dyfrakcyjnych. Dlatego ważne jest aby podczas trwania eksperymentu struktura periodyczna materiału badanego była stała, niezmienna w czasie. Czas pomiaru przy użyciu techniki dyfraktometrycznej

wynosi około 20 minut, podczas gdy zastosowanie techniki zdjęciowej wymaga od jednej do kilkudziesięciu godzin.

Ze względów technicznych nie można badać mieliny *in vivo*. Przyjmuje się, że dokonanie pomiaru *in vitro*, gdy wokół nerwu zostaje wytworzone sztuczne biośrodowisko, nie powoduje uchwytnych zmian strukturalnych w mielinie. Przystępując do opracowania warunków doświadczeń dbano początkowo by podczas badania niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego nerw przewodził impulsy do efektora (22). Później okazało się, że tak daleko idąca ostrożność jest zbędna gdyż nawet naprężenie nerwu wydaje się nie mieć istotnego wpływu na uzyskane efekty dyfrakcyjne (11).

Do badań niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, zamiast naturalnego biośrodowiska używano najczęściej: płynu Ringera (22, 29), płynu Krebsa-Ringera (31), 0,18M NaCl (49), 0,18M NaCl w D₂O (50) lub zbuforowanego roztworu fizjologicznego soli (PBS). Pomiary przeprowadzano w temperaturze pokojowej lub w 4°C (11, 31). W przypadku techniki zdjęciowej próbkę nerwu umieszczano w cienkościennej kapilarze, przez którą przepływał płyn fizjologiczny (22).

Równie dobre wyniki uzyskuje się stosując technikę dyfraktometryczną do badania nerwu bezpośrednio po wyizolowaniu, nieznacznie tylko zwilżonego płynem Ringera (nie zachodzi wówczas potrzeba stosowania osłony z cienkościennej kapilary).

W rentgenostrukturalnych badaniach mieliny świeżo wyizolowanej, a więc fizjologicznie aktywnej, należy z reguły przestrzegać następujących zasad proceduralnych:

- Technika dyfraktometryczna wymaga badania nerwu niezwłocznie po wyizolowaniu. Przyjmuje się bowiem, że przez kilkanaście minut po wypreparowaniu struktura pierwotna mieliny zachowuje się bez zmian, później jednak zaczynają się coraz bardziej uwidaczniać efekty wysychania nerwu (51).
- Stosując technikę zdjęciową trzeba nerw natychmiast po wypreparowaniu zanurzyć w płynie fizjologicznym, a następnie umieścić w cienkościennej kapilarze. W ciągu 12 godzin nie stwierdza się zmian w strukturze mieliny ośrodkowego układu nerwowego i przez okres kilku dni w mielinie układu obwodowego (31).
- Dla zarejestrowania niskokątowych efektów dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na mielinie, próbkę nerwu należy zorientować w kamery niskokątowej prostopadle do kierunku wiązki padającej. Nie obserwowano dotychczas niskokątowych efektów braggowskich jeżeli nerw zorientowano równolegle do wiązki padającej.

Obecność wody w mielinie nie stanowi przeszkody w niskokątowych pomiarach rentgenostrukturalnych, o wiele poważniejszą trudność stanowi ograniczony czas życia żywych komórek w warunkach pomiaru.

Przy interpretacji danych pomija się wpływ destrukcyjnego oddziaływania promieniowania rentgenowskiego, które przecież zaburza normalne funkcje życiowe badanego materiału. Przyjmuje się, że oddziaływanie promieniowania rentgenowskiego z mielina w zakresie niskich kątów ogranicza się jedynie do braggowskich efektów dyfrakcyjnych.

Wydawać by się mogło, że w badaniach rentgenostrukturalnych najlepiej byłoby posłużyć się metodyką podobną do tej jaką stosuje się przy przygotowaniu materiału do obserwacji w mikroskopie elektronowym, jednakże okazało się że procedura utrwalania, zatapiania itd. próbek nerwu zmienia strukturę błony mielinowej, nie spełnia zatem elementarnych wymogów potrzebnych w rentgenostrukturalnych badaniach mieliny (34, 35, 36).

V. Elementy teorii dyfrakcji na strukturze typu mieliny

V-1. Podstawowe założenia upraszczające

Jednym z najbardziej istotnych założeń znacznie upraszczających teoretyczne rozważania dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na mielinie jest ograniczenie elementarnej komórki^{*)} (krytalograficznej) mieliny do jednego wymiaru (tzn. do jednego periodu translacji). Na poprawność tego założenia wskazują obrazy mieliny uzyskane w badaniach przy pomocy mikroskopu elektronowego (patrz Ryc. 1) jak również zarejestrowane po raz pierwszy przez Schmitta i wsp. (10) efekty niskokątowej dyfrakcji na próbkach nerwowych. Dało się zauważyć że zaczerwienienia na błonie filmowej występują jedynie w przekroju równikowym. Dalsze badania potwierdziły te obserwacje i zgodnie z tym przyjęto, że komórka elementarna mieliny jest jednowymiarowa. Zagadnienie to mimo pozornej nieistotności jest bardzo złożone, gdyż mielina pomimo wprowadzenia założenia jednoperiodyczności struktury jest przestrzennie tworem trójwymiarowym, nie należy jednak do żadnej z translacyjnych sieci Bravaisa.

Analiza powstawania struktury mieliny dookoła włókna nerwowego na obrazach uzyskiwanych przy pomocy mikroskopu elektronowego sugeruje, że mielina jest (być może) strukturą dwuperiodyczną (planarną) nawiniętą spiralnie na akson (43). Aby opisać ze strukturalnego punktu widzenia taką sieć (dwuwymiarową i spiralną), należy podać takie parametry jak: skok spirali, rozmiary dwuwymiarowej komórki elementarnej, orientację

^{*)} — komórka elementarna jest to najmniejsza jednostka strukturalna kryształu powtarzająca się zgodnie z prawem translacji w trzech niekomplanarnych kierunkach, w przypadku mieliny tylko w jednym kierunku. Komórki elementarnej nie należy utożsamiać z komórką w znaczeniu biologicznym.

komórki elementarnej względem osi aksonu oraz rozkład molekuł w tej komórce.

Dotychczasowe badania mieliny metodą niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego dotyczyły pomiaru skoku spirali mielinowej. Parametr ten (w naszym ujęciu) jest jednowymiarowym wektorem translacji. Cylindryczne i spiralne struktury krystaliczne opisał *Whittaker* (52, 53, 54). Zastosowanie wyników jego badań do rozważań teoretycznych dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na mielinie powiodło się jedynie częściowo (29).

Rejestrowane dotychczas efekty niskokątowej dyfrakcji promieniowania na mielinie wynikają z lamelnego układu lipidów. Przy umiarkowanym czasie pomiaru np. 6 godzin, można z dużym prawdopodobieństwem twierdzić, że uporządkowanie białek nie ma istotnego wpływu na uzyskiwane efekty dyfrakcyjne. Okazało się bowiem, że mielina pozbawiona lipidów nie daje w niskich kątach braggowskich efektów dyfrakcyjnych (11).

Natomiast wypłukanie lipidów z mieliny w 98% podczas preparatyki dla mikroskopu elektronowego (55) wykazało, że uzyskano w końcu analogiczny obraz spiralnie nakładających się na akson warstw, na przemian jasna i ciemniejsza — czyli tak samo jak gdyby w skład mieliny wchodziły nadal lipidy (7).

Mielina wykazuje własności strukturalne ciekłego kryształu. Świeża i fizjologicznie aktywna mielina nie jest bowiem typowym ciałem stałym, ale układem fizycznym nie posiadającym sprężystości postaci. W przypadku idealnym — akson ma postać walca — mielina jest podwójną (płaszczyznową) spiralą Archimedesesa o stałym skoku d . Z krystalograficznego punktu widzenia zakładamy, że mielina świeża i fizjologicznie aktywna jest strukturą jednoperyodyczną, posiadającą symetrię translacji w kierunkach prostopadłych do osi aksonu. Przyjęte powyżej założenia są prostym sformułowaniem znanego w biologii modelu błon biologicznych *Robertsona-Daniellego*. Wydaje się, że w badaniach niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na mielinie model ten może być dobrym przybliżeniem rzeczywistości.

V-2. Funkcja gęstości elektronowej — podstawowe równania

Strukturę kryształu opisuje się za pomocą funkcji gęstości elektronowej $\rho(\mathbf{r})$. Maksima tej funkcji wskazują położenia atomów. Ponieważ funkcja ta jest periodyczna na ogół w trzech niekomplanarnych kierunkach, z tego powodu może być rozwinięta na szereg Fouriera (48):

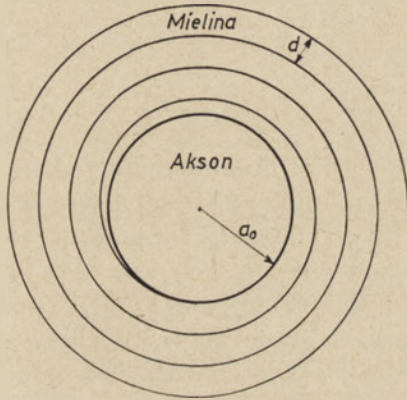
$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} \exp - 2\pi i \mathbf{s}(h,k,l) \cdot \mathbf{r} \quad (5.1)$$

gdzie

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp i \Phi_{hkl} \quad (5.2)$$

F_{hkl} — czynniki struktury, h, k, l — wskaźniki Millera, $s(h, h, l)$ — wektor rozproszenia, Φ_{hkl} — kąt fazy, \mathbf{r} — wektor położenia dowolnego punktu w przestrzeni komórki elementarnej, v — objętość komórki elementarnej.

Struktura kryształu byłaby wyznaczana bez trudności (zgodnie z równaniem (5.1)), gdyby w eksperymentach mogły być wyznaczone czynniki struktury F_{hkl} . W doświadczeniach jednak wyznacza się tylko $|F_{hkl}|$ i nie ma takiej metody, która pozwala mierzyć kąt fazy Φ_{hkl} . Ta nieokreśloność znana jest w krystalografii jako „problem fazy”. Trudności w niektórych przypadkach są tak olbrzymie, że w praktyce struktura kryształu może być wyznaczona dopiero przy użyciu pewnych metod dodatkowych, jak np.: metoda prób i błędów, metoda transformacji izomorficznej itp. (48). Rów-



Ryc. 2. Schemat struktury mieliny,

a_0 — promień aksonu, d — skok spirali mielinowej.

nianie (5.1) zastosowane bezpośrednio do struktury mieliny znacznie się uprości, ponieważ mielina powstaje (patrz Ryc. 2) poprzez n -krotne, spiralne „nawinięcie” (o skoku d) podwójnej błony komórki Schwana na akson. Z tego powodu prawo translacji występuje jedynie w kierunkach radialnych do osi aksonu (29). Równanie 5.1 w takim przypadku jednowymiarowości przyjmuje postać:

$$\varrho(x) = \frac{1}{d} \sum_{-h}^{+h} |F(h)| \exp(i \Phi_h) \exp - 2\pi i x \frac{h}{d} \quad (5.3)$$

Ponieważ wykazano (28, 58) że w przypadku struktury typu mieliny zachodzi związek pomiędzy natężeniem promieniowania ugiętego a czynnikiem struktury

$$I(h) = \frac{1}{h} F^2(h) \quad (5.4)$$

stąd funkcja gęstości elektronowej przyjmuje postać:

$$\rho(x) = \frac{1}{d} \sum_{-h}^{+h} |\sqrt{hI(h)}| \exp(i\Phi_h) \exp - 2\pi i x \frac{h}{d} \quad (5.5)$$

Równanie (5.5) jest podstawową formułą wyliczania gęstości elektronowej w kierunkach radialnych do osi aksonu, gdy obserwuje się h dyskretnych refleksów braggowskich o natężeniu $I(h)$. Po uwzględnieniu centrosymetryczności komórki elementarnej mieliny (28), uzyskuje się ostatecznie:

$$\rho(x) = \frac{2}{d} \sum_{h=1}^5 \pm |\sqrt{hI(h)}| \cos 2\pi x \frac{h}{d} \quad (5.6)$$

Równanie (5.6) jest powszechnie stosowane w praktyce, rentgenostrukturalnych niskokątowych badań mieliny.

V-3. Problem fazy

Jak wynika ze wzoru (5.5) do obliczenia radialnego rozkładu funkcji gęstości elektronowej w mielinie, niezbędna jest znajomość fazy każdego odbicia. Na podstawie analizy procesu formowania się tej osłony (54) można założyć jej centrosymetryczność (59). Dla tego typu struktur kąt fazowy jest więc równy 0° lub π (48, 60), a to oznacza, że amplituda promieniowania rentgenowskiego przyjmuje wartość rzeczywistą o znaku $-$ lub $+$. Cały problem sprowadza się więc do doświadczalnego (względnie teoretycznego) ustalenia sekwencji znaków amplitudy promieniowania ugiętego wszystkich refleksów, których jest 5 przy umiarkowanym czasie ekspozycji lub 12 przy zwiększonym czasie naświetlania.

Dokładne omawianie poszczególnych metod doświadczalnych, stosowanych do wyznaczenia sekwencji znaków amplitudy, wykraczałoby znacznie poza ramy niniejszego opracowania, dlatego ograniczono się do podania sumarycznie wyników dotychczasowych badań (Tabela 1).

Jak wynika z przytoczonej tabeli, kwestia znaków amplitudy promieniowania ugiętego stanowi dotąd problem nie rozwiązany ostatecznie, a wyniki uzyskiwane różnymi metodami badawczymi są rozbieżne. Poszczególni autorzy mają odmienne poglądy na poprawność uzyskiwanych wyników (11, 61, 62, 63, 64). Zagadnienie wyznaczania fazy amplitudy promieniowania rentgenowskiego jest nadal problemem otwartym. Ostatnie doniesienia pozwalają przypuszczać (65), że problem ten zostanie w najbliższym czasie rozwiązany, wyliczoną bowiem funkcję fazy charakteryzującą błony biologiczne można zastosować bezpośrednio do mieliny. Uzyskane w ten sposób wyniki będą najlepszym testem poprawności dotychczasowych badań.

Tabela 1

Zestawienie wyników badań sekwencji znaków amplitudy promieniowania ugiętego

Metoda wyznaczania fazy promieniowania ugiętego	Sekwencja znaków amplitudy (h = 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12)
Brak danych (81)	+ + + - -
Roztwory hipertoniczne (86)	- + + - - lub (- + + + +)
Roztwory hipertoniczne (24)	- + + + +
Analiza danych mikr. elektron. (60)	- + + - - + - - + + + -
Oznaczenie metalem (osm) (82)	+ + + + + + + +
Oznaczenie metalem (osm) (61)	+ - - + +
Funkcja Q (38)	+ - - - -
Roztwory hipertoniczne (70)	- + + - - + - - 0 - - -

h — rząd refleksu.

Dane dotyczą nerwu kulszowego.

VI. Podstawowy period identyczności

Próbki świeżych, całkowicie zmielinizowanych nerwów, badane metodą niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, wykazują znaczne różnice, w zależności od gatunku zwierzęcia i badanych nerwów. Obserwuje się wyraźną różnicę w wartościach d mieliny z ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego nawet w przypadku zwierząt tego samego gatunku oraz mniej znaczne różnice pomiędzy analogicznymi nerwami różnych zwierząt (66). W tabeli 2 zestawiono dotychczasowe dane dotyczące wartości podstawowego periodu identyczności.

- Z przytoczonych danych w tabeli 2 widać, że liczbowa wartość podstawowego periodu identyczności mieści się w przedziale 153—185Å, a także:
- Obwodowy układ nerwowy (na przykład nerw kulszowy) charakteryzuje się, przy umiarkowanym czasie ekspozycji, pięcioma refleksami, które spełniają relację rzędowości. Podstawowy period identyczności mieści się w granicach 170—185Å, a wartości natężeń poszczególnych refleksów spełniają zawsze następujące nierówności: $J(2) > J(4) > J(5) > J(3) > J(1)$.
 - Układ ośrodkowy (na przykład nerw wzrokowy, rdzeń kręgowy, substancja biała mózgu) charakteryzuje się periodem identyczności, zawar-

Tabela 2

Porównanie wartości podstawowego periodu identyczności mieliny z różnych źródeł

Lp.	Źródło tkanki	Podstawowy period identyczności d (Å)	Piśmiennictwo
1	Człowiek nerw kulszowy	178 (185)	49 (56)
2	Małpa nerw kulszowy	187	56
3	Żaba nerw kulszowy nerw wzrokowy rdzeń kręgowy	171 (170*) 154 153	31 (11, 31, 67, 24*, 81*) 31 31
4	Baran nerw kulszowy	185	56
5	Szczur nerw kulszowy nerw wzrokowy	176 (178**, 180*) 159 (160*)	31 (24*, 59*, 82*, 81**) 31 (24, 69, 81*, 83*)
6	Świnia morską nerw kulszowy	185	56
7	Królik nerw kulszowy nerw wzrokowy	180 (178** ^y , 185**) 156	37 (84*, 49** ^y , 56**) 37 y -- dyfrakcja neutronów
8	Gołąb nerw kulszowy nerw wzrokowy	182 160	56 85
9	Kura nerw kulszowy nerw wzrokowy	182 (183) 155	31 (56) 31
10	Kaczka nerw kulszowy	181	56
11	Wół istota biała mózgu	157	31
12	Ryba nerw wzrokowy rdzeń kręgowy	159 (160) 156 (150)	31 (85) 31 (85)

Bez nawiasów wyniki chronologicznie najnowsze.

(Indeksy *, ** odpowiadają wzajemnie: pozycji literatury i cytowanej wartości stałego periodu identyczności d).

tym w przedziale 153—160Å. Wartości natężeń poszczególnych refleksów spełniają w przypadkach nerwu wzrokowego czy rdzenia kręgowego, relację jaka cechuje układ obwodowy. Ponieważ refleksy J(3), J(5) i J(1) są bardzo słabe, stąd dla scharakteryzowania obrazu dyfrakcyjnego podaje się refleksy J(2) i J(4).

Ogólnie można stwierdzić, że różnica pomiędzy wartościami podstawowego periodu identyczności mieliny układu obwodowego i ośrodkowego wynosi około 20Å.

Przytoczony materiał obserwacyjny jest jednak jeszcze zbyt skąpy, aby wyciągnąć ogólne wnioski dotyczące zależności pomiędzy wartością podstawowego periodu identyczności a gatunkiem zwierzęcia.

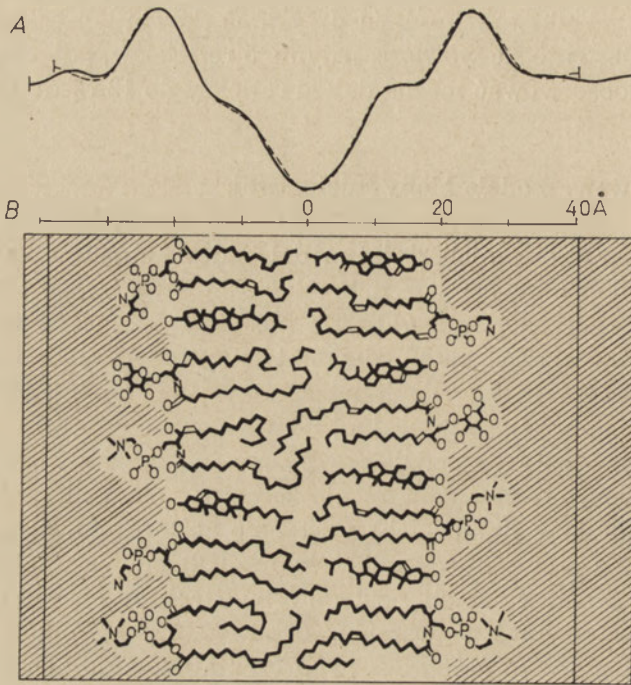
Powyższe wyniki uzyskuje się przy umiarkowanym czasie ekspozycji (6 godzin), rejestruje się wówczas jedynie 5 refleksów, gdy czas ekspozycji zwiększyć, zaobserwować można dalsze refleksy do 12 rzędu włącznie (67).

VII. Proponowane modele błony mielinowej

Na przestrzeni ostatnich 20 lat model budowy mieliny opracowany na podstawie badań przy pomocy mikroskopu elektronowego oraz dość skąpych danych rentgenostrukturalnych, nie uległ istotnej zmianie. Mielinę opisuje się dotychczas jako dwuwarstwowy układ lipidowo—białkowy. Podstawą takiego ujęcia była hipoteza Davisona—Daniellego (57, 68) dotycząca tzw. jednostki strukturalnej błon. F i n e a n opierając się na założeniach tej hipotezy, podał przypuszczalny rozkład makrocząsteczek w elementarnej jednowymiarowej komórce elementarnej (dotyczyło to tylko składników lipidowych), następnie zinterpretował obrazy mieliny, uzyskiwane przy pomocy mikroskopu elektronowego (26). Bliższe informacje na temat ewolucji poglądów na strukturę osłonki mielinowej można znaleźć również w pracach (70, 71, 72, 73, 74, 75). W niniejszym artykule przyjęto jako najbardziej reprezentatywne do ukazania prawdopodobnej struktury mieliny, model C a s p a r a - K i r s c h n e r a z 1971 r. (37) i K r e u t z a z 1972 r. (38). Dla ścisłości należałoby jednak jeszcze wspomnieć również o modelu mieliny W o r t h i n g t o n a (76) i F i n e a n a (77). Cechą wspólną tych modeli jest przyjęcie hipotezy, że podstawowym elementem strukturalnym mieliny jest podwójna warstwa lipidowa. Modele te różnią się od siebie odmiennym rozkładem makrocząstek lipidowych w tych jednostkach strukturalnych. Wynika to z bardzo trudnej do uzyskania jednoznaczności interpretacji funkcji gęstości elektronowej jednowymiarowej komórki elementarnej mieliny (patrz rozdział V-3). Ponieważ w modelu C a s p a r a i K i r s c h n e r a (37) przyjęto za podstawę interpretacji funkcji gęstości elektronowej wzajemny stosunek wagowy poszczególnych składników lipidowych (78, 79), model ten wydaje się obecnie najbardziej poprawny, przedstawiono go na rycinie 3.

Przedstawiony model mieliny odpowiada klasycznemu modelowi Robertsona—Danielego. Podwójna warstwa lipidowa otoczona jest z obu stron warstwami białkowymi, model ten przeto można opisać ogólnie symbolami BLB (białka—lipidy—białka). Poszczególne warstwy wykazując różną

zawartość cholesterolu nie są względem siebie symetryczne. Konformacje białek w modelu tym pomija się. Zgodnie z tym modelem, rozkład cząsteczek lipidowych w mielinie ośrodkowej i obwodowej jest taki sam, a to dlatego, że krzywa gęstości elektronowej pojedynczej lameli mielinowej nerwu wzrokowego i nerwu kulszowego pokrywają się.



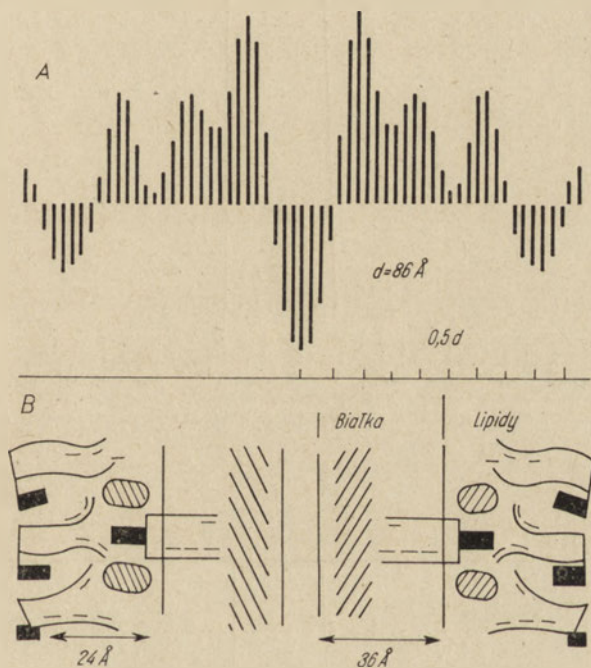
Ryc. 3. Model mielinny wg Caspara i Kirschnera (37).

(A) — wyliczony jednowymiarowy rozkład funkcji gęstości elektronowej, linia ciągła — funkcja gęstości elektronowej mielinny nerwu kulszowego królika, linia przerywana — funkcja gęstości elektronowej mielinny nerwu wzrokowego. (Ponieważ funkcje te częściowo się pokrywają, jest możliwe do przyjęcia, że rozkłady makrocząsteczek lipidowych są identyczne). (B) — przypuszczalny rozkład makrocząsteczek lipidowych w podwójnej warstwie lipidowej. W części lewej od góry: fosfatydyloseryna, cholesterol, cerebrozyd, fosfatydylocholina, cholesterol, fosfatydyleetanoloamina, sfingomielina; w części prawej od góry: cholesterol, fosfatydyloetanoloamina, cholesterol, cerebrozyd, cholesterol, sfingomielina, cholesterol, fosfatydylocholina

Model powyższy zaproponowany na podstawie badań rentgenostrukturalnych można uważać za jedną z możliwych poprawnych hipotez roboczych. Model ten został zbudowany przy użyciu transformacji fourierowskiej, jako metody opracowania danych rentgenostrukturalnych. Centralnym zagadnieniem tej metody jest problem fazy, czyli poprawne ustalenie sekwencji znaków amplitudy poszczególnych refleksów. Wówczas to dopiero można wyliczyć jednowymiarowy rozkład gęstości elektronowej, będący przecież podstawą rozszyfrowania rozkładu makrocząsteczek w lameli mielinowej. Jak wspomniano, różne metody badawcze dawały odmienne wyniki. Badacze nie są również zgodni co do poprawności interpretacji

uzyskiwanych wyników; spowodowane to jest wyłącznym przyjęciem transformacji fourierowskiej, w której przecież tkwi już nieokreśloność fazy.

Odmianą drogę ominięcia tego tak bardzo niewygodnego w badaniach mielinie problemu obrał K r e u t z (38). Zastosował on do opracowania danych eksperymentalnych metodę funkcji Q (87). Okazało się wówczas, że uzyskano inny kształt funkcji gęstości elektronowej (patrz Ryc. 4a), która pociągnęła za sobą inną interpretację rozkładu makrocząsteczek. Model ten jest całkowicie odmienny od modelu Caspara i Kirschnera i opisać go można symbolami LBL (lipidy—białka—lipidy). W modelu tym przyjmuje się również założenie dwuwarstwy lipidowej, jako podstawowego elementu struktury, jednakże odmiennej budowy. Według Kreutza region łańcuchów węglowodorowych dwuwarstwy lipidowej przedziela obszar białkowy, a warstwy lipidowe są względem siebie symetryczne.



Ryc. 4. Model mielinie wg Kreutza (38).

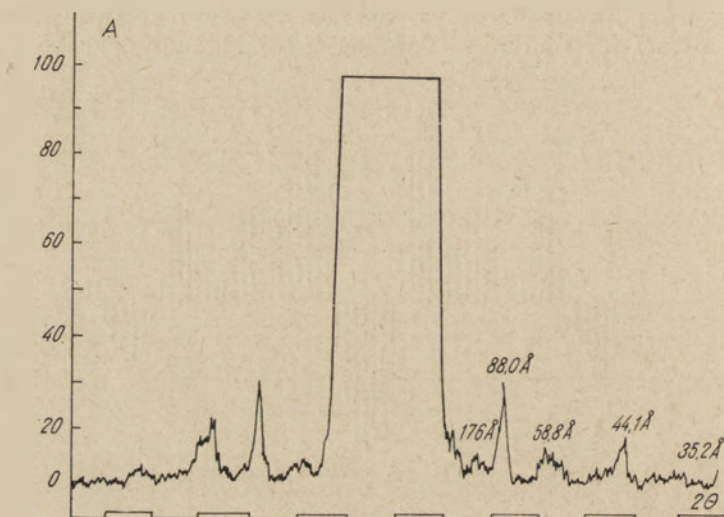
(A) — wyliczony jednowymiarowy rozkład funkcji gęstości elektronowej, (B) — przypuszczalny model rozkładu molekuł. Centralny obszar łańcuchów węglowodorowych lipidów przedzielony jest warstwami; białek (pola zakreskowane) i fosfatydylocholiny ■— z cholesterolami ⊗ (Czarne prostokąty oznaczają polarne części lipidów a odchodzące od nich linie — łańcuchy węglowodorowe). W modelu tym fosfatydylocholina z cholesterolami pełni rolę łącznika pomiędzy białkami a pozostałymi lipidami

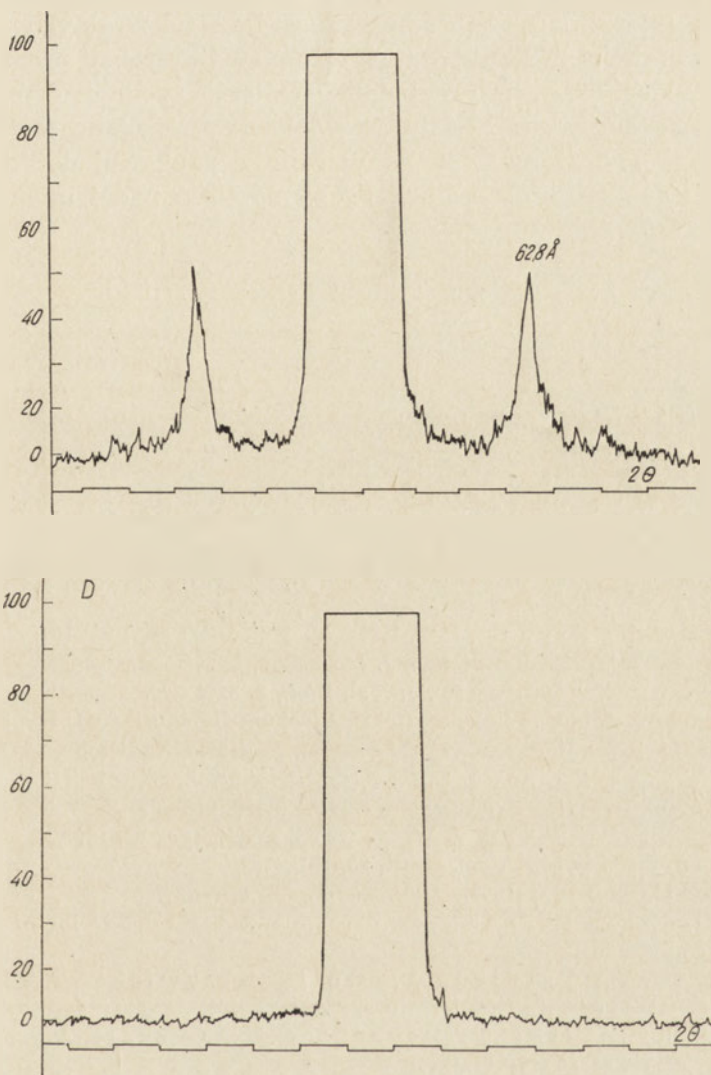
Badania mielinie metodą niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego prowadzone są nadal. Obecnie jest niezmiernie trudno odpowiedzieć, który z przedstawionych modeli jest najbardziej poprawny i dlaczego.

VIII. Uwagi końcowe

Omówione w niniejszej pracy niektóre aspekty badań rentgenostrukturalnych nie ujmują w całości obszernych zagadnień niskokątowej dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na mielinie. Wiele problemów jest świadomie pominiętych (np. wpływ roztworów hiper- i hipotonicznych, wpływ temperatury, skład chemiczny mielinę itd.). Mielina w przedstawionym tutaj ujęciu ma własności statyczne, stabilne, struktura mielinę nie zmienia się w czasie. Białka, lipidy i woda zajmują ściśle określone położenie i ich proporcje są stałe.

$$2\theta = 1^\circ$$





Ryc. 5. Dyfraktogramy mieliny nerwu kulszowego szczura uzyskane na dyfraktometrze Miller-Micro 111 (promieniowanie monochromatyczne $\text{Fe K}_\alpha = 1,94 \text{ \AA}$).

a — mielina świeża i fizjologicznie aktywna, b — nerw zaschnięty w atmosferze powietrza, c — nerw utrwalony w glutaraldehydzie, d — lipidy wypłukane z mieliny

Na osi pionowej natężenie promieniowania ugiętego (jednostki dowolne), na osi poziomej kąty 2θ (2θ jest kątem pomiędzy wiązką ugiętą a kierunkiem promieniowania padającego)

Na podstawie badań biochemicznych stwierdza się, że w osłonce mielinowej zachodzą uchwytne różnice w składzie chemicznym mieliny podczas wzrostu i dojrzewania (45, 80). Pojawiają się nowe składniki, inne zanikają. Zjawiska te muszą znaleźć swe odbicie w uzyskiwanych obrazach rentgenostrukturalnych.

Bardzo interesujące są badania procesów strukturalnych związanych z rozpadem mieliny, właśnie przy użyciu metod dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (np. zwyrodnienie Wallera, procesy demielinizacyjne itp.). Zagadnienia te zostały szczegółowo przebadane metodami biochemicznymi (88, 89, 90), lecz w literaturze naukowej dotychczas brak jest pełnej analizy strukturalnej. Problemy te są nadal intensywnie badane (91, 92, 93, 94).

Artykuł nadszedł 3.9.1974; po rewizji autorskiej otrzymano 30.11.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Webb N. G., (1972), *Nature*, **235**, 41—44.
2. Astbury W. T., (1940), *Proc. Roy. Soc. ser. B*, **129**, 307—332.
3. Huxley H. E., (1953a), *Proc. Roy. Soc. ser. B*, **141**, 59—62.
4. Blaurock A. E., Wilkins M. H. F., (1972), *Nature*, **236**, 313—314.
5. Kreutz W., (1964), *Z. Naturforsch*, **19b**, 441—446.
6. Burge R. E., Draper J. C., (1967), *J. Mol. Biol.*, **28**, 189—197.
7. Klug A., Finch J. T., (1960), *J. Mol. Biol.*, **2**, 201—215.
8. Worthington C. R., (1960), *J. Mol. Biol.*, **2**, 327—329.
9. Day W. A., Gilbert D. S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 503—506.
10. Schmitt F. O., Bear R. S., Clark G. L., (1935), *Radiology*, **35**, 121—151.
11. Akers C. K., Parsons D. F., (1970), *Biophys. J.*, **10**, 101—115.
12. Bragg W. L., (1913), *Proc. Roy. Soc.*, ser. A, **88**, 248—277.
13. Henke B., Du Mond J. W. M., (1953), *Phys. Rev.*, **89**, 1300.
14. Finean J. B., (1956), *J. Sci. Instr.*, **33**, 161—162.
15. Yudowitch K. L., (1953), *Anal. Chem.*, **25**, 721—724.
16. Guinier A., Fournet C. B., (1955), *Small Angle Scattering of X-ray*, wyd. Wiley J., London.
17. Luzzati V., Tardieu A., Gulik-Krzywicki T., Rivas E., Reiss-Husson F., (1968), *Nature*, **220**, 495—488.
18. Gulik-Krzywicki T., Schechter E., Luzzati V., Faure M., (1969), *Nature*, **223**, 1116—1121.
19. Greenfield S., Brostoff S. W., Eylar E. H., Morell P., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1207—1216.
20. Norton W. T., (1971), *Chemistry and Brain Development*, red. Paoletti R., Dawidson A. N., 327—337, Plenum Press, London.
21. Elkes J., Finean J. B., (1953), *Exp. Cell Res.*, **4**, 82—95.
22. Elkes J., Finean J. B., (1949), *Discuss. Faraday Soc.*, **6**, 134—143.
23. Finean J. B., (1953), *Exp. Cell Res.*, **5**, 202—216.
24. Finean J. B., Burge R. R., (1963), *J. Mol. Biol.* **7**, 672—682.
25. Finean J. B., (1954), *Exp. Cell Res.*, **6**, 283—292.
26. Finean J. B., Robertsen J. D., (1958), *Brit. Med. Bull.*, **14**, 267—273.
27. Elkes J., Finean J. B., (1953), *Exp. Cell Res.*, **4**, 69—81.
28. Finean J. B., Millington P. F., (1957), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 89—94.
29. Blaurock A. E., Worthington C. R., (1966), *Biophys. J.*, **6**, 305—312.
30. Blaurock A. E., (1971), *J. Mol. Biol.*, **56**, 35—52.

31. Blaurock A. E., Worthington C. R., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **173**, 419—426.
32. Moretz R. C., Akers C. K., Parsons D. F., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 1—11.
33. Moretz R. C., Akers C. K., Parsons D. F., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 12—24.
34. Parsons D. F., (1971), w Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes red. Chance B., Chuan-Pu Lee, J. K. Blasie, t. 1, cz. 1, str. 189—195, Academic Press, New York.
35. Finean J. B., (1960), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**, 13—29.
36. Finean J. B., (1960), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**, 31—37.
37. Caspar D. L. D., Kirschner D. A. M., (1971), *Nature, New Biology*, **231**, 46—52.
38. Kreutz W., (1972), *Agnew. Chem.* **11**, 551—567.
39. Hyden H., (1960), w The Cell, red. Brachet J. M. i Mirski. A. E., str. 215—323, Academic Press, New York.
40. Rouser G., Nelson B. J., Fleicher S., Simon G., (1968), w Biological Membranes, red. Champan P., str. 5—69, Academic Press, London.
41. Tasaki I., (1968), Nerve Excitation, Charles C. Thomas, Illinois USA.
42. Ackerman E., (1968), Zarys biofizyki, str. 63—79, PWN, Warszawa.
43. Geren B. B., (1954), *Exp. Cell Res.*, **7**, 558—562.
44. Brostoff S. W., Sacks H., Dal Canto M., Johnson A. B., Raine C. S., Wiśniewski H., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 1037—1043.
45. Zgorzalewicz B., Neuhoff V., Waehneltd T. V., (1974), *Neurobiology*, **4**, 265—276.
46. O'Brien J. S., (1967), *J. Theoret. Biol.*, **15**, 307—324.
47. Cuzner M. L., Davison A. N., Gregson N. A., (1965), *J. Neurochem.*, **12**, 469—480.
48. Woolfson M. M., (1970), An Introduction to X-ray Crystallography, str. 84—123, Cambridge University Press, Cambridge.
49. Parsons D. F., Akers C. K., (1969), *Science*, **165**, 1016—1018.
50. Akers C. K., Persons D. F., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **211**, 95—97.
51. Sędzik J., (1973), Streszczenia I Zjazdu Pol. Tow. Biof. Uniejów, str. 67—68.
52. Whittaker E. J. W., (1955), *Acta Cryst.*, **8**, 571—574.
53. Whittaker E. J. W., (1954), *Acta Cryst.*, **7**, 827—833.
54. Whittaker E. J. W., (1955), *Acta Cryst.*, **8**, 261—265.
55. Napolitano L., Le Banon S., Scaletti F., (1967), *J. Cell. Biol.* **34**, 817—826.
56. Hoglund G., Ringertz H., (1960), *Acta Physiol. Scand.* **51**, 290—295.
57. Robertson J. D., (1957), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 1043—1047.
58. Bear R. S., Bolduan O. E. A., (1949), *Acta Cryst.*, **3**, 136—141.
59. Fernandes-Moran H., Finean J. B., (1957), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 725—748.
60. Burge R. E., Draper J. C., (1965), *Lab. Invest.*, **14**, 978—987.
61. Harker D., (1972), *Biophys. J.*, **12**, 1285—1295.
62. Hybl A., (1970), *Biophys. J.*, **11**, 1121—1122.
63. Worthington C. R., (1970), *Biophys. J.*, **7**, 675—677.
64. Blaurock A. E., (1973), *Biophys. J.*, **13**, 1261—1262.
65. King G. I., (1975), *Acta Cryst.*, **31**, 130—135.
66. Schmitt F. O., Bear R. S., Palmer K. J., (1941), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **18**, 31—40.
67. Worthington C. R., (1972), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **195**, 298—308.

68. Danielli J. F., Davson H., (1935), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **5**, 483—494.
69. Finean J. B., (1966), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **16**, 145—170.
70. Worthington C. R., McIntosh T. J., (1973), *Nature, New Biology*, **245**, 97—99.
71. Hendler R. W., (1971), *Physiol. Rev.*, **51**, 66—97.
72. Worthington C. R., Blaurock A. E., (1968), *Nature*, **218**, 87—88.
73. McIntosh T. J., Worthington C. R., (1974), *Biophys. J.*, **14**, 363—386.
74. Bretscher M. S., (1973), *Science*, **181**, 622—629.
75. Worthington C. R., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**, 604—620.
76. Worthington C. R., (1971), w *Biophysics and Physiology of Excitable Membranes*, red. Adelman W. J., str. 1—46, wyd. Van Nostrand Reinhold Comp., New York.
77. Finean J. B., (1969), *Q. Rev. Biophys.*, **2**, 1—23.
78. Autilio L. A., Norton W. T., Terry R. D., (1964), *J. Neurochem.*, **11**, 17—24.
79. O'Brien J. S., Sampson E. L., Stern M. B., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 357—367.
80. Oulton M., Mezei C., (1973), *Lipids*, **8**, 235—238.
81. Finean J. B., (1962), *Circulation*, **26**, 1151—1162.
82. Akers C. K., Parsons D. F., (1970), *Biophys. J.*, **10**, 116—136.
83. Finean J. B., (1953), 1th Int. Collog. Biochem. Problem Lipides, Bruxelles, str. 82.
84. Fernandes-Moran H., (1962), *Circulation*, **26**, 1039—1065.
85. Finean J. B., Cumings J. N., (1960), *Modern Scientific Aspect of Neurology*, E. Arnold, London.
86. Moody M. F., (1963), *Science*, **142**, 1173—1174.
87. Hosemann R. H., Bagchi S. N., (1962), *Direct Analysis of Diffraction by Matter*, North Holland Publishing Co. Amsterdam.
88. Bignami A., Eng L. F., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 165—173.
89. Wender M., Kozik M., Wajgt A., (1972), *Acta Histochem. Cytochem.*, **43**, 361—371.
90. Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Goncerzewicz A., (1975), *Neuropat. Pol.*, **12**, 209—217.
91. McIntosh T. J., Worthington C. R., (1973), *Biophys. J.*, **13**, 498—500.
92. Worthington C. R., McIntosh T. J., (1974), *Biophys. J.*, **14**, 703—729.
93. Moody M. F., (1974), *Biophys. J.*, **14**, 697—702.
94. Moody M. F., (1975), *Acta Cryst. A*, **31**, 8—15.

SPRAWOZDANIE

XIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

(Toruń, 4 — 6 wrzesień 1975 r.)

W dniach 4—6 września 1975 odbył się w Toruniu XIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, w którym udział wzięło 467 naukowców z różnych ośrodków krajowych.

Obrady Zjazdu toczyły się na terenie Uniwersytetu im. M. Kopernika w nowo zbudowanych obiektach Wydziału Biologii.

Otwarcia Zjazdu dokonał Przewodniczący Komitetu Naukowo-Organizacyjnego, prof. dr Piotr Masłowski; następnie głos zabierali wicewojewoda toruński, mgr Stefan Stefański, Rektor Uniwersytetu M. Kopernika — prof. dr Wiesław Woźnicki oraz Prezes Zarządu Głównego P.T.Bioch. prof. dr Lech Wojtczak, który jednocześnie wręczył dyplomy nagród przyznanych przez Zarząd Główny Towarzystwa.

Wykład inauguracyjny pt „Współczesne kierunki badań nad chemizmem fotosyntezy” wygłosił doc. dr Stanisław Więckowski. Wykład ten otworzył równocześnie obrady zorganizowanego przez prof. dr J. Zubrzyckiego Sympozjum na temat fotosyntezy, w ramach którego wygłoszono następujące referaty:

1. Mechanizmy regulujące włączanie CO₂ w procesie fotosyntezy
(Prof. dr Z. Kaniuga)
2. Zjawiska fotofizyczne w systemach fotosyntetycznych
(Prof. dr D. Frąckowiak)
3. Fotosynteza a metabolizm wtórny
(prof. dr Z. Kasprzyk)
4. Biochemia fotosyntezy roślin typu C-4
(doc. dr S. Więckowski)
5. Działanie czynników środowiskowych na fotosyntetyczne przemiany związków węgla
(Dr S. Maleszewski)

Ponadto w czterech sekcjach tematycznych wygłoszono 256 komunikatów w tym z: Białegostoku — 22; Gdańska — 19, Katowic — 15, Krakowa — 10, Lublina — 24, Łodzi — 43, Olsztyna — 4, Poznań — 31, Szczecina — 4, Torunia — 4, Warszawy — 53, Wrocławia — 25.

W czasie trwania obrad czynne były wystawy aparatury zorganizowane przez firmy Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala; UNIPAN, PREMED, Mechanikę Precyzyjną, stoisko informacyjne firmy Beckman Instruments, a także duża ekspozycja Centrali Spółdzielni Ogrodniczych pod hasłem „Plony naszych ogrodów”.

W ramach imprez towarzyszących w dniu 5 września odbyło się spotkanie towarzyskie, w którym uczestniczyło 250 osób; dwa koncerty zorganizowane przez Filharmonię Bydgoską: koncert muzyki dawnej w wykonaniu *Cappella Bydostiensis* i koncert symfoniczny.

W ostatnim dniu Zjazdu odbyła się całonocna wycieczka „Szlakiem Piastowskim” (Toruń—Inowrocław—Kruszwica—Mogilno—Strzelno—Gniezno—Biskupin) z udziałem 90 uczestników Zjazdu.

P. Mastowski, A. Leźnicki

V Międzynarodowy Zjazd Towarzystwa Neurochemicznego

W dniach od 2 do 6 września 1975 roku w Barcelonie odbył się V Zjazd Międzynarodowego Towarzystwa Neurochemicznego. Udział w Zjeździe wzięło około 700 neurochemików oraz przedstawiciele pokrewnych gałęzi wiedzy z różnych kontynentów. Polskę reprezentowało siedem osób. W pięciu doniesieniach przedstawili one wyniki swych badań bądź w formie tradycyjnych komunikatów, bądź w formie plakatowej. Na zaproszenie organizatorów prof. L. Lubińska wzięła udział w dyskusji Okrągłego Stołu na temat transportu w aksonach.

Program obrad był bardzo bogaty; często posiedzenia zbliżonych do siebie tematycznie sekcji odbywały się równocześnie, stawiając przed uczestnikami problem wyboru.

W ramach Zjazdu odbyło się sześć Sympozjów:

1. Biochemiczne parametry zaburzeń bariery krew—mózg
2. Nowe potencjalne transmitery
3. Neurotransmitery a procesy wzrokowe
4. Neuronalne i glijowe błony plazmatyczne
5. Specyficzne białka mózgu
6. Biochemia neuronu i hodowla tkanki nerwowej

Ponadto toczyły się dyskusje Okrągłego Stołu z udziałem zaproszonych referentów na następujące tematy:

1. Struktura i aktywność immunologiczna IgG w chorobach neurologicznych człowieka i zwierząt
2. Immunologiczne aspekty receptorów cholinergicznych
3. Fosfolipidy w przekaźnictwie synaptycznym
4. Neurochemiczne podstawy farmakogenetyki
5. Choroba Krabbe'a
6. Neurochemiczne aspekty widzenia i słyszenia
7. Enzymologia metabolizmu lipidowego
8. Aspekty dojrzwania mechanizmów neurotransmiterowych
9. Rola neurochemika w klinice
10. O roli enzymów proteolitycznych w patogenezie stwardnień rozsianych
11. Przepływ aksoplazmy
12. Mikrometody w neurochemii
13. Obecne poglądy na pomiar *in vivo* szybkości przemian neurotransmiterów.

Przedmiotem obrad sekcyjnych były:

Acetylocholina i mechanizmy cholinergiczne;
 Metabolizm aminokwasów i powiązane z nim zaburzenia;
 Transport w aksonach;
 Biochemiczne aspekty uczenia się i zachowania się;
 Aminy biogenne;
 Bariera krew—mózg i płyn mózgowo-rdzeniowy;
 Białka mózgu;

Neurochemia komórkowa;
Cykliczne nukleotydy;
Rozwój;
Działanie leków;
Przemiany energetyczne;
GABA i inne aminokwasowe transmitery;
Glikoproteidy;
Lipidy, lipidozy i inne zaburzenia;
Błony i transport przez błony;
Mielina i demielinizacja;
RNA, synteza białek;
Synaptosomy.

W ramach Zjazdu odbyła się specjalna sesja poświęcona społecznym i filozoficznym implikacjom obecnego rozwoju neurobiologii.

Poniżej, w bardziej szczegółowym sprawozdaniu, ograniczono się do omówienia tylko niektórych wybranych zagadnień przedstawionych na Zjeździe.

Budowę błon neuronów i komórek glejowych omawiano na dwóch sympozjach i na kilku posiedzeniach sekcyjnych. Najpoważniejszą trudnością, na którą napotykają zajmujący się tym zagadnieniem, to otrzymanie czystych preparatów różnych błon a zwłaszcza synaptosomalnych. Wydaje się, że przyszość badań zależy w znacznym stopniu od rozwoju coraz bardziej precyzyjnych technik frakcjonowanego wirowania i, jak podkreślało wielu dyskutantów, od zastosowania bardziej specyficznych metod analitycznych, zwłaszcza immunochemicznych.

Jednym z ciekawszych był referat C. W. Cotmana (Uniwersytet Kalifornii) o molekularnej architektonice synaps ośrodkowego układu nerwowego. Autor omówił zagadnienie powstawania nowych synaps głównie na podstawie własnych doświadczeń. Stosując uszkodzenie elektrokoagulacyjne niektórych struktur mózgu obserwował powstawanie nowych połączeń synaptycznych w innych częściach mózgu powiązanych anatomicznie z uszkodzeniami. Wyizolowane błony postsynaptyczne mają po stronie zewnętrznej szereg receptorów lektynowych o charakterze glikoproteidowym. Autor postuluje, że w błonach postsynaptycznych glikoproteidy są powiązane w sposób bardziej trwały niż w innych błonach komórkowych. Błona postsynaptyczna po stronie wewnętrznej posiada zgrubienie; zbudowane jest ono z łańcuchów polipeptydowych o ciężarze cząsteczki od 50 000—54 000. Pod względem własności fizykochemicznych polipeptydy te przypominają tubulinę. Pozostaje zagadnieniem nie rozstrzygniętym, czy błony postsynaptyczne mają podobną budowę również i w mózgu normalnym, czy też uszkodzenie struktur ośrodkowego układu nerwowego indukuje przedstawioną architektonikę błon.

Budowę synaptosomalnych błon plazmatycznych (S.P.M.) przedstawił J. G. Morgan, B. W. Moore i szereg innych badaczy. Błony te mają niski poziom sfingomielin i niski stosunek molarny cholesterolu do fosfolipidów. Fosfolipidy charakteryzują się wysoką zawartością kwasów wielonienasyconych. Ilość glikolipidów jest znaczna, ale są to prawie wyłącznie gangliozydy. Wydaje się, że błony te zawierają białka tubulino-, miozyno- i aktynopodobne. Dane o enzymach występujących w S.P.M. poza ATP-azą ($\text{Na}^+ \text{K}^+$) są jeszcze niepewne. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że wzorzec białkowy samego złącza synaptycznego (*synaptic junction*, S.J.) jest prosty; prawdopodobnie głównym białkiem jest tubulina. Zawartość lipidów wyizolowanych S.J. jest bardzo niska, ubogi też jest zestaw enzymatyczny. Należy zaznaczyć, że szereg dyskutantów miało poważne zastrzeżenia co do czystości badanych preparatów błon.

Doniesienia, dotyczące **przepływu aksoplazmy**, poświęcone były w głównej mierze transportowi różnych substancji (białek, lipidów i glikoproteidów) oraz wpływowi różnych czynników na to zjawisko. W pierwszej grupie doniesień najciekawsze,

jak się wydaje, były dane zaprezentowane przez Marchisio i wsp. (Włochy). Badali oni dynamiczne własności transportu białek i glikoproteidów w szlaku wzrokowym kurcząt. Stwierdzili zmiany intensywności transportu tych substancji. Transport glikoproteidów przebiega najintensywniej w okresie formowania się synaps. W związku z powyższym autorzy przypuszczają, że transport glikoproteidów w aksonach może być jednym z czynników kontrolujących zjawiska synaptogenezy, a między innymi procesy „rozpoznawania” powierzchni elementów neuronalnych.

W dyskusji Okrągłego Stołu szeroko omawiane były zagadnienia udziału transportu w aksonach w procesach tworzenia się błon aksolemy i błon zakończeń nerwowych (Marchisio) oraz udział tego zjawiska w kontaktach interneuronalnych (Droz, Francja). Wydaje się, że tzw. wolny transport zależy od kontaktu wypustek nerwowych z ciałem komórki (Tuček i wsp., Instytut Fizjologii Czeskiej A.N., Mc Leon i wsp.). Poruszane było dość obszernie zagadnienie wpływu jonów na tzw. „szybki transport”. Obecność jonów wapnia w środowisku, w którym umieszczono perikarion, jest warunkiem koniecznym dla zjawiska szybkiego transportu białek (Dravid i Hammerschlag).

Zagadnieniu **potencjalnych, nowych neurotransmiterów** poświęcone zostało całe sympozjum. W referacie wprowadzającym, Aprison (Indianapolis) podał szereg uwag na temat kryteriów, które powinny być spełnione, aby dany związek mógł być uważany za substancję przekąźnikową.

Prócz ogólnie uznanych neurotransmiterów takich jak: acetylocholina, serotonina, GABA, dopamina czy noradrenalina przedstawiono dane silnie wskazujące, że również takie substancje jak: histamina (Schwartz), prolina (Johnston), asparaginian (Graham), tauryna i substancja P (Krnjević) są najprawdopodobniej neurotransmiterami. Substancja P, ze względu na swoje przedłużone, pobudzające działanie jest być może modulatorem działania innych głównych neurotransmiterów.

Zagadnienia dotyczące **układu cholinergicznego** poruszano w sekcji acetylocholiny i mechanizmów cholinergicznym oraz w czasie dyskusji Okrągłego Stołu na temat receptora cholinergicznego.

Stosunkowo dużo miejsca poświęcono sprawom metodycznym. W trzech komunikatach, prezentowanych w tej sekcji, omawiano otrzymywanie oczyszczonych preparatów acetylotransferazy cholinowej oraz charakterystykę molekularnych własności tego enzymu (Chao i Wolgram, Singh i McGeer, Malthe-Sørensen). Przedstawiono nową metodę histochemicznej lokalizacji acetylotransferazy cholinowej (McGeer). W metodzie tej zwanej „techniką sandwiczów” wykorzystano metodę szeregu przeciwciał: w pierwszym etapie reakcji przeciwciała otrzymane z królika reagują z acetylotransferazą cholinową. Powstały kompleks reaguje następnie z przeciwciałami przeciw białkom królika, które uzyskano po immunizowaniu kozy. Kompleks ten następnie reaguje z tzw. PAP (kompleksem peroksydaza — przeciw peroksydaza, uzyskanym z królika). Ta ostatnia warstwa reaguje z substancjami dającymi zaciernienie widoczne w mikroskopie elektronowym. Tę technikę badawczą przedstawiono w pięknych i przekonujących przezroczach i doniesieniu plakatowym.

Nową enzymatyczną metodę oznaczania acetylocholiny zaproponowali Contreras i Bachalard. Ze względu na duży koszt nie będzie ona prawdopodobnie szeroko stosowana, wymaga ona bowiem użycia aż czterech oczyszczonych preparatów enzymatycznych (AChE, kinazy octanowej oraz pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej).

Omawiano również własności esterazy acetylocholiny m.in. przedstawiono charakterystykę rozpuszczalnej AChE i jej izoenzymów (Paggi i wsp., Skangiel-Kramaska i Niemierko).

Osobną grupę doniesień, stosunkowo nielicznych na obecnym Kongresie, stanowiły prace dotyczące zachowania się składników układu cholinergicznego (a także

serotonergicznego), w określonych strukturach po zniszczeniu innych części mózgu. Prace te mają na celu poznanie charakteru połączeń pomiędzy poszczególnymi strukturami (Wagner, Max-Planck Inst., Frankfurt) oraz wyjaśnienie mechanizmów zmian biochemicznych w mózgu po uszkodzeniach (Oderfeld-Nowak i wsp.).

Szereg doniesień poświęcono niezwykle ważnemu zagadnieniu jakim jest **interakcja pomiędzy różnymi układami neurotransmiterowymi** w mózgu (Głowiński i wsp., Collège de France, Paryż; Consolo i wsp. — „Mario Negri”, Mediolan).

Bartholini i wsp. (Hoffman — La Roche, Bazylea) badając metodą *push-pull* wydzielanie acetylocholino w neostriatum pod wpływem różnych środków farmakologicznych, działających na receptor dopaminergiczny, wykazali że neurony cholinergiczne tej struktury są tonicznie hamowane przez układ dopaminergiczny.

Pięknym, bezpośrednim dowodem istnienia dopaminoergicznocholinergicznego połączenia w neostriatum jest praca McGeer i wsp. (Vancouver). Stosując omówioną już powyżej technikę „sandwiczów” dla zlokalizowania aktywności acetylotransferazy cholinowej, łącznie z podaniem 6-hydroksydopaminy — związku powodującego degenerację zakończeń dopaminergicznych, wykazali, że te degenerujące zakończenia nerwowe mają bezpośredni kontakt z wypustkami dendrytycznymi zawierającymi acetylotransferazę cholinową.

W zakresie **biochemicznych aspektów uczenia się i zachowania się zwierząt** nie przedstawiono nowych sposobów podejścia do tego zagadnienia. Nadal najczęściej uwagi zwraca się na inkorporację aminokwasów do białek mózgu. W wielu pracowniach stosuje się technikę podwójnego znakowania (najczęściej używając lizyny, waliny, leucyny). Inkorporację bada się bądź do białek całego mózgu, bądź do wzbogaconej frakcji neuronalnej lub glejowej, bądź też poszczególnych struktur mózgu lub frakcji komórkowych.

Badania Shashoua (Harvard Medical School) prowadzone na złotych rybkach wskazują, że zmiany w intensywności przemiany białek obserwuje się jedynie gdy zwierzę uczy się nowego zadania, wówczas zaś gdy zadanie już zostało opanowane, to nie występują różnice w inkorporacji aminokwasów. Podobny wniosek był już dawniej wysuwany, lecz wyniki dotyczyły innych gatunków zwierząt; udoskonalenie techniki badawczej jak i zastosowanie kilku grup zwierząt kontrolnych uwiarygodniają ten ważny wynik doświadczalny.

Irvin i Barracq badali kolejność inkorporacji znakowanej glukozy do poszczególnych struktur i frakcji komórkowych mózgu gołębia. Po jednorazowym treningu wzrokowym stwierdzili oni bardzo wyraźny wzrost wyznakowania kwaśnych glikoproteidów, podczas gdy w białkach rozpuszczalnych nie zaobserwowali wyraźniejszych różnic. Na istotną rolę glikoproteidów w procesach uczenia się wskazują również badania Matthiesa (Instytut Farmakologii, Magdeburg).

Przedstawiono wyniki badań nad wpływem nowych inhibitorów syntezy białek (np. anizomycyny, L-asparaginazy) na pamięć długotrwałą. Starano się ustalić najkrótszy czas, w którym synteza białek przed treningiem musi zachodzić, aby zwierzę mogło zapamiętać wyuczone zadanie. Szereg dalszych wyników przedstawiła grupa Rosego, zajmująca się chemicznymi podstawami: 1) tzw. wdrukowywania pierwszych wrażeń wzrokowych u kurcząt i 2) deprywacji wzrokowej u szczurów.

Ebel (z grupy P. Mandla ze Strasburga) wskazała na wyraźną korelację pomiędzy aktywnością enzymów cholinergicznym w jądrze migdałowatym a zachowaniem się agresywnym szczurów.

Cztery osoby z grupy polskiej wzięły również udział w satelitarnym spotkaniu zorganizowanym w Madrycie (29—30 sierpnia 1975) przez Delgado (Wydział Lekarski). Sympozjum poświęcone było zagadnieniu behawioralnej neurochemii. Na jego program składały się referaty wybitnych specjalistów, m.in. Delgado — O nowych kierunkach w behawioralnej neurochemii, Mandla — O genetycznie uwarunkowa-

nych biochemicznych korelatach zachowania; czy też Valzelli — O neurochemicznych aspektach agresywnego zachowania, oraz demonstracje przeprowadzane przez pracowników Zakładu Delgado i Defeudisa. Szczegółowo przedstawiono m.in. technikę perfundowania podkorowych struktur mózgu metodą *push-pull*, w zastosowaniu do badania mechanizmów adrenergicznych.

Zarówno to spotkanie satelitarne jak i obrady w Barcelonie stworzyły wiele możliwości szerokiej dyskusji kulturalnych.

*Stella Niemierko,
Barbara Oderfeld-Nowak,
Jolanta Skangiel-Kramska*

RECENZJA

O wartości poznawczej metod cytochemicznych stosowanych w badaniach enzymatycznych

Suplement do tomu XIV czasopisma *Acta Histochemica* (1974) obejmuje materiały sympozjum zorganizowanego przez holenderskie Towarzystwo Histochemiczne, które odbyło się w 1973 r. w Lejdzie (Aussagewert und Fehlermöglichkeiten histochemischer Enzymreaktionen. Red.: Dietrich Wittekind, Freiburg i. Br., *Acta Histochemica*, Suppl. XIV., Gustav Fischer Verlag, Jena — 1975).

Dokładny tytuł tego Sympozjum brzmiał: Wartość poznawcza i możliwości uzyskiwania błędnych wyników przy stosowaniu reakcji enzymatycznych. Zgodnie z tym założeniem prof. Arnold i dr Klessen z Instytutu Anatomicznego Uniwersytetu w Tubingen w pełnym swady referacie przedyskutowali przyczyny, które mogą powodować otrzymanie fałszywych informacji przy stosowaniu metod cytochemicznych. Błędy takie, jak to się zresztą wielokrotnie przypomina, mogą wynikać z niewłaściwego przygotowania materiału, błędnego przeprowadzenia reakcji i wreszcie z niewłaściwego odczytania otrzymanego wyniku. Jest rzeczą oczywistą, że w każdej nauce eksperymentalnej obowiązuje ściśle przestrzeganie prawidłowego przeprowadzenia wszystkich trzech etapów pracy. W każdym też przypadku należy dobrze pamiętać jakie są możliwości danej metody, i nie przekraczać zakreślonych nimi granic. Metody cytochemiczne — z samego założenia — lepiej niż inne umożliwiają zlokalizowanie danego procesu enzymatycznego w niedezorganizowanej strukturze komórki i mogą dostarczyć — jak przypominają wspomniani autorzy — wartościowych informacji w przypadku wyników typu „tak lub nie”. Jeżeli natomiast pytanie brzmi „ile” ocena wizualna wyników zawsze jest subiektywna, a stąd bardzo często zawodna. Jedynie właściwą ocenę ilościową wyniku przeprowadzonej reakcji można uzyskać przez stosowanie pomiarów fotometrycznych. Dobrym przykładem pierwszego typu informacji są wyniki doświadczeń prowadzonych przez zespół pracowników zakładów Patologii, Biochemii, Farmakologii i Radiopatologii z Uniwersytetu w Groningen. Zespół ten zastosował metody cytochemiczne do sprawdzenia czystości frakcji otrzymanych przez różnicowe wirowanie homogenatów tkankowych. W tym celu aktywność enzymów charakterystycznych dla poszczególnych frakcji autorzy ci oznaczali nie *in vitro*, jak to się zwykle robi, lecz lokalizowali ją w skrawkach kriostatowych przygotowanych z frakcji zamrożonych w ciekłym azocie. Materiał skrawano zarówno w kierunku równoległym, jak i prostopadłym do kierunku wirowania, co pozwoliło na bardzo łatwą i dobrą ocenę homogenności poszczególnych reakcji oglądanych przy niewielkim powiększeniu (od 10 — do 30×). Pozwalało także na zorientowanie się, jak daleko w osi pionowej poszczególne frakcje zachodzą na siebie. Doświadczenia takie, jak zaznaczyłam, dają jedynie ogólną orientację w rozmieszczeniu struktur charakteryzujących się aktywnością danego enzymu. W przypadku zaś, gdy celem jest dokładniejsze zlokalizowanie danego enzymu w obrębie określonych substruktur sama liofilizacja materiału utrwalonego przez zanurzenie w ciekłym azocie nie wystarcza. Należy jeszcze zabezpieczyć się wówczas przed wy-

padaniem, czy przesuwaniami różnych składników komórki, często nieuniknionym przy bardziej skomplikowanej procedurze. Stabilizację struktury przeprowadza się na ogół na drodze chemicznej. Zespół pracowników Zakładu Anatomii Akademii Medycznej w Hannoverze uzyskuje ją na drodze mechanicznej zatapiając liofilizowaną tkankę w metakrylanie glikolu. Hydrofilność zastosowanego polimeru zapewnia dobrą dostępność substratów. Możliwość otrzymania z tak przygotowanych próbek również ultracienkich skrawków pozwala na prowadzenie porównawczych badań przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego.

Interesującą metodą oceny ilościowej reakcji cytochemicznych — która, jak to określał sam autorzy: prof. Van Duijn i dr Van der Ploeg, jest jakby pomostem łączącym badania cytochemiczne (*in situ*) z badaniami biochemicznymi (*in vitro*) jest opracowana w Zakładzie Histochemii i Cytochemii Uniwersytetu w Lejdzie metoda tzw. błon modelowych. Błony te uzyskuje się przez polimeryzację monomerów akryloamidowych (stosowanych w bardzo wysokim stężeniu) zmieszanych odpowiednio z wyizolowanymi enzymami lub strukturami komórkowymi, w których enzymy te występują. Uzyskuje się w ten sposób coś w rodzaju sztucznych skrawków tkankowych, na których można przeprowadzić porównawczo reakcje cytochemiczne i biochemiczne. Ilościowej oceny wyników cytochemicznych można dokonać stosując cytofotometr lub fotometr zaopatrzony w prostą, łatwą do wykonania przystawkę. Można przy pomocy takich błon modelowych zbadać wpływ utrwalacza, wpływ dyfuzji, ustalić w przypadku stosowania barwników dwuazowych czy na specyficzność uzyskanego spektrum absorpcji nie wpływa obecność innych składników, np. lipidów. Można też ustalić, w jakim stopniu przebieg danego procesu enzymatycznego zależy od uszkodzenia struktury, w której enzym występuje. Słowem, łatwość operowania modelową błoną, stanowiącą dla zawartego w niej enzymu środowisko bardziej zbliżone do naturalnego, niż to, które występuje w doświadczeniach *in vitro* — pozwala na możliwie optymalne przystosowanie danego testu enzymatycznego do badań cytochemicznych.

W omawianym sympozjum nie zabrakło też grupy referatów poświęconych zagadnieniu rytmiki dobowej aktywności enzymatycznej komórki. Kierunek ten zapoczątkował kilkanaście lat temu, dzięki zresztą zupełnie przypadkowym obserwacjom, prof. Meyersbach, kierujący obecnie Zakładem Anatomii Akademii Medycznej w Hannoverze. Wg Prof. Meyersbacha, czas, w którym pobieramy materiał do badań, jest podstawowym czynnikiem, który należy wziąć pod uwagę przy badaniach z dziedziny cytochemii a także biologii komórki. A oto parę przykładów dla potwierdzenia tej tezy: Oznaczenia biochemiczne zawartości glikogenu w wątrobie szczura (przeprowadzone na zwierzętach z czystych szczepów, hodowanych w wysoce standardowych warunkach) wykazują wyraźny jej wzrost w ciągu doby o godz 12 i 4, oraz zasadnicze obniżenia o 20-tej, oraz 2 i 6-tej. Amplituda tych wahań mierzy się zmianami od 0,1 mg/100 mg tkanki do 8 mg/100 mg tkanki. Towarzyszą im wyraźne różnice w cytochemicznej lokalizacji glikogenu a także w rozmieszczeniu — na poziomie ultrastruktury — glukozo-6-fosfatazy. Dr Chemnitz — z tego samego, co prof. Meyersbach zakładu, przedstawił wyniki badań, świadczące o bardzo znacznych odchyleniach powyżej i poniżej średniej — obserwowanych w ciągu doby w składzie izozymowych form dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH). Zmiany te wyglądają dla różnych izozymów różnie w homogenacie z wątroby i z mięśnia sercowego szczura, co daje się dobrze skorelować z przewagą metabolizmu anaerobowego w pierwszym z tych narządów i metabolizmem aerobowym typowym dla drugiego z nich. Około godziny 6 po południu, gdy szczury wykazują najmniejszą aktywność ruchową, LDH-5 katalizujący przemianę pirogronianu w mleczan osiąga maksimum aktywności w wątrobie, natomiast w mięśniu sercowym spada do minimum. W tej ostatniej tkance rozpad pirogronianu zachodzi całkowicie na drodze utleniania w cyklu Krebsa, przy tym mle-

czan również może być wykorzystany jako substrat, stąd niska aktywność LDH-5 i przewaga LDH-1 i 2, które katalizują reakcję przemiany mleczanu w pirogronian. Przytaczane przez tę grupę referentów wyniki — zarówno oznaczeń biochemicznych, jak i cytochemicznych — są tak przekonywujące, że warto pamiętać o zmianach dobowych natężenia metabolizmu przy planowaniu naszych doświadczeń.

Wracając do problemu ilościowej, obiektywnej oceny wyników reakcji cytochemicznych, jednym z lepszych — jak mi się wydaje — rozwiązań, jest opracowany przez doc. Thiessena z Instytutu Medycyny Jądrowej i Biofizyki Specjalnej Akademii Medycznej w Hannoverze układ spektrofotometryczny „Cytos”. W aparacie tym można otrzymać zdjęcia komórki, na których wartości ekstynkcji uzyskane dla danego związku (po przeprowadzeniu odpowiedniej reakcji cytochemicznej) przez skanowanie poszczególnych jej punktów przetransponowane są w specjalny sposób na różne odcienie szarości (przy fotografii czarno—białej), lub na różne barwy (przy fotografii kolorowej). Każdy z tych kolorów odpowiada określonym stężeniom danej substancji w komórce. Wbudowany w aparat układ komputerowy umożliwia szybkie odczytanie odpowiednio zaprogramowanego pomiaru. Dla obiektu o średnicy wynoszącej 12 μ m wynik, na który składa się 2500 pojedynczych wartości otrzymuje się w ciągu 50 sekund. Zanim jednak aparaty typu „Cytos” znajdują się w więcej niż w jednej Pracowni w Europie, możliwie standardowe przeprowadzanie testów cytochemicznych i możliwie obiektywna ocena ich wyników jest ciągle warunkiem niezbędnym dla osiągnięcia wysokiej wartości poznawczej tych badań. Co więcej, wyposażenie laboratorium w najnowocześniejszą aparaturę pomiarową nie zwalnia eksperymentatora od pamiętania o pozornie banalnych przestrożkach, wysuniętych przez prof. Arnolda z Tübingen. Z błędnie przeprowadzonej reakcji, na niewłaściwie przygotowanym materiale i przy niedostatecznym przemyśleniu doświadczenia nawet najprecyzyjniejszy system komputerowy dostarczy jedynie informacji fałszywych, mimo że wynik przedstawiony będzie w postaci pięknych zestawień liczbowych i diagramów.

Powyższe omówienie nie obejmuje oczywiście całości materiałów omawianego sympozjum, które bez wątpienia dla wszystkich osób zainteresowanych badaniami cytochemicznymi procesów enzymatycznych stanowić będą interesującą i pożyteczną lekturę.

A. Przetęcka

KOMUNIKAT

KOMISJI SŁOWNICTWA
POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Monografia pt. „Polskie Słownictwo Biochemiczne” wydana przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne zawiera reguły słownictwa zalecane przez IUPAC-IUB, a opublikowane przed 1973 r. Dążąc do dalszego ujednoczenia polskiego słownictwa biochemicznego, Komisja Słownictwa PTBioch postanowiła stopniowo spolszczać i publikować w kwartalniku Postępy Biochemii później ogłoszone Reguły. Do zeszytu 2 tomu XXII załączono jako wkładkę Reguły dotyczące słownictwa hormonów peptydowych i białek żelazo-siarkowych.

Janina Kwiatkowska

SPIS TREŚCI

B. Rzeszotarska, S. Wiejak — Struktura i funkcja zasadowego inhibitora trypsyny	123
M. Manteuffel-Cymborowska — Biochemiczne aspekty biologicznych rytmów dobowych	148
N. Grankowski — Rola białek rybosomowych <i>Procaryota</i> w procesie translacji	173
B. Borkowska — Cytokininy	197
J. Sędzik — Niektóre aspekty rentgenostrukturalnych badań mieliny	211
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — Sprawozdanie z XIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń 4—6.IX.1975 (P. Maślowski, A. Leźnicki)	231
Sprawozdanie z V Międzynarodowego Zjazdu Towarzystwa Neurochemicznego (Barcelona 2—6.IX.1975) (S. Niemierko, B. Oderfeld-Nowak, J. Skangiel-Kramaska)	232
Recenzja — XIV tom <i>Acta Histochemica</i> (A. Przetęcka)	237
Komunikat Komisji Słownictwa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	240

POSTĘPY BIOCHEMII

June 1976

ARTICLES IN POLISH

Volume 22

Number 2

B. Rzeszotarska, S. Wiejak — Structure and Function of Basic Trypsin Inhibitor (Inst. Chem. Higher Pedagogical School, Opole)	123
M. Manteuffel-Cymborowska — Biochemical Aspects of Diurnal Biological Rhythms (Dept Cell. Biochem. M. Nencki Inst. Exp. Biol. Pol. Acad. Sci., Warsaw)	148
N. Grankowski — The Role of Ribosomal Proteins in Translation in <i>Procarysta</i> - (Dept Mol. Biol. Inst. Microbiol. Biochem. M. Curie-Skłodowska University, Lublin)	173
B. Borkowska — Cytokinins (Dept Plant Physiol. Inst. Pomology, Skiernewice)	197
J. Sędzik — Some Aspects of Rentgenostructural Investigation of the Myelin Membrane (Inst. Neurology and Diseases of Sensory Organs, Med. Acad., Poznań)	211
Meeting Reports	232
Book review	237
Communication	240

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

Cena zł 20.—

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

półrocznie zł 40.—

rocznie zł 80.—

Prenumeratę krajową przyjmują Oddziały RSW „Prasa—Książka—Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada na styczeń, I-szy kwartał, I-sze półrocze roku następnego i na cały rok następnny,
- do dnia 10 miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa — Książka — Ruch”. Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW oraz prenumeratorzy indywidualni, zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

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

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona—Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, Poland. Please send payments to the account of Ars Polona—Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, Poland.

Indeks 36969

Piśmiennictwo: W artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemicznej (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 276, (1) np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autor(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stroną cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydawania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co, London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58, Academic Press, London

Załączniki: Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egzemplarzach na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem 1-ego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk winny jasno opisywać ich treść, zaznaczając z jakich (jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: \triangle \square \circ \blacktriangle \blacksquare \bullet Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „górną” i „dół” (ołówkiem). O stopniu zmniejszenia ryciny w druku decyduje wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów aby zabezpieczyć maszynopisy i ilustracje przed pogięciem.

SPIS TREŚCI

B. Rzeszotarska, S. Wiejak — Struktura i funkcja zasadowego inhibitora trypsyny	123
M. Manteuffel-Cymborowska — Biochemiczne aspekty biologicznych rytmów dobowych	148
N. Grankowski — Rola białek rybosomowych <i>Procaryota</i> w procesie translacji	173
B. Borkowska — Cytokininy	197
J. Sędzik — Niektóre aspekty rentgenostrukturalnych badań mieliny	211
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — Sprawozdanie z XIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń 4—6.IX.1975 (P. Masłowski, A. Leźnicki)	231
Sprawozdanie z V Międzynarodowego Zjazdu Towarzystwa Neurochemicznego (Barcelona 2—6.IX.1975) (S. Niemierko, B. Oderfeld-Nowak, Ź. Skangiel-Kramska)	232
Recenzja — XIV tom Acta Histochemica (A. Przełęcka)	237
Komunikat Komisji Słownictwa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	240