

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 21 (1)
1-116 (1975)

1975

tom 21 nr 1



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 „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje 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.

Układ maszynopisu: strona okładkowa nienumerowana 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 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 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 nie wprowadzanie do tekstu tworzonych doraznie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

KWARTALNIK

1975 TOM 21 ZESZYT 1

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 21(1)
3-116(1975)

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-Katzenellenbogen (Wrocław),

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

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman

KOMITET REDAKCYJNY

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

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

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

I. Szumiel (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1975

Nakład 2250 (2119+131)

Ark. wyd. 8,0 ark. druk. 7,25

Pap. druk. sat. kl. V, 70 g 70×100

Zam. nr 1467/74

W-98

Oddano do składania 8.10.1974 r.

Podpisano do druku w styczniu 1975 r.

Druk ukończono w lutym 1975 r.

Cena zł 20.—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

ANNA MAZANOWSKA *

Prokolagen

Procollagen

Wśród związków pośrednich biosyntezy kolagenu prokolagen zajmuje szczególną pozycję. Wynika ona z jego roli w mechanizmie powstawania monomeru kolagenu (tropokolagenu) i tworzenia się włókien kolagenowych. Wysoka zawartość struktury niehelikalnej oraz obecność reszt cysteinowych w łańcuchach tego prekursora ułatwia i przyspiesza utworzenie cząsteczki o typowej dla tropokolagenu strukturze potrójnej spirali. Dobra rozpuszczalność prokolagenu zapobiega powstawaniu włókien wewnątrz wyspecjalizowanych komórek tkanki łącznej, w których zachodzi jego synteza. Dzięki swoistej budowie i dobrej rozpuszczalności białko to jest łatwo wydzielane z komórki i z tego względu bywa również nazywane „transportową postacią kolagenu”. Dalsze przemiany prowadzące do powstania włókien kolagenowych zachodzą w przestrzeni międzykomórkowej a katalizuje je swoisty enzym, peptydaza prokolagenowa; na uwagę zasługuje fakt, że peptydazy tej nie znaleziono w komórkach syntetyzujących prokolagen.

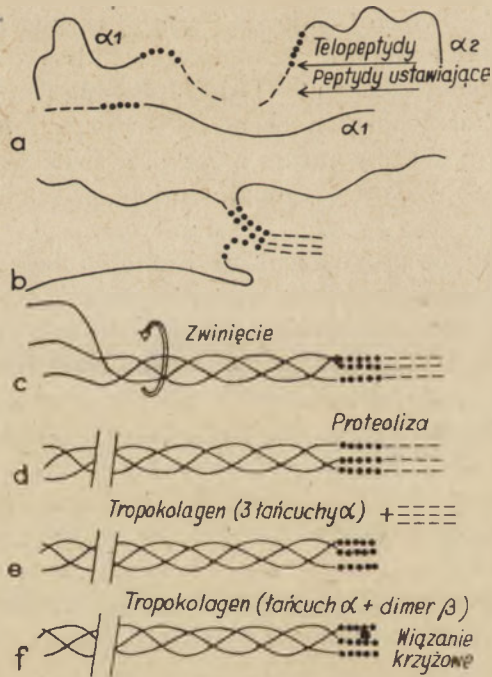
Dowody na istnieniu prokolagenu uzyskano w ciągu ostatniego pięcioletcia, jednakże już dużo wcześniej sugerowano możliwość istnienia tego rodzaju prekursora kolagenu. Jakie fakty mogły nasuwać takie przypuszczenia? Po pierwsze trudno było sobie wytłumaczyć, dlaczego proces re-naturacji kolagenu i reagregacji włókien *in vitro* przebiega wolno i z niską wydajnością (1), podczas gdy *in vivo* całkowita synteza łańcuchów i utworzenie cząsteczki tropokolagenu jest kwestią kilku (2, 3) a najwyżej kilkudziesięciu minut (4, 5, 6), w zależności od rodzaju tkanki. Po drugie zastanawiano się, dlaczego włókna kolagenowe powstają wyłącznie w przestrzeni międzykomórkowej, nigdy zaś w komórce syntetyzującej łańcuchy polipeptydowe. Pierwszą próbą wytłumaczenia tego zjawiska była sugestia, że kolagen opuszcza komórkę w postaci rozpuszczalnego prekursora

* Dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: SLS — *segment long spacing*, agregat monomerycznych cząsteczek kolagenu (tropokolagenu) spolimeryzowany „bok do boku”; CM-celuloza — karboksymetyloceluloza.

ulegającego następnie enzymatycznej przemianie w formę zdolną do polimeryzacji i agregacji we włókna (7). Jednak dopiero dziesięć lat później udało się uzyskać pierwsze doświadczalne dowody na istnienie rozpuszczalnej postaci kolagenu, której łańcuchy były dłuższe niż łańcuchy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ występujące w tropokolagenie (8, 9, 10). Wykazano również (10), że białko to, obecne w pożywce hodowli fibroblastów, w stanie natywnym ulega w obecności pepsyny jedynie ograniczonej proteolizie. W jej wyniku znikają dłuższe łańcuchy polipeptydowe, natomiast pojawiają się prawidłowe łańcuchy $\alpha 1$ i $\alpha 2$ w ilościowym stosunku 2:1. Występowanie w pożywce rozpuszczalnego białka, które ulega enzymatycznej przemianie w tropokolagen pozwala przypuszczać, że jest to transportowa postać kolagenu (10).

Początek intensywnych badań nad własnościami i funkcją prokolagenu zbiega się z ogłoszeniem przez Speakmana (11) hipotezy o mechanizmie powstawania cząsteczki tropokolagenu i tworzenia się włókien kolagenowych. Zakładał on istnienie prekursorowych łańcuchów polipeptydowych, których N-końcowe fragmenty, dzięki swoistemu składowi i konformacji, ułatwiałyby właściwe ustawienie się łańcuchów względem siebie. A zatem obecność „ustawiających peptydów” (*registration peptides*)



Schemat 1. Mechanizm tworzenia się cząsteczki tropokolagenu wg Speakmana (11).

Prawidłowe ustawienie się łańcuchów pro α (a) ułatwia interakcja pomiędzy „peptydami ustawiającymi” (b). Pozwala to na zwińnięcie łańcuchów pro α (c) w potrójną spiralę (d), z której następnie zostają enzymatycznie odszczepione „peptydy ustawiające” (e). Cząsteczkę tropokolagenu stabilizuje utworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych (f).

powinna znacznie przyspieszać przyjęcie przez prokolagen prawidłowej struktury potrójnej spirali. Zgodnie z hipotezą Speakmana N-końcowe fragmenty ulegają następnie enzymatycznemu odszczepieniu, co powoduje przemianę prekursorowej cząsteczki w tropokolagen. Dopiero ta postać zdolna jest do agregacji we włókna, które są następnie stabilizowane przez utworzenie kowalencyjnych wiązań poprzecznych. Przebieg procesu tworzenia się cząsteczki prokolagenu i jej przemianę w tropokolagen według hipotezy Speakmana przedstawia schemat 1.

Synteza łańcuchów prokolagenowych, podobnie jak innych białek, rozpoczyna się od końca aminowego (2), można zatem przypuszczać, że ustawianie się łańcuchów względem siebie następuje jeszcze przed ukończeniem ich syntezy na kompleksach polirybosomalnych (11).

Z hipotezy Speakmana jasno wynika, dlaczego renaturacja kolagenu nie posiadającego „peptydów ustawiających” jest wolnym i mało wydajnym procesem. Jednakże teoria ta nie tylko tłumaczy mechanizm powstawania cząsteczki tropokolagenu; pozwala ona również przewidywać własności prekursorowej cząsteczki oraz tworzących ją łańcuchów polipeptydowych. Wprawdzie niektóre sugestie wysunięte w tym zakresie okazały się błędne (np. przewidywanie, że w obszarze odszczepialnych peptydów nie występują wiązania kowalencyjne i że peptydy te mają wysoką zawartość struktury α -helikalnej), lecz zasadnicze punkty teorii Speakmana potwierdziły się doświadczalnie. Niewątpliwą zasługą tego autora jest również fakt, że jego teoretyczne założenia zasugerowały nowe kierunki badań w dziedzinie biosyntezy kolagenu. Prace te przyczyniły się do poznania budowy i własności prokolagenu oraz do wyjaśnienia mechanizmów powstawania cząsteczek tropokolagenu i ich agregacji we włókna.

I. Otrzymywanie, budowa i własności prokolagenu

Prokolagen (zwany także transportową postacią kolagenu (12) lub protropokolagenem (13)) ulega poza komórką szybkiej przemianie w tropokolagen. Ponieważ z tego powodu ilości prokolagenu normalnie występujące w tkankach są znikome, metodami z wyboru stosowanymi w pracach nad tym białkiem są metody izotopowe. Dla uzyskania dostatecznej ilości prekursora stwarza się również takie warunki doświadczałne, by nagromadzał się on wewnątrz komórki w postaci niehydroksylowanej (14, 15, 17). Osiąga się to przez zahamowanie czynności obu hydroksylaz, prolinowej i lizynowej. W tych warunkach protopokolagen, niehydroksylowana postać prokolagenu, pozostaje w komórce (16).

Materiałem do badań są hodowle tkanek, w których zachodzi szybka synteza kolagenu, a więc przede wszystkim tkanek embrionalnych (kości, ścięgna, chrząstka, soczewki), jak również hodowle fibroblastów oraz wolnych od macierzy komórek ścięgna lub soczewki. Prokolagen otrzymuje

się z pożywki lub tkanek przez ekstrakcję obojętnymi roztworami soli lub słabymi roztworami kwasu octowego i obecne w wyciągach białko bada metodami chromatografii jonowymiennej, sączenia molekularnego, elektroforezy w żelu poliakrylamidowym lub wreszcie ultrawierwienia analitycznego. Badano także własności immunologiczne oczyszczonych preparatów jak również ich obraz w mikroskopie elektronowym. Fakt, że prokolagen jest istotnie prekursorem dojrzałego kolagenu, wykazano w doświadczeniach typu znakowanie—przemieszczanie piętna. Znikanie białka o składzie (pro $\alpha 1$)₂ pro $\alpha 2$ w wyniku ograniczonej proteolizy nieswoistymi proteazami lub na skutek działania peptydazy prokolagenowej z jednoczesnym pojawianiem się białka zbudowanego z dwóch łańcuchów $\alpha 1$ i jednego łańcucha $\alpha 2$ również świadczyło o zależności typu prekursor—produkt końcowy pomiędzy prokolagenem i kolagenem (10, 44). Dowodem kolagenowego charakteru białka prekursorowego jest jego podatność na trawienie kolagenazą oraz stosunek zawartości hydroksyproliny do proliny, który w przypadku prokolagenu jest tylko nieznacznie niższy niż w przypadku kolagenu (18, 19).

I-1. Wielkość cząsteczki prokolagenu

Z teoretycznych założeń Speakmana oraz ze wstępnych badań (10, 14) wynikało, że cząsteczka prekursora jest większa od cząsteczki tropokolagenu. Pierwsze dane liczbowe dotyczące masy cząsteczkowej prokolagenu uzyskano stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu i używając łańcuchów α kolagenu jako standardu o znanym R_f (4). Oznaczona tą metodą masa cząsteczkowa łańcuchów prekursorowych tzn. łańcuchów pro α z kości sklepienia czaszki noworodków szczurzych wynosiła około 120 000 daltonów (20). Podobną wartość (125 000 daltonów) otrzymano w przypadku łańcuchów prokolagenu izolowanych metodą sączenia molekularnego ze ścięgien zarodków kurzych (12). Prokolagen z zarodkowych kości czaszki (18, 21), z fibroblastów ludzkich (22) jak i z wolnych od macierzy komórek ścięgna zarodkowego (23) ma masę cząsteczkową od 110 000 do 125 000 daltonów. Jedynie prokolagen w tym celu odtrawiano kolagenazą helikalną część cząsteczki prokolagenu śródmiaższowego, gdyż zbudowany jest z łańcuchów o masie cząsteczkowej około 140 000.

Zamiast oznaczać wielkość całych łańcuchów pro α niektórzy autorzy oznaczali masę cząsteczkową odszczepialnych N-końcowych fragmentów peptydowych, a więc różnicę mas cząsteczkowych łańcuchów pro α i α . W tym celu odtrawiono kolagenazą helikalną część cząsteczki prokolagenu, a pozostały fragment nie posiadający struktury potrójnej spirali oczyszczano metodami chromatograficznymi oznaczając następnie jego masę cząsteczkową (25). Na podstawie wyników uzyskanych trzema różnymi metodami obliczono, że wynosi ona około 105 000 (dane z elektro-

forezy w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu) względnie 75 000—80 000 daltonów (dane otrzymane metodami sączenia molekularnego na żelach Sephadex G-100 i G-200 oraz ultrawierowania analitycznego). Ponieważ wyizolowany fragment składa się z trzech peptydów o podobnym składzie aminokwasowym i masie cząsteczkowej, masa cząsteczkowa zatem pojedynczego peptydu wynosi 25 000—30 000 daltonów. Zbliżony wynik uzyskano w przypadku peptydu pro $\alpha 1$ -CB1 otrzymanego z łańcucha pro $\alpha 1$ przez rozszczepienie bromocyjanem (26). Peptyd ten stanowi końcową część łańcucha pro $\alpha 1$, a jego masa cząsteczkowa (około 20 000) odpowiada różnicy mas cząsteczkowych pro $\alpha 1$ i $\alpha 1$.

Oznaczenie mas cząsteczkowych peptydów odszczepionych w czasie przemiany prokolagenu w tropokolagen i obecnych w pożywce hodowli kości sklepienia czaszki kurzego zarodka dało niższe wyniki: znaleziono mianowicie (27), że masy cząsteczkowe tych peptydów wynoszą 12 000 i 18 000 daltonów.

Wreszcie ostatnią metodą, którą wykorzystano dla oznaczenia wielkości N-końcowych odszczepialnych fragmentów peptydowych prokolagenu (propeptydów) (25), były obserwacje w mikroskopie elektronowym postaci SLS prokolagenu. Na podstawie oznaczenia długości odcinka tych agregatów znajdującego się na ich aminowym (A) końcu, obliczono, że przybliżona masa cząsteczkowa propeptydów wynosi 12 000 daltonów /łańcuch (28). Tego samego rzędu są również propeptydy łańcuchów pro α błony podstawnej soczewki. Wysoka masa cząsteczkowa tych ostatnich wynika bowiem nie z większych rozmiarów propeptydów, lecz z 20-krotnie wyższej niż w kolagenie śródmięszowym zawartości reszt cukrowych (29).

Wydaje się zatem, że wielkość propeptydów bez względu na pochodzenie prokolagenu jest bardzo zbliżona. Różnice w ich rozmiarach oznaczonych przy pomocy różnych metod mogą wynikać bądź z częściowej degradacji prokolagenu w czasie preparatyki (27, 30), bądź z błędów samej metody (np. z wyboru nieodpowiednich wzorców dla wykreślenia krzywej kalibracyjnej (26)), bądź wreszcie z odmiennych własności fizykochemicznych łańcuchów pro $\alpha 1$ i pro $\alpha 2$ (szczególnie wysoka ruchliwość elektroforetyczna pro $\alpha 2$ może być przyczyną zaniżonych wyników oznaczania jego masy cząsteczkowej metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (21)).

Należy jeszcze wspomnieć, że szereg autorów stwierdzało istnienie rozpuszczalnych postaci kolagenu o masie cząsteczkowej większej niż masa łańcuchów pro α (19, 30, 31, 32, 33). Mogą to być dimery pro α (19, 30) lub ich większe agregaty (32). Trudno natomiast zgodzić się z poglądem (32), że prekursor kolagenu jest syntetyzowany i wydalany z komórki w postaci długiego łańcucha o masie cząsteczkowej około 500 000, z którego, po odpowiednim zwinięciu, zostają enzymatycznie odcięte peptydy o nietypowej dla kolagenu strukturze i sekwencji aminokwasowej. Z rozmiarów

polisomów syntetyzujących kolagen wynika bowiem (34), że mRNA łańcucha pro α jest monocystronowy i że koduje on pojedynczy łańcuch polipeptydowy o masie cząsteczkowej około 100 000 daltonów. Ponadto wykazano (2), że synteza łańcuchów pro $\alpha 1$ i pro $\alpha 2$ przebiegają równocześnie i że kontrolują ją odrębne geny. Wyniki te obalają koncepcję istnienia jednołańcuchowego prekursora kolagenu o bardzo dużej masie cząsteczkowej. Nie można jednak wykluczyć możliwości, że pierwotnie syntetyzowany prekursor ma cząsteczkę większą od tej, którą obecnie określa się jako prokolagen. Utrata pewnych sekwencji aminokwasowych następowalaby w trakcie izolowania właściwego prekursora na skutek ograniczonej proteolizy (26).

I-2. Skład aminokwasowy łańcuchów pro α ; występowanie i rola wiązań dwusiarczkowych

Poza stwierdzeniem, że fibroblasty w hodowli mogą syntetyzować „niezwykłą postać natywnego kolagenu” — rozpuszczalne białko zbudowane z łańcuchów polipeptydowych większych niż łańcuchy α — L a y m a n i wsp. (10) zaobserwowali jeszcze jeden ważny fakt. Zauważyli oni mianowicie, że działanie pepsyny w warunkach ograniczonej proteolizy, w których natywna struktura potrójnej spirali nie ulega uszkodzeniu, powoduje przemianę tego białka w prawidłowy kolagen o składzie $(\alpha 1)_2\alpha 2$. Podatność końcowego fragmentu prokolagenu na działanie pepsyny wskazywała, że fragment ten różni się swoją strukturą pierwszorzędową od struktury głównego heliksu makrocząsteczki tropokolagenu. Przypuszczano, że fragment ten nie zawiera regularnych trypletów Gli-X-Y występujących w helikalnej części tropokolagenu. Przypuszczenia te zostały potwierdzone doświadczalnie (18, 19, 21, 26). Z zachowania się łańcuchów pro α w czasie rozdziału na CM-celulozie wynikało, że mają one charakter bardziej kwaśny niż łańcuchy α , gdyż wymywają się odpowiednio przed $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (21). Oznaczenie składu aminokwasowego łańcuchów pro $\alpha 1$ i porównanie go ze składem α_1 wykazało istotnie w tym pierwszym wyższą zawartość kwasu asparaginowego i glutaminowego (18). Propeptydy zawierają też dużo seryny, są bogate w izoleucynę, histydynę i tyrozinę, natomiast ubogie w glicynę, alaninę i argininę. Prolina występuje w znikomych ilościach, a zupełnie brak hydroksyproliny. Wysoka zawartość aminokwasów polarnych w propeptydach może być jednym z powodów dobrej rozpuszczalności prokolagenu (33).

Stwierdzono również, że w prokolagencie występują dwa aminokwasy nieobecne w kolagencie śródmiąższowym kręgowców — tryptofan (6, 25, 26, 28) oraz cysteina (6, 13, 18, 19, 23, 27—29, 33, 35, 36, 37). Obecność tej ostatniej jest szczególnie ważna, gdyż wskazuje na możliwość tworzenia się międzyłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych. Stwierdzono istotnie (35), że po redukcji prokolagenu merkaptoetanołem i rozdziale na CM-ce-

lulozie otrzymuje się dwa szczyty białkowe w położeniu odpowiadającym pro $\alpha 1$ i pro $\alpha 2$. Jeżeli natomiast po redukcji przeprowadzano sączenie molekularne na agarozie w obecności siarczanu dodecyłu (28), uzyskiwano jeden szczyt białkowy w położeniu, w którym eluują się łańcuchy pro α . Jeśli nie przeprowadzono uprzedniej redukcji, to w czasie rozdzielania otrzymywano tylko jeden szczyt odpowiadający białku o masie cząsteczkowej 300 000—400 000 (28). Był to niewątpliwie prokolagen zbudowany z trzech kowalencyjnie związanych łańcuchów pro α , gdyż po redukcji zawartego w tym szczycie białka i powtórnej chromatografii stwierdzano jego ilościową przemianę w łańcuchy pro α .

Dalszych dowodów na istnienie międzyłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych w prokolagenie dostarczyły badania (19), w których wyizolowano z pożywki hodowli fibroblastów białko o własnościach kolagenu, lecz o masie cząsteczkowej 250 000 daltonów. Sączenie molekularne po przeprowadzeniu redukcji tego materiału wykazało, że jest to dimer pro α połączony wiązaniem dwusiarczkowym. W analogicznych doświadczeniach stwierdzono ponad (22), że obecny w pożywce trimer ma skład (pro $\alpha 1$)₂ pro $\alpha 2$, gdyż po redukcji komponenty te pojawiały się w stosunku 2:1.

Dalsze badania pozwoliły na zidentyfikowanie międzyłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych w nowopowstałym kolagenie kości zarodka kurzego (36, 37), diploidalnych fibroblastów ludzkich (13, 25), chrząstki (6), błony podstawnej soczewki (29) i ścięgna (38, 39) zarodków kurzych. Propeptydy prokolagenu chrząstki, który zbudowany jest z trzech identycznych łańcuchów pro $\alpha 1$ mają unikalny układ prążków w obrazie mikroskopowo-elektronowym, co świadczy o ich swoistej sekwencji aminokwasowej.

Z przytoczonych prac wynika, że we wszystkich typach łańcuchów pro α niezależnie od tkanki, z której je wyodrębniono, występują reszty cysteinowe. Wykazano również, że wszystkie nowopowstałe łańcuchy pro α z wyjątkiem łańcuchów prokolagenu błony podstawnej łączą się wkrótce po ukończeniu ich syntezy tworząc cząsteczkę o składzie (pro $\alpha 1$)₃ (prokolagen chrząstki) lub (pro $\alpha 1$)₂ pro $\alpha 2$ (pozostałe rodzaje prokolagenu), stabilizowaną mostkami dwusiarczkowymi (13, 16, 38, 39). Wiązania dwusiarczkowe pomiędzy łańcuchami prokolagenu interstycjalnego powstają jeszcze na szorstkim retikulum endoplazmatycznym, podczas gdy w prokolagenie błony podstawnej wiązania takie tworzą się tuż przed wydalaniem prekursorowej cząsteczki z komórki (29). Nie wiadomo dotąd, czy powstawanie wiązań dwusiarczkowych jest procesem enzymatycznym, czy też przebiega spontanicznie. W każdym razie według większości autorów poprzedza ono i ułatwia powstanie potrójnej spirali, a więc tej konformacji cząsteczki, która warunkuje wydzielanie prokolagenu z komórki z prawidłową szybkością (13, 16, 38, 39). Tylko w jednym przypadku (37) przypisywano wiązaniom dwusiarczkowym jedynie rolę czynnika porządkującego i stabilizującego już istniejącą prawidłową strukturę cząsteczki.

Nie zostało stwierdzone z całą pewnością, czy liczba reszt cysteinowych jest taka sama w pro α_1 i pro α_2 . Na ogół uważa się, że pro α_2 zawiera tylko jedną resztę cysteinową. Jest to jednak być może spowodowane faktem, że wiązania dwusiarczkowe łączące łańcuch pro α_2 z pozostałymi łańcuchami są położone bliżej aminowego końca cząsteczki, wskutek czego łatwiej ulegają proteolizie podczas ekstrakcji prokolagenu z tkanki (36). Nie jest również wykluczone, że reszty cysteinowe występujące w propeptydach są zaangażowane w tworzeniu mostków dwusiarczkowych z niekolagenowymi białkami (26).

I-3. Własności immunologiczne prokolagenu

Łańcuchy pro α zawierają około 7 reszt tyrozynowych, podczas gdy w łańcuchach α jest ich tylko 2 (18). Pozwala to przypuszczać, że prokolagen posiada swoiste determinanty antygenowe, których brak w kolagenie i że w porównaniu z tym ostatnim wykazuje większą immunogenność. Przypuszczenia te zostały potwierdzone w doświadczeniach (40), w których badano własności immunologiczne łańcucha pro α_1 oraz peptydu pro α_1 -CB1 i porównywano je z tego punktu widzenia z łańcuchami α_1 . Jak wiadomo, zasadnicze determinanty antygenowe kolagenu znajdują się na telopeptydach*, krótkich sekwencjach aminokwasowych położonych na aminowych i karboksylowych końcach cząsteczek i nie posiadających struktury spirali. Zasadniczy trzon cząsteczki jest bardzo słabym antygenem, a powtarzalność sekwencji aminokwasowych w tej części cząsteczki i ich podobieństwo w kolagenach rozmaitych tkanek różnych kręgowców jest przyczyną braku gatunkowej swoistości antygenowej.

Bogate w tyrozynę N-końcowe fragmenty peptydowe prokolagenu odpowiadają za aktywność antygenową tego białka. Stwierdzono (40), że przeciwciała występujące w surowicy przeciw łańcuchom pro α_1 są skierowane swoiście przeciw peptydom aminowych końców łańcuchów prokolagenu. Wykazano to czułymi badaniami radioimmunologicznymi (testem hamowania precypitacji oraz testem podwójnej dyfuzji). Okazało się, że taka surowica daje linie precypitacyjne nie tylko z łańcuchami pro α_1 , lecz również z peptydami pro α_1 -CB1 oraz pro α_1 -CB1-Koll1 (peptydem otrzymanym z pro α_1 -CB1 przez trawienie kolagenazą i zawierającym resztę cysteinową), natomiast nie reaguje z łańcuchami α_1 . Wyniki te świadczą, że reakcji nie wywołują przeciwciała skierowane przeciw determinantom umiejscowionym na części łańcucha wspólnej dla pro α_1 i α_1 . Fakt ten będzie można wykorzystać dla śledzenia przy pomocy znakowanych przeciwciał zmian wewnątrzkomórkowej lokalizacji prokolagenu podczas procesu biosyntezy oraz dla ilościowego oznaczania prokolagenu w obecności kolagenu. Stwierdzono również (41), że przeciwciała skiero-

* nazwa obecnie wychodząca z użycia.

wane przeciw prokolagenowi nie dają linii precypitacyjnych ani z dime-rem pro $\alpha 1$ (przypuszczalnie na skutek niedostępności zasadniczych determinant antygenowych), ani z łańcuchami pozbawionymi w znacznej części propeptydowych przedłużeń.

Badania własności immunochemicznych kolagenu ze skóry bydła chorego na dermatosparaktozę (kolagen ten, najprawdopodobniej identyczny z prokolagenem, zostanie omówiony w rozdziale V) wykazały (42), że i w tym przypadku aktywność serologiczna zlokalizowana jest na N-końcowym peptydzie o masie cząsteczkowej około 20 000. Redukcja w połączeniu z alkilacją całkowicie znosi czynność antygenową tego peptydu, co wskazuje na istotną rolę jego konformacji dla własności immunologicznych cząsteczki. Natomiast trawienie kolagenazą lub ograniczona proteoliza trypsyną względnie chymotrypsyną nie powoduje utraty aktywności, gdyż w tych warunkach zasadnicze determinanty antygenowe nie ulegają zniszczeniu pozostając na odtrawionym w całości propeptydzie.

Badania własności antygenowych kolagenu dermatosparaktycznego wykazało również, że jego podjednostki, które odpowiadałyby łańcuchom pro $\alpha 1$ i pro $\alpha 2$ mają zbliżoną, lecz nie identyczną strukturę antygenową. Sugerowałoby to, że skład i budowa chemiczna propeptydów występujących w tych łańcuchach różnią się od siebie.

II. Przemiana prokolagenu w tropokolagen; peptydaza prokolagenowa

Przypuszczenie, że przemiana prokolagenu po wydzieleniu go z komórki ma charakter enzymatyczny (10), znalazło potwierdzenie w pracach szeregu autorów (4, 12, 23, 28, 31, 35, 36, 37, 39), którzy w doświadczeniach symulujących przebieg tego procesu *in vivo* stwierdzili, że pod wpływem nieswoistych proteaz takich jak pepsyna czy chymotrypsyna prokolagen ulega przekształceniu w tropokolagen. Wydawało się jednak prawdopodobne, że reakcję odszczepiania propeptydów katalizuje swoista peptydaza, czynna w środowisku obojętnym i wytwarzana *in situ* w tkankach, w których zachodzi biosynteza kolagenu. Istnienia takiego enzymu dowiodły prace (43) prowadzone na kolagenie z tkanek bydła chorego na dermatosparaktozę. Ta jednostka chorobowa, która zostanie szerzej omówiona w rozdziale dotyczącym zaburzeń przemiany kolagenu, jest wrodzonym błędem metabolicznym polegającym na całkowitym braku w skórze chorych zwierząt aktywności swoistej peptydazy nazwanej peptydazą prokolagenową. Minimalną czynność tego enzymu stwierdzono w ścieganie, płucu, chrząstce i aorcie chorego bydła, a więc w tych tkankach, w których normalnie się go wykrywa. Czynność peptydazy prokolagenowej występuje niezależnie od obecnej w wyciągach tkankowych aktywności kolageno- i kazeinolitycznej. Otrzymany po raz pierwszy z tkanek (przede wszystkim ze skóry) zdrowego bydła (43) enzym ten jest

obojętną proteazą o optimum pH 7,0—7,5. Jest on nieodwracalnie hamowany w pH poniżej 5,0, a odwracalnie — przez EDTA i merkaptoetanol. Późniejsze prace (44) wykazały, że peptydaza prokolagenowa jest również częściowo hamowana przez glutation, benzoesan p-hydroksyrteńciovoy oraz Mn^{2+} i Mg^{2+} .

Wykazano również obecność peptydazy prokolagenowej w tkankach innych kręgowców (20, 45) a enzym ze ścięgien cieląt został oczyszczony (44). Stwierdzono, że surowica hamuje aktywność peptydazy, że enzym nie powoduje rozerwania wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych w kolagenie oraz że enzymatyczna przemiana prokolagenu w tropokolagen zachodzi niezależnie od tego, czy biosynteza białka jest zahamowana, czy nie (20). Badania nad wytwarzaniem i wydzielaniem peptydazy prokolagenowej przez fibroblasty w hodowli (45) wykazały ponadto, że czynność peptydazowa występuje prawie wyłącznie w pożywce, w której pojawia się dopiero pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu komórek, być może na skutek aktywacji zymogenowej postaci enzymu syntetyzowanej w okresie szybkiej proliferacji komórkowej. W komórkach wytwarzających prokolagen nie stwierdzano obecności peptydazy (13, 46), co może tłumaczyć brak wewnątrzkomórkowej konwersji prokolagenu. Uważa się (45), że w tkankach prekursor ulega szybkiej przemianie w tropokolagen i że wykrycie go w pożywce jest możliwe jedynie dzięki temu, że proces ten jest znacznie wolniejszy *in vitro* z powodu dyfuzji i rozcieńczenia enzymu w dużej objętości pożywki. Jednakże i w tych warunkach znajdowano w pożywce (19, 22) oprócz białek odpowiadających dimerom i trimerom pro α cząsteczki monomeru mniej lub bardziej skrócone z N-końca i nie posiadające już mostków dwusiarczkowych. Wyniki te wskazują, że pozakomórkowo zachodzi stopniowe odszczepienie dodatkowych sekwencji aminokwasowych, z których utworzone są propeptydy. Mogą tu działać oprócz peptydazy prokolagenowej jeszcze inne niezidentyfikowane dotąd proteazy, gdyż stwierdzono (44), że oczyszczona peptydaza, wysoce swoista dla natywnego prokolagenu, odcina propeptydy w całości. W każdym razie mechanizm przemiany prokolagenu w tropokolagen nie jest całkowicie wyjaśniony i szereg autorów (13, 19, 22, 36, 47) uważa, że jest to proces co najmniej dwuetapowy.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu do decylu wykazała, że oczyszczony preparat peptydazy prokolagenowej nie jest jednorodny, lecz że występują w nim dwa rodzaje cząsteczek (przypuszczalnie monomer i dimer) o masie cząsteczkowej odpowiednio 70 000 i 140 000. Obie postacie są czynne katalitycznie i nie zdołano stwierdzić różnic w ich swoistości substratowej (44).

Wrażliwość enzymu na pH środowiska pozwoliła zrozumieć, dlaczego przez ekstrakcję tkanek kwaśnymi roztworami uzyskiwano prokolagen, podczas gdy w wyciągach obojętnych wykrywano jedynie tropokolagen: ekstrahująca się jednocześnie z tkanek peptydaza prokolagenowa katalizuje

lizowała bowiem w obojętnym środowisku przemianę postaci prekursorowej w tropokolagen, natomiast w pH niższym niż 5,0 ulegała nieodwracalnemu zahamowaniu.

Częściowo odmienny pogląd na mechanizm przemiany prokolagenu w tropokolagen, reprezentowany przez grupę Veisa, zostanie omówiony w rozdziale IV.

III. Własności prokolagenu uniemożliwiające wewnątrzkomórkowe tworzenie się włókien

W poprzednich rozdziałach omówiono rolę propeptydów jako czynnika ułatwiającego właściwe ustawienie się łańcuchów pro α względem siebie i tym samym przyspieszającego tworzenie się cząsteczki o natywnej konformacji potrójnej spirali. Wspomniano również o roli prokolagenu jako rozpuszczalnej postaci, w której powstałe w komórce białko jest wydzielane do środowiska pozakomórkowego. Pozostają jeszcze do omówienia własności prokolagenu uniemożliwiające wewnątrzkomórkową fibrylogenezę. Powstanie włókien z prokolagenu jest niemożliwe, jak się wydaje, wskutek istnienia sterycznej przeszkody, jaką około 200-amino-kwasowe propeptydy stanowią dla ustawienia cząsteczek w konfiguracji *quarter-stagger*. (przesunięcie o 1/4 długości) (48). Być może odgrywa tu rolę również fakt większej elektroujemności prokolagenu w porównaniu z tropokolagenem (48). Istnieje tu wyraźna analogia do fibrynogenu, rozpuszczalnego prekursora fibryny, której włókna tworzą się dopiero po odtrawieniu przez trombinę fibrynopeptydów z aminowego końca łańcuchów fibrynogenu.

Odpowiedź na pytanie, dlaczego prokolagen nie jest zdolny do agregacji w normalne włókna o uporządkowanej strukturze stanowią badania (49) nad wpływem propeptydów na tworzenie się międzycząsteczkowych wiązań poprzecznych. Ponieważ zahamowanie powstawania takich wiązań jest przyczyną powstawania nieprawidłowych włókien kolagenowych w latyryzmie, można było przypuszczać, że tworzenie się międzycząsteczkowych wiązań pomiędzy molekułami prokolagenu jest również upośledzone. W badaniach włókien kolagenu dermatosparaktycznego stwierdzono istotnie, że wiązania aldiminowe (typu zasady Schiffa) występują w nich w znacznie zmniejszonej liczbie. Powstawanie natomiast wiązań wewnątrzcząsteczkowych typu aldolowego (produkt kondensacji dwóch reszt δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego) nie ulega zakłóceniu (50). Fakty te świadczą o tym, że niewłaściwe ustawienie przestrzenne prekursorów wewnątrzcząsteczkowych wiązań aldolowych w stosunku do grup aminowych lub innych reaktywnych reszt w łańcuchach sąsiednich cząsteczek hamuje powstawanie międzycząsteczkowych wiązań krzyżowych i jest przyczyną tworzenia się nieregularnych, wstążkowatych włókien. O tym, że istotnie obecność propeptydów jest przyczyną zaburzeń w strukturze

włókien świadczy fakt, że po inkubacji prokolagenu z peptydazą prokolagenową obraz odtworzonych włókien obserwowany w mikroskopie elektronowym jest prawidłowy. Ponadto analiza takich włókien po redukcji trytowanym borowodorkiem sodu wskazuje na prawidłowy pod względem ilościowym i jakościowym skład wiązań poprzecznych.

IV. „Ciężki tropokolagen” — bezpośredni prekursor tropokolagenu?

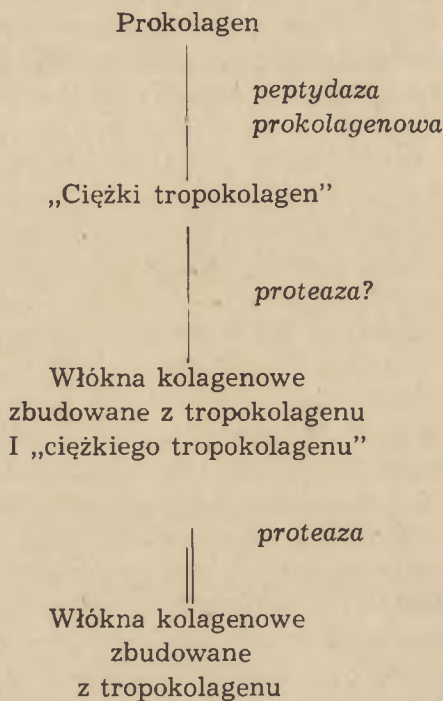
Hipoteza Speakmana dotyczyła przede wszystkim roli N-końcowych propeptydów w powstawaniu cząsteczki prokolagenu i tropokolagenu, natomiast zjawisko tworzenia się włókien zostało w niej potraktowane pobieżnie. Przepuszczalny mechanizm tego procesu został zaproponowany później przez grupę Veisa (51, 52, 53) na podstawie obserwacji, że w skórze dorosłego bydła i szczurów obecny jest rozpuszczalny w kwasach kolagen, zbudowany z łańcuchów o masie cząsteczkowej około 110 000 daltonów. Łańcuchy te nazwano $(\alpha)_h$ w odróżnieniu od występujących równolegle łańcuchów $(\alpha)_l$, które są identyczne z normalnymi łańcuchami α^* . „Ciężkie” łańcuchy różnią się w istotny sposób od normalnych składem aminokwasowym: zawierają więcej tyrozyny, histydyny i seryny, a mniej proliny, hydroksyproliny i metioniny; natomiast podobnie jak w normalnych łańcuchach nie występuje w nich cysteina. Kolagen zbudowany z ciężkich łańcuchów *in vitro* łatwo renaturuje i tworzy włókna typu natywnego. W warunkach, w których normalny tropokolagen tworzy agregaty monomerycznych cząsteczek spolimeryzowane „bok do boku”, czyli tak zwane postaci SLS, z „ciężkiego tropokolagenu” powstają cienkie nitkowate struktury wskazujące na to, że agregacja zachodzi sposobem „koniec do końca”. Niewielka liczba utworzonych postaci SLS posiada dodatkowe odcinki o długości około 170Å położone na aminowym końcu agregatów. Wydaje się, że dodatkowe odcinki peptydowe pomagają w odpowiednim ustawieniu monomerycznych cząsteczek w mikrofibryle charakterystyczne dla włókien natywnego kolagenu (53).

Znakowanie impulsowe *in vivo* wykazało, że łańcuchy $(\alpha)_h$ są prekursorami łańcuchów $(\alpha)_l$ (51). W odróżnieniu od łańcuchów pro α „ciężkie” łańcuchy można wykrywać nie tylko metodami izotopowymi, lecz również zwykłymi metodami chromatograficznymi, co świadczy o wolnym i niezpełnym przejściu $(\alpha)_h$ w $(\alpha)_l$. Fakt, że „ciężkie” łańcuchy są dużo mniejsze od pro α sugeruje, że zbudowany z nich „ciężki tropokolagen” jest związkiem pośrednim pomiędzy prokolagenem i tropokolagenem (51). Występujące w $(\alpha)_h$ dodatkowe odcinki peptydowe spełniałyby więc podobną rolę w fibrylogenezie, jak propeptydy w powstawaniu cząsteczki prokolagenu: miałyby one ułatwić prawidłowe ustawienie się monomerycznych

* h oznacza *heavy* — „ciężki”, l — *light* — „lekki”.

cząsteczek względem siebie umożliwiając szybsze powstanie mikrofibryli i ich następną agregację we włókna. Wiązaniemi stabilizującymi agregaty są przypuszczalnie wiązania typu zasady Schiffa, gdyż ulegają one rozerwaniu pod wpływem podwyższonej temperatury lub pod działaniem moczniaka (52).

Proces przemiany prokolagenu w tropokolagen według koncepcji grupy Veisa przebiega zatem w następujący sposób (Schemat 2):



Schemat 2. Przebieg przemiany prokolagenu w tropokolagen wg Veisa i wsp. (51).

„Długo żyjący” ciężki tropokolagen, powstały z prokolagenu w przestrzeni międzykomórkowej w reakcji katalizowanej przez peptydazę prokolagenową, jest następnie wbudowywany do nierozpuszczalnych włókien, a odszczepienie zbędnych sekwencji aminokwasowych łańcuchów $(\alpha)_n$ następuje podczas lub po utworzeniu się włókien (51).

V. Zaburzenia przemiany prokolagenu w tropokolagen

Prawidłowy przebieg przemiany postaci prekursorowej w tropokolagen prowadzi do powstawania i odkładania się w przestrzeni międzykomórkowej normalnych włókien kolagenowych. Pierwszym przykładem występowania *in vivo* zaburzeń procesu przemiany prokolagenu było scho-

zenie tkanki łącznej, stwierdzone u niektórych sztuk bydła pochodzącego z chowu wsobnego i charakteryzujące się ogromną podatnością skóry na rozerwania (54); stąd nazwa tego schorzenia — dermatosparaktoza. Choroba ta, przenoszona dziedzicznie charakteryzuje się występowaniem w tkankach, a zwłaszcza w skórze, kolagenu niezdolnego do tworzenia normalnych włókien (48, 49, 55), a zbudowanego z łańcuchów o większej masie cząsteczkowej niż masa łańcuchów α (56). Łańcuchy te nazwano $p-\alpha 1$ i $p-\alpha 2$. Dokładniejsze badania obejmujące oznaczenie składu aminokwasowego tych łańcuchów, ich zachowanie się podczas rozdziału na żywicach jonowymiennych i podczas sączenia molekularnego, przebieg polimeryzacji i depolimeryzacji cieplnej kolagenu dermatosparaktycznego i elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazały, że łańcuchy $p-\alpha 1$ i $p-\alpha 2$ są identyczne lub różnią się tylko nieznacznie od łańcuchów pro $\alpha 1$ i pro $\alpha 2$ (56). Oznaczałoby to, że zaburzenie nie dotyczy syntezy łańcuchów, lecz występuje ono na etapie konwersji, a zatem jest skutkiem defektu enzymatycznego. Istotnie, jak stwierdzono następnie (43), tkanki chorego bydła nie produkują wcale peptydazy prokolagenowej, lub produkują tylko jej znikome ilości, co powoduje nagromadzenie się prokolagenu.

Kolagen dermatosparaktyczny *in vitro* polimeryzuje, lecz wolniej i w mniejszym stopniu, a utworzone żele są mniej trwałe od normalnych (56). Nieprawidłowa polimeryzacja i depolimeryzacja oraz fakt, że wydajność otrzymanego kolagenu dermatosparaktycznego jest niższa podczas ekstrakcji niż normalnego kolagenu może wynikać z nadmiernej zawartości mukopolisacharydów w skórze chorego bydła (57). Obecność prawidłowego kolagenu w tkankach dermatosparaktycznego bydła tłumaczy się wolnym działaniem nieswoistych proteaz na postać prekursorową (56).

W hodowli wyselekcjonowanej linii komórkowej fibroblastów CD ze skóry chorego bydła stwierdzono obecność nawet dwóch różnych typów prokolagenu (47). Wynikałoby stąd, że komórki te mogą równocześnie produkować prokolagen o cząsteczce złożonej z trzech identycznych łańcuchów pro $\alpha 1$, oraz białko o składzie (pro $\alpha 1$)₂ pro $\alpha 2$. Po redukcji ditiotritolem w pożywce stwierdzono również obecność większych polipeptydów o masie cząsteczkowej około 150 000. Sądzi się (47), że są to wcześniejsze od pro α łańcuchy prekursorowe. Całkowity brak w pożywce łańcuchów α świadczy o tym, że fibroblasty CD, podobnie jak fibroblasty ludzkie L-929 (46) i pozbawione macierzy komórki embrionalnego ściegna (23), nie produkują peptydazy prokolagenowej.

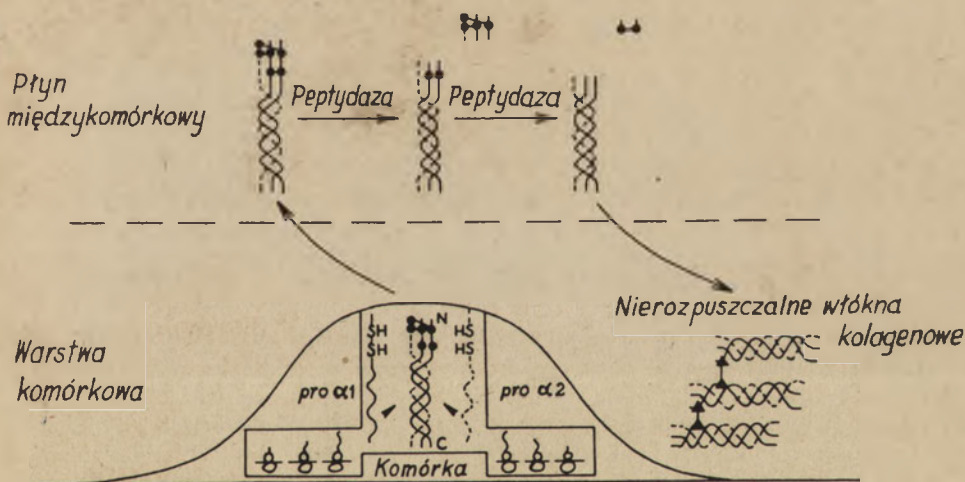
Schorzenia tkanki łącznej wywołane niską czynnością, lub całkowitym brakiem czynności peptydazy prokolagenowej stwierdzono nie tylko u bydła i owiec (58) lecz i u ludzi. Zaobserwowano mianowicie (58) obecność prokolagenu w wyciągach ze skóry i ściegna chorych na pewną postać zespołu Ehlersa-Danlosa (typ VII). Choroba ta objawia się nadmierną ru-

chliwością stawów połączoną ze skłonnością do zwichnięć (zwłaszcza stawów biodrowych) oraz rozciągliwością i wyjątkową miękkością skóry. Choroba ta jest dziedziczna. Wyniki badań świadczą (58), że przyczyną nagromadzenia się prokolagenu w tkankach jest zaburzenie jego przemiany w kolagen, w konsekwencji 6—10-krotnie obniżonej aktywności peptydazy prokolagenowej. Ponieważ jednocześnie stwierdzono zwiększenie szybkości syntezy białek kolagenowych, sądzi się (58), że dodatkową funkcją propeptydów, już po ich odszczepieniu przez peptydazę, może być regulacja procesu biosyntezy łańcuchów prokolagenu.

VI. Uwagi końcowe

Zgromadzone dotychczas wiadomości na temat prokolagenu pozwalają w zasadzie na wyjaśnienie procesu powstawania monomerycznych cząsteczek tropokolagenowych oraz ich polimeryzację we włókna. Schemat 3 ilustruje poglądy większości autorów na przebieg tych procesów. Potwier-

Rozpuszczalny prokolagen



Schemat 3. Wewnątrzkomórkowa biosynteza prokolagenu i jego pozakomórkowa przemiana w tropokolagen oraz dalsza agregacja we włókna wg Goldberga i Sherra (13).

dzenie przedstawionej kolejności wydarzeń uzyskano badając metodą autoradiografii biosyntezę kolagenu w odontoblastach (59). Metoda ta pozwoliła również na zlokalizowanie poszczególnych etapów wewnątrzkomórkowej biosyntezy prokolagenu i pozakomórkowej polimeryzacji włókien kolagenowych, jednakże to zagadnienie, omówione szczegółowo w oddzielnym artykule (60), zostało tutaj pominięte.

Mimo że zasadnicza rola propeptydów w tworzeniu się cząsteczek tropokolagenu i ich agregacji we włókna nie ulega obecnie wątpliwości, istnieje nadal kilka kwestii wymagających ostatecznego wyjaśnienia. Należą do nich między innymi: wielkość pierwotnego łańcucha prekursorowego, mechanizm powstawania wiązań dwusiarczkowych oraz mechanizm enzymatycznej degradacji prokolagenu do tropokolagenu. Nie jest wykluczone, że szybkość i droga przemiany prekursora *in vivo* w różnych tkankach jest nieidentyczna, co może być związane z różnym poziomem aktywności peptydazy prokolagenowej. W stanach patologicznych, gdy czynność tego enzymu jest bardzo niska lub niewykrywalna, nagromadzenie się postaci prekursorowej w tkance pociąga za sobą zmiany jej mechanicznych właściwości dając w efekcie wyraźne objawy chorobowe.

Artykuł nadszedł 4.6.1974, po rewizji autorskiej otrzymano 5.9.1974.

PIŚMIENICTWO

1. Beier G., Engel J., (1966), *Biochemistry*, **5**, 2744—2755.
2. Vuust J., Piez K. A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6201—6207.
3. Vuust J., Piez K. A., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 856—862.
4. Bellamy G., Bornstein P., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1138—1142.
5. Grant M. E., Kefalides N. A., Prockop D. J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3539—3544.
6. Dehm P., Prockop D. J., (1973) *Eur. J. Biochem.*, **35**, 159—166.
7. Schmitt O. F., (1960), *Bull. N.Y. Acad. Med.*, **36**, 725—749.
8. Fessler J. H., Smith L. A., (1970) w *Chemistry and Molecular Biology of Intracellular Matrix*, red. Balazs E. A., t. 1, str. 457—463, Academic Press, London.
9. Layman D. L., McGoodwin E. B., Martin G. R., (1970), *Fed. Proc.*, **29**, 668.
10. Layman D. L., McGoodwin E. B., Martin G. R., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 454—458.
11. Speakman P. T., (1971), *Nature*, **229**, 241—243.
12. Jimenez S. A., Dehm P., Prockop D. J., (1971), *FEBS Letters*, **17**, 245—248.
13. Goldberg B., Sherr Ch. J., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 361—365.
14. Dehm P., Prockop D. J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 358—369.
15. Müller P. K., McGoodwin E. B., Martin G. R., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 110—117.
16. Jimenez S. A., Dehm P., Olsen B. R., Prockop D. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 720—729.
17. Uitto J., Prockop D. J., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **43**, 221—230.
18. Bornstein P., von der Mark K., Wyke A. W., Ehrlich H. P., Monson J. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2808—2813.
19. Smith B. D., Byers P. H., Martin G. R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3260—3262.
20. Bornstein P., Ehrlich H. P., Wyke A. W., (1972), *Science*, **175**, 544—546.
21. Ehrlich H. P., Bornstein P., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1750—1756.

22. Goldberg B., Epstein E. H., Sherr Ch. J., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3655—3659.
23. Uitto J., Jimenez S. A., Dehm P., Prockop D. J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 198—205.
24. Grant M. E., Kefalides N. A., Prockop D. J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3545—3551.
25. Sherr Ch. J., Taubman M. B., Goldberg B., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7033—7038.
26. von der Mark K., Bornstein P., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2285—2289.
27. Pontz B. F., Müller P. K., Meigel W. N., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7558—7564.
28. Dehm P., Jimenez S. A., Olsen B. R., Prockop D. J., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 60—64.
29. Grant M. E., Schofield J. D., Kefalides N. A., Prockop D. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7432—7437.
30. Ramaley P. B., Rosenbloom J., (1971) *FEBS Letters*, **15**, 59—64.
31. Church R. L., Tanzer M. L., Pfeiffer S. E., (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1943—1946.
32. Church R. L., Pfeiffer S. E., Tanzer M. L., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2638—2642.
33. Tsai R. L., Green H., (1972), *Nature. New Biology*, **237**, 171—175.
34. Lazarides E., Lukens L. N., (1971), *Nature, New Biology* **232**, 37—40.
35. Burgeson R. E., Wyke A. W., Fessler J. H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 892—897.
36. Monson J. M., Bornstein P., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3521—3525.
37. Fessler J. H., Burgeson R. E., Morris N. P., Fessler J. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2993—2996.
38. Harwood R., Grant M. E., Jackson D. S., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1188—1196.
39. Uitto J., Prockop D. J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 904—911.
40. von der Mark K., Chick E. M., Bornstein P., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 356—364.
41. Sherr Ch. J., Goldberg B., (1973), *Science*, **180**, 1190—1191.
42. Timpl R., Wick G., Furthmayr H., Lapière Ch. M., Kühn K., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **32**, 584—591.
43. Lapière Ch. M., Lenaers A., Kohn L. D., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 3054—3058.
44. Kohn L. D., Isersky Ch., Zupnik J., Lenaers A., Lee G., Lapière Ch. M., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 40—44.
45. Layman D. L., Ross R., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**, 451—456.
46. Kerwar S. S., Cardinale G. J., Kohn L. D., Spears C. L., Stassen F. L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1378—1382.
47. Church R. L., Tanzer M. L., Lapière Ch. M., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 188—190.
48. Stark M., Lenaers A., Lapière Ch. M., Kühn K., (1971), *FEBS Letters*, **18**, 225—227.
49. Bailey A. J., Lapière Ch. M., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 91—96.
50. Tanzer M. L., (1973), *Science*, **180**, 561—566.
51. Veis A., Anesey J. R., Garvin J. E., Dimuzio M. T., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1404—1411.

52. Clark C. C., Veis A., (1972), *Biochemistry*, **11**, 494—502.
53. Veis A., Anesey J., Yuan L., Levy S. J., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1464—1467.
54. Hanset R., Ansay M., (1967), *Ann. Méd. Vét.*, **7**, 451—472.
55. O'Hara P. J., Read W. K., Romane W. M., Bridges C. H., (1970), *Lab. Invest.*, **23**, 307—314.
56. Lenaers A., Ansay M., Nusgens B. V., Lapière Ch. M., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 533—543.
57. Winand R. J., Nusgens B., (1971), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 14.
58. Lichtenstein J. R., Martin G. R., Kohn L. D., Byers P. H., McKusick V. A., (1973), *Science*, **182**, 298—300.
59. Weinstock M., Leblond C. P., (1974), *J. Cell Biol.*, **60**, 92—127.
60. Bańkowski E., Gałasiński W., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 481—502.

ANDRZEJ SAWARYN *

Znaczniki spinowe i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych

Spin—Labels and their Application in Biochemical Investigation

W ostatnich latach do badań makrocząsteczkowych i struktur komórkowych została wprowadzona nowa technika znaczników spinowych. W roku 1965 Ohnishi i McConnell (1) po raz pierwszy przyłączyli do makrocząsteczki stabilny rodnik syntetyczny w celu otrzymania informacji o strukturze tej makrocząsteczki. Od tego czasu obserwuje się coraz szerszy rozwój zastosowań techniki znaczników spinowych szczególnie w badaniach struktury białek i błon.

Technika znaczników spinowych opiera się na zjawisku elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), które zostało odkryte stosunkowo niedawno, bo w roku 1945 przez Zawojskiego (2). Sam elektronowy rezonans paramagnetyczny znalazł liczne zastosowanie w badaniach biochemicznych wszędzie tam gdzie mamy do czynienia z substancjami paramagnetycznymi. Przede wszystkim elektronowy rezonans paramagnetyczny zastosowano do badania procesów, w których jako metabolity pośrednie występują rodniki krótkożyjące (fotosynteza) lub stosunkowo długożyjące (kancerogeneza). Na podstawie widma EPR można wnioskować o typie substancji uczestniczących w tych procesach, jak również badać kinetykę procesu (3, 4). Rrodniki krótkożyjące mogą być też indukowane sztucznie przez naświetlanie substancji promieniami X lub UV. Kinetyka zaniku takich rodników zależy od zawartości struktur helikalnych w makrocząsteczce (5). Elektronowy rezonans paramagnetyczny zastosowano również do badania makrocząsteczek zawierających w swej strukturze metale paramagnetyczne — np. hemoglobina (6), czy też makrocząsteczek łatwo kompleksujących z metalami paramagnetycznymi — na przykład DNA (7). Technika znaczników spinowych stanowi dalsze, bardziej wyszukane, zastosowanie elektronowego rezonansu paramagnetycznego w badaniach biochemicznych, które pojawiło się z chwilą zsyntetyzowania

*Dr, Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Chałubińskiego 4, 50—368 Wrocław.

Stosowane skróty:

EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny; DNP — dwunitrofenyl.

stabilnych rodników. W technice tej stabilne syntetyczne rodniki, zwane znacznikami spinowymi, przyłącza się do makrocząsteczki. Dzięki właściwościom paramagnetycznym znacznika spinowego badana cząsteczka daje charakterystyczne widmo EPR. Kształt i położenie widma znacznika spinowego silnie zależy od jego najbliższego otoczenia. Jeżeli makrocząsteczka nie podlega żadnym procesom (badania statyczne) to na podstawie widma EPR można określić kształt, dostępność i hydrofobowość mikrootoczenia w miejscu przyłączenia znacznika spinowego. Jeżeli natomiast makrocząsteczka znacznika spinowego podlega jakimś procesom (badania dynamiczne) to na podstawie widma EPR możliwe jest badanie kinetyki tego procesu oraz efektów transglobularnych, to jest zmian jakie zachodzą w wyniku tego procesu w różnych fragmentach makrocząsteczki.

Technika znaczników spinowych posiada przede wszystkim dwie korzystne cechy. Pozwala badać strukturę fragmentów makrocząsteczki (mikrośrodowisko) oraz lokalne zmiany konformacyjne niezależnie od struktury reszty cząsteczki. Dotychczasowe metody pozwalały jedynie na badanie struktury całości makrocząsteczki i obserwowanie sumarycznych zmian konformacyjnych. Drugą korzystną cechą jest możliwość badania próbek w dowolnej postaci: proszków, cieczy, roztworów przejrzystych lub też silnie mętnych itp., co w innych metodach stanowiło poważną przeszkodę. Godny uwagi jest również brak interferencji innych substancji. Nieparamagnetyczne składniki roztworu nie mają bezpośredniego wpływu na obserwowane widmo próbki ponieważ nie dają własnego widma EPR. Znacznik spinowy ma charakter specyficznej grupy reporterowej podobnie jak znaczniki fluorescencyjne czy radioaktywne. Widma EPR otrzymuje się przy pomocy radiospektrometrów elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Czulość współczesnych radiospektrometrów pozwala wykryć do 10^{-13} mola znacznika na próbkę. Praktycznie badania prowadzi się przy stężeniach 10^{-10} mola znacznika na próbkę, a dla silnie unieruchomionych znaczników należy stosować stężenia rzędu 10^{-6} mola znacznika na próbkę. Technika ta zatem jest bardzo czuła i ustępuje jedynie technikom fluorescencyjnym.

Technika znaczników spinowych posiada również pewne wady. Jak większość technik wykorzystujących wprowadzanie znaczników powstaje problem zaburzeń struktury spowodowanych obecnością znacznika. Przyłączenie rodnika jednak następuje na ogół poprzez odcinek łańcucha węglowego o różnej długości i dość znacznej swobodzie rotacji, znacznik zatem nie musi wywoływać zmian istniejącej struktury a sam raczej ustawia się w najkorzystniejszy sposób. Nie bez znaczenia jest tu również jego obojętny charakter. W badaniach błon biologicznych stwierdzono również, że spinowa pochodna stearynianu (12-doksylostearynian) jest biosyntetycznie włączana w strukturę tak, jak normalny stearynian (8). Można zatem sądzić, że znaczniki spinowe nie wprowadzają żadnych zmian w strukturze do której są przyłączane albo zmiany te są niewielkie.

Istotny problem stanowi też reaktywność znaczników spinowych. Uważane są one za stabilne i niereaktywne (dzięki ugrupowaniu czterometrylowemu). Jednakże w próbach biologicznych obserwuje się czasami zanik widma (9). Szerokie zastosowanie znaczników spinowych w badaniach biochemicznych wskazuje jednak na duże znaczenie informacji uzyskiwanych tą techniką. Niewiele, jak dotąd, opublikowano prac przeglądowych dotyczących techniki znaczników spinowych. Ogólny przegląd tej techniki stanowi praca McConnella i McFarland (10). Obszerna monografia Jost i wsp. (9) omawia zastosowania znaczników spinowych w badaniach błon. Celem niniejszego przeglądu jest przedstawienie podstaw zjawiska elektronowego rezonansu paramagnetycznego, metod analizy widm stosowanych w badaniach biochemicznych oraz zilustrowanie najważniejszych zastosowań tej techniki.

I. Podstawy elektronowego rezonansu paramagnetycznego

I-1. Ogólny opis

Opis zjawiska EPR można znaleźć w prawie każdym podręczniku metod fizyko-chemicznych. Dostępne są też liczne, specjalistyczne monografie na różnym poziomie zaawansowania (11, 12, 13). Obszerny rozdział dotyczący EPR znajduje się w książce Stankowskiego i Graji (14). Niniejszy rozdział jest krótkim wprowadzeniem w zagadnienia elektronowego rezonansu paramagnetycznego.

Dla pełnego kwantowo-mechanicznego opisu elektronu potrzebna jest wielkość zwana spinem, nie posiadająca żadnego odpowiednika w mechanice klasycznej. Składowa spinu wzdłuż osi z ze względu na wartości własne spinu elektronu może przyjmować wartości $M_s = \pm 1/2$. Z liczbą kwantową M_s związany jest moment magnetyczny elektronu μ_E , którego składowa z może przyjmować dwie wartości zgodnie ze wzorem

$$\mu_E^z = -M g \beta$$

gdzie g — współczynnik rozszczepienia spektroskopowego

β — magneton Bohra

Przy braku zewnętrznego pola magnetycznego oba stany spinowe są zwyrodniałe, to znaczy posiadają jednakową energię. Po nałożeniu pola magnetycznego H zwyrodnienie znika (zjawisko Zeemana) a różnica między energetycznymi poziomami obu stanów spinowych wynosi:

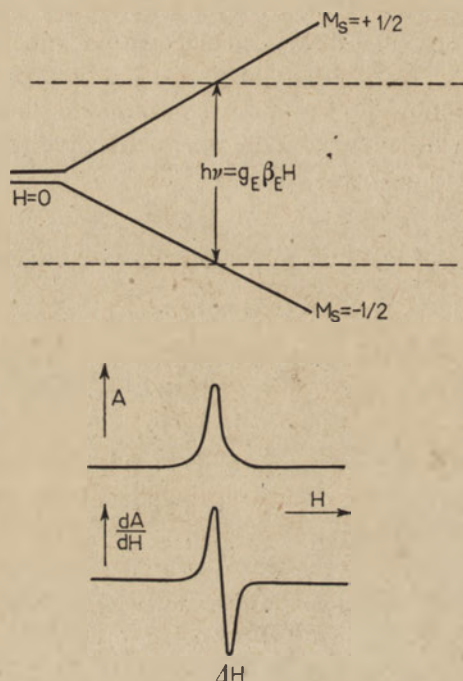
$$[1] \quad E_2 - E_1 = g \beta H$$

Przejścia z jednego poziomu zeemanowskiego na drugi następują wtedy gdy układ poddawany jest działaniu pola elektromagnetycznego o częstotliwości rezonansowej ν . Częstotliwość ta wynika z warunku rezonansu:

$$[2] \quad h \nu = g \beta H$$

gdzie h — stała Plancka

W celu spełnienia warunku rezonansu można zmieniać zarówno częstotliwość ν jak i natężenie pola H . Z przyczyn technicznych w większości spektrometrów EPR częstotliwość ν utrzymuje się stałą a zmienia natężenie pola magnetycznego H . Zwykle wykorzystuje się mikrofałe o częstotliwości 9,5 GHz (pasmo X), przy którym niezbędne jest pole magnetyczne o natężeniu 3400 G, ponieważ współczynnik g przyjmuje wtedy wartość bliską 2.



Ryc. 1. Rozszczepienie poziomów spinowych elektronu w zewnętrznym polu magnetycznym H oraz pochłanianie energii zmiennego pola elektromagnetycznego $h\nu$. Poniżej krzywe absorpcyjna i jej pierwsza pochodna obserwowane przy spełnieniu warunków rezonansu $h\nu = g\beta H$

Na rycinie 1 pokazano krzywą absorpcyjną oraz pierwszą pochodną tej krzywej. Ta ostatnia jest formą zapisu spotykaną w większości spektrometrów a wynikającą z modulacji pola magnetycznego, zastosowanej dla późniejszego wzmocnienia sygnału pochłaniania. Szerokość linii ΔH określa się jako odległość między ekstremami takiej krzywej wyrażoną w gausach.

I-2. Zjawiska relaksacji

Prawdopodobieństwo przejścia z poziomu E_1 na E_2 (pochłanianie energii) jest równe prawdopodobieństwu przejścia z poziomu E_2 na E_1 (emisja energii). Jeżeli poziomy E_1 i E_2 byłyby jednakowo obsadzone to

ilość przejść w obu kierunkach byłaby sobie równa i niemożliwa byłaby obserwacja zjawiska elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego powoduje nierównomierne wypełnienie obu poziomów zgodnie z rozkładem Boltzmana:

$$[3] \quad \frac{n_2}{n_1} = e^{-\frac{E_2 - E_1}{kT}}$$

gdzie k — stała Boltzmana

Po przyłożeniu pola elektromagnetycznego różnica ponownie zanikłaby ponieważ ilość przejść z poziomu E_1 na E_2 byłaby większa od ilości przejść w kierunku odwrotnym z powodu liczniejszego obsadzenia poziomu E_1 . Jest to tak zwany efekt nasycenia, który można wywołać zwiększając nadmiernie moc pola mikrofalowego. Mechanizmy przeciwdziałające temu wiążą się z relaksacją spinowo-spinową oraz spinowo-sięciową. Obydwa procesy relaksacji polegają na wymianie energii z otaczającym środowiskiem w przypadku relaksacji spin-sieć oraz z innymi układami spinów w przypadku relaksacji spin-spin. W wyniku tego następują dodatkowe przejścia z poziomu E_2 na E_1 na drodze bezpromienistej. W rezultacie ilość przejść z poziomu E_2 na E_1 jest równa ilości przejść w kierunku odwrotnym, nierównomierne wypełnienie poziomów zgodnie z rozkładem Boltzmana zostaje utrzymane i można obserwować zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego w sposób ciągły. Mechanizmy relaksacji wpływają na szerokość linii i świadczą o powiązaniach układu spinów (znaczników spinowych) między sobą oraz ze środowiskiem. Ten fakt jest najczęściej wykorzystywany przy interpretacji widm w technice znaczników spinowych. Procesy relaksacji są charakteryzowane czasami relaksacji T_1 (spinowo-sięciowa) i T_2 (spinowo-spinowa) odpowiadającym zmniejszeniu się liczby elektronów nadmiernie obsadzonego poziomu $1/e$ razy. Szerokość linii jest odwrotnie proporcjonalna do tych czasów i może być zapisana (w skali częstotliwości) jako:

$$[4] \quad \Delta\nu = \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2}.$$

I-3. Struktura nadsubtelna

Jeżeli jądra atomowe znajdujące się w pobliżu niesparowanego elektronu będą posiadały różną od zera kwantową liczbę spinową I , to oddziaływanie elektron-jądro spowoduje rozszczepienie podstawowej linii na $2I + 1$ linii. Warunek rezonansu należy teraz poprawić i zapisać w postaci:

$$[5] \quad h\nu = g\beta H + \sum_i 2A_i m_i$$

gdzie A_i — stała rozszczepienia nadsubtelnego i -tego jądra

m_i — $I, I - 1, \dots, -I$

lub też w formie hamiltonianu:

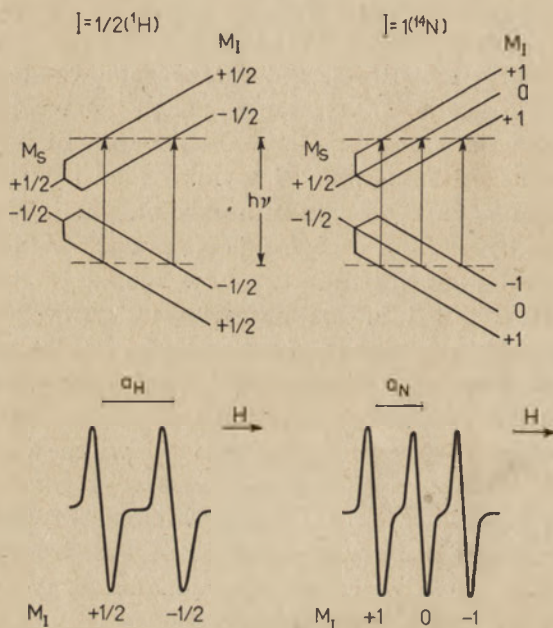
$$[6] \quad \mathcal{H} = g\beta\hat{H}\hat{S} + a\hat{I}\hat{S}$$

gdzie a — stała rozszczepienia nadsubtelnego

\hat{S} — operator spinu elektronowego

\hat{I} — operator spinu jądrowego

Pierwszy człon w hamiltonianie opisuje rozszczepienie zeemanowskie a drugi człon oddziaływanie niesparowanego elektronu ze spinem jądrowym (człon kontaktowy Fermiego). Rycina 2 ilustruje rozszczepienie po-



Ryc. 2. Rozszczepienie poziomów podstawowych jąder wodoru i azotu na podpoziomy.

Poniżej widma EPR w formie pierwszej pochodnej

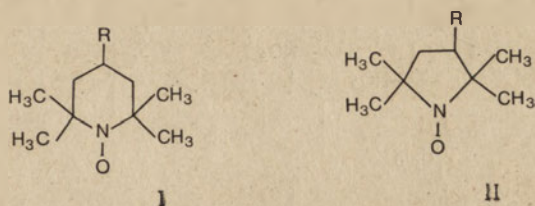
a_H , a_N stałe rozszczepienia nadsubtelnego odpowiednio dla wodoru i azotu.

ziomów podstawowych na podpoziomy w przypadku jąder o $I = 1/2$ (wodór) oraz $I = 1$ (azot). Ilość obserwowanych przejść musi być zgodna z regułami wyboru — $\Delta M_s = \pm 1$ oraz $\Delta M_I = 0$.

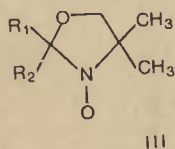
W przypadku większej ilości jąder o spinie różnym od zera w widmie EPR otrzymuje się wiele linii o charakterystycznym rozkładzie. Na podstawie ilości linii rozszczepienia nadsubtelnego w widmie EPR oraz stosunku ich intensywności można określić strukturę związku, delokalizację elektronową i gęstości spinowe. Tego typu analizy widm wykorzystywane są głównie w badaniach chemicznych.

II. Znaczniki spinowe

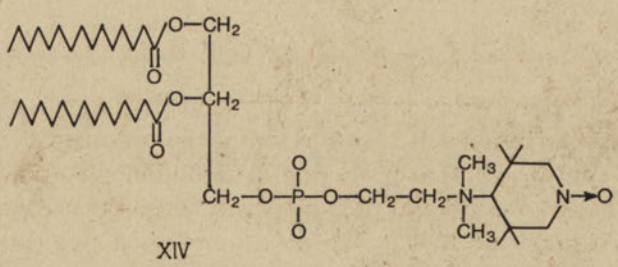
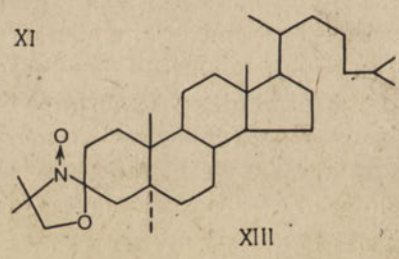
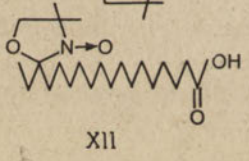
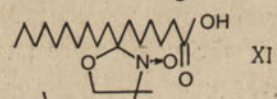
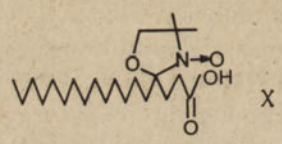
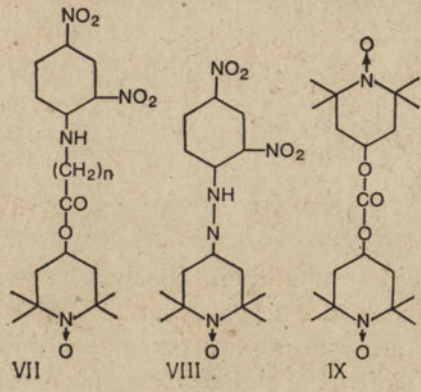
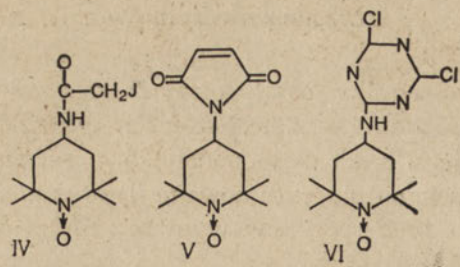
Pierwsze stabilne rodniki zostały otrzymane w roku 1960 przez utlenianie drugorzędowej aminy — 2,2,6,6-czterometylopiperodyny (15). Obecnie tą metodą otrzymuje się dwie podstawowe serie znaczników spinowych, na bazie pierścienia piperodynowego (I) oraz pierścienia pirolidonowego (II). Stabilność tych rodników wynika z małej reaktywności ugru-



powania oksylogo α jest wynikiem obecności czterech grup metylo- wych w najbliższym otoczeniu. Niesparowany elektron zlokalizowany jest głównie przy azocie dając charakterystyczne trzyliniowe widmo jak na rycinie 2b. Ta część rodnika odpowiedzialna za charakter uzyskiwanego widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego pozostaje niezmie- niona w różnych seriach znaczników. Natomiast w pozycji 4 pierścienia piperodynowego lub pirolidonowego mogą się znajdować różne grupy funkcyjne (R) decydujące o przydatności rodnika do znakowania makro- cząsteczek. Dzięki dużej stabilności ugrupowania oksylogo możliwe jest przeprowadzanie różnych przekształceń grupy funkcyjnej oraz sprzę- ganie z makrocząsteczkami bez zmian właściwości paramagnetycznych rodnika (16, 17). Należy podkreślić, że zasadniczy szkielet rodnika (wodór jako R) ma charakter obojętny i może być łatwo zdominowany przez cha- rakter grupy funkcyjnej (polarność) co ma znaczenie przy badaniach błon. Tak więc znaczniki spinowe są rodnikami wykazującymi stabilność ugru- powania oksylogo oraz posiadającymi grupy funkcyjne o odpowiedniej



reaktywności. Keana i wsp. (18) opracowali inną metodę otrzymywa- nia znaczników spinowych wykorzystując jako substraty ketony. Otrzy- mywane w tym przypadku pochodne oksazolidonowe o wzorze III nazywa się powszechnie znacznikami doksyłowymi. Tego typu znaczniki zawierają dwie grupy funkcyjne R_1 i R_2 . Stanowią one podstawę całej serii znaczni- ków stosowanych w badaniach błon.



Osobną grupę stanowią znaczniki zawierające po dwa lub więcej ugrupowań oksylowych (birodniki, poliurodniki). Stosowane są one jako wzorce przy badaniu odległości na makrocząsteczkach dwukrotnie znaczonej spinowo. Opis syntezy takich znaczników znajduje się w pracach Rozantseva i wsp. (19, 20).

Wiele podstawowych znaczników spinowych dostępnych jest obecnie w handlu (Synvar, Frinton Laboratories, Aldrich Chemical Company). Jednakże specjalne znaczniki spinowe stosowane w wielu badaniach trzeba syntetyzować samodzielnie. Syntezie i reakcjom znaczników spinowych poświęconych jest parę publikacji. Najobszerniejsze dane zawiera książka Rozantseva (21) oraz Forrestera i wsp. (22). Ogólne uwagi o znacznikach spinowych można również znaleźć w przeglądowych artykułach McConnella i McFarlanda (10) oraz Jost i wsp. (9). Wzory IV—XIV przedstawiają najważniejsze typy znaczników stosowanych w różnych badaniach cytowanych w dalszej części pracy.

III. Analiza widm znaczników spinowych

Jakkolwiek pełne opisanie widm EPR w sposób analityczny nie jest jeszcze możliwe, szczególnie dla roztworów, to wiele zagadnień można rozwiązać zadawalająco w sposób analityczny. Podejście takie zbliża nas do zrozumienia szczegółów zjawiska elektronowego rezonansu paramagnetycznego jednak wymaga posługiwania się skomplikowanym aparatem matematycznym. Dlatego też w praktyce rezygnuje się na ogół z takiej analizy widm a przeprowadza jedynie porównanie z widmami uzyskanymi w warunkach standardowych oraz analizę jakościową. W niniejszym rozdziale przedstawiono właśnie takie metody analizy widm.

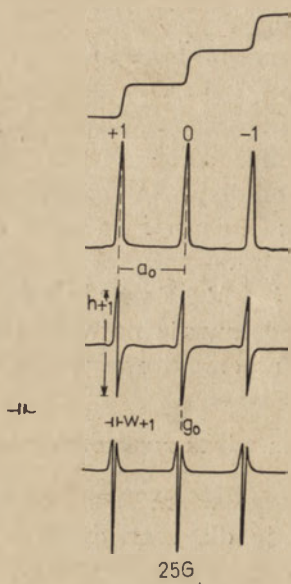
Znaczniki spinowe stosowane w badaniach biochemicznych posiadają niesparowany elektron zlokalizowany przy azocie i w związku z tym dają trzy linie w widmie EPR (patrz Ryc. 3c). Rozszczepienia spowodowanego wodorami grup metylowych nie obserwuje się. Jądra atomów makrocząsteczki o spinie różnym od zera — wodor i azot — nie oddziałują z niesparowanym elektronem znacznika spinowego i nie wpływają na strukturę nadształtów widma. W badaniach biochemicznych z zastosowaniem znaczników spinowych prowadzi się zatem wyłącznie analizę kształtu i położenia linii widma EPR.

III-1. Wpływ ruchów cząsteczkowych na widma EPR

III-1, a. Szybkie ruchy izotropowe

Znaczniki spinowe znajdujące się w nielepkich roztworach posiadają dużą swobodę ruchów i wszystkie ustawienia cząsteczek względem kierunku pola magnetycznego są jednakowo prawdopodobne. Otrzymane

w takich warunkach widmo jest więc uśrednione po wszystkich położeniach cząsteczek i w rezultacie otrzymuje się wąskie linie. Typowe widmo znacznika nitroksylowego zapisane w formie pierwszej pochodnej ilustruje rycina 3c.



Ryc. 3. Formy prezentacji widm EPR oraz sposoby pomiaru parametrów widma. Kolejno od góry — krzywa całkowa absorpcyjnego widma EPR, absorpcyjne widmo EPR, pierwsza pochodna oraz druga pochodna widma absorpcyjnego. a_0 — stała rozszczepienia nadsubtelnego, h_{+1} — intensywność linii niskopolewej, w_{+1} — szerokość linii niskopolewej, g_0 — współczynnik rozszczepienia spektroskopowego

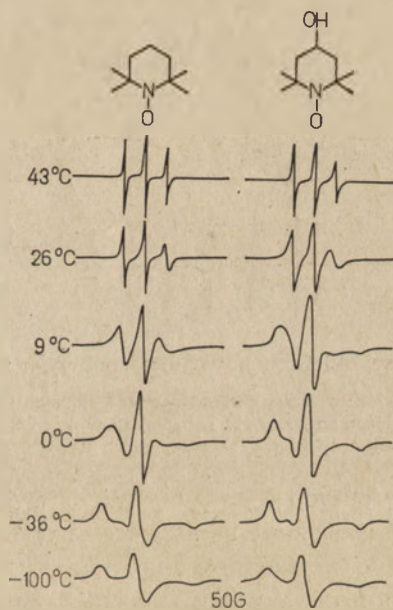
Rycina 3 przedstawia również inne formy zapisu widma lub przekształcenia formy wyjściowej oraz parametry charakteryzujące widmo. Zbiór swobodnie rotujących znaczników opisany jest hamiltonianem [6] przy czym parametry g i a mają charakter izotropowy (niezależny od orientacji). Intensywność linii widma EPR wynika z ilości spinów. Stosując odpowiednie wzory lub podwójne całkowanie widma (w formie pierwszej pochodnej) można określić ilość spinów w badanej próbce. Jednak ze względu na dokładność najczęściej stosuje się porównanie z wzorcem o znanej ilości spinów — N_{wz} . Ilość spinów w próbce N_x liczy się wtedy ze wzoru:

$$N_x = N_{wz} \frac{(I_c \Delta H^2)_x}{(I_c \Delta H^2)_{wz}}$$

III-1, b. Wolne ruchy izotropowe

Jeżeli znaczniki spinowe znajdują się w roztworze o dużej lepkości to ruchy ich będą miały w dalszym ciągu charakter izotropowy jednakże zostaną znacznie zwolnione. Wynikiem tego będzie gorsze uśrednianie położenia cząsteczki i widmo zacznie się poszerzać a poszczególne linie będą się

rozmywały. Efekty takie przedstawiono na rycinie 4, gdzie lepkość roztworu zwiększano obniżając temperaturę. Na podstawie zniekształcenia widma mówi się o silnym lub słabym unieruchomieniu znacznika spinowego. Ten mało precyzyjny sposób charakteryzowania unieruchomienia znacznika spinowego można zastąpić parametrem ilościowym — czasem korelacji. W sposób uproszczony definiuje się go jako czas, w którym znacznik dokonuje obrotu o pewien określony kąt (np. 1 radian). W literaturze znanych jest kilka sposobów obliczania czasu korelacji (23, 24) łącznie z wykorzystaniem symulacji widma na maszynach cyfrowych (25). Najpraktyczniejsza wydaje się jednak metoda podana przez McCalleya i wsp. (26) polegająca na pomiarze przesunięć położenia linii wysokopolowej względem jej położenia orzy czasie korelacji $\tau \rightarrow \infty$ i następnie odczytanie odpowiedniej wartości czasu korelacji z wykresu. W celu określenia położenia linii widma przy $\tau \rightarrow \infty$ stosuje się stężone roztwory sacharozy. Wartość czasu korelacji waha się od 10^{-11} s dla szybko rotujących znaczników

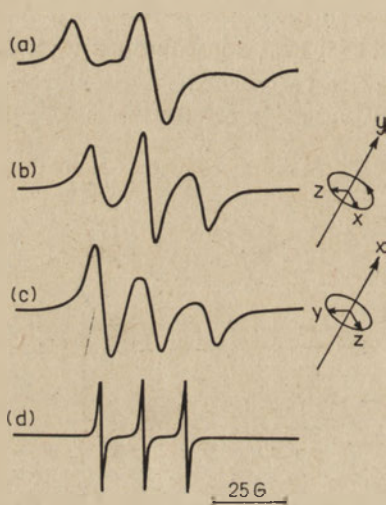


Ryc. 4. Wpływ lepkości na widma EPR. Nad serią widm w różnych temperaturach przedstawiono stosowane znaczniki spinowe (rozpuszczane w glicerolu)

ników do 10^{-8} s dla silnie unieruchomionych. Znacznik spinowy przyłączony do makrocząsteczki podlega bardzo często unieruchomieniu typu izotropowego, a czas korelacji świadczy wtedy o kształcie mikrootoczenia znacznika (Ryc. 9). Należy jednak zaznaczyć, że dokładne wyprowadzenie i sens czasu korelacji w odniesieniu do cząsteczek budzą wiele wątpliwości zatem należy go traktować jako przybliżone oszacowanie ruchliwości znacznika.

III-1, c. Ruchy anizotropowe

Po przyłączeniu do makrocząsteczki lub w strukturze błony znacznik spinowy może mieć swobodę rotacji jedynie wokół określonej osi R . Wartości g i a w hamiltonianie [6], opisującym zbiór takich znaczników, przestają mieć w tym wypadku charakter izotropowy. Jeżeli ruchy będą następowały wokół jednej osi, a oś ta będzie równoległa do jednej z osi cząsteczki, to zależnie od położenia osi R względem pola magnetycznego H będziemy obserwowali wartości g_{\parallel} i a_{\parallel} lub g_{\perp} i a_{\perp} . W oparciu o analizę widma można określić wartości anizotropowych współczynników g i a w różnych kierunkach.



Ryc. 5. Wpływ szybkich ruchów anizotropowych na widma EPR.

a) widmo przypadkowo zorientowanych nieruchomych znaczników, b) widmo znaczników rotujących wokół osi y , c) widmo znaczników rotujących wokół osi x oraz d) widmo izotropowe znaczników rotujących wokół wszystkich trzech osi cząsteczki

Przykłady widm dla orientacji tego typu przedstawiono na rycinie 5. Anizotropowe widma EPR spotykane są głównie przy badaniach błon i na ich podstawie można określić kierunek osi rotacji oraz kierunek ułożenia składników błony. Szczegóły analizy widm znaczników unieruchomionych anizotropowo przedstawione są obszernie w pracach (10, 27, 28).

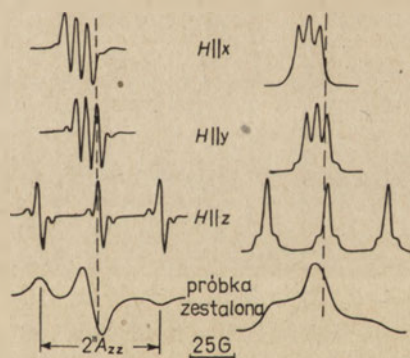
III-2. Widmo próbek zestalonych

Jeżeli roztwór znacznika spinowego zostanie zestalony w niskiej temperaturze to otrzyma się silnie zniekształcone widmo — rycina 6. Widmo takie odpowiada próbce polikrystalicznej, gdy cząsteczki znacznika spinowego są całkowicie unieruchomione ale w różnych kierunkach. Jest ono zatem skrajnym przypadkiem widma dla znaczników unieruchomionych izotropowo przy czasie korelacji $\tau \rightarrow \infty$. Można je też otrzymać jako sumę

widm dla wszystkich orientacji osi obrotu R w przypadku unieruchomienia anizotropowego. Zbieżność kształtu widm otrzymanych dla omówionych przypadków można zaobserwować na rycinach 6, 5a, 4. Widma próbek zestalonych wykorzystuje się do wyznaczania czasu korelacji. Jednak stosowanie takiej techniki do makrocząsteczek znaczonych spinowo nie jest wskazane ze względu na możliwość zmian mikrośrodowiska w niskich temperaturach i wpływ tym samym na uruchomienie znacznika. Widmo próbek zestalonych jest najszerszym z możliwych do otrzymania widm znacznika spinowego i wartościami rozszczepienia odpowiada widmu znacznika ustawionego osią z równoległe do pola magnetycznego. Sposób pomiaru wartości a_{zz} przedstawiony jest na rycinie 6.

III-3. Widma znaczników zorientowanych

Znaczniki spinowe można całkowicie unieruchomić i zorientować w ściśle określony sposób w strukturze kryształu diamagnetycznego. Stosowano w tym celu 2,2,4,4-czterometrylo-1,3-cyklobutandion (29) oraz 2,2,6,6-czterometrylopiperydon (30). Widma znaczników zorientowanych różnymi osiami równoległe do pola magnetycznego przedstawiono na rycinie 6. Oś x cząsteczki znacznika jest równoległa do wiązania N—O, oś z jest równoległa do orbitalu 2p azotu, a oś y jest prostopadła do obu poprzednich osi. Najszersze widmo uzyskuje się dla orientacji $H \parallel z$.



Ryc. 6. Widma znaczników spinowych unieruchomionych w sztywnej matrycy 2,2,4,4-czterometrylo-1,3-cyklobutandionu.

Kryształ macierzysty orientuje znaczniki spinowe w ściśle określonych kierunkach względem osi kryształu co umożliwia orientację znaczników odpowiednimi osiami względem pola magnetycznego. Dolne widma otrzymano dla przypadkowo zorientowanych znaczników w próbce zestalonej w -196°C . Z prawej strony widma w formie absorpcyjnej, z lewej odpowiednie widma w formie pierwszej pochodnej

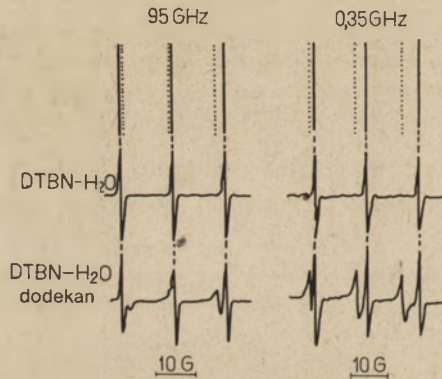
Suma widm dla wszystkich możliwych orientacji da widmo charakterystyczne dla próbek zestalonych (polikrystalicznych). Widma znaczników zorientowanych są opisywane hamiltonianem [6] z tym, że wielkości g i a są w tym wypadku tensorami podobnie jak dla znaczników unieru-

chomionych anizotropowo. Pojawiają się tu najczęściej trzy różne wartości g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} oraz odpowiednio a_{xx} , a_{yy} , a_{zz} . Dla symetrii osiowej kryształu można otrzymać wartości współczynników $g_{||}$ i $a_{||}$ oraz g_{\perp} i a_{\perp} .

W badaniach biochemicznych nie spotykamy się ze znacznikami całkowicie unieruchomionymi i zorientowanymi. Znaczenie omówionych wyżej badań polega na możliwości otrzymania dokładnych wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego oraz stałych rozszczepienia nadsubtelnego, które przydatne są w obliczeniach analitycznych.

III-4. Wpływ polarności środowiska na widma EPR

W widmach EPR występują pewne zmiany zależnie od charakteru środowiska, w którym znajduje się badany znacznik spinowy. Szczególnie interesująca jest zależność widma od polarności środowiska. Po przeniesieniu znacznika ze środowiska polarnego do niepolarnego następuje zmniejszenie wartości rozszczepienia nadsubtelnego — a oraz zwiększenie wartości współczynnika g . Efekty takie są wyraźniej obserwowalne w spektroskopii w pasmie 35 GHz (pasmo Q). Widma otrzymane dla di-t-butylu nitroksylu w środowisku polarnym i niepolarnym przedstawia rycina 7.



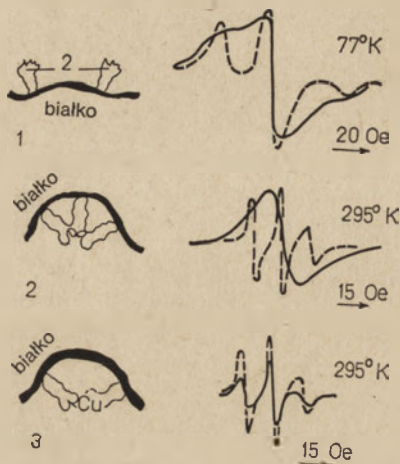
Ryc. 7. Wpływ rozpuszczalnika na widma EPR. Z lewej strony widma w pasmie X (9,5 GHz), z prawej w pasmie Q (35 GHz). Śródkowy rząd przedstawia widma di-t-butylu nitroksylu (DTBN) w wodzie. Rząd dolny — widma zapisane dla dwu próbek DTBN w wodzie i w dodekanie umieszczonych jednocześnie w rezonatorze. W górnym rzędzie przedstawiono położenia linii znacznika w wodzie — linie ciągłe oraz w dodekanie — linie przerywane

L a s s m a n i wsp. zaproponowali ostatnio metodę ilościowego określania polarności środowiska na podstawie przesunięć wspomnianych wartości (31).

III-5. Widma makrocząsteczek znaczonej podwójnie spinowo

Dwa znaczniki spinowe znajdujące się w pewnej odległości od siebie dają charakterystyczne widmo (Ryc. 8—1) dzięki oddziaływaniu spin—

spin typu dipolowego. Jeżeli do makrocząsteczki wprowadzimy dwa lub więcej znaczników spinowych to możliwe jest określanie odległości między nimi na podstawie widma (32, 33, 34). Wykorzystując możliwość specyficznego przyłączania znaczników do określonych miejsc makrocząsteczki można określać odległość między tymi miejscami na przykład centrami aktywnymi.



Ryc. 8. Typy oddziaływania między znacznikami spinowymi przyłączonymi do białka. 1 — oddziaływanie dipol—dipol, 2 — oddziaływanie wymienne, 3 — oddziaływanie wymienne dynamiczne. Z prawej przedstawiono odpowiednie widma dla znaczników oddziaływujących ze sobą — linia ciągła oraz nieoddziaływujących — linia przerywana

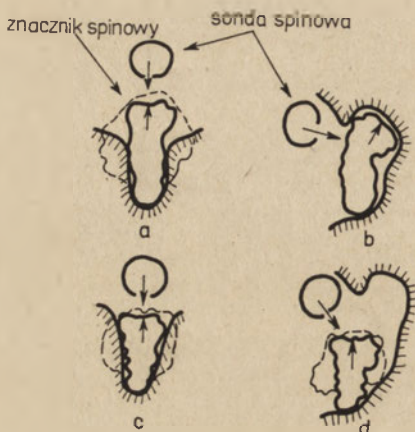
Przy analizie teoretycznej takich widm, posługujemy się związkami modelowymi (poliiodnikami), w których centra paramagnetyczne znajdują się w określonej odległości od siebie. Z porównania widm określamy odległości na badanej makrocząsteczce jako odpowiadające odległościom w poliiodniku modelowym. Jeżeli w wyniku procesów jakim podlegać będzie makrocząsteczka nastąpią zmiany w miejscu przyłączenia znaczników spinowych takie, że będą się one stykać ze sobą to w widmie wystąpią charakterystyczne zmiany — Ryc. 8—2. Oddziaływanie spin—spin polega teraz na nałożeniu się chmur elektronowych i nosi nazwę oddziaływania wymiennego.

O znacznym zbliżeniu znaczników można też sądzić na podstawie zmian w widmie jakie wystąpią po dodaniu do roztworu zawierającego makrocząsteczki znaczone spinowo jonów paramagnetycznych. Mamy wtedy do czynienia z tak zwaną wymianą dynamiczną, w której jony paramagnetyczne grają rolę pośrednika między obydwojma znacznikami. Model tego zjawiska i odpowiednie widma przedstawia rycina 8—3.

III-6. Widma znaczników w obecności jonów paramagnetycznych

Jony paramagnetyczne wykorzystywane są głównie w technice spin—sondy (35). Podobnie jak w przypadku birodników mamy tu do czynienia

z oddziaływaniem spin—spin typu dipolowego. Energia układu znaczników spinowych przekazywana jest jonom paramagnetycznym znajdującym się w roztworze i w wyniku tego obserwujemy poszerzenie linii widma EPR. Zatem jeżeli znacznik jest trudno dostępny dla jonów paramagnetycznych ponieważ znajduje się w zagłębieniu lub szczelinie na powierzchni makrocząsteczki to widmo będzie w rezultacie nieznacznie



Ryc. 9. Kształt powierzchni białka w miejscu przyłączenia znacznika spinowego. Linia przerywana ogranicza obszar swobodnej rotacji znacznika. Widoczna dostępność i możliwość rotacji znacznika

poszerzone. Natomiast znaczne poszerzenie widma będzie świadczyć, że znacznik znajduje się na powierzchni makrocząsteczki eksponowanej do roztworu (36). Odpowiednie modele powierzchni białkowej przedstawia rycina 9.

Na tym samym rysunku zilustrowano również możliwości swobodnej rotacji znacznika znajdującego się na powierzchni makrocząsteczki o różnym kształcie.

IV. Zastosowanie maszyn cyfrowych do analizy widm EPR

W ostatnich latach do analizy widm EPR coraz częściej stosuje się maszyny cyfrowe. Podstawowym celem ich zastosowania jest uśrednianie zapisów widm. Dzięki temu staje się możliwe badanie próbek dających bardzo słabe sygnały EPR.

W przypadku próbek zawierających małe ilości spinów konieczność rejestracji widma przy dużym wzmocnieniu powoduje wzrost szumów maskujących linie widma. Jeżeli takie widmo zarejestruje się wielokrotnie to otrzyma się po uśrednieniu przez komputer wyraźne widmo pozba-

wione szumów. Stosując maszyny cyfrowe można dokonać w prosty sposób podstawowych przekształceń widma — całkowania lub różniczkowania zależnie od potrzeb. Jeżeli wychodzi się z widma w formie pierwszej pochodnej to otrzymuje się w ten sposób odpowiednio widmo absorbcyjne lub widmo w formie drugiej pochodnej. Po podwójnym całkowaniu otrzymuje się krzywą umożliwiającą bezpośrednio odczytanie ilości spinów w próbce. Otrzymane widmo może być przechowywane w pamięci maszyny cyfrowej i odtworzone w razie potrzeby w dowolnej skali i fazie co umożliwia porównywanie z różnymi widmami otrzymywanymi w dalszych badaniach.

Ważnym zastosowaniem elektronicznym maszyn cyfrowych jest miareczkowanie spektralne. Od widma powstałego z nałożenia widm dwu składników odejmuje się widmo jednego ze składników małymi porcjami, aż do pojawienia się śladu widma odejmowanego w przeciwnej fazie. W ten sposób znajdując widmo jednego ze składników — na przykład czystego znacznika, otrzymuje się widmo drugiego nieznanego składnika — na przykład makrocząsteczki znaczonej spinowo. Miareczkowanie spektralne ma zastosowanie w tych wypadkach gdy trudno jest otrzymać jeden ze składników próbki paramagnetycznej w stanie czystym. W badaniach kinetycznych, gdzie następuje zanik znacznika spinowego (sygnału EPR) można posłużyć się maszyną cyfrową do bezpośredniego sporządzenia wykresu zmian intensywności określonej linii widma w czasie.

V. Zastosowanie znaczników spinowych do badania makrocząsteczek

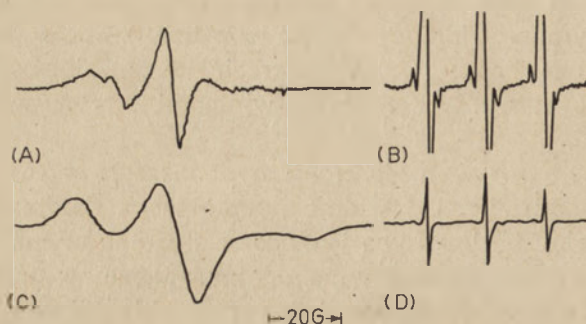
Szczegółowe przedstawienie wszystkich badań przeprowadzonych na makrocząsteczkach z wykorzystaniem znaczników spinowych znacznie przekroczyłoby zakres niniejszego przeglądu. Dlatego też przedstawione zostaną w tym rozdziale tylko najważniejsze kierunki badań i wnioski wprowadzone dla grup makrocząsteczek badanych najintensywniej.

V-1. Kwasy nukleinowe

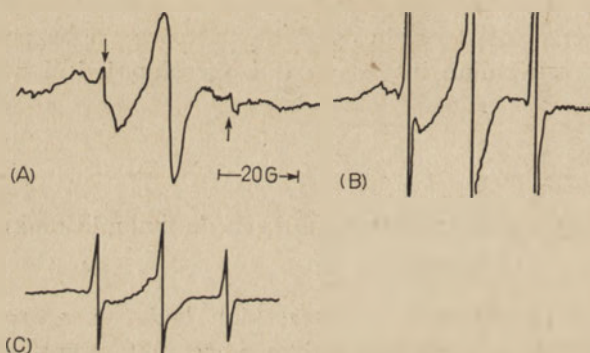
Pierwszą grupą makrocząsteczek do badania których zastosowano znaczniki spinowe były kwasy nukleinowe. Ohnishi i McConnell wykorzystali do badania struktury kwasu dezoksyrybonukleinowego kation chloropromazyny (1). Znacznik ten z powodu małej stabilności i dużej złożoności widma EPR nie pozwolił na dokładne badania a wskazał jedynie na możliwości jakie daje technika znaczników spinowych w badaniach struktury makrocząsteczki. W późniejszych latach znaczniki spinowe stosowano parokrotnie do badania kwasów nukleinowych (37—39).

V-2. Przeciwciała

Prawie równocześnie z badaniami kwasów nukleinowych rozpoczęto badania reakcji przeciwciała—antygen techniką znaczników spinowych. W 1965 roku Stryer i Griffith zsyntetyzowali hapten znaczony



Ryc. 10. Unieruchomienie znaczonego spinowo haptenu dwunitrofenylowego przez przeciwciała anti-dwunitrofenyl (A); widma wodnych roztworów spinowo znaczonego haptenu (B, D); zestalona próbka znaczonego spinowo haptenu (całkowite unieruchomienie) (C) (40)

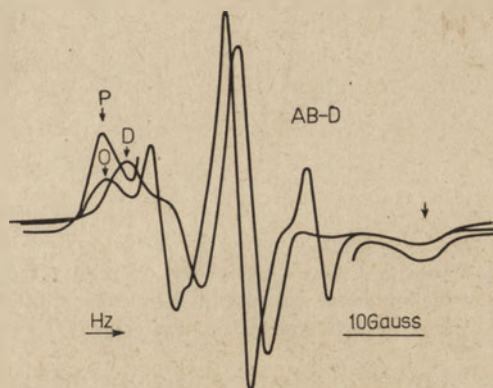


Ryc. 11. Miareczkowanie spinowe przeciwciała anti-dwunitrofenyl haptentem dwunitrofenylowym znaczonego spinowo: stosunek haptent/przeciwciała = 1,8 (A); stosunek haptent/przeciwciała = 2,28 (B); widmo próbki B zapisane przy mniejszym wzmacnieniu spektrometru (C)

spinowo (pirolidono dwunitrofenylowy) i wykorzystali go do badania reakcji ze specyficznym przeciwciałem (40). Na otrzymanych przez autorów widmach — Ryc. 10 — widać silne unieruchomienie haptenu znaczonego spinowo po reakcji z przeciwciałem. Przy nadmiarze haptenu pojawia się w widmie linia odpowiadająca niezwiązanemu, szybko rotującemu znacznikowi — Ryc. 11. Na tej podstawie wyznaczono stosunek przeciwciała/antygen = 1/2, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi innymi metodami.

Spinowo znaczone hapteny mono- dwu- i trójnitrofenylowe stosowano

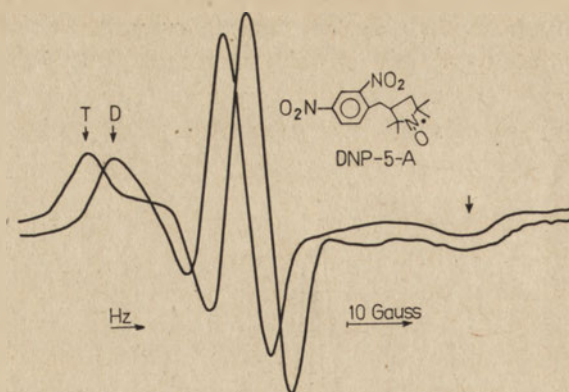
w latach następnych do badania heterogenności przeciwciał (41). Z wielkości unieruchomienia haptenu w reakcjach specyficznych i krzyżowych wywnioskowano, że centrum wiążące przeciwciał niespecyficznych (antytrójnitrofenylowe) jest albo głębsze albo silniej hydrofobowe od przeciwciał specyficznych (antydwunitrofenylowych) — Ryc. 12.



Ryc. 12. Widma przeciwciał antydwunitrofenyl po reakcji ze znaczone spinowo haptentem para-nitrofenylowym (P), orto-nitrofenylowym (O), oraz dwunitrofenylowym (D). Widma nałożono linią wysokopolową (strzałka). Widoczne silniejsze unieruchomienie haptentów reagujących krzyżowo (41)

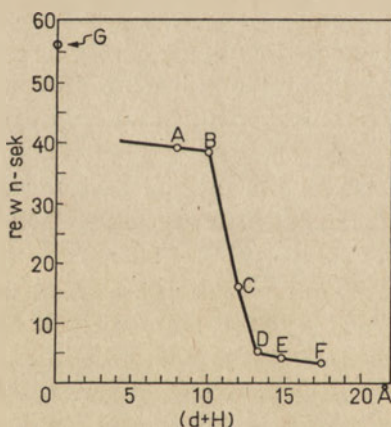
Silniejsze natomiast unieruchomienie niespecyficznych haptentów można tłumaczyć małą sztywnością kompleksów niespecyficznych co umożliwia dodatkowe oddziaływanie hydrofobowe i tym samym większe unieruchomienie haptentu — Ryc. 13.

Do badania specyficzności przeciwciał zastosowano następnie spinowo znaczone haptenty różniące się strukturą — DNP-metylenowy i DNP-hydrazonowy (42). Na podstawie tych badań sugerowano, że haptenty mogą być wiązane w różnych miejscach (w obrębie centrum aktywnego) sztywnej s'ruktury lub też selektywnie stabilizują konformację przeciwciał. Z widm spinowo znaczonych haptentów p-benzoesanowego i fenylotrójmetyloamoniowego po reakcji z odpowiednim przeciwciałem próbowano oszacować siłę wiązania tych przeciwciał (43). Jednakże w badaniach tych posługiwano się mało dokładnym określeniem stopnia unieruchomienia na podstawie całkowitej szerokości widma, a otrzymane wyniki były niezgodne z wynikami innych metod (dializa równowagowa). Dopiero ostatnio opracowano metodę pozwalającą na ilościowy pomiar wolnego i związanego haptentu na podstawie widma EPR (44). Z wyników takiego spinowego miareczkowania przeciwciała można określić stałą asocjacji i współczynnik heterogenności. Porównanie tak uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi metodą dializy równowagowej dało zupełną zgodność.



Ryc. 13. Widma spinowe znaczonego haptenu dwunitrofenylowego unieruchomionego po reakcji z przeciwciałem anti-dwunitrofenyl (D) oraz anti-trójnitrofenylowym (T). Widma nałożono linią wysokopolową (strzałką). Widoczne silniejsze unieruchomienie przez przeciwciało niespecyficzne (41)

Specjalnie syntetyzowane hapteny oddzielone od znacznika spinowego łańcuchem węglowym o zmiennej długości (VII) znalazły zastosowanie do określania głębokości centrum wiążącego (45). Długość łańcucha przy której następuje gwałtowny wzrost ruchliwości znacznika, mierzony czasem korelacji, plus długość stosowanego haptenu odpowiada głębokości centrum wiążącego przeciwciała — Ryc. 14. Określona w ten sposób głębokość

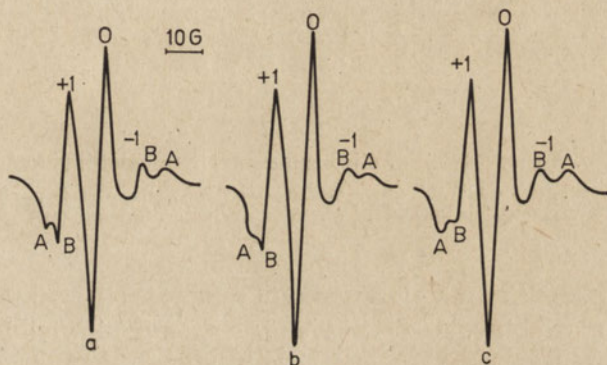


Ryc. 14. Wykres zależności czasu korelacji od długości łańcucha węglowego z haptentem.

(A) DNP-SL, (B) DNP-metyl-SL, (C) DNP-glicyna-SL, (D) DNP- α alanina-SL, (E) DNP-kwas α -masłowy-SL, (F) DNP-kwas α -kapronowy-SL, SL-piperidynowy znacznik spinowy (45)

centrum wynosząca 12 Å dobrze zgadza się z rozmiarami centrum określonymi w badaniach zahamowania precypitacji. Oprócz spinowo znaczonych haptentów w badaniach wykorzystywano również przeciwciała sprzę-

gane ze znacznikami spinowymi. Wykazano, że spinowo znaczone przeciwciała można stosować do śledzenia przebiegu reakcji precypitacji oraz do wyciągania jakościowych wniosków o jej przebiegu (46). Na podstawie widm spinowo znaczonych przeciwciał (Ryc. 15) stwierdzono istnienie dwu stanów konformacyjnych w cząsteczkach IgG i IgE (47). Stany te przypisuje się zmianom odległości między domenami immunoglobulin co możliwe jest przy dużej giętkości odcinków łączących domeny. K ä i v ä r ä i n e n i w s p . (48) wykorzystali spinowo znaczone przeciwciała do badania zmian jakie zachodzą w antygenie i przeciwciale po utworzeniu immunokompleksu. Wykazali oni, że niezależnie od typu antygeny po reakcji następuje usztywnienie struktury przeciwciała i rozluźnienie struktury antygeny. Zmiany te można obserwować niezależnie od zdolności immunokompleksów do precypitacji.

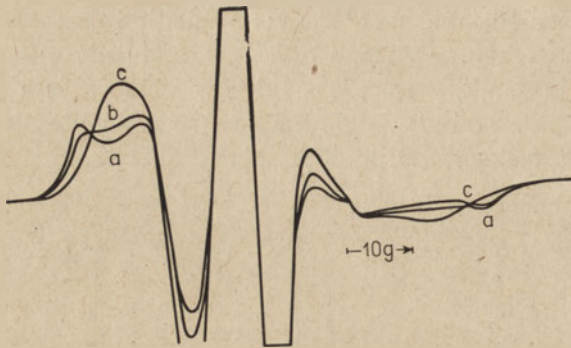


Ryc. 15. Widma EPR spinowo znaczonych króliczych IgG (a), ludzkich IgG (b) i IgE (c). A i B oznaczają podwójne linie wysoko i nisko polowe, co odpowiada dwu konformerom cząsteczek immunoglobulin (47)

V-3. Hemoglobina

Hemoglobina należy do makrocząsteczek, które były szczególnie intensywnie badane przy pomocy znaczników spinowych. Niezależnie od tego na hemoglobinie przeprowadzono szereg badań wykorzystujących obecność żelaza (6, 49). Niewątpliwie na rozwój badań nad hemoglobiną wpłynęła możliwość łatwego otrzymania kryształów hemoglobiny, które są znacznie dogodniejsze do badań EPR niż roztwory, ze względów technicznych. Znacznik spinowy wprowadza się zazwyczaj do hemoglobiny poprzez grupę SH cysteiny w pozycji β -93 (50). Otrzymane widma hemoglobiny znaczonej spinowo wykazały, że istnieje ona w dwu stanach konformacyjnych (51, 52). Wykorzystując zdolność hemoglobiny do krystalizacji, użyto jej do rozstrzygnięcia dyskusyjnej kwestii, czy struktura białka w roztworze i w kryształach jest taka sama. Na podstawie widm znacznika spinowego przyłączonego do hemoglobiny stwierdzono, że występują je-

dynie nieznaczne różnice takie jak można wywołać zmianami jonowego składu roztworu (53). Wiele badań techniką znaczników spinowych poświęcono właściwościom kooperatywnym hemoglobiny (54—57). Wyniki tych badań zostały zebrane w pracy McConnella (58). Widma EPR dla hemoglobiny znaczonej spinowo o różnym stopniu utlenowania po nałożeniu na siebie dawały wyraźne punkty izobestyczne — Ryc. 16, co



Ryc. 16. Widma EPR spinowo znaczonej hemoglobiny końskiej.

(a) — 100% utlenowania, (b) — 71% utlenowania, (c) — odlenowana. Ostre punkty izobestyczne wskazują na istnienie dwu lokalnych konformacji (54)

wskazuje na istnienie dwu stanów konformacyjnych związanych z utlenowaniem hemoglobiny. Obserwowane czasami niewielkie odchylenia w punkcie izobestycznym świadczą o możliwości istnienia obszarów hemoglobiny, których struktura zależy od utlenowania większej ilości grup hemowych (55). Do badań hemoglobiny po raz pierwszy zastosowano technikę dwu znaczników spinowych (59). Dzięki temu efekty towarzyszące utlenowaniu hemoglobiny czy też zmianom pH lub siły jonowej stają się wyraźniejsze i łatwiejsze do zaobserwowania. Stosując technikę dwu znaczników spinowych pomierzono też odległości między niektórymi grupami aminokwasowymi (32) — patrz rozdział III-5.

V-4. Enzymy

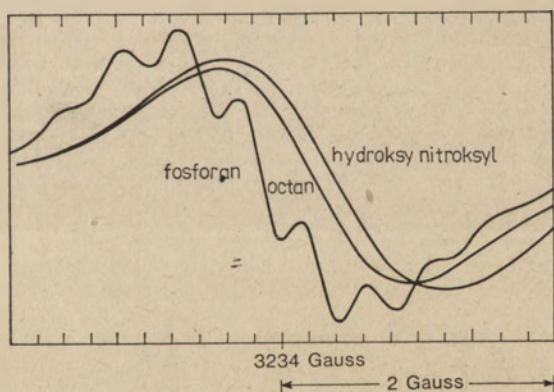
W tej grupie makrocząsteczek badania przy pomocy znaczników spinowych można podobnie jak w przypadku hemoglobiny podzielić na badania strukturalne oraz badania kinetyczne. Wiele interesujących informacji o strukturze i kinetyce enzymów można otrzymać w sposób zilustrowany już dla przeciwciał czy hemoglobiny. W rozdziale tym obszerniej zostaną omówione jedynie zastosowania niespotykane uprzednio.

Najwięcej doniesień dotyczy badań stanów konformacyjnych i przejść między nimi dla samych enzymów pod wpływem różnych czynników. Takie badania prowadzono obszernie na enzymach serynowych (60—62),

fosfofruktokinazie (63, 64), fosforylaze a i b (65), anhydrazie węglanowej (66) i aminotransferazie asparaginianowej (67). W wymienionych powyżej badaniach analizowano unieruchomienie znacznika powodowane zmianami pH, siły jonowej itp. z czego wnioskowano o zmianach konformacyjnych w danym enzymie.

Drugą grupę stanowią badania struktury centrum aktywnego. Stosowano w tym przypadku najczęściej analogi substratu znaczone spinowo. Badając wpływ różnych czynników na widma enzymów znaczonych spinowo w centrum aktywnym poprzez substrat, można określać jakie zmiany zachodzą w centrum. Tego typu badania przeprowadzono w przypadkach trypsyny (68), chymotrypsyny (69, 70), anhydrazy węglanowej (71), fosfatazy alkalicznej (72) oraz rybonukleazy (73). Wykorzystując znaczniki spinowe badano też własności kompleksów enzym—substrat w przypadku kinazy kreatynowej (74) a wpływ ligandów na strukturę cząsteczki w przypadku fosforylazy b (75). Otrzymane wyniki potwierdziły znane już fakty.

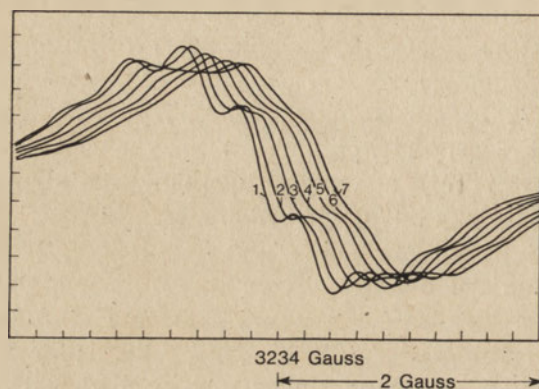
Bardzo interesujące okazało się zastosowanie znaczników spinowych bezpośrednio jako substratów enzymu (76). Fosfataza alkaliczna może przeprowadzać fosforanową pochodną znacznika spinowego (4-fosforan-2,2,6,6-czterometylopiperydyno-1-oksyl) w pochodną hydroksylową. Te dwa związki posiadają widma różniące się współczynnikiem g oraz strukturą nadsubtelną — Ryc. 17. Obserwując zmiany tych parametrów w wid-



Ryc. 17. Środkowa linia widma znaczników spinowych typu I z różnymi grupami R. Widoczne przesunięcie wartości współczynnika g (76).

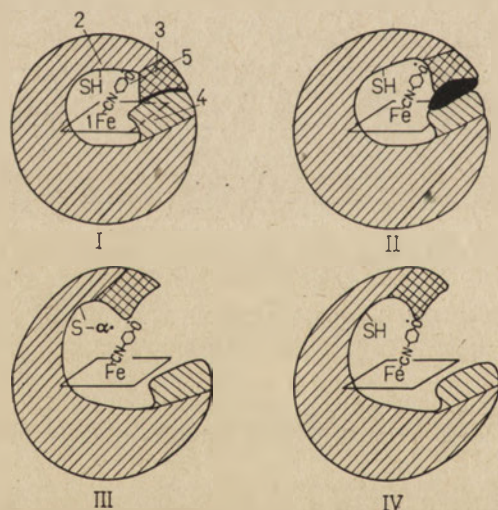
mie rejestrowanym w pewnych odstępach czasu — Ryc. 18, można oznaczyć aktywność enzymatyczną fosfatazy alkalicznej. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami klasycznych metod badania aktywności enzymatycznej. Nad stosowaniem znaczników jako substratów enzymów prowadzone są dalsze badania (77).

Omówioną poprzednio technikę spin—sonda (patrz rozdział III-6) zastosowano po raz pierwszy przy badaniu cytochromu P—450 (78, 79). Na podstawie wpływu jonów paramagnetycznych na widmo znacznika przyłączonego w pobliżu pierścienia hemowego ustalono, że pierścień ten znajduje się we „wnęce” niedostępnej dla otoczenia w normalnych warunkach. Dopiero czynniki niszczące strukturę cytochromu jak dezoksycholan powodują otwarcie „wnęki” cytochromu P-450 — Ryc. 19. Analizując zaś widmo samego znacznika w czasie reakcji przeprowadzanych przez cyto-



Ryc. 18. Zmiany środkowej linii widma EPR fosforanowego znacznika spinowego podczas hydrolizy enzymatycznej przez fosfatazę alkaliczną.

Krzywe oznaczone numerami 1 — 7 otrzymano odpowiednio po 2, 11, 21, 36, 61, 91 i 121 minutach od początku reakcji (76)



Ryc. 19. Hipotetyczny schemat centrum aktywnego cytochromu P-450 w stanie niearuszonym (I), w obecności niepolarnego substratu (II), po potraktowaniu odczynnikiem na grupy tiolowe (III), po potraktowaniu dezoksycholanem (IV): grupa hemowa (1), centrum tiolowe (2), centrum hydrofobowe (3), centrum aromatyczne (4), znacznik spinowy (5), niepolarny substrat przyłączony do cytochromu (6) (78)

chrom wyprowadzono cały szereg wniosków o mechanizmie działania tego cytochromu (80). Do badania cytochromu P-450 zastosowano też bardziej skomplikowane techniki polegające na indukowaniu przesunięć w widmie EPR przy pomocy pola elektrycznego (81). Technika ta pozwalała wykrywać subtelne zmiany zachodzące w strukturze w czasie działania cytochromu P-450 na substrat. Wiele ciekawych informacji otrzymano stosując technikę znaczników spinowych do badania układu miozyna—aktyna. Badano zarówno aktywność enzymatyczną miozyny (82, 83), wpływ metali dwuwartościowych na aktynę (84) jak również strukturę kompleksu miozyny z aktyną (85). Badania te potwierdziły niektóre hipotezy dotyczące działania miozyny i aktyny.

V-5. Inne białka

Zastosowanie znaczników spinowych do białek nie posiadających aktywności biologicznej polega głównie na śledzeniu zmian konformacyjnych powodowanych zmianami pH, czynnikami denaturującymi itp. Badania tego typu rozpoczęto równie wcześnie jak badania kwasów nukleinowych czy też reakcji przeciwciało—antygen. W 1965 roku Stone i wsp. (23) zastosowali znacznik pirolidonowy z czynną grupą izocyjanianową do znakowania albuminy surowicy wołu oraz poli-L-lizyny. W widmach EPR obserwowano zmiany jakie zachodzą przy zmianach pH. Sporządzając wykres zależności czasu korelacji od pH stwierdzono, że przyłączenie znacznika do makrocząsteczki następuje w dwu różnych miejscach. Po trawieniu albuminy surowicy wołu pepsyną następowały zmiany w ruchliwości znacznika tego samego typu, jak przy obniżaniu pH. Następnie do badań albuminy surowicy wołu zastosowano nowy typ znacznika (maleimidowy) potwierdzając uzyskane wcześniej wyniki (86). Albuminę surowicy wołu wykorzystano też do przeprowadzenia badań modelowych nad wpływem substancji powierzchniowo czynnych na strukturę makrocząsteczki (87, 88). Wpływ pH i czynników denaturujących badano też stosując ceruroplazminę (89, 90) oraz plastocyaniny znakowane znacznikami spinowymi (91). Do badań mioglobiny wykorzystano po raz pierwszy pasmo Q (35 MHz) oraz pasmo 4mm wskazując na możliwość badań falami o długościach milimetrych (92).

Ogólne zasady badania przejść konformacyjnych w białkach metodą znaczników spinowych zostały obszernie przedstawione na przykładzie lizozymu przez Achmedowa (93).

VI. Zastosowanie znaczników spinowych do badania modelowych układów błon

W części tej, podobnie jak poprzednio, przedstawiono jedynie najważniejsze wnioski wypływające z zastosowania znaczników spinowych do

badania błon. Bardziej wyczerpujące informacje na temat badania błon techniką znaczników spinowych można znaleźć w artykułach Josta i wsp. (9) oraz Keitha i wsp. (94).

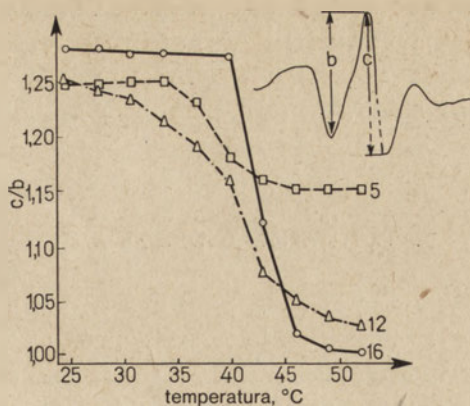
VI-1. Micelle

Badania właściwości miceli zostały zapoczątkowane przez Waggonera i wsp. (95, 96). Dodawali oni znaczniki spinowe do wodnego roztworu siarczanu dodecyłu. Poniżej krytycznego stężenia micel znacznik rotował swobodnie natomiast w obszarze krytycznego stężenia następowało zahamowanie tej rotacji i nie obserwowano dalszych zmian przy zwiększaniu stężenia siarczanu dodecyłu. Badania te wykazały, że znaczniki mogą być wskaźnikiem lipidowych przejść fazowych. Zastosowanie znaczników zawierających grupę chromoforową (XIV) pozwoliło na niezależne badanie wpływu rozpuszczalnika na obydwie końce znacznika. W oparciu o otrzymane wyniki zaproponowano nowy dynamiczny model struktury micelarnej (96). Badania te zostały później potwierdzone i uzupełnione obliczeniami współczynników podziału na podstawie widm EPR (97).

VI-2. Liposomy

Wprowadzenie znaczników sterydowych (XXII) i kwasów tłuszczowych znaczonych spinowo (X—XII) umożliwiło badanie dynamiki struktur modelowych błon liposomalnych. Lipidowe znaczniki spinowe nie wprowadzają zaburzeń w strukturze liposomu co zostało udokumentowane zdjęciami elektronomikroskopowymi (9). Znacznik lipidowy jest włączany między cząsteczki fosfolipidów i dlatego też odzwierciedla strukturę i ruchy otoczenia fosfolipidowego. Spinowe izomery pozycyjne kwasów tłuszczowych (X—XII) mogą odzwierciedlać zachowanie się różnych obszarów warstwy podwójnej zależnie od miejsca w którym jest przyłączone ugrupowanie doksylowe.

Wcześniejsze badania bez stosowania znaczników spinowych wskazywały na wpływ cholesterolu na strukturę liposomów co objawiało się ograniczeniem swobody ruchów łańcucha fosfolipidowego. Znaczone spinowo kwas stearynowy zastosowany do wyjaśnienia tego problemu potwierdził i udowodnił hipotezę o ograniczeniu ruchów fosfolipidów powyżej temperatury przejścia (98, 99). Sama temperatura przejścia stanowiła również temat badań z zastosowaniem znaczników spinowych (100). W późniejszych badaniach dla serii kwasów 5-, 12- i 16-doksylostearynowych sporządzono wykresy stosunku intensywności linii widma c/b (odpowiednik czasu korelacji) od temperatury — Ryc. 20. Łatwo zauważyć, że temperatura przejścia najsilniej odbija się na ruchliwości końca łańcucha kwasu stearynowego. Natomiast początek łańcucha podlega stosunkowo niewielkim zmianom ruchliwości (9).



Ryc. 20. Zmiany ruchliwości izometrów pozycyjnych kwasu doksylostearynowego w 20% dwupalmitylofosfatydylocholinie zawieszonyj w wodzie w zależności od temperatury.

□ — 5-doksylostearynyan, △ — 12-doksylostearynyan, ○ — 16-doksylostearynyan. W prawym górnym rogu podano sposób pomiaru ruchliwości (9)

Przy użyciu znaczników powyższego typu przeprowadzono szczegółowe badania organizacji błony liposomalnej (101). Parametr uporządkowania określany w tych badaniach wykazał, że do pozycji C-8 węglowe łańcuchy lipidowe pozostają stosunkowo sztywne. W dalszej części łańcucha obserwuje się natomiast stosunkowo dużą swobodę rotacji.

Według przypuszczeń wielu badaczy transport cząsteczek lub jonów przez błonę powinien być związany z przemieszczeniami składników błony. Stosując znaczniki spinowe pokazano, że cząsteczki fosfolipidów mogą przechodzić z jednej strony podwójnej warstwy lipidowej na drugą stronę (102). Wykorzystano tu właściwość kwasu askorbinowego do niszczenia paramagnetycznych właściwości znaczników spinowych. Niezależnie w innych badaniach wykazano, że kwas askorbinowy nie wnika do wnętrza liposomów. Po potraktowaniu liposomów zawierających znaczniki spinowe kwasem askorbinowym część sygnału EPR znika gwałtownie a reszta stopniowo w miarę upływu czasu. Na tej podstawie możliwe było wyznaczenie stałej wymiany składników między obiema stronami warstwy podwójnej. Badaniami tymi potwierdzono sugerowaną już wcześniej dynamiczną strukturę liposomów.

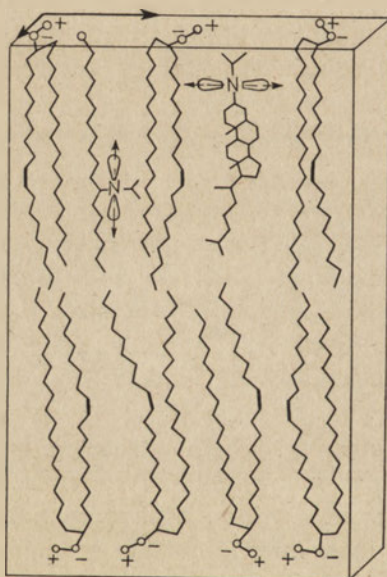
VI-3. Ciekłe kryształy

Ciekłe kryształy niektórych substancji (np. p-azoksyanizol) przypominają strukturę fazy lipidowej, dlatego też badania ciekłych kryształów wlicza się do badań modelowych układów błon. W badaniach ciekłych kryształów znaczniki spinowe również znalazły zastosowanie (103, 104, 105). Ciekłe kryształy można orientować w polu magnetycznym a z widma

EPR można wnioskować o orientacji znacznika w takim kryształcie. Wartości oddziaływań dipolowych i wymiennych dostarczają informacji o strukturze otoczenia znacznika i tym samym o strukturze ciekłego kryształu. Znaczniki spinowe mogą być też wskaźnikiem izotropowych przejść fazowych w ciekłym kryształcie.

VI-4. Wielowarstwy lipidowe

Naturalne lecytyny w pewnych warunkach orientują się spontanicznie dając lipidowe struktury wielowarstwowe. Orientację składników w wielowarstwach można badać techniką znaczników spinowych (106, 107). Na podstawie wielkości rozszczepienia widma znaczników lipidowych w różnych kierunkach względem pola magnetycznego ustalono, że cząsteczki lipidów układają się swoją długą osią prostopadle do powierzchni podtrzymującej strukturę wielowarstwową — Ryc. 21. Świadczy to o ist-



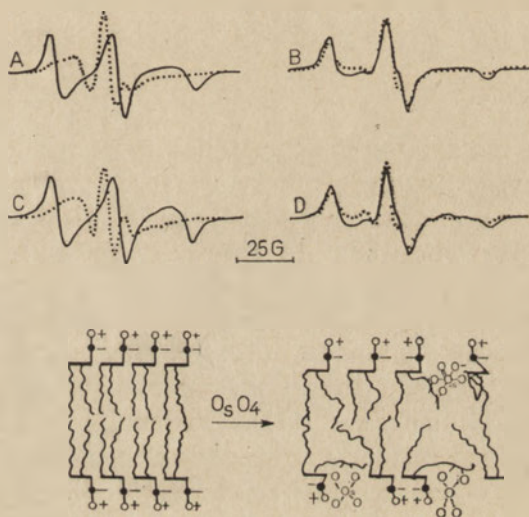
Ryc. 21. Schematyczny obraz dwuwarstwy lecytynowej zawierającej stearynowe i cholestanowe znaczniki spinowe. Kierunek osi z stearynowego znacznika spinowego jest prostopadły do płaszczyzny dwuwarstwy a oś z cholestanowego znacznika spinowego jest równoległa do płaszczyzny dwuwarstwy lecytynowej (106)

nieniu dużego stopnia uporządkowania w lipidowych strukturach wielowarstwowych. Wyniki te zostały również potwierdzone badaniami rentgenograficznymi.

Wyraźnie obserwowana anizotropia widm EPR dla wielowarstw lipidowych zawierających znaczniki spinowe umożliwiła przeprowadzenie ca-

łego szeregu badań nad ruchami cząsteczkowymi w takich warstwach. Stosując znaczniki typu izomerów pozycyjnych kwasu stearynowego wykazano, że anizotropia zanika w miarę przesuwania się ugrupowania doksylogowego do końca łańcucha węglowego (108).

Swoboda rotacji składników wielowarstwy lipidowej uzależniona jest od stopnia uwodnienia oraz od stopnia uporządkowania. Wraz ze wzrostem uwodnienia i zmniejszeniem uporządkowania następuje zwiększenie swobody rotacji znacznika a tym samym zwiększenie swobody ruchów cząsteczkowych składników wielowarstwy. Wpływ cholesterolu na uruchomienie znacznika tłumaczy się zwiększeniem uporządkowania struktury wielowarstwy lipidowej o obecności cholesterolu. Zastosowanie znaczników spinowych do badania zmian występujących w strukturze wielowarstwy lipidowej pod wpływem czterotlenku osmu wykazało znaczne zaburzenia tej struktury (9). W oparciu o uzyskane widma zaproponowano schematyczny obraz zaburzeń w strukturze wielowarstwy lipidowej (Ryc. 22).



Ryc. 22. Wpływ czterotlenku osmu na strukturę lipidów zorientowanych modelowych układów błon.

A — widmo EPR kwasu 5-doksylostearynowego w wielowarstwie lecytynowej przed zadziałaniem czterotlenkiem osmu oraz B — po zadziałaniu czterotlenkiem osmu. C i D odpowiednie widma symulowane komputerem. Linie ciągłe przedstawiają widma dla orientacji prostopadłej a linie przerywane dla orientacji równoległej. Poniżej przedstawiono schematyczny obraz możliwej interpretacji otrzymanych widm EPR. (9)

VI-5. Kompleksy lipidowo-białkowe

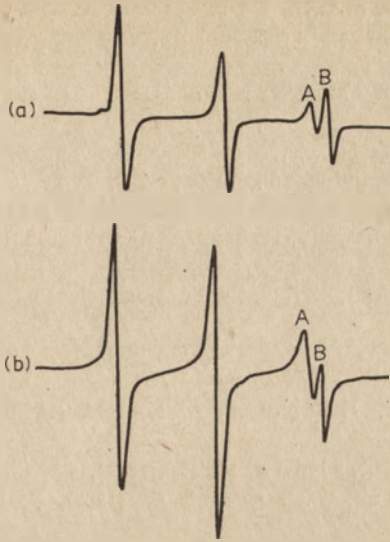
Kompleksy lipidowo—białkowe stanowią modele oddziaływania lipid—białko w błonach naturalnych. Pierwsze zastosowanie znaczników spinowych do badania tego typu układów opisał Barrat i wsp. (109). Znaczone

spinowo białka wchodzące w skład kompleksu wykazywały wzrost unieruchomienia po utworzeniu kompleksu nierozpuszczalnego w wodzie. Berger i wsp. (110) badali odtwarzanie kompleksów lipoproteidowych ze składników wydzielonych z błony erytrocytów. Wykonali oni serię eksperymentów stosując zarówno znaczenie spinowe składników białkowych jak i lipidowych. Otrzymane złożone widma wskazywały na wzrost unieruchomienia po utworzeniu kompleksu. Stosunek lipid/białko w kompleksie lipoproteidowym może być zmieniany przez dodanie różnych ilości $MgCl_2$ do roztworu. Badanie serii tak otrzymanych kompleksów techniką znaczników spinowych wykazało, że wielkość unieruchomienia znacznika w sztucznym kompleksie jest bardzo zbliżona do tej wielkości dla błon naturalnych jeżeli stosunek lipid/białko będzie taki sam (111). Stwierdzono także, że w widmach błon naturalnych występuje szeroka linia świadcząca o obecności silnie unieruchomionego składnika. Linia taka nie pojawiała się gdy odtwarzano kompleks ze składników uprzednio wydzielonych z błony.

VII. Błony biologiczne

Zastosowanie znaczników spinowych do naturalnych błon staje się coraz powszechniejsze jakkolwiek otrzymywane wyniki są trudne do interpretacji. Jedną z metod znakowania w badaniach błon biologicznych jest biosyntetyczne wprowadzanie znacznika spinowego. Jeżeli w środowisku w czasie wzrostu bakterii będzie znajdował się znacznik spinowy (np. 12-doksylostearynian) to później wykrywa się go we frakcji lipidowej ekstrahowanej z komórki (8, 113). Znakowanie można też przeprowadzić metodą dyfuzji, przez umieszczenie błony w środowisku zawierającym znacznik spinowy (111). Dokładniejsze badania wykazały istnienie nieznaczących różnic w strukturze błon biologicznych nie zawierających i zawierających znaczniki spinowe (114, 8). Jest to jedna z przyczyn trudności interpretacji widm znakowanych błon naturalnych. Białka będące składnikami błony mogą być znaczone spinowo w warunkach zbliżonych do fizjologicznych bez naruszenia struktury błony. Błony znaczone w ten sposób były stosowane w badaniach wpływu pH oraz innych czynników na strukturę i funkcję błony (115, 116, 117).

Niektóre z metod stosowanych w badaniach makrocząsteczek mogą być bezpośrednio przeniesione do badania błon biologicznych. Szczególnie przydatne jest wprowadzanie znacznika spinowego w ściśle określone miejsca błon wykorzystując analogi substratów (118) do badania aktywności enzymatycznych błony, co pozwala na przykład badać ruchliwość i orientację składników w różnych obszarach błony (111, 119). W badaniu błon naturalnych wykorzystano też znajomość zmian widma znacznika spinowego pod wpływem różnych środowisk (120, 121), (Ryc. 23).



Ryc. 23. Podział znaczników spinowych między fazę wodną i węglowodorową.

(a) widmo EPR znacznika w nerwie błędnym królika (120), (b) widmo EPR znacznika spinowego w zewnętrznych segmentach pręcików siatkówki wołu (121). Szczyt A linii wysokopolo-
lowej pochodzi od znacznika w środowisku hydrofobowym a szczyt B od znacznika w środo-
wisku wodnym

Jak widać na podstawie przytoczonych przykładów, wprowadzona przed paru laty, technika znaczników spinowych mimo znacznych trudności w analizie wyników znalazła już szerokie zastosowanie do rozwiązywania różnych problemów w dziedzinie badań makrocząsteczek, jak również błon modelowych i biologicznych. Nowe możliwości otwierające się przed tą techniką w związku z zastosowaniem maszyn cyfrowych do analizy wyników pozwalają przypuszczać, że stanie się ona nowym narzędziem w badaniach biochemicznych uzupełniając inne metody spektroskopowe.

Artykuł nadszedł 4.5.1974, po rewizji autorskiej otrzymano 15.9.1974.

PIŚMIENNICTWO

1. Ohnishi S., McConnell H. M. (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2293—2294.
2. Zawojski E. (1945), *J. Phys. USSR*, **9**, 211—214.
3. Isenberg I. (1964), *Physiol. Rev.*, **44**, 487—517.
4. Swartz H. M. (1972), *Adv. Can. Res.*, **15**, 227—258.
5. Lvov K. M., Kim Yu. A. (1972), *Studia Bioph.*, **33**, 193—200.
6. Nakano N., Otsuka J., Tasaki A. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 355—371.
7. Maskos K. (1973), I Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, Streszczenia Prac, str. 22.
8. Keith A. D., Waggoner A. S., Griffith O. H. (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 819—826.

9. Jost P., Waggoner A. S., Griffith O. H. (1971), *Structure and Function of Biological Membranes*, Rothfield L. J. 83—144, Academic Press, New York, London.
10. McConnell H. M., McFarland B. G. (1970), *Quat. Rev. Biophys.*, **3**, 91—136.
11. Hedvig P., Zentai G. (1969), *Microwave Study of Chemical Structures and Reactions* Akademiai Kiado, Budapest.
12. Blumenfeld L. A., Wojewodski W. W., Siemionow A. G. (1967), *Zastosowanie elektronowego rezonansu paramagnetycznego w chemii*, PWN, Warszawa.
13. Slichter C. P. (1963), *Principles of Magnetic Resonance*, Harper and Row, New York.
14. Stankowski J., Graja A. (1972), *Wstęp do elektroniki kwantowej*, Wyd. Komunikacji i Łączności, Warszawa.
15. Lebediew O. L., Kazarnowski S. N. (1960), *Zur. Obszcz. Chim.* **30**, 1631—1635.
16. Rozantsev E. G., Neiman M. B. (1964), *Tetrahedron*, **20**, 131—137.
17. Brier R., Lemaire H., Rassat A. (1965), *Bull. Soc. Chim. France*, **32**, 3273—3282.
18. Keana J. F. W., Keana J. B., Beetham D. (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3055—3056.
19. Rozantsev E. G., Gołubiew W. A., Neiman M. B., Kokhanov J. V. (1965), *Izw. AN ZSRR Ser. Chim.* str. 572—573.
20. Rozantsev E. G., Gołubiew W. A. (1965), *Izw. AN ZSRR Ser. Chim.*, str. 718—720.
21. Rozantsev E. G. (1970), *Swobodnyje iminoksilne radikały*, Chimiya, Moskwa.
22. Forrester A. R., Hay J. M., Thomson R. H. (1968), *Organic Chemistry of Stable Free Radicals*, Academic Press, New York.
23. Stone T. J., Buckman P., Nordio P. L., McConnell H. M. (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 1010—1017.
24. Freed I. H., Fraenkel G. K. (1963), *J. Chem. Phys.*, **39**, 326—348.
25. Łazariew A. W., Strjukow W. B. (1971), *Doklady AN ZSRR* **197**, 627—630.
26. McCalley R. C., Shimshick E. J., McConnell H. M. (1972), *Chem. Phys. Letters*, **13**, 115—119.
27. Hudson A., Luckhurst G. R. (1969), *Chem. Rev.*, **69**, 191—194.
28. Corvaja C., Giacometti G., Kopple K. D., Ziauddin (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3919—3924.
29. Griffith O. H., Libertini L. J., Birrell G. B. (1971), *J. Phys. Chem.*, **75**, 3417—3425.
30. Snipes W., Cupp J., Cohn G., Keith A. (1974), *Biophys. J.*, **14**, 20—32.
31. Lasman G., Ebert B., Kuznetsow A. N., Damerau W. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 298—304.
32. Likhtenstein G. J., Bobojanov P. C. (1968), *Biofizika*, **13**, 757—764.
33. Kokorin A. J., Zamaraev K. I., Grigoryan G. L., Ivanov V. P., Rozantsev E. G. (1972), *Biofizika*, **17**, 34—41.
34. Kulikow A. W., Likhtenstein G. I., Rozantsev E. G., Suskina V. I., Shapiro A. B. (1972), *Biofizika* **17**, 42—48.
35. Likhtenstein G. I., Grebenshchikov Yu. B., Bobojanov P. H., Kokhanov I. V. (1970), *Mol. Biol.*, **4**, 682—684.
36. Likhtenstein G. I. (1972), *Studia Biophys.*, **33**, 185—192.

37. Leventahl V.I., Backer J. M., Molin Yu. N., Kumarev V. P., Grachev M. A., Knorre D. G., (1972), *FEBS Letters*, **24**, 149—152.
38. McIntosh A. R., Caron M., Dugas H. (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1356—1362.
39. Sukhorukov B. J. (1973), *Studia Biophys.*, **40**, 33—40.
40. Stryer L., Griffith O. H. (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 1785—1791.
41. Hsia J. C., Piette L. H. (1969), *Arch. Bioch. Bioph.*, **132**, 466—469.
42. Hsia J. C., Little J. R. (1973), *FEBS Letters*, **31**, 80—84.
43. Piette L. H., Kiefer E. F., Grossberg A. L., Pressman D. (1972), *Immunochemistry* **9**, 17—22.
44. Hsia J. C., Wong L. T. L., Kalow W. (1973), *J. Immunol. Met.*, **3**, 17—24.
45. Hsia J. C., Piette L. H. (1969), *Arch. Bioch. Bioph.*, **129**, 296—307.
46. Grigorjan G. L., Tatarinowa S. T., Kulberg A. Ja., Kałmanson A. E. Rozantsev E. G., Suskina W. S. (1968), *Doklady AN ZSRR*, **178**, 230—233.
47. Nezlin R. S., Zagjansky Y. A., Kaivarainen A. I., Stefani D. V. (1973), *Immunochemistry*, **10**, 681—688.
48. Kaivarainen A. I., Nezlin R. S., Likhtenstein G. I., Musharina A. Yu., Wolkenstein M. W. (1973), *Mol. Biol.*, **7**, 760—768.
49. Alpert Y., Couder Y., Tuchendler J., Thome H. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 34—37.
50. Ohnishi S., Boeyens J. C. A., McConnell H. M. (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 809—813.
51. Boyens J. C. A., McConnell H. M. (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 22—25.
52. McConnell H. M., Hamilton C. L. (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 776—781.
53. McConnell H. M., Deal W., Ogata R. T. (1969), *Biochemistry*, **8**, 2580—2585.
54. Ogawa S., McConnell H. M. (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 19—26.
55. Ogawa S., McConnell H. M., Horwitz A. (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 401—405.
56. McConnell H. M., Ogawa S., Horwitz A. (1968), *Nature*, **220**, 787—788.
57. Baldassare J. J., Charache S., Jones R. T., Ho C. (1970), *Biochemistry*, **9**, 4707—4713.
58. McConnell H. M. (1971), *Ann. Rev. Bioch.*, **40**, 227.
59. Kaivarainen A. I., Timofeev V. P., Wolkenstein M. W. (1972), *Mol. Biol.* **6**, 875—882.
60. Morrisett J. D., Broomfield C. A. (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7224—7231.
61. Kosman D. J., Piette L. H. (1972), *Arch. Bioch. Bioph.*, **149**, 452—460.
62. Kosman D. J., Piette L. H. (1972), *Arch. Bioch. Bioph.*, **149**, 441—451.
63. Jones R., Dwek R. A., Walker I. O., (1972), *FEBS Letters* **26**, 92—96.
64. Jones R., Dwek R. A., Walker I. O. (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 28—40.
65. Dwek R. A., Griffiths J. R., Radda G. K., Strauss U. (1972), *FEBS Letters* **28**, 161—164.
66. Mushak P., Coleman J. E. (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 373—380.
67. Timofeev V. P., Polyansky O. L., Wolkenstein M. W., Preobrayenskaya O. V., Likhtenstein G. I., Kokhanov Yu. V. (1972), *Mol. Biol.*, **6**, 377—382.
68. Berliner L. J., Miller S. T., Rosa Oy, Royer G. P. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 195—199.
69. Berliner L. J. (1972), *Biochemistry* **11**, 2921—2924.

70. Grigorjan G. L., Korchmazjan M. M., Rozantsev E. G. (1972), *Biofizika*, **17**, 692—693.
71. Chignell C. F., Starkweather D. K., Erlich R. H. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **271**, 6—15.
72. Taylor J. S., Coleman J. E. (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 859—862.
73. Daniel W. E., Morrisett J. D., Harrison J. H., Dearman H. H., Hiskey R. G. (1973), *Biochemistry*, **12**, 4918—4923.
74. Cohn M. (1970), *Quat. Rev. Bioph.*, **3**, 61—91.
75. Campbell J. D., Dwek R. A., Price N. C., Radda G. K., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 339—347.
76. Mushak P., Taylor J. S., Coleman J. E. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **261**, 332—338.
77. Stier A., Sackmann E. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 400—408.
78. Reichman L. M., Annaev B., Rozantsev E. G. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 41—51.
79. Reichman L. M., Annaev B., Rozantsev E. G., Shapiro A. B. (1972), *Chem. Biol. Interaction* **5**, 243—254.
80. Reichman L. M., Annaev B., Mamedniyazov O. N., Rozantsev E. G. (1973), *Biofizika*, **18**, 228—233.
81. Peisach J., Mims W. B. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2979—2982.
82. Ignatiewa L. G., Seregina T. M., Blumenfeld L. A., Ruge E. K., Armjuch R. I., Postnikowa G. B. (1972), *Biofizika*, **17**, 533—536.
83. Seidel J. C., Gergely J. (1973), *Arch. Bioch. Bioph.*, **158**, 853—863.
84. Burley R. W., Seidel J. C., Gergely J. (1972), *Arch. Bioch. Bioph.*, **150**, 792—796.
85. Seidel J. C. (1973), *Arch. Bioch. Bioph.*, **157**, 588—596.
86. Griffith O. H., McConnell H. M. (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 8—11.
87. Oakes J. (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 553—558.
88. Oakes J., Cafe M. C. (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 559—563.
89. Gunnarsson P. O., Nylen U., Pettersson G. (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 47—50.
90. Nalbandjan R. M. (1973) — *Biofizika* **18**, 821—826.
91. Aikazyan V. Ts., Mutuskin A. A., Pshenova K. V., Nalbandyan R. M. (1973), *FEBS Letters*, **34**, 103—105.
92. Slade E. F., Farrow R. H. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 450—458.
93. Achmedow J. D. (1972) (praca doktorska).
94. Keith A. D., Sharnoff M., Cohn G. E. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **300**, 379—419.
95. Waggoner A. S., Griffith O. H., Christensen C. R. (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 1198—1205.
96. Waggoner A. S., Keith A. D., Griffith O. H. (1968), *J. Phys. Chem.*, **72**, 4129—4132.
97. Ohnishi S., Cyr T. J. R., Fukushima H. (1970), *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **43**, 673—676.
98. Waggoner A. S., Kingsett T. J., Rottschaefter S., Griffith O. H., Keith A. D. (1969), *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 245—248.
99. Hsia J. C., Schneider H., Smith J. C. P. (1970), *Chem. Phys. Lipids*, **4**, 238—242.
100. Barrat M. D., Green D. K., Chapman D. (1969), *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 140—147.

101. Hubbel W. L., McConnell H. M. (1971), *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 314—326.
102. Kornberg R. D., McConnell H. M. (1971), *Biochemistry*, **10**, 1111—1120.
103. Falle H. R., Luckhurst G. R., Lemaire H., Marechal Y., Rassat A., Rey P. (1966), *Mol. Phys.*, **11**, 49—53.
104. Ferruti P., Gill D., Harpold M. A., Klein M. P. (1969), *J. Chem. Phys.*, **50**, 4545—4550.
105. Seelig J. (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3881—3887.
106. Libertini L. J., Waggoner A. S., Jost P. C., Griffith O. H. (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 13—19.
107. Hsia J. C., Schneider H., Smith J. C. P. (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 399—402.
108. Jost P., Libertini L. J., Hebert V. C., Griffith O. H. (1971), *J. Mol. Biol.*, **59**, 77—98.
109. Barrat M. D., Green D. K., Chapman D. (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 20—27.
110. Berger K. U., Barrat M. D., Kamat V. B. (1970), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1273—1280.
111. Rottem S., Hubbel W. L., Hayflich L., McConnell H. M. (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 104—113.
112. Gotto A. M., Kon H., Birnbaumer M. E. (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 145—151.
113. Tourtellote M. E., Branton D., Keith A. (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 909—916.
114. Keith A. D., Bulfield G., Snipes W. (1970), *Biophys. J.*, **10**, 618—629.
115. Chapman D., Barrat M. D., Kamat V. B. (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **173**, 154—157.
116. Landgraf W. C., Inesi G. (1969), *Arch. Bioch. Bioph.*, **130**, 111—118.
117. Holmes D. E., Piette L. H. (1970), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **173**, 78—79.
118. Morriset J. D., Broomfield C. A., Hackley B. E. (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 5758—5761.
119. Hubbell W. L., McConnell H. M. (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 20—27.
120. Hubbell W. L., McConnell H. M. (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 12—16.
121. Waggoner A. S., Stryer L. (1971), (wyniki nieopublikowane cyt. wg 9).

ANDRZEJ WIERASZKO *

Regulacja biosyntezy acetylocholin

Regulation of the Biosynthesis of Acetylcholine

Główna rola ACh w organizmach żywych polega na pełnieniu funkcji neurotransmitera, czyli substancji biorącej udział w przekazywaniu impulsów nerwowych (1, 2). Problem ten jest od dawna intensywnie badany.

Zadaniem niniejszego artykułu jest zaznajomienie czytelnika z najnowszymi poglądami dotyczącymi biosyntezy, magazynowania i wydzielania ACh w zakończeniu nerwowym.

I. Izolowanie i właściwości zakończeń nerwowych

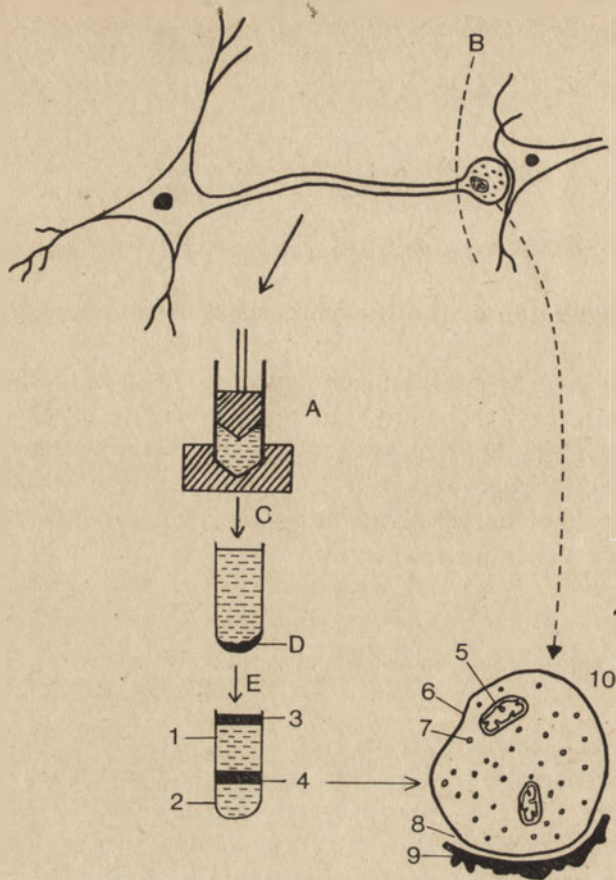
W czasie homogenizacji tkanki mózgowej w środowisku izotonicznym (np. w 0,32M sacharozie) zakończenia nerwowe odrywają się tworząc zamknięte struktury otoczone plazmatyczną błoną zakończenia nerwowego. Struktury te, których powstawanie przypomina proces formowania się mikrosomów z siateczki endoplazmatycznej (3) zaobserwowali po raz pierwszy pod mikroskopem elektronowym Gray i Whittaker w 1962 roku (4). W 1964 roku Whittaker i wsp. (5) zaproponowali dla tych struktur nazwę „synaptosomy”, przyjętą teraz ogólnie.

Stosując technikę wirowania w gradiencie stężeń można wyizolować frakcję synaptosomalną, zawierającą głównie presynaptyczną część zakończenia nerwowego i błonę postsynaptyczną. Schemat powstawania i izolowania synaptosomów przedstawia rycina 1.

Synaptosomy zawierają jedno lub kilka mitochondriów, pęcherzyki synaptyczne (sferyczne struktury wypełnione neurotransmiterem, którym

* Mgr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: ACh — acetylocholina; ChAc — acetylotransferaza cholinowa (2.3.1.6. 0-acetylotransferaza acetyloCoA : cholina); AChE — esteraza acetylocholinowa (3.1.1.7. hydrolaza acetylocholinowa); HC-3 — hemicholinium-3; CoA — koenzym A; AcetyloCoA — acetylokoenzym A; DNP-2,4 — dwunitrofenol; HRP — peroksydaza chrzanowa.



Ryc. 1. Schemat powstawania i izolowania synaptosomów

A — homogenizacja w 0,32 M sacharozie w homogenizatorze z tłokiem teflonowym, B — miejsce odrywania się zakończeń nerwowych w czasie homogenizacji, C — kilkakrotne wirowania różnicowe ($1000 \times g \times 10$ min) w celu otrzymania surowej frakcji synaptosomalnej, D — osad surowej frakcji synaptosomalnej, E — wirowanie surowej frakcji synaptosomalnej w gradiencie stężeń sacharozы ($53\,000 \times g \times 2$ h); 1 — 0,8 M sacharozы, 2 — 1,2 M sacharozы, 3 — mielina, 4 — frakcja synaptosomalna, 5 — mitochondrion, 6 — błona plazmatyczna otaczająca synaptosom, 7 — pęcherzyk synaptyczny, 8 — szczelina synaptyczna, 9 — część błony postsynaptycznej, 10 — synaptosom

w przypadku układu cholinergicznego jest ACh) i synaptoplazmę (cytoplazmę zakończenia nerwowego).

Wiele własności synaptosomów, takich jak zachowanie cyklu glikolizy, aktywne gromadzenie potasu, reagowanie uwolnieniem neurotransmitera na stymulację chemiczną np. przy pomocy jonów K^+ , lub elektryczną sprawia, że stanowią one bardzo dogodny materiał do śledzenia procesów charakterystycznych dla zakończenia nerwowego. Badania prowadzi się zarówno metodami biochemicznymi, jak i przy pomocy mikroskopu elektronowego. Wyniki otrzymane tymi różnymi metodami wykazują bardzo dużą zgodność i uzupełniają się nawzajem.

Rozdzielenie w gradiencie stężeń sacharozy frakcji synaptosomów na podfrakcje, zawierające pęcherzyki synaptyczne i błony zakończenia nerwowego umożliwiło zbadanie chemicznego składu tych struktur (5).

II. Subkomórkowa lokalizacja i mechanizm działania acetylotransferazy cholinowej

II-1. Rozmieszczenie acetylotransferazy cholinowej w zakończeniu nerwowym

Występowanie ChAc, jak i obecność ACh uważana jest za główny wskaźnik neuronów cholinergicznyczn. wydzielających ACh (6).

W celu zlokalizowania miejsca biosyntezy ACh należało w pierwszym rzędzie ustalić subkomórkowe rozmieszczenie ChAc. Problem ten w połowie lat 60-tych podzielił badaczy zajmujących się tym zagadnieniem na dwie grupy. De Robertis i wsp. (7) stosując technikę wirowania różnicowego stwierdzili występowanie ChAc jako enzymu związanego z pęcherzykami synaptycznymi. Odmienne wyniki otrzymał Whittaker (5). Stosując technikę wirowania w gradiencie stężeń sacharozy stwierdził obecność ChAc w synaptoplazmie. Doświadczenia innych autorów nie wyjaśniły powyższego spornego zagadnienia (3, 8, 9, 10). Dopiero praca Fonnum (11) rzuciła więcej światła na przyczyny rozbieżności w wynikach otrzymywanych w różnych pracowniach. ChAc, jako białko o stosunkowo niskim ciężarze cząsteczkowym — 65 000 (12) może łatwo zmieniać swoje powinowactwo do błon biologicznych przy nieznacznych nawet różnicach w wartości pH i siły jonowej. W warunkach fizjologicznych enzym powinien zatem występować w stanie rozpuszczalnym (11). Wyniki innych autorów (3, 8, 9, 10) wskazywały jednak, że nawet przy takiej samej sile jonowej i pH, ChAc pochodząca z odmiennych gatunków zwierząt była w różnym stopniu wiązana przez błony. Fakt ten tłumaczyć można (11) różnym powinowactwem enzymu do błon w zależności od gatunku zwierzęcia (11). Wnioskowanie to uzasadnia Fonnum wynikami własnych badań nad stopniem adsorpcji częściowo oczyszczonej ChAc na wymienniaczu jonowym — CM-Sephadex (13). Dla wyliczenia stosunku pomiędzy ilością enzymu zaadsorbowanego na wymienniaczu a ilością enzymu niezwiązanego z wymienniaczem wprowadzono współczynnik D:

$$D = \frac{(\% \text{ ChAc})_a}{(\% \text{ ChAc})_b} \quad \begin{array}{l} (\% \text{ ChAc})_a \text{ — } \% \text{ enzymu zaadsorbowanego na ży-} \\ \text{wicy} \\ (\% \text{ ChAc})_b \text{ — } \% \text{ enzymu niezwiązanego z wymie-} \\ \text{niaczem} \end{array}$$

Wartości D oznaczone dla zwierząt różnych gatunków i przy różnym pH przedstawia tabela 1.

Jak wynika z definicji współczynnika D, im wyższa jest jego wartość tym więcej enzymu adsorbuje się na wymienniaczu. Na wielkość współ-

czynnika D wywiera wpływ zarówno pH jak i siła jonowa. W zależności od stopnia wiązania się enzymu z wymienniczym, ChAc pochodzącą z różnych gatunków zwierząt można uszeregować w następujący sposób: ChAc świnki morskiej \leq ChAc gołębia \leq ChAc kota \leq ChAc szczura (11, 14). Enzym pochodzący z mózgu świnki morskiej i gołębia posiada znacznie słabszy ładunek dodatni (słabsze wiązanie z wymienniczym) i niższy punkt izoelektryczny niż enzym pochodzący z mózgu kota i szczura.

Tabela 1

Współczynnik D dla ChAc pochodzącej z mózgu różnych gatunków zwierząt (13)

Bufor fosforanowo-sodowy stężenie (mM)		pH	Świnka morska	Gołąb	Szczur	Kot
25		6,6	3,5	4,7	21,0	18,5
25		7,0	1,0	1,6	10,2	13,9
25		7,3	0,3	0,8	3,5	2,1
12		7,0	2,3	6,9	14,7	17,3
48		7,0	0,3	0,3	1,7	2,3

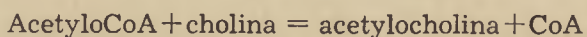
Stwierdzono, że ChAc z mózgu szczura występuje w postaci trzech form molekularnych, natomiast w mózgu gołębia i świnki morskiej istnieje tylko jedna forma tego enzymu (15).

Dane te mogłyby sugerować, że problem subkomórkowej lokalizacji ChAc został ostatecznie rozstrzygnięty. Jednakże ostatnio wykazano (16), że niezależnie od istnienia różnych form molekularnych, ChAc w mózgu szczura występuje w postaci dwóch frakcji: słabiej związanej z błonami (o punkcie izoelektrycznym 7,1—7,9) i mocniej związanej z błonami (o punkcie izoelektrycznym 7,9—8,5). Niewykluczone, że te dwie frakcje posiadają odmienną lokalizację subkomórkową w zakończeniu nerwowym. Fizjologiczne znaczenie tego zjawiska będzie omówione w dalszej części artykułu.

Lokalizację ChAc można badać przy użyciu histochemicznej metody opracowanej w 1969 roku (17), jednakże warunki oznaczeń histochemicznych zmieniają właściwości, a być może i lokalizację enzymu (18, 19), co ogranicza stosowalność tej metody.

II-2. Mechanizm działania acetylotransferazy cholinowej

ChAc katalizuje reakcję, w której z dwóch substratów (acetyloCoA i cholina) powstają dwa produkty (ACh i CoA). Przebieg reakcji przedstawia równanie:



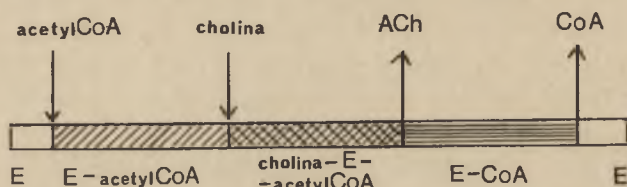
Zgodnie z nomenklaturą wprowadzoną przez Clelanda (20, 21, 22) reakcja katalizowana przez ChAc może przebiegać według mechanizmu „ping-pong”, lub zgodnie z mechanizmem sekwencyjnym. Wyniki badań dotyczące mechanizmu reakcji przedstawione w tabeli 2 otrzymano stosując częściowo oczyszczone preparaty ChAc.

Tabela 2

Porównanie mechanizmu reakcji ChAc pochodzącej z mózgu różnych tkanek ssaków i z bakterii

Źródło enzymu	Mechanizm reakcji	Piśmiennictwo
Łożysko ludzkie	sekwencyjny	(23)
Mózg szczura	sekwencyjny	(14)
Prądkowie z mózgu wołu	sekwencyjny	(24)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	sekwencyjny	(25)
Jądro ogoniaste z mózgu cielęcia	sekwencyjny uporządkowany	(26)
Łożysko ludzkie	ping-pong	(27)

Wszyscy autorzy, z wyjątkiem Schuberttha (27) uzyskali dane wskazujące na sekwencyjny mechanizm reakcji, który schematycznie można przedstawić jak na rycinie 2.



Ryc. 2. Mechanizm reakcji ChAc przedstawiony w myśl założeń Clelanda. Modyfikacja schematu (24)

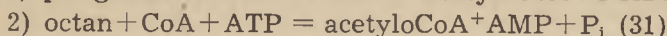
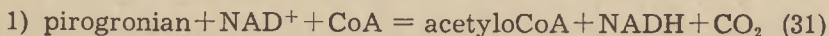
Oba substraty (acetyloCoA i cholina) przyłączają się do enzymu zanim uwolni się którykolwiek z produktów. Niektórzy autorzy (26) sugerują uporządkowany mechanizm sekwencyjny, w którym acetyloCoA byłby pierwszym przyłączającym się substratem. Rozumowanie takie uzasadniają fakty wskazujące, że w czasie reakcji katalizowanej przez ChAc powstaje pośredni kompleks acetyloCoA—enzym (26, 28), którego ilość zmniejsza się w obecności choliny (26). Wyższa wartość K_m dla acetyloCoA niż dla choliny również przemawia za tym, że acetyloCoA przyłącza się pierwszy do enzymu (24). W powstawaniu przejściowego kompleksu — zacetylowanego białka enzymatycznego — istotną rolę może odgrywać pierścień imidazolu znajdujący się w centrum aktywnym ChAc (26, 29). Jego rola polegałaby na wytwarzaniu wiązania tioestrowego z resztą acetyloCoA (28).

II-3. Wpływ stężenia substratów na szybkość biosyntezy acetylocholin

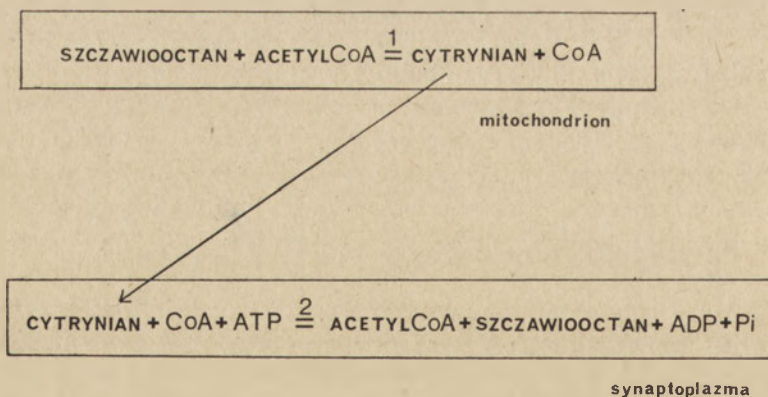
Nie znamy dotychczas dokładnie mechanizmów regulacji biosyntezy ACh. Hamowanie na drodze sprzężenia zwrotnego poprzez produkty reakcji, a zwłaszcza przez ACh jest problemem spornym (14, 23, 24, 25). Tak więc aktywność ChAc spada o 50% dopiero przy stężeniu ACh przekraczającym 100mM (30). Stężenie tego rzędu rzeczywiście występuje w pęcherzykach synaptycznych, podczas gdy stężenie ACh w synaptoplazmie (3mM) jest zbyt niskie, aby hamować przebieg tej reakcji.

Drugi produkt reakcji — CoA — wpływa na syntezę ACh na drodze hamowania kompetycyjnego w stosunku do acetyloCoA (24). Oddziaływania tego typu nie stwierdzono dla pary ACh-cholina, wydaje się więc, że istotną rolę w regulacji biosyntezy ACh odgrywa stosunek stężeń CoA do acetyloCoA. Fakt ten sprawia, że biosynteza ACh zależy w znacznym stopniu od procesów zachodzących w mitochondriach.

Podając dokomorowo różne substraty znakowane ^{14}C najwyższe wbudowanie izotopu do grupy acetylowej ACh mózgu stwierdzono, gdy donorem był znakowany pirogronian ($2\text{-}^{14}\text{C}$). Inkorporacja była mniejsza, gdy stosowano octan (31). Reakcje, w których ze wspomnianych substratów powstaje acetyloCoA, przedstawiają następujące równania:



Układy enzymatyczne katalizujące obie powyższe reakcje znajdują się w mitochondriach. Istnieją cztery możliwe drogi przejścia jednostki dwuwęglowej z mitochondrionu do cytoplazmy (32): 1) dyfuzja acetyloCoA, 2) dyfuzja wolnego octanu, 3) przenoszenie reszty octanowej w formie acetylkarnityny, 4) dyfuzja wolnego cytrynianu. Najbardziej prawdopodobne wydaje się przenoszenie reszty octanowej z mitochondrionu do sy-



Ryc. 3. Schemat przenoszenia reszty octanowej z mitochondrionu do synaptoplazmy
 1 — syntetaza cytrynianowa (E.C. 4.1.3.7. szczawiooctano-liaza cytrynianu), 2 — liaza ATP cytrynianowa (E.C. 4.1.3.8. szczawiooctano-liaza ATP : cytrynian)

naptoplazmy w formie cytrynianu (33). Przebieg tego procesu ilustruje rycina 3.

Aktywność liazy cytrynianowej w synaptoplazmie wynosi jedynie 3% aktywności ChAc (32). Jak z tego wynika, wydajność reakcji dostarczającej acetyloCoA (reakcja 2, rycina 3) nie wystarcza do zabezpieczenia optymalnego stężenia acetyloCoA do biosyntezy ACh i problem ten wymaga dalszych badań.

Cholina — drugi substrat do biosyntezy ACh powstaje głównie w wątrobie, skąd przedostaje się do krwioobiegu. Bariere krew—mózg przenika jako fosfatydylocholina (34, 35). Po degradacji do wolnej choliny dociera do miejsca biosyntezy ACh, to jest do komórki nerwowej (36). Istotnym źródłem choliny jest również zjawisko tzw. wychwytu (ang. *reuptake*) polegające na pobieraniu przez komórkę nerwową choliny pochodzącej z wydzielonej i następnie rozłożonej enzymatycznie acetylocholin. Badania frakcji synaptosomalnej z mózgu szczura i świnki morskiej wykazały istnienie w błonie otaczającej synaptosom dwóch systemów do pobierania choliny (37, 38). Pierwszy układ, o dużym powinowactwie do tego substratu (K_m rzędu kilku μM) (38) ulega w znacznym stopniu stymulacji przez fizjologiczne stężenie jonów Na^+ i hamowaniu przez HC—3 (36). Działanie drugiego układu o niskim powinowactwie do choliny (K_m rzędu kilkudziesięciu μM — 38) nie zależy od stężenia jonów Na^+ , a HC—3 w znacznie mniejszym stopniu hamuje jego czynność. Układ o wysokim powinowactwie do choliny jest charakterystyczny dla zakończeń nerwowych, w których substancją przekaźnikową jest ACh i prawdopodobnie dostarcza substratu dla syntezy tego neurotransmitera (38, 39). Układ o niskim powinowactwie występuje również w synaptosomach niecholinergicznym (38). Oba układy działają niezależnie od siebie (39). Stwierdzono, że w czasie długotrwałego drażnienia płytki nerwowo-mięśniowej mitochondria i pęcherzyki synaptyczne ulegają częściowemu rozpadowi. Błony tych struktur mogą w takich warunkach stać się również źródłem choliny (40, 41, 42).

Całkowita ilość ACh w zakończeniu nerwowym, jak i szybkość jej metabolizmu zależy w znacznym stopniu od stosunku aktywności enzymu syntetyzującego i rozkładającego tę substancję przekaźnikową. ChAc i AChE występujące w obwodowym układzie nerwowym są syntetyzowane w ciele komórki i transportowane wzdłuż aksonu do zakończenia nerwowego (43, 44, 45). Również w układzie ośrodkowym występuje transport tych enzymów z ciała komórki nerwowej do jej zakończeń (46, 47, 48). Czynniki regulujące aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm ACh badano między innymi w hodowlach tkanki nerwowej (49, 50). Stwierdzono (49), że niektóre substancje, takie jak bromodeoksyurydyna — związek wywołujący formowanie się aksonów i dendrytów w hodowlach tkankowych — wpływał na wzrost aktywności obu enzymów. Natomiast podanie cyklicznego AMP lub adeniny powodowało wzrost

aktywności AChE i spadek aktywności ChAc. Powyższe spostrzeżenia wskazują na możliwość niezależnej regulacji aktywności AChE i ChAc, co może stanowić dodatkowy czynnik kontrolujący biosyntezę tego neurotransmitera.

III. Lokalizacja acetylocholin w zakończeniu nerwowym

III-1. Charakterystyka frakcji acetylocholin

W zakończeniu nerwowym ACh występuje w postaci dwóch równych co do wielkości frakcji (41). Różnią się one lokalizacją i szybkością metabolizmu (5, 51, 52). Pierwsza frakcja zawarta w pęcherzykach synaptycznych stanowi tzw. stabilnie związaną ACh. Drugą frakcją, łatwo uwalnianą się z synaptosomów w czasie ich pęknięcia pod wpływem szoku osmotycznego, określa się jako labilnie związaną ACh (synaptoplazmatyczną). Ponieważ zagadnienie subkomórkowej lokalizacji ChAc nie zostało dotychczas wyjaśnione, nie wiadomo, czy ACh stabilnie związana z pęcherzykami synaptycznymi powstaje w bezpośrednim ich sąsiedztwie, np. na ich błonie, czy też w synaptoplazmie. W tym ostatnim przypadku ACh musiałaby ulegać przenoszeniu z synaptoplazmy do pęcherzyka synaptycznego, który jest miejscem jej magazynowania.

III-2. Budowa, powstawanie i rola pęcherzyków synaptycznych

Pęcherzyki synaptyczne są kulistymi strukturami o średnicy około 50 nm. W organie elektrycznym drętwy (*Torpedo marmorata*) wielkość ich dochodzi do 80—90 nm (53). Ilość pęcherzyków w pobliżu błony płytki nerwowo-mięśniowej wynosi u szczura i człowieka 220—250/ μ^2 (54). Proces powstawania pęcherzyków synaptycznych badano zarówno przy pomocy mikroskopu elektronowego (55, 56) jak również metodami biochemicznymi (57, 58, 59). Otrzymane wyniki wskazują, że pęcherzyki synaptyczne mogą powstawać przez wpuklenie błony presynaptycznej. Nie wykluczone, że również gładkie błony siateczki endoplazmatycznej uczestniczą w procesie formowania się tych struktur (60).

Powstawanie pęcherzyków zależy od stanu funkcjonalnego komórki (61). Podawanie *in vitro* DNP (czynnika rozprzegającego oksydacyjną fosforylację) powoduje spadek ilości pęcherzyków synaptycznych w zakończeniu nerwowym i zanik postsynaptycznego potencjału pobudzającego. Ilość mitochondriów w pobliżu płytki nerwowo-mięśniowej wzrasta przy długotrwałym drażnieniu, a morfologia ich ulega przy tym istotnym zmianom (40, 60). Podanie HC-3, związku hamującego transport cholinę do zakończeń nerwowych, przy jednoczesnym drażnieniu płytki nerwowo-mięśniowej obniża bardzo gwałtownie ilość pęcherzyków (62, 40). Zaobser-

wowano również, że w czasie tego procesu zmienia się objętość i kształt tych struktur (40, 42, 60), a także wzrasta liczba pęcherzyków będących w kontakcie (60) lub w stanie fuzji z błoną presynaptyczną (63). Fakty te sugerują, że zjawisko powstawania i zanikania pęcherzyków synaptycznych w zakończeniu cholinergicznym jest ściśle związane z procesem wydzielania ACh.

IV. Wydzielanie acetylocholin

IV-1. Wydzielanie pęcherzykowej i synaptoplazmatycznej acetylocholin

Z doświadczeń elektrofizjologicznych (64, 65) wiadomo, że na błonie presynaptycznej ACh jest wydzielana w postaci porcji—kwantów. Wydawało się wielce prawdopodobne, że pęcherzyk synaptyczny stanowi morfologiczny odpowiednik kwantu i zawiera tę właśnie najmniejszą ilość substancji przekąźnikowej, która może być uwolniona w synapsie.

Liczba cząsteczek ACh tworzących kwant oszacowana na podstawie badań elektrofizjologicznych wynosi około 10^5 (66, 67, 68). Na podstawie objętości, jaką zajmuje jedna cząsteczka krystalicznego chlorku acetylocholin obliczono, że ilość substancji przekąźnikowej, jaka może się zmieścić w jednym pęcherzyku wynosi 45 000 (69) i 63 000 (33). Według *Whittakera* (53) w jednym pęcherzyku ośrodkowego układu nerwowego mieści się około 2000 cząsteczek ACh, a w pęcherzyku z organu elektrycznego drętwy (*Torpedo marmorata*)—40 000 (53). Dla nerwu przeponowego wartość tę określa się na 15 000—30 000 cząsteczek ACh (33).

Z badań z zastosowaniem znakowanej cholin jako prekursora ACh wynika, że ACh synaptoplazmatyczna metabolizuje się szybciej i jest szybciej wydzielana niż ACh pęcherzykowa (51, 70, 71, 72). Fakty te przeczą pogładowi, w myśl którego pęcherzyk synaptyczny byłby odpowiednikiem kwantu. Pojawiło się więc pytanie, co sprawia, że neurotransmitter jest mimo wszystko wydzielany w odrębnych porcjach.

Z badań nad narządem elektrycznym ryb (73, 74, 75, 76, 77, 78) jak i nad układem ośrodkowym (79, 80, 81, 82, 83) wynika, że wydzielona w czasie impulsu ACh pochodzi z oddzielnej, trzeciej frakcji. *Whittaker* (81) sugeruje, że ta szybko wydzielana labilna ACh mogłaby mieścić się w oddzielnej puli pęcherzyków synaptycznych, znajdujących się w pobliżu błony presynaptycznej, charakteryzujących się krótkim okresem półtrwania. Labilność tej frakcji powoduje, że w czasie homogenizacji tkanki ACh uwalnia się z pęcherzyków i przechodzi do frakcji synaptoplazmatycznej. Miejscem magazynowania neurotransmitera byłyby natomiast druga pula pęcherzyków, o dłuższym okresie półtrwania.

Biorąc pod uwagę wyniki prac *Whittakera* (79, 80, 81), jak również dane dotyczące możliwości syntezy ACh przez pęcherzyki synaptycz-

ne (84, 85, 86) można zasugerować następujący model zjawisk dotyczących syntezy i magazynowania ACh w zakończeniu nerwowym.

Większa część ACh powstaje według tej hipotezy w synaptoplazmie przez luźno związaną frakcję ChAc. Stężenie ACh jest tu tak niskie (3mM), że nie hamuje aktywności enzymu, a zsyntetyzowana ACh ulega nagromadzeniu głównie w pęcherzykach o krótkim okresie półtrwania, stanowiących jednocześnie źródło szybko wydzielanej ACh.

W pęcherzykach o długim okresie półtrwania możliwość syntezy ACh warunkować może obecność mocno związanej frakcji ChAc. Jednakże wysokie stężenie ACh w tych pęcherzykach (150mM) musiałoby ograniczać jej syntezę. Wnikająca do zakończenia nerwowego cholina stanowiłaby przeto przede wszystkim prekursor szybko syntetyzowanej ACh, gromadzonej w pęcherzykach o krótkim okresie półtrwania.

Model powyższy może tłumaczyć wyniki otrzymane dzięki badaniom biochemicznym, w których stosowano radioaktywną cholinę (71, 72). W czasie pobudzenia stwierdzono w pierwszym rzędzie wydzielanie radioaktywnej ACh, której lokalizację ustalono jako synaptoplazmatyczną. Według przedstawionego modelu nie byłaby to jednak ACh synaptoplazmatyczna, a frakcja pochodząca z pęcherzyków o krótkim okresie półtrwania.

Rozbieżności istniejące pomiędzy wynikami uzyskanymi metodami biochemicznymi i elektrofizjologicznymi odmiennie niż w przedstawionym modelu, tłumaczą Marchbanks i Israël (73). Zakładają oni istnienie w jednym pęcherzyku dwóch różnie rozmieszczonych frakcji ACh: jednej o długim okresie półtrwania zlokalizowanej wewnątrz pęcherzyka, i drugiej, o krótkim okresie półtrwania, znajdującej się na zewnętrznej powierzchni pęcherzyka. Trudno jednak przy takim założeniu wyobrazić sobie, w jaki sposób te dwie frakcje ACh byłyby niezależnie gromadzone i wydzielane.

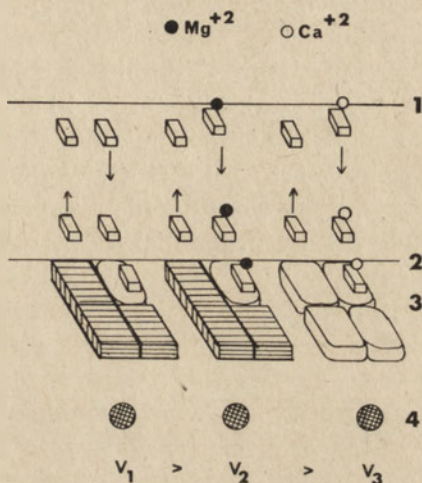
Zarówno badania pochodzące z pracowni Whittakera (79, 81), jak i pracowni Israëla (73, 75) dotyczące omawianego problemu są nowe, fragmentaryczne i często dostarczają nawzajem sprzecznych wyników.

III-2. Rola jonów, ATP i białek w wydzielaniu acetylocholiny

Uwolnienie ACh do szczeliny synaptycznej może nastąpić jedynie w określonych miejscach błony presynaptycznej (87). Warunkiem koniecznym dla przebiegu tego procesu jest obecność jonów Ca^{+2} (68, 87, 88), jednakże jony Sr^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} i Na^{+} również mogą odgrywać w tym zjawisku pewną rolę (89, 90, 91, 92). Hipotetyczny model mechanizmu działania jonów Ca^{+2} przedstawia rycina 4.

Na wewnętrznej powierzchni błony presynaptycznej istnieją miejsca receptorowe dla pęcherzyków synaptycznych składające się z czterech podjednostek. Aktywacja miejsca receptorowego, umożliwiająca wyrzuce-

nie zawartości pęcherzyka zachodzi z chwilą połączenia z kompleksem, w skład którego wchodzi hipotetyczny czynnik A i jony Ca^{+2} . Zakłada się, że czynnik A może przemieszczać się wewnątrz błony presynaptycznej przenosząc jony Ca^{+2} . Nie znamy dotąd natury czynnika wiążącego jony Ca^{+2} . W mózgu występują białka wiążące specyficznie jony Ca^{+2} . Należy do nich między innymi białko S-100 (93), a także fosfoproteid wyizolowany z mózgu świnki morskiej (94).



Ryc. 4. Mechanizm działania jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} przy wydzielaniu acetylocholin. Modyfikacja schematu (88)

1 — zewnętrzna powierzchnia błony presynaptycznej, 2 — wewnętrzna powierzchnia błony presynaptycznej, 3 — miejsca receptorowe, 4 — pęcherzyki synaptyczne, V — szybkość wyrzucania transmitera, mały prostopadłościan — czynnik A, duży prostopadłościan — aktywna podjednostka miejsca receptorowego, zakreślony prostopadłościan — nieaktywna podjednostka miejsca receptorowego

Stężenie jonów Ca^{+2} w komórce nerwowej wynosi 10^{-5} M, a stężenie poza komórką jest wyższe i wynosi 1—10mM (95). Aktywne regulowanie stężenia jonów Ca^{+2} przez mitochondria w komórce nerwowej (96, 97), ich wpływ na wydzielanie neurotransmitera (64, 98) i zmianę oporności błony komórkowej (99, 100, 101) świadczą, że jony te odgrywają istotną rolę w regulacji pobudliwości komórki nerwowej.

Szereg hipotez uwzględnia również udział ATP w wydzielaniu ACh. Przykładem może być sugestia *Whittakera* (77, 102), w myśl której w czasie wydzielania ACh główną rolę odgrywa kompleks ACh z ATP i białkiem zasadowym — wesikulina. Hydroliza ATP zapoczątkowuje rozpad kompleksu prowadząc do wydzielania ACh. Autor nie precyzuje, co stanowi impuls do zapoczątkowania hydrolizy ATP.

W modelu zaproponowanym przez *Berla* i wsp. (103) ATP również odgrywa podstawową rolę przy wydzielaniu neurotransmitera. Wyizolowali

oni z frakcji synaptosomalnej mózgu wołu i szczura białko podobne w swych właściwościach do aktomiozyny. Białko to dysocjuje na dwie podjednostki: jedną podobną do aktyny — neurynę (c.cz. 47 000) i drugą podobną do miozyny — steninę (c.cz. 240 000). Autorzy postulują, że w momencie zbliżenia się pęcherzyka do błony presynaptycznej następuje, stymulowana przez jony Ca^{+2} , interakcja związanej z pęcherzykiem steniny i występującej w błonie presynaptycznej neuryny. Zjawisku temu towarzyszy wzrost aktywności ATP-azy. Rozkład ATP jest źródłem energii potrzebnej do morfologicznych zmian w strukturze pęcherzyka i wydzielania transmitera.

Przedstawione powyżej mechanizmy dotyczące wydzielania neurotransmitera pozostają nadal hipotezami. Niektóre z hipotez sugerowane dawniej, w miarę postępu metodyki neurochemicznej okazały się nieaktualne, jak np. hipoteza ogłoszona w 1967 roku (104). W myśl jej założeń pęcherzyki synaptyczne rozpląwałyby się w błonie presynaptycznej. Proces ten umożliwiałaby hydrofobowa część gangliozydów, obecnych w pęcherzykach synaptycznych. Jednakże jak wykazały najnowsze badania (105, 106, 107) oczyszczona frakcja pęcherzyków, w przeciwieństwie do błon plazmatycznych zakończenia nerwowego, nie zawiera gangliozydów.

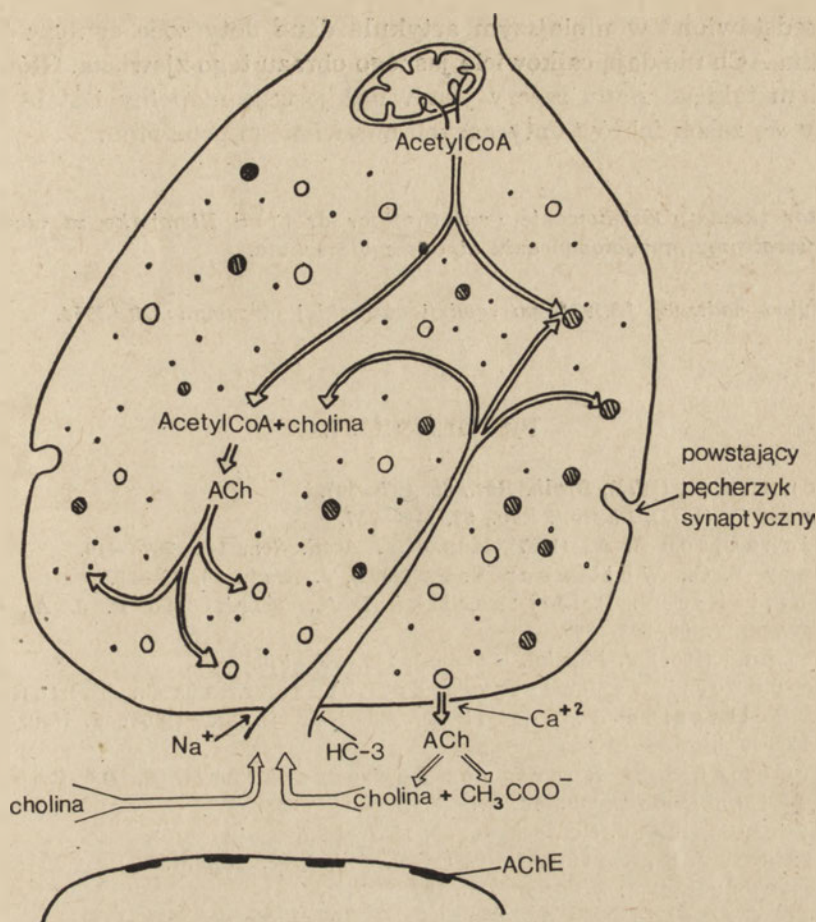
Pogląd, w myśl którego proces wydzielania neurotransmitera w zakończeniu nerwowym podlegałby prawom wymiany jonowej, nie będzie tu omawiany, gdyż wymaga on dalszego udokumentowania doświadczalnego (58, 59).

V. Uwagi końcowe

Wzajemną zależność procesów regulujących biosyntezę i wydzielanie ACh przedstawia rycina 5.

Zależność biosyntezy tego neurotransmitera od stosunku stężeń CoA do acetylCoA powoduje, że stan energetyczny mitochondrionu wpływa na biosyntezę ACh. Brak możliwości syntezy choliney przez komórkę nerwową sprawia, że biosynteza ACh zależy od transportu tego substratu poprzez błonę zakończenia nerwowego. Wpływ jonów Na^{+} na transport choliney posiada zapewne istotne znaczenie fizjologiczne (36).

Występowanie dwóch frakcji ACh w zakończeniu nerwowym (pęcherzykowej i synaptoplazmatycznej) przyjmuje się powszechnie. Sugestia obecności trzeciej, niezwykle labilnej frakcji ACh, posiadającej odrębną lokalizację, wymaga dalszego udokumentowania. Jednakże założenie istnienia tej frakcji pozwala zrozumieć rozbieżności w wynikach otrzymanych metodami biochemicznymi i elektrofizjologicznymi. Występowanie ACh w zakończeniu nerwowym w postaci bardziej i mniej preferowanej do wydzielania w czasie pobudzenia, a także ich różna lokalizacja przypomina układ amin katecholowych (108).



Ryc. 5. Hipotetyczny model biosyntezy, magazynowania i wydzielania acetylocholiny

Na schemacie nie zaznaczono układu o niskim powinowactwie do pobierania choliny; ○ — pęcherzyki synaptyczne nie zawierające ChAc, ⊗ — pęcherzyki synaptyczne zawierające ChAc, \rightarrow — działanie stymulujące, \rightleftharpoons — kierunek przenoszenia substratów i produktów reakcji enzymatycznych, \dashv — działanie hamujące, o — acetylocholina synaptoplazmatyczna.

Na podstawie badań nad subkomórkową lokalizacją ChAc można sądzić, że biosynteza ACh w zakończeniu nerwowym zachodzi zarówno w synaptoplazmie, jak również, w mniejszym stopniu, w powiązaniu z pęcherzykami synaptycznymi. Obecność AChE w części presynaptycznej zakończenia nerwowego nasuwa pytanie, w jakim stopniu enzym ten wpływa na metabolizm ACh w tej części komórki (51). Dane dotyczące regulacji aktywności AChE i ChAc w komórce nerwowej przedstawione w niniejszym opracowaniu dotyczą badań przeprowadzonych na komórkach w hodowli. Wnioski wyciągnięte na ich podstawie nie mogą wobec tego w pełni wyjaśnić procesów zachodzących w zakończeniu nerwowym.

Udział jonów Ca^{+2} w procesie wydzielania ACh, jednomyślnie podkreślany przez wszystkich autorów, omówiono ogólnie. Jest to obszerne zagadnienie i wymaga oddzielnego opracowania.

Przedstawione w niniejszym artykule dane dotyczące syntezy i wydzielania ACh nie dają całkowicie jasnego obrazu tego zjawiska. Głównym powodem takiego stanu rzeczy jest wciąż jeszcze niepełny i stale zmieniający się zasób faktów dotyczących omawianego problemu.

Autor składa podziękowanie Pani Profesor dr Stelli Niemierko za niezwykle cenne uwagi przy przygotowywaniu niniejszego artykułu.

Artykuł nadszedł 8.6.1974, po rewizji autorskiej otrzymano 20.9.1974.

PIŚMIENNICTWO

1. Fonnum F., (1973), *Brain. Res.*, **62**, 497—507.
2. Hebb C., (1972), *Physiol. Rev.*, **52**, 918—957.
3. Michaelson I. A., (1967), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **144**, 387—410.
4. Gray E. G., Whittaker V. P., (1962), *J. Anat.*, **96**, 79—88.
5. Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kirkland R. J. A., (1964), *Biochem. J.*, **90**, 293—303.
6. Hebb C., (1956), *J. Physiol. (London)*, **133**, 566—570.
7. De Robertis E., Rodriguez de Lores Arnaiz G., Salganicoff L., Pellegrine de Iraldi A., Zieher L. M., (1963), *J. Neurochem.*, **10**, 225—235.
8. McCaman R. E., Rodriguez de Lores Arnaiz G., De Robertis E., (1965), *J. Neurochem.*, **12**, 927—935.
9. Tucek S., (1966) *J. Neurochem.*, **13**, 1317—1327.
10. Saelens J. K., Potter L. T., (1966), *Fed. Proc.*, **25**, 451.
11. Fonnum F., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 262—270.
12. Bull G., Feinstein A., Morris D., (1964), *Nature*, **201**, 1326.
13. Fonnum F., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 1095—1100.
14. Potter L. T., Glover V. A. S., Saelens J. K., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3864—3870.
15. Malthe-Sørensen D., Fonnum F., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 229—236.
16. Fonnum F., Malthe-Sørensen D., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1351—1359.
17. Burt A. M., (1970), *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 408—415.
18. Kasa P., Mann S. P., Hebb C. O., (1970), *Nature (London)*, **226**, 812—814.
19. Burt A. M., Silver A., (1973), *Brain Res.*, **62**, 509—516.
20. Cleland W. W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104—137.
21. Śliwowski J., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 447—467.
22. Śliwowski J., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 507—530.
23. Morris D., Maneckjee C. J., Hebb C., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 857—863.
24. Glover V. A. S., Potter L. T., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 571—580.
25. White H. L., Cavallito C. J., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 1579—1589.
26. White H. L., Cavallito C. J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 343—358.
27. Schuberth J., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 470—481.
28. Roskoski R., Jr., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3709—3714.
29. Miroshnichenko V. P., Popova I. A., Severin S. E., (1971), *Biokhimiya* **36**, 1274—1281.
30. Kaita A. A., Goldberg A. M., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 1185—1191.

31. Tucek S., (1970) w *Drugs and cholinergic mechanisms in the CNS* Red. Heilbronn E., Winter A., str. 117—131, Research Institute of National Defence, Stockholm.
32. Nejfach S. A., (1973), w *Mechanizmy integracji przemian komórkowych*, PWN, str. 155.
33. Potter L. T., (1969), w *The structure and Function of Nervous Tissue*, III, red. Bourne W. G. H., str. 105—128, Academic Press, New York.
34. Ansell G. B., Spanner S., (1971), *Biochem. J.*, **122**, 741—750.
35. Davson H., (1967), w *Physiology of the Cerebrospinal Fluid*. Wyd. J. A. Churchill Ltd. London.
36. Guyenet P., Lefresne P., Rossier J., Beaujouan J.-C., Glowński J., (1973), *Brain Res.*, **62**, 523—529.
37. Marchbanks R. M., (1968), *Biochem. J.*, **110**, 533—541.
38. Yamamura H. I., Snyder S. H., (1972), *Science*, **178**, 626—628.
39. Kuhar M. J., Roth R. H., Aghajanian G. K., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 516.
40. Jones S. F., Kwanbunbumpen S., (1970), *J. Physiol.* (London), **207**, 31—50.
41. Whittaker V. P., (1966), w *Mechanisms of release of biogenic amines*, Wenner-Gren Center International Symposium Series, Wyd. U. S. von Euler, S. Rosell, B. Uvnäs, 5, 147—163, Pergamon Press.
42. Csilik B., Bense S., (1971), *Acta Biol. Hung.*, **22**, 131—139.
43. Tucek S., (1968), *Biochem. Biophys. Acta*, **170**, 457—458.
44. Hebb C. O., Waites G. M. H., (1956), *J. Physiol.* (London), **132**, 667—671.
45. Kasa P., Mann S. P., Karcsu S., Toth L., Jordan S., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 431—436.
46. B. Srebro, Oderfeld-Nowak B., Klodos I., Dąbrowska J., Narkiewicz O., (1973), *Life Sci.*, **12**, 261—270.
47. Lewis P. R., Shute C. C. D., Silver A., (1967), *J. Physiol.*, **19**, 215—224.
48. Oderfeld-Nowak B., Narkiewicz O., Dąbrowska J., Wieraszko A., Grądkowska M., (1974), w *Central Nervous System, Studies on Metabolic Regulation and Function*, Wyd. E. Genazzani i H. Herken, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, str. 158—163.
49. Siman-Tov R., Sachs L., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 123—129.
50. Amano T., Richelson E., Nirenberg M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 258—263.
51. Whittaker V. P., (1969), *Progr. Brain Res.*, **31**, 211—222.
52. Beani L., Bianchi C., Megazzini P., Ballotti L., Bernardi G., (1969), *Biochem. Pharm.*, **18**, 1315—1324.
53. Whittaker V. P., (1973), *Naturwissenschaften*, **60**, 281—289.
54. Hubbard J. I., Kwanbunbumpen S., (1968), *J. Physiol.* (London), **194**, 407—420.
55. Gray E. G., Willis R. A., (1970), *Brain Res.*, **24**, 149—168.
56. Jones D. G., Bradford H. F., (1971), *Tissue and Cell*, **3**, 177—190.
57. Turner P. T., Harris A. B., (1973), *Nature*, (London), **242**, 57—58.
58. Uvnäs B., (1973), *Acta Physiol. Scand.*, **87**, 168—175.
59. Bergendorff A., Uvnäs B., (1973), *Acta Physiol. Scand.* **87**, 213—222.
60. Korneliusen H., (1972), *Z. Zellforsch.*, **130**, 28—57.
61. Atwood H. L., Lang F., Morin W. A., (1972), *Science* **176**, 1353—1355.
62. Parducz A., Feher O., Joo F., (1971), *Brain Res.*, **34**, 61—72.
63. Clark A. W., Hurlbut W. P., Mauro A., (1972), *J. Cell. Biol.*, **52**, 1—14.
64. Katz B., (1971), *Science* **173**, 123—126.
65. Eccles J. C., (1968), *Fizjologia synaps nerwowych*, PZWL.
66. Krnjevic K., Mitchell J. F., (1961), *J. Physiol.* (London), **155**, 246—262.

67. Miledi R., (1961), *Discovery* **22**, 442—459.
68. Hubbard J. I., (1970), *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, **21**, 33—124.
69. Canepa F. G., (1964), *Nature*, (London), **201**, 184—185.
70. Schuberth J., Sparf B., Sundwall A., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 461—468.
71. Richter J. A., Marchbanks R. M., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 691—703.
72. Richter J. A., Marchbanks R. M., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 705—712.
73. Marchbanks R. M., Israël M., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 1049—1061.
74. Dunant Y., (1973), *Brain Res.*, **62**, 543—549.
75. Israël M., Hirt L., Mastour-Frachon P., (1973), *C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.*, (Paris), **276**, 2725—2728.
76. Dunant Y., Gautron J., Israël M., Lesbats B., Manaranche R., (1971), *C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.*, (Paris), **273**, 233—236.
77. Dowdall M. J., Boyne A. F., Whittaker V. P., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 1—12.
78. Dowdall M. J., Zimmermann H., (1974), *Brain Res.*, **71**, 160—166.
79. Whittaker V. P., Wykład na II-gim kursie EMBO, Getynga 20—31.X.1973.
80. Chakrin L. W., Marchbanks R., Mitchell J. F., Whittaker V. P., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2727—2736.
81. Barker L. A., Dowdall M. J., Whittaker V. P., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 1063—1080.
82. Molenaar P. C., Polak R. L., Nickolson V. J., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 667—678.
83. Molenaar P. C., Polak R. L., (1973), *Brain Res.*, **62**, 537—542.
84. Guth P. S., (1969), *Nature* (London), **224**, 384—385.
85. Aquilonius S. M., Flentge F., Schuberth J., Sparf B., Sundwall A., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1509—1521.
86. Ritchie A. K., Goldberg A. M., (1970), *Science*, **169**, 489—490.
87. Downie D. E., (1970), *J. Theor. Biol.*, **28**, 297—300.
88. Roshenker S., Rahamimoff R., (1970) *Science*, **170**, 648—649.
89. Dodge F. A. Jr., Miledi R., Rahamimoff R., (1969), *J. Physiol.* (London), **200**, 267—283.
90. Jenkinson D. H., (1957), *J. Physiol.* (London), **138**, 434—444.
91. Meiri U., Rahamimoff R., (1972), *Science* **176**, 308—309.
92. Rahamimoff R., Colomo F., (1967), *Nature*, (London), **215**, 1174—1176.
93. Kessler D., Levine L., Fasman G., (1968), *Biochemistry*, **7**, 758—764.
94. Wolf D. J., Huebner J. A., Siegel F. L., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2855—2862.
95. Barker P. F., (1970), w *Calcium and Cellular Function*, Wyd. A.W. Cuthbert, str. 96—107.
96. Glagolewa I. M., Libermann E. A., Khashaev S. Kh.-M. (1970), *Biofizika*, **15**, 76—83.
97. Carafoli E., Lehninger A. L., (1971), *Biochem. J.*, **122**, 681—690.
98. DeBellerocche J. S., Bradford H. F., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 1817—1819.
99. Llinas R., Blinks J. R., Nichelson C., (1972), *Science*, **176**, 1127—1129.
100. Hallet M., Carbone E., (1972), *J. Cell Physiol.* **80**, 219—226.
101. Meech R. W., (1972) *Comp. Biochem. Physiol.*, **42**, A, 493—499.
102. Whittaker V. P., Essman W. B., Dowe G. H. C., (1972) *Biochem. J.*, **128**, 833—846.
103. Berl S., Puszkin S., Nicklas W. J., (1973), *Science*, **179**, 441—446.
104. Burton R. M., Howard R. E., (1967) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **144**, 411—432.

105. Breckenridge W. C., Morgan I. G., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 253—256.
106. Morgan I. G., Vincendon G., Gombos G., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 671—680.
107. Breckenridge W. C., Morgan I. G., Zanetta J. P., Vincendon G., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 681—686.
108. Glowinski J., (1973) *Brain Res.*, **62**, 489—493.

HANNA WEHR *

Struktura i funkcja lipoproteidów krwi człowieka

Structure and Function of Human Blood Lipoproteins

I. Wstęp

W ciągu ostatnich kilku lat wiedza o budowie i przemianach lipoproteidów krwi uzupełniona została licznymi, nowymi danymi. Główne osiągnięcia tego okresu to: ustalenie składu białkowego poszczególnych klas lipoproteidowych, wyniki badań fizykochemicznych nad konformacją i strukturą czwartorzędową lipoproteidów, odkrycie funkcji koenzymatycznych niektórych z nich, wreszcie liczne nowe fakty dotyczące metabolizmu i wzajemnych przemian tej grupy związków. Do rozwoju nauki o lipoproteidach i do lepszego zrozumienia ich przemian i roli przyczyniły się w bardzo dużym stopniu badania niektórych stanów patologicznych, zwłaszcza wrodzonych chorób związanych z ich metabolizmem.

W bieżącej pracy przedstawiono i omówiono przede wszystkim te dane, które uzupełniły wiedzę o lipoproteidach krwi od czasu poprzedniego artykułu na ten sam temat publikowanego w Postępkach Biochemii w 1966 roku (1).

II. Ogólne własności lipoproteidów

Lipoproteidy osocza lub surowicy ** stanowią mieszaninę różnych lipidów i różnych białek. Odsetkowa zawartość lipidów jest w nich na ogół tym większa im większy ciężar cząsteczkowy oraz wielkość cząsteczki

* Doc. dr hab., Zakład Genetyki, Instytut Psychoneurologiczny, al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

** Skład lipidowy i lipoproteidowy osocza oraz surowicy są identyczne. W dalszych ustępach pracy referowane będą wyniki badań różnych autorów posługujących się tak jednym jak i drugim materiałem.

Wykaz stosowanych skrótów:

VLDL — lipoproteidy o bardzo niskiej gęstości (ang. *very low density lipoproteins*); LDL — lipoproteidy o niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*); HDL — lipoproteidy o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*); VHDL — lipoproteidy o bardzo wysokiej gęstości (ang. *very high density lipoproteins*); LCAT — lecytynowo cholesterolowa transferaza kwasów tłuszczowych (ang. *lecithin cholesterol acyl transferase*).

lipoproteidu. Ze spadkiem zawartości lipidów wzrasta gęstość danej grupy. Lipoproteidy krążą z krwią po całym ustroju i w tym czasie ulegają różnego rodzaju przemianom zarówno nieenzymatycznym jak i enzymatycznym. W wyniku tych reakcji lipoproteidy zmieniają swój skład i jedne odmiany mogą przechodzić w drugie.

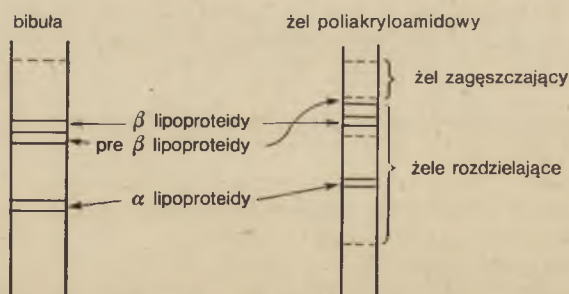
Metody rozdzielania i podział na klasy. Ogólnie przyjęty jest podział lipoproteidów według ich gęstości, oparty na metodzie ultrawierowania. Wielkością charakteryzującą poszczególnej klasy jest stała flotacji oznaczona symbolem S_f (2). W tabelicy 1 przedstawiono zakresy gęstości oraz S_f głównych klas lipoproteidowych: chylomikronów, VLDL, LDL i HDL. Klasy LDL i HDL dzieli się czasem na podgrupy, które również zostały uwidocznione w tabeli.

Tabela 1

Podział lipoproteidów na klasy

Nazwa klasy	d_3 g/cm	S_f^*
Chylomikrony	<0,94	>400
VLDL	0,94—1,006	20—400
LDL	1,006—1,063	0—20
LDL ₁	1,006—1,019	12—20
LDL ₂	1,019—1,063	0—12
HDL	1,063—1,21	
HDL ₂	1,063—1,12	
HDL ₃	1,12—1,21	

Wymienione klasy lipoproteidowe wykazują charakterystyczną ruchliwość elektroforetyczną na bibule, w mieszaninie agarozy i agaru lub w agarozie (3), (4), (5): chylomikrony nie ruszają z miejsca startu, frakcja



Ryc. 1. Schemat rozmieszczenia frakcji lipoproteidowych po rozdiale elektroforetycznym na bibule i żelu poliakrylamidowym

* S_f — stała flotacji przy wirowaniu w roztworze o gęstości 1,063 g/cm³.

LDL posiada ruchliwość beta globulin, HDL zaś ruchliwość alfa globulin, a VLDL zajmują pozycję prebeta. W elektroforezie w żelu poliakrylamidowym klasa VLDL, zgodnie z uszeregowaniem według wielkości cząstek, zajmuje pozycję za frakcją beta lipoproteidów (6), (7). Rycina 1 przedstawia rozmieszczenie frakcji lipoproteidowych po rozdziale elektroforetycznym na bibule oraz w żelu poliakrylamidowym.

Lipoproteidy tworzą w obecności metali dwuwartościowych nierozpuszczalne kompleksy z polianionami (heparyna, siarczan dekstranu, kwas fosforowolframowy). Ta własność jest podstawą licznych metod oznaczania i preparatyki (8).

Skład chemiczny. Tabela 2 przedstawia skład chemiczny różnych klas lipoproteidowych, które podlegają w osoczu przemianom; zestawione dane przedstawiają więc oczywiście wartości przeciętne (9), (10), (11).

Tabela 2

Skład chemiczny lipoproteidów osocza (9), (10), (11)

	Chylomikrony %	VLDL (prebeta) %	LDL (beta) %	HDL (alfa) %
Trójglicerydy	80—95	50—65	7—11	3—8
Cholesterol wolny	1—3	7—12	8	2—3
Cholesterol zestryfikowany	2—5	4—13	37—39	14—20
Fosfolipidy	3—7	15—20	22	22—30
Białko	1—2	8—12	20—25	45—55

Od dawna znany był odmienny skład białkowy HDL i LDL (12). Zastosowano nazwę białka A dla HDL i B dla LDL (13) oraz C dla białka opisanego jako składnik VLDL (14). W 1968 roku Shore i Shore (15) zidentyfikowali w białku A dwa polipeptydy. Praca ta zapoczątkowała w kilku pracowniach bardzo intensywne badania nad komponentami białkowymi lipoproteidów. Obecnie wiadomo już, że poszczególne frakcje lipoproteidowe zawierają mieszaninę polipeptydów, przy czym te same polipeptydy powtarzają się w różnych frakcjach. Nomenklatura polipeptydów nie została dotąd ujednolicona. Niektórzy autorzy stosują nazwy według aminokwasów C końcowych, nie jest to jednak wygodne, ponieważ okazało się, że te same aminokwasy powtarzają się w różnych polipeptydach. W bieżącym artykule stosowana będzie tymczasowa terminologia zachowująca poprzednie symbole białek A, B, i C z dodanym numerem polipeptydu (16), (17).

III. Charakterystyka poszczególnych klas lipoproteidowych

Lipoproteidy o wysokiej gęstości (HDL). Z dwu głównych subklas HDL: HDL₂ i HDL₃ (patrz tablica 1) HDL₂ są lżejsze i większe. Średnica HDL oznaczona na podstawie mikroskopii elektronowej wynosi 95—100Å a HDL₃ 70—75Å (11) a ciężary cząsteczkowe odpowiednio $3,4 \times 10^5$ i $1,75 \times 10^5$ (18). Frakcja HDL występuje w bardzo małej ilości i prawdopodobnie stanowi mieszaninę różnych lipoproteidów (19).

Frakcja o gęstości powyżej 1,21 zawiera również pewną ilość lipidów. Nazwano ją frakcją lipoproteidów bardzo wysokiej gęstości (VHDL) i stwierdzono, że w zakresie gęstości 1,21—1,25 występują cząsteczki o składzie bardzo podobnym do HDL, natomiast subfrakcja o ciężarze właściwym powyżej 1,25 ma już zupełnie odmienny charakter — zawiera prawie wyłącznie kompleksy albuminy z wolnymi kwasami tłuszczowymi (20).

Po usunięciu lipidów z właściwych HDL (o c.wł. 1,063—1,21) białko ich jest dobrze rozpuszczalne w wodzie — najlepiej spośród wszystkich frakcji lipoproteidowych. Dlatego też analiza składu białkowego tej frakcji została wykonana najwcześniej (15), (21), (22). Obecne w białku HDL dwa polipeptydy A I i A II różnią się znacznie składem aminokwasowym, mają zbliżone ciężary cząsteczkowe wynoszące około 15 000 i stanowią razem 85—90% części białkowej HDL. Aminokwasem C końcowym jest w obu z nich glutamina. Polipeptydy te nazywane są również apoLpGln I i apoLpGln II (23) lub frakcjami III i IV (22), (24). Stosunek A I do A II wynosi 3:1 dla całej frakcji HDL (23), a według innych autorów 3,4:1 dla HDL₂ i 4,6:1 dla HDL₃ (25).

W obrębie frakcji HDL stwierdza się metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (26), (7) oraz metodą izoelektrycznego ogniskowania (27) obecność subpopulacji. Przyczyną tego mogą być różnice w podjednostkowej budowie cząsteczek HDL (27), (28).

Scaanu (29) przeprowadzał liczne doświadczenia nad ponownym łączeniem się białek i lipidów izolowanych z HDL. Z mieszaniny białek, lipidów polarnych i apolarnych otrzymywał on pod wpływem sonifikacji kompleksy bardzo podobne do rodzimych HDL. Świadczy to o zdolności białek HDL do tworzenia sobie właściwego kompleksu z lipidami.

Oprócz polipeptydów grupy A, które stanowią główną część całego apolipoproteidu HDL wykryto w nim również polipeptydy o niższym ciężarze cząsteczkowym (7000—10 000) grupy C — te same polipeptydy występują w VLDL (30). Posiadają one następujące aminokwasy C końcowe: C I — serynę, C II — kwas glutaminowy, C III — alaninę (31). Ostatnio opisano jeszcze jeden polipeptyd obecny głównie w HDL₃. Nazwano go polipeptydem D (32).

W delipidowanym białku HDL stwierdza się obecność ponad 3% wę-

glowodanów. Głównym składnikiem jest glukozoamina. Obecny jest również kwas sjałowy (33).

Badania fizykochemiczne: optyczna dyspersja rotacyjna i dichroizm kołowy wykazują, że 70—80% białka HDL występuje w postaci alfa spirali. Obliczono, że zawartość alfa spirali jest znacznie wyższa w A I niż w A II (34). Białko pozbawione lipidów różni się pod względem swoich własności optycznych od całych HDL — lipidy wydają się mieć ważne znaczenie dla struktury części białkowej (18).

Wyniki doświadczeń nad działaniem trypsyny i lipazy na cząsteczki HDL wskazują na to, że białko oraz fosfolipidy znajdują się na powierzchni (35). Badania przy użyciu promieni rentgenowskich również uwidaczniają skupienie elektronów w zewnętrznej części cząsteczki i jądro o charakterze apolarnym (18).

W mikroskopie elektronowym HDL mają kształt kulisty (36), wewnątrz cząsteczek widoczna jest struktura podjednostkowa (11).

Lipoproteidy o niskiej gęstości (LDL). Podobnie jak w wypadku HDL rozmiary cząsteczek całej klasy lipoproteidów niskiej gęstości wahają się w niewielkich granicach. Średnica tych białek ma od 200 do 290Å (37). Ciężar cząsteczkowy LDL_2 wynosi $2,2—2,3 \times 10^6$ (38). W skład LDL wchodzi duża ilość cholesterolu przeważnie w postaci zestryfikowanej.

Końcowym aminokwasem głównego białka LDL — apolipoproteidu B jest prawdopodobnie seryna (12). Oprócz tego białka LDL zawierają małe, zmienne u różnych osób ilości białka A i C (39).

Część białkowa LDL zawiera około 3% heksoz, około 1% heksozoaminy i około 0,5% kwasu sjałowego (40), (41). Kwas sjałowy jest łatwo uwalniany przez neuraminidazę (42), co świadczy o jego umiejscowieniu na powierzchni cząsteczki.

Wyniki badań fizykochemicznych nad konformacją całych LDL oraz apo LDL wskazują na to, że są one mieszaniną alfa spirali, struktury beta czyli „harmonijkowej” (ang. *pleated sheet*) oraz struktury nieuporządkowanej czyli „kłębka przypadkowego” (ang. *random coil*) (43), (44). Zawartość alfa spirali jest jednak znacznie niższa niż w HDL (34). W subfrakcjach o różnym ciężarze właściwym przeważają różne struktury — ze wzrostem zawartości lipidów występuje więcej struktury beta (45). Lipidy mają stabilizujący wpływ na konformację białka LDL (42), (43).

Podobnie jak w wypadku HDL sporo informacji na temat struktury LDL dostarczyły doświadczenia z degradacją enzymatyczną przy użyciu enzymów proteolitycznych oraz fosfolipaz. Wykazały one obecność białka oraz fosfolipidów na powierzchni cząsteczek (42), (46), (47). Jednak nie całe białko jest dostępne dla enzymów proteolitycznych i na tej podstawie zaproponowano (42) model cząsteczki LDL, w którym występują 4 podjednostki zbudowane z lipidów otoczonych białkiem. Sugerowano również model w kształcie dwunastościanu o 20 globularnych podjednostkach (46).

W mikroskopie elektronowym LDL mają kształt kulisty, który łatwo ulega deformacjom (11).

Polimorfizm genetyczny LDL. W 1963 roku Berg (48) stwierdził metodą immunologiczną występowanie u części osób zdrowych wariantu genetycznego, który nazwał Lp(a). Okazało się (49), że antygen ten obecny jest w małych ilościach w surowicy wszystkich ludzi, tylko ilość jego jest determinowana genetycznie. Izolowany lipoproteid Lp(a) reaguje z surowicami przeciw LDL. Ma trochę większe rozmiary i trochę wyższy ciężar cząsteczkowy niż pozostałe LDL oraz znacznie wyższą gęstość co powoduje, że w ultrawirowaniu oddziela się z frakcją HDL₂. Jego ruchliwość elektroforetyczna na agarozie odpowiada frakcji prebeta lipoproteidów. Skład lipidowy Lp(a) nie różni się od LDL, w składzie aminokwasowym stwierdzono różnice (50). Oprócz antygeny wspólnego z LDL Lp(a) zawiera polipeptydy C oraz albuminę. Wykryto w nim 6 razy więcej kwasu sjałowego, około 3 razy więcej heksozamin i 2 razy więcej heksoz niż w pozostałych LDL (51). Punkt izoelektryczny tego białka jest przesunięty w stronę kwaśną w stosunku do reszty LDL.

Lp(a) jest, być może, identyczny z lipoproteidem opisanym pod nazwą sedimentującego prebeta (ang. sinking prebeta) (52).

Opisywano również inny polimorfizm dziedziczący się niezależnie od Lp(a), a mianowicie układ Ag (53). Cechy tego układu nie zostały scharakteryzowane pod względem chemicznym, determinanty wykryto w różnych frakcjach lipoproteidowych (54).

Lipoproteidy o bardzo niskiej gęstości (VLDL). Nazywane są one również chylomikronami endogennymi, ponieważ transportują lipidy syntetyzowane w wątrobie. Cząsteczki tej frakcji mają różne rozmiary od 300 do 900Å (55) i zmienny skład chemiczny (56). Ze spadkiem stałej flotacji spada w nich zawartość trójglicerydów, wzrasta natomiast ilość składników polarnych — fosfolipidów i białka.

Wykazano (57), (58), (31), (59), że 40% białka VLDL stanowi białko B, około 10% białko A, a 50% polipeptydy o niskim ciężarze cząsteczkowym C I, C II i C III — te same, które występują w HDL. Polipeptyd C III zawierający alaninę jako aminokwas C końcowy opisano w 2 odmianach różniących się ilością kwasu sjałowego w cząsteczce.

„Wspólne” polipeptydy stanowią wprawdzie tylko 10% białka HDL, ale ponieważ stężenie HDL w osoczu jest wyższe niż VLDL, więc całkowite ilości „małych” polipeptydów są w obu frakcjach porównywalne (30).

Gdy polipeptydy C I, C II i C III izolowane z ludzkich VLDL poddawano sonifikacji razem z mieszaniną lipidów, powstawały kompleksy o różnej gęstości, zarówno takiej, która odpowiadała VLDL, jak również cięższe, podobne do rodzimych HDL (o ciężarze właściwym 1,063—1,21) (60).

Stwierdzono (61), (62), że w obrębie frakcji VLDL występują subpopulacje o różnej zawartości poszczególnych polipeptydów.

Badania fizykochemiczne nad konformacją lipoproteidów bardzo niskiej gęstości wykazały obecność w nich od 41 do 60% alfa spirali (63). Wysoką zawartość alfa spirali posiada polipeptyd C I, wydaje się natomiast, że struktura C III jest głównie typu nieuporządkowanego (56).

VLDL mają kształt kulisty. W mikroskopie elektronowym nie widać w nich elementów struktury wewnątrzcząsteczkowej (11).

Chylomikrony. W warunkach prawidłowych we krwi pobranej najczęściej nie stwierdza się obecności chylomikronów, występują one w osoczu tylko po posiłku (od 0,5—3 do 6—10 godzin). Rozmiary chylomikronów wahają się w szerokich granicach od 1 200 do 11 000 Å (36) a ich skład chemiczny jest zmienny, zależny od wielkości. Jak widać z tabeli 2 główny składnik chylomikronów stanowią trójglicerydy. Skład ich kwasów tłuszczowych przypomina skład tłuszczu pokarmowego (64). Trójglicerydy i estry cholesterolu znajdują się w środku cząsteczki, warstwa zewnętrzna składa się głównie z fosfolipidów, małej ilości wolnego cholesterolu oraz białka (65).

Ze względu na bardzo małą zawartość białka dokładna charakterystyka części białkowej chylomikronów była bardzo trudna. Kłopotliwy problem stanowi również możliwość adsorpcji innych lipoproteidów na powierzchni chylomikronów po przejściu ich z limfy do krwioobiegu. Od dłuższego czasu stwierdzano tylko ogólne podobieństwo składu aminokwasowego białka chylomikronów i białka HDL (66). Niektóre dane wskazywały na podobieństwo antygenowe chylomikronów i białka B (67). Dopiero w 1972 roku udało się (68) dokładnie scharakteryzować polipeptydy występujące w chylomikronach. Główną część białka stanowią opisane poprzednio polipeptydy grupy C. Apolipoproteid B stanowi około 20% a A I i A II razem około 15% białka chylomikronów. Z faktu, że polipeptydy A I i A II występują w równych stężeniach autorzy wyciągnęli wniosek, że są one integralną częścią chylomikronu a nie składnikami zaadsorbowanych na jego powierzchni cząsteczek HDL.

IV. Synteza lipoproteidów

Wchłonięte w jelicie lipidy pochodzenia pokarmowego przechodzą do krążenia pod postacią chylomikronów. Stwierdzono, że w jelicie cienkim może być syntetyzowane białko lipoproteidów (69).

Wątroba jest głównym miejscem syntezy lipidów endogennych. W siateczce endoplazmatycznej i w aparacie Goldiego wątroby szczura obserwowano występowanie cząstek podobnych do lipoproteidów o bardzo niskiej gęstości (70). Były one bezpośrednim prekursorem VLDL osocza. Stwierdzono, że ich produkcja wymaga zachodzącej jednocześnie syntezy

białka. Doświadczenia na izolowanej wątrobie szczura potwierdziły, że synteza części białkowej różnych klas lipoproteidów zachodzi w wątrobie (69). Synteza zlokalizowana jest w rybosomach (71).

V. Nieenzymatyczna wymiana lipidów między frakcjami lipoproteidowymi

W czasie inkubacji osocza w 37° następuje przenoszenie estrów cholesterolu z HDL i LDL na VLDL, a trójglicerydów „w drugą stronę” tzn. z VLDL na HDL i LDL (72). Podobną wymianę obserwowano między HDL osocza człowieka a lipoproteidami o gęstości $< 1,006$ z żółtka jaja kurzego (73). Wymiana nie wymaga obecności enzymów a zdolność do niej stanowi fizykochemiczną cechę lipoproteidów.

Wymiana lipidów między frakcjami decyduje wspólnie z przemianami enzymatycznymi o charakterystycznym składzie lipoproteidów.

VI. Enzymy związane z przemianami lipoproteidów osocza

Poznane przemiany enzymatyczne dotyczą komponenty lipidowej lipoproteidów.

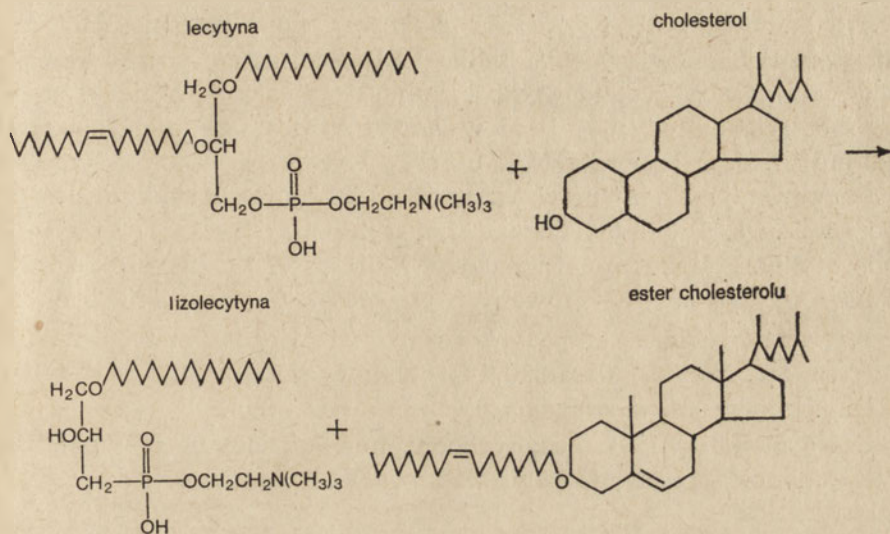
Lipaza lipoproteidowa. Enzym (E.C. 3.1.1.3.) katalizuje hydrolizę jednego wiązania estrowego w trójglicerydach chylomikronów lub innych lipoproteidów.

We krwi wykrywa się aktywność lipazy lipoproteidowej dopiero po podaniu heparyny. Pod jej wpływem enzym uwalnia się ze ścian naczyń włosowatych różnych tkanek, zwłaszcza tkanki tłuszczowej. Heparyna wywiera efekt allosteryczny na lipazę lipoproteidową (74).

Pod wpływem lipazy lipoproteidowej trójglicerydy chylomikronów oraz VLDL są szybko usuwane z osocza do różnych tkanek. Wychwytywanie chylomikronów przez wątrobę zachodzi prawdopodobnie po usunięciu z nich większości trójglicerydów (75).

Lecytynowo cholesterolowa transferaza kwasów tłuszczowych — LCAT. Enzym (E.C. 2.3.1.43), zwany często enzymem Glomseta, katalizuje przeniesienie reszty kwasu tłuszczowego z pozycji 2 lecytyny na cholesterol. W wyniku reakcji powstają estry cholesterolu i lizolecytyna (Ryc. 2). Enzym wykazuje najwyższą aktywność wobec kwasów nienasyconych, przede wszystkim linolowego (76). Najszybsza estryfikacja cholesterolu zachodzi we frakcji HDL (77) a oczyszczony enzym jest aktywny tylko wobec HDL₃ i VHDL (78). Pośrednio, drogą wymiany nieenzymatycznej wzrasta ilość estrów cholesterolu w innych frakcjach lipoproteidowych.

Wysokie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych hamują aktywność LCAT. Mechanizm hamowania polega na rywalizacji o miejsce wiążące w albuminie między kwasami tłuszczowymi a produktem reakcji — lizolecytyną, która jest usuwana z układu przy udziale albuminy (79).



Ryc. 2. Przebieg reakcji katalizowanej przez lecytynowo-cholesterolową transferazę kwasów tłuszczowych (LCAT)

VII. Rola apolipoproteidów w aktywacji enzymów

Niskocząsteczkowe polipeptydy obecne we frakcji VLDL i HDL aktywują lipazę lipoproteidową (80). Białko aktywatora wiąże się w czasie reakcji z substratem trawionym przez lipazę (81), (82). Większość autorów podaje, że najsilniejszym aktywatorem jest C II (polipeptyd z C końcowym kwasem glutaminowym) (83), (84). Z frakcji C III natomiast wyizolowano polipeptyd hamujący reakcję (83). Aktywacja wymaga obecności fosfolipidów (85).

Aktywatorem LCAT jest polipeptyd A I. W obecności A I, A II wykazuje działanie hamujące (86). HDL₃ zawiera więcej A I a mniej A II niż HDL₂, toteż działa silniej aktywująco.

Apolipoproteid HDL działa również jako czynnik stymulujący przemianę skwalenu w cholesterol katalizowaną przez enzymy mikrosomalne. Polipeptyd A I jest bardzo silnym aktywatorem tej reakcji, A II działa słabiej (87), (88). Możliwe, że czynnik aktywujący jest identyczny z opisanym poprzednio białkiem — nośnikiem skwalenu i steroli-SCP (ang. *squalene and sterol carrier protein*). Czynniki te umożliwiają przemiany chemiczne nierozpuszczalnych w wodzie prekursorów cholesterolu.

VIII. Przemiany komponenty białkowej lipoproteidów

Ciekawe wyniki dotyczące przemian lipoproteidów człowieka w osoczu uzyskano, znakując część białkową VLDL jodem radioaktywnym (89), (90), (91). Prawie natychmiast po podaniu dożylnym tej frakcji polipeptydy C stanowiącej 50% jej części białkowej przechodzą na HDL. Apolipoproteid B (stanowiący 40% białka VLDL) pozostaje początkowo związany z frakcją lipoproteidów o bardzo niskiej gęstości. W miarę stopniowego odłączania od niej lipidów szczyt radioaktywności tego białka odnajduje się w lipoproteidach o coraz wyższej gęstości. Z cząsteczek VLDL powstają w ten sposób cząsteczki LDL poprzez stadium pośrednie lipoproteidu o S_t 20—60. Podanie heparyny przyspiesza powstanie tego lipoproteidu. Polipeptydy C wracają z HDL na VLDL dopiero po wejściu do krążenia nowosyntetyzowanych cząsteczek tej ostatniej klasy.

Wykazano również, że podane dożylnie izolowane apolipoproteidy łączyły się ze „swoimi” klasami lipoproteidowymi: polipeptydy C z VLDL i HDL, polipeptyd A I prawie wyłącznie z HDL (90).

Część białkowa LDL podanych dożylnie ludziom ulega wolniejszym przemianom w osoczu niż część białkowa VLDL (92).

IX. Niektóre stany patologiczne dotyczące lipoproteidów osocza

Abetalipoproteinemia — wrodzony brak beta lipoproteidów (LDL)

Jest to choroba dziedziczna, za najprawdopodobniejszą jej przyczynę uważa się niezdolność do syntezy apolipoproteidu B (93). W osoczu obserwuje się zupełny brak LDL i VLDL a po posiłku nie pojawiają się chylomikrony. Ilość HDL jest obniżona. Do głównych objawów należą: zapalenie barwikowe siatkówki, objawy neurologiczne oraz zmiany kształtu krwinek czerwonych (akantocytoza). Pierwszy przypadek tej choroby opisano już w 1950 roku (94), ale dopiero wiele lat później dokładniejsze badania spowodowały kompletną zmianę poglądów na rolę lipoproteidów we wchłanianiu tłuszczu pokarmowego. Poprzednio uważano, że w procesie przenoszenia tłuszczu z przewodu pokarmowego z limfą do krwioobiegu główną rolę odgrywa HDL. Badania nad abetalipoproteinemią wykazały gromadzenie dużych ilości tłuszczu w komórkach błony śluzowej jelita cienkiego (95), dowiodły więc, że niezbędne w syntezie chylomikronów jest białko LDL. Wykazały również niewątpliwie powiązania metaboliczne między chylomikronami i frakcją VLDL i LDL.

Rodziny niedobór HDL — choroba tangierska. Obserwuje się w niej bardzo niski poziom HDL w osoczu (0,5—4,5% normy), niski poziom cholesterolu (przy zachowanym normalnym odsetku cholesterolu zestryfikowanego) i niskie stężenie fosfolipidów. Trójglicerydy i VLDL występują

w zwiększonej ilości. Stwierdza się gromadzenie estrów cholesterolu w różnych narządach. Wchłanianie tłuszczu z przewodu pokarmowego i synteza chylomikronów przebiegają normalnie (96), (97).

Wiadomości na temat roli HDL są jeszcze bardzo ograniczone, nic dziwnego więc, że wrodzony niedobór tej frakcji uznano za doskonały model eksperymentalny i nieliczną grupę chorych (kilkanaście opisanych przypadków) poddano szczegółowym badaniom. Izolowano śladowe ilości HDL występujące w osoczu chorych i poddano je szczegółowej analizie chemicznej i immunologicznej (23). Izolowany lipoproteid — nazwany HDL_T — zawiera oba polipeptydy A I i A II, ale stosunek ich wynosi 1:12 zamiast 3:1, jak w normie. Poziom białka A I jest więc obniżony w porównaniu z osobami zdrowymi około 600 razy, natomiast A II tylko około 17 razy. Ilość polipeptydów C nie jest zmniejszona. Nie stwierdzono różnic między A I izolowanym z osocza zdrowych i chorych. Autorzy uważają więc, że mutacja dotyczy genu regulującego syntezę A I.

Te skomplikowane i trudne ze względu na małą ilość dostępnego materiału badania wykazały niezbędność obu polipeptydów A I i A II dla istnienia normalnej frakcji HDL. Nie wyjaśniły wprawdzie przyczyny gromadzenia estrów cholesterolu w tkankach, ale niedobór właśnie tego polipeptydu, który jest aktywatorem LCAT kieruje uwagę na reakcję transestryfikacji jako na możliwą przyczynę zaburzeń metabolicznych. Możliwe jest również, że cholesterol gromadzi się w tkankach skutkiem upośledzenia jego transportu.

Badania nad chorobą tangierską potwierdziły więc, że HDL nie są niezbędne do wchłaniania tłuszczu i jego transportu z przewodu pokarmowego. Pokazały również powiązania metaboliczne między HDL i VLDL — przy braku HDL poziom VLDL wzrasta.

Rodziny niedobór LCAT (lecytynowo cholesterolowej transferazy kwasów tłuszczowych). Ta wrodzona wada metabolizmu opisana w 1967 roku w krajach skandynawskich (98) stała się podstawowym modelem do badania roli LCAT w przemianach lipoproteidów osocza oraz wpływu tego enzymu na błony komórkowe.

Głównymi objawami choroby są: zmętnienie rogówki, anemia i uszkodzenie nerek. W osoczu obserwuje się prawie zupełny brak cholesterolu zestryfikowanego oraz zmieniony skład i własności wszystkich klas lipoproteidowych (99), (37). Lipoproteidy nie zawierają estrów cholesterolu, mają zwiększoną ilość cholesterolu wolnego i lecytyny.

LDL i HDL składają się z subpopulacji o różnych rozmiarach cząstek. Największe cząsteczki LDL mają w mikroskopie elektronowym wygląd płaskich krążków o średnicy 1000Å wykazujących miejscami strukturę „typu mielinowego” (100). Cząsteczki LDL średniej wielkości (400—600Å — też większe niż normalne) są również spłaszczone i wysychając podczas negatywnego barwienia układają się często w rulony. Bardzo charakterystyczny jest skład komponenty białkowej tych lipoproteidów:

zawierają one 35% polipeptydów C i 65% albuminy. Obecność albuminy stwierdza się dopiero po częściowej delipidacji (101). Ilość tych lipoproteidów jest u chorych z niedoborem LCAT zmienna; ilość apolipoproteidu B jest u nich obniżona (17).

Frakcja HDL o rozmiarach większych niż normalne (150—200Å) jest podobna w mikroskopie elektronowym do poprzednio opisanych LDL. Ma również postać płaskich krążków tworzących rulony. Dodanie estrów cholesterolu jak również inkubacja z frakcją normalnej surowicy zawierającą LCAT powoduje ich zmianę na kuliste cząsteczki o wymiarach 50—100Å podobne do normalnych HDL (37).

Druga subfrakcja HDL zawiera okrągłe cząsteczki o średnicy 45—100Å a więc mniejsze niż normalne HDL. G l o m s e t (102) wykazał, że są one efektywnym substratem dla LCAT i postulował, że mogą to być świeżo wyprodukowane HDL, które w normalnym osoczu ulegają szybko przemianie, przyłączając lipidy. W niedoborze LCAT proces ten byłby opóźniony. Pod względem składu białkowego HDL osób z niedoborem LCAT nie różnią się od HDL normalnych (103).

Badania nad lipoproteidami we wrodzonym niedoborze LCAT wykazały niezbędną rolę estrów cholesterolu dla utrzymania prawidłowej struktury lipoproteidów. Obecność apolarnego rdzenia warunkuje ich kulisty kształt, przy braku estrów cząsteczki są spłaszczone. Wyniki pokazują również ważny wpływ reakcji transestryfikacji katalizowanej przez LCAT na nieenzymatyczną wymianę lipidów między HDL i lżejszymi lipoproteidami: przy braku estryfikacji cholesterolu HDL obserwuje się zmiany składu wszystkich frakcji lipoproteidowych.

Hiperlipoproteinemia typu I* — hiperchylomikronemia. Choroba ta jest znana od bardzo dawna. W 1960 roku stwierdzono (105), że jest spowodowana wrodzonym niedoborem lipazy lipoproteidowej. Obserwuje się w jej przebiegu bardzo wysokie poziomy trójglicerydów i chylomikronów, osocze chorych ma mleczny wygląd. Ilość VLDL jest trochę zwiększona, LDL i HDL zmniejszona. Dieta beztłuszczowa przywraca prawie zupełnie normalny skład osocza (106).

Niedobór enzymatyczny dotyczy tylko lipazy o specyficzności trójglicerydowej, aktywność wobec jedno- i dwuglicerydów jest zachowana (107—109).

Model, jaki stanowi ta postać hiperlipemii, pokazuje podstawowe znaczenie lipazy lipoproteidowej w przemianie chylomikronów oraz zależności metaboliczne między różnymi klasami lipoproteidów — blok w przemianie chylomikronów powoduje obniżenie poziomu LDL i HDL.

Hiperlipoproteinemia typu II — hiperbetalipoproteinemia lub hipercholesterolemia. Jest to najczęstsza postać hiperlipoproteinemii wrodzonej. Objawy występują już przy pojedynczej dawce nieprawidłowego

* Klasyfikacja hiperlipoproteinemii zgodnie z zaleceniami WHO (104).

geny, są łżejsze u heterozygot, u homozygot bardzo ciężkie. Obserwuje się bardzo wysoki poziom cholesterolu i beta lipoproteidów osocza. Choroba ta wywołała niesłychane zainteresowanie faktem, że u dotkniętych nią osobników obserwuje się bardzo wczesną miażdżycę tętnic. U homozygot jest ona przyczyną śmierci najczęściej już poniżej 30 roku życia.

Przez długi czas nie udawało się stwierdzić swoistego defektu metabolicznego w tej chorobie. Ostatnio dopiero zaobserwowano (110), że w hodowli fibroblastów pochodzących od osoby z hiperlipoproteinemią typu II zwiększona jest aktywność enzymu decydującego o szybkości biosyntezy cholesterolu: reduktazy beta-hydroksy-beta-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA). Autorzy uważają, że pierwotnym defektem jest uszkodzenie mechanizmu kontrolującego syntezę tego enzymu. W hodowlach pochodzących od osób zdrowych LDL hamowały jego syntezę, nie wywierały natomiast wpływu na hodowle pochodzące od chorych. Podobne wyniki uzyskano, badając wpływ lipidów na szybkość włączania radioaktywnego octanu do cholesterolu (111).

Hiperlipoproteinemia typu III, IV i V. W tych typach hiperlipoproteinemii nie wykryto dotychczas pierwotnych defektów metabolicznych. Zainteresowanie nimi wynika z faktu, że również w tych postaciach spotyka się często występowanie wczesnej miażdżycy tętnic.

Typ III jest interesujący ze względu na obecność w osoczu nietypowych lipoproteidów nazwanych beta VLDL lub flotującymi beta lipoproteidami (112): odwirowują się one z frakcją VLDL a w elektroforezie na bibule i w agarozie mają ruchliwość beta. Ich skład białkowy odpowiada LDL, ale zawartość trójglicerydów jest w nich 4—10 razy wyższa niż w normalnych LDL. Szybkość włączania znakowanych kwasów tłuszczowych do trójglicerydów tej frakcji była taka sama jak do LDL a mniejsza niż do normalnych VLDL (113).

Istnieje możliwość, że beta VLDL są pośrednim produktem przemiany VLDL, który z normalnego osocza znika szybko, w hiperlipoproteinemii typu III, natomiast jego konwersja w LDL jest opóźniona (112).

W IV typie hiperlipoproteinemii obserwuje się podwyższony poziom VLDL, w typie V—VLDL i chylomikronów. W obu odmianach występuje prawdopodobnie zmniejszone usuwanie trójglicerydów z krwioobiegu do tkanek, zmniejszoną aktywność lipazy lipoproteidowej obserwuje się tylko w hiperlipoproteinemii V (106), (114).

Lipoproteidy w zastoju żółci. Stwierdzano wielokrotnie, że w różnych chorobach przebiegających z zastojem żółci w osoczu występują lipoproteidy, których skład chemiczny i własności bardzo odbiegają od normy (115—120). Seidel w 1969 roku (121) nadał tym lipoproteidom nazwę LP X i nazwa ta przyjęła się ogólnie. Zawierają one bardzo mało białka (3—5%), dużo fosfolipidów i wolnego cholesterolu, bardzo mało estrów cholesterolu i trójglicerydów. Ilość ich jest zmienna. Część białkowa LP X zawiera polipeptydy C i albuminę (122), która daje reakcję immunolo-

giczną dopiero po częściowej delipidacji (123). Wykryto w nich również apolipoproteid B i małą ilość apolipoproteidu A (124).

Ostatnio okazało się, że kształt i rozmiary LP X bardzo przypominają LDL we wrodzonym niedoborze LCAT (124), (100). Obie grupy mają podobny skład białkowy, dają również reakcję zgodności immunologicznej (101).

Powstawanie LP X można w zastoju żółci również tłumaczyć niedoborem LCAT. W tym wypadku to niedobór względny wynikający ze zwiększonych ilości w krążeniu cholesterolu wolnego oraz lecytyny. Mogą one przewyższać wydolność enzymu (125). Aktywność LCAT bywa zresztą często w chorobach wątroby obniżona.

X. Wymiana lipidów między osoczem i krwinkami czerwonymi

Cholesterol w krwinkach występuje prawie wyłącznie w postaci wolnej. Jest on luźno związany z błoną krwinkową i znajduje się w stanie równowagi z cholesterolem wolnym lipoproteidów osocza (126), (127). Wymiana fosfolipidów między osoczem a krwinkami zachodzi wolniej niż wymiana cholesterolu. Dotyczy tylko lecytyny i sfingomieliny, fosfatydylseryna i fosfatydyletanolamina nie podlegają wymianie (128).

W czasie inkubacji normalnej krwi *in vitro* w osoczu zachodzi estryfikacja cholesterolu katalizowana przez LCAT. Zmienia to stan równowagi między osoczem a krwinkami, czego skutkiem jest przejście cholesterolu wolnego z krwinek do osocza (128), (129). Po przejściu do lipoproteidów cholesterol ten z kolei podlega estryfikacji (130).

Takie przemieszczanie się cholesterolu jest prawdopodobnie niezbędne dla zachowania prawidłowego składu błony krwinkowej. W nieobecności LCAT wolny cholesterol gromadzi się w błonie. Powoduje to zmiany kształtu krwinek oraz może wywoływać zmniejszenie ich oporności osmotycznej. Taką sytuację obserwuje się we wrodzonym niedoborze LCAT (131) oraz w zastoju żółci (132). W stanach tych wykazano również względny wzrost stężenia lecytyny w błonie krwinkowej przy zachowaniu normalnego poziomu całkowitych fosfolipidów. Krzyżowa inkubacja krwinek chorego z osoczem osoby zdrowej przywracała ich normalny skład lipidowy (133, 134).

Stwierdzono również wymianę oraz przenoszenie wolnego cholesterolu (i w mniejszym stopniu fosfolipidów) między lipoproteidami osocza i innymi tkankami lub komórkami (135—137). Większość autorów przypisuje ważniejszą rolę w tym procesie alfa lipoproteidom.

Powyżej przedstawiony schemat pokazuje, że LCAT współdziałając z lipoproteidami posiadać może ważne znaczenie w ustroju dla regulacji stężenia cholesterolu w różnych błonach komórkowych. Taka ogólna rola w homeostazie błon wysuwana była przez Glomseta (100) i innych (138).

XI. Uwagi końcowe

Wyniki badań ostatnich lat wyjaśniły wiele faktów, jednak w dalszym ciągu przedstawienie całości przemian lipoproteidów osocza nie jest możliwe.

Stwierdzony został związek metaboliczny VLDL i LDL. Po odłączeniu części ładunku lipidowego VLDL (a może również chylomikrony) zamieniają się w LDL. Rozkład trójglicerydów katalizowany jest przez lipazę lipoproteidową. Nasuwa się przypuszczenie, że obserwowana wędrówka polipeptydów C, które są aktywatorami tego enzymu, z VLDL na HDL ma jakiś związek z reakcją enzymatyczną. Możliwe, że przejściowo powstają z VLDL lipoproteidy, nie zawierające już polipeptydów C a zawierające jeszcze dużo trójglicerydów o własnościach zbliżonych do beta VLDL, opisanych w hiperlipoproteinemii III.

Ważnym znaczeniem frakcji HDL jest obecność w niej koenzymów i współdziałanie z enzymami lipazą lipoproteidową oraz LCAT. Istotna wydaje się rola HDL w transporcie cholesterolu między tkankami i osoczem. Jest dość prawdopodobne, że świeżo powstałe HDL zawierają mało lipidów i że w osoczu zachodzi stopniowe dołączanie większej ich ilości. Opisane w niedoborze LCAT HDL o mniejszych niż normalnie rozmiarach mogłyby stanowić przykład takich świeżo powstałych lipoproteidów, których lipidacja ulega opóźnieniu.

Przemiany nieenzymatyczne lipoproteidów osocza oraz przemiany zachodzące pod wpływem enzymów warunkują ich prawidłowy skład. Zmiany składu lipoproteidów odbijać się mogą na funkcji różnych tkanek (przede wszystkim błon komórkowych), których lipidy wymieniają się z lipidami lipoproteidów krążących. Estryfikacja cholesterolu katalizowana przez LCAT wpływa wybitnie na tę wymianę.

Nie jest jasne, dlaczego białko lipoproteidów wiąże tak dużą ilość lipidów. Jego przeciętny skład aminokwasowy wcale nie odbiega od składu innych białek osocza (139). Pewnym wyjaśnieniem mogłaby być stwierdzona większa dostępność reszt aminokwasów aromatycznych w lipoproteidach w porównaniu z innymi białkami podobnych rozmiarów (140).

Ogromna w ostatnich latach ilość publikacji na temat lipoproteidów krwi jest wyrazem zainteresowania nie tylko ich rolą w ustroju lecz również ogólnym problemem wiązania białek i lipidów dla którego stanowią one doskonały model doświadczalny.

Artykuł nadszedł 25.6.1974, po rewizji autorskiej otrzymano 19.9.1974.

PIŚMIENNICTWO

1. Wehr H., (1966), *Post. Biochem.*, **12**, 383—395.
2. DeLalla O. F., Gofman J. W., (1959), *Methods of Biochemical Analysis*, red. Glick D. I., 459—478, Interscience Publishers Inc. New York.

3. Lees R. S., Hatch F. T., (1963), *J. Lab. Clin. Med.*, **61**, 518—528.
4. Noble R. P., (1968), *J. Lip. Res.*, **9**, 693—700.
5. McGlashan D. A. K., Pilkington T. R. E., (1968), *Clin. Chim. Acta*, **22**, 646—647.
6. Grajnert K., Drewnowska I., Krawczyński J., (1972), *Diagn. Lab.*, **8**, 277—284.
7. Feliste R., Dousset N., Douste-Blazy L., (1973), *Clin. Chim. Acta*, **47**, 329—333.
8. Burstein M., Scholnick H. R., (1973), *Adv. Lip. Res.*, **11**, 67—108.
9. Scanu A. M., Wisdom C., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, 703—730.
10. Fredrickson D. S., Gotto A. M., Levy R. I., (1972), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, red. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S., 493—530, Mc. Graw-Hill Company, New York.
11. Forte T., Nichols A. V., (1972), *Adv. Lip. Res.*, **10**, 1—41.
12. Shore B., (1957), *Arch. Biochem. Biophys.*, **71**, 1—10.
13. Alaupovic P., Gustafson A., Shafeek S., Sanbar S. S., Furman R. H., (1964), *Circulation*, **30**, (Suppl. 3), 1.
14. Gustafson A., Alaupovic P., Furman R. H., (1966), *Biochemistry*, **5**, 632—640.
15. Shore B., Shore V., (1968), *Biochemistry*, **7**, 2773—2777.
16. Kostner G., Alaupovic P., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 320.
17. McConathy W. J., Alaupovic P., Curry M. D., Magnani H. N., Torsvik H., Berg K., Gjone E., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 406—418.
18. Scanu A. M., (1972), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **195**, 390—406.
19. Albers J. J., Chi-Hong-Chen, Aladjem F., (1972), *Biochemistry*, **11**, 57—63.
20. Alaupovic P., Sanbar S. S., Furman R. H., Sullivan M. L., Walraven S. L., (1966), *Biochemistry*, **5**, 4044—4053.
21. Shore V., Shore B., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3396—3403.
22. Scanu A., Toth J., Edelstein C., Koga S., Stiller E., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3309—3316.
23. Lux S. E., Levy R. I., Gotto A. M., Fredrickson D. S., (1972), *J. Clin. Invest.* **51**, 2505—2519.
24. Edelstein C., Lim C. T., Scanu A. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5842—5849.
25. Albers J. J., Aladjem F., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3436—3442.
26. Janecki J., (1972), informacja ustna.
27. Mackenzie S. L., Sundaram G. S., Sodhi H. S., (1972), *Clin. Chim. Acta*, **43**, 223—229.
28. Scanu A., Lim C. T., Edelstein C., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5850—5855.
29. Scanu A., Cump E., Toth J., Koga S., Stiller E., Albers L., (1970), *Biochemistry*, **9**, 1327—1335.
30. Shore B., Shore V., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4510—4516.
31. Herbert P., Levy R. I., Fredrickson D. S., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7068—7071.
32. McConathy W. J., Alaupovic P., (1973), *FEBS Letters*, **37**, 178—182.
33. Scanu A., (1966), *J. Lip. Res.*, **7**, 295—306.
34. Gotto M., Shore B., (1969), *Nature*, **224**, 69—70.
35. Camejo G., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 290—300.
36. Nichols A. V., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 1128—1137.

37. Forte T., Norum K. R., Glomset J. A., Nichols A. V., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 1141—1148.
38. Scanu A., Pollard H., Reader W., (1968), *J. Lip. Res.*, **9**, 342—343.
39. Lee D. M., Alaupovic P., (1970), *Biochemistry*, **9**, 2244—2252.
40. Marshall W. E., Kummerow F. A., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 271—273.
41. Margolis S., Langdon R. G., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 469—476.
42. Margolis S., Langdon R. G., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 485—493.
43. Gotto A. M., Levy R. I., Fredrickson D. S., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 1436—1441.
44. Scanu A., Pollard H., Hirz R., Kothary K., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 171—178.
45. Dearborn D. G., Wetlaufer D. B., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 179—185.
46. Pollard H., Scanu A. M., Taylor E. W., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 304—310.
47. Aggarbeck L. P., Scanu A. M., (1971), *Circulation*, **44**, (Suppl 2), 11.
48. Berg K., (1963), *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **59**, 369—382.
49. Harvie N. R., Schulz J. S., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 99—103.
50. Simons K., Ehnholm C., Renkonnen O., Bloth B., (1970), *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **B 78**, 459—466.
51. Ehnholm C., Garoff H., Renkonnen O., Simons K., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3239—3232.
52. Sodhi H. S., (1969), *Metabolism*, **18**, 852—859.
53. Blumberg B. S., Bernanke D., Allison A. C., (1962), *J. Clin. Invest.*, **41**, 1936—1944.
54. Ehnholm C., Bütler R., Brunner E., (1973), *Vox Sang.*, **25**, 281—285.
55. Kretschmar R., Honefeld M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **280**, 105—115.
56. Fredrickson D. S., Levy R. I., Lees R. S., (1967), *New Engl. J. Med.*, **276**, 94—103.
57. Brown W. V., Levy R. I., Fredrickson D. S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 573—575.
58. Brown W. V., Levy R. I., Fredrickson D. S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6588—6594.
59. Albers J. J., Scanu A. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 29—37.
60. Forte T., Gong E., Nichols A. V., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **337**, 169—183.
61. Paerlstein E., Aladjem F., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2553—2558.
62. Shore V. G., Shore B., (1973), *Biochemistry*, **12**, 502—507.
63. Kane J. P., Wells B. D., Jones A. L., (1971), *Circulation*, **44**, (Suppl 2), 19.
64. Watts R. B., Dils R., Wehr H., (1971), *J. Chromat.*, **66**, 239—247.
65. Zilversmit D. B., (1967), *Fed. Proc.*, **26**, 1599—1605.
66. Levy R. S., Lynch A. C., Mc Gee E. D., Mehl J. W., (1967), *J. Lip. Res.*, **8**, 463—472.
67. Lees R. I., (1967), *J. Lip. Res.*, **8**, 396—405.
68. Kostner G., Holasek A., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1217—1223.
69. Windmüller H. G., Herbert P. N., Levy R. I., (1973), *J. Lip. Res.*, **14**, 215—223.
70. Jones A. L., Ruderman N. B., Herrera M. G., (1967), *J. Lip. Res.*, **8**, 429—446.

71. Bungenberg de Jong J. J., Marsh J. B., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 192—199.
72. Nichols A. V., Smith L., (1965), *J. Lip. Res.*, **6**, 206—219.
73. Nichols A. V., Coggiola E. L., (1966), *J. Lip. Res.*, **7**, 215—221.
74. Whayne T. F., (1971), *Circulation*, **44**, (Suppl 2), 27.
75. Redgrave T. G., (1970), *J. Clin. Invest.*, **49**, 465—471.
76. Sgontes D. S., (1972), *Biochemistry*, **11**, 293—296.
77. Goodman DeWitt S., (1964), *J. Clin. Invest.*, **43**, 2026—2036.
78. Fielding C. J., Fielding P. E., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 355—358.
79. Rutenberg H. L., Lacko A. G., Soloff L. A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 419—427.
80. Fielding C. J., Lim C. T., Scanu A. M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 889—894.
81. Havel R. J., Kashyap Mati L., Kane J. P., (1971), *Circulation*, **44**, (Suppl 2), 9.
82. Fielding C. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **316**, 66—75.
83. Brown W. V., Baginsky M. L., (1971), *Circulation*, **44**, (Suppl 2), 9.
84. Havel R. J., Fielding C. J., Olivecrona T., Shore V. G., Fielding P. E., Egelrud T., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1828—1833.
85. LaRosa J. C., Levy R. I., Herbert P., Lux S. E., Fredrickson D. S., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 57—62.
86. Fielding C. J., Shore V. G., Fielding P. E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1493—1498.
87. Dempsey M. E., Ritter M. C., Seaton J. D., (1971), *Circulation*, **44**, (Suppl. 2) ,14.
88. Dempsey M. E., Ritter M. C., Lux S. E., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 430.
89. Bilheimer D. W., Eisenberg S., Levy R. I., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 212—221.
90. Eisenberg S., Bilheimer D. W., Levy R. I., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **280**, 94—104.
91. Eisenberg S., Bilheimer D. W., Levy R. I., Lindgren F. T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 361—377.
92. Langer T., Strober W., Levy R. I., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 1528—1536.
93. Levy R. I., Fredrickson D. S., Laster L., (1966), *J. Clin. Invest.*, **45**, 531—541.
94. Bassen F. A., Kornzweig A. L., (1950), *Blood*, **5**, 381—387.
95. Ways P. O., Parmentier C. M., Kayden H. J., Jones J. W., Saunders D. R., Rubin C. E., (1967), *J. Clin. Invest.*, **46**, 35—46.
96. Fredrickson D. S., Altrocchi P. H., Avioli L. V., Goodman DeWitt S., Goodman H. C., (1961), *Ann. Int. Med.*, **55**, 1016—1031.
97. Bale P. M., Clifton-Bligh P., Benjamin B. N. P., Whyte H. M., (1971), *J. Clin. Pathol.*, **24**, 609—616.
98. Norum K. R., Gjone E., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 698—700.
99. Norum K. R., Glomset J. A., Nichols A. V., Forte T., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 1131—1140.
100. Glomset J. A., Norum K. R., (1973), *Adv. Lip. Res.*, **11**, 1—65.
101. Torswik H., Berg K., Magnani H. N., McConathy W. J., Alaupovic P., Gjone E., (1972), *FEBS Letters*, **24**, 165—168.
102. Glomset J. A., Norum K. R., King W., (1970), *J. Clin. Invest.*, **49**, 1827—1837.
103. Torswik H., (1972), *Clin. Genetics*, **3**, 188—200.
104. Fredrickson D. S., (1971), *Ann. Int. Med.*, **75**, 471—472.

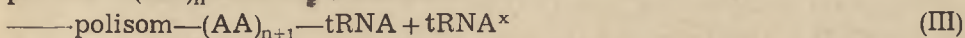
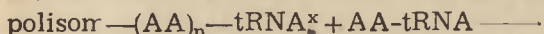
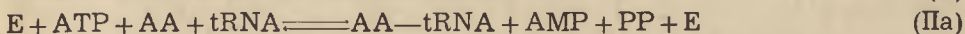
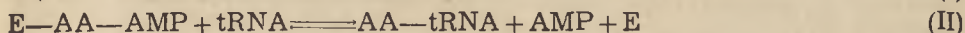
105. Havel R. J., Gordon R. S., (1960), *J. Clin. Invest.*, **39**, 1777—1790.
106. Levy R. I., Fredrickson D. S., (1968), *Am. J. Cardiol.*, **22**, 576—583.
107. Greten H., Levy R. I., Fredrickson D. S., (1969), *J. Lip. Res.*, **10**, 326—330.
108. Nilsson-Ehle P., Belfrage P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 60—64.
109. Greten H., Levy R. I., Fales H., Fredrickson D. S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **210**, 39—45.
110. Goldstein J. L., Brown M. S., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2804—2808.
111. Khachadurian A. K., Kawahara F. S., (1974), *J. Lab. Clin. Med.* **83**, 1—15.
112. Quarfordt S. H., Levy R. I., Fredrickson D. S., (1968), *J. Clin. Invest.* **47**, 81a—82a.
113. Quarfordt S. H., Levy R. I., Fredrickson D. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **296**, 572—576.
114. Eaton R. P., Berman M., Steinberg D., (1969), *J. Clin. Invest.*, **48**, 1560—1579.
115. Russ E., Raymunt J., Barr D., (1965), *J. Clin. Invest.*, **35**, 133—144.
116. Wehr H., (1966), *Pam. Zj. Nauk. Pol. Tow. Epid. i Lek. Chor. Zak.*, 319—323.
117. Switzer S., Satenstein L., (1967), *J. Clin. Invest.* **46**, 1855—1866.
118. Wehr H., (1970), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **45**, 563—570.
119. Wehr H., (1970), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **45**, 571—576.
120. Picard J., Veissière D., (1970), *Clin. Chim. Acta*, **30**, 149—155.
121. Seidel D., Alaupovic P., Furman R. H., (1969), *J. Clin. Invest.*, **48**, 1211—1223.
122. Seidel D., (1971), *New. Engl. J. Med.*, **285**, 1538.
123. Seidel D., Agostini B., Müller P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 146—152.
124. Quarfordt S. H., Oelschlaeger H., Krigbaum W. R., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 1979—1988.
125. Ritland S., Blomhoff J. P., Gjone E., (1973), *Clin. Chim. Acta*, **49**, 251—261
126. Lovelock J. E., James A. T., Rowe C. E., (1960), *Biochem. J.*, **74**, 137—140.
127. Bell F. P., (1973), *Exp. Mol. Pathol.*, **19**, 293—303.
128. Reed C. F., Murphy M., Roberts G., (1968), *J. Clin. Invest.*, **47**, 749—760.
129. Murphy J. R., (1962), *J. Lab. Clin. Med.*, **60**, 86—109.
130. Badzio T., Solecki A., (1973), *Diagn. Lab.*, **9**, 95—98.
131. D'Hollander F., Chevallier F., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 110—132.
132. Gjone E., Torswik H., Norum K. R., (1968), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 327—332.
133. Cooper R. A., Jandl J. H., (1968), *J. Clin. Invest.*, **47**, 809—822.
134. Norum K. R., Gjone E., (1968), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **22**, 94—98.
135. Gjone E., Norum K. R., (1970), *Acta Med. Scand.*, **187**, 153—161.
136. Graham J. M., Green C., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 16C—18C.
137. Stein O., Stein Y., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 232—244.
138. Kranepool M. J., Hearn V. M., Blumenfeld O. O., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1479.
139. Schumaker V. N., Adams G. H., (1969), *Ann. Rev. Biochem.*, **30**, 113—136.
140. Fredrickson D. S., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 1138—1146.
141. Jonas A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4503—4507.

HIERONIM JAKUBOWSKI*

Syntetazy aminoacylo-tRNA Aminoacyl-tRNA Synthetases

I. Schemat biosyntezy białka

Badania nad biosyntezą białka doprowadziły do poznania (1) ogólnego przebiegu tego procesu (równania I—III):



Reakcja (I) to reakcja aktywacji aminokwasu. W tej reakcji syntetaza aminoacylo-tRNA (ligaza aminokwas: tRNA (AMP), E.C.6.1.1.) specyficzna dla jednego z 20 aminokwasów występujących w białku katalizuje utworzenie aminoacyloadenylationu. W drugim etapie (równanie II) właściwa ligaza katalizuje przeniesienie reszty aminokwasowej na 2' (2, 3) hydroksylową grupę rybozy końcowej adenozy w cząsteczce tRNA. Reakcja (III) przedstawia syntezę łańcucha polipeptydowego na rybosomach.

* Dr Międzyuczelniany Instytut Biochemii, Akademia Rolnicza, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów: AA — aminokwas; AA-tRNA — aminoacylo-tRNA; AMP — adenozylo 5'-monofosforan; ATP — adenozylo 5'-trójfosforan; ϵ ATP — 1,N⁶-etenoadozeno 5'-trójfosforan; dATP — dezoksy ATP; DTNB — kwas ditionitrobenzenowy; E — syntetaza aminoacylo-tRNA; mRNA — RNA informacyjny; tRNA — RNA przenośnikowy; tRNA^{AA} — tRNA specyficzny dla danego aminokwasu, np. tRNA^{cys} — tRNA specyficzny dla cysteiny, tRNA cysteinowy; NEM — N-etyloimid kwasu maleinowego; pCMB — kwas parachlorortęciobenzenowy; PP — pirofosforan. Skrót „syntetazy” używać będziemy w artykule na określenie syntetaz aminoacylo-tRNA, skrótem np. „syntetaza izoleucynowa” nazywać będziemy syntetazę izoleucylo-tRNA, itd.

Prawidłowy przebieg reakcji (IIa) warunkuje powstanie w następnym etapie białka o sekwencji aminokwasowej odpowiadającej sekwencji nukleotydów w mRNA. Błąd w reakcji (II) to jest powstanie AA-tRNA, w którym tRNA jest połączony z niewłaściwym aminokwasem, nie może ulec naprawie, a w konsekwencji powstaje białko o zmienionej sekwencji. Ala-tRNA^{Cys}, otrzymany w drodze chemicznej redukcji Cys-tRNA^{Cys} przynosi alaninę w normalną pozycję cysteiny w peptydzie (4). Walinowy tRNA z *E.coli* błędnie zestryfikowany fenyloalaniną rozpoznaje kodon waliny, lecz nie fenyloalaniny (5) i przynosi fenyloalaninę w normalną pozycję waliny w peptydzie (6). Ile-tRNA^{fMet} wiąże się z rybosomem programowanym kodonem AUG, tak jak normalny Met-tRNA^{fMet} (7).

Reakcja aktywacji aminokwasu wydaje się być mniej specyficzna niż reakcja aminoacylacji. I tak syntetaza izoleucynowa katalizuje reakcję aktywacji izoleucyny, waliny i leucyny, jednak tylko izoleucyny jest przenoszona na tRNA^{Ile} (8-11). Syntetaza walinowa prócz waliny aktywuje też treoninę (10).

W obecności odpowiedniego tRNA specyficzność syntetazy danego aminokwasu wydaje się być zwiększona. Baldwin i Berg (11) wyizolowali kompleksy Ile-AMP-E^{Ile} i Val-AMP-E^{Ile}. Po dodaniu tRNA^{Ile} izoleucyna z pierwszego kompleksu ulega przeniesieniu na tRNA, drugi zaś kompleks ulega hydrolizie do waliny, AMP i enzymu.

W literaturze nie znaleziono doniesień na temat błędnej aminoacylacji w warunkach fizjologicznych. Natomiast bardzo często udaje się uzyskać błędne ładowania *in vitro*, szczególnie w układach heterologicznych, to jest w układach zawierających syntetazę i tRNA z różnych organizmów. Poziom błędnej aminoacylacji jest o wiele niższy (lub wręcz nie obserwuje się błędnej aminoacylacji), gdy stosuje się do badań „surowe” preparaty tRNA zawierające tRNA specyficzne dla wszystkich 20 aminokwasów. W pewnych warunkach można włączyć fenyloalaninę do około 70% tRNA^{Ala} lub tRNA^{Val} z drożdży za pomocą syntetazy fenyloalaninowej z drożdży, podczas gdy tylko 9% tRNA^{Ala} lub tRNA^{Val} można naładować fenyloalaniną, gdy stosuje się tRNA „surowy” (12). Syntetaza walinowa z drożdży włącza walinę do czystego tRNA^{Ala} lub tRNA^{Phe} z drożdży, lecz takiej niespecyficznej aminoacylacji nie obserwuje się, gdy stosuje się „surowy” tRNA (12). Syntetaza walinowa z *Escherichia coli* nie katalizuje aminoacylacji tRNA^{Phe} z *Neurospora crassa* obecnego w „surowym” tRNA, podczas gdy enzym ten włącza walinę do częściowo oczyszczonego tRNA^{Phe} (13). Wyniki te zdają się wskazywać na większą specyficzność aminoacylacji w warunkach bardziej zbliżonych do fizjologicznych. Ciekawy jest problem enzymatycznej hydrolizy błędnie naładowanych tRNA. Syntetaza izoleucynowa z *E. coli* w pewnych warunkach katalizuje syntezę Ile-tRNA^{Phe}, który bardzo szybko ulega hydrolizie pod wpływem syntetazy fenyloalaninowej (14-15). Podobnie, pod działaniem syntetazy fenyloalaninowej ponad 100-krotnie szybszej hydrolizie

ulegał Val-tRNA^{Phe} niż Phe-tRNA^{Phe} (16). Tak więc należałoby zmodyfikować ogólnie dotąd przyjęty pogląd, że aminokwas raz włączony do tRNA zostaje przenoszony bez żadnych przeszkód na rybosom i wbudowany w białko: w przypadku błędnej aminoacylacji istnieje możliwość naprawienia błędu. Nie jest to jednak mechanizm uniwersalny, o czym świadczy fakt bardzo wolnej hydrolizy Phe-tRNA^{Val} przez syntetazę walinową (16).

Przedstawiony wyżej dwustopniowy mechanizm aminoacylacji (reakcje I i II) jest bardzo dobrze udokumentowany. Prawie wszystkie syntetazy wykazują reakcję I: w wielu przypadkach wyizolowano nawet kompleks E—AA—AMP (np. 17—21) oraz udało się rozdzielić dwie funkcje enzymu (patrz rozdział III 5.). Duże różnice szybkości reakcji I i II zdają się potwierdzać również dwustopniowy mechanizm aminoacylacji. Równocześnie jednak w wielu przypadkach obserwowano duży wpływ tRNA na reakcję I (22—26), co więcej, w nieobecności tRNA nie obserwuje się w ogóle aktywacji wobec syntetazy argininowej (27, 28) glutaminowej (28, 29) i kwasu glutaminowego (30—33). Zaobserwowano również, że poliaminy mogą zastąpić jony magnezu w reakcji aminoacylacji (34), przy czym w tych układach nie obserwuje się wymiany ATP/PP. Dane te zdają się wskazywać na jednostopniowy mechanizm aminoacylacji w cytowych przypadkach (35, 36). Warto przy tym zwrócić uwagę na obecność poliamin w izolowanych preparatach kwasów nukleinowych, szczególnie w tRNA (37).

II. Oczyszczanie aminoacylo-tRNA syntetaz

Pierwszą wysoce oczyszczoną syntetazę otrzymano w 1956 roku. Była to syntetaza tryptofanowa z trzustki wołowej (38). W ciągu minionych kilkunastu lat wyizolowano w stanie wysokiej czystości i scharakteryzowano syntetazy dla 19 aminokwasów. Do tej pory nie otrzymano homogenego preparatu jedynie syntetazy asparaginowej. Większość syntetaz wyizolowano z bakterii (głównie *E. coli*) i drożdży, mniej z tkanek zwierzęcych, a dopiero w 1972 roku wyizolowano jednorodną elektroforetycznie, jednak dotąd bardzo słabo scharakteryzowaną, roślinną syntetazę prolinową (z nasion fasoli złocistej, (39)).

Istnieje kilka obszernych prac przeglądowych poświęconych wyodrębnieniu i ogólnym własnościom syntetaz (1, 36). Ponieważ do tej pory praktycznie nie wyizolowano roślinnych syntetaz w stanie wysokiej czystości, znane są tylko takie ich własności, które można określić w preparatach o niskim stopniu czystości (40).

Poza syntetazami opisanymi w przeglądowych pracach Novelliego (1) i Loftfielda (36) wyodrębniono i wysoce oczyszczono także syn-

tetazy: asparaginową z drożdży (41), fenyloalaninową z drożdży (42) i wątroby szczura (43, 44), glutaminową z *E. coli* (45), lizynową z *E. coli* (46—48), leucynową z drożdży (49, 50), tryptofanową z trzustki wołowej (51, 60), łożyska ludzkiego (52), lizynową i walinową z drożdży (46), argininową (53) i izoleucynową (54) z *Bacillus starothermophilus*, izoleucynową (55) i tyrozynową (56) z *E. coli* oraz serynową z *E. coli* (57, 58) i wątroby kury (59).

W stanie krystalicznym otrzymano preparat syntetazy lizynowej (62) i leucynowej (63) z drożdży, oraz duży, aktywny fragment syntetazy metioninowej z *E. coli* (64). Nie poznano jednak dotychczas budowy pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej żadnej z syntetaz. Czynione są próby podstawień izomorficznych ciężkimi atomami i bada się możliwość wiązania substratów do krystalicznego enzymu (63).

Syntetazy oczyszcza się wg klasycznych metod frakcjonowania białek. Stosuje się wysalanie siarczanem amonu, sączenie żelowe, chromatografię na DEAE-celulozie, CM-celulozie i hydroksypatycie oraz elektroforezę lub ogniskowanie elektroforetyczne. W ostatnich latach do wyodrębnienia syntetaz aminoacylo-tRNA zastosowano chromatografię powinowactwa. W tej technice stosuje się nośniki (zwykle agarozowe), do których wiąże się kowalencyjnie substrat lub też inhibitor danego enzymu (65). Stosując tę technikę wyizolowano w stanie homogennym syntetazę metioninową (66), tyrozynową (67) i fenyloalaninową (68, 69), oczyszczane już wcześniej metodami klasycznymi. Nie zawsze jednak zastosowanie tej techniki okazuje się skuteczne (70, 71), obserwuje się bowiem często niespecyficzną adsorpcję innych białek na kolumnie. Należy sądzić, że efekty te pochodzą w dużej mierze z oddziaływań ze zmodyfikowanym nośnikiem, a tylko częściowo z niespecyficznych interakcji z ligandem związanym ze zmodyfikowanym nośnikiem.

W metodach chromatografii powinowactwa jako nośnika używa się zwykle ω -aminoalkilowych pochodnych Sepharose 4B, do których dołącza się odpowiedni ligand, przy czym zakłada się, że sam aminoalkilowy nośnik nie oddziałuje z białkiem. Wykazano jednak (72—77), że ω -aminoalkilowe pochodne Sepharose 4B bardzo silnie wiążą białka, dlatego należy ostrożnie interpretować wyniki uzyskane w pracach z tymi nośnikami. Siła niespecyficznego wiązania białek przez zmodyfikowaną Sepharose 4B zależy od wielkości grupy aminoalkilowej. Tę własność ω -aminoalkilopochodnych Sepharose wykorzystano do oczyszczania syntetaz z nasion łubinu żółtego (77) uzyskując homogenne preparaty syntetaz walinowej, serynowej i tryptofanowej (77a).

W metodzie będącej odwróceniem chromatografii powinowactwa syntetazy zaadsorbowane na fosfofelulozie wymywa się swoiście za pomocą oczyszczonego tRNA (78). Zaletą tej metody jest wykorzystanie powinowactwa enzym—substrat bez wiązania substratu do matrycy.

III. Charakterystyka syntetaz aminoacylo-tRNA

III-1. Ciężary cząsteczkowe, struktura czwartorzędowa i miejsca wiążące dla substratów

Ciężary cząsteczkowe syntetaz mieszczą się w granicach 40—276 tysięcy, przy czym większość znanych i oczyszczonych syntetaz ma ciężar około 100 tysięcy (Tabela 1). Podzielić je można na trzy typy struktur czwartorzędowych (79): enzymy złożone z jednego łańcucha polipeptydowego, enzymy zbudowane z różnych podjednostek i enzymy zbudowane z jednakowych podjednostek.

Większość syntetaz wykazuje złożoną strukturę czwartorzędową. Ilustrują to dane zebrane w tabeli 1. Wydaje się, istnieje pewien związek między strukturą czwartorzędową syntetaz a ilością miejsc wiążących substraty. Syntetazy zbudowane z jednego łańcucha polipeptydowego mają jedno miejsce wiążące, syntetazy zbudowane z dwóch jednakowych podjednostek mają dwa miejsca wiążące. O syntetazach zbudowanych z czterech podjednostek mało jeszcze wiemy; są jednak dane wskazujące, że syntetaza fenyloalaninowa z wątroby szczura (43) może mieć cztery miejsca wiążące substrat. Należy przy tym zaznaczyć, że w syntetazie fenyloalaninowej z drożdży i *E. coli* wykazano istnienie tylko jednego miejsca wiążącego.

Istnieją rozbieżności w ocenie struktury czwartorzędowej kilku syntetaz. Tak na przykład według różnych autorów syntetaza lizynowa z *E. coli* jest zbudowana z dwóch identycznych podjednostek (46), dwóch różnych (48) lub też stanowi jeden łańcuch polipeptydowy (91). Syntetaza tryptofanowa z trzustki wołowej ma być zbudowana z identycznych podjednostek (92) lub też z różnych (60). Być może rozbieżności te wynikają z niepełnej dysocjacji tych enzymów w warunkach używanych przez niektórych autorów. Na przykład Marshal i Zamecnik (91) stosują takie warunki dysocjacji dla syntetazy lizynowej, w których dysocjuje hemoglobina. Trudno przypuścić, że były to warunki dostateczne, skoro inni autorzy (46) rozbili ten enzym na podjednostki dopiero w 4M chlorowodoru guanidyny. Przy zastosowaniu bardziej drastycznych warunków dysocjacji okazało się, że syntetaza tryptofanowa z trzustki wołowej składa się z czterech podjednostek (60), a nie, jak sądzono uprzednio, z dwóch (92). Różne liczby miejsc wiążących ten sam substrat uzyskane przez różnych autorów można tłumaczyć różnicami w użytych metodach badań. Na przykład metoda dializy równowagowej może dać niższą od rzeczywistej liczbę miejsc wiążących wtedy, gdy powinowactwo przyłączenia do drugiego i dalszych miejsc wiążących jest niskie. Zwykle wyniki oznaczania białka uzyskane metodą Folina są wyższe od wyników uzyskanych na podstawie składu aminokwasowego. Stwierdzono to na przykład w przypadku syntetazy tyrozynowej z *E. coli* (56). Podobnie oznaczając białko

Charakterystyka syntetaz aminoacylo-tRNA¹

Syntetaza	Pochodzenie	Ciężar cząsteczkowy $\times 10^{-3}$	Podjednostki	Liczba miejsc wiążących AA ATP-tRNA	Podatność na odczynniki blokujące grupy -SH	Piśmiennictwo
Ala	<i>E. coli</i>	140—160	2 identyczne		-	169, 170
Asp	drożdże	100 (260?)	1 łańcuch		+	41, 94
Arg	<i>E. coli</i> ^a	75 (40?)	1 łańcuch			91
Cys	<i>B. stearothermophilus</i>	78	1 łańcuch	1	-	53, 196
Glu	drożdże	160	4 identyczne		+	95
	<i>Micrococcus cryophilus</i>	190				171
	wątroba szczura	180				32
	<i>E. coli</i> ^a	102	56 tys. + 46 tys.	1	+	33, 45
GluNH ₂	<i>E. coli</i>	70	1 łańcuch	1	+	85
Gly	<i>E. coli</i>	220	2 × 33 tys. + 2 × 80 tys.	1		81
His	<i>Salmonella</i>	100				172
Ile	<i>E. coli</i> ^a	112; 102	1 łańcuch	1	+	18, 55, 86, 161, 173, 174
Leu	<i>B. stearothermophilus</i>	110		1		54
	drożdże ^b	120	2 identyczne	1	+	49, 50
	<i>E. coli</i>	105	1 łańcuch	1	+	89, 90, 175, 176
Lys	<i>Drosophila melanogaster</i>	75	2 identyczne	2; 1		177
	drożdże ^{a,b}	138	2 identyczne	2		46, 47, 93, 178
	<i>E. coli</i>	108	1 łańcuch	2		46, 179
		80—90	2 różne		-	91, 131, 97
		150				48

Met	<i>E. coli</i> ^{a, b}	96 173—190	2 identyczne 4 identyczne	2 2	2 2	2 1;2	+	+	152, 180 156, 158, 159, 181—183
Phe	drożdże <i>E. coli</i> ^a	180; 220 236; 276 181; 270	2×50 tys.+2×60 tys. 2×63 tys.+2×75 tys. 4 identyczne	1 1	2 1	1 1	+	+	106, 163, 184 42, 78, 164 82, 155, 160, 165, 185
Pro	<i>Drosophila melanogaster</i> wątroba szczura <i>E. coli</i>	181 237, 287 94	2×74,5 tys.+2×69 tys. 2 identyczne			4	+		177 43, 44 80, 186
Ser	drożdże łubin żółty <i>E. coli</i> ^a	90; 115 110 95; 103	2 identyczne 2 identyczne	1;2	1;2	1;2	+	+	106, 187, 157, 117, 163, 154, 188, 189 77a
Tre	wątroba szczura wątroba kury <i>E. coli</i>	90 120 117	2 identyczne				+	+	57, 58, 101, 190, 191 192
Try	<i>E. coli</i> ^a trzuska wołowa ^{a, b}	74 108 110	2 identyczne 2 identyczne (α, β)	2 2	2 2	1	+	+	193 83, 84 51, 92, 194, 195 60
Tyr	łubin żółty łóżyisko ludzkie drożdże <i>E. coli</i> ^a <i>B. subtilis</i>	200 110; 118 46,5 95—97 85	4 identyczne? 2 identyczne 1 łańcuch 2 identyczne			1;2	+	+	77a 52 67 56, 26, 104, 168, 168
Val	drożdże ^a <i>E. coli</i> ^a łubin żółty	112 110 120	1 łańcuch 1 łańcuch 1 łańcuch	1 1	1 1	1 1	+	+	46, 78, 162, 167 21, 86, 87, 153, 166 77a

¹ W tabeli podano charakterystykę syntetaz oczyszczonych do stanu homogenności.

^a syntetazy o znanym składzie aminokwasowym,

^b syntetazy wyizolowane w postaci nadającej się do badań krystalograficznych.

ze składu aminokwasowego obliczono w syntezie lizynowej z drożdży dwa miejsca wiążące (46), z oznaczeń białka metodą Folina zaś jedno miejsce wiążące (93).

III-2. Rola grup -SH

Związki blokujące grupy -SH inaktywują prawie wszystkie syntetazy, oprócz syntetazy asparaginowej z drożdży (94), cysteinowej z drożdży (95) i lizynowej z *E. coli* (96—98). Można by zatem sądzić, że aktywność tych enzymów nie zależy od obecności wolnych grup -SH. Lizyna, ATP i jony Mg^{++} nie chronią grup sulfhydrylowych syntetazy lizynowej przed reakcją z DTNB (79). ATP i izoleucyna chronią jedną z dziewięciu grup -SH syntetazy izoleucynowej przed reakcją z NEM (99). Enzym jest aktywny tylko wtedy, gdy właśnie ta grupa -SH jest wolna. Syntetaza tryptofanowa z *E. coli* posiada dwie grupy -SH chronione przed reakcją z DTNB, gdy w mieszaninie reakcyjnej występują jednocześnie ATP, tryptofan i jony Mg^{++} . Syntetaza tryptofanowa jest aktywna tylko wtedy, gdy te dwie grupy -SH są wolne (79, 84). ATP i tryptofan chronią cztery z ośmiu grup sulfhydrylowych syntetazy tryptofanowej z trzustki wołowej (100) przed reakcją z DTNB. Również i w tym przypadku enzym jest aktywny, gdy te cztery grupy -SH są wolne.

Natywna forma syntetazy leucynowej z *E. coli* ma 11 grup -SH (136). W wyniku blokady jednej z nich za pomocą NEM lub pCMB enzym traci zdolność katalizowania aminoacylacji, zachowuje jednak zdolność katalizowania wymiany ATP/PP i zdolność tworzenia kompleksu z tRNA. Po zablokowaniu trzech grup -SH syntetaza leucynowa traci zdolność katalizowania aktywacji leucyny, przy czym można wykazać, że posiada nadal zdolność tworzenia kompleksu z tRNA. Kompleks ten nie tworzy się dopiero po zablokowaniu około sześciu grup sulfhydrylowych. Należy zwrócić uwagę na to, że kompleks tRNA z syntetazą leucynową traktowaną pCMB nie jest identyczny z kompleksem tRNA z natywną formą enzymu.

Syntetaza serylo-tRNA z *E. coli* traktowana wysokimi stężeniami DTNB lub jodoacetamidu wykazuje tylko jedną zmodyfikowaną resztę cysteiny na dziesięć obecnych w jednej podjednostce enzymu, przy czym modyfikacja ta nie wpływa na jego aktywność. Na podstawie krzywych miareczkowania syntetazy serynowej za pomocą odczynników blokujących grupy -SH sądzi się, że grupy te pełnią raczej funkcję strukturalną niż katalityczną (101).

III-3. Specyficzność substratowa

Podobnie jak wszystkie enzymy, których substratem jest ATP, syntetazy aminoacylo-tRNA wymagają jonów Mg^{++} . Tylko syntetaza tyrozynowa z *E. coli* tworzy adenylany w nieobecności jonów Mg^{++} (102—104),

jednak reakcja ta przebiega z bardzo niską szybkością. Dwuwartościowe kationy Mn^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Zn^{++} (105) oraz poliaminy mogą w pewnych przypadkach zastąpić jony magnezu. Jak już wspomniano w obecności poliamin nie obserwuje się reakcji wymiany ATP/PP (34, 36).

Poza ATP tylko dATP i ϵ ATP są substratami dla syntetaz (36, 106).

Syntetazy wykazują niewysoką specyficzność wobec analogów aminokwasów nie występujących w komórce. Na przykład kwas azatydynokarboksylowy (analog proliny) ulega włączeniu do tRNA^{Pro} przez syntetazę prolinową z wątroby szczura (107), *E. coli* (108) i groszku (109). Analogu tego nie włączają do tRNA^{Pro} syntetazy z roślin zawierających go w tkankach (109, 110). Znamy tylko jedną syntetazę D-tyrozylo-tRNA. Fakt ten jest dobrze udokumentowany (36).

Specyficzność syntetaz wobec tRNA omówiono w rozdziale I.

III-4. Wpływ jonów jednowartościowych

Na aktywność syntetaz silnie wpływają kationy jednowartościowe. Jony potasu w stężeniu 0,15M bardzo silnie stymulują syntetazę tyrozynową z *E. coli* w buforze Tris-HCl, podczas gdy jony litu, sodu i amonu w tym samym stężeniu hamują ten enzym w 50%. W buforze kakodylanowym wpływ tych jonów jest niewielki (67). Jony potasu i amonu w stężeniach 5—80mM stymulują syntetazę leucynową z *E. coli*, jony sodu i litu nie wpływają na jej aktywność (61, 90, 111). Jony K^+ i NH_4^+ stymulują również syntetazę metioninową z *E. coli*; optimum stymulacji występuje przy stężeniu tych jonów równym 50—100mM. Jony Na^+ , Li^+ , Cs^+ i Rb^+ w stężeniu 50 mM nie wpływają na aktywność tych enzymów (112). Jony Na^+ obniżają aktywność i poziom ładowania tRNA^{Val} z wątroby szczura. Inhibicja jest całkowita przy stężeniu NaCl równym 0,5—0,6M (113). Chlorek sodowy w stężeniu 0,1M stymuluje (w 20%) syntetazę fenyloalaninową z *E. coli* (25) oraz leucynową i fenyloalaninową z wątroby szczura (133); wyższe stężenie soli częściowo hamują te enzymy. Syntetazy fenyloalaninowe z *E. coli* (25) oraz fenyloalaninowa i lizynowa z wątroby szczura (113) wykazują 20—40% aktywności wobec NaCl w stężeniu 1M. NaCl i KCl silnie hamują syntetazę lizynową z *E. coli*: przy stężeniu soli równym 0,3M inhibicja wynosi 90% (98). Podobnie wpływa NaCl na syntetazę walinową z *E. coli* (115). NH_4Cl i KCl w stężeniach powyżej 50mM hamują syntetazę walinową z fasoli. W niższych stężeniach sole te nie wpływają na jej aktywność (116).

Mimo obszernego materiału doświadczalnego, (przedstawionego powyżej) nie wysunięto hipotezy jednoznacznie precyzującej rolę jonów Me^+ w procesie aminoacylacji. Sugeruje się, że jony te wpływają na strukturę syntetazy (112) lub tRNA (90) lub też aktywują enzymy degradując tRNA w przypadku stosowania nieoczyszczonych preparatów syntetaz do badań (113). Sądzi się także, że niekompletna aminoacylacja wobec Me^+ jest

wynikiem równowagi między reakcją aminoacylacji a deacylacją enzymatyczną i nieenzymatyczną (115). Ostatnia hipoteza, mimo szerokiego opracowania teoretycznego i zgodności z doświadczeniem nie wydaje się być w pełni słuszna, ponieważ została oparta na nieprawdziwych założeniach. Założono mianowicie, że reakcja aminoacylacji jest praktycznie nieodwracalna, co wydaje się być błędem, ponieważ stała równowagi tej reakcji, jak podano wynosi $K = 4$.

Najbardziej racjonalnym wytłumaczeniem obserwowanych zależności wydaje się być przypuszczenie, że jony Me^+ poprzez oddziaływanie na strukturę tRNA i enzymu zmieniają położenie równowagi reakcji aminoacylacji. Poparciem dla tej hipotezy są prace, w których wykazano, że sole zmieniają powinowactwo syntetazy do tRNA. NaCl podwyższa stałą Michaelisa syntetazy fenyloalaninowej z *E. coli* wobec tRNA^{Phe} z $5,8 \times 10^{-8}$ bez NaCl do $35 \times 10^{-8} M$ wobec 0,4M NaCl, przy czym nie obserwuje się zmian szybkości maksymalnej aminoacylacji (25). Chlorek potasowy z kolei drastycznie zmienia stałą asocjacji kompleksu syntetaza serynowa — tRNA^{Ser} z drożdży. Stała ta wynosi $2 \times 10^7 M^{-1}$ bez KCl, a 1×10^7 , 4×10^6 i $1,4 \times 10^5 M^{-1}$ w układach zawierających odpowiednio 0,05, 0,1 i 0,2M KCl (117). Sole zmieniają również powinowactwo syntetazy izoleucynowej z *E. coli* do tRNA^{Ile} (118).

III-5. Modyfikacja syntetaz enzymami proteolitycznymi oraz odróżnienie dwóch czynności enzymatycznych

Chociaż już od dawna znany jest fakt istnienia izoakceptorowych tRNA, to jednak dotychczas nie stwierdzono istnienia więcej niż jednej syntetazy danego aminokwasu. Wcześniejsze doniesienia mówiły o istnieniu kilku syntetaz jednego aminokwasu (119—129), lecz dokładniejsze badania wykazały, że w kilku przypadkach były to syntetazy z różnych organelli komórek, w pozostałych wyniki nie są zbyt przekonujące (1, 130). Obecnie sądzi się, że syntetazy danego aminokwasu pochodzące z różnych organelli komórki lub różnych organów organizmów roślinnych czy zwierzęcych mogą się różnić, lecz, że w cytoplaźmie występuje tylko jedna syntetaza danego aminokwasu estryfikująca wszystkie izoakceptorowe tRNA tego aminokwasu.

W kilku przypadkach wyizolowano dwie formy danej syntetazy, przy czym okazało się, że jest to jedno białko ulegające pewnym modyfikacjom podczas oczyszczania. Na przykład z *E. coli* wyizolowano dwie formy syntetazy metioninowej, które różniły się ciężarem cząsteczkowym, aktywnością właściwą i optymalnym stężeniem jonów magnezu reakcji aminoacylacji (132). Enzymy te były prawie nierozróżnialne w reakcji wymiany ATP/PP: posiadały identyczne wymagania jonowe i stałe Michaelisa wobec ATP i metioniny, lecz prędkość maksymalna różniła się dwukrotnie dla poszczególnych preparatów (133). Okazało się, że przejście jednej for-

my w drugą jest wynikiem proteolizy. Podobne modyfikacje uzyskano po częściowym trawieniu oczyszczonej syntetazy kilkoma enzymami proteolitycznymi (132). Dimitrijevic (134) uzyskał dwie formy syntetazy lizynowej z drożdży: jedną złożoną z dwóch podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 70 tysięcy i drugą, lżejszą, złożoną z podjednostek o ciężarze 50—60 tysięcy daltonów. Obie formy były aktywne, lżejszą formę można było otrzymać przez trawienie cięższej formy trypsyną.

Otrzymanie dwóch form syntetazy leucynowej z *E. coli* również jest wynikiem proteolizy (135). Natywny enzym E_{II} o ciężarze 105 tysięcy przechodzi w lżejszą formę E_I o ciężarze 102 tysiące. Dodanie hydrolitycznie odszczepionego peptydu (o $M = 3000$) do formy E_I prowadzi do powstania formy przypominającej formę natywną (E_{II} -like complex). W tym wypadku dwie formy enzymu różnią się znacznie. Forma E_{II} jest aktywna w aktywacji leucyny i w aminoacylacji, podczas gdy forma E_I jest aktywna w aktywacji leucyny i posiada zdolność tworzenia kompleksu z tRNA, lecz nie katalizuje reakcji aminoacylacji. Również kompleksy E_I -tRNA i E_{II} -tRNA są różne, chociaż mają podobne stałe dysocjacji. ATP i leucyna wpływają na szybkość tworzenia kompleksu E_{II} -tRNA, lecz nie wpływają na szybkość tworzenia E_I -tRNA. Różnice w interakcji syntetaza: tRNA zaobserwowano badając dwie formy syntetazy metioninowej z *E. coli* (133).

Z dwóch form syntetazy leucynowej z *E. coli* tylko E_I można zdysocjować roztworami 8M mocznika lub 6M chlorowodoru guanidyny na dwie podjednostki o ciężarze cząsteczkowym 55 tysięcy. Formy te różnią się także ilością grup -SH podatnych na reakcję z pCMB w warunkach niedenaturujących (9 dla E_I i 11 dla E_{II}) (136).

Częściowa trypsynoliza syntetazy leucynowej z *E. coli* jest jednym z przypadków, w którym udało się rozdzielić dwie funkcje syntetazy: zdolność katalizowania reakcji aktywacji i reakcji aminoacylacji. Dla syntetazy cysteinowej z drożdży rozdzielono dwie aktywności przez denaturację termiczną (95). Syntetaza ta podczas denaturacji cieplnej szybciej traciła zdolność katalizowania reakcji aminoacylacji niż zdolność katalizowania reakcji aktywacji.

Syntetaza prolinowa z *E. coli* po obniżeniu temperatury do 0°C traci zdolność aminoacylacji, lecz zachowuje aktywność w reakcji aktywacji proliny (137). Syntetaza metioninowa traci zdolność katalizowania reakcji aminoacylacji i zachowuje zdolność katalizowania wymiany ATP/PP po traktowaniu jej pCMB wobec $8 \times 10^{-7}M$ metionyladenylanu (138).

IV. Formy występowania syntetaz *in vivo*

Pomimo postępu wiedzy o procesach biosyntezy białka nie mamy zbyt wielu informacji o strukturalnej organizacji makromolekuł biorących w nich udział. W komórkach organizmów wyższych część aktywnych ry-

bosomów jest związana z reticulum endoplazmatycznym (139), sądzi się natomiast, że syntetazy i tRNA, jak również i inne rozpuszczalne czynniki niezbędne w procesie biosyntezy białka nie są związane ze strukturami cytoplazmatycznymi. Ostatnio pojawiły się doniesienia, w których przedstawiono dowody na to, że syntetazy z komórek zwierzęcych nie występują jako swobodne składniki, lecz są częścią wysokocząsteczkowych kompleksów.

Syntetazy aminoacylo-tRNA w komórkach wątroby szczura występują w postaci wysokocząsteczkowego kompleksu z tRNA (140). W tej postaci wykazują one od kilku do kilkuset razy większą aktywność, niż syntetazy otrzymane przez innych badaczy z tego samego materiału. Kompleks ten jest nietrwały i rozpadając się traci niemal całą aktywność. Małe wydajności w biosyntezie białka *in vitro* mogą być przeto wynikiem zniszczenia natywnych, wysoce zorganizowanych struktur. Kompleks syntetaz i tRNA wyizolowany z wątroby szczura zawiera 20—25% lipidów, prawie wyłącznie estrów cholesterolu i 7—8 różnych kwasów tłuszczowych (141); lipidy być może stabilizują strukturę kompleksu, nie ma jednak pewności czy tak jest istotnie, gdyż nie udało się zreaktywować zdegradowanego kompleksu. Ciekawe w tym kontekście są dane o stymulacji syntetaz z wątroby szczura przez ester cholesterolu i kwasu 14-metyloheksadecanowego, który to ester stymulował również wiązanie aminoacylo-tRNA do rybosomów i wydłużanie łańcucha peptydowego (142—145). Inne estry cholesterolu były nieaktywne.

Kompleks syntetaz w pomikrosomalnej frakcji z wątroby szczura (146) zawiera aktywności syntetaz glutaminowej, izoleucynowej, leucynowej, lizynowej i metioninowej i jest trwały podczas oczyszczania na Sephadex G-200, DEAE-Sephadex A-50 i hydroksypatycie. Stała sedymentacji oczyszczonego kompleksu wynosi około 18S. W mikroskopie elektronowym obserwowano kolistą i prostokątną cząstki o wymiarach 11—14nm.

Wiele syntetaz w lizatach retikulocytów królika (147) i homogenatach wątroby szczura (148) występuje również w postaci wysokocząsteczkowego kompleksu z rybosomami. W preparatach rybosomów z komórek Ehrlicha wykrywa się aktywne syntetazy fenyloalaninowe w dwóch wysokocząsteczkowych frakcjach: jedną jako część kompleksu sedymentującego przy 25S i drugą związaną z podjednostką 60S rybosomów. Kompleks 25S powstaje podczas inkubacji tRNA z podjednostką 60S. Nie wiadomo przeto czy kompleks syntetazy fenyloalaninowej z tRNA istnieje *in vivo* czy też stanowi artefakt powstający w trakcie preparatyki. W zależności od materiału i metod stosowanych do homogenizacji i izolacji frakcji wysokocząsteczkowej syntetazy z komórek zwierzęcych można otrzymać jako kompleksy nie zawierające rybosomów (140, 146, 149) lub też związane z rybosomami (147—149).

Nie mamy danych na temat występowania podobnych kompleksów w organizmach bakteryjnych i roślinnych. W dwóch przypadkach sącze-

nia żelowego na Sephadex G-200 ekstraktów z *E. coli* nie znaleziono do-
vodu na istnienie kompleksów syntetaz (82, 150).

Jest wysoce prawdopodobne, że *in vivo*, przynajmniej w organizmach
zwierzęcych, syntetazy występują w postaci wielkocząsteczkowego kom-
pleksu z innymi składnikami aparatu biosyntezy białka. Wyizolowano na
przykład z komórek HeLa kompleksy zawierające syntetazy aminoacylo-
-tRNA i czynniki elongacyjne (151). Kompleksy te o stałych sedymentacji
w granicach 5—28S w połączeniu z rybosomami mogą tworzyć zorgani-
zowaną strukturę, czynną w efektywnej biosyntezie białka. Należy jed-
nakże wyraźnie stwierdzić, że przedstawione wyżej wyniki nie dowodzą
jednoznacznie, że kompleksy te rzeczywiście istnieją *in vivo*.

V. Zakończenie

Nasza wiedza o procesie aminoacylacji, o makrocząsteczkach biorących
w nim udział, o oddziaływaniach między nimi i o wpływie różnych czyn-
ników na ten proces jest stosunkowo duża, lecz mimo to wciąż jeszcze nie
jest pełna. Nie ma dotychczas zgodnych poglądów na mechanizm amino-
acylacji, nie wiadomo na czym polega prawidłowe rozpoznawanie tRNA
przez syntetazę gwarantującą wysoką specyficzność tego procesu i nie
wiemy dokładnie dlaczego sole nieorganiczne zmieniają szybkość i poziom
aminoacylacji.

Wyizolowano w stanie wysokiej czystości syntetazy aminoacylo-tRNA
10 aminokwasów. Kilka syntetaz wykryto i czynione są próby
poznania ich struktury trzeciorzędowej. Można sądzić, że próby te zostaną
uwieńczone powodzeniem i pozwolą na pełniejsze zrozumienie mechaniz-
mu działania tej niezmiernie ważnej i interesującej grupy enzymów.

Artykuł nadszedł 5.9.1973; po rewizji autorskiej otrzymano 10.9.1974.

PIŚMIENNICTWO

1. Novelli G. D., (1967), *Ann. Rev. Biochem.*, 36, 449—484.
2. Sprinzl M., Scheit K. H., Sternbach H., von der Haar F.,
Cramer F., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 881—887.
3. Sprinzl M., Cramer F., (1973), *Nature, New Biology*, 245, 3—5.
4. Chapeville F., Lipmann F., Von Ehrenstein G., Weisblum B.,
Ray W. J. Jr., Benzer S., (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 48, 1086—1092.
5. Grunberger D., Weinstein I. B., Jacobson K. B., (1969), *Science*,
166, 1635—1637.
6. Jacobson K. B., (1971), *Progres in Nucleic Acid Research and Molecular
Biology*, red. Davidson J. N., Cohn W. E., t. 11, str. 461—488, Academic Press,
New York and London.

7. Mertes M., Peters M. A., Mahoney W., Yarus M., (1972), *J. Mol. Biol.*, **71**, 671—685.
8. Berg P., Bergmann F. H., Ofengand E. J., Dieckmann M., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 1726—1734.
9. Loftfield R. B., Eigner E. A., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 426—448.
10. Kondo M., Woese C. R., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4177—4182.
11. Baldwin A. N., Berg P., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 839—845.
12. Kern D., Giege R., Ebel J. P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 148—155.
13. Strickland J. E., Jacobson K. B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 247—251.
14. Yarus M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1915—1919.
15. Yarus M., (1973), *Nature, New Biology*, **245**, 5—6.
16. Bonnet J., Giege R., Ebel J. P., (1972), *FEBS Letters*, **27**, 139—144.
17. Lagerkvist U., Waldenström J., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2264—2265.
18. Norris A. T., Berg P., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 330—337.
19. Allende J. E., Allende C. C., Gatica M., Matamala, (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 342—346.
20. Rouget P., Chapeville F., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 310—314.
21. Yaniv M., Gros F., (1969), *J. Mol. Biol.*, **44**, 1—16.
22. Goldstein J., Holley R. W., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 353—355.
23. Loftfield R. B., Eigner E. A., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1482—1484.
24. Helle P., Barth P. T., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 149—157.
25. Santi D. V., Danenberg P. V., Satterly P., (1971), *Biochemistry*, **10**, 4804—4812.
26. Buonocore V., Schlesinger S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1343—1348.
27. Mitra S. K., Mehler A. H., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5490—5494.
28. Mitra S. K., Smith Ch. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 222—224.
29. Ravel J. M., Wang S. F., Heinemeyer C., Shive W., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 432—438.
30. Lee L. W., Ravel J. M., Shive W., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 614—618.
31. Mans R. J., Novelli G. D., (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 48—53.
32. Deutcher M. P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1132—1139.
33. Lapointe J., Söll D., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4975—4981.
34. Matsuzaki K., Takeda Y., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 339—351.
35. Loftfield R. B., Eigner E. A., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1746—1754.
36. Loftfield R. B., (1972), w *Progres in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, red. Davidson J. N., Cohn W. E., t. 12, str. 87—128, Academic Press, New York and London.
37. Cohen S. S., Morgan S., Streibel E., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 669—676.
38. Davie E. W., Koningsberger V. V., Lipmann F., (1956), *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 21—30.
39. Norris R. D., Fowden L., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 2921—2935.
40. Lea P. J., Norris R. D., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 2897—2920.
41. Gangloff J., Dirheimer G., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **294**, 263—272.
42. Schmidt J., Wang R., Stanfield S., Reid B. R., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3264—3268.
43. Lanks K. W., Sciscenti J., Weinstein I. B., Cantor Ch. R., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3494—3499.
44. Tscherne J. S., Lanks K. W., Salim P. D., Grunberger D., Cantor Ch. R., Weinstein I. B., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4052—4059.

45. Lapointe J., Söll D., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4966—4974.
46. Rymo L., Lundviøk L., Lagerkvist U., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3888—3897.
47. Lagerkvist U., Rymo L., Lindqvist O., Andersson E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3897—3899.
48. Hele P., Barber R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 319—331.
49. Chirikjian J. G., Lau E., Kanagalingham K., Kaufman J., Fresco J. R., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 1165.
50. Chirikjian J. G., Kanagalingham K., Lau E., Fresco J. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1074—1079.
51. Gros C., Lemaire G., van Rapenbusch R., Labouesse B., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2931—2943.
52. Muench K. H., Lipscomb M., Kuehl G. V., Penneys N. S., (1973), 9th Intern. Congr. Biochem. IUB, Stockholm, Abstract Book, str. 160.
53. Parfait R., Grosjean H., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 242—249.
54. Charlier J., Grosjean H., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 163—174.
55. Durekovic A., Flossdorf J., Kula M. R., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 528—533.
56. Chousterman S., Chapeville F., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 51—56.
57. Boeker E. A., Hays A. P., Cantoni G. L., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2379—2383.
58. Boeker E. A., Cantoni G. L., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2384—2389.
59. Le Meur M. A., Gerlinger P., Clavert J., Ebel J. P., (1972), *Biochimie*, **54**, 1391—1397.
60. Preddie E. C., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3958—3968.
61. Smith D. W. E., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 896—901.
62. Rymo L., Lagerkvist U., Wonacott A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4308—4316.
63. Chirikjian J. G., Wright H., Fresco J. R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1638—1641.
64. Waller J. P., Risler J. L., Monteilhet C., Zelwer C., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 186—188.
65. Cuatrecasas P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059—3065.
66. Gero M. R., Waller J. P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 315—319.
67. Beikirch H., von der Haar F., Cramer F., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 182—190.
68. Remy P., Brimele C., Ebel J. P., (1972), *FEBS Letters*, **27**, 134—138.
69. Forrester P. I., Hancock R. L., (1973), *Canad. J. Biochem.*, **51**, 231—234.
70. Nedilova O. D., Kis selev L. L., (1968), *Mol. Biol. (USSR)*, **2**, 60—68.
71. Bartkowiak S., Pawełkiewicz J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 137—140.
72. Er-el Z., Zaidenzaig Y., Shaltiel S., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 383—390.
73. Shaltiel S., Er-el Z., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 778—781.
74. Yon R. J., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 765—767.
75. Hofstee B. H. J., Otilio N. F., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 751—757.
76. Hofstee B. H. J., (1973), *Anal. Biochem.*, **52**, 430—448.
77. Jakubowski H., Pawełkiewicz J., (1973), *FEBS Letters*, **34**, 150—154.
- 77a. Jakubowski H., Pawełkiewicz J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, (w druku).
78. von der Haar F., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 84—90.
79. Muench K. H., Joseph D. R., (1970), w *Nucleic Acid Protein Interactions*.

- Nucleic Acid Synthesis in Viral Infections, red. Ribbons D. W., Woessner J. F., Schultz J., str. 172—183, North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London.
80. Lee M., Muench K. H., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 223—230.
 81. Ostrem D. L., Berg P., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1967—1974.
 82. Kosakowski M. H. J. E., Böck A., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 67—73.
 83. Joseph D. R., Muench K. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7602—7609.
 84. Joseph D. R., Muench K. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7610—7615.
 85. Folk W. R., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1728—1732.
 86. Berthelot F., Yaniv M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **16**, 123—125.
 87. Yaniv M., Gros F., (1969), *J. Mol. Biol.*, **44**, 17—30.
 88. Rouget P., Chapeville F., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 310—314.
 89. Rouget P., Chapeville F., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **14**, 498—508.
 90. Rouget P., Chapeville F., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 443—451.
 91. Marshal R. D., Zamecnik P. C., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **181**, 454—464.
 92. Lemaire G., Dorizzi M., Spotorno G., Labouesse B., (1969), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **51**, 495—510.
 93. Berry S. A., Grunberg-Manago M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 83—94.
 94. Diller R. F. B., Tener G. M., (1971), *Canad. J. Biochem.*, **49**, 822.
 95. James H. L., Bucovaz E. T., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3210—3216.
 96. Stern R., Mehler A. H., (1965), *Biochem. Z.*, **342**, 400—409.
 97. Waldenström J., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **3**, 483—487.
 98. Marshal R. D., Zamecnik P. C., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 376—385.
 99. Iaccarino M., Berg P., (1969), *J. Mol. Biol.*, **42**, 151—169.
 100. De Luca M., McElroy W. D., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 103—107.
 101. Waterson R. M., Clarke S. J., Kalousek F., Konigsberg W. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4181—4188.
 102. Chousterman S., Chapeville F., (1971), *FEBS Letters*, **17**, 153—157.
 103. Chousterman S., Chapeville F., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 46—50.
 104. Krajewska-Grynkiewicz K., Buonocore V., Schlesinger S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 518—527.
 105. Loftfield R. B., (1971), w Protein Biosynthesis, red. McConkey E. H., str. 1—88, Marcel Dekker, New York.
 106. Hertz H. S., Zachau G. H., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 203—213.
 107. Atherly A. G., Bell E. E., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 510—514.
 108. Fowden L., Richmond M. H., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 459—461.
 109. Peterson P. J., Fowden L., (1965), *Biochem. J.*, **97**, 112—124.
 110. Lea P. J., Fowden L., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 2129—2138.
 111. Yu Ch. T., Hirsch D., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **142**, 149—154.
 112. Svensson I., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 239—258.
 113. Sein K. T., Bečarević A., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 164—168.
 114. Loftfield R. B., Eigner E. A., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5355—5359.
 115. Bonnet J., Ebel J. P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 335—344.
 116. Burkard G., Guillemaut P., Weil J. H., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **224**, 184—198.
 117. Pingoud A., Riesner D., Boehme D., Mass G., (1973), *FEBS Letters*, **30**, 1—5.
 118. Yarus M., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2050—2060.

119. Barnett W. E., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 1462—1467.
120. Imamoto F., Yamane T., Sueoka N., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 1456—1462.
121. Barnett W. E., Epler J., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 184—189.
122. Barnett W. E., Epler J., (1966), *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, **31**, 549—555.
123. Allende C. C., Allende J. E., Gatica M., Celis J., Mora G., Matamala M., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2245—2251.
124. Yu C. T., Rappaport H. P., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 134—141.
125. Strehler D. L., Hendley D. D., Hirsch G. P., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 1751—1758.
126. Vescia A., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 496—500.
127. Favorowa O. O., Spasokukotskaya T. N., Kisselev L. L., (1968), *Mol. Biol. (USSR)*, **2**, 69—78.
128. Cowles J. R., Key J. L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **281**, 33—44.
129. Yem D. W., Williams L. S., (1973), *J. Bacteriol.*, **113**, 891—894.
130. Kull F. J., Jacobson K. B., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 1137—1144.
131. Kisselev L. L., Baturina I. D., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 231—234.
132. Cassio D., Waller J. P., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **20**, 283—300.
133. Lawrence F., Blanquet S., Poiret M., Robert-Gero, Waller J. P., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 234—239.
134. Dimitrijević, (1972), *FEBS Letters*, **25**, 170—174.
135. Rouget P., Chapeville F., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 459—467.
136. Rouget P., Chapeville F., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 452—458.
137. Papas T. S., Mehler A. H., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3767—3768.
138. Cassio D., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 222—224.
139. Tata J. R., (1968), *Nature*, **219**, 331—337.
140. Bandyopadhyay A. K., Deutscher M. P., (1971), *J. Mol. Biol.*, **60**, 113—122.
141. Bandyopadhyay A. K., Deutscher M. P., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 257—261.
142. Hradec J., Dusek Z., (1968), *Biochem. J.*, **110**, 1—8.
143. Hradec J., Dusek Z., (1969), *Biochem. J.*, **115**, 873—880.
144. Hradec J., Dusek Z., Bermek E., Matthaehi H., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 959—966.
145. Hradec J., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 1225—1229.
146. Vennegoor C., Bloemendal H., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 562—573.
147. Irvin J. D., Hardesty B., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1915—1920.
148. Tscherne J. S., Weinstein I. B., Lanks K. W., Gerston N. B., Cantor Ch. R., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3859—3865.
149. Roberts W. K., Coleman W. H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 206—214.
150. Nass G., Stöffler G., (1967), *Mol. Gen. Genet.*, **100**, 378—382.
151. Henriksen O., Smulson M., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1047—1054.
152. Bruton C. J., Hartley B. S., (1970), *J. Mol. Biol.*, **52**, 165—173.
153. Hélène C., Brun F., Yaniv M., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 349—365.
154. Rigler R., Cronvall E., Hirsch R., Pachman U., Zachau H. G., (1970), *FEBS Letters*, **11**, 320—324.
155. Farrelly J. G., Longsworth J. W., Stulberg M. P., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1266—1270.

156. Blanquet S., Fayet G., Waller J. P., Iwatsubo M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **24**, 461—479.
157. Engel G., Heider H., Maelicke A., van der Haar F., Cramer F., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **29**, 257—262.
158. Blanquet S., Iwatsubo M., Waller J. P., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 213—226.
159. Blanquet S., (1973), 9th Intern. Congr. of Biochem., (IUB), Stockholm, Abstract Book, str. 160.
160. Kosakowski H. M., Böck A., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **24**, 190—200.
161. Yarus M., Berg P., (1967), *J. Mol. Biol.*, **28**, 479—490.
162. Lagerkvist U., Rymo L., Waldenström J., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 5391—5400.
163. Befort N., Fasiolo F., Bolack C., Ebel J. P., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 319—331.
164. Hörz W., Zachau H. G., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **32**, 1—14.
165. Parfait R., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 323—325.
166. Georg H., Meister A., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **132**, 165—174.
167. Lagerkvist U., Waldenström J., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3021—3025.
168. Calendar R., Berg P., (1966), *Biochemistry*, **5**, 1681—1690.
169. Böck A., (1969), *Arch. Microbiol.*, **68**, 165—178.
170. Lazar M., Yaniv M., Gros F., (1968), *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **266**, 531—534.
171. Malcolm N. L., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 347—357.
172. De Lorenzo F., Ames B. N., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1710—1716.
173. Baldwin A. N., Berg P., (1966), *J. Biol. Chem.*, **242**, 831—838.
174. Arndt D. J., Berg P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 665—667.
175. Hayashi H., Knowles J. R., Katze J. R., Lapointe J., Söll D., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1401—1406.
176. Bennet T. P., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3182—3187.
177. Christopher C. W., Jones M. E., Stafford B. W., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 682—687.
178. Chlumecka v., von Tigerstrom M., D'Obrenan P., Smith Ch. J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5481—5488.
179. Stern R., Peterkofsky A., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4346—4354.
180. Bruton C. J., Hartley B. S., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 281—288.
181. Heinrickson R. L., Hartley B. S., (1967), *Biochem.*, **105**, 17—24.
182. Lemoine F., Waller 'J. P., van Rapenbusch R., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 213—221.
183. Cassio D., Waller J. P., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 33—41.
184. Fasiolo F., Befort N., Boulanger Y., Ebel J. P., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 305—318.
185. Stulberg M. P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1060—1064.
186. Paps T. S., Mehler A. H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1588—1595.
187. Heider H., Gottschalk E., Cramer F., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **20**, 144—152.
188. Makman M. H., Cantoni G. L., (1965), *Biochemistry*, **4**, 1434—1442.
189. Bluestein H. G., Allende C. C., Allende J. E., Cantoni G. L., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 4693—4699.
190. Katze J. R., Konigsberg W., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 923—930.
191. Knowles J. R., Katze J. R., Konigsberg W., Söll D., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1407—1415.
192. Rouge M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 342—351.

193. Hirsch D. I., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5731—5738.
194. Lemaire G., van Rapenbusch R., Gros C., Labouesse B., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **10**, 336—344.
195. Dorizzi M., Labouesse B., Labouesse J., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 563—572.
196. Parfait R., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 572—580.

Redakcja *Postępów Biochemii* uprzejmie informuje, że Państwowe Wydawnictwo Naukowe zobowiązało się wymieniać niekompletne lub mylnie oprowione zeszyty naszego kwartalnika. Redakcja prosi przeto Prenumeratorów o odsyłanie zeszytów z brakami wprost na adres:

Państwowe Wydawnictwo Naukowe
Dział Sprzedaży Czasopism
01-552 Warszawa, Pl. Inwalidów 10
z adnotacją „do wymiany”.

SPIS TREŚCI

A. Mazanowska — Prokolagen	3
A. Sawaryn — Znaczniki spinowe i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych	21
A. Wieraszkó — Regulacja biosyntezy acetylocholíny	57
H. Wehr — Struktura i funkcja lipoproteidów krwi człowieka	75
H. Jakubowski — Syntetazy aminoacylo-tRNA	95

POSTĘPY BIOCHEMII

March, 1975

Articles in Polish

Volume 21

Number 1

A. Mazanowska — Procollagen (Dept. of Radiobiology and Health Protection, Inst. Nuclear Research, Warsaw)	3
A. Sawaryn — Spin-Labels and their Application in Biochemical Investigation (Dept. Immunochemistry, Inst. Immunology and Experimental Therapy, Pol. Acad. Sci., Wrocław)	21
A. Wieraszkowski — Regulation of the Biosynthesis of Acetylcholine (Dept. Biochemistry of Nervous System and Muscle, Nencki Institute of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warsaw)	57
H. Wehr — Structure and Function of Human Blood Lipoproteins (Dept. Genetics, Psychoneurological Institute, Warsaw)	75
H. Jakubowski — Aminoacyl-tRNA-Synthetases (Dept. Biochem., Academy of Agriculture, Poznań)	95

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

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 nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. 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 stronę 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 pierwszego 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). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku podejmuje wydawca.

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

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

SPIS TREŚCI

A. Mazanowska — Prokolagen	3
A. Sawaryn — Znaczniki spinowe i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych	21
A. Wieraszkowski — Regulacja biosyntezy acetylocholino- winy	57
H. Wehr — Struktura i funkcja lipoproteidów krwi człowieka	75
H. Jakubowski — Syntetazy aminoacylo-tRNA	95