

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 23 (3)
293-492 (1977)

1977

tom 23 nr 3



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów 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; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa 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, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) 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 obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I—1.). 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. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. 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 niewprowadzanie do tekstu tworzonych do różnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

J. Polak

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1977 TOM 23 ZESZYT 3

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 23(3)
(293-492) (1977)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

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

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

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

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Balińska

KOMITET REDAKCYJNY

W. Ardelt (Warszawa), B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), S. Lewak (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), I. Szumiel (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1977

Nakład 2260 (2.145+115)

Ark. wyd. 15,25, ark. druk. 12,5.

Pap. druk. m/gł. kl. III, 70 g, 70×100

Zam. nr 473/77

F-28

Oddano do składania 7.IV.1977 r.

Podpisano do druku w sierpniu 1977 r.

Druk ukończono w sierpniu 1977 r.

Cena zł 20.—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej

MAREK KAŃSKI

1918—1976

Śmierć nagła, niespodziewana Marka Kańskiego, Profesora i Kierownika Zakładu Chemii Fizjologicznej Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi stanowi wielką stratę dla Uczelni, dla naszego Zakładu Chemii Fizjologicznej w Lublinie, dla Polskiej Biochemii — wywołała żal tych, którzy go znali, cenili i kochali.

Marek Kański należał do tego pokolenia, które uzyskało dyplomy, stopnie i tytuły naukowe już w Polsce Ludowej. Urodził się 14.XI. 1918 r. w Radomiu w rodzinie inteligenckiej. Egzamin dojrzałości zdał w Bydgoszczy w 1937 r. i w tymże samym roku został przyjęty do Szkoły Podchorążych Sanitarnych i na studia medyczne w Uniwersytecie Warszawskim. We wrześniu w 1939 r. otrzymał przydział do szpitala polowego po ukończonym drugim roku studiów. Podczas okupacji pracował jako asystent lekarski w Miejskim Szpitalu w Lublinie do momentu wyzwolenia miasta w lipcu 1944 r. W sierpniu tegoż roku zgłosił się do Ludowego Wojska Polskiego uzyskując przydział do Szpitala Ewakuacyjnego w charakterze instrumentariusza w bloku operacyjnym. Studia lekarskie ukończył na Wydziale Lekarskim UMCS w Lublinie w 1945 r. W latach 1946—1963 kierował Pracownią Analityczną w Szpitalu Wojskowym, a od marca 1946 r. do września 1963 r. pracował ponadto w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego UMCS i Akademii Medycznej w Lublinie, jako starszy asystent, a po otrzymaniu stopnia doktora medycyny, jako adiunkt. W 1956 roku na wniosek Uczelni uzyskał stopień i tytuł docenta etatowego. W 1960 r. objął kierownictwo nowo utworzonego Zakładu Biochemii na Wydziale Farmaceutycznym; ponadto pełnił obowiązki Prodziekana Wydziału Farmaceutycznego do momentu służbowego przeniesienia do Wojskowej Akademii Medycznej (WAM) w Łodzi na stanowisko Kierownika Katedry Chemii Fizjologicznej.

W Lublinie oprócz wymienionych już funkcji brał czynny udział w pracach Senackich Komisji dydaktyczno-naukowej do spraw młodzieży, inwestycyjnej, był przewodniczącym Rady Pedagogicznej II roku studiów lekarskich, był członkiem Podkomisji Chromatograficznej Polskiej Akademii Nauk i członkiem korespondentem Lubelskiego Towarzystwa Naukowego.



W Łodzi oprócz obowiązków Kierownika Katedry pełnił przez kilka lat obowiązki prorektora Uczelni do Spraw Nauki i Dydaktyki, był członkiem Rady Naukowej Ministerstwa Obrony Narodowej, delegatem Ministerstwa Obrony Narodowej do Komitetu Biochemicznego PAN, przewodniczącym Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, oraz członkiem Rad Naukowych Instytutów Wojskowych i Naczelnym Specjalistą Wojska Polskiego do spraw Analityki Lekarskiej. Tytuł profesora nadzwyczajnego otrzymał w 1972 roku. Otrzymał wiele odznaczeń państwowych i społecznych.

W Jego dorobku naukowym w obu ośrodkach lubelskim i łódzkim znajdują się prace doświadczalne i monograficzne z dziedziny badań nad metabolizmem bakteryjnym oraz w zakresie metod chromatograficznych i innych stosowanych w biochemii, radiobiologii i analityce lekarskiej. Był współautorem zbiorowego wydania obszernej monografii pt. „Chromatografia”. Był promotorem kilku przewodów doktorskich, recenzentem wielu prac naukowych.

Marek Kański należał do pierwszych asystentów lubelskiego Zakładu Chemii Fizjologicznej organizujących wraz ze mną Zakład od pierwszych początków jego istnienia. Pozostał w mojej pamięci jako najbliższy współpracownik i przyjaciel, oddany bez reszty sprawom Zakładu. W tych pierwszych latach naszego uniwersytetu, w latach wielkiej improwizacji trudno ocenić Jego wkład starań o zaopatrzenie Zakładu i Jego udział w naszych badaniach nad metabolizmem bakteryjnym oraz przy wprowadzeniu nowoczesnych metod elektroforezy i chromatografii. Wiele niedziel i wieczorów spędziliśmy na opracowywaniu materiałów do naszej „Chromatografii” wydanej przez PWN.

W zespole starszych i młodszych asystentów Marek wyróżniał się wysoką kulturą, wielkim taktem, koleżeńskim i serdecznym, często opiekuńczym stosunkiem do kolegów, a przy tym niezwykłą bezinteresownością. Nie przypominam sobie, by kiedykolwiek zwrócił się do mnie z jakimkolwiek dezyderatem osobistym. Jego wkład do wszystkich prac zakładowych miał zawsze wysoki ciężar gatunkowy. Mimo wielkiego obciążenia pracą nigdy nie odmówił kolegom pomocy w ich sprawach. Nigdy nie okazywał zmęczenia, zdenerwowania, był zawsze opanowany ale potrafił walczyć gdy tego słuszność sprawy wymagała.

Był ceniony i lubiany przez wszystkich i we wszystkich środowiskach pracy. Zmarł 22 grudnia 1976 r.

J. Opieńska-Blauth

WOJCIECH PIOTR MICHALSKI *

Struktura i funkcja błony purpurowej bakterii słonolubnych z rodzaju *Halobacterium*

Structure and Function of Purple Membrane from Halophilic Bacteria of *Halobacterium* Strain

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Bakterie słonolubne z rodzaju *Halobacterium*
 - II-1. Morfologia i skład chemiczny komórki
 - II-2. Ściana i błona komórkowa
- III. Błona purpurowa
 - III-1. Struktura
 - III-2. Bakteriorodopsyna i jej cykl fotochemiczny
- IV. Fotofosforylacja u *Halobacterium*
 - IV-1. Bakteriorodopsyna jako pompa protonowa uwarunkowana działaniem światła
 - IV-2. Synteza ATP
 - IV-3. Fotofosforylacja a oddychanie u *Halobacterium halobium*
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Halophilic bacteria of *Halobacterium* strain
 - II-1. Morphology and chemical composition of the cell
 - II-2. Wall and membrane of the cell
- III. The purple membrane
 - III-1. The structure
 - III-2. Bakteriorodopsin and its photochemical cycle
- IV. Photophosphorylation in *Halobacterium*
 - IV-1. Bakteriorodopsin as light-dependent proton-pump
 - IV-2. ATP synthesis
 - IV-3. Photophosphorylation and respiration in *Halobacterium halobium*
- V. Concluding remarks

*) Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: DCCD — dwucykloheksylokarbodwuimid; CCCP — karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu

I. Wstęp

Przetwarzanie i magazynowanie energii w komórce jest procesem szczególnie istotnym z punktu widzenia integracji przemian w niej zachodzących. Sam problem magazynowania energii został już stosunkowo dawno rozwiązany (odkrycie i uznanie ATP za nośnik wiązań wysokoenergetycznych), podczas gdy proces przetwarzania wykorzystywanej energii tzn. fosforylacji ADP do ATP jest nadal niecałkowicie poznany. Odkrycie *in vitro* sprzężenia między transportem a fosforylacją zarówno w strukturach błonowych mitochondrionu jak i chloroplastu pozwoliło na sprecyzowanie nowych poglądów próbujących opisać mechanizm fosforylacji na poziomie molekularnym, a właściwie na poziomie błony biologicznej. Ten etap badań i odkryć w bioenergetyce doprowadził w rezultacie do szeregu nowych hipotez, z których na szczególne zainteresowanie zasługuje hipoteza chemiczno-osmotyczna Mitchella (1—4). Hipoteza ta postuluje mechanizm enzymatycznej (enzymatyczny kompleks ATP-azy) fosforylacji ADP jako następstwo wyrównywania się („wykonywania pracy”) gradientu pH wytworzonego po przeciwnych stronach energizowanej błony zarówno w mitochondriach jak i w chloroplastach (5—9). Proces energizacji błony zachodzi *in vivo* na ogół podczas zmian oksydoredukcyjnych składników błon w czasie transportu elektronów i zależy pierwotnie w mitochondriach od stężenia dostarczanych substratów (fosforylacja oksydacyjna) i w chloroplastach od intensywności oświetlenia (fosforylacja fotosyntetyczna).

W odniesieniu do przedstawionej, w znacznym uproszczeniu, hipotezy Mitchella szczególne miejsce zajmuje nowy mechanizm fosforylacji odkryty w latach 70-tych przez Stoeckeniusa (10, 11) i Oesterhelta (11—14) u bakterii słonolubnych z rodzaju *Halobacterium*. Nowo poznany mechanizm syntezy ATP związany jest funkcjonalnie z tzw. błoną purpurową będącą częścią składową (frakcją) błony komórkowej badanych bakterii. Błona purpurowa *Halobacterium* dzięki występowaniu w niej fotochemicznie aktywnego chromoproteidu spełnia w błonie komórkowej bakterii funkcję zależnej od światła pompy protonowej i jest odpowiedzialna za syntezę ATP na świetle (15, 16).

Artykuł ten poświęcony będzie właśnie tej frakcji błony komórkowej *Halobacterium*. Poglądy dotyczące funkcji i struktury błony purpurowej ze względu na podobieństwo do znanych już faktów dotyczących wspomnianej teorii Mitchella i procesu widzenia u kręgowców omówione będą także w sposób porównawczy.

Wyniki badań procesu fotofosforylacji u *Halobacterium* mimo niezbyt długiego czasu, jaki upłynął od momentu wykrycia, są dobrze udokumentowane w piśmiennictwie i doczekały się kilku artykułów przeglądowych przedstawionych między innymi przez Stoeckeniusa i Oesterhelta (15, 16, 16a).

W związku z rosnącym zainteresowaniem bakteriami słonolubnymi

pierwsze rozdziały artykułu poświęcono właśnie tym organizmom, co jest tylko pozornie nie związane z jego tematyką, a zapozna czytelnika z nowym, ciekawym materiałem biologicznym.

II. Bakterie słonolubne z rodzaju *Halobacterium*

II-1. Morfologia i skład chemiczny komórki

Bakterie słonolubne z rodzaju *Halobacterium* (*Halobacterium halobium*, *H. cutirubrum*, *H. salinarum*, *H. trapicanum*) odkryto w Skandynawii na początku naszego wieku, znajdując je na suszonych solonych rybach (17). Należą one do grupy bakterii gram-ujemnych (18). Do wzrostu i zachowania natywnej struktury wymagają wysokiego stężenia soli. Obniżenie tego stężenia powoduje początkowo zmiany kształtu ich komórek z wydłużonego o wymiarach $0,5 \mu\text{m}$ i $5\text{--}10 \mu\text{m}$ na kulisty, by w końcu doprowadzić do rozbicia komórki. Optymalne dla wzrostu bakterii jest następujące stężenie soli: $3\text{--}5 \text{ M NaCl}$, $0,1\text{--}0,5 \text{ M Mg}^{++}$, $2 \times 10^{-3} \text{ M K}^+$ oraz śladowe ilości żelaza, wapnia i manganu (19). Zastąpienie chlorku sodowego inną solą (NH_4Cl , KCl , LiCl) nawet o podobnym stężeniu hamuje wzrost komórek w fazie logarytmicznej, chociaż nie powoduje ich destrukcji (19—23).

Dokładne badania mikroskopowe wykazały, że komórki *Halobacterium* mają strukturę charakterystyczną dla komórki bakteryjnej (23), wyizolowane z *Halobacterium halobium* rybosomy i DNA wykazują także właściwości typowe dla tych struktur w innych organizmach *Procarvota* (24—26). Jednak mimo morfologicznego podobieństwa *Halobacterium* do innych rodzajów bakterii zbadany skład chemiczny zarówno całych komórek jak i pewnych ich frakcji np.: osłonki komórkowej (ściana + błona komórkowa, ang. *envelope*) okazał się nietypowy i charakterystyczny, jak się wydaje, tylko dla tego rodzaju bakterii. W komórkach *H. halobium*, mianowicie, nie znaleziono kwasu muraminowego, mukopeptydu ani kwasu dwuamino-pimelinowego, a osłonka komórki składa się głównie z białek, nietypowych lipidów i niewielkiej ilości niezidentyfikowanych węglowodanów (18, 27, 28, 29). Dokładne badania frakcji lipidowej wykazały, że składa się ona głównie z dwueteropochodnych fosfatydyloglicerofosforanów (30, 31), a podstawione (w miejsce kwasów tłuszczowych) w pozycjach alfa i beta glicerolu alkohole alifatyczne nie zawierają w cząsteczce wiązań podwójnych i są nasyconymi pochodnymi 20-węglowego alkoholu poliprenylowego, fitolu (32).

Taki skład frakcji lipidowej sugeruje, że komórki bakterii słonolubnych nie mają wykształconego w pełni układu syntezy kwasów tłuszczowych, a synteza związków hydrofobowych zachodzi na drodze przemian kwasu mewalonowego — prekursora związków poliprenylowych (32).

Ostatnio wykazano, że w komórkach *H. cutirubrum* istotnie zachodzi synteza tego typu związków (33—35), a wśród nich zidentyfikowano: fyllochinon (wit. K₁), retynal (aldehyd wit. A), karotenoidy 40- i 50-węglowe (odpowiednio beta-karoten i alfa-bakterioruberyna) oraz ich niektóre prekursorzy (36, 37).

II-2. Ściana i błona komórkowa

Zaskakujący skład frakcji lipidowej bakterii słonolubnych oraz brak typowych składników bakteryjnej ściany komórkowej, a co za tym idzie trudności w interpretowaniu obrazów w mikroskopie elektronowym doprowadziły pierwotnie do sugestii, że bakterie z rodzaju *Halobacterium* nie posiadają ściany komórkowej (19). Za słusznością tej sugestii przemawiały także wcześniejsze obserwacje *Stoeckeniusa* (15), który podając komórki *H. halobium* szokowi osmotycznemu w wodzie destylowanej otrzymywał z osłonki komórkowej jedynie podjednostki lipoproteidowe. Dopiero zastosowanie specyficznych metod utrwalania preparatów w mikroskopii elektronowej — wprowadzone do badań *Halobacterium* przez *Stoeckeniusa* i *Rowena* (19, 38) — pozwoliło ustalić, że bakterie te mają glikoproteidową ścianę komórkową, a otrzymane podjednostki lipoproteidowe powstają podczas fragmentacji lipoproteidowej błony komórkowej (15, 39).

Badania nad poznaniem budowy osłonki komórkowej *Halobacterium* doprowadziły poza przedstawionymi faktami do innych zaskakujących odkryć. Jak wiadomo w czasie obniżania stężenia soli w zawiesinie bakterii słonolubnych komórki ulegają deformacji a następnie destrukcji, co wskazywałoby na zmiany elastyczności, a więc zmiany w strukturze błony i ściany komórkowej. Zaobserwowano, że przeniesienie komórek *H. halobium* do roztworu NaCl o stężeniu około 2 M powoduje powolne upłynnienie ściany komórkowej (15) i deformację komórki. Dalsze obniżanie stężenia do 1 M powoduje destrukcję komórki i fragmentację błony komórkowej. Podobny efekt otrzymano przenosząc komórki do wody destylowanej (15, 17, 18). Otrzymane fragmenty nie są jednakowe pod względem wielkości i można je frakcjonować metodą wirowania w gradiencie gęstości sacharozy (11, 40—42). Stosując tę metodę *Stoeckenius* i *Kunau* (41, 42) otrzymali i scharakteryzowali trzy frakcje fragmentów błony komórkowej różniące się między sobą gęstością i zabarwieniem.

Pierwsza frakcja o najmniejszej gęstości i barwie czerwonomarańcowej, zdecydowanie niejednorodna, charakteryzuje się dużą zawartością karotenoidu alfa-bakterioruberyny, barwnika, który ochrania komórki *Halobacterium* przed letalnym dla nich wpływem światła niebieskiego. Frakcja ta zawiera także związki typu cytochromów, flawoproteidy i inne składniki łańcucha oddechowego i jak wydaje się spełnia ona rolę struktury odpowiedzialnej za oksydacyjną fosforylację.

Pozostałe dwie frakcje są bardziej jednorodne. Frakcja o największej gęstości i zabarwieniu żółtym składa się niemal wyłącznie z błon wakuoli gazowych, organelli, które prawdopodobnie regulują ciśnienie wewnątrz komórki w czasie przebywania bakterii na różnych głębokościach.

Frakcja trzecia o gęstości pośredniej i zabarwieniu purpurowym składa się głównie z białek (75% suchej masy frakcji) i niewielkiej ilości lipidów (25%). Frakcja ta jakkolwiek zdecydowanie jednorodna czasami może jednak być zanieczyszczona fragmentami frakcji żółtej i dlatego też do badań używa się komórek zmutowanego gatunku *H. halobium* R₁, które nie posiadają wakuoli gazowych (41).

Porównawcze badania morfologiczne powierzchni nienaruszonej błony komórkowej i otrzymanej frakcji błony purpurowej wykazały, że błona ta nie występuje na całej powierzchni komórki lecz jedynie na pewnych obszarach, stosunkowo łatwo rozróżnialna w mikroskopie elektronowym dzięki charakterystycznej regularności rozmieszczenia w niej podjednostek (15, 41, 42).

III. Błona purpurowa

III-1. Struktura

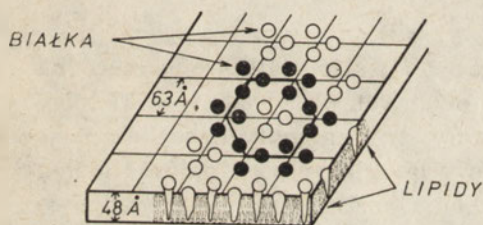
Jak już pisano, frakcja błony purpurowej jest wyjątkowo jednorodna i składa się z mniej więcej jednakowych owalnych płytek błony o średnicy około 0,5 μm . Badania chemiczne wykazały, że fragmenty te są kompleksami lipoproteidowymi, a stosunek molowy budujących je lipidów i białek wynosi 40 : 1 (15, 43). Skład chemiczny błony purpurowej jest stosunkowo prosty. Frakcję lipidową stanowią związki opisane wcześniej w rozdziale II-1. Frakcję białkową stanowią cząsteczki jedynie o masie cząsteczkowej 26 000 daltonów (11, 44).

Badania fizyczne prowadzone przez Blaurocka (10), StoECKE-niusa (10, 44) i Hendersona (45, 46) nad rozpraszaniem promieni X i elektronów przez błonę purpurową wykazały, że regularnie powtarzającą się podjednostkę błony stanowi kompleks zbudowany z trzech cząsteczek białka i 120 cząsteczek lipidów (40, 46). Ponadto ustalono, że błona ma strukturę pseudokrystaliczną w formie dwuwymiarowej sześciokątnej kraty, w narożach której znajdują się podjednostki białkowo-lipidowe.

Regularność w ułożeniu cząsteczek białka w podjednostkach błony purpurowej sugeruje, że cząsteczki te mają charakter globularny. Henderson i Unwin (47) wykazali, że białka te mają strukturę lewoskrętnej superspirali złożonej z siedmiu pojedynczych prawoskrętnych helikoid (mniej więcej równoległych do siebie). Rozmiary takiej cząsteczki białka są następujące: $25 \times 35 \times 45 \text{ \AA}$, a wektor osi najdłuższej jest prostopadły do powierzchni błony. Wysokość cząsteczki (45 \AA) stanowi jednocześnie gru-

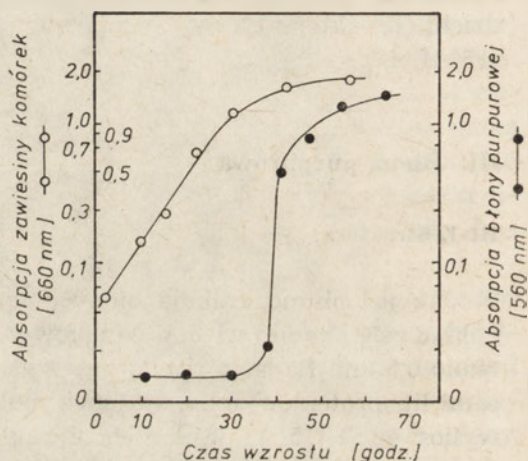
bość błony (48 Å). Postulowany przez autorów prac (44—47) model strukturalny cząsteczki białka pozwala jednocześnie wyjaśnić ułożenie cząsteczek w podjednostce. Badania gęstości elektronowej błony wykazały, że trzy z siedmiu helikoid każdej cząsteczki są skierowane do środka podjednostki i odległe od siebie o około 10 Å tworząc dziewięciocłonowy pierścień wewnętrzny. Cztery pozostałe helikoidy w cząsteczce tworzą pierścień zewnętrzny podjednostki (12-cłonowy).

Duża zawartość w cząsteczkach białka aminokwasów o charakterze hydrofobowym (62% sumy), oraz wyniki badań fizycznych sugerują (10, 43, 47), że cząsteczki białka są zanurzone w fazie hydrofobowej błony. Ustalono ponadto, że błona ta ma charakter asymetryczny w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni. Wygląd błony purpurowej, uwzględniając dotychczas otrzymane wyniki przedstawiono schematycznie na rycinie 1.



Ryc. 1. Schemat struktury błony purpurowej u *Halobacterium halobium*

Czarnymi kółkami przykładowo zaznaczono rozmieszczenie cząsteczek białka w podjednostce sześciokątnej kraty. (11, 16, 45).



Ryc. 2. Synteza błony purpurowej i wzrostu komórek *H. halobium-R₁*.

Wartość absorpcji 660 nm określa gęstość zawiesiny komórek w hodowli, zmiany absorpcji przy 560 nm w czasie pośrednio określają szybkość syntezy błony purpurowej w hodowli (11).

Pokazana na rycinie 1 błona purpurowa jest jak gdyby połową typowej lipoproteidowej błony biologicznej, a jej regularna i stosunkowo prosta struktura skłaniają do przypuszczenia, że jest ona przykładem typowej modyfikacji funkcjonalnej. Problem ten jest szczególnie interesujący z punktu widzenia jej przepuszczalności oraz ewolucji bakterii słonolubnych (17, 48).

W komórkach *Halobacterium* synteza błony purpurowej zachodzi tylko w czasie wzrostu komórek na świetle i jest związana z fazami rozwoju hodowli (11, 49—51). Zależność tę przedstawiono na rycinie 2. Absorpcja światła o długości fali 560 nm, charakterystycznej dla błony purpurowej

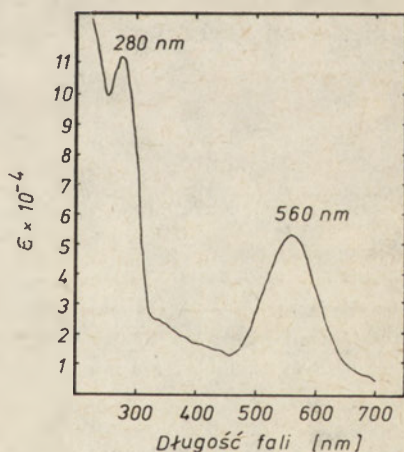
gwałtownie wzrasta pod koniec fazy logarytmicznej i osiąga poziom ostateczny w fazie stacjonarnej.

Opisane dotychczas właściwości błony purpurowej *Halobacterium*, jakkolwiek wskazują na jej związek z czynnościami życiowymi komórki, nie pozwalają sądzić o jej funkcjonowaniu czy ewentualnej roli w metabolizmie tych bakterii. Dopiero scharakteryzowanie wchodzącego w jej skład chromoproteidu — bakteriorodopsyny pozwoli na sprecyzowanie tych zagadnień.

III-2. Bakteriorodopsyna i jej cykl fotochemiczny

W badaniach nad strukturą i funkcją błony purpurowej, ze względu na konieczność operowania frakcją o dużej czystości, do jej otrzymania zastosowano mutanty *H. halobium* niezawierające w komórkach ani wewnątrzkomórkowych struktur błonowych (wakuole gazowe) ani karotenoidów. Są nimi odpowiednie mutanty *H. halobium* — R_1 oraz — R_1M_1 i R_1L_3 (40, 41).

Charakterystyczna barwa, a także intrygująca struktura błony purpurowej (porównaj rozdział III-1) sugerowała badaczom jej własności fotorecepcyjne (15, 43, 52, 53). Widmo absorpcyjne błony purpurowej przedstawiono na rycinie 3. Wykazuje ono charakterystyczne maksima pochła-



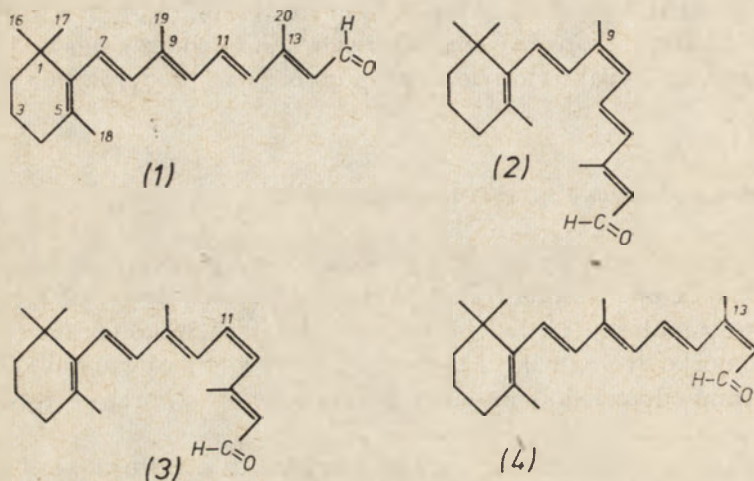
Ryc. 3. Widmo absorpcyjne błony purpurowej wyizolowanej z *H. halobium*.

Wysoka wartość absorpcji przy 280 nm wskazuje na białkowy charakter błony purpurowej. Maksimum absorpcji przy 560 nm jest wyrażone obecnością grupy chromoforowej — retynalu połączonego z białkiem (11).

niania przy długościach fali 280 i 560 nm, a stosunek wartości absorpcji 280 nm/560 nm wynosi około 2 : 1 (11). Widoczny na tej rycinie obraz widma absorpcji błony purpurowej wydaje się uzasadniony z punktu widzenia jej budowy, głównie białkowej.

Oesterhelt i Stoeckenius (11) opierając się na składzie chemicznym błony oraz na wynikach przeprowadzonych przez siebie badań wykazali, że za właściwości fotochemiczne tej błony odpowiedzialny jest jej

składnik białkowy, tzn. opisane wcześniej (rozdział III-1) cząsteczki białka o masie cząsteczkowej 26 000, którego grupą chromoforową jest aldehyd witaminy A — retynal. Wzory powszechnie występujących *in vivo* izomerów retynalu przedstawiają wzory 1—4.



Wyniki badań identyfikujących różnymi metodami retynal jako grupę chromoforową zestawiono w tabeli 1. Strukturę tego chromoproteidu badano metodami fizycznymi (10, 11, 54—56), stosując między innymi spektros-

Tabela 1.

Retynal jako grupa chromoforowa błony purpurowej (10)

Stosowana metoda badania grupy chromoforowej	Charakterystyka chromoforu błony purpurowej	Charakterystyka retynalu lub jego pochodnych
Ekstrakcja rozpuszczalnikami organ. (eter naftowy:etanol 5:1 v/v)	Maksimum absorpcji: 381 nm w etanolu 368 nm w eterze naftowym	Maksimum absorpcji retynalu: 381 nm w etanolu 368 nm w eterze naftowym
Reakcja z hydroksyloaminą, ekstrakcja jak wyżej	Maksimum absorpcji: 355 nm w etanolu	Maksimum absorpcji oksymu retynalu: 355 nm w etanolu
Chromatografia cienkowarstwowa (10)	Wartości R _f (forma zredukowana): 0,36 (główne pasmo) 0,50	Wartości R _f (retynol): 0,36 (izomer <i>trans</i>) 0,50 (izomer 13- <i>cis</i>)
Spektroskopia masowa (10)	Masa cząsteczkowa 286 Wzór empiryczny C ₂₀ H ₃₀ O	Masa cząsteczkowa retynalu 286 Wzór retynalu C ₂₀ H ₃₀ O

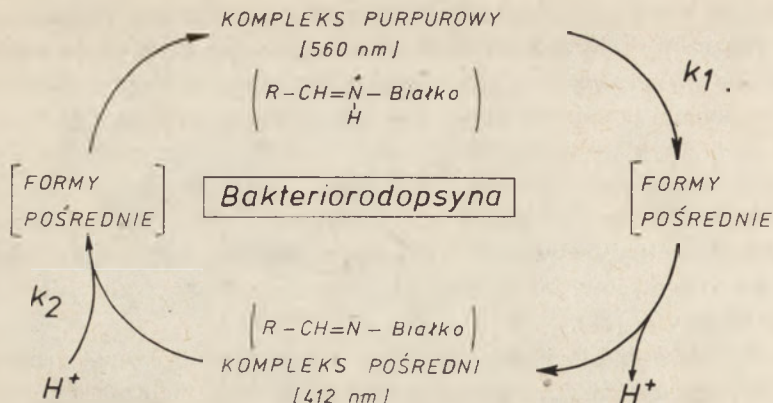
kopię ramanowską w podczerwieni i ustalono, że w cząsteczce białka retynal jest połączony wiązaniem C=N (zasada Schiffa) z resztą lizynową (10, 54). Ponadto wykazano, że retynal w tym chromoproteidzie występuje wyłącznie w postaci izomerów 13-*cis* lub całkowicie-*trans* (10, 54, 55, 57, 58). Wydaje się jednak, że w przemianach cyklu fotochemicznego bierze udział izomer całkowicie-*trans* (69, 88).

Duże podobieństwo struktury chemicznej oraz właściwości fotochemicznych barwnika purpurowego, do rodopsyny — fotoreceptora pręcików siatkówki oka kręgowców, spowodowało, że zaproponowano dla niego nazwę bakteriorodopsyna (12).

Podobieństwo bakteriorodopsyny do purpury wzrokowej (rodopsyny) pośrednio sugeruje, że jej funkcje w komórce mają związek z jej charakterystycznymi właściwościami fotochemicznymi. Przypisywanie jednak bakteriorodopsynie wyłącznie roli receptora odpowiedzialnego np.: za fototaksję komórek *Halobacterium* wydaje się niesłuszne przynajmniej z dwóch powodów: błona purpurowa (bakteriorodopsyna) stanowi aż ponad 50% powierzchni błony komórkowej, podczas gdy u innych organizmów wrażliwe receptory fototaktyczne zajmują nieporównywalnie mniejszą powierzchnię, bakteriorodopsyna nie ulega także żadnym przemianom, które mogłyby bezpośrednio wywoływać reakcję fototaktyczną (15, 59). Wydaje się więc, że bakteriorodopsyna odgrywa w komórce *Halobacterium* rolę raczej metaboliczną, a nie pełni funkcji fototaktycznego receptora. Jednak bakteriorodopsyna jako związek bezpośrednio odpowiedzialny za syntezę ATP w komórce na świetle (porównaj rozdział IV-2.) pośrednio przez to wpływa na ruch komórki *Halobacterium*.

Bakteriorodopsyna i purpura wzrokowa pełnią zupełnie inne funkcje fizjologiczne, a przyczyn tych różnic należy szukać, przy dużym podobieństwie chemicznym obu chromoproteidów, w konfiguracji grupy chromoforowej — retynalu. I tak w czynnej biologicznie rodopsynie możliwe jest przyłączenie do cząsteczki białka tylko retynalu 9-*cis* lub 11-*cis*, podczas gdy w bakteriorodopsynie występuje izomer całkowicie-*trans* (60—65).

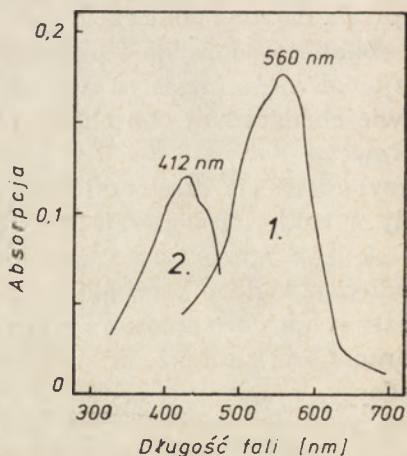
Jednak mimo tych różnic początkowe procesy fotochemiczne, jakim podlegają badane barwniki, są podobne (66). Kwant światła absorbowany przez grupę chromoforową wywołuje zmiany nie tylko w samej cząsteczce chromoforu, ale także w strukturze otaczającego go białka. W przypadku rodopsyny zmiany te zapoczątkowują proces widzenia (pobudzenie nerwowe), podczas gdy w przypadku bakteriorodopsyny prowadzą do wytworzenia nieznanych związków pośrednich, które w bardzo krótkim czasie (milisekundy) przekształcają się z powrotem w formę wyjściową. Tak więc przemiany bakteriorodopsyny są przykładem reakcji odwracalnej, podczas gdy purpura wzrokowa ulega zasadniczo przemianom nieodwracalnym. Różnice te najprawdopodobniej wynikają z obecności w cząsteczce rodopsyny retynalu 11-*cis*, który ulega indukowanej światłem izomeryzacji do formy *trans*, a reakcja ta jest nieodwracalna (66, 67). Na rycinie 4 przed-



Ryc. 4. Cykl fotochemiczny bakteriorodopsyny u *Halobacterium*

k_1 i k_2 oznaczają stałe szybkości odpowiednich reakcji; R-CH- oznacza retinal połączony z ϵ -aminową grupą lizyny (16).

stawiono cykl fotochemiczny bakteriorodopsyny z *H. halobium*, jako cykl przemian różnych form chromoforu lub chromoproteidu po oświetleniu: między innymi kompleksu-560 nm i tzw. kompleksu-412 nm. Absorpcja światła przez kompleks-560 nm (forma wyjściowa — molowy współczynnik absorpcji $\epsilon_M = 63\,000 \text{ litr/Mol} \times \text{cm}$) przy wydajności kwantowej φ około 0,8 prowadzi do wytworzenia kompleksu o charakterystycznym maksimum absorpcji przy 412 nm, najdłuższej trwającej formy pośredniej cyklu (68, 69).



Ryc. 5. Widma absorpcyjne chromoforu bakteriorodopsyny w dwóch różnych stanach (w temperaturze -196°C) 1. Kompleks purpurowy-560 nm w ciemności; 2. kompleks-412 nm; powstający na świetle (16).

Stalą szybkości tej reakcji wyraża wzór $k_1 = \epsilon_M \varphi$. Charakterystykę spektralną obu badanych kompleksów przedstawia rycina 5. Poza różnicami w widmie absorpcyjnym badanych kompleksów (Ryc. 5) wykazano eksperymentalnie inne właściwości kompleksów-560 nm i -412 nm bakteriorodopsyny, przemawiające za różnicami strukturalnymi w obrębie cząsteczki

barwnika. Stwierdzono mianowicie różnice w intensywności fluorescencji reszt tryptofanu (70) oraz we wrażliwości wiązania grup chromoforowych obu kompleksów na hydroksyloaminę (wytworzenie oksymu retynalu) oraz redukcję wiązania zasady Schiffa (71—74). Ponadto ostatnie prace dotyczące oddziaływań chromoforu z białkiem w bakteriorodopsynie wykazały występowanie zmian konformacyjnych w cząsteczce kompleksu-412 nm umożliwiające wytworzenie nowych wiązań wodorowych między atomem azotu grupy ϵ -aminowej lizyny, azotem imidazolowym histydyny białka i atomem węgla 18 retynalu, podobnie jak obserwuje się to w cząsteczce rodopsyny (75).

Przedstawiony na rycinie 4 cykl fotochemiczny bakteriorodopsyny dopuszcza pojawienie się w toku jej przemian innych, niezidentyfikowanych jeszcze, form pośrednich o bardzo krótkim czasie trwania. Nawet jeżeli więcej niż dwie formy bakteriorodopsyny biorą udział w jej przemianach fotochemicznych, to stałe szybkości tworzenia (k_1) i rozpadu (k_2) kompleksu pośredniego-412 nm pozwalają na wyprowadzenie wzoru szybkości reakcji całego cyklu V (16, 59, 76—78):

$$V = \frac{k_2 \times [B]}{1 + \frac{k_2}{k_1 \times \epsilon_M \times \varphi \times I}}$$

gdzie: ϵ_M — molowy współczynnik absorpcji kompleksu-560 nm
 [B] — stężenie bakteriorodopsyny
 I — natężenie światła
 φ — wydajność kwantowa reakcji tworzenia kompleksu-412 nm

Szybkość rozpadu kompleksu-412 nm określona jest tylko przez jego stężenie, podczas gdy szybkość jego tworzenia zależy od stężenia kompleksu purpurowego-560 nm i natężenia światła. Wzór ten przypomina klasyczne równanie Michaelisa—Menten, mówiące o zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu. W przypadku bakteriorodopsyny w równaniu tym, stężenie substratu zastępuje wartość natężenia światła. I tak, jeżeli natężenie światła wzrasta, szybkość reakcji zwiększa się aż do osiągnięcia wartości $V_{maks.} = k_2 \times [B]$, tzn. do wartości maksymalnej, niezależnej od natężenia światła (ale zależnej od temperatury). Zależność ta jest analogiczna do liczby obrotów enzymu i można ją wyrazić jako wartość k_2 . W warunkach nasycenia światłem i w temperaturze fizjologicznej cykl fotochemiczny bakteriorodopsyny powtarza się 200 razy na sekundę (76, 79).

Wyniki badań właściwości fotochemicznych rodopsyny i bakteriorodopsyny na poziomie molekularnym stwarzają bardzo interesujący problem, który można postawić w formie następującego pytania: czy zmiany konformacyjne zachodzące w cząsteczkach chromoproteidów po absorpcji energii świetlnej wywołują podobne zmiany w strukturze błony w skład której wchodzi? Próby odpowiedzi na to pytanie prowadzą się, między

innymi, do dokładnego poznania: struktur błon oraz „zachowania się” wbudowanych w nie cząsteczek barwników w czasie absorpcji promieniowania (80). Jakkolwiek wyniki badań dotyczących rodopsyny i bakteriorodopsyny nie są w tym aspekcie całkowicie jednoznaczne, to jednak pewne informacje wydają się pomocne w zrozumieniu funkcjonowania błon: wzrokowej (81, 82) i purpurowej (80, 83). Badania rentgenograficzne wykazały, że ich struktura jest zdecydowanie odmienna. Jak przedstawiono w rozdziale III-1., błona purpurowa ma strukturę pseudo-krystaliczną (ang. *crystal-like*), a więc regularną i sztywną. Błona wzrokowa pręcików siatki oka ma strukturę „płynną” (ang. *liquid-like*), nieregularną z możliwością dyfuzji cząsteczek rodopsyny wewnątrz fazy hydrofobowej (84, 85). Opisane właściwości obu błon mają związek z funkcjami, jakie przypisuje się tym strukturom. I tak sztywne umiejscowienie cząsteczek bakteriorodopsyny w błonie pozwala na wektorowe tj. prostopadłe do jej powierzchni transportowanie protonów na zewnątrz komórki w następstwie cyklu fotochemicznego (porównaj rozdział IV.). Przypuszcza się, że możliwość dyfuzji i rotacji (?) (81, 82) cząsteczek rodopsyny wewnątrz błony może być podstawą wytworzenia pobudzenia nerwowego jako następstwa absorpcji światła.

IV. Fotofosforylacja u *Halobacterium*

IV-1. Bakteriorodopsyna jako pompa protonowa uwarunkowana działaniem światła

Zmiany konformacyjne bakteriorodopsyny podczas absorpcji światła przez jej grupę chromoforową, tj. przejście kompleksu-560 → kompleksu-412 nm, powodują odłączenie protonu od atomu azotu ϵ -aminowej grupy lizyny tworzącej z retynalem wiązanie C=N (54, 55). Natomiast podczas regeneracji formy wyjściowej chromoproteidu z kompleksu przejściowego-412 nm następuje przyłączenie protonu do tego samego atomu (54, 55). Tak więc w cyklu fotochemicznym bakteriorodopsyny zachodzi ciągle uwalnianie i wiązanie protonów (Ryc. 4).

Wykazano (16, 76, 86—90), że uwalnianie i przyłączanie protonów odbywa się po przeciwnych stronach błony komórkowej *H. halobium*. Oświetlanie zawiesiny nienaruszonych komórek światłem o $\lambda = 560$ nm powoduje szybkie, odwracalne w ciemności zakwaszenie środowiska zewnętrznego komórek (72, 88, 91, 92).

Absorbowana w czasie cyklu fotochemicznego energia świetlna (około 50 kcal/mol) jest więc rozdzielona między bakteriorodopsynę i proton. Część z niej jest wykorzystywana w reakcji tworzenia kompleksu-412 nm, podczas gdy reszta jest zamieniana (tworząc gradient pH) w różnicę potencjału elektrochemicznego (76, 92, 93). Jeżeli więc przyjąć, że bakterioro-

dopsyna nie jest ułożona w błonie purpurowej dowolnie (porównaj rozdział III) to każda cząsteczka tego chromoproteidu (lub ich kompleksy) jest molekularną pompą protonową, tzn. bakteriorodopsyna dzięki swym właściwościom fotochemicznym jest zdolna do przetwarzania absorbowanej energii świetlnej w energię potencjału elektrochemicznego.

Taki obraz funkcji bakteriorodopsyny wskazuje, że wytwarzana różnica potencjału elektrochemicznego po przeciwnych stronach błony komórkowej, może być wykorzystana do syntezy ATP w komórce (94, 95), zgodnie z założeniami teorii chemicznoosmotycznej Mitchella (1—4). Zrazem dobrze poznana budowa błony purpurowej oraz regularność z jaką jest w nią wbudowana bakteriorodopsyna, pozwalają zastosować ją w układzie sztucznych błon do badania wbudowanej w niej bakteriorodopsyny jako pompy protonowej, symulując jej działanie *in vivo*.

Racker i StoECKENIUS (96) pierwsi wykazali, że bakteriorodopsynę można „wbudować” w błonę lipidową w taki sposób, by cały układ lipoproteidowy utworzył w środowisku hydrofilowym zamknięte pęcherzyki — proteoliposomy. Uzyskane w ten sposób proteoliposomy dzięki odizolowaniu w swym wnętrzu pewnej przestrzeni od środowiska zewnętrznego, można traktować jako modele komórek. Podobne eksperymenty powiodły się także innym badaczom (92, 93, 97—99).

Badania wykorzystujące tę metodę doprowadziły do zaskakujących rezultatów, sprzecznych z uzyskanymi wcześniej wynikami doświadczeń z całymi nienaruszonymi komórkami *H. halobium* (42,100). Mianowicie oświetlanie zawiesiny proteoliposomów powodowało alkalizację środowiska, zamiast jego zakwaszenia (porównaj wyżej). Proces ten był odwracalny w ciemności (96, 101). Ponieważ otrzymane proteoliposomy są bardzo małe, zmiany pH w ich wnętrzu w czasie naświetlania mierzono metodami pośrednimi (92, 93, 102—104). Używano do tego celu fluoryzujących amin (105, 106), które w formie pozbawionej protonu łatwo przenikają przez błony lipidowe, podczas gdy dla ich form uprotonowanych błony te są nieprzepuszczalne. Wyniki tych prac wykazały jednocześnie, że wbudowana w proteoliposomy bakteriorodopsyna spełnia wprawdzie funkcję pompy protonowej, lecz transportuje protony z mniejszą wydajnością i w przeciwnym kierunku (do wnętrza proteoliposomu) niż *in vivo* (92, 93, 96, 102—104). Problem tego odwrotnego transportu H^+ przez bakteriorodopsynę wyjaśniły badania strukturalne błony proteoliposomów (91, 96, 101). Wykazały one, że cząsteczki tego chromoproteidu są zorientowane przeciwnie niż w błonie purpurowej. Cząsteczki bakteriorodopsyny znajdują się w błonie proteoliposomów po jej zewnętrznej stronie, a więc inaczej niż w błonie purpurowej (porównaj Ryc. 1).

Podczas oświetlania zawiesiny proteoliposomów gradient pH jest wytwarzany tylko wtedy, gdy „pompowaniu” protonów towarzyszy przeciwny ruch innych kationów, np.: K^+ , które jednocześnie obniżają efektywność netto transportu H^+ (16).

Badania przepuszczalności błon *Halobacterium* dla jonów jednowartościowych, zwracają uwagę na ich ewentualny udział w wytwarzaniu potencjału elektrochemicznego, a także w syntezie ATP. L a n y i i wsp. wykazali, że chociaż błona komórkowa *H. halobium* jest bardzo słabo przepuszczalna dla jonów K^+ i Rb^+ , ich powolna dyfuzja w kierunku przeciwnym do transportu H^+ ogranicza szybkość wytwarzania gradientu pH (20, 21, 101, 107—111).

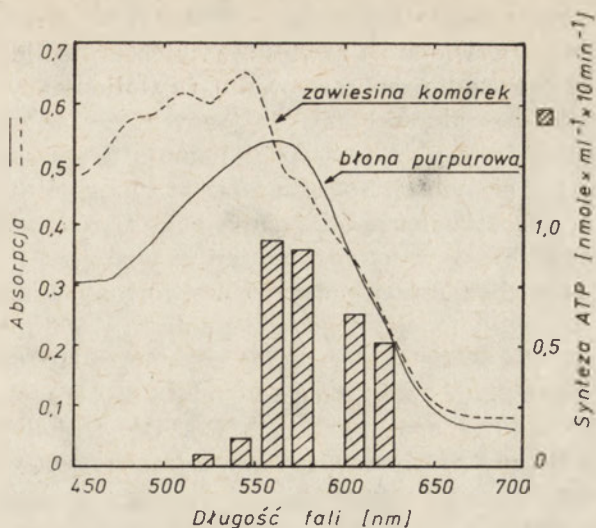
S k u l a c h e v i wsp. (92, 102, 103) oraz L o z i e r i i wsp. (112) wbudowali bakteriorodopsynę w dwucząsteczkową błonę lipidową rozdzielającą roztwory elektrolitów i oświetlając tak otrzymaną sztuczną błonę zmierzili wytworzony na świetle potencjał elektrochemiczny. Jego wartość zależy od przepuszczalności tej błony dla jonów K^+ i wynosi dla błony niemodyfikowanej około 300 mV (103).

Taka duża różnica potencjału elektrochemicznego (~ 300 mV) jest wystarczająca do syntezy ATP *in vivo* (16, 88). Z przyczyn metodycznych nie udało się zmierzyć dotychczas tego potencjału wytwarzanego na świetle przez bakteriorodopsynę w nietkniętej komórce (88). O e s t e r h e l t (16), opierając się na parametrach kinetycznych cyklu fotochemicznego bakteriorodopsyny (liczba obrotów), na jej zawartości w błonie komórkowej oraz uwzględniając objętość komórki wyliczył jednak, że w warunkach nasycenia światłem różnica potencjału ~ 300 mV może powstać po obu stronach błony komórkowej w czasie mniejszym od milisekundy tzn. około 1000 razy szybciej niż szybkość syntezy ATP (88).

IV-2. Synteza ATP

Synteza ATP u *Halobacterium* zachodzi w ciemności i na świetle. W ciemności ma miejsce fosforylacja oksydacyjna zależna od transportu elektronów w łańcuchu oddechowym (porównaj rozdział II-2), podczas gdy fotofosforylacja funkcjonalnie związana jest z bakteriorodopsyną. Zależność syntezy ATP na świetle od błony purpurowej (= bakteriorodopsyna) *in vivo* w komórkach *H. halobium* przedstawiono na rycinie 6. Na rycinie tej porównano szybkość fotofosforylacji podczas naświetlania komórek światłem o różnej długości fali. Naintensywniejszą syntezę ATP stwierdzono przy długościach fal świetlnych 560—570 nm (porównaj ryciny 3 i 5) (15, 94).

Synteza ATP na świetle charakteryzuje się niewrażliwością na cyjanek oraz wrażliwością na związki rozprzegające — zaburzające transport protonów (np. CCCP), a także na inhibitory ATP-azy (np. DCCD). Fotofosforylacja u tych bakterii nie jest także wrażliwa na inhibitory cyklicznego i niecyklicznego transportu elektronów w fotosyntezie (16, 88, 94). Fosforylacja oksydacyjna, podobnie jak w mitochondriach, jest wrażliwa na cyjanek i związki rozprzegające oraz na inhibitory ATP-azy (np.: powyżej wymie-



Ryc. 6. Zależność syntezy ATP od własności fotochemicznych błony purpurowej

Szybkość syntezy ATP porównywano oświetlając komórki *H. halobium* światłem o różnej długości fali. Widmo absorpcyjne zawiesiny komórek *H. halobium* porównano także z widmem błony purpurowej wyizolowanej z bakterii tego gatunku. Najintensywniejszą syntezę ATP obserwowano po oświetleniu komórek światłem o długości fali równej maksimum absorpcji bakteriorodopsyny t.zn. 560 nm (15).

nione DCCD i CCCP) (88). Obserwacje te wskazują na to, że chociaż w komórkach *Halobacterium* istnieją dwa układy syntezy ATP, mechanizm obu procesów wydaje się podobny, zgodny z teorią Mitchella. Dlatego też problem fotofosforylacji u bakterii słonolubnych rozpatrzmy w aspekcie funkcjonowania bakteriorodopsyny jako generatora różnicy potencjału elektrochemicznego po obu stronach błony komórkowej, a więc w aspekcie teorii chemicznoosmotycznej.

Chemicznoosmotyczna hipoteza fosforylacji Mitchella opiera się na trzech zasadniczych założeniach, precyzujących niezbędny skład sprzężonego układu (błony) fosforylującego. Układ taki musi zawierać: zależną od transportu H^+ odwracalną ATP-azę; układ transportujący H^+ przez błonę (wytwarzający potencjał elektrochemiczny); nieprzepuszczalną lub bardzo słabo przepuszczalną dla jonów błonę (1—4). W przypadku fotofosforylacji u *Halobacterium*, błoną „sprzężoną” jest błona komórkowa (94, 95, 113, 114), a układem transportującym H^+ jest zależna od światła bakteriorodopsyna.

Wcześniejsze badania Rackera i wsp. (115—117) wykazały, że proteoliposomy zawierające w swej błonie fragmenty łańcucha oddechowego (układ wytwarzający gradient protonów) oraz wrażliwą na oligomycynę ATP-azę (118) w warunkach tlenowych syntetyzują ATP z ADP i nieorganicznego fosforanu.

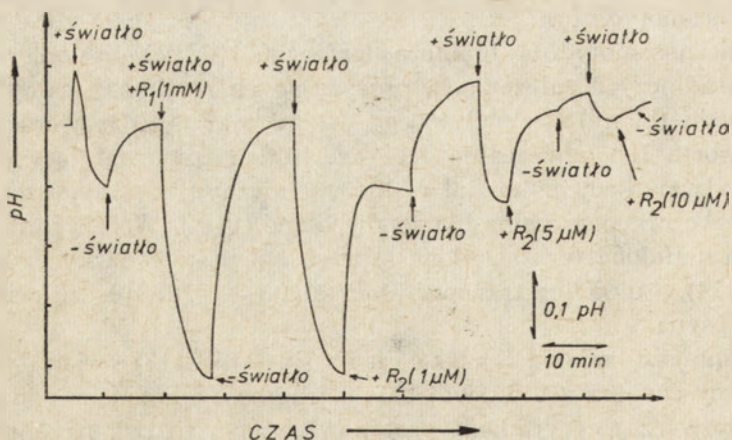
Podobne doświadczenia wykonali Racker i StoECKenius (96)

wbudowując w błonę proteoliposomów ATP-azę (118) obok bakteriorodopsyny z *H. halobium*. Oświetlenie zawiesiny takich proteoliposomów powoduje syntezę ATP. Ponadto zaobserwowano, że walinomycyna, antybiotyk zwiększający przepuszczalność błony dla jonów K^+ , oraz związki rozpręgające oksydacyjną fosforylację wyraźnie hamują tę syntezę. Fosforylacji nie obserwowano w ciemności. Spostrzeżenia te zwracają uwagę na możliwość sprzężenia między zależną od światła bakteriorodopsyną a układem enzymatycznym ATP-azy w fotofosforylacji *in vivo*.

Zgodnie z teorią chemicznoosmotyczną wytworzony w następstwie gradientu pH tak wysoki potencjał elektrochemiczny (~ 300 mV) nie jest konieczny do zapoczątkowania syntezy ATP w komórce (16, 88).

Badania Oesterhelta i Stoeckeniusa (44) wykazały, że synteza ATP na świetle (transport H^+ *via* ATP-aza) u *H. halobium* może zachodzić już wtedy, gdy pH środowiska zewnętrznego jest większe niż 5,5. Poziom ATP stosunkowo szybko (sekundy) osiąga poziom maksymalny a kwasowość środowiska zależnie od sprawności pompy protonowej (a więc zależnie np.: od przepuszczalności błony dla jonów jednowartościowych lub natężenia światła) ustala się przy bardziej lub mniej kwaśnym odczynie środowiska. Tak więc, szybkość syntezy ATP potrzebna do utrzymania jego maksymalnego poziomu i aktywność pompy protonowej determinują stężenie protonów w środowisku zewnętrznym.

Jeżeli takie rozumowanie jest słuszne, zahamowanie jednej z dwóch reakcji tego procesu (transportu H^+ na zewnątrz lub syntezy ATP czyli transportu H^+ *via* ATP-aza do wewnątrz) powinno zachwiać wytworzoną równowagę funkcjonalną czyli znieść sprzężenie. Sytuację taką przedstawiono na rycinie 7. Zahamowanie syntezy ATP przez dodanie (inhibitora ATP-azy) DCCD ($=R_1$) powoduje gwałtowne zakwaszenie środowiska zewnę-



Ryc. 7. Rozprzężenie syntezy ATP zależnej od działania pompy protonowej przez DCCD ($=R_1$) oraz wpływ zwiększających się stężeń CCCP ($=R_2$) na indukowane światłem zmiany pH w środowisku zewnętrznym oświetlanych bakterii (16).

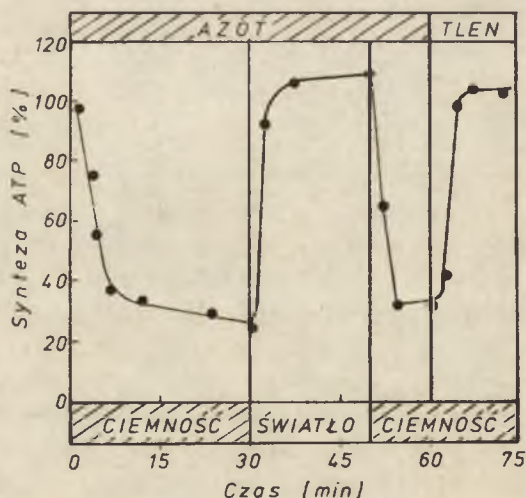
trznego komórki, a powstający ciągle gradient pH jest wyrównywany jedynie na drodze biernej dyfuzji protonów przez błonę. Następnie dodanie do zawiesiny komórek związku rozprzegającego CCCP (= R₂) powoduje zanikanie efektu funkcjonowania pompy protonowej.

Powyższe badania wykazały, że w komórkach *Halobacterium* występuje sprzężenie między zależnym od światła transportem protonów a syntezą ATP. Układ wytwarzający gradient pH — bakteriorodopsyna, podobnie jak transport elektronów w mitochondriach i chloroplastach, może tworzyć potencjał elektrochemiczny dużo większy niż tego wymaga synteza ATP.

IV-3. Fotofosforylacja a oddychanie u *H. halobium*

Fotofosforylacja u *Halobacterium* może zachodzić także *in vivo* w warunkach beztlenowych lub po zahamowaniu oddychania (88, 94) (Ryc. 8). W atmosferze azotu i w ciemności poziom ATP w komórkach *H. halobium* gwałtownie obniża się do ~ 30% poziomu wyjściowego. Oświetlenie komórek zwiększa niemal natychmiast poziom ATP do około 100—110%, podczas gdy w ciemności syntezę ATP można wywołać, przenosząc komórki w atmosferę tlenu lub powietrza (94). Ponadto zaobserwowano, że oświetlenie bakterii w atmosferze tlenu nie zwiększa poziomu syntetyzowanego ATP ponad 100% (porównaj Ryc. 8) (88, 94). Obserwacje te wskazują, że chociaż za utrzymanie odpowiedniego poziomu ATP w komórce odpowiedzialne są zarówno fotofosforylacja jak i fosforylacja oksydacyjna, to ich funkcje są rozdzielone w zależności od panujących warunków.

Krippahl i Oesterhelt (88, 119), badając zapotrzebowanie



Ryc. 8. Wpływ tlenu i warunków oświetlenia na syntezę ATP w komórkach *H. halobium* (95).

kwantowe fotofosforylacji u *H. halobium* zaobserwowali, że światło hamuje oddychanie tych bakterii w około 70%. Warunkiem tej inhibicji jest maksymalnie sprawny i wydajny proces oddychania. Ponieważ oba układy, bakteriorodopsyna (wykorzystując energię świetlną) i łańcuch oddechowy (wykorzystując energię reakcji oksydoredukcji) dostarczają komórce wolnej energii chemicznej (ATP) muszą „współzawodniczyć” *in vivo* ze sobą. Jakkolwiek rozumowanie takie wydaje się słuszne, nie udało się sprecyzować mechanizmu współzawodnictwa tego typu. Przedmiotem współzawodnictwa fotofosforylacji i fosforylacji oksydacyjnej teoretycznie mogą być trzy czynniki: ADP, stężenie H^+ wewnątrz komórki i elektrochemiczny potencjał błonowy. Jak dotąd tego problemu nie wyjaśniono jeszcze, chociaż wydaje się, że ADP i transport protonów nie odgrywają głównej roli w tym współzawodnictwie.

Badania inhibicji oddychania *H. halobium* na świetle wykazały także, że zahamowaniu ulega zarówno zużycie tlenu jak i substratów łańcucha oddechowego, a za proces ten odpowiada fotochemicznie czynna bakteriorodopsyna. Wykazano bowiem, że absorpcja 36 kwantów energii świetlnej przez ten chromoproteid hamuje redukcję jednej cząsteczki tlenu w łańcuchu oddechowym. Biorąc pod uwagę znane fakty, wydajności kwantowej cyklu fotochemicznego bakteriorodopsyny ($\varphi = 0,8$) i stechiometrię redukcji tlenu ($12 H^+ / mol O_2$) obliczono przybliżoną wydajność kwantową badanej inhibicji. Jest ona stosunkowo wysoka i wynosi dla danych warunków około 0,5 (88).

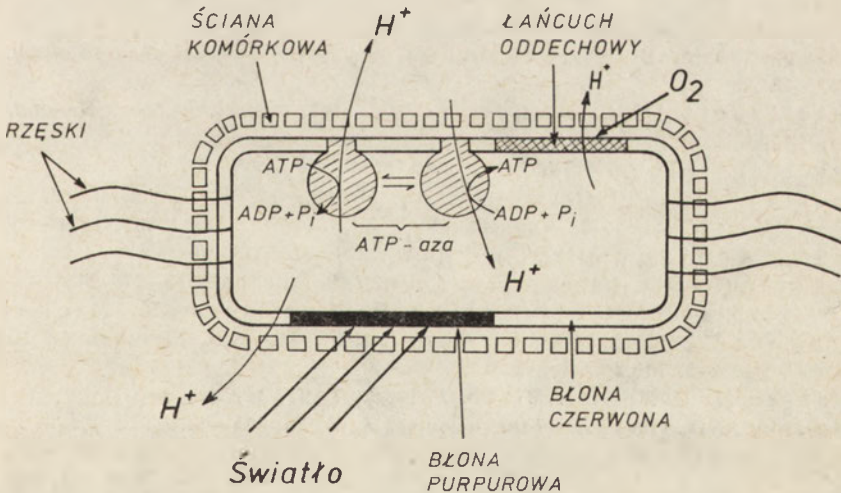
Obserwowane zjawisko kontroli świetlnej oddychania u *Halobacterium* ułatwi w przyszłości, jak się wydaje, ilościowe opisanie procesu przetwarzania energii świetlnej w chemiczną u tych bakterii. Zwraca ponadto uwagę na możliwość regulacji metabolizmu komórkowego przez światło i tlen, zależnie od warunków życia.

V. Uwagi końcowe

Badania procesów bioenergetycznych przetwarzania energii *in vivo* są ogromnie trudne ze względu na nierozzerwalny związek tych procesów z całym skomplikowanym metabolizmem komórki. Z drugiej jednak strony stosowanie do badań *in vitro* sztucznych, prostych modeli doświadczalnych zawęża obszar badań, o otrzymywane rezultaty zdeterminowane są praktycznie technicznymi możliwościami operowania sztucznym układem. Z tych względów dokładne poznanie mechanizmu przetwarzania energii świetlnej u *Halobacterium*, układu stosunkowo prostego w swej budowie, pozwoli, jak się wydaje, wyjaśnić wiele nierozwiązanych dotychczas problemów bioenergetycznych. Ponadto, być może, pozwoli w przyszłości na kontrolowanie tych procesów (87) i wykorzystywanie absorbowanej przez układy biologiczne energii świetlnej (słoneczna) do innych celów. Przewi-

duje się np.: zastosowanie fotochemicznie czynnej błony purpurowej do odsalania wody morskiej (76).

Struktura błony purpurowej i jej własności fotochemiczne *in vitro* zostały już dobrze poznane, jednak mechanizmów jej funkcji w metabolizmie energii w komórkach *Halobacterium* jeszcze nie udało się ostatecznie wyjaśnić. W artykule przedstawiono między innymi rezultaty i poglądy dotyczące procesu fotofosforylacji u bakterii słonolubnych, a więc procesu przetwarzania energii świetlnej w chemiczną. Jednak mimo pewnych ustaleń mechanizm tego procesu nie jest jeszcze całkowicie zrozumiały. Tak więc wiele obserwacji towarzyszących fotofosforylacji, ze względu na niewystarczającą ilość opublikowanych prac, nie zostało w artykule uwzględnionych, jak np.: rola jonów jednowartościowych w tworzeniu gradientu pH, aktywność ATP-azowa *in vivo*, rola fosforylacji substratowej w przetwarzaniu energii, czy funkcja nowych form ferredoksyny u *H. halobium* (120, 121). Do nierozwiązanych problemów należy także mechanizm kompetycji (współzawodnictwa) procesów fotofosforylacji i fosforylacji oksydacyjnej. Podstawowym jednak problemem, który nie został ostatecznie rozwiązany, jest mechanizm molekularnego, zależnego od bakteriorodopsyny transportu H^+ przez błonę komórkową *Halobacterium*. Błona purpurowa wydaje się bardzo wygodnym modelem do badania tego typu zależności, a dokładne poznanie mechanizmu tej reakcji pozwoli na wykorzystanie otrzymanych rezultatów w wyjaśnieniu mechanizmu transportu protonów w innych strukturach energetycznych komórki, być może, nawet u *Eucaryota*.



Ryc. 9. Schemat przemian energetycznych zachodzących w komórkach *H. halobium* (15).

Błona komórkowa zawiera błonę purpurową i składniki łańcucha oddechowego. Zarówno światło jak i tlen mogą inicjować transport protonów na zewnątrz komórki. W wyniku wytworzenia gradientu pH, ATP-aza przenosi protony z powrotem do wnętrza komórki. (Reakcja katalizowana przez ATP-azę jest odwracalna).

Na rycinie 9 przedstawiono schematycznie, opisane w artykule procesy bioenergetyczne zachodzące w komórkach *H. halobium*, związane funkcjonalnie między innymi z błoną purpurową. Przedstawione na tej rycinie szczegóły struktury i funkcji komórki *Halobacterium halobium* obrazują jednocześnie współczesny stan badań bioenergetycznych z zastosowaniem bakterii słonolubnych z rodzaju *Halobacterium*.

Panu Profesorowi dr Zbigniewowi Kaniudze autor dziękuje za krytyczne i pomocne uwagi przy przygotowaniu niniejszego artykułu.

Artykuł nadszedł 24.1.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 15.3.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Mitchell P., (1961), *Nature*, **191**, 144—148.
2. Mitchell P., (1966) w *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation*. Glynn Research Ltd., Cornwall.
3. Mitchell P., Moyle J., (1967) w *Biochemistry of Mitochondria* (red. Slater E. C., Kaniuga Z., Wojtczak L.) str. 53—75, PWN Warszawa.
4. Slater E. C., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **1**, 317—327.
5. Jagendorf A. T., Uribe E., (1966), *Brookhaven Symp. Biol.*, **19**, 215—219.
6. Tupper J. T., Tedeschi H., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.*, **63**, 370—377.
- 6a. Tupper J. T., Tedeschi H., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.*, **63**, 713—717.
7. Junge W., Witt H. T., (1968) *Z. Naturforsch.*, **236**, 244—250.
8. Kraayenhof R., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 213—215.
9. Witt H. T., (1972), *J. Bioenerg.*, **3**, 47—52.
10. Blaurock A. E., Stoeckenius W., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 152—154.
11. Oesterhelt D., Stoeckenius W., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 149—152.
12. Oesterhelt D., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 1180
13. Oesterhelt D., (1971), w *Abstr., 7th Meeting FEBS, Varna*, str. 205.
14. Oesterhelt D., (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1554—1555.
15. Stoeckenius W., (1976), *Sci. Amer.*, **234**, 38—58.
16. Oesterhelt D., (1976), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **15**, 17—24.
- 16a. Oesterhelt D., Gottschlich R., Hartmann R., Michel H., Wagner G., (1977), *Microbiol. Energetics*, **27**, 334—349. (Symposia of the for Society General Microbiology).
17. Larsen H., (1967), *Adv. Microb. Physiol.*, **1**, 97—132.
18. Brown A. D., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **75**, 425—431.
19. Stoeckenius W., Rowen R., (1967), *J. Cell. Biol.*, **34**, 365—393.
20. Christian J. H. B., Waltho J., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 506—508.
21. Gintzburg M., Sachs L., Gintzburg B. Z., (1970), *J. Cell. Biol.*, **55**, 187—207.
22. Lanyi J. K., Silverman M. P., (1972), *Can. J. Microbiol.*, **18**, 993—995.
23. Larsen H., (1962), w *The Bacteria*, red. Gunsalus I. C., Stanier R. Y., tom 4, str. 297—331, Academic Press, New York.
24. Bayley S. T., (1966), *J. Mol. Biol.*, **15**, 420—427.
25. Bayley S. T., Kushner D. J., (1964), *J. Mol. Biol.*, **9**, 654—658.

26. Joshi J. G., Guild W. R., Handler P., (1963), *J. Mol. Biol.*, **6**, 34—49.
27. Smithies W. R., Gibbons N. E., Bayley S. T., (1955) *Can. J. Microbiol.*, **1**, 605—611.
28. Brown A. D., Shorey C. D. (1963) *J. Cell. Biol.*, **18**, 681—687.
29. Kushner D. J., Bayley S. T., Boring J., Kates M., Gibbons N. E., (1964), *Can. J. Microbiol.*, **10**, 483—488.
30. Sehgal S. N., Kates M., Gibbons N. S., (1962). *Can. J. Microbiol.*, **40**, 69—81.
31. Kates M., (1972) w *Ether Lipids Chemistry and Biology*, red. Snyder F., str. 351—397, Academic Press, New York.
32. Kates M., Yengoyan L. S., Sastry P. S., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 252—269.
33. Qureshi A. A., Barnes F. J., Porter J. W., (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6730—6732.
34. Oesterhelt D., (1972), Abstr. 8th Meeting FEBS Budapest, str. 125.
35. Kelly M., Norgard S., Liaaen-Jensen S., (1970) *Acta Chem. Scand.* **24**, 2169—2182.
36. Kushwaha S. C., Pugh E. L., Kramer J. K. G., Kates M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 492—506.
37. Kushwaha S. C., Kates M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **316**, 235—243.
38. Frasca J. M., Porks V. R., (1965), *J. Cell. Biol.*, **25**, 157—162.
39. Blaurock A. E., Stoeckenius W., Oesterhelt D., Scherphof G. L., (1976), *J. Cell. Biol.*, **71**, 1—23.
40. Oesterhelt D., Stoeckenius W., (1974) w *Methods Enzymology*, red. Fleischer S., Packer L., t. 31A, str. 667—678, Academic Press, New York, London.
41. Stoeckenius W., Kunau W. H., (1968), *J. Cell. Biol.*, **34**, 365—393.
42. MacDonald R. E., Lanyi J. K., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2882—2889.
43. Henderson R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **93**, 123—138.
44. Oesterhelt D., Stoeckenius W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, 2853—2857.
45. Blaurock A. E., (1975), *J. Mol. Biol.*, **93**, 139—158.
46. Unwin P. N. T., Henderson R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **94**, 425—440.
47. Henderson R., Unwin P. N. T., (1975), *Nature* **257**, 28—32.
48. Larsen H., (1973), *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Ser.*, **39**, 383—396.
49. Sumper R., Herrmann G., (1976), *FEBS Letters* **71**, 333—336.
50. Sumper R., Reitmeier H., Oesterhelt D., (1976), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **15**, 187—194.
51. Sumper R., Herrmann G., (1976) *FEBS Letters* **69**, 149—152.
52. Fesenko E. E., Zhavronok A. J., Fesenko N. K., (1972), *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, **207**, 472—475.
53. Montal M., Korenbrot J. I., (1973), *Nature* **246**, 219—221.
54. Mendelson R., Verma A. L., Bernstein H. J., Kates M., (1974), *Can. J. Biochem.*, **52**, 774—782.
55. Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni R. A., Lozier R. H., Stoeckenius W., (1974), *Proc. Nat. Sci. U.S.A.*, **71**, 4462—4466.
56. Silverstein R. M., Bassler G. C., (1970), w *Spektroskopowe metody identyfikowania związków chemicznych*, str. 72—119, PWN, Warszawa.
57. Gochnauer M. B., Kushwaha S. C., Kates M., Kushner D. J., (1972), *Arch. Microbiol.*, **84**, 339—349.
58. Oesterhelt D., Schuman L., (1974) *FEBS Letters* **44**, 262—266.
59. Hildebrandt D., Deutcher N., (1975), *Nature* **257**, 46—48.
60. Brown P. K., Wald G., (1956), *J. Biol. Chem.*, **222**, 865—877.

61. Wald G., Brown P. K., (1976), *Nature* **177**, 174—176.
62. Hubbard R., (1956), *J. Gen. Physiol.*, **39**, 935—962.
63. Wald G., (1968), *Angew. Chemie*, **80**, 857—866.
64. Jan L. Y., (1974), *Vision Res.*, **15**, 907—911.
65. Petti M., Yudd A., Nakanishi K., Stoeckenius W., (1976), *Biochemistry* (w druku).
66. Wald G., (1968), *Nature*, **219**, 800—807.
67. Oesterhelt D., (1974), w *Biochemistry of Sensory Function*, 25th Coll. Ges. Biol. Chemie str. 75—76, Mosbach, Springer, Berlin.
68. Kung M. C., de Vault D., Hess B., Oesterhelt D., (1975), *Biophys. J.*, **15**, 907—911.
69. Tokunaga F., Iwasa T., Yoshizawa T., (1976), *FEBS Letters*, **72**, 33—38.
70. Hess B., Kleinhaus H., Schlüter H., (1976), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**, 515—531.
71. Oesterhelt D., Hartman R., Fischer U., Michel H., Schrenchenbach T., (1975), Proc. 10th FEBS Meeting, Paryż, str. 239.
72. Oesterhelt D., Hess B., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 316—326.
73. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuman L., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 413—463.
74. Oesterhelt D., Schuman L., Gruber H., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 257—261.
75. Der Meer van K., Mulder J. J. C., Lugtenburg J., (1976), *Photochem. Photobiol.*, **24**, 363—367.
76. Oesterhelt D., (1976), *FEBS Letters*, **64**, 20—22.
77. Deutcher N., Wilms M., (1975), *Biophys. Strukt. Mechanism.*, **1**, 259—271.
78. Sherman W. V., Korenstein R., Caplan S. R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 454—458.
79. Erlanger B. F., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 267—284.
80. Cherry R. J., (1976), *FEBS Letters*, **55**, 1—8.
81. Cone R. A., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 39—43.
82. Brown P. K., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 35—39.
83. Razi Naqvi K., Gonzalez-Rodriguez J., Cherry R. J., Chapman D., (1973), *Nature, New Biology*, **245**, 249—251.
84. Blasié J. K., Worthington C. R., Dewey M. M., (1969), *J. Mol. Biol.*, **39**, 407—417.
85. Blasié J. K., Worthington C. R., (1969), *J. Mol. Biol.*, **39**, 417—439.
86. Hess B., Oesterhelt D., (1975) Abstr. 10th FEBS Meeting Paryż, 1207.
87. Hess B., (1975) *FEBS Letters*, **64**, 26—28.
88. Oesterhelt D., (1975) w *Ciba Foundation Symp.: Energy Transformation in Biological Systems*, str. 147—169 Elsevier, North Holland, Amsterdam.
89. Bogomolni R. A., Stoeckenius W., (1974), *J. Supramol. Strukt.*, **2**, 775—780.
90. Eisenbach M., Bakker E. P., Korenstein R., Caplan R. S., (1976), *FEBS Letters*, **71**, 228—230.
91. Lozier R. H., Niederberger W., Bogomolni R. A., Hwang S. B., Stoeckenius W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 545—557.
92. Skulachev V. P., (1975), Abstr. 10th Meeting FEBS, Paryż, 67.
93. Bakker E. P., Rottenberg H., Caplan S. R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 557—573.
94. Danon A., Stoeckenius W., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **71**, 1234—1238.

95. Danon A., Caplan S. R., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **423**, 133—140.
96. Racker E., Stoeckenius W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 662—664.
97. Daucshazy Z., Karvaly B., (1976), *FEBS Letters*, **72**, 136—138.
98. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D., Konrashin A. A., Liberman E. A., Nemecek I. B., Ostroumov S. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P., (1974), *Nature*, **249**, 321—324.
99. Drachev L. A., Frolov V. N., Kaulen A. D., Liberman E. A., Ostroumov S. A., Plakunowa V. G., Semenov A. Yu., Skulachev V. P., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059—7065.
100. Kanner B. J., Racker E., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 1054—1061.
101. MacDonald R., Lanyi J. K., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2882—2889.
102. Kayushin L. P., Skulachev V. P., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 39—43.
103. Drachev L. A., Kaulen A. D., Ostroumov S. A., Skulachev V. P. (1974), *FEBS Letters*, **39**, 43—45.
104. Chance B., Porte M., Hess B., Oesterhelt D., (1975), *Biophys. J.*, **15**, 913—917.
105. Kraayenhof R., (1970), *FEBS Letters*, **6**, 161—166.
106. Deamer D. W., Prince R. C., Crofts A. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 323—336.
107. Renthal R., Lanyi J. K., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2136—2143.
108. Lanyi J. K., Yearwood-Drayton V., MacDonald R. E., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1595—1603.
109. Lanyi J. K., Renthal R., MacDonald R. E., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1603—1609.
110. Lanyi J. K., Hilliker K., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **448**, 181—184.
111. Danon A., Caplan S. R., (1974) w Proceedings of Third International Congress on Photosynthesis, red. Avron M., str. 2163—2170 Elsevier, Amsterdam.
112. Lozier R. H., Rogomolni R. A., Stoeckenius W., (1975), *Biophys. J.*, **15**, 955—962.
113. Hartman R., Oesterhelt D., (1975), Abstr. 10th Meeting FEBS, Paryż, 68.
114. Belyakowa T. N., Kagzyauskas Yu. P., Skulachev V. P., Smirnova I. A., Chekuleava L. N., Jasaitis A. A., (1975), *Dokl. Acad. Nauk SSSR*, **223**, 483—486.
115. Racker E., Kandrash A., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7069—7072.
116. Racker, E., (1972), *J. Membrane Biol.*, **10**, 221—229.
117. Hinkle P. C., Kim J. J., Racker E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1338—1342.
118. Kagava Y., Racker E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477—5487.
119. Oesterhelt D., Kripahl G., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 72—76.
120. Kerscher L., Oesterhelt D., (1976), *FEBS Letters*, **67**, 320—322.
121. Kerscher L., Oesterhelt D., Cammack R., Hall D. O., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 101—107.

ANNA SOŁTYK *)

Wczesne etapy oddziaływania kompetentnych bakterii z kwasami nukleinowymi

Early Interactions of Competent Bacteria with Nucleic Acids

Spis treści

- I. Kompetencja bakterii
 - I-1. Definicja i ogólna charakterystyka kompetencji
 - I-2. Właściwości kompetentnych komórek
- II. Zależność pobierania i transformacji od właściwości kwasów nukleinowych reagujących z kompetentnymi komórkami
 - II-1. Kwasy dezoksyrybonukleinowe
 - II-2. Kwasy rybonukleinowe
 - II-3. Syntetyczne polinukleotydy
- III. Oddziaływanie DNA z kompetentnymi komórkami
 - III-1. Odwracalne wiązanie DNA przez kompetentne bakterie
 - III-2. Nieodwracalne wiązanie DNA przez kompetentne bakterie
 - III-3. Polarność i liniowość pobierania DNA
 - III-4. Komórkowe receptory DNA
 - III-5. Lokalizacja DNA dawcy w czasie pobierania
- IV. Los DNA dawcy po pobraniu przez kompetentne komórki
 - IV-1. *Bacillus subtilis*
 - IV-2. *Diplococcus pneumoniae*
 - IV-3. *Haemophilus influenzae*
- V. Modele pobierania DNA przez kompetentne bakterie
 - V-1. Model Lacksa
 - V-2. Model „odslaniania”
 - V-3. Model replikacyjny

Contents

- I. Competence of Bacteria
 - I-1. Definition and general characteristics of competence
 - I-2. Properties of competent cells

*) Dr, Instytut Onkologii, ul. Wawelska 15, 02-034 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy, RNA — kwas rybonukleinowy, EDTA — kwas etylenodwuaminoczerooctowy, DNaza — dezoksyrybonukleaza, RNaza — rybonukleaza, t-RNA — przenoszący RNA.

- II. Dependence of uptake and transformation upon properties of nucleic acids interacting with component cells
 - II-1. Deoxyribonucleic acids
 - II-2. Ribonucleic acids
 - II-3. Synthetic polymers
- III. Interaction of DNA with competent cells
 - III-1. Reversible binding
 - III-2. Irreversible binding
 - III-3. Polarity and linearity of DNA uptake
 - III-4. DNA cell receptor sites
 - III-5. Localization of donor DNA during the uptake
- IV. Fate of donor DNA after uptake by competent cells
 - IV-1. *Bacillus subtilis*
 - IV-2. *Diplococcus pneumoniae*
 - IV-3. *Haemophilus influenzae*
- V. Hypothetical mechanisms of DNA uptake by competent bacteria
 - V-1. Model by Lacks
 - V-2. „Unmasking” model
 - V-3. „Replication” model

Oddziaływanie cząsteczek kwasów nukleinowych zawierających informację genetyczną z komórkami bakterii może wywoływać różne efekty biologiczne: transformację (1), śmierć komórek (2), mutację (3) lub transfekcję (4). Szczególną wagę mają doniesienia o wprowadzonych za pomocą obcego DNA modyfikacjach w komórkach organizmów wyższych (5—9), a w tym, obserwowana transformacja nowotworowa (10).

Innym skutkiem oddziaływania kwasów nukleinowych (dwuniciowego RNA) z komórkami jest indukcja interferonu w komórkach zwierzęcych (11). Nie wymaga ona prawdopodobnie wniknięcia induktora do wnętrza komórek a jedynie oddziaływania powierzchniowego (12).

Jednym z najprostszych modeli pozwalających na badanie mechanizmów oddziaływania kwasów nukleinowych z komórkami jest układ transformacji bakteryjnej. W skład jego wchodzi: a) bakterie znajdujące się w specjalnym stanie fizjologicznym określanym mianem kompetencji i b) kwas dezoksyrybonukleinowy. W wyniku oddziaływania tych dwu składników układu, jeśli są spełnione warunki opisane w dalszej części pracy może, choć nie musi, zajść pobranie kwasu nukleinowego ze środowiska a następnie rekombinacja między nim i chromosomem biorcy. W przypadku, gdy reagujące kwasy nukleinowe posiadają marker genetyczny, to znaczy kodują dwie przeciwstawne informacje, to w wyniku rekombinacji może nastąpić dziedziczne, fenotypowe wyrażenie cechy wprowadzonej za pośrednictwem dodanego z zewnątrz DNA. Proces prowadzący do tego nazywamy transformacją, a potomstwo transformowanej komórki transformantami. Liczba transformantów przypadająca na jedną komórkę w hodowli charakteryzuje kompetencję tej hodowli.

Oddziaływanie między DNA i kompetentnymi komórkami w czasie transformacji można traktować jako ogólną reakcję kompetentnych ko-

mórek z kwasami nukleinowymi. Należy podkreślić, że ponieważ jednym z elementów tego układu jest oczyszczony kwas nukleinowy, możliwe jest użycie w doświadczeniach kwasów nukleinowych radioaktywnie znakowanych, wyodrębnianych z różnych źródeł lub też modyfikowanych. Układ taki pozwala też na względnie ściśle kontrolowanie warunków reakcji. Dzięki temu możliwe jest bezpośrednie określanie związku między fizyko-chemicznymi właściwościami kwasów nukleinowych i ich sposobem oddziaływania z komórkami.

W artykule scharakteryzowano kolejno oba składniki układu transformacji a następnie przedstawiono wiadomości dotyczące wczesnych etapów ich oddziaływania (adsorpcja, pobieranie oraz wybrane zagadnienia dotyczące losu DNA po pobraniu) i w końcu opisano współczesne modele obrazujące mechanizm zachodzących procesów.

Ograniczenie treści artykułu do wymienionych zagadnień było konieczne ze względu na nagromadzenie ogromnego piśmiennictwa dotyczącego różnych aspektów transformacji oraz istnienia szeregu wcześniejszych prac przeglądowych omawiających nie poruszone w tej pracy problemy (13—20).

I. Kompetencja bakterii

I-1. Definicja i ogólna charakterystyka kompetencji

Kompetencja to fizjologiczny stan bakterii w którym mogą one nieodwracalnie wiązać DNA dodany do środowiska. Wiązanie DNA przez bakterie przejawia się w ten sposób, że pewna jego ilość nie daje się odpłukać od bakterii a następnie staje się niewrażliwa na działanie zewnątrzkomórkowych nukleaz. Takie wiązanie kwasów nukleinowych określane jest jako nieodwracalne wiązanie lub pobieranie. Zatem o hodowli bakterii mówimy skrótowo, że jest kompetentna gdy znajdują się w niej komórki, które mogą pobierać DNA.

Zdolność osiągania stanu kompetencji przez komórki jest uwarunkowana genetycznie (15). Jest to stan przejściowy, który zależnie od systemu transformacji trwa od 15 minut (*Diplococcus pneumoniae*) (21) do 3—4 godzin (*Bacillus*) (22, 23). Poszczególne komórki hodowli osiągają kompetencję niezupełnie synchronicznie (24) i nie wszystkie komórki w hodowli kompetentnej muszą znajdować się w tym stanie. Jest prawie 100% komórek kompetentnych w kompetentnych hodowlach *Diplococcus pneumoniae* (25, 26) i *Haemophilus influenzae* (27, 28) ale tylko 10—20% w kompetentnych hodowlach *Bacillus subtilis* (26, 29, 30).

Komórki różnych gatunków bakterii osiągają kompetencję w różnych warunkach. Pojawianiu się tego stanu towarzyszą liczne i różnorodne zmiany w samych komórkach i w ich środowisku. Zebrano dotychczas dużo fak-

tów charakteryzujących właściwości kompetentnych komórek i warunki w których stają się one kompetentne. Jednak faktów tych nie potrafimy dotychczas logicznie połączyć w jeden mechanizm wspólny dla wszystkich znanych układów transformacyjnych.

I-2. Właściwości kompetentnych komórek

Osiąganiu stanu kompetencji towarzyszą znaczne zmiany fizjologiczne i morfologiczne oraz zmiany fizycznych właściwości komórek.

Zmiany te są różne w poszczególnych układach transformacji. Stan fizjologiczny dwoinek zapalenia płuc (*Diplococcus pneumoniae*) jest w okresie kompetencji tylko nieznacznie zmieniony. Synteza białek, RNA, DNA jest podobna w kompetentnych i niekompetentnych hodowlach (31). Komórki kompetentne są jednak bardziej wrażliwe niż niekompetentne na działanie penicyliny, trypsyny, dezoksyholanu, KJO₄ (cytowane wg 17).

W układzie transformacji *B. subtilis* komórki kompetentne są mniejsze (32), mają mniejszą gęstość (33, 34), zmienione są też ich właściwości fizjologiczne. Komórki kompetentne charakteryzuje zwolniony metabolizm (22). Przed osiągnięciem stanu kompetencji, spada w nich znacznie synteza RNA i DNA (22, 35—38), i hamowanie replikacji DNA nie ma wpływu na rozwój kompetencji (39).

We wszystkich układach transformacyjnych zasadniczą sprawą dla wytworzenia i utrzymania kompetencji jest synteza RNA i białek (23, 40—42). Wskazuje to, że pobieranie DNA i transformacja wymagają obecności specjalnych białek.

Wydaje się, że istnieje związek pomiędzy pojawianiem się kompetencji i zmianami w ścianach i błonach komórkowych *B. subtilis* i *D. pneumoniae*. Zaobserwowano, że w czasie powstawania stanu kompetencji *B. subtilis* następuje gwałtowny wzrost ujemnego ładunku powierzchniowego komórek (24) i że liczba otrzymanych transformantów jest proporcjonalna do tego ładunku. Wykazano też pewne ilościowe zmiany składu ścian komórkowych, towarzyszące kompetencji hodowli (43). Stwierdzono, między innymi, znaczne zmiany aktywności związanego ze ścianą komórkową enzymu autolitycznego, zidentyfikowanego jako amidaza N-acylomuramino-L-alaninowa (44) i hydrolizującego amidowe wiązanie między kwasem muraminowym i L-alaniną peptydów, które tworzą krzyżowe połączenia między łańcuchami wielocukrów ściany komórkowej (45, 46). Czasowy związek pomiędzy pojawianiem się kompetencji i aktywności enzymu autolitycznego znaleziono też w układach transformacji *D. pneumoniae* (47) i paciorkowców grupy serologicznej H (*Streptococcus*) (48). W obu tych przypadkach enzym autolityczny działał w obszarze środkowym ściany, to znaczy obszarze jej wzrostu (48, 59). Oprócz tego stwierdzono, że pozabawienie kompetentnej hodowli *D. pneumoniae* choliny, która jest składni-

kiem kwasu teichojowego tych bakterii lub zastąpienie jej analogiem — etanolaminą — prowadziło do utraty zdolności wiązania DNA przez bakterie (50, 51).

Wyniki ostatnich badań Lacksa i Neubergera (52) wskazują, że w czasie osiągania kompetencji przez *D. pneumoniae* następują zmiany w zewnętrznych warstwach komórek (ścianie lub błonie) ułatwiające protoplastyzację bakterii. Jednocześnie wyniki te przemawiają raczej przeciwko aktywnej roli enzymu autolitycznego w tworzeniu stanu kompetencji.

W okresie kompetencji zahamowana jest synteza ściany komórkowej *B. subtilis* o czym świadczy zmniejszona wrażliwość kompetentnych komórek na działanie penicyliny (22, 29) oraz fakt, że prekursorzy ściany komórkowej hamują rozwój kompetencji (45). Badania wpływu usuwania ściany komórkowej, za pomocą lizozymu, na pobieranie i wydajność transformacji wykazały, że bardzo łagodne trawienie ściany może prowadzić do wzrostu kompetencji bakterii (53—55). Wynik ten przemawia za tym, że ściana komórkowa może stanowić w pewnym stopniu przeszkodę w oddziaływaniu obcego DNA z bakteriami. Z drugiej strony, całkowita protoplastyzacja i zahamowanie syntezy ściany komórkowej uniemożliwiały transformację (54, 55). Wskazuje to, że albo ściana komórkowa jest niezbędna do penetracji DNA do wnętrza komórki albo jej usunięcie umożliwia rozwój transformantów (np. ich replikację lub podział komórki), które i tak mają znacznie zwolnione procesy biosyntetyczne w stosunku do całej populacji (29).

Opisane wyżej modyfikacje w zewnętrznych warstwach kompetentnych komórek mogą być przyczyną uwalniania komórkowego DNA do środowiska przez *D. pneumoniae* i *B. subtilis* w czasie rozwoju ich kompetencji lub już po jej osiągnięciu (56, 57).

Rozwój kompetencji w hodowlach *B. subtilis* prowadzi do zmian morfologicznych przejawiających się zwiększeniem ilości mezosomów, szczególnie tych, które mają połączenie zarówno z błoną komórkową jak i obszarem jądrowym (58, 59).

1-2.1. Czynniki kompetencji

W niektórych układach transformacji *D. pneumoniae* (60) *Streptococcus* (61), *B. cereus* (62), *B. subtilis* (63—66) znaleziono czynniki produkowane przez kompetentne bakterie, które dodane do niekompetentnych bakterii tego samego gatunku indukowały ich kompetencję.

Najlepiej poznane są czynniki kompetencji *D. pneumoniae* i *Streptococcus*. Posiadają one niektóre wspólne własności: są wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych, są najprawdopodobniej składnikami zewnętrznych warstw komórkowych, mają ładunek dodatni w fizjologicznym pH i ciężary cząsteczkowe rzędu 5—10 tysięcy daltonów (52, 67).

Nie wyjaśniono dotychczas, co jest przyczyną rozpoczęcia syntezy czynników kompetencji przez bakterie ani nie określono mechanizmu ich działania. Stwierdzono, że rozpoczęcie syntezy czynników kompetencji przez małą ilość komórek wywołuje bardzo szybką ich produkcję w całej hodowli, powodując synchroniczne prawie pojawienie się kompetencji. Mamy tu więc do czynienia z mechanizmem wprowadzającym fizjologiczną homogenność hodowli, która staje się przez to biologiczną jednostką. Czynnik kompetencji spełnia więc rolę produktu koordynującego właściwości fizjologiczne poszczególnych komórek w hodowli, a więc rolę podobną do roli hormonów w organizmach wyższych (68).

Wyprodukowane przez komórkę lub znajdujące się w środowisku czynniki kompetencji *D. pneumoniae* i *Streptococcus* oddziałują z receptorami komórkowymi prawdopodobnie znajdującymi się na błonie komórkowej (69, 70). Powoduje to zmianę powierzchni bakterii, a w konsekwencji pojawienie się specyficznych właściwości antygenowych (71—73) i zdolności wiązania DNA (52, 74).

W układzie *B. subtilis* rolę czynnika kompetencji przypisywano bezpośrednio enzymowi autolitycznemu (65). Wodny ekstrakt komórkowy, zawierający ten enzym, przywracał kompetencję komórkom, które ją utraciły w wyniku ekstrakcji (64).

W innym laboratorium obserwowano, że w czasie hodowli komórki *B. subtilis* wydzielają do pożywki niskocząsteczkowy, mało wrażliwy na ogrzewanie i trawienie enzymami proteolitycznymi składnik, który przyspiesza pojawienie się kompetencji w niekompetentnych hodowlach bakterii (66). Wywoływana w ten sposób kompetencja utrzymywała się jednak tylko przez stosunkowo krótki okres czasu. Wskazuje to, że do utrzymania kompetencji potrzebna jest stała obecność czynnika indukującego. W pożywce zawierającej ten czynnik nie wykrywano aktywności autolitycznej. Problem powstawania stanu kompetencji i charakter substancji wywołującej ją w komórkach *B. subtilis* jest więc nadal w tym układzie nie wyjaśniony.

I-2.2. Aktywność nukleolityczna kompetentnych komórek

Wyniki prac z różnych ośrodków sugerowały możliwość udziału nukleaz w transformacji (75). Pokazywano istnienie związku pomiędzy aktywnością nukleolityczną a kompetencją komórek w hodowlach *D. pneumoniae* (76—79) i *Streptococcus* (80—82). W obu układach znajdowano enzymy, które miały własności endonukleaz (76, 82, 83) i były związane z zewnętrznymi warstwami komórek (54, 80, 82, 84, patrz też rozdziały III-1 i III-2).

Również w układzie *B. subtilis* stwierdzono, że jedynie kompetentne bakterie charakteryzuje aktywność egzonukleolityczna, degradująca intensywnie DNA dodany do hodowli (86). Wykryty enzym był związany praw-

dopodobnie z zewnętrznymi warstwami komórek, ponieważ nie znajdowano jego aktywności w środowisku bakterii w normalnych warunkach hodowli, a protoplastyzacja komórek powodowała pojawianie się aktywności egzonukleazy w pożywce. Aktywność ta była zależna od obecności jonów dwuwartościowych w środowisku. Badania kinetyczne wykazały, że enzym degradowe DNA dopiero po jego adsorpcji przez komórki, to znaczy po jego odwracalnym wiązaniu, ale przed pobraniem.

II. Zależność pobierania i transformacji od właściwości kwasów nukleinowych reagujących z kompetentną hodowlą

II-1. Kwasy dezoksyrybonukleinowe

II-1.1. Wpływ homologii pomiędzy DNA dawcy i biorcy na pobieranie i transformację

Kompetentne bakterie pobierają na ogół dobrze DNA pochodzące z różnych źródeł, zarówno bakteryjnych jak fagowych (transfekcja) i zwierzęcych (1, 13, 15, 17). Zaobserwowano jednak, że w układzie transformacji *H. influenzae* pochodzące z różnych źródeł heterologiczne DNA różniły się zdolnością do konkurencji z homologicznym DNA o receptory komórkowe. Nie znaleziono związku pomiędzy procentowym składem zasad badanych DNA a ich zdolnością do współzawodniczenia o receptory komórkowe (86, 87) i dotychczas nie znane są przyczyny obserwowanych różnic. Ostatnio wykazano, że DNA fagów T-parzystych, zawierający glukozylowane 5-hydroksymetylocytozyny zamiast cytozyn był bardzo źle pobierany i posiadał bardzo małe powinowactwo do receptorów komórkowych *B. subtilis* i *D. challis* (88, 89). Równoległe doświadczenia w których porównywano powinowactwo do receptorów komórkowych i wielkość pobierania dwu DNA: DNA transformującego i DNA zawierającego nieglukozylowane 5-hydroksymetylocytozyny, wykazały, że w tym przypadku wielkości te są podobne. Można więc stwierdzić, że obserwowana dyskryminacja była spowodowana obecnością podstawników glukozowych zlokalizowanych w dużym rowku DNA fagów T-parzystych.

Transformacja, w przeciwieństwie do pobierania DNA, wymaga podobieństwa sekwencji między DNA dawcy i biorcy. Równoległe badania wydajności transformacji i homologii między DNA dawcy i biorcy (przez pomiar stopnia hybrydyzacji tych DNA (90) i temperatur topnienia otrzymanych hydrydów (91), wykazały, że mierzone technikami fizykochemicznymi zmiany homologii odpowiadają zmianom wydajności transformacji. Wydajność transformacji zależy też od rodzaju śledzonego markera genetycznego (90) i od sekwencji otaczających go a to z kolei ma związek z pochodzeniem tego markera w cząsteczce DNA dawcy (28).

Wydajność transformacji międzygatunkowej jest zwykle znacznie niż-

sza niż transformacji w której DNA dawcy pochodzi z bakterii tego samego gatunku co biorca. Może to wynikać z następujących przyczyn:

- restrykcji heterologicznego DNA zaraz po wnikięciu do komórki lub już po integracji (92—94),
- ograniczonej integracji na skutek różnic w sekwencji zasad między DNA dawcy i biorcy w obszarze parowania (95, 96),
- reoperacji regionów złego sparowania po integracji, ale przed replikacją (94),
- zabijania kompetentnych komórek przez pobrany DNA (2, 97) na skutek indukcji profagów (98) lub wbudowania niewłaściwej informacji (99),
- trudności w wyrażaniu informacji pochodzącej z heterologicznego DNA (20).

II-1.2. Struktura drugorzędowa DNA

Istotne znaczenie dla pobierania DNA przez kompetentne bakterie ma jego drugorzędowa, helikalna struktura. W normalnych warunkach transformacji, zdenaturowany DNA nie jest pobierany, lub jest bardzo źle pobierany przez kompetentne komórki i ma znacznie niższe od natywnego DNA powinowactwo do receptorów komórkowych (100—106). Wykazano, że transformacja otrzymywana przy użyciu denaturowanego DNA była zawdzięczana biologicznej aktywności cząsteczek DNA, które na skutek kowalencyjnych wiązań poprzecznych, nie zostały całkowicie zdenaturowane i zawierały natywne odcinki (101, 105, 107).

Znaleziono jednak warunki (niskie pH i 1 mM EDTA) w których kompetentne komórki *B. subtilis* (108, 109) i *H. influenzae* (110, 111) pobierały zdenaturowany DNA i ulegały transformacji. Autorzy przypuszczali, że przyczyną dyskryminacji denaturowanego DNA w normalnych warunkach transformacji mogła być jego degradacja przez nukleazy (108). Nie wiadomo jednak, jakie zmiany konformacji i specyficzności receptorów komórkowych, poza hamowaniem aktywności nukleaz, mogły powodować zmodyfikowane warunki tym bardziej, że pobieranie natywnego DNA przez bakterie było wtedy gorsze niż w warunkach normalnej transformacji. Jednocześnie, wielkość pobierania denaturowanego DNA w warunkach dla niego dobranych i tak była niższa od wielkości pobierania natywnego DNA w zwykłych warunkach (108).

II-1.3. Ciężar cząsteczkowy

W czasie wyodrębniania DNA trudno uniknąć działania sił powodujących łamanie tych cząsteczek (siły ścinające) i całkowicie zahamować wewnątrzkomórkowe nukleazy, dlatego używane do doświadczeń preparaty DNA zawierają fragmenty chromosomów komórek z których je wyodręb-

niono. Ciężar cząsteczkowy tych fragmentów waha się na ogół w granicach — $1-2 \times 10^7$, podczas gdy cały chromosom bakteryjny ma ciężar cząsteczkowy rzędu 10^9 (112). Dodawanie DNA o coraz mniejszym ciężarze cząsteczkowym do hodowli komórek kompetentnych powoduje w kolejności oddzielanie od siebie markerów, występujących początkowo na jednej cząsteczce i w wyniku spadek wydajności jednoczesnego ich przekazywania w transformacji, a następnie spadek wydajności transformacji poszczególnych markerów (15, 18).

Pobieranie DNA przez kompetentne bakterie zależy od jego ciężaru cząsteczkowego w znacznie mniejszym stopniu niż transformacja (101, 113). Szczegółowe badania nad wpływem zmian ciężaru cząsteczkowego DNA dawcy na wydajność transformacji w układzie transformacji *D. pneumoniae* (114) wykazały, że spadek ciężaru cząsteczkowego od 10^7 do $0,3 \times 10^6$ powoduje 10^4 -krotny spadek wydajności transformacji. Przy tym samym obniżeniu ciężaru cząsteczkowego DNA dawcy, spadek pobierania DNA przez komórki był tylko 7-krotny. Pobieranie cząsteczek DNA o ciężarze cząsteczkowym mniejszym niż 1×10^6 nie spadało do zera ale do wartości stałej, odpowiadającej około 15% pobierania DNA nie ścinanego. Podobne wyniki otrzymano w układzie transformacji *H. influenzae* (115) i *B. subtilis* (116). Wyniki te świadczą o tym, że utrata aktywności biologicznej DNA przy obniżaniu jego ciężaru cząsteczkowego tylko częściowo jest wynikiem jego zmniejszonego pobierania. W układzie transformacji *B. subtilis* wykazano, że aktywność transformująca DNA o ciężarze cząsteczkowym poniżej 1×10^6 jest już na poziomie tła rewersji (116).

Inne badania wykazały, że aktywność transformująca DNA maleje wraz ze spadkiem ciężaru cząsteczkowego pojedynczych nici DNA (117—121). Wydajność pobierania DNA przez komórki w wyniku powstawania pęknięć w jednej tylko z dwu nici DNA nie zmienia się w zasadniczy sposób (117, 119).

Zdolność DNA do konkurencji o receptory komórkowe również zależy od jego ciężaru cząsteczkowego. Wykazano, że zarówno w układzie transformacji *H. influenzae* jak i *D. pneumoniae* zdolność konkurencyjna DNA spada w miarę zmniejszania jego ciężaru cząsteczkowego. Spadek ten jest jednak ograniczony ponieważ nawet cząsteczki o ciężarze cząsteczkowym mniejszym niż 5×10^5 posiadają skończone powinowactwo do receptorów komórkowych (103, 114, 115).

II-2. Kwasy rybonukleinowe

Ukazało się kilka doniesień o niestabilnej — to znaczy dziedzicznej jedynie przez kilka pokoleń, transformacji wywołanej przez ekstrakty komórkowe w których czynnik transformujący był wrażliwy na RNazę i DNazę. Na podstawie tych badań, prowadzonych na *D. pneumoniae* (122)

oraz *B. cereus* i *B. subtilis* (123, 124) wnioskowano, że transformację tę powodował kompleks RNA—DNA. Niestabilną transformację wywoływaną za pomocą hybrydu RNA—DNA (otrzymanego przez syntezę RNA na matrycy DNA polimerazą RNA) opisano również w układzie transformacji *D. pneumoniae* (125).

Badania wpływu całego komórkowego RNA lub wyodrębnionego t-RNA na pobieranie radioaktywnego DNA lub transformację *D. pneumoniae* (113, 126) wykazały, że RNA nie posiada powinowactwa do receptorów komórkowych tych bakterii. Podobny wynik otrzymano w układzie transformacji *B. subtilis* gdzie 23S rybosomalny RNA i t-RNA wyodrębnione z *E. coli* nie powodowały obniżenia pobierania homologicznego, radioaktywnego DNA (127).

W tym samym układzie stwierdzono, że dwuniciowy RNA, o helikalnej drugorzędowej strukturze i właściwościach fizykochemicznych analogicznych do właściwości aktywnych biologicznie cząsteczek DNA nie zostawał pobierany przez komórki i nie miał powinowactwa do komórkowych receptorów DNA (127).

Ostatnie badania L a c k s a (128) wskazują, że również cząsteczki hybrydowe RNA—DNA (o wysokim ciężarze cząsteczkowym około 5×10^6) nie zostają pobierane przez kompetentne *D. pneumoniae*.

Różnice właściwości między natywnym DNA z jednej strony, a hybrydami RNA—DNA i dwuniciowymi RNA z drugiej strony, sprowadzają się do zmian wynikających z zastąpienia tyminy przez uracyl i dezoksyrybozy przez rybozę w jednym lub dwu łańcuchach cząsteczek. Wynikiem tego jest wyższa stabilność temperaturowa drugorzędowej struktury hybrydów RNA—DNA i dwuniciowych RNA w porównaniu z DNA. (Wyraża się to stosunkowo wysoką temperaturą topnienia tych polimerów). Wydaje się jednak, że wysoka stabilność temperaturowa nie jest przyczyną obserwowanej dyskryminacji hybrydów RNA—DNA i dwuniciowych RNA przez komórki ponieważ dotychczasowe wyniki badań (86, 87) świadczą przeciwko istnieniu zależności między stabilnością temperaturową kwasów nukleinowych a ich powinowactwem do receptorów komórkowych i pobieraniem przez komórki.

Zastąpienie tyminy przez uracyl w cząsteczkach badanych polimerów również nie może być przyczyną dyskryminacji skoro znamy szereg fagowych DNA zawierających hydroksymetylouracyl zamiast tyminy, a jednak pobieranych przez bakterie i wywołujących transfekcję (4). Na skutek obecności grupy 2'-hydroksylowej w pierścieniu rybozy dwuniciowe RNA i hybrydy RNA—DNA mają konformację A i nie mogą przyjmować konformacji B, charakterystycznej dla DNA w roztworze wodnym. Można więc wnioskować, że obserwowana dyskryminacja dwuniciowych RNA i hybrydów RNA—DNA przez komórki jest wynikiem rozpoznawania obecności grupy 2'-hydroksylowej przez białka biorące udział w pobieraniu

DNA (127). Trudne wydaje się pogodzenie wzmiankowanych wyżej prac opisujących wywoływanie niestabilnej transformacji za pomocą hybrydu RNA—DNA z tymi ostatnimi wynikami badań.

II-3. Syntetyczne polinukleotydy

Wyniki prac kilku autorów (129—131) wskazują, że kompetentne komórki *B. subtilis*, *H. influenzae* i *D. pneumoniae* pobierają syntetyczne polidezoksyrybonukleotydy, ale nie pobierają polirybonukleotydów ani hybrydowych polimerów w których jeden łańcuch zawiera rybonukleotydy a drugi dezoksyrybonukleotydy. Wyniki takie, podobnie jak ostatnie prace L a c k s a (128, patrz też rozdział II-2) są niezgodne z opisanymi wyżej doniesieniami o możliwości wywoływania niestabilnej transformacji za pomocą hybrydu RNA—DNA.

III. Oddziaływanie między DNA i komórką kompetentną

III-1. Odwracalne wiązanie DNA przez kompetentne bakterie

Analiza kinetyki transformacji wskazuje, że oddziaływanie DNA z komórką zaczyna się od przypadkowego spotkania, po czym następuje bardzo szybka ale odwracalna adsorpcja DNA na komórce (25, 132—134). Zależność wiązania DNA od pH, stężenia jonów dwuwartościowych, siły jonowej (101) sugeruje, że to pierwotne oddziaływanie ma charakter jonowy. Nie bez znaczenia jest też obserwowana w czasie rozwoju kompetencji *B. subtilis* zmiana ładunku powierzchniowego komórek (24). Częsteczki DNA w ten sposób związane mogą być łatwo usuwane przez odpłukiwanie, ścinanie mechaniczne, działanie DNazy, przeciwciała przeciwko natywnemu DNA (101, 113, 135).

Ostatnio (84) wykazano, że DNA związany z *D. pneumoniae* w sposób wrażliwy na DNazę można uwolnić za pomocą 0,1 M NaOH lub stężonego chlorowodoru guanidyny (84).

Odwracalne wiązanie DNA przez kompetentne komórki wymaga glukozy a więc źródła energii (135).

Badania D u b n a u i C i r i g l i a n o (136) wykazały, że bezpośrednio po związaniu z kompetentnymi komórkami *B. subtilis*, DNA dawcy jest wrażliwy na działanie sił ścinających, powodujących łamanie długich cząsteczek DNA. Świadczy to o tym, że DNA znajduje się na zewnątrz komórek w rozciągniętej konfiguracji. Pojawiająca się szybko (po 30 sekundach) niewrażliwość na działanie sił ścinających wynika z obniżania ciężaru cząsteczkowego DNA dawcy, który jest cięty do fragmentów o ciężarze cząsteczkowym około 9×10^6 (136—138). Pomiary ciężarów cząsteczkowych

DNA wyjściowego, dodawanego do hodowli, i tego samego DNA już po zajściu fragmentacji sugerowały, że fragmenty te powstają przy udziale endonukleazy, przecinającej obie nici DNA (137). Wyniki te potwierdzono w układzie transformacji *D. pneumoniae* (84), w którym zaobserwowano, że przed osiągnięciem niewrażliwości na działanie zewnątrzkomórkowej DNazy (to jest przed nieodwracalnym pobraniem DNA przez komórki), DNA dawcy zostaje przycinany do fragmentów odpowiedniej długości. Następnie zachodzi transport DNA do wnętrza komórek już bez udziału dalszej redukcji ciężaru cząsteczkowego. Wykazano też (139, 140), że długość fragmentów DNA powstających w pierwszym etapie pobierania zależy od ciężaru cząsteczkowego DNA dawcy. DNA o niskim ciężarze cząsteczkowym (poniżej 1×10^6) ulega przecięciu na pół, podczas gdy z cząsteczek DNA o wysokim ciężarze cząsteczkowym odcinane są fragmenty o ciężarze cząsteczkowym rzędu $4,4 \times 10^6$.

Ostatnio Lacks i wsp. (141) stwierdzili, że w czasie odwracalnego wiązania DNA przez *D. pneumoniae* następuje nacinanie tylko jednej nici DNA dawcy. Proces ten nie zależy od obecności jonów dwuwartościowych. Powstawanie dwuniciowych fragmentów DNA dawcy opisane powyżej, wydaje się — na podstawie opisanych tu wyników badań — konieczne do zapoczątkowania procesu pobierania DNA przez kompetentne bakterie.

III-2. Nieodwracalne wiązanie DNA przez kompetentne bakterie

Po odwracalnym związaniu DNA, może nastąpić dalszy proces w wyniku którego DNA dawcy staje się niewrażliwy na działanie zewnątrzkomórkowych nukleaz. Proces ten nazywamy nieodwracalnym pobieraniem DNA (lub w skrócie pobieraniem).

Niewrażliwość DNA dawcy na DNazę pojawia się w różnym czasie po związaniu DNA przez komórki, zależnie od gatunku bakterii. W przypadku *H. influenzae* wystarcza 3—6 sekund do osiągnięcia oporności na działanie DNazy przez pierwsze cząsteczki DNA (133). W przypadku *B. subtilis* czas ten wynosi około 2 minut (142). W układzie transformacji *D. pneumoniae* obliczono prędkość osiągnięcia niewrażliwości DNA dawcy na DNazę — wynosi ona 80 nukleotydów na sekundę w 25°C (84).

Nieodwracalne wiązanie DNA wykazuje ostre optimum pH, temperatury, siły jonowej i jest zależne od procesów energetycznych w komórce (101, 113, 133, 135), a więc jest to proces aktywnego pobierania. Z drugiej strony, inhibitory syntezy RNA, DNA i białek mają mały wpływ na pobieranie DNA (143, 144).

Nieodwracalne pobieranie DNA, w przeciwieństwie do wcześniejszego etapu — odwracalnego wiązania (rozdział III-1) — wymaga też obecności jonów dwuwartościowych. W układzie *D. pneumoniae* wykazano, że związki wiążące jony dwuwartościowe (EDTA) mogą blokować pobieranie DNA

i wtedy związany DNA jest gromadzony na zewnątrz komórek w formie wrażliwej na działanie DNazy (135, 141, 145). Obecność EDTA powoduje też obniżenie wydajności transformacji *B. subtilis* (108). W tym układzie transformacji obecność jonów dwuwartościowych jest konieczna tylko w momencie inicjacji nieodwracalnego pobierania DNA (146). (Po rozpoczęciu tego procesu dalsze pobieranie DNA może przebiegać w obecności EDTA).

Obserwowano, że nieodwracalnemu pobieraniu DNA towarzyszy pojawianie się w środowisku produktów degradacji DNA dawcy (5'-mononukleotydów, nukleozydów i wolnych zasad) (139, 147—150).

Dane te wskazywały na udział nukleaz w pobieraniu DNA co więcej fakt, że produkty degradacji usuwane były do środowiska świadczył, że enzym produkujący je działa na zewnątrz błony cytoplazmatycznej (137).

Ostatnio wyizolowano mutanty *D. pneumoniae* z uszkodzoną aktywnością endonukleazy I (79, 83). Mutanty takie zachowywały zdolność wiązania DNA na zewnątrz komórek ale nie były zdolne do jego pobierania. Wnioskowano stąd, że aktywość związanej z błoną komórkową endonukleazy *D. pneumoniae* (54) jest nieodzowna, aby mogło zajść nieodwracalne pobranie DNA.

Wykazano ponadto, że procesem inicjującym pobieranie DNA jest powstawanie dwuniciowych fragmentów DNA (141, patrz też rozdział III-1). Wniosek ten jest zgodny z wcześniejszą sugestią Morrisona i Guilda (139), że do pobrania DNA konieczne jest przynajmniej jedno przecięcie podwójnego łańcucha DNA.

Nie znamy dotąd pełnego mechanizmu pobierania DNA. Przedstawione w dwu powyższych rozdziałach dane, oraz omówione dalej wyniki badań nad losem pobranego przez komórki DNA pozwoliły jedynie na zbudowanie kilku modeli pobierania (rozdział V).

III-3. Polarność i liniowość pobierania DNA

Pobieranie DNA przez kompetentne komórki następuje liniowo wzdłuż cząsteczek. Do wniosku tego doprowadziły wyniki doświadczeń, w których badano związek pomiędzy odległością genów (markerów genetycznych) w cząsteczce DNA i czasem koniecznym aby śledzone markery zostały pobrane czyli, zgodnie z definicją stały się niewrażliwe na działanie zewnątrzkomórkowych nukleaz. Zaobserwowano, że czas ten był dłuższy w przypadku grupy markerów niż w przypadku pojedynczych markerów i tym dłuższy im większa była odległość między nimi (134, 136, 151).

O polarności pobierania DNA wnioskowano na podstawie doświadczeń, w których zastosowano, w układzie transformacji *B. subtilis*, technikę *marker rescue*. Technika ta opiera się na tym, że mutacje występujące w różnych miejscach chromosomu faga zakażającego kompetentną hodowlę

bakterii mogą być naprawiane w wyniku rekombinacji z pobieranymi ze środowiska cząsteczkami DNA pochodzącymi z niezmutowanych fagów. Wykazano, że im bardziej odległa była mutacja od jednego z końców fagowego DNA, tym dłuższy był czas pobierania cząsteczek DNA konieczny aby mutacja mogła zostać „zreperowana”. Przedstawione wyniki wskazują jednak tylko na to, że pewne fragmenty DNA są pobierane wcześniej niż inne, co przy fragmentacji DNA już na etapie wiązania z komórką, nie musi mieć związku z liniowością pobierania DNA, a raczej z kolejnością odcinania fragmentów DNA. Ostatecznie liniowość pobierania DNA wykazali w układzie transformacji *D. pneumoniae* Morrison i Guild (84), stwierdzając, że wkrótce po związaniu DNA z komórką, długość cząsteczek DNA, pobranych nieodwracalnie przez komórki, jest proporcjonalna do odstępu czasu między dodaniem DNA i DNazy.

III-4. Komórkowe receptory DNA

Na podstawie zaobserwowanych zależności prędkości powstawania transformantów od temperatury, stężenia dodanego transformującego DNA i liczby komórek w hodowli Fox i Hotchkiss (25) stwierdzili, że transformację można interpretować jako zwykłą reakcję enzym—substrat. Badacze ci przypuścili też, że na powierzchni kompetentnych komórek mogą znajdować się białkowe receptory DNA. O istnieniu komórkowych receptorów DNA świadczyło też stwierdzenie kompetytywnej konkurencji pomiędzy transformującym i nietransformującym DNA (153) w warunkach, w których ilość dodawanego DNA była wystarczająca do nasycenia wszystkich miejsc wiążących komórki (28). Ponieważ konkurencyjny DNA w jednakowym stopniu obniżał transformację jak i pobieranie badanego DNA, można było stwierdzić, że konkurencja ma miejsce na poziomie receptorów powierzchniowych, odpowiedzialnych za pobieranie DNA (154).

Na podstawie kinetyki wiązania DNA lub badań autoradiograficznych określono w przybliżeniu ilość miejsc wiążących DNA. *H. influenzae* posiadają 1 do 4 miejsc wiążących na komórkę, *D. pneumoniae* 30 do 80 a *B. subtilis* 20 do 50 (133, 155).

Nieznaną jest wielkość i struktura receptorów komórkowych, biorących udział w pobieraniu DNA, nie wiadomo też czy ten sam receptor odpowiedzialny jest zarówno za odwracalne jak i za nieodwracalne wiązanie DNA.

Wyniki badań immunologicznych wskazują, że tylko niewielka część powierzchni bakterii (*D. pneumoniae* i *Streptococcus*) bierze udział w wiązaniu DNA (156). Przeciwciała wytworzone przeciwko kompetentnym komórkom *Pneumococcus*, hamują pobieranie DNA (156) przez te bakterie (przeciwciała przeciwko niekompetentnym bakteriom nie mają tego działania). Te same przeciwciała hamują pobieranie DNA przez kompetentne ko-

mórki *Streptococcus* mimo, że większość własności antygenowych tych dwu gatunków bakterii jest różna (71). Z danych tych można wnioskować, że: po pierwsze — powierzchnia komórek, która bierze udział w pobieraniu DNA, jest modyfikowana w czasie osiągnięcia kompetencji, po drugie — mechanizm pobierania (receptory?) może być w różnych układach transformacji podobny.

Produkowane w czasie rozwoju kompetencji *Streptococcus* i *D. pneumoniae* czynniki kompetencji indukują zdolność komórek do nieodwracalnego wiązania DNA (52, 74). Nasuwa to na myśl możliwość, że czynniki kompetencji mogą spełniać rolę receptorów komórkowych dla DNA. W układzie z *D. pneumoniae* nie udało się jednak wykazać istnienia bezpośrednich oddziaływań między czynnikiem kompetencji i DNA (52). Nie wyklucza to jednak możliwości ich udziału w wiązaniu DNA w układzie *in vivo* lub jako jednego ze składników receptora.

Ostatnio (126, 157) sugerowano, że:

- przynajmniej połowa zaadsorbowanych przez kompetentne komórki cząsteczek DNA jest związana z receptorami na błonie cytoplazmatycznej,
- miejsca wiążące DNA o własnościach przypominających własności receptorów w żywych komórkach (optimum pH i temperatury wiązania DNA) można wyodrębnić w kompleksie ściany komórkowej z błoną cytoplazmatyczną,
- rozdzielanie ściany i błony komórkowej powoduje utratę receptorów DNA z badanych frakcji.

Sądono, że receptory komórkowe są składnikami błony komórkowej a obecność ściany komórkowej stabilizuje ich wiązanie z błoną. Ponieważ wyodrębnione kompleksy ściany i błony komórkowej wiążą więcej DNA niż odpowiadająca im liczba komórek, przypuszczano, że komórkowe receptory DNA występują również w niekompetentnych komórkach, ale dopiero w czasie osiągnięcia kompetencji część receptorów zostaje odsłonięta. Wyodrębnione kompleksy ściany i błony komórkowej wiążą t-RNA, co jest zgodne z właściwościami receptorów w żywych komórkach (patrz rozdział II-2), ale w przeciwieństwie do komórek kompetentnych mają nieco większe powinowactwo do denaturowanego DNA niż do natywnego. Opracowano również metodę ekstrakcji kompetentnych komórek *D. pneumoniae* prowadzącą do zaniku zdolności wiązania DNA przez komórki i jednoczesnego pojawiania się czynników wiążących DNA w ich środowisku (157). Wnioskowano, że to receptory komórkowe DNA ulegały w tych warunkach ekstrakcji z komórek. Stwierdzono też, że czynnik wiążący DNA tracił swoją aktywność pod wpływem wysokiej temperatury, działania enzymów proteolitycznych, formaldehydu, oraz soli o wysokim stężeniu. Wykazano ponadto, że czynnik ten przejawiał powinowactwo do DNA, ale nie miał go wobec RNA. W warunkach doświadczenia wiązanie DNA zależało od pH środowiska, temperatury i czasu inkubacji. Właściwości te wskazy-

wały na białkowy i enzymatyczny charakter wiązania. Całkowite wyjaśnienie tego zagadnienia będzie wymagało jednak oczyszczenia aktywnego czynnika.

III-5. Lokalizacja DNA dawcy w czasie pobierania

Wrażliwość DNA, w pierwszym etapie wiązania, na działanie sił ścinających świadczy, że początkowo DNA jest wiązany na powierzchni komórki. Dotychczas jednak nie wiadomo, czy pojawiająca się po pewnym czasie jego niewrażliwość na działanie DNazy jest skutkiem wnikania tego DNA do wnętrza komórki przez błonę cytoplazmatyczną. Cały szereg badań świadczy o tym, że pobrany DNA przez długi okres czasu pozostaje w zewnętrznych warstwach komórki.

Badania autoradiograficzne za pomocą mikroskopu elektronowego (58, 158) wykazały, że nieodwracalnie pobrany DNA pozostawał w regionie ściany i błony komórkowej przez znaczny okres czasu po pobraniu. Inne badania prowadzone przy użyciu mikroskopu elektronowego wskazywały, że DNA wiązany przez *B. subtilis* znajduje się w obszarze końców tych komórek lub w ich środkowej części (26, 159) i jest prawdopodobnie wiązany przez mezosomy (58, 159). O tym, że DNA pobierany przez *B. subtilis* i *D. pneumoniae* znajduje się przez dłuższy czas blisko powierzchni komórki świadczy możliwość hamowania transformacji za pomocą przeciwciał przygotowanych przeciwko zdenaturowanemu DNA już po osiągnięciu przez DNA dawcy stadium oporności na DNazę (19, 160). Co więcej, w niektórych wypadkach traktowanie lizozymem komórek, które pobrały DNA, powodowało utratę tego DNA (161).

Na podstawie powyższych doświadczeń sugerowano, że większość DNA po pobraniu nieodwracalnym, zanim zostanie przetransportowana do wnętrza komórki, pozostaje przez dłuższy czas związana z błoną komórkową w przestrzeni peryplazmatycznej.

Późniejsze doświadczenia (158, cytowane w 19) świadczyły, że usuwanie ściany komórkowej lizozymem nie powoduje straty pobranego DNA, co wskazuje na mocne związanie DNA z błoną komórkową lub niesłuszność wyżej wzmiankowanego wniosku.

IV. Los DNA dawcy po pobraniu przez kompetentne hodowle

Badanie losu DNA pobranego przez kompetentne komórki ma na celu określenie mechanizmu pobierania i procesów prowadzących do rekombinacji.

IV-1. *Bacillus subtilis*

Przez długi czas, wyniki prowadzonych w różnych laboratoriach badań nad losem DNA pobranego przez kompetentne *B. subtilis*, nie dawały się ze sobą pogodzić. Nieintegrowany DNA dawcy znajdowano po pobraniu w formie natywnej (150, 162, 163) lub zdenaturowanej (164, 165) lub w częściowo natywnej i częściowo zdenaturowanej formie (136, 137, 166). Ostatnio przeprowadzone badania wydają się układać obserwowane fakty w logiczny ciąg i godzić dotychczasowe sprzeczności.

W czasie gdy związany z komórką DNA dawcy staje się niewrażliwy na działanie zewnątrzkomórkowych nukleaz, w środowisku pojawiają się produkty jego degradacji i jednocześnie fragmenty dwuniciowe DNA (patrz rozdział III-2) zostają przekształcone w formę jednoniciową (164, 167, 168). Wyniki dotychczasowych badań (164, 167) przemawiają za tym, że jednołańcuchowy DNA łączy się z chromosomem biorcy.

W wyniku integracji powstają w DNA biorcy obszary hybrydowe, składające się z jednej nici DNA biorcy i jednej nici DNA dawcy (150, 163, 166). Początkowo jednoniciowy fragment dawcy jest połączony z DNA biorcy niekowalencyjnie poprzez wiązania wodorowe między zasadami dwu nici hybrydu. Z pewnym opóźnieniem następuje uzupełnienie wiązań fosfodwuestrowych, łączących końce nowowbudowanego fragmentu nici DNA z dalszymi odcinkami odpowiedniej nici DNA gospodarza (150, 160, 170). W czasie wszystkich procesów, prowadzących do integracji, około 60% pobranego DNA zostaje zdegradowane (164, 167, 171) i usunięte z komórek.

Po pobraniu część DNA dawcy (zarówno w przypadku pobierania homologicznego jak i heterologicznego DNA) znajdowano w kompleksie ze składnikami komórkowymi (138, 164, 165). Stwierdzono, że kompleks ten był wyjątkowo trwały skoro nie ulegał dysocjacji w roztworach o wysokim pH, pod działaniem soli o wysokim stężeniu i w 1% sarkozylu. Kompleks był częściowo wrażliwy na działanie pronazy i lipazy. Jednak, dopiero ogrzewanie w wysokim stężeniu soli prowadziło do jego dysocjacji; wtedy, uwolniony DNA dawcy znajdowano w formie zdenaturowanej (164, 165).

Badania połączenia DNA z błoną komórkową w czasie transformacji (172, 173) ujawniły, że DNA dawcy jest po pobraniu połączony z błoną komórkową i pozostaje z nią związany aż do integracji, po której nieintegrowane fragmenty zostają usunięte z kompleksu. Heterologiczny DNA *E. coli*, podobnie jak transformujący DNA, znajdowano w kompleksie z błoną komórkową (173). Ulegał on jednak szybkiej degradacji. Wskazuje to, że łączenie DNA dawcy z błoną komórkową jest związane z procesami „przed-integracyjnymi”.

Właściwości opisanego kompleksu sugerują możliwość jego identyczności z kompleksem błona komórkowa — DNA dawcy.

IV-2. *Diplococcus pneumoniae*

Wkrótce po pobraniu DNA przez kompetentne komórki *D. pneumoniae*, połowę DNA dawcy znajdowano w formie zdenaturowanej a resztę w postaci produktów degradacji (139, 147—149). Następnie zdenaturowany DNA zanikał a jego materiał znajdowano kowalencyjnie związany z DNA biorcy (147, 149). Było to skutkiem integracji jednoniciowych fragmentów DNA dawcy do chromosomu biorcy (148). Los heterologicznego DNA po pobraniu jest jakościowo podobny. Obserwuje się wbudowywanie materiału pochodzącego z DNA dawcy do chromosomu biorcy, ale uważa się, że nie jest to wynik wbudowywania długich fragmentów tego DNA jak w przypadku homologicznego DNA, ale zużywania produktów degradacji DNA dawcy do replikacji DNA biorcy (149).

IV-3. *Haemophilus influenzae*

Inaczej niż u *B. subtilis* i *D. pneumoniae*, w układzie transformacji *H. influenzae* pobrany DNA znajdowano w formie natywnej (174, 175). Stopniowo około 20% tego DNA ulegało degradacji do fragmentów kwasorozpuszczalnych (176—178). Obserwowana degradacja prawdopodobnie dotyczyła całych cząsteczek i nie miała związku z procesem integracji (178).

Ostatnio doniesiono o wykryciu jednoniciowych krótkich fragmentów pobranego DNA w komórkach *H. influenzae* (179). Nie można było jednak odnieść ich pojawienia się do któregośkolwiek z etapów pobierania lub rekombinacji. Wykrycie jednoniciowej formy pobranego DNA również w tym układzie jest dość ważne, ponieważ upodabnia układ transformacji *H. influenzae*, dotychczas uważany za odmienny, do dwu układów opisanych wyżej.

V. Modele pobierania DNA przez kompetentne bakterie

Na podstawie zgromadzonych danych doświadczalnych, stworzono kilka modeli mechanizmów pobierania DNA przez kompetentne komórki.

V-1. Model Lacksa

Opierając się na fakcie, że po pobraniu przez kompetentne komórki *D. pneumoniae*, DNA dawcy jest w połowie zdegradowany a reszta jest w postaci jednołańcuchowej, L a c k s (147) zaproponował model w którym pobieranie jednego łańcucha DNA i degradacja drugiego są procesami zsynchronizowanymi. Postulował on obecność w błonie cytoplazmatycznej,

egzonukleazy, która hydrolizując jeden łańcuch DNA dawcy, jednocześnie mogła by wciągać drugi łańcuch DNA do komórki. Postulowana nukleaza miała by więc działać jako translokaza DNA.

Późniejsze badania, opisane w poprzednich rozdziałach, dostarczyły większej ilości danych, które pozwoliły rozwinąć ten model według obecnych poglądów. Obraz wydarzeń prowadzących do pobrania DNA przedstawia się następująco (89, 141). Początkowo DNA ulega związaniu na zewnątrz komórek. Łączy się z tym powstawanie nacięć pojedynczych nici cząsteczek DNA w odstępach około 6000 zasad. Proces ten wymaga energii i może zachodzić w obecności EDTA. Lacks przypuszcza, że utworzenie aparatu komórkowego działającego w ten sposób na DNA, może warunkować pojawianie się stanu kompetencji bakterii. Lacks stawia też hipotezę, że białko biorące udział w przecinaniu nici DNA może się trwale łączyć (kowalencyjnie?) z jednym z nowo powstałych końców i w ten sposób wiązać DNA dawcy z komórką. Następnie białko to mogło by spełniać rolę „przewodnika” nici DNA w czasie transportu przez błonę komórkową a potem brać udział w rekombinacji.

Następnym obserwowanym przekształceniem DNA dawcy jest jego fragmentacja. Proces ten, podobnie jak pobieranie w czasie którego następuje przekształcenie fragmentów dwuniciowych w jednoniciowe z jednoczesnym pojawieniem się w środowisku produktów degradacji DNA, wymaga jonów dwuwartościowych i aktywności związanej z błoną komórkową głównej endonukleazy *D. pneumoniae* (endonukleaza I) (54). Wydaje się prawdopodobne, że fragmentacja DNA inicjuje jego pobieranie. Lacks przypuszcza, że endonukleaza może produkować dwuniciowe fragmenty DNA przecinając jego łańcuch na przeciwko nacięcia powstałego przy wiązaniu DNA z komórką. Nie można jednak wykluczyć możliwości przecinania podwójnej nici DNA, niezależnie od nacięć powstających wcześniej. Stworzony przez Lacksa model pobierania DNA zakłada, że endonukleaza stopniowo usuwa oligonukleotydy, rozpoczynając od nowowprowadzonych nacięć i jednocześnie wciąga związaną z białkiem „przewodnikowym” drugą nić DNA do komórki. Energia potrzebna do tego procesu mogłaby jak sugeruje Lacks, pochodzić właśnie z hydrolizy jednego z łańcuchów DNA. Dyskutując swój model autor zwraca uwagę, że uzyskane wyniki nie stanowią wystarczającego dowodu roli endonukleazy I w pobieraniu DNA przez *D. pneumoniae*. Propozycja udziału endonukleazy I w pobieraniu DNA opiera się, jak wiemy z poprzednich rozdziałów na występowaniu czasowego związku między aktywnością komórkowych nukleaz a stanem kompetencji oraz na fakcie, że uszkodzenie aktywności głównej endonukleazy *D. pneumoniae* wiąże się z zablokowaniem nieodwracalnego pobierania DNA. Nie można wykluczyć więc, że badane mutacje powodowały uszkodzenie pobierania nie bezpośrednio przez inaktywację enzymu, ale na skutek pośrednio wprowadzonych zmian w błonie komórkowej. Inną możliwością jest to, że badane mutacje dotyczą genu kontrolującego zarówno

aktywność endonukleazy I *D. pneumoniae* jak i któryś z etapów pobierania DNA (83).

Podobny model pobierania DNA w układzie transformacji *B. subtilis* zaproponował D u b n a u (167).

V-2. Model „odslaniania”

Obecność enzymu autolitycznego w dobrze transformowalnych szczepach *B. subtilis* (46, 180, 181) i *D. pneumoniae* (182) oraz fakt znalezienia związku między jego aktywnością i kompetencją (181) pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że działanie enzymu autolitycznego powodując rozluźnienie struktury ujemnie naładowanej ściany komórkowej umożliwia cząsteczkom DNA, również ujemnie naładowanym, przenikanie i oddziaływanie z głębiej ulokowanymi receptorami komórkowymi. Udział częściowego usuwania lub osłabienia ściany komórkowej w mechanizmie pobierania DNA był sugerowany też przez wcześniejsze badania, omówione w rozdziale I-2.

Biorąc pod uwagę, że DNA dawcy wiąże się z komórkami biorcy w pobliżu mezosomów (56, 58, 68), A k r i g g i wsp. (183) zaproponowali model według którego enzym autolityczny działać by miał na ścianę komórkową w obszarze występowania mezosomów. Na nich to mogłyby znajdować się aktywne miejsca receptorowe dla DNA dawcy. W pierwszym etapie DNA mógł by wnikać do mezosomów (z którymi prawdopodobnie związany jest DNA komórkowy (184, 185)), a następnie ulegał by transportowi do wnętrza komórki. Transport DNA przez błonę komórkową zachodzić by mógł kosztem energii dostarczanej przez mezosomy z reakcji utleniania—redukcji, za pomocą specjalnego nie określonego mechanizmu transportu umiejscowionego w mezosomach. Integracja DNA mogła by następować w czasie replikacji, przy użyciu istniejących na miejscu struktur, biorących udział w syntezie DNA biorcy.

Udział mezosomów w wiązaniu DNA i transporcie do wnętrza komórki, gdzie następuje rekombinacja, proponowano też na podstawie badań autoradiograficznych z zastosowaniem mikroskopu elektronowego (159 i rozdział I-2).

Najbardziej szczegółowy jest model proponowany przez T o m a s z a i wsp. (51, 126, 157) dla układu transformacji *D. pneumoniae*. Zgodnie z tym modelem kompetencję mają zapoczątkować zmiany zachodzące w błonie komórkowej i wynikające z oddziaływania pomiędzy cząsteczkami czynnika kompetencji i receptorami błony cytoplazmatycznej (69), znajdującymi się w obszarze wzrostu ściany komórkowej (53). W wyniku tego oddziaływania następować by miał wyciek autolizyny do przestrzeni periplazmatycznej. Enzym ten trawiąc częściowo ścianę komórkową odsłaniać by mógł umiejscowione w (lub na) błonie komórkowej białkowe re-

ceptory posiadające powinowactwo do DNA ale nie do RNA. Autorzy tego modelu przypuszczają, że receptory te mogą być obecne zarówno w kompetentnych jak i niekompetentnych komórkach, lecz niedostępne w tych ostatnich dla zewnątrzkomórkowego DNA (126, 157).

V-3. Model replikacyjny

Badania Ericksona i wsp. (186, 187) wykazały, że istnieje związek między wydajnością transformacji markerów i kolejnością ich replikacji. Wskazywało to na istnienie zależnego od syntezy DNA biorcy etapu transformacji. Badania te dostarczyły też faktów przemawiających za takim sposobem związania pobranego nieodwracalnie DNA z komórką, że wiązania fosfodwuestrowe łańcucha wielocukrowego DNA są zabezpieczone przed hydrolizą enzymatyczną, podczas gdy zasady mogą oddziaływać z przeciwciałami przeciw zdenaturowanemu DNA (187).

Na podstawie tych danych Erickson (19) zaproponował model pobierania i rekombinacji DNA, w którym DNA dawcy miał być związany z błoną komórkową w pobliżu struktur odpowiedzialnych za replikację DNA biorcy. W wiązaniu tym zaproponowano udział rdzenia cukrowofosforanowego DNA. Przesuwanie się replikującego chromosomu gospodarza, posiadającego w miejscu replikacji rozluźnioną strukturę drugorzędową, w pobliżu punktu wiązania DNA dawcy, dawałoby możliwość przywędrowania fragmentu tego chromosomu homologicznego do związanego DNA. Mogłoby to doprowadzić do utworzenia wiązań wodorowych między komplementarnymi odcinkami a więc do integracji. Nieprzerwane przesuwanie się replikującego chromosomu biorcy względem miejsca replikacji automatycznie powodowało by wciąganie tego wbudowanego odcinka DNA do wnętrza komórki. W ten sposób proces integracji i transport DNA przez błonę komórkową mogłyby być procesami jednoczesnymi. W przypadku braku homologii, DNA dawcy mógłby być związany przez błonę komórkową, ale nie mógłby przez nią przenikać.

Proponowany mechanizm podważają jednak liczne wyniki badań świadczących o braku związku między replikacją DNA gospodarza i pobieraniem cząsteczek DNA ze środowiska (190) lub integracją tego DNA do chromosomu biorcy (38, 39, 149, 188—190).

Obecnie uważa się, że opisane wyżej mechanizmy pobierania DNA, w których aktywną rolę odgrywać by miały enzymy nukleolityczne i autolityczne są bliższe rzeczywistości niż model „replikacyjny”. Wydaje się również, że mogą one stanowić uzupełniające się elementy jednego mechanizmu.

Artykuł nadszedł 27.11.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 14.3.1977.

PIŚMIENICTWO

1. Hayes W. (1968), w *The Genetics of Bacteria and their Viruses*, 2 wyd., str. 574—619, J. Wiley and Sons, New York.
2. Piechowska M., Shugar D., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 290—295.
3. Mergeay M., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 89—92.
4. Trautner T. A., Spatz H. Ch., (1973), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **62**, 61—88.
5. Merrill C. R., Geier M. R., (1971), *Nature (London)*, **233**, 398—400.
6. Doy C. H., Gresshoff P. M., Rolfe B. G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 723—726.
7. Hess D., (1973), *Z. Pflanzphysiol.*, **68**, 432—441.
8. Johnson C. B., Grierson D., Smith H., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 105—107.
9. Horst J., Kluge F., Beyreuther K., Gerok W., (1975), *Proc. Nat. Sci. U.S.A.*, **72**, 3531—3535.
10. Drlica K. A., Kado C. I., (1975), *Bacteriol. Rev.*, **39**, 186—196.
11. Kleinschmidt W. J., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 517—542.
12. Bachner L., DeClercq E., Thang M. N., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 476—483.
13. Schaeffer P., (1964), *The Bacteria*, red. Gunsalis I. C., Stauer R. Y., t. 5, str. 87—144, Academic Press, New York, London.
14. Bańkowska E., Dobrzański W. T., Osowiecki H., (1966), *Post. Biochem.*, **12**, 189—223.
15. Spizizen J., Reilly B. E., Evans A. H., (1966), *Ann. Rev. Microbiol.*, **20**, 371—400.
16. Piechowska M., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 561—580.
17. Tomasz A., (1969), *Ann. Rev. Gen.*, **3**, 217—232.
18. Hotchkiss R. D., Gabor M., (1970), *Ann. Rev. Gen.*, **4**, 193—224.
19. Erickson R. J., (1970), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **53**, 149—199.
20. Notani N. K., Setlow J. K., (1974), *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, **14**, 99—120.
21. Thomas R., (1955), *Biochem. Biophys. Acta*, **18**, 467—481.
22. Nester E. W., (1964), *J. Bacteriol.*, **87**, 867—875.
23. Kammen H. O., Wojnar R. J., Canellakis E. S., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 56—65.
24. Jensen R. A., Haas F. L., (1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 79—86.
25. Fox M. S., Hotchkiss R. D., (1957), *Nature*, **179**, 1322—1325.
26. Javor G. T., Tomasz A., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 1216—1222.
27. Hotchkiss R. D., Marmur J., (1954), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **40**, 55—60.
28. Schaeffer P., (1958), *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 60—74.
29. Nester E. W., Stocker B. A. D., (1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 785—796.
30. Somma S., Polsinelli S., (1970), *J. Bacteriol.*, **101**, 851—855.
31. Tomasz A., (1968), *Bacteriol. Proc.*, **68**, 59.
32. Singh R. N., Pitale M. P., (1968), *J. Bacteriol.*, **95**, 864—866.
33. Cahn F. H., Fox M. S., (1968), *J. Bacteriol.*, **95**, 867—875.
34. Hadden C. T., Nester E. W., (1968), *J. Bacteriol.*, **95**, 876—885.
35. Erickson R. J., Copeland J. C., (1973), *Genetics*, **73**, 13—21.
36. Bodmer W. F., (1965), *J. Mol. Biol.*, **14**, 534—557.
37. McCarthy C., Nester E. W., (1967), *J. Bacteriol.*, **94**, 131—140.

38. Laird C. D., Wang L., Bodmer W., (1968), *Mutat. Res.*, **6**, 205—209.
39. Archer L. J., Landman O. E., (1969), *J. Bacteriol.*, **97**, 174—181.
40. Pakuła R., Cybulska J., Walczak W., (1963), *Acta Microbiol. Polon.*, **12**, 245—258.
41. Spencer H. T., Herriott R. M., (1965), *J. Bacteriol.*, **90**, 911—920.
42. Tomasz A., (1970), *J. Bacteriol.*, **101**, 860—871.
43. Young F. E., Spizizen J., Crawford I. P., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3119—3125.
44. Young F. E., Tipper D. J., Strominger J. L., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3600—3602.
45. Sharon H., (1969), *Sci. Amer.*, **5**, 92—98.
46. Klein A., Rais A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 225—240.
47. Mosser J. L., Tomasz A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 287—298.
48. Rånhand J. M., Leonard C., Cole R. M., (1971), *J. Bacteriol.*, **106**, 257—268.
49. Seto H., Tomasz A., (1975), *J. Bacteriol.*, **121**, 344—353.
50. Tomasz A., Mosser J. L., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 58—64.
51. Tomasz A., Zanati E., Ziegler R., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1848—1852.
52. Lacks S., Neuberger M., (1975), *J. Bacteriol.*, **124**, 1321—1329.
53. Prozorov A. A., (1965), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **160**, 472—474.
54. Tichy P., Landman O. E., (1969), *J. Bacteriol.*, **97**, 42—51.
55. Wilson G., Bott A., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **199**, 464—475.
56. Ephrati-Elizur E., (1968), *Genet. Res. Camb.*, **11**, 83—96.
57. Ottolenghi-Nightingale E., (1969), *J. Bacteriol.*, **100**, 445—452.
58. Wolstenholme D. R., Vermeulen C. A., Venema G., (1966), *J. Bacteriol.*, **92**, 1111—1121.
59. Vermeulen C. A., Venema G., (1974), *J. Bacteriol.*, **118**, 334—341.
60. Tomasz A., Hotchkiss R. D., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**, 480—487.
61. Pakuła R., Piechowska M., Bańkowska E., Walczak W., (1962), *Acta Microbiol. Polon.*, **11**, 205—222.
62. Felkner I. E., Wyss O., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 94—99.
63. Charpak M., Dedonder R. M., (1965), *C.R.H. Acad. Sci. (Paris)*, **260**, 5638—5642.
64. Akrigg A., Ayad S. R., Barker G. R., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 1062—1067.
65. Akrigg A., Ayad S. R., (1970), *Biochem. J.*, **17**, 397—403.
66. Joenje H., Gruber M., Venema G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 189—199.
67. Osowiecki H., Nałęcz J., Dobrzański W. T., (1969), *Mol. Gen. Genet.*, **105**, 16—20.
68. Tomasz A., (1965), *Nature*, **208**, 155—159.
69. Ziegler R., Tomasz A., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1342—1349.
70. Perry D., (1974), *J. Bacteriol.*, **117**, 702—707.
71. Tomasz A., Beiser S. M., (1965), *J. Bacteriol.*, **90**, 1226—1232.
72. Pakuła R., (1965), *J. Bacteriol.*, **90**, 1501—1502.
73. Pakuła R., (1967), *J. Bacteriol.*, **94**, 75—79.
74. Pakuła R., Hauschild A. H. W., (1965), *Can. J. Microbiol.*, **11**, 823—827.
75. Dobrzański W. T., (1976), *Post. Mikrobiol.*, **15**, 77—92.
76. Kohoutová M., (1967), *Folia Microbiol. (Prague)*, **12**, 316—322.

77. Kohoutová M., Braná H., Holubová I., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 124—129.
78. Lipavská H., Braná H., Kohoutová M., (1972), *Folia Microbiol. (Prague)*, **17**, 331.
79. Lacks S., Greenberg B., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2305—2309.
80. Nałęcz J., Dobrzański W. T., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **114**, 249—260.
81. Pakuła R., Spencer L. R., Goldstein P. A., (1972), *Can. J. Microbiol.*, **18**, 111—119.
82. Starościak B., Cegłowski P., Dobrzański W. T., (1975), *J. Bacteriol.*, **123**, 174—178.
83. Lacks S., Greenberg B., Neuberger M., (1975), *J. Bacteriol.*, **123**, 222—232.
84. Morrison D. A., Guild W. R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **299**, 545—556.
85. Joenje H., Venema G., (1975), *J. Bacteriol.*, **122**, 25—33.
86. Schaeffer P., Edgar R. S., Rolfe R., (1960), *C.R. Soc. Biol.*, **154**, 1978—1983.
87. Scocca J. J., Poland R. L., Zoon K. C., (1974), *J. Bacteriol.*, **118**, 369—373.
88. Sołtyk A., Shugar D., Piechowska M., (1975), *J. Bacteriol.*, **124**, 1429—1438.
89. Cegłowski P., Fuchs P., Sołtyk A., (1975), *J. Bacteriol.*, **124**, 1621—1623.
90. Dubnau D., Smith I., Morell P., Marmur J., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 491—498.
91. Chilton M. D., McCarthy B. J., (1969), *Genetics*, **62**, 697—710.
92. Kelly T. J., Smith H. O., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 393—409.
93. Smith H. O., Wilcox K. W., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 379—391.
94. Notani N. K., Setlow J. K., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 751—760.
95. Chen K. C., Ravin A. W., (1966), *J. Mol. Biol.*, **22**, 109—134.
96. Biswas G. D., Ravin A. W., (1971), *Mol. Gen. Genet.*, **110**, 1—22.
97. Steinhart W. L., Herriott R. M., (1968), *J. Bacteriol.*, **96**, 1725—1731.
98. Setlow J. K., Boling M. E., Allison D. P., Beattie K. L., (1973), *J. Bacteriol.*, **115**, 153—161.
99. Beattie K. L., Setlow J. K., (1970), *J. Bacteriol.*, **104**, 390—400.
100. Lerman L. S., Tolmach L. J., (1959), *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 371—387.
101. Barnhart B. J., Herriott R. M., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 25—30.
102. Marmur J., Rownd R., Schildkraut C. L., (1963), *Proc. Nucl. Acid. Res.*, **1**, 231—300.
103. Rabeyrotte N., Latarjet R., (1967), *Ann. Inst. Pasteur*, **113**, 183—204.
104. Rownd R., Green D. M., Sternglanz R. S., Doty P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **32**, 369—377.
105. Alberts B. M., Doty P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **32**, 379—503.
106. Miao K., Guild W. R., (1970), *J. Bacteriol.*, **101**, 361—364.
107. Mulder C., Doty P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **32**, 423—435.
108. Tevethia M. J., Mandel M., (1970), *J. Bacteriol.*, **101**, 844—850.
109. Tevethia M. J., Caudill C. P., (1971), *J. Bacteriol.*, **106**, 808—811.
110. Postel E. H., Goodgal S. H., (1966), *J. Mol. Biol.*, **16**, 317—327.
111. Postel E. H., Goodgal S. H., (1967), *J. Mol. Biol.*, **28**, 247—259.

112. Davidson J. N., (1969). W *Biochemia kwasów nukleinowych*, str. 62, PWRiL, Warszawa.
113. Lerman L. S., Tolmach L. J., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 68—82.
114. Cato A. Jr., Guild W. R., (1968), *J. Mol. Biol.*, **37**, 157—178.
115. Bach M. L., (1971), *Mol. Gen. Genet.*, **110**, 40—53.
116. Morrison D. A., Guild W. R., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 220—223.
117. Bodmer W. F., (1966), *J. Gen. Physiol.*, **49**, 233—258.
118. Summers W. C., Szybalski W., (1967), *J. Mol. Biol.*, **26**, 227—236.
119. Bernardi G., Bach M. L., (1968), *J. Mol. Biol.*, **37**, 87—98.
120. Laipis P. J., Olivera M. B., Ganesan A. T., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, 289—296.
121. Thorsett G. O., Hutchinson F., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **238**, 67—74.
122. Evans A. H., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**, 1442—1449.
123. Kirtikar M. W., Duerksen J. D., (1968). *Biochemistry* **7**, 1172—1182.
124. Kirtikar M. W., Duerksen J. D., (1968), *Biochemistry* **7**, 1183—1194.
125. Hurwitz J., Evans A., Babinet Ch., Skalka A., (1963), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 59—65.
126. Seto H., Lopez R., Tomasz A., (1975), *J. Bacteriol.*, **122**, 1339—1350.
127. Sołtyk A., Piechowska M., Shugar D., Doskočil J., (1976), *Mol. Gen. Genet.*, (w druku).
128. Lacks S., (1976), w *Modern Trends in Bacterial Transformation*, red. Portolés A., Lopez R., str. 35—44. North—Holland Pub. Comp., Amsterdam, New York.
129. Setlow J. K., Boling M. E., Bollum F. J., (1965), *Proc. Acad. Nat. Sci. U.S.A.*, **53**, 1430—1436.
130. Ciferri O., Barlati S., Lederberg J., (1970), *J. Bacteriol.*, **104**, 684—688.
131. Tomasz A., (1973), w *Bacterial Transformation*, red. Archer L. J., str. 81—88, Academic Press, London, New York.
132. Goodgal S. H., Herriott R. M., (1961), *J. Gen. Physiol.*, **44**, 1201—1227.
133. Stuy J. H., Stern D., (1964), *J. Gen. Microbiol.*, **35**, 391—400.
134. Strauss N., (1965), *J. Bacteriol.*, **89**, 288—296.
135. Seto H., Tomasz A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1493—1498.
136. Dubnau D., Cirigliano C., (1972), *J. Mol. Biol.*, **64**, 31—46.
137. Dubnau D., Cirigliano C., (1972), *J. Mol. Biol.*, **64**, 9—29.
138. Arwert F., Venema G., (1973), *Mol. Gen. Genet.*, **123**, 185—198.
139. Morrison D. A., Guild W. R., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 1157—1168.
140. Morrison D. A., Guild W. R., (1973), *J. Bacteriol.*, **115**, 1055—1062.
141. Lacks S., Greenberg B., (1976), *J. Mol. Biol.*, **101**, 255—275.
142. Levine L. S., Strauss N., (1965), *J. Bacteriol.*, **89**, 281—287.
143. Stuy J. H., (1962), *J. Gen. Microbiol.*, **29**, 537—542.
144. Young F. E., Spizizen J., (1963), *J. Bacteriol.*, **86**, 392—400.
145. Seto H., Tomasz A., (1976), *J. Bacteriol.*, **126**, 1113—1118.
146. Morrison D. A., (1971), *J. Bacteriol.*, **108**, 38—44.
147. Lacks S., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 119—131.
148. Fox M. S., Allen M. K., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**, 412—419.
149. Lacks S., Greenberg B., Carlson K., (1967), *J. Mol. Biol.*, **29**, 327—347.
150. Dubnau D., Davidoff-Abelson R., (1971), *J. Mol. Biol.*, **56**, 209—221.
151. Gabor M. R., Hotchkiss D., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1441—1448.
152. Williams G. L., Green D. M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1545—1549.

153. Alexander H. E., Leidy G., Hahn E., (1954), *J. Exp. Med.*, **99**, 505—533.
154. Schaeffer P., (1957), *C.R. Hebd. Acad. Sci.*, **245**, 230—231.
155. Singh R. N. (1972), *J. Bacteriol.*, **110**, 266—277.
156. Nava G., Galis A., Beiser S. M., (1963), *Nature*, **197**, 903—904.
157. Seto H., Tomasz A., (1975), *J. Bacteriol.*, **124**, 969—976.
158. Young F. E., (1967), *Nature*, **213**, 773—775.
159. Vermeulen G. A., Venema G., (1974), *J. Bacteriol.*, **118**, 342—350.
160. Braun W., Plescia O., Kohoutová M., Grellner J., (1965), w *The Physiology of Gene and Mutation Expression*, red. Kohoutová M., Hubacěk J., str. 181—185, Academia, Prague.
161. Miller I. L., Landman O. E., (1965), w *Physiology of Gene and Mutation Expression*, red. Kohoutová M., Hubacěk J., Academia, Prague.
162. Pène J. J., Romig W. R., (1964), *J. Mol. Biol.*, **9**, 236—245.
163. Ayad S. R., Barker G. R., (1969), *Biochem. J.*, **113**, 167—174.
164. Piechowska M., Fox M. S., (1971), *J. Bacteriol.*, **108**, 680—689.
165. Piechowska M., Sołtyk A., Shugar D., (1975), *J. Bacteriol.*, **122** 610—622.
166. Bodmer W. F., Ganesan A. T., (1964), *Genetics*, **50**, 517—738.
167. Davidoff-Abelson R., Dubnau D., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 154—162.
168. Davidoff-Abelson R., Dubnau D., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 146—153.
169. Zadražil S., Fučík V., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 676—683.
170. Arwert F., Venema G., (1973), w *Bacterial transformation*, red. Archer L., str. 203—214, Academic Press, New York.
171. Davidoff-Abelson R., Dubnau D., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1070—1074.
172. Harris W. J., Barr G. C., (1971), *Mol. Gen. Genet.*, **113**, 331—344.
173. Dooley D. C., Nester E. W., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 711—722.
174. Stuy J. H., (1965), *J. Mol. Biol.*, **13**, 554—570.
175. Notani N., Goodgal S. H., (1966), *J. Gen. Physiol.*, **49**, 197—209.
176. Kooistra J., Venema G., (1971), w *Informative Molecules in Biological Systems*, red. Ledoux L. G. H., str. 408—417, North-Holland, Amsterdam.
177. Stuy J. H., van der Have B., (1971), *J. Gen. Microbiol.*, **65**, 147—152.
178. Stuy J. H., (1974), *J. Bacteriol.*, **120**, 917—922.
179. Stuy J. H., (1975), *J. Bacteriol.*, **122**, 1038—1044.
180. Young F. E., (1966), *J. Bacteriol.*, **92**, 839—846.
181. Young F. E., Spizizen J., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3126—3130.
182. Austrian R., (1952), *Bacteriol. Rev.*, **16**, 31.
183. Akrigg A., Ayad S. R., Blamire J., (1969), *J. Theor. Biol.*, **24**, 266—272.
184. Robinow C. F., (1964), w *The Cell*, red. Brachet J., Kirskey A. E., t. 4, str. 45, Academic Press, New York.
185. Ryter A., Landman O. E., (1964), *J. Bacteriol.*, **88**, 457—467.
186. Erickson R. J., Braun W., (1968), *Bacteriol. Rev.*, **32**, 291—296.
187. Erickson R. J., Young F. E., Braun W., (1969), *J. Bacteriol.*, **99**, 125—131.
188. Voll M. J., Goodgal S. H., (1965), *J. Bacteriol.*, **90**, 873—883.
189. Fox M. S., (1960), *Nature*, **187**, 1004—1006.
190. Ganesan A. T., Buckman N., (1969), *Biophys. J.*, **9**, 11—18.

BARBARA MAZUŚ *)

Polimerazy RNA eukariontów ze szczególnym uwzględnieniem polimeraz roślin wyższych

RNA Polymerases of Eucaryotes with a Special Reference to Polymerases Higher Plants

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Różnorodność polimeraz i ich klasyfikacja**
- III. Charakterystyka eukariotycznych polimeraz RNA**
 - III-1. Polimeraza RNA I**
 - III-2. Polimeraza RNA II**
 - III-3. Polimeraza RNA III**
 - III-4. Polimerazy mitochondrialne**
 - III-5. Polimerazy chloroplastowe**
- IV. Rola polimeraz RNA w regulacji transkrypcji**
 - IV-1. Mechanizm regulacji transkrypcji eukariontów**
 - IV-2. Udział roślinnych polimeraz w regulacji syntezy RNA**
- V. Podsumowanie i wnioski końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Multiplicity and nomenclature of polymerases**
- III. Characteristics of eukariotic RNA polymerases**
 - III-1. RNA polymerase I**
 - III-2. RNA polymerase II**
 - III-3. RNA polymerase III**
 - III-4. Mitochondrial RNA polymerases**
 - III-5. Chloroplast RNA polymerases**
- IV. Role of RNA polymerases in the regulation of transcription**
 - IV-1. Mechanisms of regulation of transcription in eukaryotes**
 - IV-2. Participation of plant polymerases in the regulation of RNA synthesis**
- V. Summary and general conclusions**

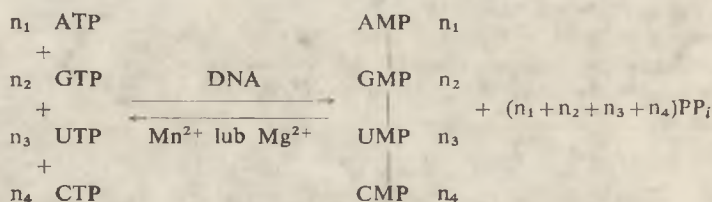
*) Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: GA₃ — kwas giberelinowy; 2,4-D — kwas 2,4-dwu-chloro-fenoksyoctowy; AF/05 i AF/013 — półsyntetyczne pochodne rifamycyny SV; HnRNA — heterogenny, jądrowy RNA.

I. Wstęp

W roku 1959 Weiss i wsp. wyizolowali z wątroby szczura (1) a następnie z komórek bakteryjnych (2) enzym, który na matrycy DNA katalizował polimeryzację rybonukleozydotrójfosforanów do wysokocząsteczkowego produktu, o własnościach typowych dla komórkowego RNA. Enzym ten nazywano polimerazą RNA zależną od DNA (E.C. 2.7.7.6.) lub transkryptazą.

W przeciwieństwie do bakterii, gdzie ten sam enzym katalizuje syntezę zarówno rybosomalnych, informacyjnych jak i przenoszących RNA, komórka eukariotyczna dysponuje zestawem różnych polimeraz, uczestniczących w syntezie poszczególnych klas RNA. Podstawowe własności katalityczne są jednak wspólne wszystkim polimerazom RNA, eukariotycznym i prokariotycznym, gdyż katalizują one reakcje przebiegające zgodnie z tym samym schematem ogólnym (Schemat 1). Stąd też dla przebiegu reakcji katalizowanych przez każdą z tych polimeraz, niezbędna jest obecność czterech rybonukleozydo-5'-trójfosforanów, DNA i kationów dwuwartościowych, Mg^{2+} lub Mn^{2+} . Szczegółowy opis warunków optymalnych dla aktywności każdej z nich różni się jednak znacznie. Są to bowiem różne białka, o różnych właściwościach fizyko-chemicznych i różnych, choć pokrewnych funkcjach biologicznych.



Schemat 1. Sumaryczny wzór reakcji katalizowanej przez polimerazy RNA

Przedmiotem niniejszego opracowania będzie próba usystematyzowania gromadzących się wciąż danych o występowaniu, charakterystyce i udziale polimeraz w syntezie różnych frakcji komórkowego RNA w organizmach eukariotycznych, ze szczególnym uwzględnieniem roślin wyższych. Choć ukazało się ostatnio wiele prac przeglądowych dotyczących polimeraz eukariontów (3, 4, 5, 6), w żadnej z nich nie poświęcono specjalnej uwagi polimerazom roślinnym.

II. Różnorodność polimeraz i ich klasyfikacja

Trzy zasadnicze klasy polimeraz RNA zidentyfikowano w jądrze komórkowym organizmów eukariotycznych, których odrębność funkcjonalna wiąże się z syntezą trzech głównych klas komórkowego RNA: rRNA,

mRNA i tRNA. Polimerazy te różnią się między sobą własnościami chromatograficznymi, wrażliwością na pewne antybiotyki i inhibitory, miejscem występowania w komórce, zapotrzebowaniem na kationy dwuwartościowe, jak również wymaganiami matrycowymi. Dwie z nich występują w nukleoplazmie, a jedna w jąderku. Enzymy takich systemów transkrypcyjnych jak chloroplast czy mitochondrion, chociaż na ogół mają właściwości zbliżone do enzymów jądrowych, ze względu na wrażliwość na pewne antybiotyki, uważa się za enzymy bardziej spokrewnione z polimerazą prokariotów.

Nomenklatura polimeraz RNA eukariontów jest dotąd niejednolita. Różni autorzy stosowali bowiem różne kryteria w klasyfikacji tych enzymów. Ch a m b o n i wsp. (7, 8) zaproponowali terminologię opartą na wrażliwości enzymów w stosunku do α -amanityny, toksyny wyizolowanej z muchomorą sromotnikowego (*Amanita phalloides*) (9—11). W nomenklaturze tej, zwanej potocznie „europejską”, polimerazy eukariontów podzielono na trzy główne klasy:

- enzymy klasy A — niewrażliwe na działanie α -amanityny nawet w wysokich jej stężeniach
- enzymy klasy B — wrażliwe na działanie inhibitora zastosowanego nawet w bardzo niskich stężeniach (10^{-9} — 10^{-6} M).
- enzymy klasy C — wrażliwe na działanie α -amanityny przy wysokich jej stężeniach (10^{-5} — 10^{-4} M).

Enzymy poszczególnych klas rozdzielić można przy użyciu właściwych metod chromatograficznych na formy enzymu, różniące się między sobą jedną z podjednostek. Poszczególne formy enzymu danej klasy oznaczane są przez dodanie za literą klasy kolejnej liczby rzymskiej np. enzym klasy A wyizolowany z jąder wątroby szczura rozdzielono na dwa enzymy AI i AII (12, 13), podobnie enzymy klasy B grasicy cielęcej czy wątroby szczura rozdzielono na dwie formy, BI i BII (14, 15).

Nomenklatura zaproponowana przez R o e d e r a i R u t t e r a (16, 17) zwana potocznie „amerykańską” opiera się głównie na różnicach we właściwościach chromatograficznych enzymów. Stosując DEAE-celulozę lub DEAE-Sephadex, autorzy otrzymali trzy rozdzielone aktywności polimerazowe z ekstraktów jąder wątroby szczura. Enzym wymywający się z kolumny siarczanem amonowym o najniższym stężeniu (0,15 M) nazwano polimerazą RNA I, aktywność wymywaną przez roztwór soli o większym stężeniu (0,22 M) polimerazą II, a enzym wymywany z kolumny jako trzeci (przy 0,27 M stężeniu soli) polimerazą III. Formy enzymów uzyskiwane po dalszym rozdzieleniu każdej z tych trzech zasadniczych klas (I, II i III) oznaczono przez dodanie za numeracją klasy kolejnej dużej litery alfabetu np. I_A, I_B czy II_A, II_B (18, 19).

Klasyfikacja oparta tylko na właściwościach chromatograficznych enzymów może, być myląca, ponieważ pozycja danej aktywności enzymatycznej w profilu elucji może być odmienna dla różnych tkanek. Również sy-

Tabela 1.

Nomenklatura i podstawowe właściwości jądrowych polimeraz RNA

Terminologia „amerykańska” (wg Roedera)		Terminologia „europejska” (wg Chambona)		Wrażliwość na α -amanitynę	Występowanie w komórce	Produkt reakcji
Klasa enzymu	Forma enzymu	Klasa enzymu	Forma enzymu			
I	I _A (12, 19)* I _B (12, 19)	A	AI(a+b) (13, 70) AII (13)	niewrażliwe	jądrekowej	rRNA
	II _C (18, 19) II _A (18, 19) II _B (18, 19)	B	Bo (8, 70, 74) BI (8, 15, 70) BII(a+b) (8, 15, 70)	wrażliwe na wysokie stężenia, 10 ⁻⁹ —10 ⁻¹⁰ M	nukleoplazma	HnRNA
III	III _A (81) III _B (81)	C	CI (169) CII (169) CIII _a (169) CIII _b (169)	wrażliwe na wysokie stężenia, 10 ⁻⁵ —10 ⁻⁴ M	nukleoplazma, cytoplazma	tRNA i 5S RNA

* — liczby w nawiasach odnoszą się do piśmiennictwa.

stem klasyfikacji oparty li tylko na wrażliwości enzymu w stosunku do α -amanityny może być zawodny. Dla przykładu — aktywność drożdżowej polimerazy RNA II jest hamowana tylko przy zastosowaniu wysokich stężeń inhibitora (20, 21), podczas gdy polimeraza III nie jest wrażliwa na działanie α -amanityny nawet przy jej stężeniu sięgającym 1 mg/ml (22).

Autorzy obu klasyfikacji zdając sobie sprawę z niedoskonałości każdej z nich podkreślają, że oprócz proponowanego przez nich łatwego kryterium dla rozróżnienia enzymów, należy brać pod uwagę również inne różniące je właściwości funkcjonalne i strukturalne.

Obie nomenklatury powszechnie stosuje się w literaturze fachowej. Oprócz tych dwu sporadycznie spotkać można jeszcze inne terminologie wprowadzane przez niektórych autorów, np. *Mondali* i wsp. (23) nazwali polimerazą CI i CII enzymy o aktywności polimerazowej, otrzymane z ekstraktów orzecha kokosowego.

W pracy niniejszej stosować będziemy nomenklaturę *Roedera* (22), którą zaproponował on ostatnio wprowadzając dodatkowe kryteria w klasyfikacji polimeraz (Tabela 1). Uwzględniając obok właściwości chromatograficznych wrażliwość na α -amanitynę, występowanie wewnątrz komórki i inne właściwości, zaszeregował on wszystkie jądrowe polimerazy RNA do trzech klas: I, II i III, odpowiadających w zasadzie klasom A, B i C systematyki *Chambona* (europejskiej). Tak więc cechami charakterystycznymi enzymów klasy I jest:

- łatwość ich elucji z kolumny chromatograficznej, brak wrażliwości na α -amanitynę i występowanie w jąderku.

Klasę II wyróżnia:

- dalsza pozycja w chromatograficznym profilu elucji, duża wrażliwość na α -amanitynę i występowanie w nukleoplazmie.

Klasę III charakteryzuje:

- opóźniony wypływ z kolumny chromatograficznej, pośrednia wrażliwość na α -amanitynę i występowanie w nukleoplazmie.

Enzymy organellowe (poza jądrowe) klasyfikowane są oddzielnie jako polimerazy chloroplastowe czy mitochondrialne.

III. Charakterystyka eukariotycznych polimeraz RNA

Z wielu organizmów eukariotycznych, niższych i wyższych, wyizolowano, oczyszczono i scharakteryzowano polimerazy RNA zależne od DNA (3, 4, 24). Najlepiej poznane zostały polimerazy zwierzęce dzięki intensywnym badaniom zespołów *Chambona* (25—29), *Roedera* i *Rutera* (16, 22, 30, 31), oraz *Chestertona* i *Butterwortha* (12, 18, 32, 33). Znaczny postęp osiągnięto w badaniu struktury i funkcji polimeraz RNA drożdży (20, 34—37). Roślinne polimerazy jako najbardziej

labilne z polimeraz eukariotycznych, należą do tych, które jako ostatnie otrzymano w stanie homogenym (38—40).

III-1. Polimeraza RNA I

Polimeraza I reprezentuje jedną z trzech głównych klas polimeraz RNA znalezionych w jądrze komórkowym eukariontów (16, 41). Jej jąderkowe występowanie sugeruje udział w transkrypcji rybosomalnego RNA. Suggestia ta znajduje ostatnio coraz to pełniejsze potwierdzenie doświadczalne (42—45). Mimo zdecydowanej przewagi ilościowej rRNA w puli komórkowego RNA, aktywność polimerazy I w większości badanych tkanek (tak roślinnych jak i zwierzęcych) jest stosunkowo niewielka. W zarodkach pszenicy stanowi ona mniej niż 10% ogólnej aktywności polimerazowej (38), a niekiedy w ogóle nie można jej wykryć (46).

Enzym ten jest bardzo silnie związany w kompleksie nukleoproteidowym w jąderku komórki i uwolnienie go wymaga zastosowania dość drastycznych metod ekstrakcji, takich jak użycie roztworów o wysokiej sile jonowej (ok. 0,5 M siarczan amonowy), oraz sonifikacji. Tym nie mniej jąderkowy enzym oczyszczono wydajnie z wielu tkanek zwierzęcych (grasica cielęca (47), nowotworowe komórki myszy (48), wątroba szczura (49)) oraz z komórek wielu niższych organizmów eukariotycznych: drożdży (20, 34, 50), pleśni (51) i innych grzybów (52).

Izolacja i oczyszczanie enzymu z roślin wyższych napotykały na znaczne trudności w związku z niestabilnością enzymu, zwłaszcza po uwolnieniu go z kompleksu nukleoproteidowego, oraz ze względu na stosunkowo niskie jego aktywności (53—55). Dopiero w roku 1976 K e y i wsp. (40) oczyścili i scharakteryzowali polimerazę I z chromatyny hypokotyli soi traktowaną auksyną.

Niezależnie od pochodzenia i stopnia oczyszczenia, polimeraza I jest enzymem nietrwałym w 0°, można ją jednak przechowywać przez długi okres czasu (kilka miesięcy) w 50% glicerolu w — 180°C bez utraty aktywności. Związki sulfhydrylowe stabilizują te enzymy (56). Podobnie jak w przypadku innych polimeraz RNA, substratami polimerazy I są rybonukleozydo-5'-trójfosforany. Wartości K_s dla UTP i CTP wynoszą w przybliżeniu 0,02 mM, a dla ATP i GTP — 0,04 i 0,03 mM (4).

Zapoczątkowanie i przebieg reakcji bezwzględnie wymaga obecności w mieszaninie inkubacyjnej matrycy DNA. Oprócz DNA dobrymi matrycami są również syntetyczne dezoksypolinukleotydy pirymidynowe, poli(dT) i poli(dC) (40, 42, 49, 57). Nieuszkodzony, dwuniciowy DNA, pochodzenia zwierzęcego czy też wirusowego, nie jest dobrą matrycą dla polimeraz zwierzęcych. Przekonywujące dowody na to uzyskano stosując matryce o dobrze zdefiniowanej strukturze (DNA bakteriofagów lub wirusów). Natywna, dwuniciowa struktura DNA faga T₄ lub faga λ uniemożliwia inicjację polimerazie RNA grascy cielęcej, chociaż enzym wiąże się

z tym DNA. Zdenaturowany fagowy DNA jest natomiast transkrybowany. Również w znikomym stopniu, podobnie jak DNA fagowe, oczyszczone polimerazy zwierzęce transkrybują linearny, dwuniciowy DNA adenowirusa 2 (58). Wydaje się, że zablokowanie transkrypcji następuje w miejscu inicjacji, gdyż zdenaturowany DNA adenowirusa, lub też traktowany deoksyrybonukleazą trzustkową, ulega wydajnej transkrypcji (59). Ciekawą jest obserwacja, że superhelikalny DNA wirusa SV 40 (Forma I) o cyrkularnej dwuniciowej strukturze jest dobrą matrycą dla polimeraz grasicowych, natomiast otwarta, cyrkularna forma dwuniciowa (Forma II), oraz linearna forma dwuniciowa (Forma III) nie są dobrymi matrycami.

Obserwacje te sugerować by mogły, że enzymy zwierzęce mogą inicjować reakcję na natywnym, dwuniciowym DNA. Należy jednak podkreślić, że superhelikalna forma DNA wirusa SV 40 nie jest idealnie dwuniciowa i zawiera jako wynik konformacyjnych uwarunkowań nieliczne regiony niesparowanych ze sobą zasad (60—62). Wydaje się więc, że nieodzownym warunkiem zapoczątkowania syntezy RNA jest rozdzielenie na krótkim odcinku dwu nici DNA, celem odsłonięcia miejsca inicjującego. Na takim superhelikalnym DNA polimeraza I może znaleźć miejsce inicjacji i syntetyzować RNA, który ma długość łańcucha dwukrotnie większą niż stosowany DNA (26, 63). Większość RNA powstałego w ciągu 30 min. na tej matrycy jest znacznie większa niż 28S rRNA.

Handlowy, natywny DNA jest dla enzymów pochodzenia zwierzęcego z reguły lepszą matrycą niż DNA zdenaturowany. Pamiętać należy jednak, że taki natywny DNA izolowany np. metodą *Marmura* (64) nie jest pozbawiony jednoniciowych fragmentów i regionów zdenaturowanych. Słabe odczytywanie zdenaturowanego DNA przez polimerazę I zapewne nie jest wynikiem braku inicjacji syntezy na tej matrycy, lecz efektem syntezy bardzo krótkich łańcuchów (4).

Polimeraza I z *soi* (40) czy z pleśni (65) transkrybuje równie dobrze natywny jak i zdenaturowany DNA, a z zarodków pszenicy (38) wykorzystuje dwukrotnie lepiej zdenaturowany DNA niż natywny.

Polimerazy jąderkowe wykazują optimum aktywności przy niskiej sile jonowej (poniżej 40 mM stężenie siarczanu amonowego). Stymulowane są przez jony Mn^{2+} jak i Mg^{2+} . Wymagane stężenie tych kationów zależy znacznie od natury stosowanej matrycy jak i od jej koncentracji w środowisku inkubowanym (56). W przypadku polimerazy I z *soi* maksymalną jej aktywność obserwowano stosując 1—2 mM Mn^{2+} , lub 5—10 mM Mg^{2+} . Te same optima obserwować można w przypadku jonów obu tych metali z natywnym i zdenaturowanym DNA jako matrycą. Jeżeli jednak jako matrycę stosowano poli (dC), jony Mn^{2+} dawały dwukrotnie wyższą aktywność enzymu niż jony Mg^{2+} w optymalnych koncentracjach każdego z nich. Zmieniały się wówczas także wymagania w stosunku do siły jonowej i następowało raptowne obniżenie aktywności enzymu już po przekroczeniu 25 mM stężenia siarczanu amonowego w środowisku.

Enzym jest aktywny w zakresie wartości pH 7,0—8,5, z optimum w pobliżu pH 8,0.

Miarą aktywności polimerazy I, jak i innych polimeraz RNA, jest ilość prekursora wcielonego do produktu reakcji, wytrącanego 5% kwasem trójchlorooctowym lub w innych warunkach gwarantujących nierozpuszczalność RNA. Z uwagi na niską wydajność syntezy, stosuje się w badaniu aktywności polimeraz metody izotopowe. Pomiar radioaktywności produktu wytrąconego po zakończeniu inkubacji świadczy o aktywności enzymatycznej testowanego preparatu.

Polimerazy jąderkowe pochodzące z różnych źródeł, nawet po oczyszczeniu do stanu homogennego, charakteryzują się różnymi aktywnościami specyficznymi. Porównawcze dane w tym zakresie zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2.

Porównanie aktywności specyficznych oczyszczonej RNA polimerazy I z różnych źródeł

Źródło enzymu	Aktywność specyficzna (jednostek*/mg białka)	Warunki inkubacji	Autor
Drożdże	250	10 min., 30°C	(34, 50)
<i>Physarum polycephalum</i>	700	10 min., 25°C	(51)
<i>Mucor rouxii</i>	9	1 min., 30°C	(52)
Hypokotyl soi	200—300	30 min., 28°C	(40)
Grasica cielęca	200	10 min., 37°C	(70)
Nowotworowe komórki myszy, MOPC 315	490—500	20 min., 37°C	(48)

* — Jedna jednostka odpowiada takiej ilości enzymu, która katalizuje wcielenie 1 nmola UMP (przy zastośowaniu ³ [H]UTP jako prekursora), do frakcji kwasonierozpuszczalnej, w warunkach wyszczególnionych w rubryce 3.

α -amanityna nie hamuje aktywności polimeraz RNA należących do klasy I. Również rifampicyna, znany inhibitor polimeraz prokariotycznych, nie ma wpływu na aktywność tych enzymów. Niektóre półsyntetyczne pochodne rifamycyny, takie jak AF/05 i AF/013 hamują aktywność polimerazy I (jak i II), lecz dopiero w znacznie wyższych stężeniach, niż stężenia potrzebne do zahamowania aktywności enzymu bakteryjnego (66). Mimo, że związki te uważa się za niespecyficzne inhibitory zależnych od DNA polimeraz RNA (67), stosuje się je w badaniach transkrypcji *in vitro*. Wykazano, że AF/05 i AF/013 hamują selektywnie inicjację łańcucha poliribonukleotydowego na natywnym DNA (66, 68).

Przeprowadzono analizę strukturalną wielu enzymów zaliczanych do klasy I polimeraz RNA takich jak: grasicy cielęcej (69), wątroby szczura

(33), komórek nowotworowych szpiku kostnego myszy (48), hypokotyli soi (40). Analiza w gradiencie glicerolowym lub też sacharozowym wykazała, że enzymy te sedymentują nieco szybciej niż „rdzeń” polimerazy RNA *E. coli* (ciężar cząsteczkowy około 380—400 000). Obserwowana stała sedymentacji około 14—15S pozwala na wniosek, że ciężar cząsteczkowy polimerazy I wynosi około 500 000. Analiza elektroforetyczna w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących wykazała, że enzym ten składa się z dwu dużych podjednostek, o ciężarze cząsteczkowym powyżej 100 000 i szeregu mniejszych podjednostek, których liczba i wielkość jest zmienna. Stosunki molowe dwu większych podjednostek są we wszystkich przypadkach jednakowe (1 : 1), podczas gdy podjednostki mniejsze występują w różnych proporcjach w enzymach z różnych źródeł. Zależności te ilustruje tabela 3. Enzymy jąderkowe pochodzące z różnych źródeł mają nieco inny skład podjednostkowy, mimo to, przypisuje się im podobieństwo pod względem strukturalnym. Potwierdzeniem tego są wyniki testów immunologicznych. Przeciwciała wytworzone przy użyciu polimerazy I grasicy cielęcej inhibują częściowo oczyszczoną polimerazę I wątroby szczura (70). Nie obserwowano natomiast reakcji pomiędzy przeciwciałami dla czystej polimerazy I grasicy cielęcej i oczyszczonego enzymu klasy II z tego materiału. Przemawia to zdecydowanie za różnorodnością polimeraz RNA poszczególnych klas enzymów, a przeczy założeniu *Chestertona* i *Butterwortha* (12) o możliwości wzajemnej wymiany podjednostek pomiędzy enzymami należącymi do odrębnych klas.

Tabela 3.

Porównanie budowy molekularnej polimerazy RNA I z różnych źródeł

Źródło enzymu	Drożdże	<i>Physarum polycephalum</i>	<i>Mucor rouxii</i>	Hypokotyl soi	Grasica cielęca	Komórki nowotworowe MOPC 315
Ciężar cząsteczk.	530*	445	ok. 400	400—500	550	465
Skład podjednostkowy	190 (1,0)**	200 (1,0)	210 (1,0)	183	197 (1,0)	195 (1,0)
	135 (1,0)	135 (1,0)	125 (1,0)	136	126 (1,0)	117 (1,0)
	48	45 (1,0)	38 (0,5)	50	51 (1,0)	60 (1,0)
	41	24 (2,0)	25 (0,5)	46	44 (1,0)	50 (1,0)
	29	17 (1,0)	19 (1,0)	40	25 (2,0)	27 (1,0)
	16			33	16,5 (2,0)	16,5 (1,0)
Współczynnik sedymentacji (S)	18	13,1	14,6	13	14,5	13
Piśmiennictwo	(20, 34)	(51)	(52)	(40)	(5, 70)	(48)

* — ciężar cząsteczkowy $\times 10^{-3}$

** — w nawiasach podano znane proporcje molowe podjednostek

W niektórych tkankach znaleziono tylko jedną formę polimerazy I (17, 71), w innych natomiast dwie lub więcej form molekularnych (13, 72). Ze-stawienie zidentyfikowanych dotychczas form polimeraz RNA klasy I po-dane jest w tabeli 1. Znaczenie różnorodności form polimeraz RNA w ra-mach tej klasy nie zostało dotychczas wyjaśnione.

III-2. Polimeraza RNA II

Polimerazy RNA II występują w nukleoplazmie. Syntetyzują one frak-cje RNA o wysokim ciężarze cząsteczkowym i składzie nukleotydowym po-dobnym do składu komórkowego DNA, które stanowią przypuszczalnie prekursor mRNA (42, 43). Polimerazę II wyodrębniono z różnych źródeł, w tym z grasicy cielęcej (8, 73), wątroby szczura (73, 74), komórek nowo-tworowych myszy (19), komórek KB i HeLa (59), *Xenopus laevis* (31), za-rodków pszenicy (38), kallusa pietruszki (75) oraz drożdży (20, 76).

Enzym ten występuje w stosunkowo dużych ilościach w większości dotychczas badanych tkanek. Dla przykładu w zarodkach pszenicy stanowi 90% ogólnej aktywności polimeraz komórkowych (38). Stosunkowo łatwo przechodzi w formę rozpuszczalną przy łagodnych warunkach ekstrakcji. J e n d r i s a k i B u r g e s s (39) podali ostatnio metodę oczyszczania po-limerazy II z zarodków pszenicy na dużą skalę, uzyskując 25—30 mg ho-mogenego enzymu z 1 kg zarodków.

Enzymatyczne i fizyczne właściwości polimeraz tej klasy, izolowanych z różnych źródeł, są podobne. Enzym jest wrażliwy na działanie α -amanityny już przy niskich jej stężeniach (10^{-9} — 10^{-8} M), można go eluować z ko-lumny DEAE-celulozowej lub DEAE-Sephadex przy wyższej sile jonowej niż polimerazę I (około 0,2—0,27 M siarczanem amonowym), wykorzystuje zdenaturowany DNA lepiej niż natywny jako matrycę i jest bardziej aktywny w obecności Mn^{2+} niż Mg^{2+} . Wartości K_s dla UTP i CTP wynoszą około 0,02 mM, a dla ATP i GTP — 0,08 i 0,07 mM (4). Dla optymalnego działania polimerazy II potrzebują wyższej siły jonowej w środowisku in-kubacyjnym niż polimerazy I (0,1—0,125 M siarczan amonu). Preparaty pochodzące z różnych źródeł, o podobnym stopniu oczyszczenia i badane w optymalnych warunkach wykazują jednak różne aktywności specyficzne (Tabela 4).

Strukturę molekularną polimeraz tej klasy poznano stosunkowo dobrze, głównie dzięki badaniom oczyszczonych enzymów zwierzęcych wyizolo-wanych z grasicy cielęcej i wątroby szczura (8, 32, 69, 74). Stabilność po-limerazy II podczas procesu oczyszczania, oraz znaczna jej zawartość w tkankach, ułatwiły otrzymanie wystarczającej ilości homogenego en-zymu do badań, mających na celu wyjaśnienie jego struktury. Analiza sedymentacyjna preparatów tych dwu zwierzęcych polimeraz RNA II wy-kazała początkowo, że ciężar cząsteczkowy enzymu (zakładając globular-

ny kształt), wyliczony ze stałej sedymentacji 14,5—15,5S, wynosi co najmniej 400 000 (73). Dalsza charakterystyka sedymentacyjna i analiza densytometryczna pozwoliła na określenie ich ciężaru cząsteczkowego na 500—700 000 (69, 74). Analiza składu podjednostkowego polimerazy II z różnych źródeł wykazała, że enzym składa się z dwu dużych podjednostek (ciężar cząsteczkowy około 200 000 i 150 000), oraz szeregu podjednostek mniejszych, o ciężarze cząsteczkowym poniżej 50 000 (Tabela 5).

Tabela 4.

Porównanie aktywności specyficznych oczyszczonej RNA polimerazy II z różnych źródeł

Źródło enzymu	Aktywność specyficzna (jednostek* /mg białka)	Warunki inkubacji	Piśmiennictwo
Drożdże	1400	1 godz., 30°C	(20, 36)
Drożdże	6000	1 godz., 30°C	
<i>Euglena gracilis</i>	140	15 min., 30°C	(170)
Jądra komórek endospermy orzecha kokosowego	16	1 godz., 37°C	(23)
Liście kukurydzy	360	1 godz., 37°C	(128)
Zarodki pszenicy	2,5	15 min., 25°C	(39)
Zarodki żyta	3,83	30 min., 30°C	(55)
Grasica cielęca	300—500	10 min., 37°C	(14, 15)

* — definicja jednostki aktywności jak w Tabeli 2.

Podobnie jak w przypadku polimerazy I, w ramach klasy II wyróżnia się także kilka form polimeraz RNA (patrz Tabela 1 i 5). Ich odrębność molekularna i funkcjonalna jest jednak nadal kontrowersyjna. W szczególności nie ustalono dotychczas czy różne formy polimerazy II są produktami różnych genów czy też pojawiają się na skutek dalszych przekształceń preenzymu.

Niektórzy autorzy sugerują (73), że liczne formy tej polimerazy w tkankach zwierzęcych mogą powstawać podczas proteolizy. Cięższa podjednostka prekursora molekuly enzymu może być modyfikowana specyficznie, dając dużą podjednostkę innej formy, tak jak to obserwowano w przypadku podjednostki 190 000, przechodzącej w podjednostkę 170 000 w enzymie wątroby. Mimo, że hipotezę tę wielu autorów uznało za mało prawdopodobną (5, 15, 70), ostatnio podobny przykład opisała De z e l e e i wsp.

Tabela 5.

Porównanie budowy molekularnej polimerazy RNA II z różnych źródeł

Źródło enzymu	Drożdże		Zarodki pszenicy	Liście kukurydzy	Kallus pietruszki	Graslica cieleca		Wątroba szszura	
	II _A	II _B				II _A	II _B	II _A	II _B
Forma enzymu			II _A +II _B	II _A	II _A +II _B	II _A	II _B	II _A	II _B
Ciężar cząsteczkowy	465*	435	400—450	ok. 500	ok. 400	400—500		ok. 400	
Skład podjednostkowy	220 (1,0)**	180 (1,0)	220 (0,9)	200 (1,0)	200 (1,0)	214 (1,0)	180 (1,0)	190 (1,0)	170 (1,0)
	150 (1,0)	150 (1,0)	170 (0,1)	160 (1,0)	180	140 (1,0)	140 (1,0)	150 (1,0)	150 (1,0)
	45	45	140 (1,0)	35	140 (1,0)	34 (1—2)	34 (1—2)	35 (1,0)	35 (1,0)
	26	26	45 (0,2)	25	43	25 (2,0)	25 (2,0)	25 (1,0)	25 (1,0)
	22,5	22,5	40 (0,4)	20	26	16,5(3—4)	16,5(3—4)		
	14,5		17	25					
	12,5			16					
	9								
Współczynnik sedymentacji (S)		13—16		16			14,5—15,5		15
Piśmiennictwo		(20, 37)	(38, 39)	(128)	(75)	(15)			(73)

* — ciężar cząsteczkowy $\times 10^{-3}$

** — w nawiasach podano znane proporcje molowe podjednostek

z drożdży (37). Drożdże, podobnie jak wyższe organizmy eukariotyczne, zawierają polimerazy RNA wielu klas i form (21, 35, 76—79). Ostatnie badania D e z e l e e i wsp. (37) wskazują na to, że polimeraza II występuje w komórkach drożdży w dwu formach II_A i II_B. Forma II_A bardzo łatwo ulega proteolizie, jej oczyszczenie przeto wymagało zabezpieczenia przed działaniem enzymów proteolitycznych (enzym oczyszczano w obecności fenylo-metylo-sulfonylo-fluorku). Porównując ruchliwość elektroforetyczną obu form enzymu stwierdzono, że ciężary cząsteczkowe formy II_A i formy II_B niewiele się różnią i wynoszą odpowiednio 465 000 i 435 000. Analiza podjednostek, rozdzielonych elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS wykazała, że różnice ciężaru cząsteczkowego tych dwu form enzymu wynikają z różnego ciężaru cząsteczkowego ich cięższych podjednostek, który w przypadku formy II_A wynosi 220 000, a w przypadku formy II_B 180 000. Pozostałe podjednostki są takie same w cząsteczkach obu form enzymu (patrz Tabela 3). Stwierdzono także, że drożdżowa proteaza może *in vitro* przeprowadzać oczyszczoną formę polimerazy II_A w formę II_B. Niewykluczone przeto, że forma II_B jest jedynie artefaktem. Stąd też, dla uściślenia nomenklatury form polimeraz RNA wewnątrz klasy II niezbędne są dalsze badania.

III-3. Polimeraza RNA III

Enzymy należące do polimeraz RNA klasy III występują głównie w nukleoplazmie, jednak znajduje się je także w cytoplazmie (22). Uczestniczą one w transkrypcji genów tRNA i 5S RNA (43—45).

W odróżnieniu do polimerazy I i II, które zostały wykryte niemal we wszystkich typach komórek, polimerazę III stwierdzono tylko w niektórych komórkach. Należą do nich oocyty i somatyczne komórki żaby (31), komórki zarodków jeżowca morskiego (16), nowotworowe komórki myszy (22), pleśnie (80), oraz komórki zarodków żyta (55). Nie znaleziono polimerazy III w komórkach grasicy cielęcej, która, jak wiadomo, jest jednym z najbogatszych źródeł dwu pierwszych polimeraz. Możliwe, że enzym ten jest niestabilny w pewnych typach komórek (tkanek), lub też stosowane metody nie były wystarczająco subtelne.

Polimerazę III można całkowicie oddzielić od polimerazy I przez chromatografię na DEAE-Sephadex, a od polimerazy II na CM-Sephadex. Z fosfocelulozy wypływa w eluacie przed polimerazą I, lecz z DEAE-celulozy obie polimerazy III i I wymywają się łącznie. Dlatego też aktywność polimerazy III może czasami ulec zamaskowaniu przez wyższą aktywność polimerazy I.

Trudność otrzymania tego enzymu w dostatecznej ilości stwarzała przeszkody w analizowaniu jego struktury i funkcji. Ostatnio S c h w a r t z i wsp. (81), wybrali do izolacji większej ilości enzymu nowotworowe komórki szpiku kostnego myszy (MOPC 315). Komórki te dzielą się z dużą

częstotliwością, można się więc było spodziewać w nich wysokiego poziomu enzymów. Co więcej, komórki można otrzymać jako homogenną populację, co eliminuje możliwą zmienność polimeraz RNA, zależną od różnych typów komórek. W komórkach stwierdzono dwie formy enzymu zaliczane do klasy III polimeraz, III_A i III_B. Oba enzymy właściwościami przypominają polimerazy klasy III z innych źródeł. Są niewrażliwe na niskie stężenia α -amanityny (0,5 $\mu\text{g/ml}$), lecz hamowane kompletnie przy jej wysokich stężeniach (400 $\mu\text{g/ml}$).

Badanie wpływu siły jonowej na aktywność obu polimeraz III wykazało, że w zależności od stosowanej matrycy, otrzymuje się odmienne profile aktywacji enzymów. I tak w przypadku stosowania jako matrycy DNA grasicy cielęcej, profil aktywacji obu polimeraz miał charakter dwufazowy, z optimum przy 0,055 M i 0,17 M stężeniu siarczanu amonowego. Gdy jako matrycę stosowano poli d(A—T), profile były monofazowe z optimum przy 0,055 M stężeniu soli. Należy tu wspomnieć, że profile aktywacji polimerazy I i II zarówno w obecności DNA grasicy jak i poli d(A—T) były monofazowe, z optimum odpowiednio przy 0,05 M i 0,09 M.

Optymalne stężenie Mn^{2+} jest 2 mM. Z jonami Mg^{2+} aktywność polimerazy III jest w przybliżeniu dwukrotnie niższa.

Polimeraza III_A występuje głównie we frakcji nukleoplazmatycznej, natomiast polimeraza III_B we frakcji cytoplazmatycznej. Znalezione ją również w surowych frakcjach jądrowych, lecz nie wykryto w oczyszczonych jądrach. Jest możliwe, że enzym ten może być gubiony podczas oczyszczania jąder, jak i to, że jest on cytoplazmatycznego pochodzenia. S e f a r t i wsp. (82, 83), opisali cytoplazmatyczną polimerazę komórek wątroby szczura, która przypomina swymi właściwościami chromatograficznymi i małą wrażliwością w stosunku do α -amanityny polimerazę III *Xenopus laevis* i komórek szpiczaka. Nadal więc pozostaje sprawa otwarta, czy polimeraza III_B jest enzymem jądrowym, jak i to, czy jej działanie jest takie samo jak polimerazy III_A.

Badania strukturalne oczyszczonych polimeraz klasy III z komórek nowotworowych myszy (MOPC 315) i *Xenopus laevis* wykazały (22), że enzym ten jest znacznie większy (620—670 000) od polimerazy II (500 000) i od polimerazy I (470 000) z tego samego źródła. Analiza elektroforetyczna wykazała, że polimeraza III podobnie jak polimerazy I i II, składa się z dwu dużych podjednostek występujących w proporcji 1 : 1, oraz z kilku mniejszych podjednostek o zmiennych proporcjach molowych (0,6—1,5) (Tabela 6). Ciężary cząsteczkowe poszczególnych podjednostek polimeraz RNA tych trzech klas różnią się znacznie (porównaj Tabele 2, 5 i 6). Natomiast nie ma różnic w składzie podjednostek polimeraz RNA klasy III z dwu różnych źródeł (pomiędzy polimerazą *Xenopus laevis* i komórek szpiczaka), jak i pomiędzy dwiema formami enzymu III_A i III_B z tego samego źródła (22).

Tabela 6.

Skład podjednostkowy polimeraz RNA III *Xenopus laevis* i komórek nowotworowych myszy, MOPC 315 (22)

Oznaczenie podjednostek	Ciężar cząsteczkowy $\times 10^{-3}$	
	<i>Xenopus laevis</i>	MOPC 315
III _a	155	155
III _b	137	138
III _c	92	89
III _d	68	70
III _e	52	52
III _f	42	43 (f_1), 41 (f_2)
III _g	33	34
III _h	29	29
III _i	19	19

Podobieństwo strukturalne polimeraz klasy III płazów i komórek nowotworowych myszy sugeruje, że enzymy wszystkich eukariontów mogą być podobne, tak jak to stwierdzono w przypadkach enzymów klasy I i enzymów klasy II. Nie można natomiast wyprowadzić uogólnienia co do funkcji obu polimeraz RNA III w transkrypcji genomu eukariotycznego i przypisywać specyficzną rolę katalizowania syntezy tRNA przez jedną z nich a 5S RNA przez drugą.

III-4. Polimerazy mitochondrialne

Od wielu lat znany jest fakt, że w izolowanych mitochondriach zachodzi synteza RNA zależna od DNA (84—88). Jednakże ze względu na trudność uwolnienia polimerazy z kompleksu, w którym jest ona silnie związana (membrana—DNA—białko—RNA) (89), oraz niezwykłą jej labilność, dopiero niedawno udało się oczyścić i scharakteryzować polimerazę mitochondriów *Neurospora crassa* (90), *Xenopus laevis* (91) i wątroby szczura (92, 93).

W mitochondriach *Neurospora crassa* oraz wątroby szczura występuje tylko jedna polimeraza RNA, podczas gdy w mitochondriach drożdży występują dwie polimerazy (94). Ostatnio Eccleshall i Criddle (95) opisali trzy formy polimeraz RNA izolowanych z mitochondriów drożdży (MI, MII i MIII).

Wszystkie, dotąd wyizolowane, mitochondrialne polimerazy RNA są typowymi zależnymi od DNA polimerazami RNA. Wymagają one matrycy DNA, wszystkich czterech nukleozydotrójfosforanów i jonów dwuwartościowych. Z wyjątkiem enzymu *Neurospora crassa*, wszystkie preferują denaturowane DNA od natywnego. Mitochondrialne DNA (szczególnie DNA forma I, t.j. superhelikalna, zamknięta, cyrkularna forma DNA), jest transkrybowana równie dobrze jak jednoniciowe DNA z grasicy cięłej (90).

Dobłą matrycą jest również poli d(A—T). Większość dotychczasowych danych wskazuje na to, że mitochondrialne polimerazy preferują swe homologiczne matryce. Należy wziąć jednak pod uwagę, że w większości przypadków zastosowany jako matryca DNA mitochondrialny nie został wcześniej należycie scharakteryzowany. Nie analizowano również produktu reakcji. Nie jest więc pewne, czy preferencyjna transkrypcja mitochondrialnego DNA wynika ze specyficznego rozpoznawania sekwencji rzeczywistego promotora przez mitochondrialne enzymy, czy też zależy od strukturalnych cech mitochondrialnych matryc. Jeśli bowiem mitochondrialne DNA zawiera regiony bogate w AT, to na tych odcinkach inicjacja syntezy RNA mogłaby być ułatwiona (96, 97). Selektywność transkrypcji na jednej ciężkiej nici natywnego, mitochondrialnego DNA *Xenopus laevis* nasuwa również wątpliwości, ponieważ *in vivo* transkrypcja mitochondrialnego DNA jest symetryczna, jak sądzi B o r s t (97).

Prawie wszystkie mitochondrialne polimerazy wykazują znaczną preferencję do Mg^{2+} , wyróżniając się tą cechą od jądrowych polimeraz, które na ogół Mn^{2+} w optymalnych stężeniach aktywuje silniej. Różnią się także pod względem wymagań co do siły jonowej. Niskie stężenia soli nie aktywują enzymu, a wyższe powodują silną inhibicję.

Mitochondrialne polimerazy nie są wrażliwe na działanie inhibitora polimeraz nukleoplazmy, α -amanityny (wyjątek stanowi jeden z trzech enzymów mitochondriów drożdży, MII). Sprzeczne są natomiast dane co do inhibicji enzymów mitochondrialnych przez rifampicynę (97, 98), specyficzny inhibitor polimerazy bakteryjnej. Należy podkreślić, że we wszystkich przypadkach, w których obserwowano wrażliwość enzymu na rifampicynę, należało zastosować znacznie wyższe stężenia inhibitora aby zahamować aktywność enzymu mitochondrialnego niż badając enzym bakteryjny. Nawet przy zastosowaniu bardzo wysokich stężeń rifampicyny, nie stwierdzono całkowitej inhibicji aktywności polimeraz (i tu wyjątek stanowi enzym z *Neurospora crassa*). Fakt, że jedna grupa badaczy znajduje w mitochondriach enzym wrażliwy na rifampicynę, a druga niewrażliwy, sugeruje, że albo mitochondria zawierają dwie zależne od DNA polimerazy RNA, wrażliwą i oporną na działanie antybiotyku, lub też, że wrażliwość w stosunku do rifampicyny może zależeć od konformacji enzymu, którą uzyskuje się przy zastosowaniu pewnych technik izolacji i oczyszczania (98).

Inne antybiotyki, które hamują aktywność polimerazy bakteryjnej nie mają wpływu na aktywność mitochondrialnych enzymów bez względu na to, z jakiego źródła enzymy te pochodzą (94, 97).

Inhibicja mitochondrialnych polimeraz *Xenopus laevis* (91), oraz drożdży (95), przez pochodną rifamycyny, AF/013, jest prawdopodobnie niespecyficzna, tak jak to stwierdzono w przypadku hamowania aktywności jądrowych enzymów drożdży (36).

Mitochondrialne polimerazy RNA (*Neurospora crassa*, *Xenopus laevis*),

agregują w niskiej sile jonowej podczas gdy w wysokiej tworzą formy monomeryczne sedymentując w gradiencie glicerolowym przy stałej sedymentacji 6,2—6,3S. Przy tej wartości S — oznaczony w przybliżeniu ciężar cząsteczkowy enzymu wynosi 74 000 wg K ü n t z e l (90) i 100—150 000 wg W u (91).

Rozdział czystego enzymu *Neurospora crassa* w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS wykazał, że enzym ten składa się tylko z jednego peptydu o ciężarze cząsteczkowym 64 000 (90). Podobny rozdział oczyszczonej polimerazy *Xenopus laevis* pozwolił na określenie ciężaru cząsteczkowego enzymu na 46 000. Ciężar cząsteczkowy mitochondrialnej polimerazy wątroby szczura wyliczono jako 64—68 000 (93).

Na podstawie powyższych danych możnaby wywnioskować, że mitochondrialne enzymy mają podobną budowę molekularną. Tymczasem dane na temat struktury mitochondrialnych polimeraz są sprzeczne. Dotyczy to głównie mitochondrialnych polimeraz drożdżowych, jedni autorzy bowiem podają ciężar cząsteczkowy dla tego enzymu 60—100 000 (96), podczas gdy inni znajdują w mitochondriach enzym podobny do polimeraz jądrowych (95). Ciężar cząsteczkowy tego enzymu wyliczają na 500 000, i znajdują w jego składzie, podobnie jak w polimerazach jądrowych, dwie podjednostki duże (190 i 150 000), oraz szereg podjednostek mniejszych.

Pozostaje więc nadal sprawa otwarta, czy podawane przez niektórych badaczy ciężary cząsteczkowe mitochondrialnych polimeraz odnoszą się tylko do większych podjednostek złożonej cząsteczki enzymu, czy też mitochondrialna polimeraza drożdżowa o wysokim ciężarze cząsteczkowym, jest po prostu jądrowym zanieczyszczeniem.

Mitochondrialna polimeraza RNA powstaje w cytoplazmie a nie w mitochondriach (94, 99, 100). Wskazuje na to fakt, że mitochondria mutantu drożdżowego „*petite*”, nie mające układu syntetyzującego białko, mają aktywną polimerazę mitochondrialną. Wyniki powyższe wskazują, że mitochondrialna polimeraza jest kodowana przez geny jądrowe.

III-5. Polimerazy chloroplastowe

Synteze RNA w chloroplastach obserwowano od dawna (101—104). Badania G i b b s dostarczyły danych, że większość chloroplastowego RNA syntetyzowana jest wewnątrz tej organelli na matrycy DNA chloroplastów (105, 106). Wykazano ponadto (107), że chloroplasty syntetyzują rRNA i tRNA. Eksperymenty z hybrydyzacją potwierdziły dalej, że DNA chloroplastów może kodować 23S i 16S rRNA (108, 109), jak również niektóre tRNA (110, 111). Nie ma natomiast doświadczalnych dowodów na to, że niesie on informację dla jakiegokolwiek mRNA czy specyficznego białka.

Białko zależnej od DNA polimerazy RNA chloroplastów jest bardzo silnie związane z DNA w lamelarnych membranach chloroplastów (112—114).

Początkowo aktywność tego enzymu oznaczano w agregatach, bez uwolnienia enzymu z kompleksu nukleoproteidowego. Dopiero w latach siedemdziesiątych wprowadzono metody uwalniania enzymu ze struktur komórkowych, przeprowadzania go w formę rozpuszczalną i częściowego oczyszczenia (115—117).

Polimeraza chloroplastów generalnie przypomina właściwościami enzymy mitochondrialne. Wymaga matrycy DNA, wszystkich czterech rybonukleozydotrójfosforanów i jonów dwuwartościowych. Odróżniające ją od pozostałych polimeraz właściwości dotyczą głównie znacznej preferencji wobec chloroplastowego DNA, lepszej aktywacji przez Mg^{2+} niż przez Mn^{2+} (112, 115), większej wrażliwości enzymu na działanie ultradźwięków, oraz nieco innej wrażliwości na jony metali (118). Według niektórych autorów, cechą najbardziej wyróżniającą polimerazy chloroplastowe od innych polimeraz, jest ich wrażliwość na działanie rifampicyny (114, 119). Sprawa tej wrażliwości jest jednak kontrowersyjna, gdyż nie wszystkie dotąd opisane polimerazy chloroplastów wykazują wrażliwość na ten antybiotyk (115, 116, 120, 121). Nie jest wiadomo, w jakim zakresie zróżnicowana inhibicja jest wynikiem różnic w strukturze enzymów, czystości preparatów stosowanych do badań, czy też nawet jakości stosowanej matrycy. Podobnie jak w przypadku enzymu mitochondrialnego, jeśli następowała inhibicja w obecności rifampicyny, należało zastosować znacznie większe stężenia inhibitora niż do zahamowania polimerazy bakteryjnej.

Chloroplastowy enzym różni się od innych znanych polimeraz RNA zadziwiająco wysokim optimum temperatury (45—50°C). W przeciwieństwie do enzymów jądrowych, nie jest on aktywniejszy przy zwiększeniu siły jonowej, a wyższe stężenia soli (0,1 M KCl lub 0,03 M $(NH_4)_2SO_4$), mocno hamują jego aktywność.

Polimeraza chloroplastów wykazuje wyższą aktywność na zdenaturowanej matrycy DNA niż na natywnej, jednakże preferencja wobec jednociowej matrycy zmienia się wobec DNA z różnych źródeł, w zależności od stopnia oczyszczenia enzymu.

Ciężar cząsteczkowy oczyszczonego preparatu z chloroplastów kukurydzy, oznaczony na podstawie stałej sedimentacji w gradiencie glicerolowym (18S), wyliczono na 400—500 000.

IV. Rola polimeraz RNA w regulacji transkrypcji

IV-1. Mechanizmy regulacji transkrypcji u eukariontów

Jednym z ważniejszych problemów współczesnej biologii jest regulacja syntezy RNA. U eukariontów regulacja ta wymaga selektywnej transkrypcji różnych części genomu, w odpowiedzi na bodźce działające w różnym

czasie (indukcja i represja), jak i bodźce działające stale (różnicowanie). Przyjmuje się, że regulacja może przebiegać dwiema różnymi drogami. Mianowicie, albo czynniki regulacyjne mogą działać na matrycę, określając, która część genomu będzie dostępna transkrypcji przez niespecyficzną polimerazę RNA, albo faktory regulatorowe działając na polimerazę RNA mogą wyznaczać, które partie genomu będzie ona transkrybować.

W pierwszym przypadku selektywna transkrypcja genów jest wynikiem specyficzności samej matrycy, a aktywność poszczególnych genów jest regulowana przez makromolekuły towarzyszące DNA w chromatynowym kompleksie. W takim przypadku, specyficzność polimerazy RNA ogranicza się tylko do rozpoznania nukleotydowych substratów i miejsca inicjacji na matrycy DNA. Najbardziej przekonującym dowodem, przemawiającym za tym typem regulacji, jest wykazanie wyraźnej specyficzności transkrypcyjnej chromatyny, przy zastosowaniu polimerazy bakteryjnej jako enzymu transkrybującego (122).

Przy rozpatrywaniu alternatywnej możliwości, szereg różnych miejsc na chromosomie jest wymaganych dla zapoczątkowania transkrypcji. Miejsca te mogą być rozróżniane przez poszczególne polimerazy RNA z różną specyficznością w stosunku do miejsc zapoczątkowujących transkrypcję, lub przez jedną polimerazę, z licznymi podjednostkami regulatorowymi, określającymi specyficzność odczytywania matrycy. Ten drugi mechanizm mógłby tłumaczyć regulację transkrypcji cistronów pewnych klas. Posłużymy się przykładem. Chromosomy prokariotów nie mają skomplikowanej chromosomalnej matrycy, lecz mimo to cechuje je swoistość transkrypcji (faktory współdziałające z „rdzeniem” enzymu nadają mu specyficzność). Co więcej, obecność licznych form polimeraz RNA eukariotów, z różnym miejscem występowania, oraz specyficzna ich rola fizjologiczna sugerują, że ekspresja genu w tych organizmach może podlegać przynajmniej częściowo regulacji poprzez różne enzymy, które wybiórczo mogą transkrybować różne geny czy zespoły genów. Nie ma wprawdzie dowodów na to, że genomy organizmów eukariotycznych zawierają miejsca regulatorowe (podobne do prokariotycznego promotora), które to miejsca różne polimerazy mogłyby specyficznie rozpoznać po sekwencji charakterystycznej dla danego zespołu genów (123, 124). Jednakże podobieństwo strukturalne wszystkich polimeraz RNA, zarówno prokariotów jak i eukariotów sugeruje, że i pewne mechanizmy regulatorowe mogą być podobne. Wobec tego można przypuszczać, że różne enzymy eukariotyczne mogłyby także odgrywać pozytywną rolę w regulacji ekspresji informacji genetycznej. Stąd też, obserwacje dotyczące się zachowania polimeraz RNA w warunkach prowadzących do zmian intensywności i wybiórczości transkrypcji genomu komórki mogą mieć istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmu regulacji syntezy RNA. Obserwacje te zostaną omówione poniżej na przykładzie roślinnych polimeraz RNA.

IV-2. Udział roślinnych polimeraz w regulacji syntezy RNA

Podstawowe działanie polimeraz RNA w komórce roślinnej jest takie samo jak w przypadku innych eukariontów. Jednakże z uwagi na specyfikę metabolizmu ustroju roślinnego, uwarunkowaną jego autotrofizmem, a także unikalnymi dla świata roślin etapami rozwojowymi (stan spoczynku i kiełkowania nasion), roślinne polimerazy działają w szczególnych warunkach metabolicznych, nieznanymi z występowania u innych eukariontów. Warunki te znajdują swe odbicie w mechanizmach regulujących intensywność i specyficzność transkrypcji, a co za tym idzie i aktywności polimeraz w komórce roślinnej. Mimo intensywnych badań opublikowane dotychczas dane w tej dziedzinie są jednak skąpe i fragmentaryczne.

Postęp badań nad mechanizmem regulacji transkrypcji zależy w istotny sposób od poznania enzymów, które mogą mieć swój udział w tej regulacji. Dlatego też celowym wydaje się krótkie podsumowanie danych na temat roślinnych polimeraz RNA.

Znaczne trudności metodyczne w zakresie izolacji i oczyszczania powodują, że jak dotychczas opisano nieliczne przykłady dobrze zdefiniowanych polimeraz RNA pochodzenia roślinnego. Mimo, że już w roku 1960 wykryto w roślinach aktywność polimerazy RNA zależnej od DNA, przez następnych 14 lat nie uzyskano homogenego enzymu z żadnego materiału roślinnego. Większość badań dotyczyła występowania jednej lub dwu aktywności polimerazowej w surowych lub częściowo oczyszczonych homogenatach (23, 115, 116, 126, 127). Dopiero w roku 1973 uzyskano w stanie homogenym polimerazę RNA II z kukurydzy (128), a w rok później z zarodków pszenicy (38). Ostatnio w pracowni K e y' a otrzymano homogeny preparat polimerazy RNA I z hypokotyli soi (40). Jedno z doniesień mówi o występowaniu polimerazy III w zarodkach żyta (55). Ogłoszone dotychczas dane o izolacji i oczyszczaniu roślinnych polimeraz zestawiono w tabeli 7, str. 371.

Zmiany aktywności specyficznej polimeraz RNA mogą regulować szybkość syntezy RNA w komórce; na przykład poprzez przyłączenie specyficznego aktywatora czy inhibitora, przez zmiany poziomów polimeraz, a także bądź na drodze represji, bądź to derepresji odpowiednich odcinków genu szybkość syntezy RNA może ulegać zmianie. Determinanty warunkujące intensywność i specyficzność transkrypcji nie tkwią jednak jedynie wewnątrz struktury polimeraz RNA czy też samych genów. Prawdopodobnie potrzebne są także inne czynniki regulacyjne, które współdziałają z enzymem, matrycą, lub jednym i drugim. Znaczny postęp w zakresie poznania mechanizmów regulacji intensywności syntezy RNA w komórkach roślinnych osiągnięto dzięki badaniom kolejnych stadiów rozwojowych rośliny, jak również dzięki badaniom, w których jej intensywność zmieniano doświadczalnie, na przykład przez traktowanie fitohormonami.

Hormony roślinne, auksyny, gibereliny czy kininy, bezpośrednio, lub

w sposób pośredni sprawują rolę regulatorową w komórce poprzez wpływ na syntezę kwasów nukleinowych. Od dawna wiadomo, że zawartość kwasów nukleinowych w licznych tkankach roślinnych znacznie wzrasta w wyniku traktowania ich jednym ze znanych fitohormonów (129—138). Mechanizm stymulowanej hormonami syntezy jest przedmiotem intensywnych badań. W pracy przeglądowej, na temat wpływu hormonów roślinnych na metabolizm kwasów nukleinowych, K e y (139) podaje taką interpretację wszystkich zebranych wyników: w regulacji transkrypcji hormony wpływają na indukcję syntezy tylko pewnych rodzajów RNA, które mogą służyć jako matryce dla syntezy białek, niezbędnych dla fizjologicznej odpowiedzi organizmu (czy tkanki) na działanie hormonu. Dane doświadczalne przemawiające za takim przebiegiem regulacji przez hormon są pośrednie i fragmentaryczne. Wykrycie małej populacji molekuł RNA na tle całego komórkowego RNA jest niemal niemożliwe. Pośrednie dowody opierają się głównie na badaniu mechanizmu zwiększania przez hormon syntezy RNA w izolowanych jądrach czy chromatynie.

O' B r i e n i wsp. (140) wysuwają przypuszczenie, że auksyna 2,4-D, może być efektem lub koefektem, który reagując z chromatyną powoduje indukcję syntezy polimerazy RNA. Enzym w zwiększonej ilości, łącząc się z DNA chromatyny, transkrybuje dostępne uprzednio, lecz nie wykorzystane z braku enzymu, miejsca matrycowe na DNA. W obecności suboptymalnych stężeń auksyny, produkowana jest tylko niewielka ilość enzymu, co zezwala na nieznaczną tylko syntezę RNA i w konsekwencji małą produkcję białka. Przypuszczenie swoje oparł O' B r i e n także na znanym od dawna fakcie (141), że auksyna powoduje kilkukrotne zwiększenie akumulacji kwasów nukleinowych, gdy podawana jest siewkom *in vivo*.

Etiolowane siewki soi, traktowane auksyną 2,4-D, miały 5—8 krotnie wyższą aktywność polimerazy I niż siewki nie traktowane hormonem (142). Nie obserwowano natomiast wpływu hormonu na aktywność polimerazy II. Podwyższenie aktywności polimerazy I autorzy postrzegają jako wynik zmiany aktywności, a nie ilości enzymu (143). Przypuszcza się więc, że auksyna kontroluje aktywność samego enzymu (polimerazy I), a nie matrycy.

A r e n s i S t o u t (144) obserwowali zwiększenie przez auksynę 2,4-D aktywności polimerazy II izolowanej z siewek kukurydzy. Ponieważ w tym przypadku zwiększenie aktywności dotyczyło enzymu nie związanego z chromatyną, tylko z tak zwaną rozpuszczalną formą enzymu, ewidentny wydaje się wpływ hormonu na samą cząsteczkę enzymu.

H a r d i n i wsp. (145) z kolei, podają, że wzrost aktywności polimerazy II po traktowaniu chromatyny soi auksyną, jest spowodowany współdziałaniem enzymu z receptorem, uwalnianym przez hormon z błony plazmatycznej. Chemiczna natura tego receptora nie została dotychczas określona, a jego rola jest przedmiotem spekulacji.

Dalszych dowodów popierających pogląd, że auksyny oddziałują na aktywność polimeraz i na ich poziom w tkankach roślin, dostarczyły wyniki opublikowanych ostatnio prac grupy Key'a (40, 142). Po traktowaniu auksyną hypokotyli soi, autorzy zaobserwowali zwiększenie poziomu polimerazy jąderkowej jak i zwiększenie jej stabilności. Dzięki więc zastosowaniu auksyn, możliwym było otrzymanie dostatecznej ilości enzymu w materiale wyjściowym dla izolacji i oczyszczenia po raz pierwszy polimerazy RNA I z materiału roślinnego.

Inna auksyna, kwas indolilo-3-octowy, w dwojaki sposób wpływa na metabolizm RNA i białek w tkankach roślin wyższych (146). Przy krótkiej ekspozycji na działanie hormonu (2 godz.) auksyna ta powoduje przyspieszenie syntezy HnRNA i polisomalnego mRNA o krótkim okresie półtrwania. Przy dłuższym okresie działania hormonu, następuje znaczna stymulacja syntezy rRNA i specyficznych białek (147). Ten dwojaki wpływ hormonu na aktywność chromatyny izolowanej z tkanek traktowanych auksyną jest zapewne wynikiem oddziaływania na dwa różne mechanizmy. Podwyższenie syntezy HnRNA i mRNA może być spowodowane derepresją pewnych genów (148), podczas gdy stymulację syntezy rRNA w efekcie długiego działania hormonu można przynajmniej częściowo tłumaczyć przez stymulację jąderkowej polimerazy RNA. W stymulacji tego rodzaju, pośrednią rolę odgrywać mogą swoiste białka niehistonowe, uzyskane w częściowo oczyszczonej postaci przez Mondala i wsp. (23), które po połączeniu z IAA zwiększają aktywność polimerazy I.

Inny hormon roślinny, kwas giberelinowy, stymuluje syntezę kwasów nukleinowych w wielu tkankach i organellach roślin; w izolowanych jądrach z siewek grochu (149), izolowanej chromatynie (150), w warstwie aleuronowej jęczmienia (151), w protoplastach i siewkach kukurydzy (152, 153).

Wyniki dwu ostatnich prac wskazują na to, że GA_3 powoduje przede wszystkim przyspieszenie syntezy molekuł informacyjnego RNA, oraz wpływa również na proces poliadenylacji nowo utworzonych prekursorów mRNA. Dane te wskazują, że GA_3 działać może albo na polimerazę RNA II poprzez interakcję z jej cząsteczką, albo na chromatynową matrycę, udostępniając miejsca na matrycy DNA rozpoznawane specyficznie przez ten enzym. Już po ukończeniu procesu transkrypcji, GA_3 działa na enzym adenylujący (E.C. 2.7.7.19), indukując pojawianie się większej liczby molekuł mRNA zawierających poli(A). Nowo syntetyzowany mRNA pojawia się we frakcji polirybosomalnej, w następstwie czego wzrasta synteza białek. W przeciwieństwie do siewek, w izolowanych tarczках nasion kukurydzy (154) GA_3 stymuluje preferencyjnie syntezę rRNA i wzrasta proces metylacji RNA.

Kwas abscyzynowy (155), dodany do środowiska ekstrakcyjnego liści kukurydzy, powoduje obniżanie aktywności polimerazy RNA (formy rozpuszczalnej, a więc przypuszczalnie polimerazy II). Hormon ten oddziałuje

wuje prawdopodobnie na enzym w sposób pośredni przez współdziałanie z cząsteczką aktywatora, gdyż nie ma on wpływu na częściowo oczyszczony preparat tej polimerazy.

Przytoczone wyżej prace wskazują na plejotropowe działanie fitohormonów na syntezę i metabolizm kwasów nukleinowych roślin. Działanie to jest uzależnione także od szeregu czynników, których wpływu na gospodarkę hormonalną i uprzywilejowanie syntezy pewnych makromolekuł nie należy pomijać. Rodzaj tkanki, stadium rozwojowe, warunki wzrostu rośliny (temperatura, wilgotność, naświetlenie), jak i czas działania hormonu, mogą wpływać w istotny sposób na regulację syntezy RNA przez hormony.

Szczególne zainteresowanie budzi ostatnio udział polimeraz RNA w aktywacji procesów transkrypcji w zarodkach nasion poddanych kiełkowaniu. Po przerwaniu stanu spoczynkowego nasion, mamy bowiem do czynienia z naturalną synchronizacją procesów rozwojowych, co stwarza dogodne warunki dla obserwacji kolejności procesów molekularnych, leżących u ich podstaw. W procesach tych główną rolę odgrywa synteza RNA, która przynajmniej w przypadku ziarna pszenicy i pokrewnych gatunków zbóż, rozpoczyna się niemal natychmiast po umieszczeniu nasion w optymalnych warunkach kiełkowania (156—161). Nadal istnieje jednak kontrowersja co do produktów powstających we wczesnej fazie transkrypcji. Według jednych autorów (158, 159, 162), w najwcześniejszej fazie kiełkowania rozpoczyna się selektywna transkrypcja sekwencji rybosomalnych, według drugich — w pierwszej kolejności wznawia się transkrypcja unikalnych sekwencji DNA (157, 163, 164, 165, 166), a według trzecich — synteza pre-rRNA i pre-mRNA zaczyna się równocześnie (161) lub niemal równocześnie (160).

Powstałe rozbieżności wynikać mogą z trudności izolacji i identyfikacji powstających *in vivo* wczesnych produktów transkrypcji. Dlatego też, istotny wkład do wyjaśnienia tego spornego zagadnienia wnieść mogą badania aktywności polimeraz RNA w czasie indukcji procesu kiełkowania, z których polimeraza I, jak wiadomo, jest związana z transkrypcją sekwencji rybosomalnych, a polimeraza II-sekwencji unikalnych.

Pomiary aktywności ogólnej polimeraz RNA wykazały, że jest ona dość wysoka w wyciągach z suchych zarodków pszenicy i stopniowo wzrasta w czasie kiełkowania (127). Aktywność znajdująca w suchych zarodkach należy głównie (55, 167), lub wyłącznie (168) do polimerazy RNA II. Obserwowany zaś przyrost aktywności w pierwszych godzinach kiełkowania przypada głównie na polimerazę I (46). Zastosowanie znakowanych aminokwasów pozwoliło na stwierdzenie, że przyrost aktywności polimerazy I jest wynikiem syntezy *de novo* tego enzymu.

Powyższe informacje prowadzą do wniosku, że polimeraza II zachowana jest w suchych zarodkach by katalizować syntezę pre-mRNA natychmiast po przerwaniu stanu spoczynkowego, podczas gdy polimeraza I zaczyna od-

grywać znaczącą rolę w transkrypcji genomu dopiero po zaktywowaniu cytoplazmatycznego warsztatu biosyntezy białka. W ten sposób, wysoka aktywność polimerazy II, przy braku lub znikomej aktywności polimerazy I, decydować może o wybiórczej transkrypcji unikalnych sekwencji DNA w bezpośredniej odpowiedzi zarodka pszenicy na zewnętrzne czynniki kiełkowania. Późniejszy wzrost aktywności polimerazy I, uzależniony przypuszczalnie od jej syntezy *de novo*, umożliwić może w kolejnej fazie kiełkowania syntezę także i rRNA. Regulowana w ten sposób stopniowa aktywacja transkrypcji genomu, chronić może ziarno pszenicy przed natychmiastowym uruchomieniem masowej syntezy RNA w czasie przypadkowego i krótkotrwałego nawilgotnienia.

V. Podsumowanie i wnioski końcowe

W przeciwieństwie do *Prokaryota*, gdzie jeden enzym katalizuje syntezę wszystkich rodzajów molekularnych komórkowego RNA, u *Eucaryota* występuje kilka polimeraz RNA o podobnych właściwościach katalitycznych lecz różnej budowie i różnych funkcjach szczegółowych. Polimerazy RNA organizmów eukariotycznych stanowią dziś względnie dobrze poznaną grupę enzymów. Informacje o ich budowie i funkcjach pochodzą głównie z badań oczyszczonych preparatów pochodzenia zwierzęcego i w mniejszym stopniu roślinnego. Do najlepiej poznanych należą polimeraza I i II.

Polimeraza klasy I występuje w jąderku i katalizuje transkrypcję sekwencji rybosomalnych. Jest to białko złożone z pięciu lub więcej podjednostek o ogólnym ciężarze cząsteczkowym wahającym się w granicach od 400 000 do 550 000 zależnie od pochodzenia. Enzym klasy II występuje w nukleoplazmie, katalizuje transkrypcję unikalnych sekwencji DNA i charakteryzuje się szczególną wrażliwością na α -amanitynę. Podobnie jak polimeraza I, jest białkiem o bardzo wysokim ciężarze cząsteczkowym (400 000 do 500 000), złożonym z kilku różniących się między sobą podjednostek. Mniej poznana jest polimeraza III, katalizująca przypuszczalnie syntezę tRNA i 5S RNA, oraz polimerazy organellowe, występujące w mitochondriach i plastydach. W ramach każdej z klas wyróżnia się indywidualne formy polimeraz, których odrębność molekularna i funkcjonalna nie zostały jednak dotychczas wystarczająco udokumentowane.

Różnorodność klas i form polimeraz RNA w komórce eukariotycznej ma zapewne związek ze złożonością budowy aparatu genetycznego i regulacji transkrypcji w organizmach wyższych. Współczesny stan wiedzy, mimo szybkiego postępu badań, nie pozwala jeszcze określić na czym polega udział polimeraz RNA w regulacji ekspresji genów w komórce eukariotycznej. Tym niemniej pozwala z całym przekonaniem utrzymywać, że enzymy te, obok innych białek jądrowych, hormonów oraz innych czynni-

ków białkowych i niebiałkowych, są integralnym składnikiem komórkowego systemu regulacji intensywności i specyficzności transkrypcji w cyklu życiowym komórki i w rozwoju ustroju eukariotycznego. Co więcej, jak to wynika z danych uzyskanych w badaniach materiału zwierzęcego, odrębne uogólnienia można formułować dla polimerazy II i odrębne dla polimerazy I i III. Katalizując syntezę mRNA, polimeraza II jest niewątpliwie najważniejszym z enzymów uczestniczących w przekazywaniu informacji genetycznej z jądra komórkowego do miejsca syntezy białka w cytoplazmie. Polimeraza I i III natomiast decydują o transkrypcji genów, których produkty -rRNA i tRNA, choć nie niosą informacji genetycznej, to stanowią postawowe składniki cytoplazmatycznego warsztatu syntezy białka. W ten sposób, pośrednio wpływać mogą także i na ekspresję genów strukturalnych.

Mimo znacznych trudności metodycznych w zakresie izolowania i oczyszczania polimeraz RNA z roślin wyższych, badania tego materiału pozwoliły w istotny sposób uzupełnić informacje o roli polimerazy I i II w regulacji intensywności i specyficzności transkrypcji w komórce eukariotycznej. Materiał roślinny pozwala bowiem badać polimerazy w specjalnych warunkach metabolicznych, jakich nie można obserwować w przypadku

Tabela 7.

Zestawienie danych o identyfikacji i oczyszczaniu polimeraz RNA z roślin wyższych

Klasa enzymu	Źródło	Stopień oczyszczenia	Piśmiennictwo
I	Liście pszenicy	138—krotny	(117)
I	Hypokotyl soi	do homogenności	(40)
II	Liście pszenicy	18—krotny	(117)
II	Zarodki żyta	760—krotny	(55)
II	Zarodki pszenicy	do homogenności (ok. 4000 razy)	(39)
II	Kallus pietruszki	prawie do homogenności	(75)
II	Liście kukurydzy	do homogenności (ok. 3500 razy)	(128)
III	Zarodki żyta	brak danych	(39)
organellowy (chloroplastów)	Chloroplasty liści kukurydzy	do homogenności	(125)
„	Chloroplasty liści pszenicy	11—krotny	(116, 117)

komórek zwierzęcych. Należy tu w szczególności możliwość badania zmian aktywności polimeraz w wyniku przerwania stanu spoczynkowego nasion, lub w odpowiedzi na traktowanie różnymi fitohormonami.

Wyniki uzyskane z badań na materiale roślinnym pozwoliły na szersze udokumentowanie odrębności funkcjonalnej polimerazy I i II niż to było możliwe opierając się jedynie na badaniach tkanek zwierzęcych i komórek niższych eukariontów. Dalszy rozwój tych badań pozwoli zapewne ściśle określić mechanizm udziału polimeraz RNA w kontroli ekspresji genów w dowolnym ustroju eukariotycznym.

Artykuł nadszedł 19.11.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 20.2.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Weiss S. B., Gladstone L., (1959), *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4118.
2. Weiss S. B., Nakamoto T., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, PC18.
3. Jacob S. T., (1973), *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **13**, 93—124.
4. Chambon P., (1974), *The Enzymes*, red. Boyer P. D., t. 10, str. 261—331, Academic Press, London, New York.
5. Chambon P., (1975), *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 613—628.
6. Biswas B. B., Ganguly A., Das A., (1975), *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, **15**, 145—184.
7. Kedinger C., Gniazdowski M., Mandel J. L., Gissinger F., Chambon P., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 165.
8. Kedinger C., Nuret P., Chambon P., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 169.
9. Wieland T., (1964), *Pure Appl. Chem.*, **9**, 145.
10. Wieland T., (1968), *Science*, **159**, 946.
11. Wieland R., Wieland O., (1972), *Microbiological Toxins*, t. 8, str. 249, Academic Press, New York.
12. Chesterton C. J., Butterworth P. H. W., (1971), *FEBS Letters*, **12**, 301.
13. Chesterton C. J., Butterworth P. H. W., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 232.
14. Gissinger F., Chambon P., (1972), *Eur. J. Biochem.* **28**, 277.
15. Kedinger C., Chambon P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **28**, 283—290.
16. Roeder R. G., Rutter W. J., (1969), *Nature*, **224**, 234—237.
17. Roeder R. G., Rutter W. J., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **65**, 675.
18. Butterworth P. H. W., Cox R. F., Chesterton C. J., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 229—241.
19. Schwartz L. B., Roeder R. G., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3221—3228.
20. Ponta H., Ponta U., Wintersberger E., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **29**, 110.
21. Adman R., Schultz L. D., Hall B. D., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1702.
22. Sklar V. E. P., Schwartz L. B., Roeder R. G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 348—352.
23. Mondal H., Mandal R. K., Biswas B. B., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **25**, 463.
24. Chambon P., Gissinger F., Kedinger C., Mandel J. L., Meilhac M., (1974), *The Cell Nucleus*, red. Busch H., t. 3, Academic Press.

25. Mandel J. L., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 367—378.
26. Mandel J. L., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 379—395.
27. Hossenlopp P., Oudet P., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 397—411.
28. Cohet-Meilhac M., Chambon P., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **353**, 160—184.
29. Cochet-Meilhac M., Chambon P., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **353**, 185—192.
30. Roeder R. G., Rutter W. J., (1970), *Biochemistry* **9**, 2543—2553.
31. Roeder R. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 241—248.
32. Chesterton C. J., Butterworth P. H. W., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 181—185.
33. Chesterton C. J., Humphrey S. M., Butterworth P. H. W., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 675.
34. Buhler J. M., Sentenac A., Fromageot P., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5963—5970.
35. Ponta H., Ponta U., Wintersberger E., (1971), *FEBS Letters*, **18**, 204—208.
36. Dezelee S., Sentenac A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 41.
37. Dezelee S., Wyers F., Sentenac A., Fromageot P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **65**, 543—552.
38. Jendrisak J. J., Becker W. M., (1974), *Biochem. J.*, **139**, 771—777.
39. Jendrisak J. J., Burgess R. R., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4639—4645.
40. Guilfoyle T. J., Lin C., Chen Y., Key J. L., (1976), *Biochem., Biophys. Acta*, **418**, 344—357.
41. Furth J. J., Austin G. E., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 641—648.
42. Blatti S. P., Ingles C. J., Lindell T. J., Morris P. W., Weaver R. F., Weinberg F., Rutter W. J., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 649.
43. Zybler E. A., Penman S., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2861—2865.
44. Roeder R. H., Roeder R. G., (1972), *J. Mol. Biol.*, **67**, 433—441.
45. Weinman R., Roeder R. G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1790—1794.
46. Mazus B., Brodniewicz-Proba T., (1976), *Acta Biochem. Pol.*, **23**, 261—267.
47. Gissinger R., Chambon P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **28**, 277—282.
48. Schwartz L. B., Roeder R. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5898—5906.
49. Goldberg M., Perriard J. C., Hager G., Hallick R. R., Rutter W. J., (1973), *Basic Life Sciences*, red. Biswas B. B., Mondal R. K., t. 3, str. 241—255, Plenum Press, New York.
50. Hager G. L., Holland M. J., Rutter W. J., (1975), *Fed. Proc.* **34**, 650.
51. Gornicki S. Z., Vuturo S. B., West T. V., Weaver R. F., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1792—1798.
52. Young H. A., Whiteley H. R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 479—484.
53. Horgen P. A., Key J. L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **294**, 227—235.
54. Strain G. C., Mullinix K. P., Bogorad L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2647—2651.
55. Fabisz-Kijowska A., Dullin P., Walerych W., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **390**, 105—116.

56. Gissinger F., Kedingner C., Chambon P., (1974), *Biochimie*, **56**, 319—333.
57. Lentfer D., Lezius A. G., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 278.
58. Chambon P., Mandel J. L., Gissinger F., Kedingner C., Gross-Bellard M., Hossenlopp P., (1973), *Colloq. Ges. Biol. Chem.*, **24**, str. 125, Mosbach, Germany.
59. Sudgen B., Keller W., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3777.
60. Maestre M. F., Wang J. C., (1971), *Biopolymers*, **10**, 121.
61. Dean W. W., Lebowitz J., (1971), *Nature, New Biology*, **231**, 5.
62. Delius H., Mantell N. J., Alberts B., (1972), *J. Mol. Biol.*, **67**, 341.
63. Mandel J. L., Kedingner C., Gissinger F., Chambon P., Fried A. H., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 109.
64. Marmur J., (1961), *J. Mol. Biol.*, **3**, 208.
65. Burgess A. B., Burgess R. R., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1174—1177.
66. Meilhac M., Tysper Z., Chambon P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **28**, 291.
67. Gurgo C., Ray R. K., Thiry L., Green M., (1971), *Nature, New Biology*, **229**, 111.
68. Oniski T., Muramatsu M., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 1361.
69. Chambon P., Gissinger J. L., Kedingner C., Gniazdowski M., Meilhac M., (1970), *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* **35**, 693.
70. Kedingner C., Gissinger F., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **44**, 421—436.
71. Roeder R. G., Roeder R. H., Brown D. D., (1970), *Cold Spring Harbor Sym. Quant Biol.*, **35**, 727.
72. Sajdel E. M., Jacob S. T., (1971), *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, **45**, 707.
73. Weaver R. F., Blatti S. P., Rutter W. J., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2994—2999.
74. Mandel J. L., Chambon P., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 175—180.
75. Link G., Richter G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 337—346.
76. Dezelee S., Sentenac A., Fromageot P., (1972), *FEBS Letters*, **21**, 1—6.
77. Brogt T. M., Planta R. J., (1972), *FEBS Letters*, **20**, 47—52.
78. Sebastian J., Bhargava M. M., Halvorson H. O., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 1—6.
79. Gong C. S., Van Etten J.-L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 44.
80. McNaughton D. R., Klassen G. R., Le John H. B., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 468—474.
81. Schwartz L. B., Sklar V. E. F., Jachning J. A., Weinman R., Roeder R. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5889—5897.
82. Seifart K. H., Benecke B. J., Juhasz P. P., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 41—47.
83. Seifart K. H., Benecke B. J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **53**, 293—300.
84. Borst P., Kroon A. M., (1969), *Intern. Rev. Cyt.*, **26**, 107.
85. Ashwell M., Work T. S., (1970), *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 107.
86. Rabinowitz M., Swift H., (1970), *Phys. Rev.*, **50**, 376.
87. Schatz G., (1970), *Membrane of Mitochondria and Chloroplast*, red. Racker E., str. 251, Van Nostrand-Reinhold, Princetown, New Jersey.
88. Rytel M., Gołaszewski T., Szarkowski J. W., (1970), *Acta Biochim. Polon.*, **17**, 111—120.
89. Van Tuyle G. C., Kalf G. F., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 425.
90. Küntzel H., Schäfer K. P., (1971), *Nature, New Biology*, **231**, 265.

91. Wu G. J., David J. B., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3589.
92. Gallerani R., Saccone C., Cantatore P., Gadaleta M. N., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 37.
93. Reid B. D., Parson P., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2830.
94. Tsai M. J., Michaelis G., Criddle R. S., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 473.
95. Eccleshall R., Criddle R. S., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 602.
96. Bernardi G., Faunes M., Piperno G., Słonimski P. P., (1970), *J. Mol. Biol.*, **48**, 23.
97. Borst P., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 333.
98. Wintersberger E., (1972), *Mitochondria-Biomembranes*, str. 21, North Holland, Publ., Amsterdam.
99. Wintersberger E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1287.
100. Barath Z., Küntzel H., (1972), *Nature, New Biology*, **240**, 195.
101. Kirk J. T. O., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 393—397.
102. Schweiger H. G., Berger S., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 533—535.
103. Semal J., Spencer D., Kim Y. T., Wildman S. G., (1964), **91**, 205—216.
104. Gołaszewski T., Rytel M., Szarkowski J., (1972), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **20**, 539—542.
105. Gibbs S. P., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 653—657.
106. Gibbs S. P., (1968), *J. Cell. Sci.*, **3**, 327—340.
107. Berger S., (1967), *Protoplasma*, **64**, 13—25.
108. Scott N. S., Smellie R. M., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 588—603.
109. Towari K. K., Wildman S. G., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 569.
110. Williams G. R., Williams A. S., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 853.
111. Stutz K. K., Rawson J. R., (1970), *Biochem., Biophys. Acta*, **209**, 16.
112. Tewari K. K., Wildman S. G., (1969), *Biochem. Biophys. Acta*, **186**, 358.
113. Spencer D., Whitfield P. R., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* **132**, 477.
114. Surzycki S. J., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**, 1327.
115. Bottomley W., Smith H. J., Bogorad L., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2412—2416.
116. Polya G. M., Jagendorf A. T., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 635—648.
117. Polya G. M., Jagendorf A. T., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 649—657.
118. Brady C. J., Patterson B. P., Tung H. F., Smellie R. M., (1969), *Abstr. Conf. Autonomy Biogenesis Mitochondria and Chloroplasts*, str. 54, Canberra.
119. Brown R. D., Bastia D., Haselkorn R., (1969), *Lepetit Colloquia in Biology and Medicine*, rd. Silvestri L., t. 1, str. 309, North Holland Publ., Amsterdam.
120. Bottomley W., Spencer D., Wheeler A. M., Whitfield P. R., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 269.
121. Bogorad L., Woodstock C. L., (1970), *Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts*, red. Boardman N. K., Linnane A. W., Smellie R. M., North Holland Publ., Amsterdam.
122. Meilhac M., Chambon P., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 454.
123. Losic R., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 409—446.
124. Chamberlin M. J., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 421—475.

125. Huang R. C., Maheshwari N., Bonner J., (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 689.
126. Stout E. R., Mans R. J., (1967), *Biochim., Biophys. Acta*, **134**, 327—336.
127. Mazuś B., Buchowicz J., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 77—82.
128. Mullinix K. P., Strain G. C., Bogorad L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2386—2390.
129. Masuda Y., (1959), *Plant Physiol.*, **12**, 325.
130. Chrispeels M. J., Hanson J. B., (1962), *Weeds*, **4**, 123.
131. Key J. L., Ingle J., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**, 1382.
132. Silberger J., Skoog F., (1953), *Science*, **118**, 443.
133. Roychaudhury R., Sen S. P., (1964), *Plant Physiol.*, **17**, 352.
134. Maheshwari S. C., Guha S., Gupta S., (1966), 117, 470.
135. Cherry J. H., (1967), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **144**, 154.
136. Chandra G. R., Varner J. E., (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 583.
137. Johri M. M., Varner J. E., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 269.
138. Osborne D. J., (1962), *Plant Physiol.*, **37**, 595.
139. Key J. L., (1969), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**, 449—474.
140. O'Brien T. J., Jarvis B. C., Cherry J. H., Hanson J. B., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **169**, 35—43.
141. Key J. L., Ingle J., (1968), *Biochemistry and Physiology* of Plant Growth Substances*, Proc. VI Intern., Ottawa.
142. Guilfoyle T. J., Lin C. Y., Chen Y. M., Nagao R. T., Key J. L., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 69—72.
143. Guilfoyle T. J., Hanson J. B., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 110—113.
144. Arens M. Q., Stout E. R., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **353**, 121—131.
145. Hardin J. W., Cherry J. H., Morre D. J., Lembi C. A., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3146—3150.
146. Miassod R., Pennon P., Teissere M., Ricard J., Cechini J. P., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **224**, 423.
147. Penon P., Cechini J. P., Miassod R., Ricard J., Teissere M., Pinna M. H., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 73.
148. Teissere M., Pennon P., Ricard J., (1973), *FEBS Letters*, **30**, 65—70.
149. Jarvis B. C., Frankland B., Cherry J. H., (1968), *Plant Physiol.* **43**, 1734.
150. Jarvis B. C., Frankland B., Cherry J. H., (1968), *Planta*, **83**, 257—266.
151. Tuan-Hua Ho D., Varnes J. E., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4783—4786.
152. Wasilewska L. D., Kleczkowski K., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 164—168.
153. Wasilewska L. D., Kleczkowski K., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **66**, 405—412.
154. Jankowski I., Wielgat B., Kleczkowski K., (1975), *Plant Science Letters*, **5**, 347—350.
155. Bex J. H. M., (1972), *Planta*, **103**, 11—17.
156. Rejman E., Buchowicz J., (1971), *Phytochemistry*, **10**, 2951—2957.
157. Van de Walle C., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 219.
158. Chen D., Schultz G., Katchalski E., (1971), *Nature, New Biology*, **231**, 60—72.
159. Van Onckelen H. A., Verbeck R., Khan H. A., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 562—568.
160. Sen S., Payne P. J., Osborne D. J., (1975), *Biochem. J.* **148**, 381—387.

161. Spigel S., Obendorf R. L., Marcus A., (1975), *Plant Physiol.*, **56**, 502—507.
162. Bhat S. P., Padayatty J. D., (1975), *Nature*, **156**, 227—228.
163. Rejman E., Buchowicz J., (1973), *Phytochemistry*, **12**, 271—276.
164. Dobrzańska M., Tomaszewski M., Grzelczak Z., Rejman E., Buchowicz J., (1973), *Nature*, **244**, 507—509.
165. Dobrzańska M., Buchowicz J., (1976), *Biochim., Biophys. Acta*, **432**, 73—79.
166. Van de Walle C., Bernier C., Deltour R., Brouchart R., (1976), *Plant Physiol.*, **57**, 632—639.
167. Jendrisak J. J., Becker W. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **319**, 48.
168. Mazuś B., (1973), *Phytochemistry*, **12**, 2809—2813.
169. Hossenlopp P., Wells D., Chambon P., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 237—251.
170. Falchuk K. H., Mazuś B., Ulpino L., Vallee B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4468—4475.

KONRAD STANISŁAW FAMULSKI *)

Niehistonowe białka chromatyny jako endogenne substraty jądrowych kinaz białkowych

Non-histone Chromatin Proteins — Endogenous Substrates for Nuclear Protein Kinases

Spis treści

- I. Jądrowe kinazy białkowe
- II. Fosforylacja białek niehistonowych — wpływ hormonów i cAMP
 - II-1. Metabolizm białek niehistonowych podczas aktywacji genów przez hormony
 - II-2. Wpływ cAMP na fosforylację białek niehistonowych w wątrobie
 - II-3. Inne związki stymulujące fosforylację
- III. Fosforylacja białek niehistonowych w czasie cyklu komórkowego
- IV. Wpływ cAMP i kinaz białkowych na syntezę RNA oraz na fosforylację białek z frakcji polimerazy RNA
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Nuclear protein kinases
- II. Non-histone proteins phosphorylation — stimulation by hormones and cAMP
 - II-1. Non-histone proteins metabolism in time of gene activation by hormones
 - II-2. Influence of cAMP on non-histone proteins phosphorylation in liver
 - II-3. Other compounds which altered phosphorylation
- III. Non-histone proteins phosphorylation during cell cycle
- IV. Influence of cAMP and protein kinases on RNA synthesis, and on phosphorylation of proteins from polimerase RNA fraction
- V. Concluding remarks

Przypuszczenie, że większość hormonów oddziałuje na funkcje komórki poprzez kinazy białkowe zależne od cAMP, tłumaczy duże zainteresowanie badaczy endogennymi substratami tych enzymów. Kinazy wy-

*) Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02—089 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — 3',5'-adenozynomonofosforan; dATP — 2'-dezoksyadenozynotrójfosforan; db-cAMP — dwubutyrylo 3',5'-adenozynomonofosforan; pCMB — parachlorortęciobenzoesan; GTP, ITP, CTP, UTP — odpowiednio guanozyno-, inozyno-, cytydino-, urydynotrójfosforany; UMP — urydynomonofosforan.

stępują we wszystkich frakcjach komórki, przy czym wiele z nich jest związanych ze strukturami błonowymi (1, 2, 3, 4, 5, 6), lub z chromatyną (7, 8). Prawdopodobnie endogennymi substratami tych enzymów są białka charakterystyczne dla danej struktury bądź frakcji komórkowej, a wybiórczość fosforylacji uwarunkowana jest występowaniem kinazy w danej strukturze.

Występowanie fosfoproteidów stwierdzono we wszystkich strukturach komórkowych różnych badanych tkanek (10—11). Grupy fosforanowe połączone są wiązaniami estrowymi z resztami seryny i treoniny. Wśród białek jądrowych białka niehistonowe zawierają dziesięciokrotnie więcej fosforu niż histony i białka nukleoplazmy. Włączanie fosforanu znakowanego ^{32}P do frakcji niehistonowej, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, odbywa się bardzo szybko (12, 13, 14, 15, 16). Fosforylacja wymaga udziału ATP, ale zachodzi niezależnie od syntezy białka (17, 18). Świadczy to o obecności w jądrze kinaz wybiórczo fosforylujących białka niehistonowe.

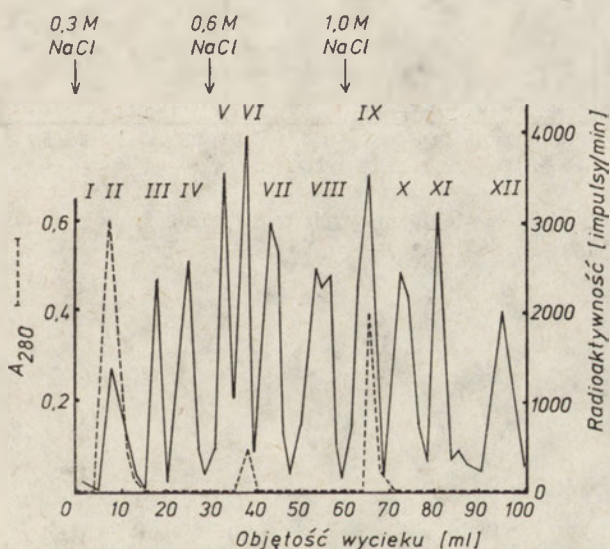
W ostatnich latach uzyskano wiele danych wskazujących na udział niehistonowych białek chromatyny w regulacji genetycznej u *Eucaryota*. Białka te cechuje swoistość tkankowa, specyficzność oddziaływań z DNA oraz zdolność do regulacji aktywności matrycowej chromatyny (19, 20). Ponadto zmiany ilościowe i jakościowe białek niehistonowych towarzyszą zawsze aktywacji genomu, zachodzącej na przykład w toku cyklu komórkowego, procesu różnicowania i rozwoju oraz rakowacenia komórek (19, 20). Poznanie przeto substratów kinaz białkowych w chromatynie wydaje się szczególnie ważne.

I. Jądrowe kinazy białkowe

Pierwsze prace nad kinazami fosforylującymi białka jądrowe prowadzone przez L a n g a n a (21, 22, 23) dotyczyły fosforylacji histonów. Szczegółowe badania *in vivo* i *in vitro* pozwoliły stwierdzić, że włączanie fosforanu do histonów katalizuje kinaza cytosolowa o dużej specyficzności substratowej (21). Aktywność tej kinazy podlega regulacji przez cAMP i hormony peptydowe (22, 23).

W roku 1966 K l e i n s m i t h przedstawił wyniki wskazujące na to, że w nienaruszonych jądrach zachodzi włączanie [^{32}P]fosforanu do białek jądrowych. Wstępne rozfrakcjonowanie materiału jądrowego pozwoliło stwierdzić że 90% włączonego [^{32}P]fosforanu znajduje się w białkach niehistonowych (17). Najlepszym donorem reszt fosforanowych kinaz jądrowych okazał się ATP i dATP. Przyjmując włączenie [^{32}P]fosforanu do białek niehistonowych w obecności ATP lub dATP za 100%, przydatność substratowa innych nukleotydów przedstawia się następująco: GTP — 70%, ITP — 38%, CTP — 24%, UTP — 7%, ADP — 3% (18). Inkubując

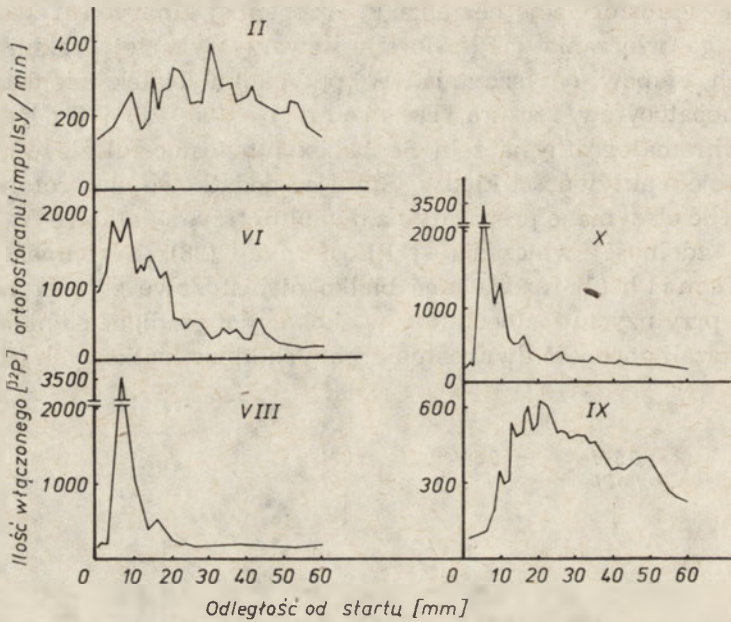
oczyszczoną frakcją białek niehistonowych z γ [32 P]ATP w obecności Mg^{2+} obserwuje się fosforylację bez udziału egzogennej kinazy (18). Właściwość endogennego włączania [32 P]fosforanu towarzyszyła tej frakcji podczas wszystkich etapów oczyszczania. W przypadku białek niehistonowych z jąder hepatocytów szczura, Desjardins (25, 26) i Takeda (27) stosując chromatografię na żelu Sephadex lub fosfocelulozie wyizolowali dwie frakcje o aktywności kinazy. Stosując dodatkowo elektroforezę można rozdzielić otrzymane preparaty na dwie lub trzy dodatkowe frakcje wykazujące zdolność włączania [32 P]fosforanu (28). Natomiast Kish i Kleinsmith (7) rozdzielając białka niehistonowe z jąder hepatocytów wołu przy użyciu fosfocelulozy w skokowym gradiencie chlorku sodowego wykazali obecność dwunastu odrębnych kinaz białkowych (Ryc. 1).



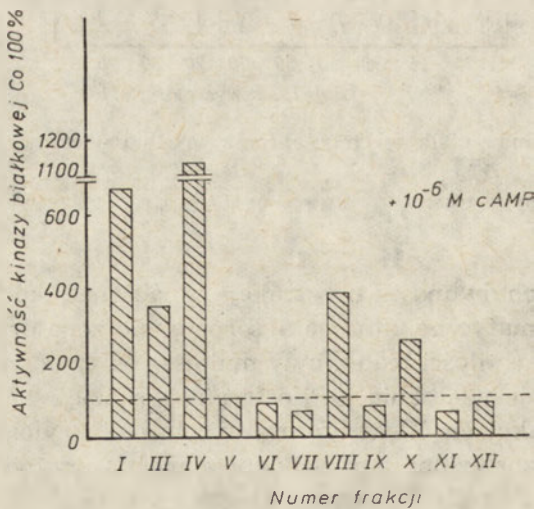
Ryc. 1. Rozdział kinaz białkowych z chromatyny hepatocytów wołu przy pomocy fosfocelulozy (7)

Dodatkowe objaśnienia w tekście

Spośród owych dwunastu trzy frakcje oznaczone jako II, VI, IX, zawierały białko enzymatyczne, którego absorpcję mierzono przy 280 nm. W pozostałych frakcjach ilości białek były mniejsze od czułości metody, co przy wysokim poziomie włączania [32 P]fosforanu wskazuje na dużą aktywność kinaz w tych frakcjach. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym frakcji II wykazała, że znaną tam aktywność można przypisać czterem kinazom. Profile elektroforetyczne niehistonowych białek inkubowanych z frakcjami II, VI, VIII, IX, X i znakowanym γ [32 P]ATP przedstawiają inne rozmieszczenie piętna włączonego [32 P]fosforanu, co wskazuje na róż-



Ryc. 2. Fosforylacja białek niehistonowych przez różne frakcje kinaz jądrowych (7)
Objaśnienia w tekście



Ryc. 3. Wpływ cAMP na aktywność jądrowych kinaz białkowych (7)
Za 100% przyjęto aktywność enzymatyczną poszczególnych frakcji przed dodaniem cAMP

ną specyficzność tych enzymów w stosunku do endogennego substratu (Ryc. 2).

Charakterystyczną cechą preparatów kinaz jądrowych jest aktywne fosforylowanie kwaśnych białek jądrowych oraz kazeiny i fosfofityny (7), natomiast tylko w niewielkim stopniu histonów (29, 30).

Endogenna fosforylacja białek w nienaruszonych jądrach, bądź w preparatach białek niehistonowych nie jest ilościowo stymulowana w sposób znaczący przez cAMP (13, 31, 32, 33). Niemniej jednak stwierdzono w jądrze obecność białek wiążących cykliczne nukleotydy (34, 35, 36), a we frakcjach nr. I, III, IV, VIII, X, otrzymanych przez Kish i Kleinsmitha cAMP stymulował endogenną fosforylację (7) (Ryc. 3).

W przypadku fosforylacji *in vivo* działanie cAMP dotyczy jedynie selektywnej stymulacji fosforylacji pewnych białek niehistonowych (13, 37).

Rikans i Ruddon (38) wyizolowali z chromatyny wątroby szczura kinazę aktywowaną przez cAMP o dużej specyficzności wobec białek niehistonowych. Związane z chromatyną białka niehistonowe są lepszymi substratami niż wyizolowane. Rozmieszczenie piętna [³²P]fosforanu w białkach użytych jako substraty jest podobne do znakowania *in vivo*, co może świadczyć o tym, że enzym związany jest z chromatyną, a białka niehistonowe są najprawdopodobniej jego endogennymi substratami.

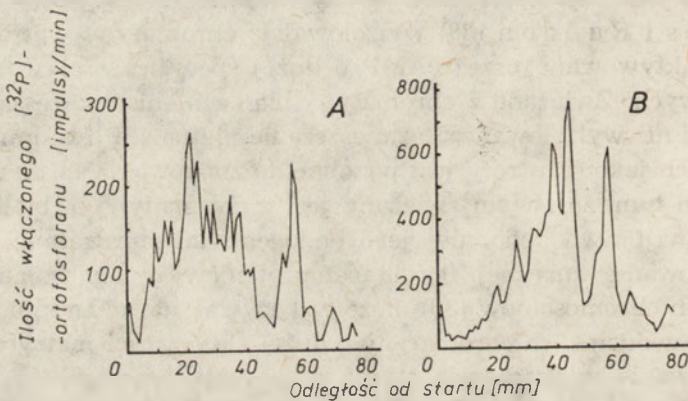
Występowanie znacznej ilości fosfoproteidów w euchromatynowych fragmentach chromosomów (39) może wskazywać na to, że kinazy są rozmieszczone w odcinkach chromatyny o dużej aktywności matrycowej. Stosując wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy i sączenie na kolumnie z ECTHAM-celulozy rozdzielono chromatynę z jajowodów kurczęcia na frakcje o różnej aktywności matrycowej (8). Porównując włączanie [³²P]fosforanu do tych frakcji, stwierdzono obecność dużej aktywności kinaz we fragmentach tzw. „aktywnej chromatyny” (8). Specyficzność substratowa tych enzymów była charakterystyczna dla kinaz jądrowych. Fosforylowały one zarówno substraty egzogenne — kazeinę i fosfofitynę, jak i endogenne białka kwaśne. Obszarem chromatyny o dużej intensywności syntezy RNA jest także chromatyna jąderka (40, 41). Włączanie [³²P]fosforanu z γ [³²P]ATP do białek tej frakcji jądra obserwowano *in vitro*. Porównanie aktywności kinaz jądrowych i jąderkowych *in vivo* i *in vitro* oraz analiza elektroforetyczna znakowanych substratów endogennych wykazuje w jąderku obecność specyficznych kinaz. Enzymy te katalizują włączenie [³²P]fosforanu do białek związanych z satelitarnym DNA (42, 43), natomiast słabo fosforylują białka cząstek prerybosomalnych (44).

Przedstawione powyżej dane dotyczące izolowania i oczyszczania kinaz związanych z chromatyną wskazują na ich różną odpowiedź na cAMP oraz specyficzność substratową uwarunkowaną umiejscowieniem enzymów.

II. Fosforylacja białek niehistonowych — wpływ hormonów i cAMP

II-1. Metabolizm białek niehistonowych podczas aktywacji genów przez hormony.

Wiązanie i uwalnianie fosforanu z jądrowych fosfoproteidów stanowi jeden z głównych typów przekształceń metabolicznych tych białek (13, 17, 18, 24). Badanie włączenia [^{32}P]fosforanu do białek niehistonowych rozdzielanych elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS wskazuje na zróżnicowane rozmieszczenie piętna fosforu w polipeptydach. Porównanie elektroforogramów białek izolowanych z wątroby i nerek szczura wskazuje na ich tkankową odmienność znakowania (14, 45) (Ryc. 4).



Ryc. 4. Rozmieszczenie włączonego *in vivo* [^{32}P] fosforanu we frakcjach białek niehistonowych z wątroby (A) i nerek (B) (14)

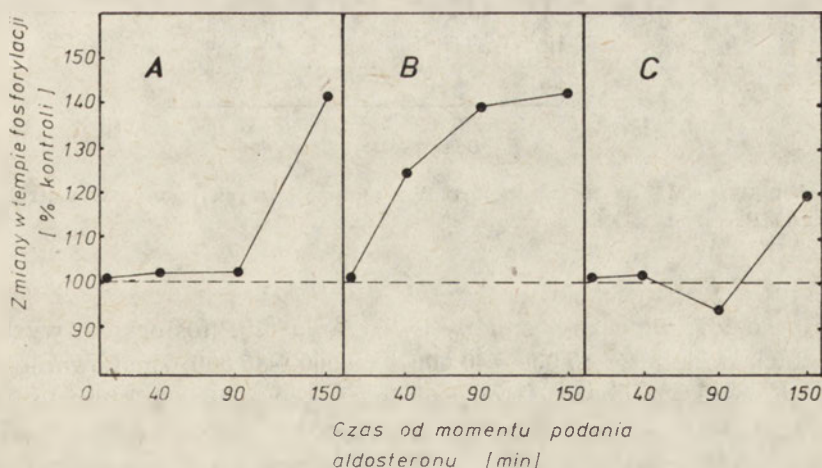
Wydaje się, że specyficzność ta wynika z kontroli hormonalnej syntezy i fosforylacji poszczególnych białek niehistonowych (46, 47). W wątrobie szczura na przykład kortyzol selektywnie stymuluje syntezę białek niehistonowych o ciężarze cząsteczkowym 41 000 (48). Podanie glukagonu powoduje zwiększone włączanie [^{14}C]leucyny do białek z tej frakcji o ciężarze 60 000 i 80 000 (14). Ten typ odpowiedzi ujawnia się po kilku godzinach, podczas gdy dużo szybsze zmiany obserwuje się we włączaniu [^{32}P]fosforanu do białek niehistonowych (14). Fosforylacja tych białek z wątroby zachodzi już po pięciu minutach od podania kortyzolu (14). Badanie kinetyki włączania [^{32}P]fosforanu do poszczególnych kwaśnych białek jądrowych ukazuje skomplikowany obraz ich fosforylacji i defosforylacji. Podwyższenie tempo fosforylacji białek o wyższym ciężarze cząsteczkowym jest wyraźna po 15 minutach, później spada do około 50%, podczas gdy niektóre polipeptydy o niższym ciężarze wykazują podwyższone znakowanie dopiero po ośmiokrotnie dłuższym okresie działania hormonów. Być może różnice te wiążą się ze stymulacją syntezy różnych typów RNA przez

kortyzol (49, 50). Korelacje pomiędzy aktywacją genów przez hormony, a fosforylacją białek niehistonowych zostały stwierdzone w takich przypadkach jak: stymulacja komórek prostaty przez testosteron (51, 52), stymulacja gruczołów mlecznych ssaków przez prolaktynę (53), oddziaływanie kortyzolu i kortykosterolu na wątrobę (14, 54, 55), aldosteronu na nerki (56), czy trójiodotyroniny na mięsień sercowy i wątrobę (57).

Podanie trójiodotyroniny szczurom zwiększa aktywność kinazy związanej z chromatyną komórek wątroby (58), przy czym stwierdza się, że hormon ten wiąże się z białkami niehistonowymi (59). W cytosolu nie obserwowano natomiast zmian aktywności kinaz zarówno po podaniu egzogennej trójiodotyroniny, jak i po usunięciu tarczycy (58). Resekcja gruczołów tarczycy pociąga za sobą obniżenie fosforylacji białek jądrowych w hepatocytach. Prawdopodobnie stymulacja kinaz przez ten hormon polega na ich indukcji w jądrze. Analiza elektroforogramów znakowanych substratów (białek niehistonowych) oraz wpływu denaturacji cieplnej i hamowania fosforylacji przez pCMB wykazała, że enzym wyizolowany z chromatyiny poddanej działaniu trójiodotyroniny *in vivo* różni się od enzymu otrzymanego z wątroby zwierząt, którym nie podawano hormonów (58). W przypadku stymulacji narządów rozrodczych kurcząt przez estrogen obserwuje się również wzrost aktywności kinaz jądrowych (36).

Stopień specyficzności odpowiedzi narządów i tkanek na hormony można wykazać badając kinetykę fosforylacji białek niehistonowych. Wpływ aldosteronu na włączanie [32 P]fosforanu *in vivo* do izolowanych następnie jąder z serca, nerek i wątroby najwyraźniej ujawnia się w nerkach (56), (Ryc. 5).

Dane te wskazują na udział fosforylacji w oddziaływaniu hormonów na

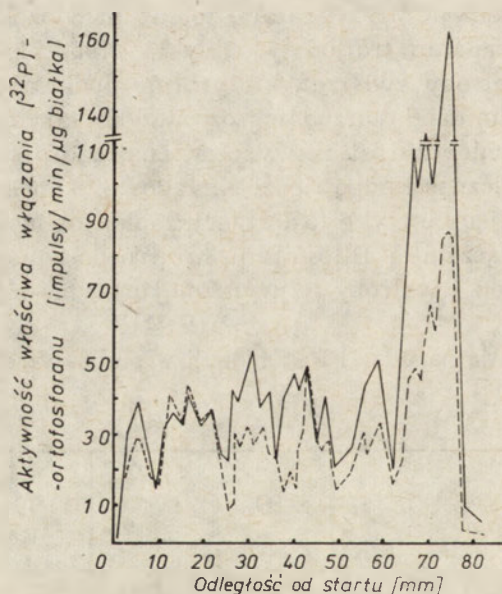


Ryc. 5. Wpływ aldosteronu na fosforylację białek niehistonowych *in vivo* w sercu (A), nerkach (B) i wątrobie (C) szczura (54, zmodyfikowane)

funkcje komórki. Wydaje się więc, że proces ten jest w wysokim stopniu specyficzny dla hormonów i tkanki docelowej oraz powodować może funkcjonalne zmiany chromatyny.

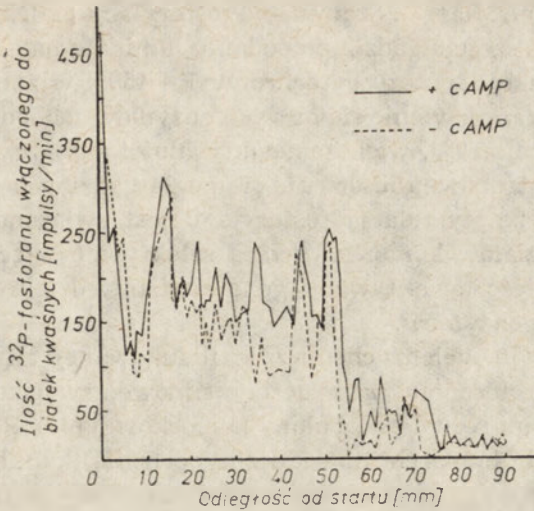
II-2. Wpływ cAMP na fosforylację białek niehistonowych w wątrobie.

Podanie db-cAMP szczurom pozbawionym kory nadnerczy zmienia charakter znakowania [32 P]fosforanem białek niehistonowych w wątrobie (13, 14). Zmiany znakowania [32 P]fosforanem obserwuje się także w fosforylacji histonów (13, 23). *In vivo* wpływ cAMP jest szybki i złożony. Po 15 minutach od podania obserwuje się zwiększone o około 30% w stosunku do kontroli włączanie [32 P]fosforanu przy czym niektóre białka wykazują stymulację tego procesu rzędu 200% (13), Ryc. 6.



Ryc. 6. Wpływ cAMP na fosforylację białek niehistonowych *in vivo* w wątrobie (13)
 — + cAMP
 - - - - cAMP

Najbardziej widoczne zmiany włączania [32 P]fosforanu występują w białkach o ciężarze 15 000—40 000 i 60 000—85 000. Znakowanie wielu białek nie jest stymulowane, szczególnie o ciężarze 58 000, która to frakcja wykazująca największe włączenie pozostaje na niezmiennym poziomie. Ilościowe zmiany znakowania *in vitro* są mniejsze niż *in vivo*, natomiast zachowana jest specyficzna stymulacja znakowania białek o ciężarze 70 000 (13) (Ryc. 7).



Ryc. 7. Wpływ cAMP na fosforylację białek niehistonowych w izolowanych jądrach komórek wątroby (13)

Rozkład piętna [^{32}P]fosforanu w białkach niehistonowych znakowanych *in vivo* i *in vitro* różni się nieznacznie, co wynika z utraty kinaz podczas preparatyki oraz zbyt krótkiego czasu inkubacji (4 minuty), który nie pozwala na uzyskanie równowagi pomiędzy kinazami a fosfatazą (15, 60). *In vivo* stymulacja fosforylacji przez cAMP towarzyszy innym zjawiskom indukowanym przez ten nukleotyd, takim jak synteza niektórych enzymów (61) i wzrost syntezy RNA (62). Procesy te wymagają udziału układów regulacji genetycznej, a estryfikacja łańcuchów białka resztami fosforanowymi przez kinazy jest być może mechanizmem modyfikującym ich funkcję.

II-3. Inne związki stymulujące fosforylację

Równoległość pomiędzy fosforylacją a aktywacją genów można obserwować stosując związki o właściwościach powodujących różne zmiany komórkowe, takie jak: synteza układów enzymatycznych, zmiany morfologiczne, rakowacenie itp. Wykazano to w gruczołach ślinowych po podaniu izoproterenolu (63, 64), podczas karcinogenezy wywołanej związkami azowymi (65) oraz w wątrobie po podaniu luminalu (66). W tym ostatnim przypadku obserwowano stymulację włączania [^{32}P]fosforanu do białek niehistonowych od dwóch do sześciu godzin po podaniu leku. Maksimum fosforylacji następowało po 24 godzinach i osiągało 48% w stosunku do kontroli. Zjawisko to obserwowano tylko w przypadku białek niehistonowych. Największe znakowanie wykrywano w białkach o ciężarze 15 000—40 000 i 60 000—85 000, podobnie jak w przypadku stymulacji te-

go procesu przez cAMP (13). Stymulacja fosforylacji białek niehistonowych w ciągu dwóch do sześciu godzin po podaniu luminalu nakłada się na udział tego leku w indukcji syntezy cytochromu P—450 i w zmianach morfologicznych wątroby. Pojawienie się nowych enzymów zachodzi w czasie sześć do dwunastu godzin (67). Zwiększenie aktywności mitotycznej i gwałtowny wzrost tkanki wątrobowej obserwuje się po 24 godzinach (68). Wydaje się prawdopodobne, że stymulacja fosforylacji jest związana z przyspieszeniem tempa podziałów komórkowych, a selektywne włączanie [³²P]fosforanu można odnieść do aktywacji genów odpowiedzialnych za indukcję syntezy pewnych enzymów.

Interesującym modelem chemicznie indukowanej aktywacji genomu jest wpływ izoproterenolu na gruczoły ślinowe, związku wiążącego się z β-adrenalginicznymi receptorami błony komórkowej (64). Podanie tego leku stymuluje podziały komórek, powoduje hipertrofię tkanki (69) oraz wpływa na wzrost syntezy kwasów nukleinowych. Maksimum syntezy RNA następuje po 18 godzinach (70), natomiast wzrost syntezy DNA obserwowany jest po 20 godzinach (69). Jednorazowa iniekcja izoproterenolu powoduje zmianę aktywności kinazy białkowej związanej z chromatyną komórek ślinianek. Aktywność tego enzymu obniża się do około 70% po dwóch godzinach od podania leku, następnie wyraźnie zwiększa się po czterech godzinach i osiąga maksimum stymulacji tj. około 100% w stosunku do kontroli po 12—16 godzinach. Po upływie dwóch dni aktywność kinazy powraca do stanu początkowego. Badania, w których zastosowano aktywnomycynę i chloramfenikol wykazały, że obserwowane zmiany są spowodowane syntezą kinazy *de novo* (64). Podobne wnioski można wyciągnąć z obserwacji dotyczących wpływu dwuchloroizoproterenolu, który hamuje działanie izoproterenolu na ślinianki, blokując wiązanie się leku z β-adrenalginicznymi receptorami błon komórkowych tej tkanki (64). Uzyskane wyniki wykazują ścisłą zależność czasową pomiędzy wzrostem aktywności kinazy, a charakterystycznymi zmianami w metabolizmie DNA i RNA w okresie premitotycznym, a synteza kinazy *de novo* jest prawdopodobnie związana z aktywacją chromatyny. Fakt oddziaływania izoproterenolu na aktywność enzymów jądrowych poprzez β-adrenalginiczne receptory znajdujące się w błonie komórkowej, sugeruje udział cAMP w tym procesie w sposób charakterystyczny dla modelu działania hormonów peptydowych (71, 72).

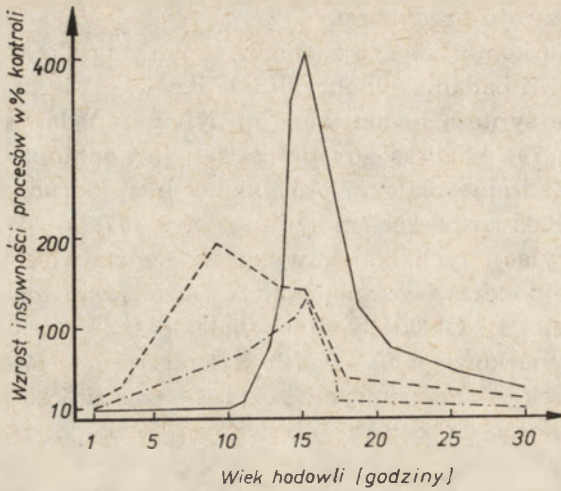
III. Fosforylacja białek niehistonowych w czasie cyklu komórkowego

Charakter procesów zachodzących podczas cyklu komórkowego zależy między innymi od endogennych układów regulujących metabolizm kwasów nukleinowych i białek. Zastosowanie do badań zsynchronizowanych *in vitro* hodowli komórkowych daje możliwość analizy czynników odpo-

wiedzialnych za regulację aktywności genomu, co można przenieść na proces wzrostu i rozwoju organizmu.

Podczas cyklu komórkowego zachodzą zmiany w aktywności matrycowej chromatyny. Z badania synchronicznie dzielącej się kultury komórkowej wiadomo, że synteza histonowego mRNA przypada na późną fazę G_1 i wczesną S (73, 74), podczas gdy proces ten jest zablokowany w mitozie (75, 76). Nagromadzenie białek niehistonowych w jądrach komórek HeLa obserwuje się przed rozpoczęciem syntezy DNA (77, 78). Wstępne badania dotyczące fosforylacji tych białek wykazały, że najwięcej [32 P]fosforanu zostaje włączone podczas wczesnej fazy S. Dużo niższa fosforylacja zachodzi w późnej fazie S i G_2 , kiedy to równolegle zmniejsza się synteza RNA (14) i stężenie komórkowego cAMP (79). Rozmieszczenie piętna [32 P] ufosforylowanych białek niehistonowych różni się zasadniczo w preparatach otrzymanych z komórek zsynchronizowanych hodowli, będących w różnych fazach cyklu komórkowego, podczas gdy profil elektroforetyczny tych białek nie ulega zmianie (80). Zróżnicowany obraz włączenia [32 P]fosforanu jest spowodowany specyficzną fosforylacją określonych białek, a nie zmianami w ich puli. Wynika to stąd że wymiana [32 P]fosforanu w ciągu 12 godzin osiąga 65%, a [14 C]leucyny jedynie 20%. Najwyższe włączenie znakowanego fosforanu zachodzi podczas fazy S i wczesnej G_1 i uwidacznia się w polipeptydach o ciężarze cząsteczkowym 40 000—47 000, 50 000—90 000 i 160 000. Zmiany w tempie wymiany fosforanu obserwuje się w białkach o ciężarze cząsteczkowym 28 000, 49 000, 55 000, gdzie półokres trwania [32 P]fosforanu wynosi odpowiednio 6, 12 i 9 godzin (80). Jednocześnie aktywność kinaz cytosolowych oraz pula komórkowego ATP nie zmienia się (80). Kleinsmith (81) stosując układ doświadczalny opracowany w laboratorium Karna (80) uzyskał wyniki różniące się od opisanych powyżej. Maksimum fosforylacji białek niehistonowych obserwował w fazie G_1 i G_2 . Włączenie [32 P]fosforanu do tych białek zmniejszało się w fazie S, natomiast podczas mitozy fosforylacja białek niehistonowych w zasadzie nie zachodziła. W fazach w których obserwowano maksimum włączenia [32 P]fosforanu, głównie fosforylowane były białka o średnim i wysokim ciężarze cząsteczkowym (81). Charakterystyczne znakowanie poszczególnych kwaśnych białek jądrowych podczas cyklu komórkowego, wydaje się być powszechne dla tego typu modyfikacji chromatyny w organizmach wyższych. Stwierdzono to w preparatach otrzymanych z kultur komórkowych fibroblastów kurczęcia (82), komórek BHK21 C13 (chomika) (83, 84), nefrocytów z regenerujących nerek (85) i statycznej hodowli skrawków wątroby (86). Wykazano, że fosforylacja białek niehistonowych zachodzi dużo intensywniej w komórkach dzielących się niż w komórkach hodowli z fazy stacjonarnej. Maksimum włączenia [32 P]fosforanu obserwuje się w fazie G_1 i S (82, 83, 84), przed osiągnięciem maksimum syntezy DNA i RNA (Ryc. 8).

Znakowanie kwaśnych białek jądrowych wskazuje na podobieństwa



Ryc. 8. Synteza DNA ----, synteza RNA -.- i fosforylacja białek niehistonowych — w komórkach BHK 21 C13 chomika z hodowli w fazie logarytmicznego wzrostu (83)

w fosforylacji i syntezie białek niehistonowych w różnych fazach cyklu komórkowego, pomimo zasadniczych różnic filogenetycznych badanych tkanek. W komórkach nie dzielących się główne włączenie [32 P]fosforanu znajdowano w białkach o niskim ciężarze cząsteczkowym (82, 86). Wzrost częstotliwości mitoz przejawia się w białkach niehistonowych wzrostem fosforylacji białek o ciężarze cząsteczkowym 40 000 (82, 83, 84, 85), natomiast w późnej fazie G_1 i w połowie fazy S zwiększone znakowanie pojawia się w białkach o wyższym ciężarze (82, 83, 86). Najszybszą wymianę fosforanu obserwuje się w białkach o niskim ciężarze cząsteczkowym, przy czym wymiana znakowanych aminokwasów wskazuje na dużą stabilność metaboliczną tej frakcji (82).

Podwyższenie fosforylacji białek niehistonowych można tłumaczyć dwojako. Po pierwsze zachodzić mogą modyfikacje ich struktury przestrzennej, powodujące wyeksponowanie reszt serynowych i treoninowych. Po drugie może wzrastać aktywność jądrowych kinaz białkowych. Fosforylacja kwaśnych białek przez kinazy z jąder komórek BHK21 C13 jest około 50% wyższa w przypadku otrzymania tej frakcji z hodowli dzielącej się (83). Analiza elektroforetyczna białek niehistonowych z tych komórek wykazała obecność pięciu odrębnych kinaz fosforylujących fosfofitynę (84, 85). Dwie z nich wykazywały wzrost aktywności rzędu 200—300%, jeżeli izolowane były z komórek znajdujących się w fazie G_1 (83, 84).

Podwyższenie aktywności kinaz białkowych w chromatynie komórek dzielących się tłumaczy wzrost fosforylacji białek niehistonowych zachodzący w takich warunkach. Specyficzność enzymów w stosunku do tych białek jest kilkakrotnie wyższa niż w przypadku fosfofityny stosowanej

jako substrat egzogeny (83). Maksimum aktywności kinaz i szybkie włączenie fosforanu do białek niehistonowych obserwuje się na ogół przed rozpoczęciem syntezy RNA i DNA. Można przypuścić, że modyfikacja tej frakcji białek jądra ma znaczenie w procesach regulacji i synchronizacji czasowej przemian chromatyny dzielących się komórek.

IV. Wpływ cAMP i kinaz białkowych na syntezę RNA oraz na fosforylację białek z frakcji polimerazy RNA.

Badając układ zawierający DNA oraz polimerazę RNA wrażliwą na α -amanitynę, wyizolowaną z homologicznej tkanki, obserwuje się stymulację syntezy RNA po dodaniu jądrowych fosfoproteidów (87). Ilość włączonego w tych warunkach [^{14}C]UMP jest ściśle zależna od zawartości białkowego fosforanu we frakcji białek niehistonowych. Tabela 1 ilustruje sty-

Tabela 1.

Wpływ jądrowych białek niehistonowych z wątroby szczura na syntezę RNA *in vitro* (87)

Układ reakcyjny	Włączenie [^{14}C]UMP % kontroli	Białkowy P % wagowy
DNA + polimeraza	100	
DNA + polimeraza + ekstrakt kwaśnych białek chromatyny	130	0,4
DNA + polimeraza + jądrowe białka niehistonowe oczyszczone (frakcja bogata w fosfoproteidy)	250	1,2

mulację syntezy RNA w zależności od stopnia oczyszczenia frakcji fosfoproteidów. Istotny jest fakt, że stymulacja syntezy RNA przez jądrowe fosfoproteidy zachodzi tylko w przypadku gdy DNA i białka niehistonowe pochodzą z tego samego organizmu. W obecności DNA pochodzącego z innych organizmów niż białka niehistonowe nie obserwuje się zmian we włączeniu [^{14}C]UMP (87).

Ufosforylowane białka niehistonowe częściowo odwracają hamujący efekt działania histonów na syntezę RNA (88, 89). W układzie zawierającym DNA, histony oraz polimerazę bakteryjną dodanie fosfoproteidów pochodzących z tego samego organizmu co DNA, zwiększa aktywność matrycową. Odwrócenie inhibicji syntezy RNA zależy od zawartości białkowego

fosforanu a defosforylacja białek niehistonowych powoduje spadek aktywności matrycowej zrekonstruowanej chromatyny o 50% (88).

Przedstawione dane wskazują na wysoką specyficzność oddziaływań fosfoproteidów z DNA i histonami, przy czym fosforylacja tych białek wydaje się być nieodzowna dla regulacji syntezy RNA.

Z badania wpływu fosfoproteidów i cAMP na syntezę RNA wynika, że jądrowe kinazy białkowe regulują ją na poziomie polimerazy RNA. Zaobserwowano mianowicie, że w obecności 1 mM db-cAMP włączanie znakowanego trytem UMP do izolowanych jąder zwiększa się o 45% powyżej kontroli (90). Podobne wyniki uzyskano dla wyizolowanej chromatyny (90). Sugeruje to, że cAMP może regulować syntezę RNA działając prawdopodobnie za pośrednictwem kinaz białkowych. Rozdzielając białka niehistonowe z jąder hepatocytów szczura na kolumnie z żelu DEAE-Sephadex w ciągłym gradiencie stężeń siarczanu amonu otrzymuje się dwie frakcje fosfokinaz oraz dwie frakcje białkowe o aktywności polimerazy RNA (90, 91). Wstępna charakterystyka rozdzielonych enzymów wykazała, że tzw. kinazy I i II fosforylują kazeinę. Frakcje polimeraz zostały zidentyfikowane na podstawie wrażliwości na α -amanitynę jako polimeraza I — jąderkowa i polimeraza II — jądrowa (92). Martelo i Hirsch (90) stwierdzili, że w układzie zawierającym DNA z wątroby szczura i homologiczną polimerazę, kinaza I stymuluje wyraźnie syntezę RNA (Tabela 2). Z kolei cAMP stymuluje fosforylację polimerazy I i II. Elektroforeza ufosforylowanego preparatu polimerazy I wykazała, że frakcja odznaczająca się najwyższą aktywnością syntezy RNA zawiera najwięcej łązonego [32 P]fosforanu.

Tabela 2.

Wpływ kinazy I na syntezę RNA (90)

Układ reakcyjny	Włączenie [3 H]UMP (pmole)		Włączenie [32 P]fosforanu (pmole)
	DNA z wątroby szczura	DNA z grasicy cielęcej	
Polimeraza I	1,4	3,2	3,2
Polimeraza I + kinaza I	5,6	3,0	1,1 (-cAMP) 9,0 (+cAMP)
Polimeraza I + kinaza II	2,7	3,0	
Polimeraza II	14,0	21,0	0,0
Polimeraza II + kinaza I	20,0	18,0	3,0 (-cAMP) 6,5 (+cAMP)
Polimeraza II + kinaza II	14,0	20,0	

Kleinsmith i wsp. uzyskali interesujące dane dotyczące wpływu cAMP na syntezę RNA w obecności histonów i preparatu polimerazy II, wykazującego jednocześnie endogenną aktywność kinazy (16). W obecności tego nukleotydu obserwowano odwrócenie hamującego wpływu histonów na aktywność matrycową DNA. Analiza elektroforetyczna znakowanych [³²P]fosforanem polipeptydów preparatu polimerazy wykazała, że cAMP specyficznie hamuje fosforylację jednej z rozdzielonych frakcji (16).

Porównanie przedstawionych danych dotyczących wpływu cAMP i kinaz białkowych na syntezę RNA jest trudne ze względu na niejednoznaczny charakter otrzymanych wyników. Regulacja aktywności polimeraz przez cAMP za pośrednictwem kinaz jest wysoce prawdopodobna. Wydaje się, że fosforylacja frakcji białek ściśle związanych z syntezą RNA nie zależy od fosforylacji innych frakcji białek niehistonowych. Fakt zwiększania przez cAMP aktywności matrycowej w układzie: DNA, histony, polimeraza II może świadczyć o istnieniu specyficznej kinazy działającej bezpośrednio na poziomie syntezy RNA. Niestety nie stwierdzono czy jest to enzym występujący we frakcji polimerazy, czy jeden z wielu związanych z białkami niehistonowymi. Na tym tle wynikają rozbieżności dotyczące umiejscowienia efektu działania kinaz w układzie syntetyzującym RNA.

V. Uwagi końcowe

Uzyskane dotąd dane dotyczące regulacji i aktywności kinaz (93) pozwalają przypuszczać, że aktywność większości tych enzymów jest kontrolowana przez hormony. Jeżeli fosforylacja białek jest ostatnim etapem działania czynników pośredniczących między hormonem a komórką, to można założyć, że proces ten powinien przebiegać według następującego schematu:

- Hormon wiążąc się z receptorami komórkowymi wpływa na aktywność cykazy adenylowej zmieniając stężenie cAMP.
- Ten sam hormon w sposób pośredni może wpływać na syntezę nowych kinaz.
- Wpływ cAMP lub synteza nowych enzymów powoduje zwiększone lub specyficznie zmodyfikowane włączenie fosforanu do substratów kinaz białkowych.
- Ufosforylowanie endogennego substratu powinno zmieniać jego właściwości biologiczne.
- Specyficzna fosfataza może odwracać ten proces.

Wydaje się, że w przypadku kinaz jądrowych można znaleźć przykłady potwierdzające przypuszczenie zawarte w powyższym schemacie. Wykazano bowiem syntezę tych enzymów *de novo* pod wpływem hormonu — trójiodotyroniny (58), który wiąże się z białkami jądrowymi (59) oraz mo-

dulatora chemicznego wiążącego się z receptorami β -adrenalgicznymi (64). Zróznicowany obraz włączania [32 P]fosforanu do białek niehistonowych w obecności cAMP jak i pod wpływem hormonów wskazuje na specyficzność jądrowych kinaz w stosunku do białek tej frakcji. Znaczący jest fakt, że enzymy te związane są z euchromatynowymi odcinkami chromosomów (8, 42, 43).

Przedstawione w rozdziale IV badania ukazują w interesującym świetle rolę kinaz i ich ufosforylowanych substratów w regulacji syntezy RNA (87, 94). Prawdopodobnie za pośrednictwem tych białek hormony stymulują syntezę specyficznych typów mRNA. Poziom fosforanu we frakcji białek niehistonowych może być regulowany przez jądrowe i jąderkowe fosfatazy (15, 60, 95) a także przez histony i poliaminy które stymulują fosforylację tych białek (14, 96, 97).

W świetle wyników badań metabolizmu białek niehistonowych podczas aktywacji genomu, cyklu komórkowego i embriogenezy fosforylacja tych białek okazuje się zjawiskiem powszechnym w kontrolowaniu rozwoju i różnicowania się organizmów (80—86, 98, 99). Specyficzność składu i znakowania [32 P]fosforanem białek niehistonowych stwierdzono dla preparatów otrzymanych z wielu tkanek (14, 100—102). Wyniki tych obserwacji wskazują na białka niehistonowe jako interesujący obiekt do badań nad rolą kinaz białkowych i ich substratów.

Autor dziękuje Panu prof. Zbigniewowi Kaniudze za zachęcenie do napisania niniejszego artykułu oraz za pomocne uwagi w trakcie pracy.

Artykuł nadszedł 27.12.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 28.2.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G., (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 3763—3765.
2. Rubin C. S., Erlichman J., Rosen O. H., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 6135—6139.
3. Walton G. M., Gill G. N., Abrass I. B., Garren L. D., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 880—884.
4. Weller N., Rodnight R., (1970), *Nature*, **225**, 187—188.
5. Maneo A., Johnson R. N., Greengarg P., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 134—142.
6. Chen L. J., Walsh D. A., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3614—3621.
7. Kisch V. M., Kleinsmith L. J., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 750—760.
8. Keller R. K., Socher S. H., Krall J. F., Chanolra T., O'Halley B. W., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 453—459.
9. Davidson J. N., Frazer S. C., Hutchinson W. C., (1951), *Biochem. J.*, **49**, 311—316.
10. Johnson R. N., Albert S., (1953), *J. Biol. Chem.*, **200**, 335—343.
11. Kennedy E. P., Smith S. W., (1954), *J. Biol. Chem.*, **207**, 153—160.
12. Blat C., Harel L., (1964), *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **259**, 3659—3663.

13. Johnson E. M., Allfrey V. G., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 786—794.
14. Allfrey V. G., Johnson E. M., Karn J., Vidali G., (1973), w *Protein Phosphorylation in Control Mechanism*, red. Huying F., Lee E. Y. C., str. 217—250, Academic Press, New York.
15. Rickwood D., Riches P. G., Mac Gillirary J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **299**, 162—171.
16. Kleinsmith L. J., (1975), *J. Cell. Physiol.*, **85**, 459—476.
17. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1182—1189.
18. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 123—130.
19. Kiliańska Z., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 533—558.
20. Kiliańska Z., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1976), *Post. Biol. Kom.*, **3**, 31—50.
21. Langan T. A., Smith L. K., (1967), *Fed. Proc.*, **26**, Abstrakt nr 603.
22. Langan T. A., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5763—5765.
23. Langan T. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 1276—1283.
24. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1966), *Science*, **154**, 780—781.
25. Desjardins P. R., Lue P. F., Liew C. C., Gernall A. G., (1972), *Can. J. Biochem.*, **50**, 1249—1259.
26. Desjardins P. R., Liew C. C., Gornall A. G., (1975), *Can. J. Biochem.*, **53**, 354—363.
27. Takeda M., Yamamura H., Ohga Y., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 103—110.
28. Dastuge B., Tichonicky L., Kruch J., (1974), *Biochimie*, **56**, 491—500.
29. Ruddon R. W., Anderson S. L., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1499—1503.
30. Rikans L. E., Ruddon R. W., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 387—394.
31. Kaplowitz P. B., Platz R. D., Kleinsmith L. J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 739—748.
32. Ahmed K., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **243**, 38—48.
33. Kamiyama M., Dastugue B., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 29—36.
34. Van Leemput-Contrez M., Camus J., Christophe J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 182—190.
35. Johnson E. M., Inoue A., Crouse L. J., Allfrey V. G., Hadden J. W., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 714—721.
36. Keller R. K., Chandra T., Schrader W. T., O'Malley B. W., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1958—1966.
37. Byvoet P., (1971), *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **2**, 78—86.
38. Rikans L. E., Ruddon R. W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 73—86.
39. Frenster J. H., (1965), *Nature*, **206**, 680—681.
40. Tata J., (1968), *Nature*, **219**, 331—337.
41. Prestayko A. W., Klomp G. R., Schmall D. J., Busch H., (1974), *Biochemistry*, **13**, 1945—1951.
42. Grumnt J., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 125—128.
43. Grumnt J., Grumnt E., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 129—132.

44. Ballal M. R., Kang Y., Olson M. O. J., Busch H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5921—5925.
45. Teng C. S., Teng C. T., Allfrey V. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3597—3609.
46. Teng C. S., Hamilton T. H., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1231—1238.
47. Steggles A. W., Spelsberg T. C., O'Malley B. W., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 20—27.
48. Shelton K. R., Allfrey V. G., (1970), *Nature*, **228**, 132—135.
49. Yu F. L., Feigelson P., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 499—506.
50. Schmid W., Sekeris C. E., (1972), *FEBS Letters*, **26**, 109—112.
51. Ahmed K., Ishida H., (1971), *Mol. Pharmacol.*, **7**, 323—327.
52. Schauder P., Starman B. J., Williams R. H., (1974), *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.*, **145**, 331—333.
53. Turkington R. W., Riddle M., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6040—6046.
54. Bottoms G. D., Jungmann R. A., (1973), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Biol.*, **144**, 83—88.
55. Starman B. J., Williams R. H., (1974), *Experientia*, **30**, 1277—1279.
56. Liew C. C., Suria D., Gornall A. G., (1973), *Endocrinology*, **93**, 1025—1034.
57. Gibson K., Tichonicky L., Kruh J., (1975), *Mol. Cell. Biochem.*, **9**, 79—83.
58. Kruh J., Tichonicky L., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 109—115.
59. Thomopoulos P., Dastugue B., Defer N., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 499—506.
60. Kruh J., Courtois Y., Tichonicky L., (1975), *Biochimie*, **67**, 1323—1330.
61. Jost J. P., Hsie A., Hughes S. D., Ryan L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **254**, 351—360.
62. Dokas L. A., Kleinsmith L. J., (1971), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **172**, 1237—1243.
63. Ishida H., Ahmed K., (1973), *Exp. Cell. Res.*, **78**, 31—40.
64. Ishida H., Ahmed K., (1974), *Exp. Cell. Res.*, **84**, 127—136.
65. Chiu J. F., Craddock C., Hnilica L. S., (1973), *FEBS Letters*, **33**, 247—250.
66. Blankenship J., Bresnick E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 218—227.
67. Blankenship J., Kuehl L., (1973), *Mol. Pharmacol.*, **9**, 247—258.
68. Argyris T. S., (1968), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **164**, 405—411.
69. Barka T., (1965), *Exp. Cell. Res.*, **37**, 662—670.
70. Barka T., (1970), *Exp. Cell. Res.*, **62**, 50—56.
71. Krebs E. G., (1972), w Current Topics of Cellular Regulation, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., t. 5, str. 99—128, Academic Press, New York.
72. Soderling T. R., Corbin J. D., Park C. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1822—1829.
73. Pfeifer S. E., Tolmach L. J., (1968), *J. Cell Physiol.*, **71**, 71—93.
74. Farber J., Stein G., Baserga R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 790—797.
75. Gallwitz D., Mueller G. C., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5947—5952.
76. Breinoll M., Gallwitz D., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **32**, 381—391.
77. Stein G.S. Baserga R., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 715—722.
78. Stein G. S., Borun T. W., (1972), *J. Cell. Biol.*, **52**, 292—307.

79. Zeilig C. E., Johnson R. A., Friedman D. L., Sutherland E. W., (1972), *J. Cell. Biol.*, **55**, 296a.
80. Karn J., Johnson M., Vidali G., Allfrey V. G., (1974), *Biol. Chem.*, **249**, 667—677.
81. Platz R. D., Stein G. S., Kleinsmith L. J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 735—740.
82. Kruh J., Courtois Y., Tichonicky L., (1975), *Biochimie*, **57**, 1323—1329.
83. Blat C., Marty de Morales M., Harel L., (1975), w *Post-Synthetic Modifications of Macromolecules*, Proceedings of the Ninth FEBS Meeting, red. Antoni F., Faragó A., t. 34, str. 137—148, Akadémiai Kiadó, Budapest.
84. Blat C., Marty de Morales M., Harel L., (1976), *Exp. Cell Res.*, **98**, 104—110.
85. Brade W. P., Thompson J. A., Chiu J. F., Hnilica L. S., (1974), *Exp. Cell Res.*, **84**, 183—190.
86. Ofenbacher S., Kline E. S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 375—382.
87. Shea M., Kleinsmith L. J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 473—477.
88. Kamiyama M., Dastugue B., Defer N., Kruh J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 576—583.
89. Kamiyama M., Wang T. Y., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 563—583.
90. Martelo O. J., Hirsh J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 1008—1015.
91. Martelo O. J., Hirsh J., (1974), w *Protein Phosphorylation in Control Mechanisms* red. Huiyng F., Lee E. Y. C., str. 198—216, Academic Press, New York.
92. Roeder R. G., Rutter W. J., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **65**, 675—682.
93. Kwast-Welfefeld J., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 383—405.
94. Prestayko A. W., Crane P. M., Busch H., (1976), *Biochemistry*, **15**, 414—421.
95. Imai H., Shimoyama M., Yamamoto S., Tanigawa Y., Ueda I., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 856—861.
96. Olson H., Guetzow K., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 717—722.
97. Kaplowitz P. B., Platz R. D., Kleinsmith L. J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 739—748.
98. Platz R. D., Hnilica L. S., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 222—227.
99. Lazo J. S., Prasad K. N., Ruddon R. W., (1976), *Exp. Cell Res.*, **100**, 41—46.
100. Ezrailson E. G., Olson M. J. O., Guetzow K. A., Busch H., (1976), *FEBS Letters*, **62**, 69—73.
101. Boffa L. C., Vidali G., Allfrey V. G., (1976), *Exp. Cell Res.* **98**, 396—411.
102. Platz R. D., Kleinsmith L. J., (1976), *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **55**, 9—19.

BARBARA WOLSKA-MITASZKO *)

Rola poliamin w syntezie białka

The Role of Polyamines in Protein Biosynthesis

Spis treści

- I. Biosynteza poliamin
- II. Działanie poliamin na poziomie molekularnym
 - II-1. Wpływ poliamin na procesy transkrypcji
 - II-2. Wpływ poliamin na procesy translacji
 - II-2.1. Stabilizacja i zmiany konformacyjne rybosomów
 - II-2.2. Przyłączanie aminoacylo-tRNA do rybosomów
 - II-2.3. Asocjacja podjednostek rybosomowych
 - II-2.4. Inicjacja translacji
 - II-2.5. Powstawanie aminoacylo-tRNA
- III. Uwagi końcowe

Contents

- I. Biosynthesis of polyamines
- II. Action of polyamines on molecular level
 - II-1. Influence of polyamines on transcription process
 - II-2. Influence of polyamines on translation process
 - II-2.1. Stabilization and conformational changes of ribosomes
 - II-2.2. Binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes
 - II-2.3. Association of ribosomal subunits
 - II-2.4. Initiation of translation
 - II-2.5. Formation of aminoacyl-tRNA
- III. Concluding remarks

Poliaminy są związkami występującymi w różnorodnym materiale biologicznym. Liczne dane wskazują, że mogą być one czynnikami regulującymi syntezę kwasów nukleinowych i białek. Obecnie pojawia się coraz

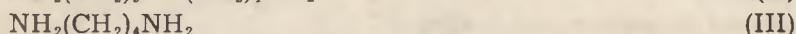
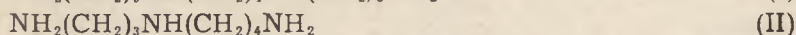
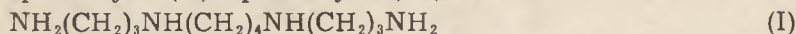
*) Dr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biochemii Uniwersytetu im. M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20—033 Lublin

Wykaz stosowanych skrótów: Fen-tRNA — fenyloalanylo-tRNA; N-ac-Fen-tRNA — N-acetylofenyloalanylo-tRNA; Met-tRNA_f — metionylo-tRNA ulegający formylacji; ppGpp — guanozyno-3'-dwufosforan-5'-dwufosforan.

więcej prac podkreślających korelację między poziomem poliamin w komórce a proliferacją i transformacją nowotworową w tkankach zwierzęcych. Podobną zależność obserwuje się w hodowlach drobnoustrojów. Niniejszy artykuł stanowi przegląd aktualnych doniesień na ten temat ze szczególnym uwzględnieniem wpływu poliamin na procesy transkrypcji i translacji.

I. Biosynteza poliamin

Najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie poliaminy to spermina (I), spermidyna (II) i putrescyna (III):



Dane zgromadzone przez B a c h r a c h a (1) i B e e r a i wsp. (2) wskazują, że poliaminy znaleziono we wszystkich badanych komórkach. W grzybach, bakteriach gram-ujemnych i wirusach występuje putrescyna i spermina, brak w nich natomiast spermidyny. Stężenie poliamin w komórkach drobnoustrojów zależy od fazy wzrostu i warunków hodowli; waha się ono od 5—20 μmoli putrescyny i 1,5—5 μmoli spermidyny na gram świeżej masy bakteryjnej. Minimalne ilości sperminy (0,1—0,5 $\mu\text{mola/g}$ świeżej masy) mogą pochodzić z podłoża. Wysoką zawartością poliamin charakteryzują się wirusy. Suma stężeń putrescyny i spermidyny u faga T4 dochodzi do 250 μmoli na gram świeżej masy, co jest najwyższą stwierdzoną dotąd zawartością poliamin w materiale biologicznym.

Komórki eukariotyczne zawierają przede wszystkim sperminę i spermidynę. Zwraca uwagę wysoka zawartość poliamin w tkankach systemu nerwowego i narządach rozmnażania ssaków. Szczegółowe dane ilościowe na ten temat można znaleźć w monografii B a c h r a c h a (1) i artykule B e e r a i wsp. (2).

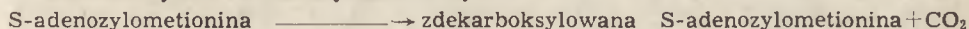
Poliaminy powstają na drodze dekarboksylacji aminokwasów, głównie ornityny (putrescyna) i metioniny (spermidyna i spermina). Dekarboksylaza ornitynowa (E.C. 4.1.1.17) jest enzymem o wysokiej specyficzności substratowej, wymaga fosforanu pirydoksalu jako koenzymu i aktywowana jest przez związki zawierające grupy SH (3, 4, 5). Donatorem grup propyloaminowych w syntezie spermidyny i sperminy jest zdekarboksylowana S-adenozylometionina, która powstaje w wyniku działania dekarboksylazy S-adenozylometioniny (E.C. 4.1.1.50). Dekarboksylaza S-adenozylometioniny z tkanek zwierzęcych aktywowana jest przez putrescynę (6, 7). Specyficzna propyloaminotransferaza, syntetaza spermidyny przenosi grupy propyloaminowe na putrescynę. Syntetaza sperminy przyłącza te grupy do spermidyny, co prowadzi do utworzenia sperminy (8, 9).

Kolejność działania enzymów uczestniczących w syntezie poliamin w komórkach zwierzęcych przedstawiono na schemacie 1.

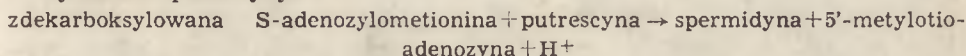
1. Dekarboksylaza ornitynowa:



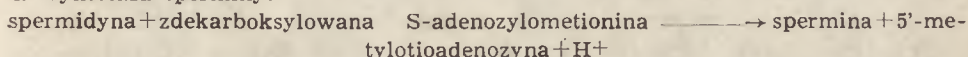
2. Dekarboksylaza S-adenozylometioniny:



3. Syntetaza spermidyny:



4. Syntetaza sperminy:



Schemat 1. Enzymy biosyntezy poliamin

W komórkach pewnych bakterii i roślin wyższych dekarboksylacja argininy może prowadzić przez agmatynę ($\text{NH}_2\text{C}(\text{NH}/\text{CH}_2/4\text{NH}_2)$) do wytworzenia putrescyny. Natomiast w tkankach zwierzęcych nie obserwuje się tego procesu (10, 11). Ponadto u bakterii możliwa jest przemiana enzymatyczna argininy przez ornitynę w putrescynę (cyt. wg 2).

Enzym ATP: adenozylotransferaza L-metioniny katalizujący w obecności Mg^{2+} syntezę S-adenozylometioniny z ATP i L-izomeru tego aminokwasu limituje biosyntezę spermidyny i sperminy (12). Kluczowym punktem regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu poliamin są zmiany aktywności dwóch zasadniczych dla biosyntezy tych związków dekarboksylaz: dekarboksylazy ornitynowej i dekarboksylazy S-adenozylometioniny. Znaczącym jest fakt, że równolegle z szybką syntezą RNA i białka następuje bardzo szybki wzrost poziomu aktywności obu tych enzymów (13—16). Prowadzi to do zwiększenia ilości poliamin m.in. w regenerującej wątrobie (17, 18), w hipertrofii mięśnia sercowego (19), podczas rozwoju zarodków szczurzych (20) i komórek raka Ehrlicha (21, 22). Natomiast w powoli rosnących tkankach narządów takich jak: płuca, śledziona czy mięśnie szkieletowe, aktywność dekarboksylazy ornitynowej i dekarboksylazy S-adenozylometioniny pozostaje na stałym, stosunkowo niskim poziomie (13, 16).

II. Działanie poliamin na poziomie molekularnym

Poliaminy wiążą się z lipidami i kwasami nukleinowymi. Niekowalentne połączenie zasadowych grup poliaminowych z resztami fosforanowymi kwasów nukleinowych stabilizuje drugorzędową strukturę DNA (23—26) oraz pętlowe odcinki struktury tRNA (27, 28). Wykazano *in vitro*, że poliaminy w odpowiednich stężeniach mogą powodować przekształcenie konfi-

guracji tRNA z formy nieaktywnej w formę aktywną przez wzmacnianie dwupasmowej struktury (29, 30). Poliaminy reagują również zarówno z naturalnym mRNA jak i z pojedynczymi pasmami syntetycznych polinukleotydów jak poliU i poliA, co wykazano przez obserwację profilów termicznej denaturacji (31, 32). Stwierdzono, że spermina i spermidyna w stężeniu 0,1 mM podwyższa temperaturę topnienia syntetycznych dwupasmowych rybopolinukleotydów jak poliI:C (33). Pozwala to przypuszczać, że poliaminy mogą pełnić rolę nieswoistego inhibitora procesów degradacji mRNA, rRNA czy tRNA. Wykazano ponadto, że degradująca rybosomy RNaza wykazuje mniejszą aktywność hydrolityczną w obecności sperminy lub spermidyny (34, 35). Powyższe dane mogą częściowo wyjaśniać ochraniające przed denaturacją termiczną i degradacją enzymatyczną oddziaływanie poliamin na kwasy nukleinowe (36—39), z czym związane jest stabilizowanie takich elementów subkomórkowych jak rybosomy (40, 41) i jądra (42, 43). Natomiast stabilizowanie całych komórek bakteryjnych, protoplastów, retikulocytów, mitochondriów czy cząstek fagowych związane jest z mniejszą wrażliwością błon cytoplasmatycznych na zmiany ciśnienia osmotycznego w obecności poliamin (44—49).

II-1. Wpływ poliamin na procesy transkrypcji

Powszechnie obserwowany związek między poziomem poliamin a syntezą RNA sugeruje, że poliaminy mogą regulować syntezę RNA i białka. W stężeniach milimolarnych poliaminy stymulują procesy transkrypcji między innymi zabezpieczając RNA przed degradacją (36, 38, 39) czy współzawodnicząc z takimi czynnikami toksycznymi jak chinina, atebryna (50) i leworfanol (51). W wyższych stężeniach (50 mM i powyżej) poliaminy hamują syntezę RNA powodując powstawanie zarówno niekorzystnej konformacji matrycy (32) jak i tendencji do agregacji (52) lub formowania produktów toksycznych (53). Fakt, że w tkankach szybkorosnących wzrost poziomu RNA i poliamin zachodzi równolegle (14—16, 54, 55) potwierdza obserwacje wskazujące, że oddziaływanie poliamin na intensywność procesów transkrypcji zależy od ich stężenia.

Strukturalne i funkcjonalne różnice genomu organizmów prokariotycznych i eukariotycznych pozwalają przypuszczać, że mechanizm działania poliamin na poziomie transkrypcji jest różny u tych dwóch grup organizmów.

Prokariotyczna transkrypcja *in vitro* stymulowana jest przez poliaminy w milimolarnych stężeniach. Może to wynikać zarówno ze wzrostu poziomu aktywności polimerazy RNA zależnej od DNA (56—58), jak i z interakcji poliamin z nowopowstającym RNA co prowadzi do uwolnienia go z kompleksu DNA—enzym—nowopowstały RNA (56, 57, 59, 60).

W organizmach eukariotycznych, wpływ poliamin na proces transkrypcji *in vitro* może dotyczyć:

- niespecyficznego wpływu sperminy czy spermidyny w stężeniach milimolarnych na aktywność polimerazy RNA na etapie inicjacji syntezy RNA co prowadzi do uwalniania łańcuchów nowopowstałego RNA z kompleksu DNA—enzym—RNA (61). Być może obecność poliamin w stężeniach milimolarnych zabezpiecza nowoutworzony RNA przed degradacją (62). Ponadto poliaminy w zakresie stężeń od 0.1 do 2 mM stymulują elongację RNA (63—65);
- wysoce specyficznego oddziaływania sperminy w stężeniu mikromolarnym na dostępność matrycy DNA dla formy B polimerazy RNA (65). Być może spermina w stężeniu 1 μ M specyficznie stabilizuje miejsca wiązania enzymu z matrycą bądź powoduje zmiany drugorzędowej struktury przez zmianę reorientacji histonów lub białek niehistonowych (65).

Stymulacja acetylacji histonów przez poliaminy stwierdzona *in vivo* i *in vitro* (66, 67) wskazuje na udział poliamin w jądrowych modyfikacjach chromatyny. Wykazano, że podczas tworzenia kompleksu DNA—nukleo-histon, spermina współzawodniczy z każdą z frakcji histonu o miejsce wiązania z matrycą (68). Natomiast alifatyczne dwuaminy zwiększają syntezę DNA przez odszczepienie histonu z kompleksu nukleohistonowego (69). Metylacja histonów hamowana jest przez sperminę i spermidynę (70). Poliaminy w fizjologicznych stężeniach stymulują *in vitro* fosforylację niehistonowych białek chromatyny (71) lecz wykazują zróżnicowany wpływ na aktywność kinaz białkowych (72). Putrescyna, spermidyna i spermina w stężeniach milimolarnych mogą hamować *in vitro* aktywność kinazy fosforylującej histon, zależnej od cyklicznego AMP, ale stymulują fosforylację kazeiny niezależną od cyklicznego AMP. Nie wyjaśniono dotąd czy akumulacja poliamin *in vivo* może powodować modyfikację kinaz białkowych.

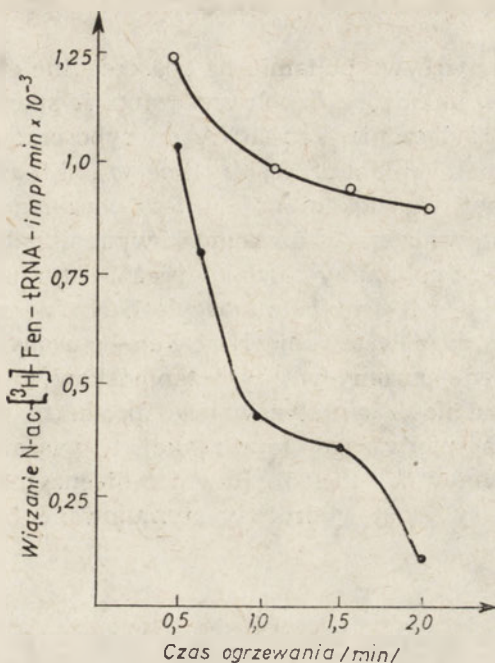
II-2. Wpływ poliamin na procesy translacji

Zaobserwowano, że dodanie poliamin do układów bezkomórkowych *in vitro* pozwoli na zastosowanie magnezu w niższych stężeniach (ang. *magnesium shift*) (34, 73—77) z zachowaniem intensywności syntezy białka charakterystycznej dla warunków optymalnych (74, 77—79); nie można jednak całkowicie usunąć Mg^{+2} z układu. Liczne dane pozwalają przypuszczać, że stymulujący syntezę białka wpływ poliamin może dotyczyć nie tylko bezpośredniego oddziaływania elektrostatycznego lecz i specyficznego udziału tych związków w procesach zachodzących na rybosomach jak i w powstawaniu aminoacylo-tRNA.

II-2.1. Stabilizacja i zmiany konformacyjne rybosomów

Poliaminy stabilizują rybosomy przez interakcję z kwasami nukleinowymi. Sądzi się, że poliaminy mogą zajmować te same miejsca co Mg^{2+} lub przynajmniej część miejsc „magnezowych” w strukturze rybosomu, przy czym najsilniejsze jest oddziaływanie czterech protonowych grup sperminy (80). Poliaminy mogą neutralizować przynajmniej 1/3 reszt fosforanowych rRNA u bakterii (81). Rola poliamin i jonów magnezu w utrzymaniu funkcji rybosomów nie jest równoważna. Zastąpienie więcej niż 70% Mg^{2+} związanego z rybosomami *E. coli* prowadzi do utraty ich aktywności w reakcji polimeryzacji fenyloalaniny (78). Prawdopodobnie dla utrzymania biologicznej aktywności rybosomów niezbędny jest pewien krytyczny poziom magnezu, którego nie można zastąpić jakimkolwiek innym kationem organicznym lub nieorganicznym. Niemniej obecność poliamin w surowych preparatach rybosomów, łatwość wiązania się dodawanych z zewnątrz poliamin z rybosomami i stymulacja inkorporacji aminokwasów *in vitro*, pozwalają przypuszczać, że poliaminy stanowią składniki rybosomów niezbędne dla maksymalnej syntezy polipeptydów. Wysunięto przypuszczenia, że stabilizowanie rybosomów przez poliaminy może polegać na takiej zmianie konformacji rybosomu, która zabezpiecza rRNA przed uszkadzającym działaniem nukleaz. Wykazano, że poliaminy w niskich stężeniach (0,1—1 mM) hamują autodegradację rybosomów przez stabilizację takiej konformacji rybosomów, która utrzymuje w stanie zamaskowanym zasocjowaną z rybosomami rybonukleazę I (41). Możliwość powstawania zmian konformacyjnych rybosomów wywołanych obecnością poliamin potwierdzają doświadczenia, w których rybosomy *E. coli* preinkubowane (w 37°C) ze sperminą ulegają wyraźnym zmianom wyrażającym się odmiennym powinowactwem do erytromycyny i dwuhydrostreptomycyny (85, 86). Zmianom powinowactwa pod działaniem sperminy towarzyszy zahamowanie aktywności transferazy peptydylowej, integralnego składnika dużej podjednostki rybosomowej. Ten hamujący wpływ sperminy można całkowicie odwrócić przez zastosowanie NH_4^+ w wysokich stężeniach (200 mM). Można przypuszczać, że poliaminy w odpowiednich stężeniach mogą powodować zmianę konformacji rybosomu na optymalną dla syntezy białka *in vitro*. Stwierdzono, że kompleksy rybosom—poli U—N-ac-Fen-tRNA naśladujące naturalne kompleksy typu rybosom—peptydylo-tRNA (87), wykazują w obecności sperminy wyższą stabilność termiczną i mniejszą podatność na degradację w temperaturze 50° (Ryc. 1).

Badanie zdolności rybosomów do tworzenia wyżej wymienionych kompleksów po preinkubacji ze sperminą w różnych temperaturach wskazuje przy braku aktywności RNazowej w układzie, że rybosomy są miejscem zabezpieczanym przez sperminę (Tabela 1).



Ryc. 1. Stabilność kompleksu rybosom—poli U—N-ac-³H-Fen-tRNA w temperaturze 50°C (87).

○—○ kompleks wytworzony w obecności 0,4 mM sperminy,
 ●—● kompleks wytworzony w nieobecności sperminy. Stężenie Mg²⁺ wynosiło 30 mM. Wytworzone kompleksy ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 50°C, oziębano i sączono przez filtry miliporowe. Radioaktywność oznaczano w liczniku scyntylacyjnym f-my Packard.

Tabela 1.

Wpływ preinkubacji rybosomów na zdolność tworzenia kompleksów rybosom—poliU—N-ac-Fen-tRNA (87)

Zmienne składniki preinkubacji	Wiązanie N-ac-[³ H]-Fen-tRNA (imp/min)	
	Temperatura preinkubacji	
	30°C	45°C
5 mM Mg ²⁺ 0,4 mM spermina	1000	500
5 mM Mg ²⁺	920	250
0,4 mM spermina	260	240

Mieszanka użyta do preinkubacji zawierała około 200 μg rybosomów. Próbki preinkubowano 2 min. w 30°C lub 45°C. Następnie stężenie Mg²⁺ doprowadzono do końcowego stężenia 10 mM, dodawano sperminę, jeśli brak jej było podczas preinkubacji, i dodawano N-ac-[³H]Fen-tRNA. Inkubację kontynuowano w 30°C przez 20 min.

II-2.2. Przyłączanie aminoacylo-tRNA do rybosomów

Podczas badania wpływu poliamin na poszczególne etapy procesu elongacji polipeptydu w układzie z *E. coli* wykazano, że spermidyna stymuluje jedynie reakcję przyłączania Fen-tRNA do rybosomów (34). Poliaminy w stężeniach optymalnych dla procesu polimeryzacji fenyloalaniny nie stymulowały ani reakcji translokacji ani syntezy wiązania peptydowego. Doświadczenia przeprowadzone w bezkomórkowym układzie z drożdży (77) również wskazują, że poliaminy bardzo wyraźnie stymulują reakcję przyłączania aminoacylo- i N-acetyloaminoacylo-tRNA do rybosomu zaś nieznacznie wpływają na powstawanie N-ac-Fen—puromycyny. Badając powstawanie N-ac-Fen—puromycyny w bezkomórkowym układzie z *E. coli*, wykazano że wzrost ilości syntetyzowanego produktu wynikał ze stymulacji przez sperminę pierwszego etapu reakcji tj. wiązania acetylowej pochodnej do rybosomów *E. coli* (85). Również nieenzymatyczne przyłączenie Fen-tRNA do rybosomów drożdży stymulowane było przez sperminę (88).

II-2.3. Asocjacja podjednostek rybosomowych

Spontaniczna asocjacja podjednostek rybosomowych zależy od obecności jonów magnezu w odpowiednim stężeniu. Poliaminy również mogą indukować asocjację podjednostek rybosomowych *in vitro* (89—91). Wykazano, że izolowane z bakterii i organizmów eukariotycznych białkowe czynniki (82—83) asocjują podjednostki rybosomowe przy niskim stężeniu magnezu. Badania Garcia - Patrone i wsp. (94) z laboratorium Algrana i tiego wykazały, że spermina i spermidyna są aktywnymi składnikami czynnika asocjującego podjednostki rybosomowe z *Bacillus stearothermophilus*. Asocjacja podjednostek może być jednym z fizjologicznych efektów działania poliamin. Doświadczenia z radioaktywną spermidyną (95) wskazują, że poliaminy wiążą się z obiema podjednostkami rybosomowymi, ale jedynie wiązanie [³H]spermidyny z podjednostką 30S prowadzi do utworzenia aktywnych połączeń 30S—50S (Tabela 2).

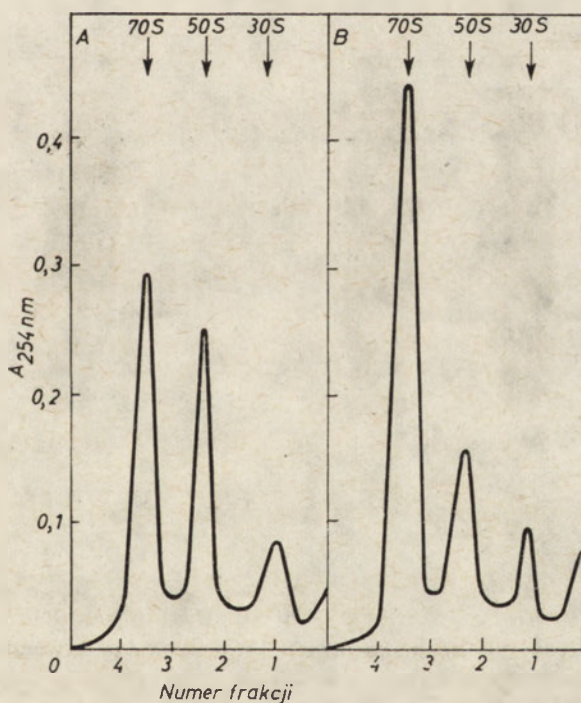
Dalsze badania Algrana i tiego i wsp. (96) nad aukсотroficznymi mutantami *E. coli* z zablokowaną syntezą putrescyny potwierdzają przypuszczenia, że poliaminy działają asocjująco na podjednostki rybosomowe *in vivo*. Przypuszczalnie brak poliamin *in vivo* może powodować zmianę proporcji cząstek rybosomowych wynikającą z naruszenia równowagi między ilością wolnych podjednostek a ilością monomerów 70S w komórce (Ryc. 2).

Profile sedymentacji rybosomów z lizatów komórek *E. coli* nie zawierających poliamin oraz z komórek rosnących w środowisku zawierającym putrescynę różnią się znacznie. Profil sedymentacji rybosomów z lizatu komórek *E. coli* nie zawierającej poliamin charakteryzuje się małą ilością

Tabela 2.

Wiązanie [^3H] spermidyny do podjednostek rybosomowych i tworzenie par 30S–50S (95)

Warunki etapu wiązania			Związane cząsteczki spermidyny na podjednostkę	Asocjacja (%)
Podjednostki rybosomowe	Stężenie spermidyny (mM)	Temperatura inkubacji ($^{\circ}\text{C}$)		
30 S	0,5	25	0,8	0
	2,0	25	2,4	0
	0,5	65	1,2	48
	2,0	65	3,3	46
50 S	0,5	25	1,7	0
	2,0	25	4,2	0
	0,5	65	3,6	0
	2,0	65	8,3	0



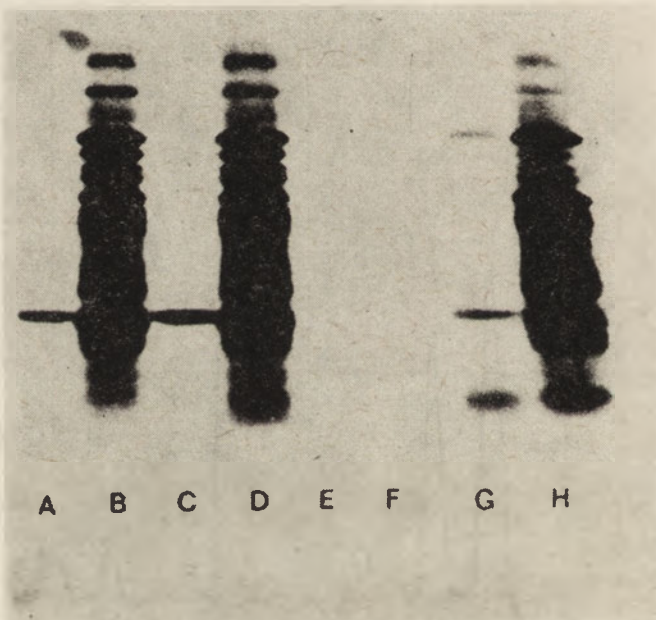
Ryc. 2. Zmiana proporcji cząstek rybosomowych w komórkach *E.coli* pod wpływem poliamin (96).

Ekstrakty komórkowe analizowano po ultrawlirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy.

A. Profil sedimentacji rybosomów z lizatu komórek *E. coli* rosnących w podłożu nie zawierającym poliamin.

B. Profil sedimentacji rybosomów z bakterii, do których dodano putrescynę na 30 min. przed przerwaniem hodowli.

rybosomów 70S i podjednostek 30S w porównaniu z dużą ilością podjednostek 50S (Ryc. 2A). Wykazano, że specyficzny dla braku poliamin stan cząstek rybosomowych w komórce *E. coli* nie zależy od braku źródła węgla (glukozy) czy azotu. Dodanie putrescyny do hodowli komórek *E. coli* nie zawierających tej poliaminy powodowało już po 30 minutach gwałtowną zmianę profilu sedymentacji rybosomów charakteryzującą się wzrostem ilości monomerów 70S i prawidłowym stosunkiem między ilością podjednostek (Ryc. 2B). Tą zmianę proporcji cząstek rybosomowych występującą zanim nastąpią zmiany szybkości wzrostu hodowli, *in vitro* można uzyskać przez dializę wobec spermidyny. Oznacza to, że poliaminy mogą bezpośrednio wpływać na równowagę między połączeniami 30S—50S a ilością wolnych podjednostek rybosomowych *in vivo*. Wykazano ponadto, że oddziaływanie poliamin nie jest w tym wypadku zależne od procesu transkrypcji a miejscem działania poliamin są rybosomy (97). Nienormalny stan proporcji cząstek rybosomowych w komórkach *E. coli* nie zawierających poliamin wynika prawdopodobnie z zakłóceń w biosyntezie lub akumulacji podjednostek 30S podczas głodu poliaminowego.



Ryc. 3. Autoradiogram białek znakowanych [^{35}S]-metioniną utworzonych w bezkomórkowej syntezie *in vitro* (98).

Mieszanka reakcyjna zawierała:

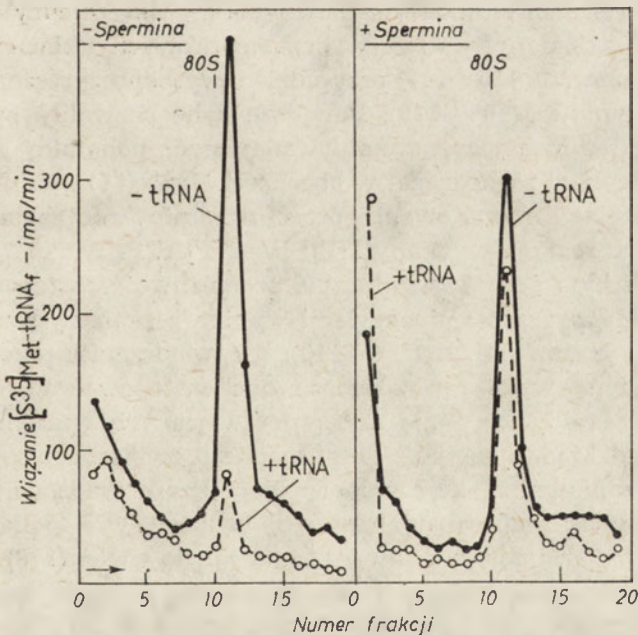
- A. surowe czynniki inicjujące +3 mM Mg^{2+} minus mRNA,
- B. surowe czynniki inicjujące +3 mM Mg^{2+} +mRNA z soczewki oka,
- C. surowe czynniki inicjujące +2 mM Mg^{2+} +0,25 mM spermidyna minus mRNA,
- D. surowe czynniki inicjujące +2 mM Mg^{2+} +0,25 mM spermidyna + mRNA z soczewki oka,
- E. dializowane czynniki inicjujące +3 mM Mg^{2+} minus mRNA,
- F. dializowane czynniki inicjujące +3 mM Mg^{2+} +mRNA z soczewki oka,
- G. dializowane czynniki inicjujące +2 mM Mg^{2+} +1 mM spermidyna minus mRNA,
- H. dializowane czynniki inicjujące +2 mM Mg^{2+} +1 mM spermidyna + mRNA

Elektroferazę przeprowadzono w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Kliszę światłoczułą eksponowano przez zetknięcie z suchym żelom przez okres 2 dni.

II-2.4. Inicjacja translacji

Ostatnie doniesienia (84, 98) wskazują, że poliaminy mogą również odgrywać pewną rolę w inicjacji syntezy białka. Frakcja białkowa wymywana z rybosomów retikulocytów królika 0,5 M KCl zawiera dające się oddzielić składniki niezbędne dla maksymalnej syntezy globiny *in vitro*, które zidentyfikowano jako sperminę i spermidynę (84). Dodanie poliamin do przedializowanej frakcji popłuczyn rybosomowych (ang. *ribosomal salt wash*) może przywracać jej aktywność w syntezie białka *in vitro*, przy czym uzyskuje się dwukrotnie wyższe wbudowywanie radioaktywnych aminokwasów mimo obniżenia stężenia jonów magnezu poniżej poziomu charakterystycznego dla procesu inicjacji. Efekt ten dotyczy syntezy kierowanej zarówno przez poliU jak i przez naturalny mRNA globiny. Wykazano ponadto, że na rybosomach retikulocytów zachodzi kompetytywne inhibicja między spermidyną a edeiną, antybiotykiem selektywnie hamującym inicjację.

Salden i Bloemendal (98) również zaobserwowali, że dodanie poliamin przywraca aktywność przedializowanej frakcji surowych czynników inicjujących z rybosomów retikulocytów. Spermidyna w stężeniu 1 mM przywracała aktywność przedializowanym czynnikom inicjującym



Ryc. 4. Powstawanie kompleksu inicjującego 80S—Met-tRNA_i—AUG (99).

Kompleksy analizowano po ultrawirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy.

○ --- ○ powstawanie kompleksu inicjującego w obecności 5 pmoli tRNA-Leu

● ——— ● powstawanie kompleksu inicjującego w nieobecności zdeacylowanego tRNA

Mieszanina inkubacyjna zawierała 5 mM MgCl₂, 0,5 pmola [³⁵S]Met-tRNA_i (15 000 imp/min.) Stężenie sperminy wynosiło 0,4 mM.

w stopniu porównywalnym z frakcją niedializowaną (Ryc. 3B i 3H). Właściwości oddializowanej frakcji (niski ciężar cząsteczkowy, zachowanie aktywności po traktowaniu alkaliami i RNazą z trzustki, niewytrącanie etanolem i odporność na wysoką temperaturę) pozwalają przypuszczać, że poliaminy mogą wchodzić w skład surowej frakcji czynników inicjujących.

Na udział poliamin w inicjacji translacji wskazują także badania powstawania kompleksu inicjującego AUG—Met-tRNA_f—rybosomy 80S w obecności poliamin w bezkomórkowym układzie z wątroby szczura (99). Dodanie sperminy znosi w znacznym stopniu inhibicję powstawania tego kompleksu powodowaną przez zdeacylowany tRNA (Ryc. 4).

Fakt, że poliaminy mogą stabilizować lub zmieniać konformację rybosomów najprawdopodobniej w miejscu P (78, 82, 105), w sposób który zmniejsza powinowactwo do zdeacylowanego tRNA przy zwiększeniu powinowactwa do inicjatorowego aminoacylo-tRNA (99), oraz sugestie co do regulującej roli zdeacylowanego tRNA w inicjacji syntezy białka (100—104) mogą wskazywać na bezpośredni udział poliamin w tworzeniu kompleksów inicjujących.

II-2.5. Powstawanie aminoacylo-tRNA

Spermina, spermidyna i putrescyna mogą zastępować Mg^{2+} podczas powstawania różnych aminoacylo-tRNA, takich jak izoleucylo-, leucylo-, lizylo-, czy fenyloalanylo-tRNA w bezkomórkowych układach z *E. coli* i wątroby szczura (30, 105—107) przy udziale wysokooczyszczonych aminoacylo-tRNA syntetaz (108—110). Powyższe dane pozwoliły przypuszczać, że mechanizm aminoacylacji stymulowanej przez poliaminy może różnić się od aminoacylacji zachodzącej w obecności Mg^{2+} (111—113). Wykazano, że w aminoacylacji stymulowanej przez poliaminy nie zachodzi zależna od aminokwasu reakcja wymiany [³²P]PP z [³²P]ATP.

Nie można było jednak wykluczyć, że możliwość zastępowania Mg^{2+} przez poliaminy podczas aminoacylacji wynika z zanieczyszczenia preparatów tRNA jonami Mg^{2+} (114—116). Doświadczenia przeprowadzone z [¹⁴C]spermidyną wykazały, że może ona zastępować Mg^{2+} związany z tRNA, podczas gdy Mg^{2+} nie zastępuje związanych wcześniej poliamin (117). Bardzo dokładne pomiary ilości magnezu związanego z tRNA i pozostałymi składnikami reakcji aminoacylacji przeprowadzone przy pomocy spektrofotometru absorpcji atomowej wykazały, że poliaminy mogą zastępować Mg^{2+} podczas powstawania aminoacylo-tRNA (118). Nie wyjaśniono nadal czy w warunkach fizjologicznych, in vivo, aminoacylacja w obecności poliamin może zachodzić bez tworzenia intermediatu jakim jest aminoacylo-AMP—enzym.

Oprócz wyżej przedstawionych możliwości regulującego wpływu poliamin na układ syntetyzujący białko wykazano, że stymulacja inkorporacji aminokwasów przez poliaminy może zależeć od rodzaju użytego mRNA,

a przede wszystkim od ilości zawartych w nim reszt uracylowych (119). Może to oznaczać, że podczas syntezy białka zachodzi specyficzna interakcja poliamin z matrycowym RNA.

Próby sprawdzenia wpływu poliamin w układach zawierających naturalny mRNA są nieliczne a wyniki niejednoznaczne (76). W układach bezkomórkowych z tkanek ssaków kierowanych przez różne naturalne mRNA (jak mRNA z komórek infekowanych adenowirusem typ 2, mRNA globinowy 9S i RNA bakteriofagów QB, MS2 i R17) poliaminy specyficznie wzmagają syntezę poszczególnych peptydów w różnym stopniu (120). W bezkomórkowych ekstraktach z kielków pszenicy spermina wzmagają translację naturalnych mRNA ze szczególną preferencją dotyczącą syntezy dużych peptydów (121).

Nie ma również wielu danych co do bezpośredniej funkcji poliamin *in vivo*. Użycie mutantów *E. coli* z obniżoną zdolnością do syntezy poliamin pozwoliło wykazać, że zarówno szybkość syntezy mRNA dla β -galaktozydazy jak i szybkość syntezy samego enzymu są obniżone o 35—40% (122). W efekcie głodu aminokwasowego w komórkach *E. coli* szczepu *stringent* (124) następuje obniżenie syntezy poliamin a przede wszystkim spermidyny w wyniku zahamowania aktywności dekarboksylazy ornitynowej przez guanozyno-czterofosforan (ppGpp). Nukleotyd ten bierze udział w regulacji syntezy RNA (125—127) i białka (128). To również pozwala przypuszczać, że synteza poliamin związana jest z syntezą kwasów nukleinowych i syntezą białka.

III. Uwagi końcowe

Korelacja między intensywnością syntezy RNA a poziomem poliamin sugeruje, że poliaminy regulują syntezę RNA a więc pośrednio syntezę białka i procesy wzrostu komórek. Z drugiej strony wiele danych wskazuje na bezpośredni udział poliamin w regulacji syntezy białka poprzez oddziaływanie na etap translacji. Większość badań dotyczy jednakże działania poliamin *in vitro*. Chociaż wiadomo, że *in vivo* poliaminy działają jako biologiczne stymulatory wzrostu wielu mikroorganizmów, tkanek roślinnych i zwierzęcych, mechanizm ich działania nie jest dostatecznie wyjaśniony.

Fakt, że poliaminy występują w najwyższych stężeniach w tkankach o wysokiej zawartości RNA i aktywnie syntetyzujących białko, jak również bardzo szybki wzrost poziomu aktywności enzymów biorących udział w syntezie poliamin w komórkach ulegających transformacji nowotworowej, potwierdza regulujący wpływ poliamin na syntezę białka *in vivo*. Obecnie gromadzi się coraz więcej prac na temat ścisłego powiązania biosyntezy poliamin z transformacją nowotworową komórek. Zagadnienie to wymagałoby jednak odrębnego opracowania.

PIŚMIENICTWO

1. Bachrach U., (1973), w *Function of Naturally Occurring Polyamines*, str. 1—34, New York, London, Academic Press, Inc.
2. Beer J. Z., Rosiek O., Sabliński J. M., (1966), *Post. Biochem.*, **12**, 63—94.
3. Jänne J., Williams-Ashman H. G., (1970), *Biochem. J.*, **119**, 595—597.
4. Bachrach U., Ben-Joseph M., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 75—77.
5. Jänne J., Williams-Ashman H. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1725—1732.
6. Pegg A. E., Williams-Ashman H. G., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 682—693.
7. Raina A., Hannonen P., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 1—4.
8. Jänne J., Schenone A., Williams-Ashman H. G., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 758—764.
9. Hannonen P., Jänne J., Raina A., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 341—348.
10. Williams-Ashman H. G., Pegg A. E., Lockwood D. H., (1969), *Advances in Enzyme Regulation*, **7**, 291—323.
11. Smith T. A., (1970), *Ann. NY Acad. Sci.*, **171**, 988—1001.
12. Lombardini J. B., Talalay P., (1971), *Advances in Enzyme Regulation*, **9**, 349—384.
13. Russel D. H., Snyder S. H., (1969), *Mol. Pharmacol.*, **5**, 253—262.
14. Russel D. H., Lombardini J. B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 273—286.
15. Williams-Ashman H. G., Coppoc G. L., Weber G., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 1924—1932.
16. Morris D. R., Fillingame R. H., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 303—325.
17. Raina A., Jänne J., Hannonen P., Höltä E., (1970), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **171**, 697—708.
18. Russel D. H., McVicker T. A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 85—93.
19. Caldarera C. M., Casti A., Rossoni C., Moruzzi G., (1971), w 7th Meeting FEBS, 196, Varna, (Abst.).
20. Russel D. H., (1970), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **171**, 772—782.
21. Siimes M., Jänne J., (1967), *Acta Chem. Scand.*, **21**, 815—817.
22. Anderson G., Heby O., (1972), *J. Nat. Cancer Inst.*, **48**, 165—172.
23. Tabor H., (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 382—385.
24. Mahler H. R., Dutton G., Mehrotra B. D., (1964), *Fed. Proc.*, **23**, 217.
25. Mandel M., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 435—441.
26. Stevens L., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 811—815.
27. Cohen S. S., Morgan S., Streibel E., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 669—676.
28. Cohen S. S., (1970), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **171**, 869—881.
29. Ishida T., Sueoka N., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5329—5336.
30. Igarashi K., Takeda Y., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **213**, 240—243.
31. Savino M., Ascoli F., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 569—572.
32. Ikemura T., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 389—395.
33. Lampson G. P., Tytell A. A., Field A. K., Nemes M. M., Hilleman M. R., (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 212—218.
34. Igarashi K., Sugawara K., Izumi I., Nagayama Ch., Hirose S., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **48**, 495—502.
35. Khawaja J. A., Raina A., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 512—518.

36. Mitra S., Kaesberg P., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 146—151.
37. Schlenk F., Dainko J. L., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 127—133.
38. Goldstein J., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 620—623.
39. Brakke M. K., Van Pelt N., (1969), *Virology*, **39**, 516—533.
40. Hardy S. J. S., Turnick G., (1971), *Nature, New Biology*, **299**, 17—19.
41. Erdman V., Thomas G., Norton J., Herbst E., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 43—51.
42. Busch H., Narayan K. S., Hamilton J., (1967), *Exp. Cell Res.*, **47**, 329—336.
43. Russell D. H., Levy C. C., Taylor R. L., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 212—217.
44. Herbst E. J., Witherspoon B. H., (1960), *Fed. Proc.*, **19**, 138.
45. Tabor C. W., (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 117—120.
46. Little J. R., (1962), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **109**, 910—912.
47. Brown A. D., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 132—144.
48. Razin S., (1964), *J. Gen. Microbiol.*, **36**, 451—459.
49. Stevens L., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 811—815.
50. O'Brien R. L., Olenick J. G., Hahn F. E., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1511—1517.
51. Simon E. J., Cohen S. S., Raina A., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 482—487.
52. Agrell J. P. S., Heby O., (1968), *Exp. Cell Res.*, **50**, 668—671.
53. Caldarera C. M., Casti A., De Sanctis B., Moruzzi G., (1971), *FEBS Letters*, **14**, 29—32.
54. Jänne J., (1967), *Acta Physiol. Scand.*, **300**, 7—71.
55. Caldarera C. M., Barbirolli B., Moruzzi G., (1965), *Biochem J.*, **97**, 84—88.
56. Fox C. F., Gumpert R. J., Weiss S. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2101—2109.
57. Fuchs E., Millete R. L., Zillig W., Walter G., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **3**, 183—193.
58. Abraham K. A., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 143—146.
59. Fox C. F., Weiss S. B., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 175—185.
60. So A. G., Davie E. W., Epstein R., Tissières A., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 1736—1746.
61. Stripe F., Novello F., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **15**, 505—512.
62. Raina A., Jänne J., (1970), *Fed. Proc.*, **29**, 1568—1574.
63. Mandel J. L., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 367—378.
64. Jänne O., Bardin C. W., Jacob S. T., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3589—3597.
65. Moruzzi G., Barbirolli B., Moruzzi M. S., Tadolini B., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 697—703.
66. Moruzzi G., Caldarera C. M., Casti A., (1974), *Mol. Cell. Biochem.*, **3**, 153—161.
67. Caldarera C. M., Casti A., Guarnieri C., Moruzzi G., (1975), *Biochem. J.*, **152**, 91—98.
68. Agrell I., Heby O., (1971), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 39—42.
69. Schwimmer S., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 251—254.
70. Cory M., Henry D. W., Taylor D. L., Koskela K. J., (1974), *Chem. Biol. Interactions*, **9**, 253—259.
71. Imai H., Shimoyama M., Yamamoto S., Tanigawa Y., Ueda I., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 856—862.

72. Murray A. W., Froscio M., Rogers A., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1175—1181.
73. Fleischer-Lambropoulos H., Sarkander H.-J., Brade W. P., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 792—800.
74. Igarashi K., Hikami K., Sugawara K., Hirose S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **299**, 325—330.
75. Algranati I. D., Lengyel P., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 1778—1783.
76. Takeda Y., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **179**, 232—234.
77. Wolska-Mitaszko B., Jakubowicz T., Gąsior E., (1976), *Acta Microbiol. Pol.*, **25**, 187—197.
78. Weiss R. L., Morris W. R., (1973), *Biochemistry*, **12**, 435—441.
79. Tabor H., Tabor C. W., (1972), *Adv. Enzymol.*, **36**, 203—268.
80. Suwalsky M., Traub W., Shmueli U., Subirana J. A., (1969), *J. Mol. Biol.*, **42**, 363—373.
81. Zillig W., Krone W., Albers M., (1959), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **317**, 131—143.
82. Kimes B. W., Morris D. R., (1973), *Biochemistry*, **12**, 442—449.
83. Zitomer R. S., Flaks J. G., (1972), *J. Mol. Biol.*, **71**, 263—279.
84. Konecki D., Kramer G., Pinphanichakarn P., Hardesty B., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 192—198.
85. Teraoka H., Tanaka K., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 578—583.
86. Teraoka H., Tanaka K., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 423—429.
87. Jakubowicz T., Wolska-Mitaszko B., Gąsior E., Kucharzewska T., (1976), *Acta Microbiol. Pol.*, **25**, 199—204.
88. Tanner M. J. A., (1967), *Biochemistry*, **6**, 2686—2694.
89. Cohen S. S., Lichtenstein J., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2112—2116.
90. Norton J. W., Erdman V. A., Herbst E. J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 293—295.
91. Silman N., Artman M., Engelberg H., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **103**, 231—240.
92. García-Patrone M., Gonzalez N. S., Algranati J. D., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2822—2825.
93. Kyner D., Levin D. H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1056—1060.
94. García-Patrone M., Gonzalez N. S., Algranati I. D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 373—380.
95. García-Patrone M., Algranati I. D., (1976), *FEBS Letters*, **66**, 39—43.
96. Algranati I. D., Echandi G., Goldemberg S. H., Cunningham-Rundles S., Maas W. K., (1975), *J. Bacteriol.*, **124**, 1122—1127.
97. Echandi G., Algranati I. D., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 313—319.
98. Salden M., Bloemendal H., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 157—161.
99. Kyner D., Zabos P., Levin D. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **324**, 386—396.
100. Leder J. G., Bursztyn H., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1579—1585.
101. De Groot N., Panet A., Lapidot Y., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 728—734.
102. Zasloff M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **76**, 445—453.
103. Watanabe S., Tanaka K., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 728—734.

104. Vaughan M. H., Hansen B. S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7087—7096.
105. Igarashi K., Matsuzaki K., Takeda Y., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 476—487.
106. Takeda Y., Igarashi K., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 917—924.
107. Igarashi K., Takahashi K., Hirose S., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 234—240.
108. Doctor B. P., Fournier M. J., Thornsvarð C., (1970), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **171**, 863—868.
109. Kayne M. S., Cohn M., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1285—1291.
110. Pastuszyn A., Lofftfield R. B., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 775—783.
111. Matsuzaki K., Takeda Y., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 339—351.
112. Lofftfield R. B., (1972), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **12**, 87—128.
113. Lofftfield R. B., Eigner E. A., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1746—1754.
114. Thiebe R., (1975), *FEBS Letters*, **51**, 259—261.
115. Chakraburttý K., Midelfort C. F., Steinschneider A., Mehler A. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3861—3865.
116. Santi D. V., Webster R. W. Jr., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3874—3877.
117. Takeda Y., Ohnishi T., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 611—617.
118. Takeda Y., Ogiso Y., (1976), *FEBS Letters*, **66**, 332—335.
119. Igarashi K., Watanabe Y., Hirose S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 407—413.
120. Atkins J. F., Lewis J. B., Anderson C. W., Gerteland R. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5688—5695.
121. Marcu K., Dudock B., (1974), *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1385—1397.
122. Morris D., Hansen M. F., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 588—592.
123. Raina A., Jansen M., Cohen S. S., (1967), *J. Bacteriol.*, **94**, 1684—1696.
124. Hölta E., Jänne J., Pispá J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1104—1111.
125. Fiil N. P., von Meyenburg K., Friesen J. D., (1972), *J. Mol. Biol.*, **71**, 769—783.
126. Lazzarini R. A., Cashel M., Gallant J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4381—4385.
127. Travers A., (1973), *Nature*, **244**, 15—18.
128. Gallant J., Irr J., Cashel M., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5812—5816.

ANDRZEJ L. PAWLAK *)

Homotropowe i heterotropowe oddziaływania w ludzkiej hemoglobinie A

Homotropic and Heterotropic Interactions in Human Hemoglobin A

Spis treści

- I. Budowa ludzkiej hemoglobiny A
- II. Czynności hemoglobiny A
 - II-1. Homotropowe i heterotropowe mechanizmy regulacji przenoszenia O₂ i CO₂ przez hemoglobinę
 - II-2. Modele oddziaływań homotropowych
 - II-3. Budowa przestrzenna hemoglobiny a mechanizmy oddziaływań homotropowych
 - II-4. Właściwości hybrydów różniących się ligandami lub budową hemów przy łańcuchach α i β
- III. Zmiany równowagi konformacji R i T w przypadkach dziedzicznie uwarunkowanych odmian hemoglobiny A
- IV. Powstawanie i właściwości methemoglobiny. Interakcja methemoglobiny z ligandami allosterycznymi

Contents

- I. The structure of human hemoglobin A
- II. The function of hemoglobin A
 - II-1. The homotropic and heterotropic regulation of O₂ and CO₂ transport by hemoglobin

*) Dr, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów: hem (II), hem (III) — hemy z żelazem dwuwartościowym i trójwartościowym; Hb, HbO₂ — hemoglobina A odtlenowana i utlenowana; HbCO — hemoglobina tlenkowęgłowa; Hb (III) — methemoglobina; Hb (III H₂O) — forma H₂O (kwaśna) methemoglobiny; Hb (III OH) — forma OH (zasadowa) methemoglobiny; Hb (IICN) — cyjanomethemoglobina; $\alpha_2^{II} \text{CN} \beta_2$, $\alpha_2 \beta^{III} \text{CN}$ — hybrydy łańcuchów cyjanomethemoglobiny z łańcuchami wiążącymi tlen; $\alpha_2^{III} \beta_2$, $\alpha_2 \beta_2^{III}$ — hybrydy łańcuchów zawierających żelazo trójwartościowe z łańcuchami wiążącymi tlen; p₅₀ — ciśnienie parcjalne tlenu odpowiadające nasyceniu ligandem, $y = 0,5$; n₅₀ — współczynnik interakcji hemów w reakcji utlenowania hemoglobiny odpowiadający nasyceniu ligandem w 50%; E_m — potencjał oksydacyjno-redukcyjny przy utlenieniu związku w 50%; 2,3-DPG — 2,3-dwufosfoglicerynian; IHP — sześciofosforan inozytolu; T, R — konformacje czwartorzędowe Hb (*tense*) i HbO₂ (*relaxed*); t, r — konformacje trzeciorzędowe łańcuchów w Hb i HbO₂; e.p.r. — elektronowy rezonans paramagnetyczny.

II-2. The models of homotropic interactions**II-3 The conformation of hemoglobin and homotropic interactions****II-4. The properties of valency hybrids and heme-modified hybrid hemoglobins****III. The changes in equilibrium of R and T states in hereditary variants of hemoglobin A****IV. The oxidation of hemoglobin and properties of methemoglobin. Binding of allosteric ligands to methemoglobin**

Hemoglobina była przedmiotem badań i analiz z najrozmaitszych punktów widzenia i z zastosowaniem wyjątkowo szerokiego wachlarza metod (1). Na łamach *Postępów Biochemii* czynność i budowę hemoglobiny przedstawiała K w i a t k o w s k a (2), a heterotropowe oddziaływania związków fosforowych — P a w ł a k (3) i Gondko (4). L e y k o i wsp. przedstawili ostatnio analizę mechanizmów czynności hemoglobiny w kontekście poznanych właściwości innych białek oddechowych (4a). Obecne omówienie opiera się przede wszystkim na nowszych doniesieniach dotyczących właściwości hemoglobiny i w szerszym zakresie uwzględnia modele reakcji allosterycznych przydatne do interpretacji mechanizmów czynności hemoglobiny.

I. Budowa ludzkiej hemoglobiny A

Ludzka hemoglobina A (*adult* = typu dorosłego) składa się z czterech łańcuchów polipeptydowych zawierających po jednej grupie hemowej. W cząsteczce hemoglobiny występują dwa rodzaje łańcuchów: α i β różniące się składem aminokwasów (141 w łańcuchu α i 146 w łańcuchu β) i kodowane przez odrębne, niesprężone geny strukturalne.

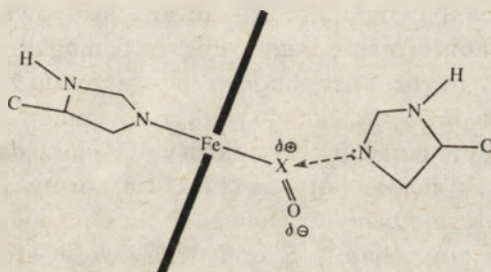
Informacje o przestrzennej budowie hemoglobiny, uzyskane w wyniku badań prowadzonych przez P e r u t z a i wsp. bez przerwy od roku 1937, stanowią obecnie podstawę do wyciągania szczegółowych wniosków o związkach pomiędzy budową a czynnością tego białka. Ważnymi etapami w tym zakresie było poznanie przy pomocy dyfrakcji promieni rentgenowskich z dokładnością do 2,8 Å budowy przestrzennej utlenowanej (HbO₂) hemoglobiny końskiej (5, 6), a następnie jej formy nieutlenowanej (Hb) (7).

Pozycję każdego aminokwasu w łańcuchach polipeptydowych oznacza się w dwojaki sposób: kolejną cyfrą od końca NH₂, oraz kolejnością w oznaczonych dużymi literami alfabetu odcinkach łańcuchów polipeptydowych wyróżnionych na podstawie budowy drugorzędowej (α -heliks lub forma przypadkowego zwinięcia). Określenie pozycji aminokwasu w odcinkach łańcucha (od A do H) informuje w przybliżeniu o położeniu tej reszty w trójwymiarowym modelu cząsteczki. Grupa hemowa w każdym łańcuchu wiąże się kowalently z resztą histydyny określaną jako proksymalna — F8 (87 α i 92 β); identyczna pozycja tej reszty w odcinku F jest wy-

razem homologii w budowie łańcuchów α i β . Miejsce wiążące ligand w obu rodzajach łańcuchów tworzy hem z sąsiednią resztą histydyny — E7 (58 α i 63 β), oraz waliny — E11 (62 α i 67 β). W hemoglobinie utlenowanej cząsteczka tlenu łączy się z atomem żelaza w sposób asymetryczny, to znaczy dwa atomy tlenu znajdują się w różnych odległościach od atomu żelaza (8, 9). W zależności od stanu wartościowości żelaza hemu, hemoglobina wiąże następujące ligandy: O_2 , CO, NO (żelazo zredukowane) lub H_2O , OH^- , F^- , N_3^- , CN^- (żelazo trójwartościowe). Poglądy na charakter wiązania pomiędzy tymi ligandami (zwłaszcza O_2) a żelazem zostały przedstawione w rozdziale IV.

Pozostałe wiązania pomiędzy hemem a globiną (w liczbie około 60) odgrywają ważną rolę w stabilizacji cząsteczki globiny oraz w przenoszeniu zmiany konformacji hemu na sąsiednie łańcuchy (10).

Właściwości różnych form hemoglobiny (hemoglobiny związanej z różnymi ligandami) często są związane ze spinem żelaza. Spin Fe zależy od



Ryc. 1. Schemat wiązania hemu w hemoglobinie

X oznacza C, N lub O. Ładunek dodatni X jest stabilizowany wiązaniem z pierścieniem imidazolowym dystalnej histydyny, w którym azot jest donorem elektronu a X — akceptorem (14)

Tabela 1.

Formy hemoglobiny A i ich spiny

Hemoglobina	Ligand Fe	Spin
Fe(II)		
Hemoglobina utlenowana (HbO ₂)	O ₂	0
Hemoglobina tlenowęglowa (HbCO)	CO	0
Hemoglobina ze związanym tlenkiem azotu (HbNO)	NO	0
Hemoglobina odtlenowana (Hb)	—	2
Fe(III)		
Methemoglobina kwaśna (Hb III H ₂ O)	H ₂ O	5/2
Methemoglobina zasadowa (Hb III OH)	OH ⁻	1/2, 5/2
Fluoromethemoglobina (Hb III F)	F ⁻	5/2
Azydek methemoglobiny (Hb III N ₃)	N ₃ ⁻	1/2
Cyjanomethemoglobina (Hb III CN)	CN ⁻	1/2

Tabela 2.

Konfiguracje spinów elektronów 3d i odpowiadające im wartości spinu Fe

	Wiązanie z ligandem	Konfiguracja elektronów 3d	Całkowity spin
(Fe ²⁺)(3d) ⁶	jonowe	$\uparrow\downarrow \mid \uparrow \mid \uparrow \mid \uparrow \mid \uparrow$	2
(Fe ³⁺)(3d) ⁵		$\uparrow \mid \uparrow \mid \uparrow \mid \uparrow \mid \uparrow$	5/2
(Fe ²⁺)(3d) ⁶	kowalencyjne	$\uparrow\downarrow \mid \uparrow\downarrow \mid \uparrow\downarrow \mid \mid \mid$	0
(Fe ³⁺)(3d) ⁵		$\uparrow\downarrow \mid \uparrow\downarrow \mid \uparrow \mid \mid \mid$	1/2

sparowania elektronów 3d, przy czym Fe(II) posiada 6 elektronów 3d, natomiast Fe(III) — 5 elektronów 3d. W tabeli 2 przedstawiono stany sparowania tych elektronów i odpowiadające im stany spinu atomu Fe. Wartości spinów różnych form hemoglobiny podano w tabeli 1. Wysokość spinu Fe wyznacza paramagnetyczne właściwości hemoglobiny. Ponieważ globina jest diamagnetyczna, hemoglobina utlenowana jest również diamagnetyczna ze względu na konformację hemu. Formy hemoglobiny — odtlenowana i związana z ligandem różnią się budową przestrzenną zarówno w zakresie struktury trzeciorzędowej łańcuchów, jak konformacji tetrameru.

Stany konformacji łańcuchów struktury trzeciorzędowej oznacza P e - r u t z symbolami t (*tense* — napięta struktura formy odtlenowanej) oraz r (*relaxed* — struktura formy utlenowanej mniej zmieniona w porównaniu z izolowanymi łańcuchami). Szereg właściwości struktury trzeciorzędowej ma określone znaczenie w reakcji wiązania ligandów hemu przez hemoglobinę. W β t kieszonka hemowa jest za ciasna aby zmieścić ligand, podczas gdy w kieszonce α t jest dosyć miejsca na cząsteczkę O₂ — właściwości te odgrywają rolę w kolejności utlenowania łańcuchów α przed łańcuchami β . Przedostatnie aminokwasy w łańcuchach α i β — tyrozyny 140 α i 145 β w konformacji t znajdują się w kieszonkach pomiędzy spiralami F i H odpowiednich łańcuchów. W konformacji r zostają one wypchnięte z tych kieszonek, co pociąga za sobą przemieszczenie się końcowych aminokwasów Arg 141 α i His 146 β i zerwania wiązań łączących łańcuchy, a więc zmianę struktury czwartorzędowej.

Struktura czwartorzędowa hemoglobiny to ułożenie dwóch łańcuchów α i dwóch łańcuchów β względem siebie oraz ich wzajemne powiązanie. Opisana budowa przestrzenna Hb i HbO₂ odpowiada dwóm stanom struktury czwartorzędowej: T i R. W obu stanach konformacyjnych hemoglobina jest symetryczna, co oznacza istnienie osi, wokół której obrót cząsteczki o 180° powoduje nałożenie na siebie pozycji jednoimiennych łańcuchów. Różnice pomiędzy obydwoma stanami konformacyjnymi wyrażają się między innymi odległościami pomiędzy atomami żelaza — różnymi w Hb i HbO₂ (Tabela 3).

Tabela 3.

Odległości pomiędzy atomami żelaza w hemoglobinie
końskiej (w Å) (11)

	Hb	HbO ₂
Fe β_1 —Fe β_2	39,9	33,4
Fe α_1 —Fe α_2	34,9	36,0
Fe β_1 —Fe α_2]	24,7	25,0
Fe β_2 —Fe α_1]		
Fe α_1 —Fe β_1]	36,9	35,0
Fe α_2 —Fe β_2]		

Wiązania pomiędzy łańcuchami w hemoglobinie mają w większości charakter niepolarny; poza tym występują wiązania jonowe i wodorowe, nie ma natomiast wiązań kowalencyjnych. Niepolarne reszty aminokwasowe poza płaszczyznami kontaktu łańcuchów występują w kieszonce hemowej. Szczegółowo poznane zmiany wiązań jonowych pomiędzy łańcuchami hemoglobiny sprzężone z transformacją T \rightarrow R zostaną omówione w rozdziale II-3 w kontekście sekwencji zmian proponowanej przez Perutz a (10).

Wiązania pomiędzy łańcuchami różnią się trwałością i w roztworach w warunkach fizjologicznych tetramer znajduje się w równowadze dysocjacji z dimerami o składzie $\alpha\beta$. Dla oznaczania płaszczyzny dysocjacji w tetramerze stosujemy notację dysocjujących dimerów: $\alpha^1\beta^1$ i $\alpha^2\beta^2$. Kontakty pomiędzy łańcuchami można opisać symbolami: $\alpha^1 - \beta^1$ w odniesieniu do kontaktu łańcuchów tworzących dimer i odpowiednio $\alpha^1 - \beta^2$ oraz $\alpha^1 - \alpha^2$ na określenie kontaktów pomiędzy łańcuchami dysocjujących dimerów. Dysocjacja tetrameru na dimery jest w HbO₂ około 3×10^4 razy większa aniżeli w Hb odtlenowanej. Oznacza to, że ta ostatnia w warunkach fizjologicznych występuje prawie wyłącznie jako tetramer (12).

II. Czynność hemoglobiny A

Hemoglobina nie jest enzymem, jednak właściwość swoistego i odwracalnego wiązania ligandów hemu odpowiada reakcji wiązania substratu przez enzym. Badania tej reakcji hemoglobiny w znacznym stopniu przyczyniły się do powstawania koncepcji allosterycznej regulacji funkcji białek. Zaawansowanie badań czynności i budowy hemoglobiny sprawia, że interpretacja tych danych jest podstawą tworzenia modeli czynności hemoglobiny, które są przydatne również do oceny allosterycznych mechanizmów występujących w innych białkach.

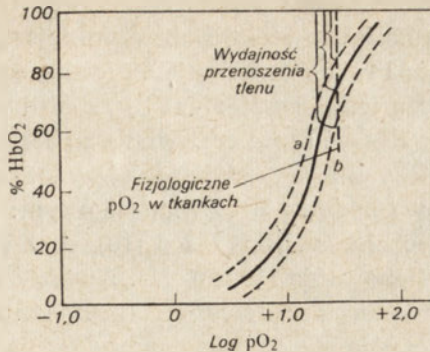
Następujące pojęcia z zakresu regulacji allosterycznej czynności białek będą przydatne w opisie właściwości hemoglobiny (13):

- konformacja białka — przeciętne pozycje atomów w stanie równowagi termodynamicznej cząsteczki;
- zmiana konformacji — dotyczy tych zmian pozycji atomów, które nie tworzą i nie zrywają wiązań kowalencyjnych, zwykle rozważa się zmiany odwracalne w warunkach doświadczalnych;
- ligand — cząsteczka wiążąca się w sposób odwracalny ze swoistym miejscem aktywnym w cząsteczce białka; jon wodorowy jest ligandem, w aspekcie przyłączania do określonych atomów w białku;
- efekt allosteryczny — oddziaływanie nie przylegających do siebie miejsc aktywnych w białku; miejsca te i związane z nimi ligandy nie mają bezpośredniego kontaktu i nie oddziałują na drodze elektrostatycznej; oddziaływanie zachodzi poprzez zmianę konformacji białka;
- białko allosteryczne — zawiera wzajemnie oddziałujące nieprzylegające do siebie miejsca aktywne;
- efektor — ligand, który poprzez swoje miejsce wiązania oddziałuje na nieprzylegające miejsca białka;
- oddziaływanie homotropowe — oddziaływanie pomiędzy identycznymi miejscami aktywnymi, które wiążą takie same cząsteczki liganda;
- oddziaływanie heterotropowe — oddziaływanie pomiędzy nieprzylegającymi miejscami aktywnymi różniącymi się budową i rodzajem wiązanego liganda.

II-1. Homotropowe i heterotropowe mechanizmy regulacji przenoszenia O₂ i CO₂ przez hemoglobinę

Różnice pomiędzy właściwościami hemów w łańcuchach α i β (10, 14) sugerują, że termin interakcja homotropowa nie jest w pełni adekwatny na określenie interakcji pomiędzy hemami w Hb. Niemniej stosowane zgodnie z tradycją określenie to wyróżnia wspomnianą interakcję od wpływu na reakcję utlenowania takich afektorów heterotropowych, jak 2,3-dwufosfoglicerynian (2,3-DPG), H⁺, CO₂.

Interakcje homotropowe pomiędzy hemami objawiają się sigmoidalnym wykresem wiązania tlenu w funkcji stężenia liganda (Ryc. 2), co odróżnia reakcję allosteryczną od reakcji przebiegających zgodnie z prawem równowagi mas charakteryzujących się hiperbolicznym przebiegiem krzywej. Fizjologiczne znaczenie interakcji hemów polega na ułatwieniu przenoszenia tlenu przez hemoglobinę ponieważ oznacza duże zmiany wysycenia hemoglobiny przy stosunkowo niewielkich zmianach pO₂. Sigmoidalny kształt krzywej wiązania tlenu przez Hb sprawia, że w zakresie fizjolo-



Ryc. 2. Krzywe wiązania tlenu przez hemoglobinę w krwinkach czerwonych; wpływ zmian powinowactwa (p_{50}) na wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone (3)

gicznych wartości ciśnienia tlenu, zmniejszenie powinowactwa Hb do tlenu zwiększa różnicę utlenowania hemoglobiny pomiędzy krwią tętniczą a krwią żylną, a tym samym zwiększa wydajność przenoszenia tlenu przez krwinki czerwone. Alternatywny mechanizm zwiększenia tej wydajności poprzez obniżenie ciśnienia tlenu w tkankach jest przeważnie niepożądany. Wyjaśnia to znaczenie fizjologicznej regulacji przenoszenia O_2 przez heterotropowe efekторы, jak H^+ , CO_2 i 2,3-DPG, które zmniejszają powinowactwo hemoglobiny do tlenu (Ryc. 2).

Ocenę wydajności przenoszenia tlenu przez hemoglobinę wykazującą prawidłową interakcję hemów można opierać na wartościach $p_{50}O_2$, to znaczy ciśnienia parcjalnego tlenu, przy którym Hb jest utlenowana w 50%. Przy zmienionej interakcji hemów należy uwzględnić to, że wydajność przenoszenia tlenu *in vivo* zależy przede wszystkim od kształtu krzywej wiązania tlenu w zakresie wartości wysycenia hemoglobiny jakie stwierdza się *in vivo* (3).

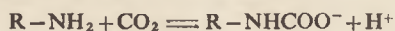
Pierwszym heterotropowym efektem opisanym w hemoglobinie był efekt Bohra, który dotyczył zmian powinowactwa tlenowego (p_{50}) pod wpływem zmian pCO_2 (15). Później wytłumaczono te zmiany wpływem pH, nie odróżniając go od wpływu CO_2 i od tego czasu nazwa efekt Bohra jest używana na określenie wpływu H^+ na wiązanie O_2 przez hemoglobinę.

Powinowactwo Hb do tlenu jest najniższe przy pH około 6,5 i wzrasta przy wzroście pH (alkaliczny efekt Bohra) oraz przy obniżeniu wartości pH (kwaśny efekt Bohra). Alkaliczny efekt Bohra jest mechanizmem fizjologicznym i jako taki budzi większe zainteresowanie aniżeli kwaśny.

W roku 1914 Christiansen, Douglas i Haldane stwierdzili wiązanie większej ilości jonów H^+ przez Hb w porównaniu z HbO_2 . Stąd odnoszące się do zasadowego efektu Bohra określenie, że HbO_2 jest silniejszym kwasem aniżeli Hb, jest nazwane efektem Haldane'a (16).

Zmodyfikowana hemoglobina pozbawiona grupy His 146 β — des (His 146 β)Hb wykazuje alkaliczny efekt Bohra zmniejszony do połowy (17). Grupa imidazolowa His 146 β determinuje 50% alkalicznego efektu Bohra. Zidentyfikowano jeszcze jedną resztę: Val 1 α , której wiązanie H^+ jest silniejsze w Hb aniżeli w HbO_2 , i która odpowiada za 25% efektu Bohra w zakresie zasadowym. Efekt Bohra jest bardziej związany z trzeciorzędową aniżeli z czwartorzędową budową Hb. Świadczą o tym: występowanie efektu Bohra w izolowanych łańcuchach α i β (18), oraz szybkość uwalniania protonów w reakcji utlenowania (19, 20, 21). Kwaśny efekt Bohra wydaje się w całości zależeć od trzeciorzędowej struktury łańcuchów (18).

Hemoglobina przyczynia się do transportu CO_2 poprzez krążenie krwi w dwojaki sposób: neutralizuje H_2CO_3 za pośrednictwem efektu Bohra, oraz wiążąc CO_2 bezpośrednio do grup aminowych Val 1 α i Val 1 β . Wiązanie bezpośrednie zachodzi w reakcji:



zachodzącej tylko pomiędzy niezjonizowanymi grupami aminowymi i CO_2 , przy czym produktem są karbaminiany. Badania hemoglobin z zablokowanymi grupami Val 1 α lub Val 1 β wykazały, że grupy aminowe Val 1 β warunkują większą część obniżenia powinowactwa hemoglobiny pod wpływem CO_2 (22). Tworzenie karbaminianu Val 1 β jest szybsze (23) i silniej sprzężone z odtlenowaniem (24), aniżeli tworzenie karbaminianu Val 1 α . Val 1 α wiąże nie tylko CO_2 , ale również H^+ , co oznacza współzawodniczenie tych dwóch efektorów o to miejsce. W oddziaływaniu z Val 1 β CO_2 współzawodniczy z 2,3-DPG. Pomimo tego współzawodnictwa 2,3-DPG zwiększa wydajność całkowitego transportu CO_2 zwiększając efekt Bohra hemoglobiny. W obecności fizjologicznych stężeń 2,3-DPG tylko 12% transportu (netto) odbywa się w formie karbaminianów, podczas gdy przy obniżonym stężeniu 2,3-DPG ta forma stanowi 30% transportu (25).

Stosunkowo niedawno zidentyfikowano trzecią klasę heterotropowych efektorów obniżających powinowactwo hemoglobiny do tlenu (26,27). Są to związki fosforowe: 2,3-DPG w krwinkach czerwonych ssaków i sześciofosforan inozytolu (IHP) w krwinkach czerwonych ptaków. Badania czynnościowe wykazały, że Hb wiąże te związki silniej od HbO_2 i że wiązanie następuje w proporcji 1 cząsteczka efektora na tetramer.

Miejsce wiązania 2,3-DPG w szczelinie pomiędzy łańcuchami β , sugerowane przez Perutz'a (10) zostało potwierdzone bezpośrednio badaniami krystalograficznymi kompleksu Hb-DPG (28). Miejsce to nie występuje w HbO_2 . His 143 β okazuje się ważnym miejscem wiązania pomiędzy Hb a 2,3-DPG, ponieważ brak tej reszty w hemoglobinie płodowej (Hb F) znacznie obniża wiązanie tego efektora, co jest przyczyną zwiększonego powinowactwa krwi płodowej do tlenu w porównaniu z krwią człowieka dorosłego (29). Wpływ ATP na wiązanie tlenu przez Hb jest bardzo zbliżony do wpływu 2,3-DPG (30). Niemniej w krwinkach czerwonych ATP wy-

stępuje głównie w formie kompleksu z Mg^{2+} , który nie wpływa na powinowactwo Hb do tlenu (31).

Wszystkie efekty heterotropowe w hemoglobinie oprócz zmiany wiązania O_2 oddziałują na siebie wzajemnie. Oddziaływanie to może być rozpatrywane w kategoriach funkcji sprzężonych opisanych przez Wymana (32):

$$\left(\frac{\Delta \log aY}{\Delta \log aX} \right)_{zY} = \left(\frac{\Delta zHbX}{\Delta zHbY} \right)_{aX}$$

gdzie X i Y oznacza ligandy hemoglobiny, a oznacza aktywność (liganda w roztworze), zHb — frakcję hemoglobiny związaną z ligandem. Prawidłowa krew w procesie odtlenowania wiąże około 0,5 H^+/O_2 ; dwutlenek węgla w formie karbaminianów uwalnia protony z hemoglobiny odtlenowanej i w ten sposób obniża wymieniony wskaźnik do 0,4 H^+/O_2 ; 2,3-DPG wiąże dodatkowe protony i dlatego zwiększa efekt Bohra do 0,8 H^+/O_2 (33).

11-2. Modele oddziaływań homotropowych

Interakcja hemów w reakcji wiązania tlenu przez hemoglobinę objawia się sigmoidalnym przebiegiem krzywej nasycenia.

Pierwszą hipotezę na temat mechanizmów wyjaśniających to zjawisko podał Hill (34), proponując sprzężony charakter wiązania tlenu do n miejsc w cząsteczce hemoglobiny, co opisał wzorem:

$$\frac{y}{1-y} = Kp^n$$

gdzie K oznacza stałą równowagi reakcji, a p — ciśnienie tlenu. Dane doświadczalne w zakresie wartości $0,1 < y < 0,9$ wskazują na wielkość n około 3. Mechanizm proponowany przez Hilla nie znalazł potwierdzenia w dalszych badaniach wykazujących cztery miejsca aktywne w cząsteczce hemoglobiny (35), wartości n zbliżające się do 1 przy krańcowych wartościach y (36) oraz kinetykę wiązania liganda nie potwierdzającą występowania reakcji wyższego rzędu (37). Niemniej wartość n z wzoru Hilla jest nadal używana jako ilościowy wskaźnik interakcji hemów. Sigmoidalny wykres zależności pomiędzy wiązaniem tlenu przez Hb a stężeniem O_2 można przedstawić inaczej w formie wykresu równania Hilla:

$$\log \frac{y}{1-y} = n \log p + \log K$$

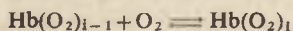
Roztwory Hb A i jej odmian wykazują w tym wykresie prostoliniowe zmiany parametrów w zakresie wartości y od 0,1 do 0,9. Nachylenie tej linii jest miarą interakcji hemów (n).

Schemat Adaira (38), który zastąpił hipotezę Hilla wprowadził oddzielne stałe równowagi dla wiązania liganda z poszczególnymi hemami.

Ma on charakter wyłącznie fenomenologiczny i nie sugeruje nic w odniesieniu do strukturalnych mechanizmów reakcji. Wzór Adaira ma postać:

$$Y = \frac{K_1 p + 2K_1 K_2 p^2 + 3K_1 K_2 K_3 p^3 + 4K_1 K_2 K_3 K_4 p^4}{4(1 + K_1 p + K_1 K_2 p^2 + K_1 K_2 K_3 p^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 p^4)}$$

przy czym stałe równowagi K_i odpowiadają etapom reakcji:



dla $i = 1-4$, a p — oznacza ciśnienie parcjalne O_2 , K_i zależy od stałej wiązania (k'_i) i stałej dysocjacji (k_i):

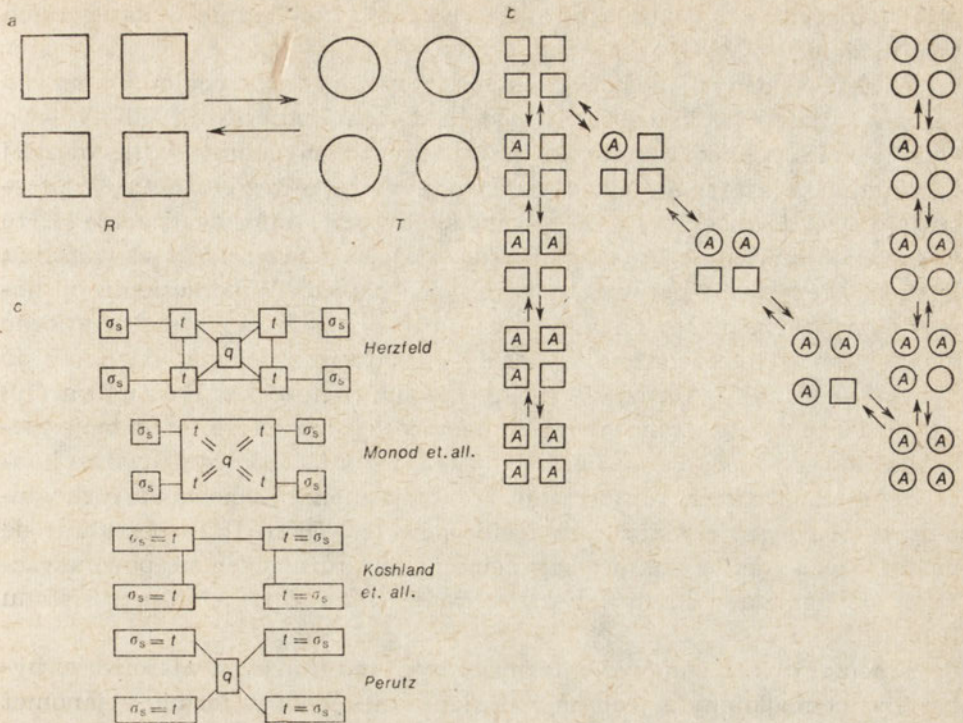
$$K_i = \frac{k'_i}{k_i}$$

W prawidłowej hemoglobinie interakcja hemów wyraża się wartościami K_4 $300 \times$ większymi od K_1 (39).

Stałe K_1 i K_4 oznaczono na podstawie odpowiednio szybkości początkowej reakcji utlenowania oraz szybkości reakcji wymiany O_2 na CO mierzonych metodą stop flow. Stałą k'_i oznaczano przy pomocy fotolizy łańcuchów hemoglobiny związanych z CO w roztworze HbO_2 zawierającym niewielką ilość hemów (CO). Ponieważ w roztworze tym $p\text{O}_2$ znacznie przewyższało $p\text{CO}$ po fotolizie hemów (CO) reagowały one z O_2 , a kinetyka tej reakcji była funkcją k'_i (40). Stałą k_i w najprostszy sposób można zmierzyć dodając małą ilość O_2 do roztworu Hb z podsiarczynem sodowym. Bezpośrednio po zmieszaniu powstaje niewielka ilość HbO_2 , która dysocjuje wskutek obniżenia $p\text{O}_2$ przez podsiarczyn. Szybkość dysocjacji hemów (O_2) jest wyznaczona stałą k_i (41).

W zakresie strukturalnych mechanizmów interakcji hemów w hemoglobinie proponowane modele można podzielić na dwie grupy. Pierwsza opiera się na założeniu, że powinowactwo tlenowe cząsteczki hemoglobiny jest wyznaczone liczbą hemów wysyconych ligandem, a końcowe etapy reakcji są ułatwione pod wpływem hemów utlenowanych. Należą tutaj modele Paulinga (42) oraz Koshlanda, Nemethy i Filmera (K—N—F) (43). Ten ostatni jest określony jako model wielostopniowych zmian konformacji (*sequential model*), lub jako model wzbudzonego dopasowania (*induced fit*) (Ryc. 3b). Do drugiej grupy należy model dwóch konformacji Monod—Wyman—Changeux (13), który w przeciwieństwie do modelu K—N—F zakłada, że powinowactwo nie zależy bezpośrednio od ilości miejsc aktywnych wysyconych ligandem tylko od równowagi dwóch konformacji czwartorzędowych o różnym powinowactwie. W odniesieniu do białek zawierających kilka podjednostek jest to model sprzężonych zmian konformacji łańcuchów (*concerted model*) (Ryc. 3a).

W oderwaniu od mechanizmów interakcji hemów można twierdzić zarówno, że pierwsza cząsteczka liganda ułatwia wiązanie następnych, jak również, że wiązanie pierwszej cząsteczki liganda jest utrudnione z powodu interakcji hemów w odtlenowanej Hb. Pierwszą możliwość ilustruje



Ryc. 3. Modele mechanizmów interakcji homotropowych.

(a) Model dwóch konformacji (Mond, Wyman, Changeux) (13).

Kwadraty i koła symbolizują trzeciorzędową strukturę podjednostek. Wszystkie podjednostki danej cząsteczki białka przyjmują tę samą konformację (wg 101)

(b) Model wzbudzonego dopasowania (Koshland, Nemethy, Filmer) (43).

Kwadraty i koła przedstawiają strukturę trzeciorzędową podjednostek, która wyznacza powinowactwo do liganda A. Zgodnie z modelem jako związki pośrednie występują formy przedstawione na przekątnej. Formy przedstawione w kolumnach występowałyby przy zmianie konformacji zgodnej ze schematem M-W-C (wg 101)

(c) „Ogólny” model interakcji homotropowych w hemoglobinie (Herzfeld i Stanley, 1974) w zestawieniu z mechanizmami proponowanymi przez Monoda i in., (13) oraz Perutza (10), które zostały przedstawione jako szczególne przypadki „ogólnego” modelu

Symbole: σ_s — wiązanie substratu; t — struktura trzeciorzędowa; q — struktura czwartorzędowa. Linia łącząca ciągła oznacza interakcję, a linia łącząca podwójna i wpisane w ramkę oznaczają niezwykle silne oddziaływanie (sprzężenie).

mechanizm oddziaływania typu wzbudzonego dopasowania (model K—N—F), druga odpowiada modelowi dwóch konformacji (M—W—C). W odniesieniu do hemoglobiny Wyman już w roku 1949 zauważył, że wysokie powinowactwo do tlenu hemoglobiny zdysocjowanej w roztworach mocznika przemawia za drugim mechanizmem oddziaływania, to znaczy, że powinowactwo podjednostek jest większe od powinowactwa tetrameru (32).

Szereg białek allosterycznych zachowuje się zgodnie z modelem K—N—F i niektóre zjawiska, jak obniżenie współczynnika interakcji po-

nież 1 (*negative cooperativity*) można wyjaśniać wyłącznie w kategoriach tego modelu.

Większość danych doświadczalnych dotyczących hemoglobiny można jednak wyjaśnić w kategoriach modelu dwóch konformacji (M—W—C). Opis różnic pomiędzy budową kryształów hemoglobiny odtlenowanej i związanej z ligandem (44) zainspirował stworzenie tego modelu. W przeciwieństwie do modelu K—N—F, model dwóch konformacji zakłada, że w stanie konformacji T (*tense*) białka występują przeszkody w wiązaniu liganda, których nie ma w konformacji R (*relaxed*). W odniesieniu do hemoglobiny założenie to zostało potwierdzone i badania krystalograficzne o zwiększonej rozdzielczości wykazały ograniczenie dostępu ligandów do hemów w stanie T (rozd. II-3). Stąd postulowane przez Perutza (10) molekularne mechanizmy interakcji hemów, jak również interpretacje mechanizmów zmiany równowagi reakcji (45) rozbudowują podstawowe koncepcje modelu dwóch konformacji. Dla wyjaśnienia zachowania hemoglobiny w obecności organicznych fosforanów (2,3-DPG, IHP) postuluje się model trzech stanów konformacji hemoglobiny różniących się powinowactwem do ligandów: stanu T bez fosforanu, stanu T z fosforanem i stanu R (46).

Schemat dwóch stanów konformacyjnych nie tłumaczy właściwości hybrydów hemoglobiny z jednym rodzajem łańcuchów w formie cyjanomet (47, rozdz. II-4). Przydatność modelu zwiększa się po uwzględnieniu różnic w reaktywności łańcuchów α i β . Za dalszym skomplikowaniem modelu przemawia postulat Perutza (10), że oddziaływanie liganda na geometrię hemu znacząco zmienia konformację łańcuchów, co oznacza mechanizm wzbudzonego dopasowania współlistniejący z mechanizmami sprzężonej zmiany struktury czwartorzędowej. Z drugiej strony energia oddziaływania żelaza z hemem okazuje się zbyt mała, aby postulować bezpośrednią „interakcję hemów” (48, 49, rozdz. II-3).

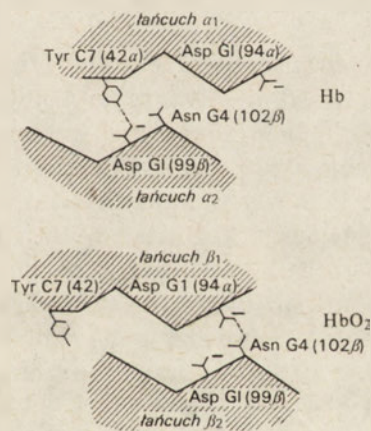
Herzfeld i Stanley (50) zaproponowali, jako wyjaśnienie wymienionych właściwości hemoglobiny „ogólny” model interakcji homotropowych występujących w cząsteczce hemoglobiny. Model ten zakłada, że oddziaływania hemu z łańcuchem globiny oraz oddziaływania pomiędzy strukturą trzeciorzędową a czwartorzędową hemoglobiny są równorzędne pod względem wpływu na całość interakcji homotropowej. Na rycinie 3c przedstawiono schemat mechanizmów interakcji hemów tych autorów, przy czym modele M—W—C, K—N—F i Perutza zostały przedstawione jako szczególne przypadki „ogólnego” modelu.

II-3. Budowa przestrzenna hemoglobiny a mechanizmy oddziaływań homotropowych

Dostępne metody badania, w szczególności pomiary rezonansu magnetycznego wykonywane w roztworach hemoglobiny oraz na kryształach Hb i HbO₂ nie wykazują różnic w konformacji tych form hemoglobiny w za-

leżności od stanu: krystalicznego czy w roztworze (51). Poznane konformacje Hb i HbO₂ występują więc w roztworach.

Zmiany w strukturze czwartorzędowej hemoglobiny sprzężone z wiązaniem liganda mogą być w skrócie opisane zmianami odległości atomów żelaza; odległość pomiędzy atomami żelaza w łańcuchach β zwiększa się o 1,1 Å (tabela 3). Przemieszczenia atomów żelaza są spowodowane obrotem podjednostek względem siebie. W obrębie kontaktu $\alpha^1 - \beta^1$ wyraża się to niewielkim tylko (do 1 Å) przesunięciem atomów. Na tej podstawie uważa się, że ten kontakt nie odgrywa czynnej roli w interakcji hemów. W obrębie kontaktu $\alpha^1 - \beta^2$ przesunięcia sięgają 7 Å. Oznacza to, że w płaszczyźnie kontaktu $\alpha^1 - \beta^2$ wiązania pomiędzy łańcuchami różnią się w zależności od stanu utlenowania hemoglobiny. Rycina 4 przedstawia jak sprzężone z utlenowaniem przemieszczenie w obrębie tej płaszczyzny zmienia wiązanie stabilizujące konformację odtlenowaną (Tyr 42 α_1 — Asp 99 β_2) na wiązanie stabilizujące konformację R (Asp 94 α_1 — Asn 102 β_2). Schemat ten uwidacznia również mechanizm stabilizacji określonych konformacji hemoglobiny.



Ryc. 4. Sprzężone z utlenowaniem hemoglobiny zmiany wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami α_1 i β_2 (100).

W oparciu o budowę hemoglobiny w formach odtlenowanej i utlenowanej Perutz (10) zaproponował hipotetyczną sekwencję zmian konformacji towarzyszących wiązaniu tlenu. Dodatkową przesłanką w proponowanym przez niego modelu było stwierdzenie, że walina E11 β stanowi w konformacji T przeszkodę dla wiązania liganda z hemami β , natomiast w hemach α taka przeszkoda nie występuje. Uzasadniło to założenie, że łańcuchy w tetramerze są utlenowane w kolejności α przed β i zasugerowało występowanie określonych form hemoglobiny częściowo utlenowanej.

Powinowactwo łańcuchów hemoglobiny do tlenu maleje w stanie kon-

formacji T zarówno w wyniku bezpośredniego oddziaływania na hemy, jak i ograniczenia dostępu liganda do miejsca wiązania (52). Badania hybrydów zawierających różne (proto- i mezo-)porfiry wykazały, że w odtlenowanej Hb A bezpośrednie oddziaływanie na hemy, czyli związane z konformacją T napięcia w strukturze występują tylko w łańcuchach α (53). Według nowszych danych ograniczenie dostępu ligandów do hemu zachodzi w konformacji T zarówno w łańcuchach α jak β . W łańcuchach α wiązanie liganda musi być poprzedzone usunięciem cząsteczki wody związanej z dystalną histydyną (ale nie z żelazem hemu) (54). W łańcuchach β resztą ograniczającą dostęp do hemu jest Val E11 (55). Przypuszczenia Perutza o kolejności utlenowania łańcuchów α przed łańcuchami β były więc oparte na niepełnych danych o strukturze hemoglobiny (10), niemniej znalazły potwierdzenie w wynikach badań wykonanych z zastosowaniem techniki znaczników spinowych (58). Dalszym warunkiem zmiany konformacji hemu polegającej na sprzężonym z wiązaniem liganda przemieszczeniu żelaza w kierunku płaszczyzny pierścienia porfiryńskiego są zmiany struktury trzeciorzędowej łańcuchów. Zmianom tym przeciwdziałają wiązania stabilizujące konformację T, które narzucają łańcuchom konformację t (52). Z drugiej strony konformacja R nie przeszkadza w przyjmowaniu przez podjednostki konformacji t.

Ograniczenia stwarzane przez konformację T i utrzymujące łańcuchy w konformacji t maleją w wyniku wiązania kolejnych cząsteczek tlenu z hemoglobiną. Perutz (10) wyróżnił następujące etapy zmian wiązań stabilizujących konformację T w przebiegu wiązania tlenu z hemoglobiną:

- Szersza kieszonka hemowa w łańcuchach α umożliwia wiązanie liganda z hemem; powoduje to zmianę spinu i przemieszczenie żelaza w płaszczyznę pierścienia porfiryńskiego (tabela 4) oraz wiąże się z dalszymi zmianami struktury trzeciorzędowej tego łańcucha.
- Zmniejszenie odległości pomiędzy heliksami F i H usuwa z tej przestrzeni resztę tyrozyny 140 α ; przemieszczenie tej ostatniej pociąga za sobą sąsiednią argininę 141 α , która jako końcowy aminokwas tworzy w Hb dwa wiązania jonowe z Val 11 i Asp 126 sąsiedniego łańcucha α ; przemieszczenie Arg 141 powoduje zerwanie tych wiązań stabilizujących konformację T i zmianę struktury czwartorzędowej (transformacja T \rightarrow R).
- Wiązanie liganda z hemami β występuje po utlenowaniu łańcuchów α , jednak oddziaływanie zmiany konformacji hemu na strukturę trzeciorzędową tego łańcucha jest podobne; zmniejszenie odległości pomiędzy heliksami F i G w łańcuchu β_1 usuwa z tej przestrzeni Tyr 145, powodując przemieszczenie His 146 β_1 i zerwanie mostka jonowego z Asp 94 β_1 stabilizującego konformację t łańcuchów.

Ważnym elementem budowy hemoglobiny, który zdaniem Perutza wyjaśnia (10) mechanizm interakcji homotropowych są właściwości żelaza i konformacja hemów w Hb i HbO₂. Właściwości żelaza w formach hemo-

globiny, w których nie stwierdza się różnic w przestrzennej budowie hemów w łańcuchach α i β , zostały przedstawione w tabeli 4.

Tabela 4.

Właściwości żelaza w formach hemoglobiny nie wykazujących różnic w przestrzennej budowie hemów pomiędzy łańcuchami α i β (10)

Formy hemoglobiny	HbO ₂	Hb	Hb (III CN)	Hb (III H ₂ O)
	HbCO		Hb (III N ₃)	Hb (III F)
Wartościowość	Fe ⁺⁺		Fe ⁺⁺⁺	
Ilość wiązań koordynacyjnych	VI	V	VI	VI
Odległość od płaszczyzny hemu w kierunku proksymalnej histydy (Å)	0	0,75	0	0,3
Długość wiązania z proksymalną histydyną (Å)	2,0	2,15		
Spin	0	2	1/2	5/2

Średnica atomu żelaza jest w Hb o 0,12 Å większa aniżeli w Hb (III H₂O) (10). Zmiana średnicy atomu żelaza połączona ze zmianą konformacji hemu jest zdaniem Perutza bodźcem wywołującym interakcję hemów za pośrednictwem zmian konformacji białka. Opisany mechanizm oddziaływania liganda na hemoglobinę należy do interakcji allosterycznych typu wzbudzonego dopasowania (model K—N—F). Koncepcji tej przeciwstawił się jednak Shulman i in., (48) wskazując na stosunkowo małą energię związaną ze zmianami konformacji hemów. Ostatnio grupa Shulmana wykazała, że energia zmiany wiązania żelaza hemu stanowi mniej niż 4% zmiany energii cząsteczki hemoglobiny związanej z interakcją homotropową (49). Sugeruje to, że oddziaływania typu wzbudzonego dopasowania nie odgrywają większej roli w czynności hemoglobiny, którą w pierwszym przybliżeniu można opisać w kategoriach modelu dwóch konformacji (M—W—C).

Asakura (56) na podstawie badań hemoglobiny zawierającej hemy związane ze znacznikami spinowymi postuluje również bezpośredni związek pomiędzy strukturą kieszonki hemowej warunkującą dostęp liganda do hemu a powinowactwem hemoglobiny do ligandów. W badaniach tych amplituda zmiany sygnału elektronowego rezonansu paramagnetycznego wyprzedzała zmianę absorpcji światła sprzężoną z wiązaniem liganda (O₂). Autor wyjaśnia to zakładając, że e.p.r. wykazuje zmiany konformacji, które nie zmieniając absorpcji światła powodują zwiększenie powinowactwa hemoglobiny do liganda. Wyniki te podważają możliwość interpretacji czynności hemoglobiny w kategoriach modelu wzbudzonego dopasowania. Jednocześnie, ponieważ zmiany spinu nie wykazują punktów isobestycznych, można przyjąć, że otoczenie hemu przyjmuje w przebiegu utlenowania pośrednie konformacje (w zakresie struktury trzeciorzędowej), które nie odpowiadają właściwościom typowych stanów konformacji Hb i HbO₂.

Na podstawie proporcjonalnych zmian wiązania tlenu i takich wskaźników konformacji jak reaktywność grup SH przypuszczano, że w stanie równowagi reakcji formy hemoglobiny częściowo utlenowanej występują w niedużych stężeniach (57). Przy pomocy metody znaczników paramagnetycznych wykazano jednak, że przy stężeniu HbO_2 około 25% utlenowane są głównie łańcuchy α (58).

II-4. Właściwości hybrydów różniących się ligandami lub budową hemów przy łańcuchach α i β

Budowa hemoglobiny, na którą składają się dwa rodzaje łańcuchów: α i β , stwarza możliwość modyfikacji miejsc wiązania tlenu w jednym tylko rodzaju łańcuchów. W badaniach tych, skierowanych na ocenę czynności poszczególnych łańcuchów w hybrydach, posługiwano się kilkoma rodzajami modyfikacji.

Semihemoglobiny, w których jeden typ łańcucha wcale nie zawiera hemu, swoimi właściwościami udokumentowały różnice pomiędzy łańcuchami w kształtowaniu właściwości tetrameru (59).

Prawidłowa budowa hemu odgrywa ważną rolę w interakcjach hemotropowych w hemoglobinie. Badano znaczenie modyfikacji grup hemowych polegających na substytucji grup winylowych połączonych z pierścieniem porfirynowym w prawidłowym hemie (protohem) grupami etylowymi (mezoem) lub wodorem (deutrohem). Wszystkie hemoglobiny zawierające zmodyfikowane hemy odznaczają się obniżoną interakcją hemów. Modyfikacje te nie zmieniają równowagi konformacji T i R, tylko reaktywność poszczególnych konformacji (60). Hemoglobiny zawierające wymienione zmodyfikowane hemy wykazują różne szczyty absorpcji światła. W oparciu o tę właściwość, badając hybrydy zawierające różne zmodyfikowane hemy w łańcuchach α i β , Sugita (53) zmierzył zmianę absorpcji towarzyszącą tworzeniu takich hybrydów z izolowanych łańcuchów. Wykazał on, że w odróżnieniu od ograniczenia dostępu liganda do hemu, bezpośrednie oddziaływanie konformacji T na hemy występuje tylko w łańcuchach α .

Spośród hybrydów wartościowości (*valency hybrids*), to znaczy różniących się wartościowością żelaza w hemach związanych z łańcuchami α i β , największe znaczenie mają odznaczające się stabilnością formy zawierające łańcuchy (III) o niskim spinie, najczęściej związane z CN. Zmiana spinu hemów (III) w tych hybrydach wpływa na powinowactwo do tlenu łańcuchów (II). Formy o niższym spinie (III N_3 i III CN) wykazywały wyższe powinowactwo do tlenu, aniżeli formy o wyższym spinie (III H_2O i III F) (61).

Różnice pomiędzy właściwościami hybrydów $\alpha_4^{\text{III CN}}\beta_2$ i $\alpha_2\beta_2^{\text{III CN}}$ były interpretowane w kategoriach równowagi konformacji R i T. Ponieważ miejsce wiązania o dużym powinowactwie do 2,3-DPG występuje tylko

w Hb a nie w HbO₂ (rozd. II-1) wiązanie tego związku i jego analogów (np. związanych ze znacznikiem spinowym) służy jako wskaźnik równowagi konformacji T i R w stosunkowo stabilnych hybrydach cyjanomet. Wyniki przedstawione w tabeli 5 wykazują, że w formie odtlenowanej hybryd $\alpha^{\text{III CN}}\beta_2$ ma konformację bardziej zbliżoną do T aniżeli hybryd $\alpha_2\beta^{\text{III CN}}$. Wyniki te potwierdzają koncepcję, że różnice w czynności łańcuchów α i β objawiają się silniejszym oddziaływaniem łańcuchów β na konformację łańcuchów α w porównaniu z oddziaływaniem skierowanym przeciwnie (62).

Tabela 5.

Właściwości hybrydów cyjanomet/dezoksy hemoglobiny A odnoszące się do ich struktury czwartorzędowej

Forma hemoglobiny; hemy(II) odtleno- wane	Zawartość konfor- macji T na pod- stawie badań e.p.r. (64)	Wzrost p ₅₀ pod wpły- wem 2 mM 2,3-DPG (47)	Stałe asocjacji z 2,3—DPG (65)	
			pH 6,0	pH 7,0
$\alpha_2\beta_2$	1	2,7x	$3,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
$\alpha_2^{\text{III CN}}\beta_2$	0,67	3,5x	$1,4 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
$\alpha_2\beta_2^{\text{III CN}}$	0,09	1,7x	$3,0 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$

Zgodność przedstawionych w tabeli 5 wyników uzyskanych niezależnie różnymi metodami podważa obserwacje Caldwella i Nagela (63), którzy badając te same typy hybrydów nie stwierdzili pomiędzy nimi różnic.

Na podstawie analizy opisanych właściwości hybrydów zawierających łańcuchy (III) o niskim spinie Fe związane z łańcuchem (II) stwierdzono, że oddziaływanie łańcuchów β na strukturę trzeciorzędową łańcuchów α oraz na strukturę czwartorzędową hemoglobiny jest silniejsze od odpowiednich oddziaływań łańcuchów α (66).

Jeszcze bardziej przekonujące w odniesieniu do oddziaływań homotropowych w przebiegu wiązania tlenu przez hemoglobinę są właściwości hybrydów $\alpha_2^{\text{I NO}}\beta_2$ i $\alpha_2\beta_2^{\text{I NO}}$, w których hemy nie wiążące tlenu zawierają żelazo dwuwartościowe. W hybrydach $\alpha_2^{\text{I NO}}\beta_2$ stwierdzono mianowicie zmianę widma e.p.r. hemów NO sprzężoną z przyłączeniem CO do hemów β . W hybrydach $\alpha_2\beta_2^{\text{I NO}}$ zmiana taka nie występuje. Wskazuje to na przewagę oddziaływania łańcuchów β na łańcuchy α nad oddziaływaniem skierowanym w przeciwnym kierunku (62).

Z dwóch typów hybrydów NO: $\alpha_2^{\text{CO}}\beta_2^{\text{NO}}$ i $\alpha_2\beta_2^{\text{NO CO}}$ tylko drugi wykazywał duże zmiany absorpcji światła pod wpływem IHP. Porównanie tych zmian z amplitudą zmian absorpcji światła stwierdzanych pod wpływem IHP w HbNO sugeruje, że zmiany widma w HbNO zależą głównie od właściwości łańcuchów α (67).

III. Zmiany równowagi konformacji R i T w przypadkach dziedzicznie uwarunkowanych odmian hemoglobiny A

Różne odmiany hemoglobiny występujące w życiu osobniczym, jak również genetycznie uwarunkowane odmiany hemoglobiny różnią się budową części białkowej, natomiast zawierają zawsze takie same cząsteczki hemu.

Większość dziedzicznie uwarunkowanych odmian hemoglobiny jest spowodowana przez substytucje pojedynczych aminokwasów. Zmiany czynności tych odmian zależą od lokalizacji substytucji oraz od tego w jakim stopniu podstawiony aminokwas różni się od występującego w hemoglobinie A.

Zmiany wiązania hemu z globiną mogą powodować: (1) osłabienie wiązania hemu połączone z labilnością (przyspieszoną denaturacją), wytrącaniem się hemoglobiny patologicznej i niedokrwistością hemolityczną; (2) zmianę wiązania liganda, najczęściej w wyniku substytucji histydyny proksymalnej lub dystalnej, przy czym w zmienionych łańcuchach żelazo występuje w formie trójwartościowej — są to hemoglobiny M, których właściwości zostały przedstawione w tabeli 6. Stwierdzenie różnic pomiędzy właściwościami hemoglobin M ze zmienionym łańcuchem α (Boston i Iwate) a hemoglobinami M ze zmienionym łańcuchem β (Saskatoon i Hyde Park) było jedną z pierwszych przesłanek różnic w czynności tych łańcuchów w Hb (68, 69). Wyrazem tych różnic jest prawie niezmienione powinowactwo do tlenu hemów (II) i współczynnik interakcji hemów 1,3 w odmianach łańcucha β , w zestawieniu ze zmniejszonym powinowactwem tlenowym i brakiem interakcji hemów w odmianach łańcucha α . W przypadku Hb M Boston α (substytucja His dystalnej) po zredukowaniu łańcuchów α obserwowano prawidłową interakcję hemów. Efektu tego nie stwierdzono po zredukowaniu łańcuchów α w Hb M Iwate (substytucja His proksymalnej) (72). Widmo absorpcji światła przez łańcuchy (III) w hemoglobinach M odbiega od widma Hb (III), co jest wyrazem zmienionego otoczenia hemów (III) w hemoglobinach M (73).

Zmiany zlokalizowane w płaszczyźnie kontaktu $\alpha^1 - \beta^1$ nie powodują większych zaburzeń czynności, z wyjątkiem substancji w hemoglobinie Philly (Tyr 35 $\beta \rightarrow$ Phe).

Zmiany w zakresie kontaktu $\alpha^1 - \beta^2$ nie powodują labilności hemoglobin, ponieważ utlenowana HbA prawidłowo dysocjuje w tej płaszczyźnie. Do tej grupy substytucji należy szereg hemoglobin patologicznych odznaczających się zmienioną równowagą konformacji R i T.

Struktura czwartorzędowa zmienia się z T na R przy różnych stopniach wysycenia hemoglobin, w zależności od równowagi konformacji: Hb A zmienia konformację po przyłączeniu drugiego liganda (74); Hb Kansas (Asn 102 $\beta \rightarrow$ Thr) po przyłączeniu trzeciego liganda (75, 76) i Hb Chesapeake (Arg 92 α , FG4 \rightarrow Leu) po przyłączeniu pierwszego liganda (45). W Hb Chesapeake stwierdzono zmiany tylko w konformacji T a nie w kon-

Tabela 6.

Substytucje dystalnej (E7) i proksymalnej (F8) histydyny u człowieka

	Hb M Boston (79)	Hb M Iwate (68)	Hb M Saskatoon (71)	Hb M Hyde Park (69)
substytucja	$\alpha 58(E7)$ His \rightarrow Tyr	$\alpha 87(F8)$ His \rightarrow Tyr	$\beta 63(E7)$ His \rightarrow Tyr	$\beta 92/F8$ His \rightarrow Tyr
P ₅₀	obniżone	obniżone	normalne	normalne
n	1,2	1,1	1,2	1,3
efekt Bohra	obniżony	obniżony	normalny	prawie normalny
reakcja z KCN; transformacja zmienionych łańcuchów(III) w (III CN)	wolna	b. wolna	szybka	wolna

formacji R. Interesujące jest porównanie właściwości Hb Chesapeake z homologiczną substytucją w łańcuchach β : Hb Malmö (His 97 β , FG4 \rightarrow Gln), w której zmieniona jest konformacja r, przy czym równowaga konformacji R i T nie ulega zaburzeniu (77). Potwierdza to różnice w czynności łańcuchów α i β . Hb Iwate wiążąc ligand wcale nie zmienia konformacji T (78).

Oddziaływanie organicznych fosforanów na ten typ dziedzicznie uwarunkowanych odmian hemoglobiny (z zaburzoną równowagą T — R) jest zmienione w porównaniu z Hb A. W Hb A transformacja T \rightarrow R jest procesem szybkim i sprzężonym z wiązaniem liganda hemu. Zmiany absorpcji światła przez HbO₂ występujące pod wpływem 2,3-DPG (79) zależą prawdopodobnie od asocjacji dimerów (80). Z drugiej strony w przypadkach hemoglobin Kansas i Bethesda (Tabela 7), jak również w niektórych zmodyfikowanych hemoglobinach zmiany struktury czwartorzędowej zachodzą wolniej. Te odmiany hemoglobiny umożliwiają scharakteryzowanie zmian zależnych od transformacji T \rightarrow R w oderwaniu od zmian zależnych w hemoglobinie od wiązania liganda.

W HbO₂ i HbCO wiązanie IHP modyfikuje strukturę R, ale nie indukuje pełnej transformacji do struktury T.

Hemoglobina Kansas (Asn 102 $\beta \rightarrow$ Thr) odznacza się obniżonym powinowactwem do tlenu i przesunięciem równowagi konformacji w kierunku konformacji T (81). Jest to spowodowane brakiem jednego z wiązań stabilizujących konformację R (Asp 94 α_1 -COO⁻—NH₂-Asn-102 β_2). Dodanie IHP do stężonych roztworów formy utlenowanej tej hemoglobiny indukuje pełną transformację do konformacji T, co uwidacznia się poprzez przesunięcie szczytów absorpcji światła widzialnego w kierunku podczerwieni (82). W tabeli 7 przedstawiono właściwości Hb Kansas w zestawieniu z właściwościami Hb Bethesda (Tyr 145 $\beta \rightarrow$ His) i Hb Kempsey (Asp 99 $\beta \rightarrow$ Asn), w których występuje brak jednego lub dwóch wiązań stabilizujących konformację T. Kryształy odtlenowanej Hb Kempsey mają strukturę R.

Obniżoną stabilizację konformacji T stwierdzono również w Hb York

Tabela 7.

Zmiany wiązań stabilizujących konformacje T i R w przypadkach hemoglobin patologicznych (82)

Specyficzne wiązania jonowe i wodorowe stabilizujące konformację T i R	Utrata stabilizacji konformacji T, Hb może przyjąć konformację R		Utrata stabilizacji konformacji R, HbO ₂ może przyjąć konformację T
	Hb Bethesda (Tyr—145β → His) (bez 2,3-DPG)	Hb Kempsey (Asp-99β → Asn)	Hb Kansas (Asn—102β → Thr)
Konformacja T: Tyr—145β—OH—OC—Val— —98β	—	+	+
PO ₄ ⁻ +NH ₃ —Val—1β +NH ₃ —Lys—82β	—	+	+
Tyr—42α ₁ —OH—OOC—Asp— —99β ₂	+	—	+
Konformacja R: Asp—94α ₁ —COO ⁻ —NH ₂ —Asn— —102β ₂	+	+	—

(His 146 β → Pro) oraz w Hb Hiroshima (His 146 β → Asp), co łączy się ze zwiększonym powinowactwem do tlenu. Brak w tych hemoglobinach His 146 β powoduje niemożność wytworzenia dwóch wiązań, które w Hb A stabilizują konformację T: β 146 His NH⁺—COO⁻ Asp 94 β i β 146 His COO⁻—NH₂ Lys ε 40 α, a także obniżenie efektu Bohra o 50% (83).

Badania kinetyczne reakcji odtlenowania Hb A wykazują dwufazowy przebieg (41). Autor rozważał dwa mechanizmy powstawania takiej heterogenności: (1) różne powinowactwo konformacji T i R występujących w roztworze lub (2) różnice w powinowactwie pomiędzy łańcuchami α i β. Badania Hb Kansas, która po związaniu z IHP przyjmuje konformację T niezależnie od stanu związania hemów z ligandem, a kinetyka reakcji odtlenowania nie wykazuje w tych warunkach fazy wolnej (charakteryzującej zgodnie z pierwszym mechanizmem konformację R) potwierdziły, że dwufazowy charakter kinetyki odtlenowania zależy od równowagi konformacji T i R (80). Potwierdza to przydatność allosterycznego modelu Monod, Wyman i Changeux w interpretacji czynności hemoglobiny.

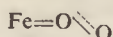
IV. Powstawanie i właściwości methemoglobiny. Interakcja methemoglobiny z ligandami allosterycznymi

Powszechnie przyjęta nomenklatura zakłada, że w HbO₂ żelazo jest dwuwartościowe, jednak bezspreczne jest tylko stwierdzenie, że w wy-

niku dysocjacji liganda powstaje Hb z dwuwartościowym żelazem. W wyniku utleniania żelaza hemoglobiny do Fe (III) powstaje methemoglobina, która nie przechodzi w Hb bez zastosowania czynników redukujących. Methemoglobinę można określać jako produkt utleniania hemoglobiny w którym szósta pozycja koordynacyjna Fe (III) jest związana z H₂O (kwaśna forma) lub OH⁻ (forma zasadowa), przy czym każda z tych form odznacza się charakterystycznym widmem absorpcji światła (84).

Na podstawie podobieństwa widma absorpcji Hb (III OH) i HbO₂ wysunięto hipotezę, że konfiguracja elektronowa żelaza jest podobna w HbO₂ i Hb (III OH) (85). Na podstawie badań elektronowego rezonansu paramagnetycznego postulowano, że żelazo w HbO₂ występuje jako Fe (III LS) (84). Zwolennicy tego poglądu uważają, że methemoglobina powstaje po wytworzeniu anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻) związanego z Fe (III), a następnie dysocjacji tego wiązania.

Koncepcji tej przeciwstawiali się C a u g h e y i inni (86) przedstawiając dowody, że wiązanie tlenu przedstawia się następująco:



przy czym pod wpływem dystalnej histydyliny wiązanie przyjmuje polarny charakter (Ryc. 1). Jako mechanizm powstawania methemoglobiny autorzy ci zaproponowali reakcję podstawienia jonu O₂⁻ przez aniony nukleofilowe — w warunkach fizjologicznych przede wszystkim Cl⁻. Wyjaśniając mechanizm nasilonego powstawania methemoglobiny w przypadkach substytucji aminokwasów w kieszonce hemowej badacze ci sugerują, że np. Hb Zürich (63 β His → Arg) charakteryzuje się przewagą niepolarnego typu wiązania tlenu, które po przyłączeniu elektronu jest bardziej podatne na reakcje wymiany O₂⁻ z anionami aniżeli przeważające w Hb A polarne wiązanie z którego powstaje jon O⁺—O⁻ stabilizowany wiązaniem z dystalną histydyną (87).

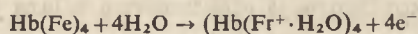
Przy pomocy hemoglobiny zawierającej hemy związane ze znacznikami spinowymi wykazano, że w zakresie konformacji otoczenia hemu, HbO₂ różni się od Hb (III) (56), co potwierdza proponowane przez C a u g h e y' a mechanizmy wiązania tlenu w HbO₂ oraz powstawania methemoglobiny.

Reakcja utleniania hemoglobiny wykazuje efekty allosteryczne podobne do tych, które opisano w omówieniu reakcji utlenowania (rozdz. II-1). Najwyższe wartości współczynnika interakcji hemów w reakcji utleniania: $n = 2,5$ stwierdza w pH 9,0. Z efektorów heterotropowych reakcji utleniania hemoglobiny badano głównie wpływ pH i organicznych fosforanów.

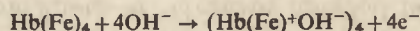
Efekt Bohra utleniania hemoglobiny jest mierzony poprzez miareczkowanie methemoglobiny z pomiarami zmian pH, albo poprzez pomiary potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (E_m) w warunkach różnych wartości pH. Wyniki pomiarów wykonanych tymi dwoma metodami są zgodne. Cechą odróżniającą efekt Bohra utleniania hemoglobiny od efektu Bohra utleniania jest towarzyszące temu pierwszemu w warunkach pH poniżej 7,0

znaczne obniżenie interakcji hemów do wartości n w zakresie od 1,5 do 1,2 (88).

Brunori i wsp. (89) wysunęli hipotezę, że omawiane obniżenie interakcji hemów w zakresie wartości pH od 6,0 do 7,0 może być spowodowane odmienną reaktywnością dwóch, występujących w hemoglobinie typów łańcuchów (α i β) w zakresie utleniania i redukcji. W atts-Tobin (90) sugerował, że zjawisko to może być spowodowane przez odmienny przebieg reakcji utleniania hemoglobiny w roztworze kwaśnym:



i w roztworze alkalicznym:



W odniesieniu do molekularnych mechanizmów postulowanego oddziaływania ładunków, autor ten ograniczył się do tezy, że odbiegają one od modelu dwóch konformacji.

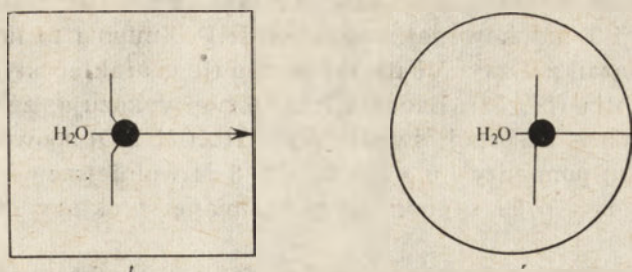
MacQuarrie i Gibson (91) wykazali, że kolejność utleniania łańcuchów hemoglobiny nie zmienia się w zakresie pH od 6,1 do 8,7, co podważa hipotezę Brunorigo i wsp. (89). Perutz i wsp. (92, 93) uważają, że obniżenie interakcji hemów w reakcji utleniania może być spowodowane stabilizacją methemoglobiny w konformacji T. Skorelowane wystąpienie tych dwóch zmian obserwowano pod wpływem IHP.

Nawiązuje to do oddziaływania na methemoglobinę drugiego typu efektorów heterotropowych reakcji utleniania hemoglobiny: związków fosforu. Potencjał oksydacyjno-redukcyjny hemoglobiny zostaje podwyższony pod wpływem 2,3-DPG i fosforanów nieorganicznych (57). IHP jak wspomniano dodatkowo obniża interakcję hemów w reakcji utleniania hemoglobiny (92).

Kilmartin (94) oraz Perutz, Fershti in., (92) zwrócili uwagę na podobieństwo pomiędzy zmianą konformacji methemoglobiny spowodowaną działaniem IHP a zmianą konformacji towarzyszącą odtlenowaniu hemoglobiny utlenowanej. Ci ostatni autorzy udokumentowali postulowane podobieństwo takimi wskaźnikami zmiany konformacji czwartorzędowej, jak zmiany absorpcji światła zależne od Tyr 42 α i Trp 37 β , różnica krzywej dichroizmu kołowego przy 287 nm oraz kinetyka wiązania p-rtęcio-benzoenu. Podjęto więc dalsze badania interakcji IHP z methemoglobiną celem wyjaśnienia mechanizmów tej reakcji allosterycznej.

Analiza zmian stałych dysocjacji tetramerów hemoglobiny i methemoglobiny w zależności od stężenia IHP wykazała, że methemoglobina w obecności IHP dysocjuje na dimery znacznie bardziej aniżeli hemoglobina odtlenowana w konformacji T (96). Oznacza to, że zakres postulowanej transformacji $R \rightarrow T$ zachodzącej w Hb (III) pod wpływem IHP jest mniejszy od zmiany konformacji obserwowanej przy odtlenowaniu Hb. Porównując wpływ IHP na Hb (III OH) stwierdzono podobne zmiany dysocjacji (96),

co podważyło tezę Perutza (92, 95), że transformacja $R \rightarrow T$ występuje tylko w methemoglobinie o wysokim spinie, w której obserwuje się sprzężone ze zmianą konformacji zmiany spinu.



Ryc. 5. Wpływ konformacji łańcuchów(III) w Hb(III) na konformację hemów(III H_2O) (95).

Badania metodą dichroizmu kołowego oraz badania widma Ramana sugerują, że IHP zmienia strukturę czwartorzędową methemoglobiny z kierunku $R \rightarrow T$, nie zmieniając struktury trzeciorzędowej, która pozostaje r (97) co podważałoby interpretację Perutza w odniesieniu do struktury trzeciorzędowej (Ryc. 5).

Oprócz swoistych wskaźników zmiany struktury czwartorzędowej Hb (III) Kilmartin (94) oraz Perutz i in. (92) opisali również różnicę widma absorpcji światła wywołaną wiązaniem IHP z Hb (III). Perutz i in., uważali, że różnica ta jest spowodowana transformacją $R \rightarrow T$.

Podobne widmo różnicowe pod wpływem związków fosforowych wykazuje również HbO_2 (79), a badania kinetyczne tej zmiany absorpcji sugerowały, że zależy ona w większym stopniu od asocjacji dimerów aniżeli od transformacji $R \rightarrow T$ (80). Spektrofotometryczne badania kinetyki wiązania IHP z methemoglobiną wykazały istnienie dwóch typów zmian konformacji methemoglobiny towarzyszących tej reakcji, przy czym amplitudy tych procesów zmieniają się niezależnie w funkcji pH (98). W warunkach stosowanych przez Perutza i Fershta i in., oraz przez Hensley' a i Edelsteina (99) (w pH około 6) badano przede wszystkim widma zależne od procesu o szybkiej kinetyce, scharakteryzowanego przez Olsona jako zmianę konformacji łańcuchów β i wzrost spinu hemów β (III) bezpośrednio spowodowane wiązaniem IHP. Ten sam autor opisuje różnicę absorpcji powstającą wolniej i wyraźnie zaznaczoną w warunkach wyższych wartości pH, której mechanizm przypisuje zmianie konformacji czwartorzędowej przypominającej transformację $R \rightarrow T$. W odróżnieniu od różnicy absorpcji fazy szybkiej, zmiana widma towarzysząca tej zmodyfikowanej transformacji $R \rightarrow T$ zależy od zmiany absorpcji światła przez łańcuchy α .

Opisane różnice w interakcji Hb (III) z IHP w zależności od liganda hemów (H_2O czy OH^-) nawiązują do zmienionej interakcji z IHP jaką cha-

rakteryzuje Hb (III NO). Badania przy pomocy absorpcji światła w podczerwieni oraz epr wykazały, że w łańcuchach α w Hb (III NO), z powodu osłabienia wiązania żelaza z proksymalną histydyną przez bardzo krótkie i silne wiązanie żelaza z NO, słabe wiązanie Fe—His zostaje zerwane w konformacji T indukowanej wiązaniem IHP. Zmienia to liczbę koordynacyjnych wiązań żelaza z VI na V i powoduje charakterystyczne zmiany absorpcji światła (14, 52). Badania kinetyczne wykazują, że indukowane przez IHP zmiany absorpcji światła przez Hb (III NO) spowodowane zerwaniem wiązań pomiędzy Fe a His 87 α F 8 są wolniejsze od zmian reaktywności cysteiny β 93 sygnalizujących zmianę struktury czwartorzędowej (67).

W Hb A związane z konformacją T napięcia w strukturze hemu występują tylko w łańcuchach α (53). W przypadku hemów (III) nie można wyłączyć oddziaływania konformacji T również na hemy w łańcuchach β , ponieważ przejście Hb M Milwaukee (β 98 Val \rightarrow Glu) z konformacji R do T jest połączone z przesunięciem szczytu absorpcji hemów (III) (620 nm) w kierunku dłuższych fal świetlnych, co świadczy, że w tym przypadku konformacja łańcuchów β oddziałuje bezpośrednio na strukturę hemów (III) (93, 95). Różnica pomiędzy HbA a Hb M Milwaukee (β III) prawdopodobnie jest spowodowana różnym położeniem żelaza w stosunku do płaszczyzny hemu w hemach odtlenowanych i hemach (III) (Tabela 4).

Artykuł nadszedł 13.12.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 20.3.1977.

PIŚMIENNICTWO

1. Perutz M. F., (1976), *Brit. Med. Bull.*, **32**, 193—208.
2. Kwiatkowska J., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 27—47.
3. Pawlak A. L., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 221—229.
4. Gondko R., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 323—336.
- 4a. Gondko R., Alikhan M. A., Leyko W., (1976), *Acta Univ. Lodziensis* (Ser. II), **19**, 279—331.
5. Perutz M. F., Muirhead H., Cox J. M., Goaman L. C. G., Matthews F. S., McGandy E. L., Webb L. E., (1968), *Nature*, **219**, 29—32.
6. Perutz M. F., Muirhead H., Cox J. M., Goaman L. C. G., (1968), *Nature*, **219**, 131—139.
7. Bolton W., Perutz M. F., (1970), *Nature*, **228**, 551—552.
8. Pauling L., (1949), *Haemoglobin*, red., Roughton F. J. W., Kendrew J. C., str. 57—65, Butterworth, London.
9. Gupta R. K., Mildvan A. S., Yonetani T., Srivastava T. S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1005—1012.
10. Perutz M. F., (1970), *Nature*, **228**, 726—739.
11. Perutz M. F., (1969), *Proc. Roy. Soc.*, **B 173**, 113—140.
12. Kellett G. L., Gutfreund H., (1970), *Nature*, **227**, 921—926.
13. Monod J., Wyman J., Changeux J. P., (1965), *J. Mol. Biol.*, **12**, 88—118.
14. Maxwell J. C., Caughey W. S., (1976), *Biochemistry*, **15**, 388—396.
15. Bohr C., Hasselbalch K. A., Krogh A., (1904), *Skand. Arch. Physiol.*, **16**, 402—412.

16. Christiansen J., Douglas C. G., Haldane J. S., (1914), *J. Physiol.*, **48**, 244—277.
17. Kilmartin J. V., Wootton J. F., (1970), *Nature*, **228**, 766—767.
18. Rollema H. S., de Bruin S. H., van Os G. A. J., (1976), *FEBS Letters*, **61**, 148—150.
19. Antonini E., Shuster T. M., Brunori M., Wyman J., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2262—2264.
20. Gray R. D., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2914—2921.
21. Olson J. S., Gibson Q. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1623—1630.
22. Kilmartin J. V., Fogg J., Luzzana M., Rossi-Bernardi L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7039—7043.
23. Parella M., Kilmartin J. V., Fogg J., Rossi-Bernardi L., (1975), *Nature*, **256**, 759—761.
24. Morrow J. S., Matthew J. B., Wittebort R. J., Gurd F. R. N., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 477—484.
25. Bauer C., Schröder E., (1972), *J. Physiol.*, **227**, 457—471.
26. Benesch R., Benesch R. E., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 162—167.
27. Chanutin A., Curnish R. R., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 96—102.
28. Arnone A., (1972), *Nature*, **237**, 146—149.
29. Verdier C.-H., de Garby L., (1969), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **23**, 149—151.
30. Benesch R., Benesch R. E., (1969), *Nature*, **221**, 618—622.
31. Bunn H. F., Ransil B. J., Chao A., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5273—5279.
32. Wyman J. Jr., (1964), *Adv. Protein Chem.*, **19**, 223—286.
33. Siggaard-Andersen O., (1971), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **27**, 351—361.
34. Hill A. V., (1910), *J. Physiol.*, **40**, 4—7.
35. Adair G. S., (1924), *J. Physiol.*, **58**, 39—40.
36. Roughton F. J. W., (1965), *J. Gen. Physiol.*, **49**, 105—125.
37. Edelstein S. J., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 209—232.
38. Adair G. S., (1925), *J. Biol. Chem.*, **63**, 529—545.
39. Roughton F. J. W., Kendrew J. C., (1949), *Haemoglobin*, Butterworths, London.
40. Gibson Q. H., (1959), *Prog. Biophys. Biophysical Chem.*, **9**, 1—53.
41. Gibson Q. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1—4.
42. Pauling L., (1935), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **21**, 186—191.
43. Koshland D. E. Jr., Nemethy G., Filmer D., (1966), *Biochemistry*, **5**, 365—385.
44. Muirhead H., Perutz M. F., (1963), *Nature*, **199**, 633—638.
45. Edelstein S., (1971), *Nature*, **230**, 224—227.
46. Minton A. P., Imai K., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1418—21.
47. Maeda T., Imai K., Tyuma I., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3685—3689.
48. Shulman R. G., Ogawa S., Wuthrich K., Yamane T., Peisach J., Blumberg W. E., (1969), *Science*, **165**, 251—257.
49. Eisenberger P., Shulman R. G., Brown G. S., Ogawa S., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 491—495.
50. Herzfeld J., Stanley H. E., (1974), *J. Mol. Biol.*, **82**, 231—265.
51. Weissbluth M., (1974), *Hemoglobin*, Springer Verlag, Berlin.
52. Perutz M. F., Kilmartin J. V., Nagai K., Szabo A., Simon S. R., (1976), *Biochemistry*, **15**, 378—387.
53. Sugita Y., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1251—1256.
54. Fermi G., (1975), *J. Mol. Biol.*, **97**, 237—256.

55. Perutz M. F., Ten Eyck L. F., (1971), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 295—310.
56. Asakura T., Tamura M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4504—4509.
57. Antonini E., Brunori M., (1971), Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands, North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
58. Raftery M. A., Huestis W. H., (1973), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **222**, 40—55.
59. Gondko R., (1973), Fyzyko-chemiczne i biologiczne właściwości α i β semi-hemoglobiny człowieka, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź.
60. Seybert D. W., Moffat K., Gibson Q. H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 45—52.
61. Banerjee R., Stetzkowski F., Henry Y., (1973), *J. Mol. Biol.*, **73**, 455—467.
62. Henry Y., Banerjee R., (1973), *J. Mol. Biol.*, **73**, 469—82.
63. Caldwell P. R. B., Nagel R. L., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 605—611.
64. Ogata R. T., McConnell H. M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 335—339.
65. Bauer C., Henry Y., Banerjee R., (1973), *Nature*, **242**, 208—209.
66. Szabo A., Karplus M., (1975), *Biochemistry*, **14**, 931—940.
67. Cassoly R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **98**, 581—595.
68. Hayashi A., Suzuki T., Shimizu A., Yamamura Y., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 262—273.
69. Ranney H. M., Nagel R. L., Heller P., Udem L., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 112—115.
70. Suzuki T., Hayashi A., Yamamura Y., Enoki Y., Tyuma I., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 691.
71. Suzuki T., Hayashi A., Shimizu A., Yamamura Y., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 280—282.
72. Nishikura K., Sugita Y., Nagai M., Yoneyama Y., Jagenburg R., (1975), *Nature*, **254**, 727—728.
73. Tönz O., (1968), The Congenital Methemoglobinemias, Karger, Basel.
74. Hopfield J. J., Shulman R. G., Ogawa S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 425—443.
75. Hopfield S., Ogawa S., Shulman R. G., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1480—1484.
76. Ogawa S., Mayer A., Shulman R. G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1485—1491.
77. Wiechelmann K. J., Fairbanks V. F., Ho C., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1414—1420.
78. Mayer A., Ogawa S., Shulman R. G., Gersonde K., (1973), *J. Mol. Biol.* **81**, 187.
79. Adams M. L., Schuster T. M., (1974), *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 525—531.
80. Salhany J. M., Castillo C. L., McDonald M. J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3998—4002.
81. Ogawa S., Shulman R. G., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 315—336.
82. Perutz M. F., Ladner J. E., Simon S. R., Ho C., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2163—2173.
83. Bare G., Bromberg P. A., Alben J. O., (1976), *Nature*, **259**, 155—156.
84. Wittenberg J. B., Wittenberg B. A., Peisach J., Blumberg W. E., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1846—1853.
85. Weiss J. J., (1964), *Nature*, **202**, 83—84.

86. Caughey W. S., Barlow C. H., Maxwell J. C., Volpe J. A., Wallace W. J., (1975), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **244**, 1—8.
87. Wallace W. J., Volpe J. A., Maxwell J. C., Caughey W. S., Charache S., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 1379—86.
88. Antonini E., Wyman J., Brunori M., Taylor J. F., Rossi-Fanelli A., Caputo A., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 907—912.
89. Brunori M., Wyman J., Antonini E., Rossi-Fanelli A., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 3317—3324.
90. Watts-Tobin R. J., (1967), *J. Mol. Biol.*, **23**, 305—322.
91. Mac Quarrie R. A., Gibson Q. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 517—522.
92. Perutz M. F., Fersht A. R., Simon S. R., Roberts G. C. K., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2174—2186.
93. Perutz M. F., Heinder E. J., Ladner J. E., Beetlestone J. G., Ho C., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2187—2200.
94. Kilmartin J. V., (1973), *Biochem. J.*, **133**, 725—733.
95. Perutz M. F., (1972), *Nature*, **237**, 495—499.
96. Edelstein S. J., Gibson Q. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 961—965.
97. Ferrone F. A., Topp W. C., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 444—450.
98. Olson J. S., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 447—458.
99. Hensley P., Edelstein S. J., Wharton D. C., Gibson Q. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 952—960.
100. Morimoto H., Lehmann H., Perutz M. F., (1971), *Nature*, **232**, 408—413.
101. Janin J., (1973), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **27**, 79—120.

Faint, illegible text covering the majority of the page, likely bleed-through from the reverse side of the document.

DANUTA SŁAWIŃSKA *) i JANUSZ SŁAWIŃSKI **)

Analiza chemiluminescencyjna w biochemii

Chemiluminescent Analysis in Biochemistry

Spis treści

Wstęp

I. Mechanizmy bioluminescencji i chemiluminescencji niektórych układów stosowanych w analizie

I-1. Bioluminescencja

I-2. Chemiluminescencja

II. Podstawy zastosowań analitycznych

II-1. Kinetyka chemiluminescencji a stężenie substratów

II-2. Techniki pomiarowe i aparatura

III. Przykłady zastosowań

III-1. Bioluminescencja

III-2. Chemiluminescencja

Contents

Introduction

I. Mechanisms of bioluminescence and chemiluminescence of certain systems being used in analysis

I-1. Bioluminescence

I-2. Chemiluminescence

II. The principles of analytical applications

II-1. Kinetics of chemiluminescence and concentration of substrates

II-2. Measurement techniques and equipment

III. Examples of application

III-1. Bioluminescence

III-2. Chemiluminescence

*) **) Doc. dr habil., Instytut Fizyki i Chemii Akademii Rolniczej w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28A, 60-637 Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów: ATP, CTP, GTP, ITP, UTP — trójfosforany odpowiednio — adenozyne, cytydiny, guanozyne, inozyne i urydiny; ADP, CDP, GDP, IDP, UDP — dwufosforany odpowiednio — adenozyne, cytydiny, guanozyne, inozyne i urydiny; FMN i FMNH₂ — nukleotyd flawinowy i jego forma zredukowana; NAD⁺ i NADH+H⁺ — dwunukleotyd nikotynoamidoadeninowy i jego forma zredukowana; FAD — dwunukleotyd flawinoadeninowy; PP₁ — pirofosforan nieorganiczny; LH₂ — lucyferyna; EDTA — etylenodwuaminoczeroctan.

Wstęp

Chemiluminescencja, a zwłaszcza szczególnie jej przypadek — bioluminescencja znajdują w ostatnich latach coraz szersze zastosowanie analityczne, obejmujące przede wszystkim biochemię i dziedziny pokrewne. Składają się na to cztery powody:

- Do wystąpienia zjawiska bioluminescencji lub chemiluminescencji niezbędne są tak powszechnie występujące i ważne substancje, jak ATP, NADH_2 , NADPH_2 , FMNH_2 , O_2 , i H_2O_2 oraz odpowiednie enzymy. Uczestniczą one bezpośrednio lub pośrednio w większości przemian biochemicznych. Dlatego też istnieje możliwość oznaczania dużej liczby substratów i enzymów metodami bio- i chemiluminescencji.
- Bardzo duża czułość współczesnych urządzeń optycznoelektronicznych do detekcji słabych promieniowań. Niektóre techniki, np. metoda zliczania pojedynczych fotonów (ang. *single photon counting*) realizowana za pomocą liczników scyntylicyjnych umożliwia oznaczanie substratów lub enzymów reakcji bioluminescencyjnych w ilościach rzędu 10^{-18} mola. Jest to czułość z trudem osiągalna kilkoma zaledwie innymi metodami.
- Walory „ekonomiczne” metod analitycznych, wykorzystujących bioluminescencję i chemiluminescencję. Oznaczenia tego typu sprowadzają się w zasadzie do pomiaru natężenia światła. Odnaczają się przedto szybkością i prostotą wykonywania, czułością oraz minimalnym zużyciem odczynników. Z powodzeniem stosowane są coraz powszechniej w laboratoriach biochemicznych liczniki scyntylicyjne lub proste fotometry chemiluminescencyjne.
- Od kilku lat są dostępne w handlu zestawy odczynników zawierające preparaty niezbędne do reakcji bioluminescencji. Stało się to dzięki poznaniu struktury kilku lucyferyn, które są substratami bioluminescencji, postępowi w hodowli wydajnie świecących gatunków i opracowaniu metod otrzymywania aktywnych preparatów lucyferaz będących enzymami reakcji bioluminescencji.

Wymienione czynniki nie wyczerpują aspektów zastosowania zjawisk bioluminescencji i chemiluminescencji w biochemii. Należy choćby tylko wspomnieć o ich wykorzystaniu do badania energetyki i kinetyki przemian biochemicznych, zwłaszcza ich egzoergicznych stadiów z udziałem stanów elektronowo wzbudzonych lub wolnych rodników. Badania bioluminescencji pomagają wyjaśnić mechanizmy działania enzymów, a w szczególności subtelne zmiany konformacji i fizyko—chemicznych właściwości ich centrów aktywnych (1, 2).

Aktualny i otwarty jest także problem informacyjnej roli bioluminescencji np. „pakietów” impulsów świetlnych, emitowanych przez komórki bakteryjne (3). Jednakże bliższe omówienie tych różnorodnych zagadnień

przekracza ramy jednego opracowania. Artykuł niniejszy ogranicza się zatem do przeglądu najnowszych metod i najciekawszych technik analitycznych, wykorzystujących bioluminescencję i chemiluminescencję, mogących zainteresować szersze kręgi biochemików.

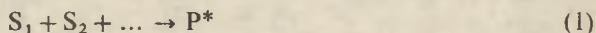
Podstawy teoretyczne zjawiska bio- i chemiluminescencji omówiono bardzo pobieżnie, w zakresie niezbędnym dla zrozumienia treści dalszych rozdziałów. Obszerniejsze opracowania na ten temat znaleźć można w innych pracach (4—9).

Pominięto też zastosowania ultrasłabych świeceń biologicznych (biochemiluminescencji) w biochemii, fizjologii roślin, medycynie i rolnictwie (4, 5, 10, 11).

I. Mechanizmy bioluminescencji i chemiluminescencji niektórych układów stosowanych w analizie

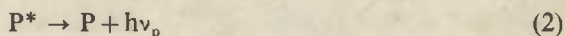
Świecenie towarzyszące reakcjom chemicznym określane jest jako chemiluminescencja, gdy zaś występuje ono w żywych organizmach z udziałem układów enzymatycznych, znane jest jako bioluminescencja. Te dwa rodzaje luminescencji powstają w elementarnych egzoergicznym stadiach reakcji, najczęściej utleniania, gdy tworzą się elektronowo (rzadziej oscylacyjnie) wzbudzone cząsteczki produktów reakcji. W procesie chemiluminescencji są więc zawsze dwa etapy:

- Etap chemiczny tj. powstawanie wzbudzonej cząsteczki produktu P reakcji:



gdzie S_1 i S_2 — substraty reakcji.

- Etap fizyczny, tzn. dezaktywacja promienista ze wzbudzonego stanu singletowego ($^1P^*$) lub tripletowego ($^3P^*$) do stanu podstawowego (1P), a więc odpowiednio fluorescencja lub fosforescencja.

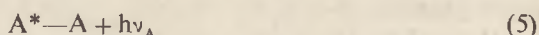
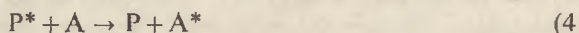


Natężenie świecenia (I), tj. liczba kwantów emitowanych w jednostce czasu zależy od szybkości reakcji (w) tworzenia cząsteczek wzbudzonych P^* (równanie 1) oraz od wydajności kwantowej generowania cząsteczek wzbudzonych (Φ_p^{*zb}) i wydajności kwantowej luminescencji (Φ_L , równanie 3):

$$I = \Phi_p^{*zb} \cdot \Phi_L \cdot w = \Phi_{CL} \cdot w \quad (3)$$

gdzie Φ_{CL} — ogólna całkowita wydajność kwantowa chemiluminescencji. Jak zobaczymy dalej, zależność ta znajduje praktyczne zastosowanie w analizie chemiluminescencyjnej.

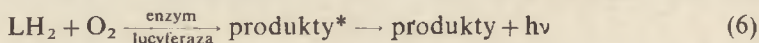
Niekiedy wzbudzona cząsteczka P^* nie ulega bezpośrednio dezaktywacji promienistej, lecz nadmiar energii przekazuje innej cząsteczce, np. A (równanie 4). Jeśli cząsteczka akceptora energii A odznacza się dużą wydajnością kwantową fluorescencji $\Phi_{A,L}$, to może mieć miejsce proces chemiluminescencji sensybilizowanej:



Procesy tego typu występują w niektórych przypadkach bioluminescencji (patrz niżej). Ich znajomość może być wykorzystana do zwiększenia czułości oznaczeń chemiluminescencyjnych np. przez dodatek sensybilizatora zwiększającego wartość Φ_{CL} ($\Phi_{A,L} > \Phi_{P,L}$). Zasadnicza różnica między chemiluminescencją a bioluminescencją polega na tym, że w przypadku bioluminescencji zarówno stadium wzbudzenia jak i luminescencji zachodzi pod działaniem enzymów w specjalnych strukturach zwanych lumisomami. Omówimy teraz krótko kilka reakcji bioluminescencji i chemiluminescencji, które znajdują szersze zastosowania analityczne.

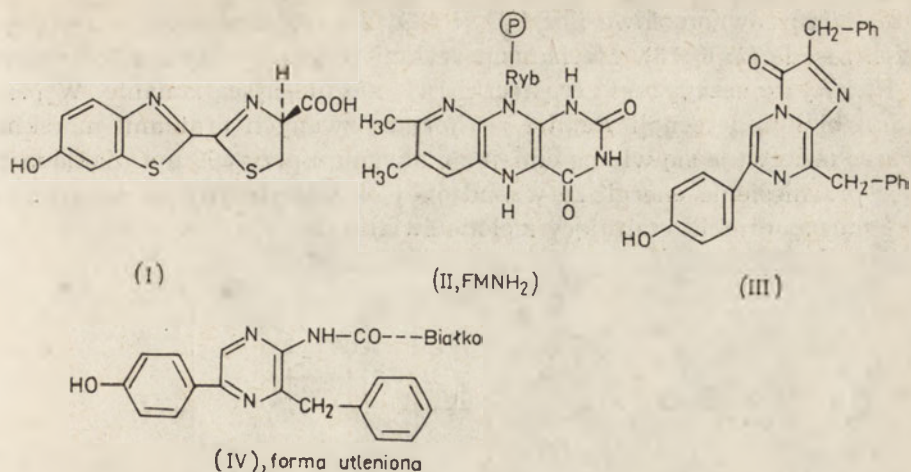
1-1. Bioluminescencja

Organizmy żywe takie jak świetliki, skorupiaki, bakterie i grzyby wysyłają promieniowanie w zakresie 420—750 nm. Najczęściej są to organizmy morskie. Natężenie bioluminescencji jest bardzo różne, np. chrząszcz *Photinus* sp. emituje około 10^{12} kwantów/sek, zaś komórka bakterii *Photobacterium* wysyła 10^2 — 10^3 kwantów/sek (1, 3, 14). Bioluminescencja towarzyszy reakcjom utleniania tlenem cząsteczkowym ciepłotrwałych substratów, zwanych od czasów Dubois (1885 r) lucyferynami (LH_2), w obecności termolabilnych enzymów, objętych wspólną nazwą lucyferaz. W tym przypadku reakcje bioluminescencji można zapisać następująco:



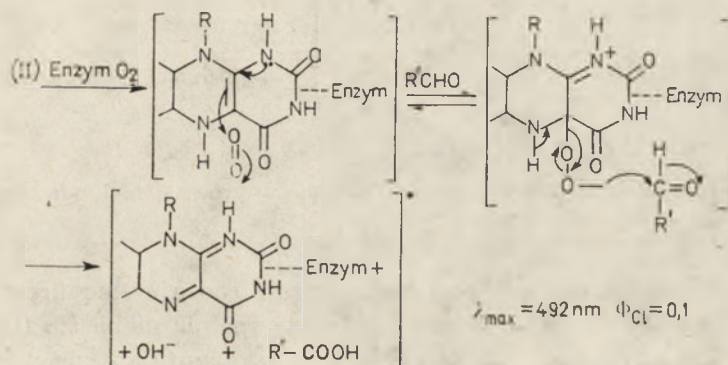
Struktura lucyferyn jest w wielu przypadkach znana (1, 6, 9, 12, 13). Wzory strukturalne lucyferyn omawianych dalej układów świecących podano na rycinie 1.

W kontrolowanej enzymatycznie reakcji utleniania lucyferyn (LH_2) uczestniczy labilny atom wodoru H, który jest wiązany przez kwas adenyloowy lub OOH^- oraz tlen cząsteczkowy. W przypadku bioluminescencji bakterii zredukowany nukleotyd flawinowy ($FMNH_2$, lucyferyna bakteryjna) tworzy z tlenem w obecności lucyferazy utlenioną formę FMN, która następnie reagując z aldehydem np. dodekanalem wytwarza cząsteczki wzbudzone, emitujące światło (14, 15) co zilustrowano na rycinie 2.



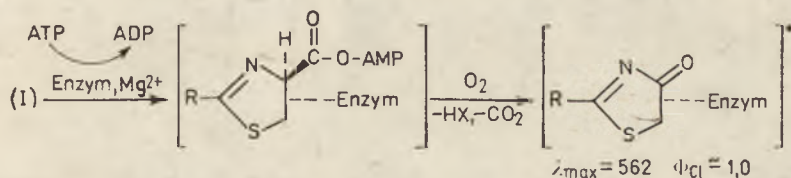
Ryc. 1. Wzory strukturalne lucyferyn następujących układów świecących: chrząszcza *Photinus pyralis* (I), bakterii *Photobacterium fisheri* i *Achromobacter* (II), bratków morskich (pierścieniec) *Renilla reniformis* (III), oraz meduzy *Aequorea* (IV) (1, 6, 12, 13)

Ph — grupa fenylowa.



Ryc. 2. Mechanizm bioluminescencji bakterii (14, 15).

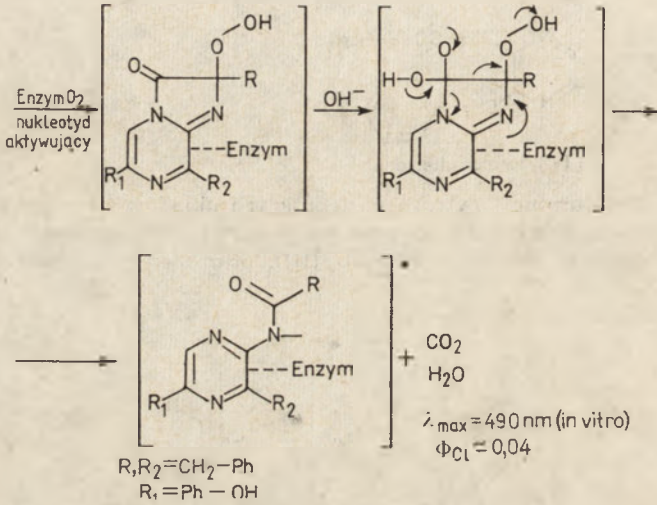
Widmo bioluminescencji odpowiada fluorescencji uprotonowanej formy FMNH⁺ co wskazuje, że FMN jest związany z silnie kwasowym centrum enzymu (14, 16). Utlenianie lucyferyn (I) i (III) świecącego chrząszcza i bratków morskich jest reakcją oksydacyjnej dekarboksylacji, w której



Ryc. 3. Mechanizm oksydacyjnej dekarboksylacji lucyferyny chrząszcza *Photinus pyralis* (2, 6).

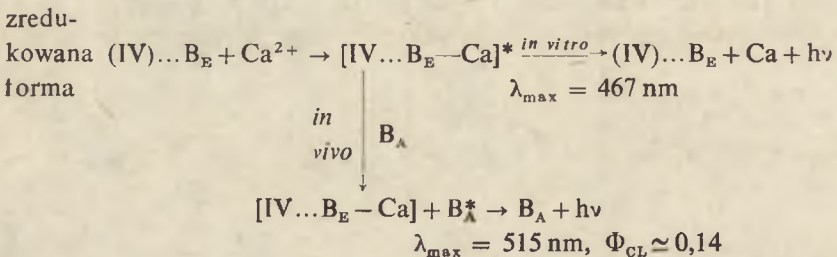
X — zasada, wiążąca labilny atom wodoru w cząsteczce LH₂.

uczestniczą równomolowe ilości O_2 i CO_2 oraz labilny atom H, wiązany przez zasadę (2, 6, 13). Mechanizm reakcji podają ryciny 3 i 4. Symbole R, R_1 i R_2 oznaczają część cząsteczki LH_2 , nie ulegającą zmianie. W przypadku bioluminescencji *Renilla reniformis*, zwanych bratkami morskimi, *in vivo* obserwuje się widmo emisji z maksimum przy 509 nm. Zakłada się więc przeniesienie energii ze wzbudzonej oksylucyferyny na sensybilizator—chromoproteid emitujący zielone światło (9, 17).



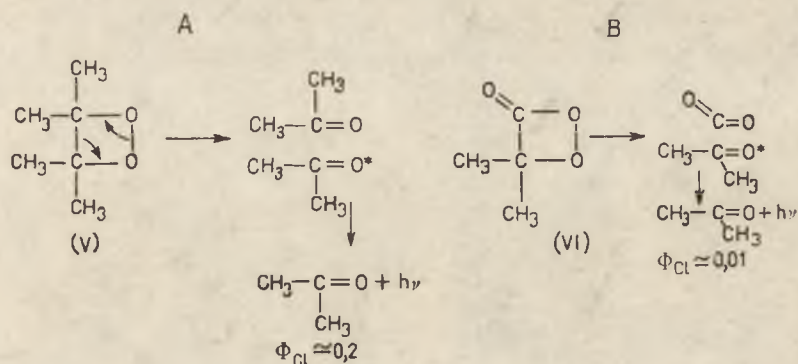
Ryc. 4. Mechanizm oksydacyjnej dekarboksylacji w procesie bioluminescencji bratków morskich *Renilla reniformis* (13, 17).

Ciekawy układ świecący posiada meduza z rodzaju *Aequorea*. Funkcję zarówno lucyferyny jak i enzymu lucyferazy spełnia niebiesko fluoryzujące białko tzw. ekwaryna (B_E), która reaguje z jonami Ca^{2+} przypuszczalnie bez udziału O_2 . Wzbudzenie następuje w reakcji przeniesienia elektronu z donora B na akceptor Ca^{2+} , przy czym w warunkach *in vivo* energia wzbudzenia przenoszona jest na emitującą zielone światło cząsteczkę białka (B_A) (4, 9, 18):



Jest to więc klasyczny przykład bioluminescencji aktywowanej (sensybilizowanej).

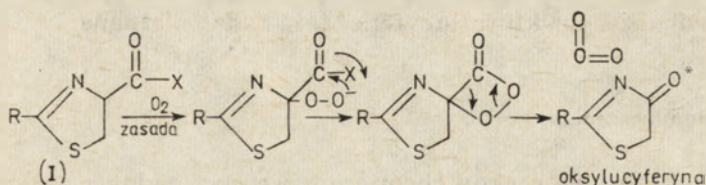
Nasuwa się pytanie, dlaczego oksydacyjna dekarboksylacja lucyferyny prowadzi do tworzenia produktów elektronowo wzbudzonych (P*)? Według Adama (13), Mc Capra (6) i White'a (19) w omawianych procesach tworzą się przejściowe czteroczłonowe pierścienie dwuoksyetanowe (V) lub α -peroksy-laktanowe (VI). (Ryc. 5). Rozpadając się w synchronicznej, egzoer-



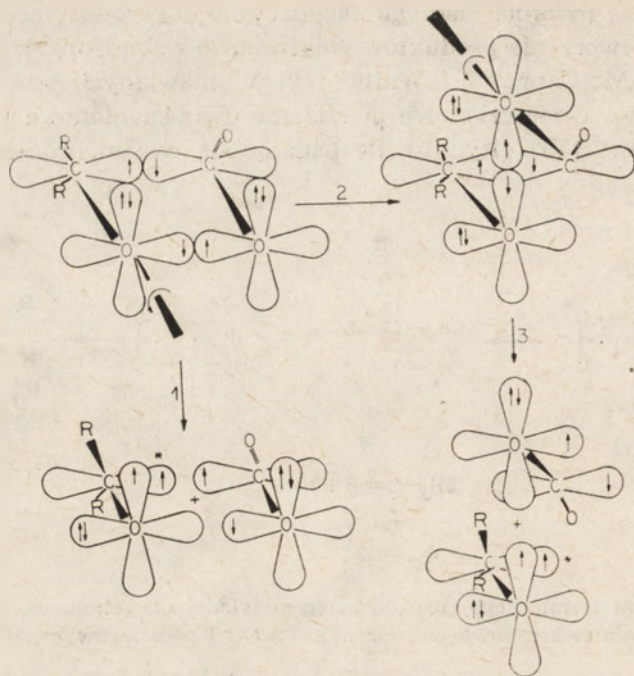
Ryc. 5. Schemat termicznego rozpadu czterometylodwuoksyetanu na dwie cząsteczki acetonu w stanie elektronowo wzbudzonym (*) (A) i podstawowym (B) (6, 13).

gicznej reakcji ($-\Delta H = 350-420$ kJ/mol) do produktów karbonylowych, efektywnie przekształcają energię wiązań O—O i C—C w energię wzbudzenia elektronowego. Jako przykład służyć może termiczny rozpad czterometylodwuoksyetanu na dwie cząsteczki acetonu (Ryc. 5). W przypadku utleniania LH_2 *Photinus pyralis* postulowano reakcje pokazane na rycinie 6 (2, 6, 20). Przez R oznaczono resztę cząsteczki lucyferyny, nie biorącą udziału w przemianie.

Duże prawdopodobieństwo tworzenia związku karbonylowego np. acetonu z czterometylodwuoksyetanu (V) lub oksylucyferyny z lucyferyny (I) chrząszcza *Photinus sp.* w stanie elektronowo wzbudzonym. Turro i Lechtken (7) wyjaśniają dużą wartością entalpii rozpadu ($-\Delta H \geq 350$ kJ/mol) i (lub) oscylacyjnie inicjowanym sprzężeniem spinowo-orbitalnym w grupie karbonylowej. Rycina 7 przedstawia oddziaływania ładunków elektrycznych orbitali cząsteczki α -peroksy-laktanu, powodujące rozpad pierścienia z równoczesną rewersją spinu S (Π, Π^*) \rightleftharpoons T (n, Π^*). Przyczyną



Ryc. 6. Tworzenie się i rozpad pierścienia dwuoksyetanowego podczas oksydacyjnej dekarboksylacji lucyferyny chrząszcza *Photinus pyralis* (2, 6, 20).



Ryc. 7. Oscylacyjnie indukowane sprzężenia spinowo-orbitalne w α -peroksylationach (13). W cząsteczce α -peroksylationu spiny elektronów są skompensowane i wypadkowa multipletowość wynosi $2s+1=1$.

1 — w wyniku obrotu (strzałka) orbitali lewego atomu tlenu o 90° następuje inwersja spinu. Równocześnie pękają wiązania σ C—C i O—O. Tworzy się cząsteczka ketonu z dwoma niesparowanymi elektronami ($2s+1=3$) a więc w stanie tripletowym T (n, π^*) oraz cząsteczka CO, w stanie singletowym ($2s+1=1$) podstawowym.

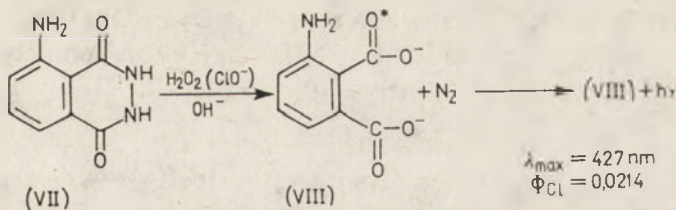
2 — oscylacja wzdłuż słabego wiązania σ O—O powoduje deformację czterocłonowego pierścienia, a następnie pęknięcie tego wiązania.

3 — rotacja orbitali p_x i p_y tlenu o 90° (strzałka) i pęknięcie wiązania σ C—C daje keton w stanie T (n, π^*) oraz CO₂ w stanie singletowym podstawowym.

dużej wartości całkowitej wydajności kwantowej bioluminescencji Φ_{CL} jest specyficzna rola enzymu lucyferazy. Zmniejsza on prawdopodobieństwo dezaktywacji bezpromienistej (gaszenia) wzbudzonego produktu (P^*). Właściwości lucyferaz są intensywnie badane; niektóre z nich wyodrębniono już w stanie krystalicznym, zbadano masę cząsteczkową, wyznaczono stałe dysocjacji kompleksu LH₂-lucyferaza i podjednostek lucyferazy bakteryjnej, zlokalizowano centra aktywne wiążące LH₂, ATP i Mg²⁺ (9, 12, 15, 16). Jednakże struktura lucyferaz jest nadal nieznaną.

I-2. Chemiluminescencja

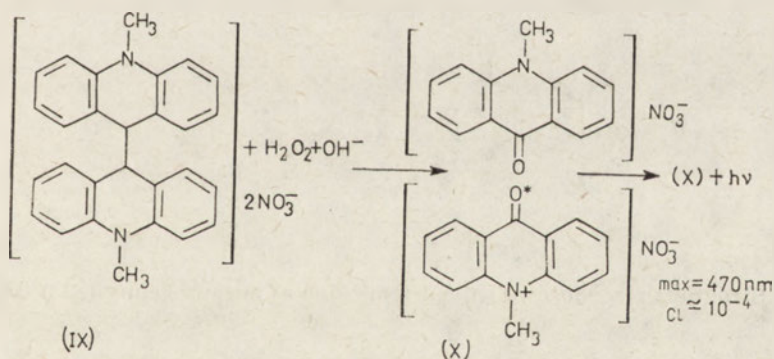
Z pośród licznych reakcji chemiluminescencji, jedną z najlepiej poznanych i wydajnych jest utlenianie luminolu (hydrazynu kwasu 5-amino-o-ftalowego) w roztworze zasadowym (6, 8, 21, 22) (Ryc. 8). Najczęściej



Ryc. 8. Mechanizm chemiluminescencji hydrazynu kwasu 5-amino-o-ftalowego luminolu (VII) (8, 21, 22).

używanym utleniaczem jest H_2O_2 w obecności jonów OH^- i katalizatorów, jak np. jony metali o zmiennej wartościowości $\text{Me}^{n\pm 1}$, hemoglobina, peroksydazy i kompleksy metali ciężkich. Utlenianie (VII) przebiega przez stadia wolnorodnikowe i dlatego $\text{Me}^{n\pm 1}$ oraz inhibitory reakcji rodnikowych silnie wpływają na szybkość reakcji i natężenie chemiluminescencji. Widmo chemiluminescencji luminolu pokrywa się z widmem fluorescencji kwasu 5-amino-ftalowego (VIII) od pH jest taka sama jak w przypadku chemiluminescencji luminolu (23). Wskazuje to, że emitery chemiluminescencji jest dwuanion (VIII) w wzbudzonym stanie singletowym S. Liczne zastosowania analityczne chemiluminescencji luminolu będą zilustrowane dalej.

Innym związkiem wykazującym silną chemiluminescencję jest azotan $\text{N,N}'$ -dwumetylo-9,9'-dwaakrydylu, lucygenina (IX) (Ryc. 9). Widmo che-

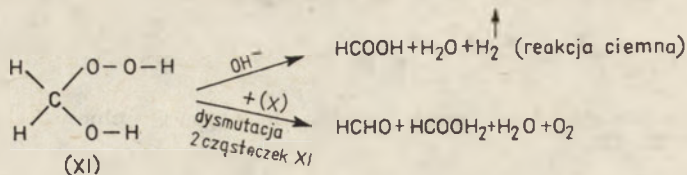


Ryc. 9. Mechanizm chemiluminescencji azotanu $\text{N,N}'$ -dwumetylo-9,9'-dwaakrydylu (IX) (6, 24).

miluminescencji lucygeniny jest identyczne z widmem fluorescencji N -metyloakrydonu (X), co wskazuje, że emitery ten tworzy się w stanie elektro-nowo wzbudzonym w procesie utleniającego rozerwania wiązania 9, 10 w cząsteczce lucygeniny (IX) (24).

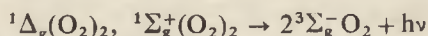
Reakcji Trautza-Schorigina tj. reakcji utleniania pirogalolu i HCHO przez stężony roztwór $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{K}_2\text{CO}_3$ towarzyszy pomarańczowe promienio-wanie (25). Dla celów analitycznych została ona zmodyfikowana przez za-

stąpienie pirogalolu kwasem galusowym oraz użycie mniejszych stężeń reagentów (26). W pierwszym stadium reakcji $H_2O_2 + HCHO$ tworzą nietrwały α -hydroksymetylohydronadtlenek (XI), który ulega kompetycyjnym reakcjom rozpadu (26, 27, 28, 29) (Ryc. 10). Nadtlenek (XI) i powstający tlen

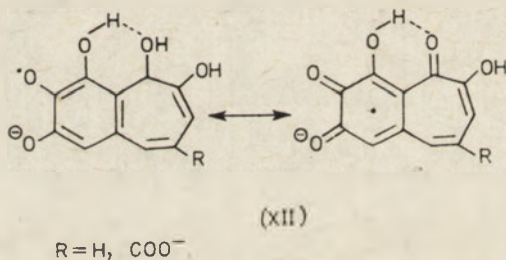


Ryc. 10. Kompetycyjny rozpad hydronadtlenku α -hydroksymetylu (XI) (28, 31).

O_2 reagują z polifenolem utleniając go w szeregu następujących po sobie reakcji do prostych kwasów alifatycznych (28, 30). W tych egzotermicznych reakcjach utleniania tworzą się cząsteczki wzbudzone. Przepuszcza się, że emiterami pomarańczowego promieniowania i chemiluminescencji o wydajności $\Phi_{CL} \approx 10^{-4}$ i $\lambda_{max} = 635-705$ nm są dimery singletowego tlenu cząsteczkowego (27, 28, 31):



lub kompleksy ${}^1\Delta_g(O_2)_2, {}^1\Sigma_g^+(O_2)_2 - D$, gdzie D — przejściowy produkt utleniania polifenolu, niebiesko zabarwiony anion semichinonu (XII). Struktury graniczne anionu semichinonu pokazano na rycinie 11.



Ryc. 11. Struktury rezonansowe anionu semichinonu purpurogaliny (XII) (26, 28).

II. Podstawy zastosowań analitycznych

II-1. Kinetyka chemiluminescencji a stężenie substratów

U podstaw analizy chemiluminescencyjnej i bioluminescencyjnej leży związek między natężeniem chemiluminescencji I_{CL} w czasie t , a stężeniem substratów uczestniczących w elementarnej reakcji:

$$I_{CL}(t) = \Phi_{CL} \cdot \frac{dc(t)}{dt}$$

gdzie Φ_{CL} jest wydajnością chemiluminescencji, $dc(t)$ — zmianą stężenia substratów w danym momencie reakcji, $\frac{dc(t)}{dt}$ — szybkością reakcji generującej elektronowo wzbudzone cząsteczki, emitujące promieniowanie. Wielkość Φ_{CL} zależy od dwóch czynników:

$$\text{— wydajności kwantowej wzbudzenia } \Phi_{exc} = \frac{N_p^*}{N_R} \quad (8)$$

$$\text{— wydajności kwantowej luminescencji } \Phi_L = \frac{N_{hv}}{N_p^*} \quad (9)$$

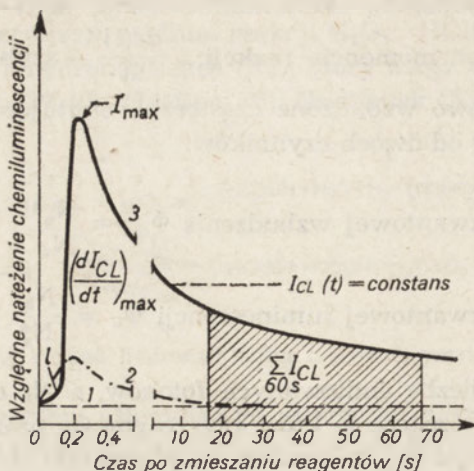
gdzie N_{hv} oznacza liczbę emitowanych fotonów, a N_R oraz N_p^* oznaczają odpowiednio liczbę cząsteczek, które przereagowały oraz liczbę cząsteczek wzbudzonych. Wartość Φ_{exc} i Φ_L zależy od energetyki elementarnej reakcji i układu poziomów energetycznych wzbudzonego elektronowo produktu, zatem od takich właściwości środowiska jak polarność, lepkość, temperatura, pH itp. Dla reakcji bioluminescencji wartość Φ_{CL} wynosi od 0,04 do 0,88. Tak duże wartości Φ_{CL} zapewniają wysoką czułość bioluminescencyjnych metod analitycznych, która jest zasadniczo limitowana szybkością reakcji $\frac{dc(t)}{dt}$, czułością układu pomiarowego, a najczęściej czystością odczynników.

Natężenie chemiluminescencji I_{CL} można mierzyć w funkcji czasu jako krzywą kinetyczną $I_{CL} = f(t)$ lub też mierzyć sumę świetlną $\sum I$ w przedziale czasu t_0 do t jako równą całce

$$\sum_t I = \int_{t_0}^t I_{CL} dt$$

Typową krzywą kinetyczną bioluminescencji podano na rycinie 12. Po zmieszaniu substratów niezbędnych dla procesu bioluminescencji, natężenie świecenia przechodzi przez kilka faz: „fazę powolną” (okres indukcji), wzrost I_{CL} , maksimum I_{CL} i fazę zaniku świecenia. Krzywą kinetyczną chemiluminescencji lub bioluminescencji można opisać za pomocą kilku parametrów (32):

- I — czasu trwania „fazy powolnej” tj. odcinka między początkiem reakcji ($t = 0$), a przecięciem osi t z linią prostą, prowadzoną przez punkt na krzywej $I_{CL}(t)$, gdzie szybkość wzrostu I_{CL} jest maksymalna,
- $\left(\frac{I_{CL}}{dt}\right)_{max}$ — maksymalna szybkość wzrostu I_{CL} ,
- I_{max} — maksymalne natężenie chemiluminescencji (wysokość szczytu),



Ryc. 12. Typowa krzywa kinetyczna bioluminescencji *Photinus pyralis* ($I_{CL} = f(t)$).

1 — tło układu pomiarowego,

2 — chemiluminescencja roztworu kontrolnego zawierającego lucyferinę, lucyferazę, O_2 , Mg^{2+} i bufor,

3 — krzywa kinetyczna chemiluminescencji roztworu zawierającego lucyferinę, lucyferazę, O_2 , Mg^{2+} , bufor i ATP,

— I_t — natężenie chemiluminescencji po t sekundach od zapoczątkowania reakcji,

— I_{av} — średnia wartość I_{CL} , określona jako $\frac{\sum I_{CL}}{t}$

Czas trwania oznaczeń, powtarzalność wyników i czułość metody zależą od wyboru odpowiedniego parametru dla oznaczeń analitycznych a także od techniki mieszania i rejestrowania sygnału chemiluminescencji.

Pomiar parametru 1, tj. czasu trwania „fazy powolnej” znalazł dotychczas zastosowanie analityczne jedynie w przypadku oznaczania stężenia CN^- (21).

W analizie biochemicznej najczęściej wykorzystuje się zależności:

$$\left(\frac{dI_{CL}}{dt}\right)_{max} = f(c) \quad i \quad I_{max} = f(c)$$

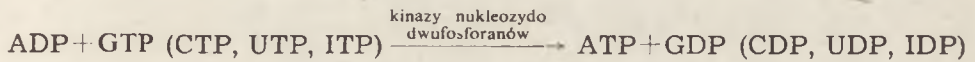
gdzie c — stężenie oznaczonego substratu. Wartość $\left(\frac{dI_{CL}}{dt}\right)_{max}$ oraz I_{max} jest

wprost proporcjonalna do stężenia np. w przypadku ATP zarówno dla oczyszczonych jak i nieoczyszczonych preparatów lucyferyny *Photinus pyralis*. Również obecność innych nukleotydów jak ADP, GTP, ADP+GTP

oraz jonów Mn^{2+} znacznie mniej narusza proporcjonalność między $\left(\frac{dI_{CL}}{dt}\right)_{max}$ lub I_{max} a stężeniem ATP niż między $\sum I_t$ lub I_t i I_{av} a $[ATP]$ (32, 33). Parametr I_{max} odpowiada maksymalnej szybkości reakcji, a więc największemu

natężeniu świecenia. Pomiar I_{\max} pozwala uzyskać maksymalną czułość oznaczeń, co jest istotne np. podczas oznaczania ATP i FMN w pojedynczych komórkach (14, 32).

Pomiary parametru $\sum_t I$ w czasie całkowania od 10 do 150 s od momentu zmieszania reagentów mogą stanowić często wygodny sposób sporządzania krzywej kalibracji $\sum_t I = f(c)$. Należy jednak upewnić się, czy w wybranym przedziale czasowym t całkowania natężenia chemiluminescencji nie zachodzą reakcje naruszające proporcjonalność między $\sum_t I$ a (c) . Do reakcji takich należy np. powolne tworzenie się ATP w reakcjach (15, 32, 34).



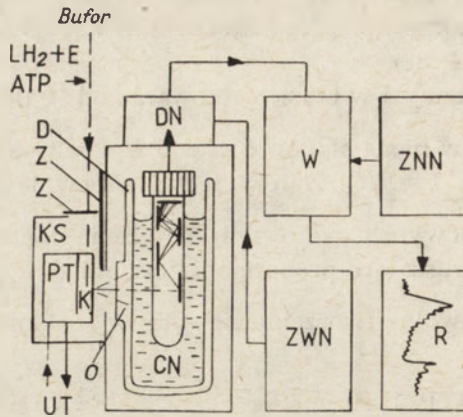
Zaletą oznaczeń wykorzystujących pomiar parametru $\sum_t I$ jest możliwość dokonywania pomiarów po upływie kilku sekund od mieszania reagentów, a więc zbędność urządzeń do szybkiego wstrzykiwania roztworów. Dlatego też pomiary $\sum_t I$ są szeroko stosowane w przypadku analiz wykonywanych za pomocą liczników scyntylicyjnych (35, 36) oraz seryjnie produkowanych fotometrów chemiluminescencyjnych.

Innym sposobem całkowania I_{CL} jest pomiar stacjonarnego natężenia chemiluminescencji $I_{\text{CL}} = \text{const}$ techniką przepływową. Dobierając odpowiednio stałą prędkość przepływu świecącego roztworu, można otrzymać $I_{\text{CL}} = \text{const}$ w dowolnej fazie kinetyki chemiluminescencji. Metoda ta posiadająca wiele zalet wymaga jednak większego zużycia reagentów oraz odpowiedniej pompy dozującej. Zilustrujemy teraz technikę pomiarów parametrów kinetyki chemiluminescencji przykładami wybranymi pod kątem powszechności stosowania, oryginalności rozwiązań lub innych walorów analitycznych, jak np. czułości oznaczeń.

II-2. Techniki pomiarowe i aparatura

Wybór techniki pomiarowej i aparatury zależy od rodzaju mierzonych parametrów kinetycznych, pożądanej czułości oznaczeń, rodzaju analizowanego układu świecącego, ilości materiału itp. Ogólna zasada sprowadza się do pomiaru natężenia świecenia za pomocą układu fotoelektrycznego, którego schemat podaje rycina 13. Tego rodzaju układ, w zależności od szczegółów konstrukcyjnych i dodatkowego wyposażenia np. w filtry optyczne, monochromator, kuwetę przepływową itp., może być przyrządem uniwersalnym, przystosowanym do różnych technik i różnych wymogów analizy biochemicznej.

Niżej omówimy najbardziej rozpowszechnione lub najciekawsze techniki pomiarów kinetyki chemiluminescencji.



Ryc. 13. Schemat układu fotoelektrycznego do pomiarów chemiluminescencji i bioluminescencji metodą prądową (wzmacnianie i rejestracja prądu stałego) na przykładzie oznaczania ATP.

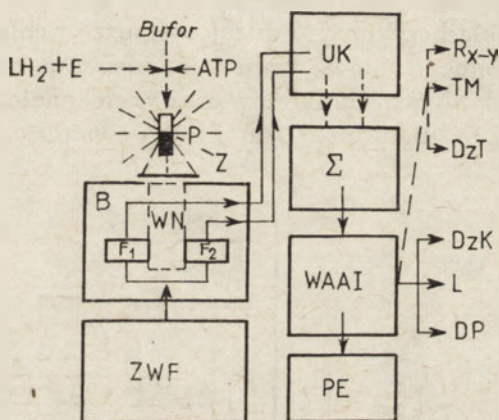
Z — przysłony, KS — komora światłoszczelna, PT — płaszcz termostatujący kufwę, K — kufwa, w której zachodzi reakcja generująca chemiluminescencję, O — okienko w naczyniu Dewara (nieposrebrzana część szklanych lub kwarcowych ścianek), D — naczynie Dewara zawierające ciekły azot (CN) z zanurzonym fotopowielaczem, DN — dzielnik napięcia i wtórnik, W — wzmacniacz, ZNN — zasilacz niskiego napięcia, ZWN — zasilacz wysokiego napięcia 600–2000 V, R — rejestrator, UT — ultratermostat.

Pomiary sumy świetlnej $\sum_t I$ bioluminescencji licznikami scyntylacyjnymi, jakich używa się do określenia aktywności β -promieniotwórczych izotopów, jak T, [^{14}C], [^{32}P], [^{45}Ce], [^{131}X] zastosowano do oznaczania pikomolowych (10^{-12} M) stężeń ATP, ADP, FMN, NADP, adenozy-no-3'-fosforano-5'-fosforanu (PAP) i 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczanu (PAPS) (15, 35, 36, 37). Oznaczenia przeprowadzono w licznikach typu *Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer* — Packarda IS 133, Backmana lub *Mark II* — Nuclear Chicago, wykorzystując reakcje bioluminescencji układów świecących *Photinus pyralis*, *Photobacterium fisheri* i *Renilla reniformis*. Zasadnicze zalety użycia liczników scyntylacyjnych w bioluminescencyjnych analizach ilościowych są następujące:

- niski poziom szumów selekcyonowanych fotopowielaczy umożliwia pomiary w temperaturze pokojowej, odpowiedniej dla reakcji enzymatycznych,
- geometria stosowanego układu optycznego (próbka — fotopowielacze — reflektory) zapewnia wysoką sprawność zbierania światła ($> 90\%$), co z kolei warunkuje dużą czułość oznaczeń,
- rejestracja liczby impulsów czyli pomiar $\sum_t I_{\alpha}$ metodą zliczania pojedynczych fotonów daje wyniki lepsze statystycznie niż pomiar I_{\max} , a poza tym szybkość mieszania reagentów nie ma tak dużego wpływu na te wyniki,
- odpowiedni dobór napięcia fotopowielacza, wzmacnienia i dyskry-

minacji umożliwia optymalizację warunków zliczania impulsów tj. maksymalną szybkość zliczania impulsów dla maksymalnego stosunku sygnał — szum,

- możliwa jest automatyczna, programowana zmiana próbek,
- sprzężenie licznika scyntylicyjnego z komputerem umożliwia szybkie opracowanie wyników pod względem kinetycznym i statystycznym. Schemat układu pomiarowego typowego licznika scyntylicyjnego podano na rycinie 14.



Ryc. 14. Schemat blokowy licznika scyntylicyjnego, wykorzystanego do analizy chemiluminescencyjnej.

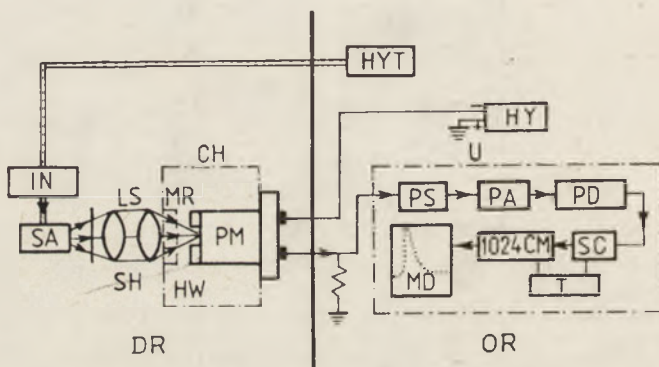
P — naczynie ze świecącym roztworem, B — ołowiany blok licznika scyntylicyjnego, F_1 i F_2 — fotopowielacze, WN — wnęka pomiarowa, ZWF — zasilacz wielofunkcyjny, UK — układ koincydencyjny (wylączony), Σ — sumator impulsów, WAAI — wielokanałowy analizator amplitudy impulsów, PE — przelicznik elektronowy impulsów. Urządzenia rejestrujące, stosowane alternatywnie, zależnie od metod obróbki danych doświadczalnych: R_{x-y} — rejestrator, TM — zapis wyników na taśmie magnetycznej, DzT — dziurkarka taśmy, DzK — dziurkarka kart, L — lister, DP — dalekopis.

Od kilku lat znane są proste urządzenia do automatycznego wstrzykiwania reagentów do naczynek scyntylicyjnych co pozwala mierzyć nie tylko wartości parametru $\sum_t I_{CL}$ lecz także I_{max} oraz śledzić kinetykę chemiluminescencji (35, 37). Zastosowanie tych urządzeń pozwala dokładniej sporządzić krzywą kalibracji, a tym samym zwiększyć czułość oznaczeń.

Zalety analitycznych metod chemiluminescencyjnych i ich szybko wzrastająca popularność spowodowały opracowanie prostych fotometrów. Są to niewielkie aparaty, często przenośne z elektronicznymi obwodami scalonymi. Analogowa lub cyfrowa skala przyrządu umożliwia zwykle pomiary $\sum_t I$ dla $t = 60$ s lub I_{max} . Można je również wykorzystać do wykonywania analiz opartych o chemiluminescencję luminolu lub lucygeniny. Firmy prowadzące dystrybucję takich prostych przyrządów, jak np. *Amino-Bowman Chemiluminescent Photometer*, *Lab-Line ATP Photometer*

9140 lub JRB Inc. San Diego Photometer, dostarczają również zestawy niezbędnych odczynników. Fotometry te są coraz powszechniej stosowane do seryjnych oznaczeń enzymów, metabolitów, analiz bakteriologicznych wody, ścieków, produktów spożywczych, płynów ustrojowych, określania produkcji biomasy itp. Do oznaczania subfentomolowych ($< 10^{-15}$) stężeń ATP Wattermark i Sty m n e (32) opracowali finezyjną technikę pomiarów dwóch parametrów $\left(\frac{dI_{CL}}{dt}\right)_m$ i I_{max} . Rycina 15 przedstawia schemat

układu pomiarowego. Zawiera on takie elementy jak zdalnie sterowane urządzenie do szybkiego wstrzykiwania ($< 0,8$ sek) mikrolitrowych objętości reagentów, układ optyczny o dużej aperturze i chłodzony fotopowielacz o niskim poziomie szumów, rzędu 8 impulsów na sekundę, pracujący metodą zliczania pojedynczych fotonów oraz wielokanałowy analizator amplitudy z pamięcią magnetyczną. Dzięki zastosowaniu odczynników o wy-



Ryc. 15. Układ pomiarowy do oznaczania subfentomolowych stężeń ATP (54).

DR — pomieszczenie zaciemnione, OR — pomieszczenie niezaciemnione, HYT — hydrauliczne urządzenie uruchamiające automatyczną strzykawkę magnetyczną IN, SA — kuweta reakcyjna ze świecącym roztworem, SH — przysłona, LS — układ soczewek, HW — ogrzewane okienko kwarcowe, CH — kriostat dla chłodzenia fotopowielacza PM, MR — pierścień magnetyczny zmniejszający prąd ciemny fotopowielacza, HY — zasilacz stabilizowany wysokiego napięcia, U — wieloczynnościowy analizator, PS — układ formowania impulsów, PA — wzmacniacz amplitudy impulsów, PD — dyskryminator amplitudy impulsów, SC — licznik impulsów, T — czasoster, 1024 CM — wielokanałowy analizator amplitudy impulsów z pamięcią, MD — ekran oscyloskopu do graficznego odtwarzania danych z pamięci analizatora.

sokim stopniu czystości, zwłaszcza preparatów lucyferazy z *Photinus pyralis* i sterylności roztworów (osłona heksanowa) udało się oznaczyć stężenie ATP w pojedynczych komórkach infusorii, wiciowców i makroflagów. Użycie bardzo czystych preparatów lucyferaz z bakterii *Achromobacter fisheri* pozwala również analizować fentomolowe stężenia $NAD(P)H_2$ (14, 34).

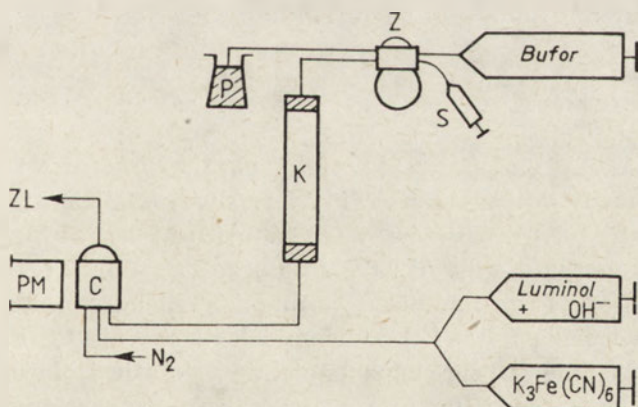
Do pomiarów wartości parametru $\left(\frac{dI_{CL}}{dt}\right)_{max}$ R h e e i wsp. (33) wykorzystali technikę zatrzymanego strumienia (ang. *stopped-flow*), wprowadzając

dzoną przez *Chance* do badania kinetyki szybkich reakcji enzymatycznych. Pomiar $\frac{dI_{CL}}{dt}_{max}$ w ciągu 2 sek po zmieszaniu reagentów umożliwia rozdzielenie w czasie szybkiej reakcji zużycia ATP od powolnych reakcji tworzenia ATP z ADP i trójfosforanów nukleotydów.

Pomysłową technikę rejestracji kinetyki kilkusekundowych błysków świetlnych opracowali *Bowling* i wsp. (38). Skonstruowali oni analizator — dysk wirujący z prędkością 1 000 obrotów/min. Siła odśrodkowa powoduje szybkie zmieszanie reagentów w 16 kuwetach, a natężenie chemiluminescencji emitowanej z każdej kuwety jest rejestrowane przez fotopowielacz 40 razy w ciągu 2,5 sek i notowane w pamięci komputera. Technikę tę zastosowano do oznaczania jonów Cr^{3+} i Cr^{6+} w wodach naturalnych, wykorzystując katalityczny wpływ Cr^{3+} na chemiluminescencję luminolu. Może ona być z powodzeniem użyta również do analiz bioluminescencyjnych. Metoda ta pozwala w ciągu 2 do 5 sek wykonać analizę chemiluminescencyjną jedenastu próbek, czterech roztworów wzorcowych i jednego roztworu „tła”, przy czym objętość jednej próbki wynosi tylko 0,3 ml.

Hercules, Seitz i wsp. opracowali metody chemiluminescencyjne wykorzystujące technikę przepływową do analizy wielu związków ważnych w biochemii, farmacji i ochronie środowiska (22, 39, 40). Techniki te wykorzystujące chemiluminescencję luminolu ilustruje rycina 16 na przykładzie oznaczania glukozy we krwi (40).

Zasadę oznaczania glukozy objaśniono bliżej w następnym rozdziale,



Ryc. 16. Schemat analizy chemiluminescencyjnej techniką przepływową na przykładzie oznaczania glukozy w osoczu krwi (40).

4 mM bufor octanowy o pH = 5,6, S — strzykawka lub mikropipeta dla wprowadzania badanej próbki, Z — zawór teflonowy włączający-wyłączający przepływ roztworu buforowego lub próbki, P — badana próbka, K — kolumna z glukooksydazą (E.C. 1.1.3.4) związaną na Sepharose, N_2 — dopływ azotu dla mieszania roztworów w kuwecie, C — kuweta reakcyjna, PM — fotopowielacz, Z — odpływ zużytych roztworów. Na rysunku pominięto pompę dozującą.

a obecnie omówimy tylko aspekty techniczne. Pompa dozująca i układ strzykawkowy wytwarzają stacjonarny przepływ badanych roztworów w kuwecie przepływowej, które po zmieszaniu reagują chemicznie. Natężenie świecenia jest funkcją szybkości przepływu. Prędkość przepływu dobiera się tak, aby fotopowielacz rejestrował świecenie mieszaniny reakcyjnej w kuwecie, odpowiadające określonej fazie reakcji, zwykle I_{max} . Najczęściej stosuje się przepływ z prędkością od 4 do 10 ml/min. Tak więc zasadniczą zaletą metody przepływowej jest łatwość wyboru optymalnego parametru kinetyki i utrzymania stałej jego wartości w czasie. Ponadto tło układu reagującego tj. emisja z wszystkich odczynników zawartych w roztworze, za wyjątkiem analizowanej substancji stanowi cały układ odniesienia, limitujący z reguły czułość metody. Technika przepływowa nadaje się do seryjnych, automatycznych oznaczeń, w szczególności analizy wycieków z kolumn chromatograficznych. Wymaga ona jednak dużych ilości odczynników, a zatem jest kosztowna. Zużycie roztworów jest znacznie większe niż w innych metodach, a objętość analizowanej próbki wynosi 1—3 ml.

III. Przykłady zastosowań

Zastosowanie bioluminescencji i chemiluminescencji do ilościowego oznaczania różnych związków chemicznych i materiału biologicznego zilustrujemy kilkoma przykładami. Wybór ich uzasadniony jest użytecznością oznaczeń. Uwzględniono też aspekty analityczne obecnie może mniej znane, lecz posiadające duże perspektywy zastosowania do oznaczeń np. tlenu singletowego lub „sond chemiluminescencyjnych”.

III-1. Bioluminescencja

Układ świecący chrząszczy *Photinus pyralis*, *Photuris* i *Luciola* jest szeroko stosowany do oznaczeń ATP. W typowej analizie używa się lucyferyny (LH_2) 1,0 mg/ml, lucyferazy (E) 1,0 mg/ml i 0,01 M Mg^{2+} w nasyconym powietrzem ($[O_2] \geq 0,5\%$) 0,05 M buforze Tris o pH 7,4. Dodając próbkę zawierającą ATP do nadmiaru wymienionych odczynników, uzyskuje się krzywą świecenia $I_{CL} = f(t)$ podobną jak na rycinie 12. Natężenie bioluminescencji zmniejsza się eksponencjalnie w czasie i dla oczyszczonych preparatów lucyferyny i lucyferazy jest wprost proporcjonalne do stężenia ATP w zakresie od $2 \cdot 10^{-9}$ $\mu\text{g/ml}$ do 30 $\mu\text{g/ml}$. Ponieważ ATP obecny jest we wszystkich komórkach, zarówno auto- jak i heterotrofów, przeto oznaczanie ATP jest jedną z metod wykrywania życia typu ziemskiego w przestrzeni kosmicznej, stosowaną w satelitach, sondach i stacjach kosmicznych (1, 15, 22). Szczegóły dotyczące ekstrakcji lucyferyny, lucyferazy ATP z komórek i tkanek, sporządzania i oczyszczania roztworów oraz

wpływu substancji towarzyszących znaleźć można w obszernej literaturze (12, 15, 16, 32, 34, 35, 36). W tabeli 1 zestawiono zastosowania układu lucyferyny—lucyferaza—ATP w analizie biochemicznej i pokrewnych dziedzinach. Na uwagę zasługują zwłaszcza dwa oznaczenia:

- całkowitej masy żywych komórek, czyli biomasy,
- glicerolu.

Określenie biomasy np. bakterii, glonów, drożdży i innych mikroorganizmów w płynach ustrojowych, wodach powierzchniowych, płynach fermentacyjnych itp. opiera się na założeniach:

- ATP występuje wyłącznie w żywych organizmach,
- stosunek ATP do innych składników komórki jest względnie stały np. średnia zawartość ATP w bakteriach morskich stanowi 0,4⁰/o węgla komórki, a w glonach 0,35⁰/o (15, 41, 42).

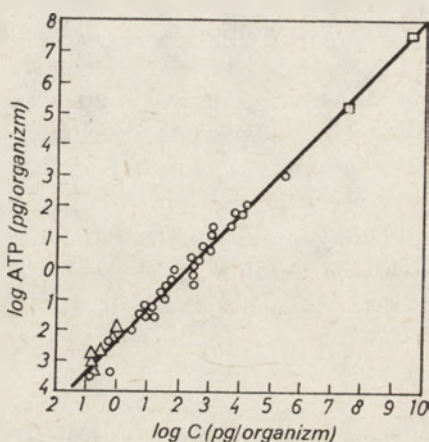
Tabela 1.

Analityczne zastosowania bioluminescencji układu ATP—LH₂—lucyferaza

Oznaczenie	Dziedzina zastosowań	Piśmiennictwo
Substratów bioluminescencji ATP, ADP, AMP, c-AMP, fosfoenolopirogronianu, fosfokreatyny, nukleozydotrójfosforanów	biochemia, egzobiologia	12, 15, 36, 37
Enzymów: heksokinazy, kinazy pirogronianowej i kinazy fosfokreatyny, ATP — kinazy siarczanu adeniny	biochemia, genetyka, biochemia kliniczna	1, 35, 36
PP ₁ , [O ₂], szybkości fosforylacji	biochemia, egzobiologia	1, 12, 44
Analiza mikrobiologiczna wód, badanie łańcucha pokarmowego i produkcji biomasy	ekologia, limnologia i oceanografia	14,42
Analiza bakteryjna ścieków, wód kanalizacyjnych, liczebność kolonii	zakłady utylizacji odpadków i ścieków, stacje sanitarno-epidemiologiczne	45
Bakterii w płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu, określanie sterylności, wykrywanie anaerobów	laboratoria kliniczne, surowic i szczepionek	41, 46
Kontrola produkcji biomasy (bakterie, drożdże) w procesach fermentacyjnych	przemysł spożywczy produkcja napojów, używek, przemysł farmaceutyczny	22
Żywotności (przeżywalności) czerwonych krwinek	medycyna, stacje krwiodawstwa	47
Zanieczyszczeń wody i gleby biocydami	Ochrona środowiska	42
Poszukiwanie złóż ropy naftowej, badanie osadów geologicznych	geologia	48

Zależność: [ATP] = f(C) lub log[ATP] = f(log liczby komórek) wykazuje wysoki współczynnik korelacji 0,93 (Ryc. 17). Oznaczenia biomasy za pomocą bioluminescencji układu lucyferyny—lucyferaza—ATP jest znaczą-

nie prostsze niż pracochłonna klasyczna technika liczenia liczby mikroorganizmów i dlatego znajduje bardzo szerokie zastosowania w praktyce. W przypadku planktonu wód powierzchniowych można obliczać relacje



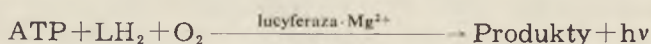
Ryc. 17. Zależność między stężeniem ATP i węgla w komórkach mikroorganizmów (42).

między heterotrofami i autotrofami na podstawie zawartości węgla w ich organizmach: $[C_{ATP}] - [C_{chlorofil}] = [C_{heterotroficzny}]$.

Do oznaczania glicerolu stosowano dotychczas m.in. dwie enzymatyczne metody pośrednie z udziałem $NADH + H^+ \rightarrow NAD^+$ (43):

1. $glicerol + ATP \xrightarrow{GK} glicerofosforan + ADP$
 $ADP + PEP \xrightarrow{PK} pirogronian + ATP$
 $pirogronian + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} mlecyan + NAD^+$
2. $glicerol + ATP \xrightarrow{GK} glicerofosforan + ADP$
 $glicerofosforan + NAD^+ \xrightarrow{GDH} fosforan\ dwuhydroksy\ acetonu + NADH + H^+$

gdzie GK — kinaza glicerolowa (E.C. 2.7.1.30), PK — kinaza pirogronianowa (E.C. 1.2.7.40), GDH — dehydrogenaza glicerofosforanu (E.C. 1.1.1.6), PEP — kwas fosfoenolpirogronowy. Sheehan i Hercules (43) dokonali modyfikacji tych metod stosując znane początkowe stężenie ATP większe od stechiometrycznego. Nadmiar niez użytogo w powyższych reakcjach ATP oznaczali w standardowej reakcji:



przy czym stężenie glicerolu = $[ATP]_0 - [ATP]_{zużyty}$. Metoda ta daje liniową zależność między $\sum_{60s} I$, a stężeniem glicerolu w zakresie $10^{-12} - 10^{-5}$ g/ml

oraz jest tańsza od metody wykorzystującej układ $NADH + H^+ \rightarrow NAD^+$.

Bakteryjne układy świecące *Photobacterium fisheri* i *Achromobacter*

Tabela 2.

Porównanie czułości różnych metod wykrywania nukleotydu flawinowego FMNH₂ (22)

Metoda oznaczania FMNH ₂	Minimalne wykrywalne stężenie FMNH ₂ (μg/100μl)
Chromatografia bibułowa	10 ²
Reduktaza cytochromowa (E.C. 1.6.2.3)	10 ²
Oksydaza mleczanowa (E.C. 1.1.3.2)	1
Fluorescencja	10 ⁻⁴
Bioluminescencja bakterii	10 ⁻⁵

wykazują wysoką czułość i specyficzność w stosunku do FMNH₂. Jak wiadać z Tabeli 2 układy bakteryjne wykazują najniższą granicę wykrywalności FMNH₂. Zbliżoną czułością metoda fluorescencyjna jest mniej specyficzna — wiele związków zawartych w ekstraktach tkankowych zakłóca oznaczenia fluorymetryczne. Liniowa zależność między I_{max} lub ΣI_{CL} a [FMNH₂] utrzymuje się w zakresie 10⁻⁴ — 1 μg/ml. Bioluminescencję wykazuje wyłącznie zredukowana forma FMNH₂ (redukcja NaBH₄ lub NADH + H⁺). Lucyferaza bakteryjna używana jest zwykle w stężeniach

Tabela 3.

Analityczne zastosowania bioluminescencji bakterii

Oznaczana substancja	Układ reakcyjny	Piśmiennictwo
NAD ⁺	$\text{NAD}^+ + \text{EtOH} \xrightarrow[\text{SC}]{\text{AD}} \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{aldehyd}$	15, 49
Maleinian	$\text{maleinian} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{H}} \text{szczawiooctan} + \text{NADH} + \text{H}^+$	1, 36
Glukoza	$\text{glukoza} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+$ reakcja sprzężona z udziałem HK-DG	15, 49
NADH + H ⁺	$2\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{FMN} \xrightarrow{\text{E}^-} 2\text{NAD}^+ + \text{FMNH}_2$	15, 49
NADPH + H ⁺	enzymatyczne, selektywne utlenianie nieoznaczonego nukleotydu — forma utleniania nie daje bioluminescencji	
NO ₃ ⁻	$\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ (\text{nadmiar}) \xrightarrow{\text{E}^-} \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{FMN} \xrightarrow{\text{E}''} \text{NAD}^+ + \text{FMNH}_2$	
Szczawiooctan	$\text{szczawiooctan} + \text{NADH} \rightarrow \text{malonian} + \text{NAD}^+$	11, 15, 28, 29, 35, 36
Wykrywanie narkotyków (heroína) i promieniowania jonizującego	hamowanie bioluminescencji bakterii w wyniku dezaktywacji lucyferyny bakteryjnej	

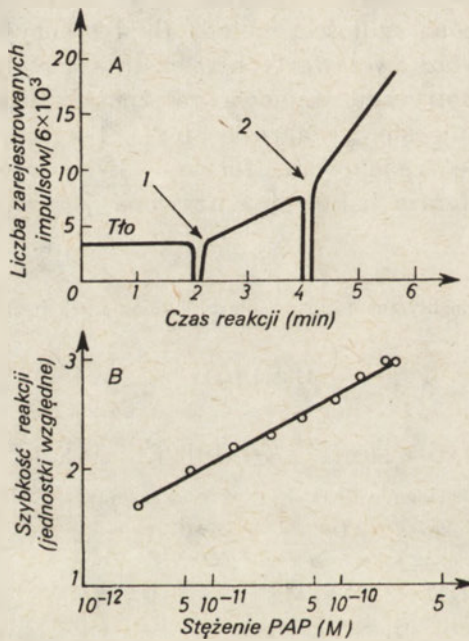
AD — dehydrogenaza alkoholowa (E. C. 1.1.1.1); SC — semikarbazyd, H — hydrazyna; E⁻ — dehydrogenaza NADH (E. C. 1.1.1.1); E' — reduktaza azotanowa (E. C. 1.6.6.2); E'' — oksydaza NADH₂ (E. C. 1.6.1.1)

Tabela 4.

Aktywność nukleotydów w bioluminescencji *Renilla reniformis* (17, 22, 35)

Aktywator	Względna aktywność
Adenozyno-3', 5'-dwufosforan	100
Adenozyno-2', 5'-dwufosforan	1
Koenzym A	7
Aktywny siarczan fosforan 5' — siarczanu adeniny (PAPS)	15—98*
ATP	0

* — Zależy od stopnia kwaśnej hydrolizy PAPS do PAP



Ryc. 18. Zależność natężenia bioluminescencji układu świecącego *Renilla reniformis* *in vitro* od czasu reakcji (A) i krzywa kalibracji (B) oznaczania adenozyno 3'-fosforano-5'-fosforanu (PAP), (35).

(A) — strzałkami oznaczano kolejność dodawania składników (sekwencję reakcji): 2 ml roztworu buforowego o pH 7,5;

1 — dodatek 50 μ l układu świecącego *Renilla reniformis*, zawierającego PAP o nieznanym stężeniu 1—100 pM,

2 — wprowadzenie standardu wewnętrznego, tj.: 10^{-10} M roztworu PAP w objętości < 50 μ l;

U dołu (B) pokazano krzywą kalibracji oznaczania PAP w układzie współrzędnych: szybkość reakcji utleniania lucyferyny (III) a stężenie PAP.

1 μ g/ml w 0,05 M buforze o pH 7,4 a aldehyd dodecyłowy w postaci kompleksu z dwusiarczynem. Szczegóły na temat ekstrakcji i oczyszczania LH₂ i lucyferazy oraz procedur analitycznych podano w pracach (3, 12, 14, 15,

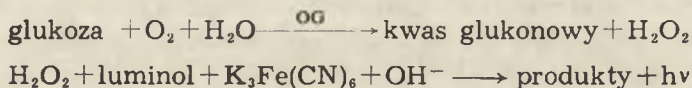
16, 36). Bioluminescencja układów bakteryjnych znajduje podobne zastosowania analityczne, jak ATP, np. automatyczna, ciągła kontrola zakażeń bakteryjnych, wykrywanie anestetyków, badania egzobiologiczne itp. Inne zastosowania świecących układów bakterii zestawiono w tabeli 3.

Świecący układ enzymatyczny pierścienic morskich *Renilla reniformis*, służy do oznaczania niektórych nukleotydów — aktywatorów bioluminescencji *R. reniformis* (Tabela 4). Stanley (35) opracował metodę oznaczania pikomolowych stężeń PAP (adenozyno-3'-fosforano-5'-fosforanu) stosując licznik scyntylicyjny. Rycina 18 ilustruje sekwencję reakcji oraz krzywą kalibracji oznaczania PAP. Używając roztworów o znanym stężeniu substratów PAP lub 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczanu (PAPS) można z kolei mierzyć aktywność enzymów: ATP — kinazy siarczanu adeniny (E.C. 2.7.7.4) i ATP — kinazy fosforanu siarczanu adeniny (E.C. 2.7.1.25). Bioluminescencja meduzy *Aequorea* i *Halistaura* ma znaczenie analityczne jako czuły wskaźnik jonów Ca^{2+} . Stwierdzono (18), że stymulujące bioluminescencję działanie kationów zależy od ich rodzaju i stężenia: $[\text{Ca}^{2+}] = 10$ [Y^{3+} , La^{3+}] ≈ 100 [Sr^{2+}]. Kationy NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} i Zn^{2+} nie wykazują efektu, a słabą stymulację bioluminescencji jonów Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} i Hg^{2+} hamuje dwumetylodwutiokarbaminian. Ponieważ w układach biologicznych stężenie Ca^{2+} jest znacznie większe niż innych kationów, przeto układ świecący meduzy jest praktycznie selektywny. Czułość mikrooznaczeń w tkankach nerwowych, mięśniowych i w ekstraktach wynosi 10^{-13} mola Ca^{2+} .

III-2. Chemiluminescencja

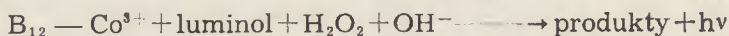
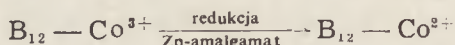
Omówione tu zostaną jedynie najnowsze przykłady analiz, stosowane w badaniach biochemicznych, gdyż wcześniejsze opracowania opisane są w łatwo dostępnej literaturze (21, 22, 51).

Szczególnie atrakcyjne metody wykorzystujące chemiluminescencję luminolu sprzężoną z reakcjami enzymatycznymi opracowują Hercules, Seitz i wsp. (22, 39, 40). Przykładem może służyć mikrooznaczanie glukozy w krwi (52, 53) i w moczu (45) opisaną już techniką przepływową (Ryc. 5). Wykorzystano tu układ sprzężonych reakcji:



gdzie OG jest oksydazą glukozową (E.C. 1.1.3.4) związaną z Sepharose, umieszczoną w kolumnie przepływowej (Ryc. 15). Istnieje liniowa zależność między stężeniem glukozy a I_{CL} w zakresie $1 \times 10^{-8} - 10^{-4}$ M/l. Jedno oznaczenie, wykonywane metodą przepływową zajmuje kilka minut i zużywa objętość 100 μl próbki (osocza krwi). Metoda chemiluminescencyjna

oznaczania glukozy we krwi daje mały rozrzut, w porównaniu z innymi technikami oznaczania tego związku. W przypadku oznaczania glukozy w moczu, usuwa się przeszkadzający kwas moczowy przez adsorpcję na $Ba(OH)_2 + ZnSO_4$. Błąd oznaczeń nie przekracza 5⁰/₀. W nowopropozowanej metodzie oznaczania witaminy B₁₂ tj. cyjanokobalaminy wykorzystano katalityczny efekt Co^{2+} na chemiluminescencję luminolu (43):



Śladowe ilości innych metali, które mogłyby katalizować chemiluminescencję luminolu, usuwa się za pomocą EDTA. Wszystkie operacje przeprowadza się w atmosferze azotu, gdyż obecność tlenu powoduje przejście Co^{2+} do Co^{3+} , który nie katalizuje chemiluminescencji luminolu. Jest to niewątpliwie duży mankament metody. Najniższe oznaczalne stężenie witaminy B₁₂ wynosi $5 \cdot 10^{-9}$ mola, a liniowa zależność I_{CL} od jej stężenia występuje od 10^{-6} mola. Metoda ta jest szczególnie przydatna do oznaczeń aktywności witaminy B₁₂ w preparatach farmaceutycznych.

Chemiluminescencja luminolu, będąc silnie katalizowana kompleksami żelazo-porfirynowymi stosuje się ponadto w badaniach egzobiologicznych. W radzieckich laboratoriach planetarnych, świecenie układu luminol — H_2O_2 — OH^- — żelazoporfiryny jest jedną z trzech metod wykrywania życia w przestrzeni pozaziemskej. Czułość oznaczania połączeń żelazoporfirynowych, zawartych w ewentualnie występujących mikroorganizmach na powierzchni badanej planety wynosi $1,3 \times 10^{-7}$ g cytochromu c na 1 ml ekstraktu (54).

Chemiluminescencję luminolu silnie hamują związki polifenolowe i aminy, co zostało wykorzystane do szybkiego ich oznaczania (21). Z innych układów o znaczeniu biochemicznym wykazujących chemiluminescencję wymienić należy układ ryboflawina — H_2O_2 . Emisję światła inicjuje dodatek reduktorów np. kwasu askorbinowego, a także naświetlanie światłem widzialnym (55, 56). Tak indukowaną chemiluminescencję szczególnie silnie aktywują jony Cu^{2+} , co znalazło zastosowanie do ich selektywnego oznaczania (56).

Możliwości analitycznych zastosowań chemiluminescencji lucygeniny są przypuszczalnie duże, jednak dotychczas opracowano kilka metod oznaczania Bi^{3+} , $Cr^{3+,2+}$, $Os^{6+,5+,4+}$ i Th^{4+} (57, 58).

Różnorodne zastosowanie analityczne daje zmodyfikowana reakcja Trautza-Schorigina. Reakcji Trautza-Schorigina towarzyszy pomarańczowa chemiluminescencja o stosunkowo dużym natężeniu. Jest to reakcja pomiędzy stężonym, alkalicznym roztworem H_2O_2 , formaldehydem i pirogalolem. Zmodyfikowanie reakcji Trautza-Schorigina, aby była wygodniejsza do zastosowań analitycznych, polega na stosowaniu roztworów

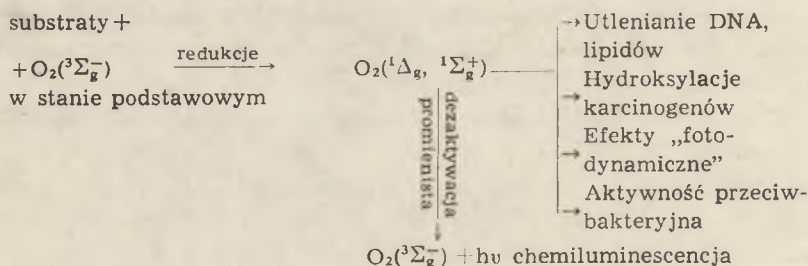
znacznie rozcieńczonych i zastąpieniu pirogalolu innym polifenolem — kwasem galusowym. Podany wyżej układ charakteryzuje się silną zależnością natężenia chemiluminescencji od stężenia formaldehydu. Glutation i białka, jak γ -globuliny osocza krwi, kazeina i żelatyna wiążą formaldehyd. Własność ta została wykorzystana do opracowania chemiluminescencyjnej metody oznaczania białek (59). Zasada oznaczania białek jest następująca. Białko reaguje z formaldehydem tworząc nierozpuszczalny osad. Proporcjonalnie do stężenia białka $[C_B]$ maleje stężenie formaldehydu C_{HCHO} , który jest niezbędnym składnikiem świecącej mieszaniny i proporcjonalnie do ubytku stężenia HCHO zmniejsza się natężenie chemiluminescencji

$$-\Delta I \sim -\Delta C_{HCHO} \sim [C_B]$$

Zastąpienie kwasu galusowego garbnikami roślinnymi daje świecenie, którego I_{max} jest proporcjonalne do stężenia garbnika w zakresie 0,01%—4%. Chemiluminescencyjne oznaczanie garbników jest znacznie szybsze, prostsze i tańsze niż innymi metodami, a średni błąd względny oznaczeń nie przekracza 1,8% (60). Zależność I_{max} i ΣI_{CL} chemiluminescencji zmodyfikowanej reakcji Trautza-Schorigina jest liniowa względem HCHO w przedziale 10^{-7} — 10^{-2} M HCHO. Umożliwiło to opracowanie szybkiej i czułej metody oznaczania HCHO w wodach. Oznaczenia można wykonywać w układzie statycznym (26) lub znacznie korzystniej — techniką przepływową (31). Należy zaznaczyć, że reakcje tworzenia α -hydroksy-hydranadtlenków z H_2O_2 i HCHO oraz ich rozpadu rozpatrywane są jako prosty model procesów peroksydatywnego utleniania lipidów w błonach mitochondriów i mikrosomów (29). Z tego względu chemiluminescencja układu Trautza-Schorigina może znaleźć szersze zastosowanie w biochemii. Możliwe, że reakcje biochemiczne wytwarzające takie reaktywne nadtlenki potrafimy sprzęgać z silną chemiluminescencją. Wykorzystując wydajnie fluoryzujące związki endogenne, jak np. FMN, FAD, adrenolutin lub chlorofil jako akceptory — emitery, lub też wprowadzając egzogenne związki typu aktyuatorów, można by otrzymać swego rodzaju „sondy chemiluminescencyjne”. Obecnie już znane są reakcje dysmutacji rodników nadtlenowych, w których energię wzbudzenia można efektywnie przenosić na silnie fluoryzujące akceptory, np. chelaty europu, rutenu lub bromonaftalen (61, 62).

Sondy chemiluminescencyjne pozwoliłyby wykrywać bardzo wczesne stadia niektórych procesów, poprzedzających np. uszkodzenia błon mitochondriów i mikrosomów, rozkojarzenie oksydacyjnej fosforylacji i oddychania itp. Zaletą tych sond w stosunku do obecnie stosowanych sond fluorescencyjnych byłoby m.in. wyeliminowanie silnego światła wzbudzającego fluorescencję, która niewątpliwie zaburza badany obiekt. Ponadto wykazywałyby dużą czułość nie tylko na zmiany fizyko-chemicznych właściwości mikrośrodowiska, jak np. stałej dielektrycznej, pH, lepkości, ale przede wszystkim na stan energetyczny (transport O_2 , ATP, OH^- , nadtlenków itp).

Interesująco przedstawia się zastosowanie chemiluminescencji do oznaczania tlenu cząsteczkowego we wzbudzonych elektronowo stanach singletowych oznaczanych termami ${}^1\Delta_g$ i ${}^1\Sigma_g^+$. Okazuje się, że w wielu reakcjach, jak np. rozpadu nadtlenu nienasyconych kwasów tłuszczowych (10, 29), utleniania adrenaliny (63, 64), polifenoli (65), ksantyny w obecności ksantynooksydazy (66), NADPH w obecności cytochromu c i reduktazy adrenodoksyny (67) z udziałem O_2 oraz podczas radiolizy wody nasyconej tlenem (68) tworzy się tlen singletowy 1O_2 (${}^1\Delta_g$). Cząsteczki 1O_2 i ich dimery w kombinowanych stanach ${}^1\Delta_g$ ${}^1\Sigma_g^+$ jako cząsteczki elektronowo wzbudzone wykazują zwiększoną reaktywność. Z łatwością utleniają nienasycone kwasy tłuszczowe, białka, DNA, barwniki, uszkadzają błony mitochondriów (67), powodując nieenzymatyczne hydroksylacje (2, 29), efekt fotodynamiczny itd. Część 1O_2 , która nie przereagowała, ulega dezaktywacji promienistej w postaci chemiluminescencji:



Dezaktywacja promienista elektronowo wzbudzonych cząsteczek tlenu singletowego manifestuje się jako chemiluminescencja w szerokim zakresie spektralnym, począwszy od ultrafioletu aż do podczerwieni. Zaobserwowano kilkanaście pasm emisji; najczęściej obserwowane pasma dla reakcji o znaczeniu biologicznym mają maksymalne natężenie przy długościach fali 382, 478, 580, 635, 703, 1070 i 1270 nm. Pasma emisji z 1O_2 , a zwłaszcza stosunkowo silne świecenie w zakresie czerwieni, można wyodrębnić za pomocą filtrów optycznych. Pomiar natężenia tych pasm pozwalają wnioskować o szybkości generowania i konsumpcji 1O_2 w badanym układzie. Jak widać z powyższego schematu reakcji, procesy destrukcji składników komórkowych, utleniania metabolitów i niektóre inne związane ze zjawiskami odpornościowymi (pokazane w prawej części schematu) współzawodniczą o tlen singletowy 1O_2 z dezaktywacją promienistą (chemiluminescencją). Dlatego pomiary natężenia chemiluminescencji z tlenu singletowego stanowią bardzo czułą i specyficzną metodę jakościową i ilościową określania rodzaju i szybkości procesów utleniania. Zagadnienia związane z tworzeniem tlenu singletowego w reakcjach enzymatycznych, procesach sensybilizowanego fotoutleniania oraz z rolą 1O_2 w układach biologicznych są obecnie obiektem bardzo intensywnych badań, w których metody chemiluminescencyjne spełniają niepoślednią rolę.

Tlen cząsteczkowy w stanie tripletowym (podstawowym) $^3\text{O}_2$, wydzielany w procesie fotosyntezy, a w szczególności w reakcji Hilla, może być oznaczany w sposób ciągły za pomocą chemiluminescencji luminolu. Metoda ta pozwala oznaczać szybkość wydzielania O_2 rzędu 10^{-12} mola/s (69, 70).

Na zakończenie warto wspomnieć, że peroksydazy katalizujące rozkład H_2O_2 wzmagają silnie chemiluminescencję związków polifenolowych (71). Zastosowanie purpurogaliny (2,3,4,6-czterohydroksy-5H-cykloheptabenzo-5-onu) jako substratu oraz pomiar maksymalnego natężenia chemiluminescencji I_{max} techniką zliczania pojedynczych fotonów pozwala oznaczyć nawet 10^{-14} moli peroksydazy chrzanu w preparatach tego enzymu (72) oraz 10^{-9} mola peroksydazy w ekstraktach z tkanek roślinnych (73).

Należy oczekiwać dalszego postępu w opracowaniu nowych i doskonaleniu już istniejących metod wykorzystujących bioluminescencję i chemiluminescencję do celów analitycznych. Będzie on uwarunkowany rozwojem wiedzy o mechanizmach bio- i chemiluminescencji, otrzymywaniem coraz aktywniejszych lucyferaz oraz doskonaleniem układów elektronicznych, służących do detekcji i analizy słabych świeceń.

Artykuł nadszedł 4.10.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 16.3.1977.

PIŚMIENNICTWO

- Seliger H. H., (1973) w *Chemiluminescence and Bioluminescence*, red. Cormier M. J., Hercules D. M., Lee J., str. 461—478, Plenum Press, New York.
- Seliger H. H., (1975) *Photochem. Photobiol.*, **21**, 355—361.
- Bierżanskaja Ł. Yu., Gitielzon I. I., Fis z A. M., Czumakowa R. I., (1975), *Doklady A.N. SSSR.*, **222**, 1220—1222.
- Barenboim G. M., Domański A. N., Turowierow K. K., (1966), *Luminescencja biopolimerow i klatek*, str. 116—146, Nauka, Moskwa, Leningrad.
- Sławiński J., (1967), *Postępy Biochemii* **13**, 191—216; (1969), *Kosmos*, ser. A **18**, 3—25; (1975). *Wykłady z Biofizyki* red. W. Leyko, t. 1 str. 5—46, Uniwersytet Łódzki, Łódź.
- Mc Capra F., (1970), *Pure Appl. Chem.* **24**, 611—629.
- Turro N. J., Lechtken P., (1973), *Pure Appl. Chem.*, **33**, 363.
- Gundermann K. D., (1974), *Topics in Current Chemistry*, **46**, str. 61—138, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Cormier M. J., Lee J., Wampler J. E., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 255—272.
- Władimirow J. A., (1966) *Swierchslabyje swieczienja w biochimizeskich reakcjach*. str. 14—85. Nauka. Moskwa.
- Murkowski A., (1973), *Postępy Nauk Roln.*, **4**, 3—16; (1974), **2**, 3—21.
- Strehler B. L., (1968), w *Methods of Biochemical Analysis*, red. Glick D., Interscience **16**, 99—181.
- Adam W., (1975), *J. Chem. Education*, **52**, 138—145.

14. Lee J., Murphy C. L., Faini G. I., Baucom T. L., (1974), w *Liquid Scintillation Counting—Recent Developments*, red. Stanley P. E., Scoggins B. h. str. 403—420, Academic Press, New York.
15. Schram E., (1974) w *Liquid Scintillation Counting—Recent Developments* Ed. Stanley P. E., Scoggins B. A. str. 383—430, Academic Press, New York.
16. Hastings J. W., Eberhard A., Baldwin T. O., Nicoli M. Z., Cline T. W., Nealson K. H., (1973) w *Chemiluminescence and Bioluminescence*, wyd. Cormier M. J., Hercules D. M., Lee J., str. 369—380, Plenum Press, New York.
17. Hori K., Cormier M. J., (1973) w *Chemiluminescence and Bioluminescence*, red. Cormier M. J., Hercules D. M., Lee J., str. 361—368, Plenum Press, N. Y.
18. Shimomura O., Johnson F. H., (1974) 2-nd An. Meet. Am. Soc. Photobiology, Vancouver, TAM—D3, 56; (1972) *Nature, New Biology*, **237**, 287—288.
19. White E. H., Miano J. D., Watkins C. J., Breux E. J., (1974), *Angew. Chem.* **86**, 292—301.
20. Hopkins T. A., Seliger H. H., White E. H., Cass M. W., (1967), *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 7148—7150.
21. Babko A. K., Dubovienko L., Łukowska I., (1966), *Chemiluminescentnyj Analiz*, str. 37—38, Nauka, Kijew.
22. Seitz W. R., Neary M. P., (1974), *Anal. Chem.*, **16**, 188A—202A.
23. Seliger H. H., (1961), w *Light and Life* red. Mc Elroy W. D., Glass B., str. 200—205, Johns Hopkins Press, Baltimore.
24. Hercules D. M., (1971), w *Physical Methods in Chemistry*, red. Weissberger A., Rossiter B., t. 1 str. 257—284, Wiley, New York.
25. Trautz M., Schorigin P., (1905), *Z. Wiss. Photographie Photochemie*, **3**, 121—124.
26. Sławińska D., Gołębiowska D., Sławiński J., (1966), *Chemia Analityczna*, **11**, 1117—1125.
27. Bowen E. J., (1964), *Pure Appl. Chem.*, **2**, 473—479.
28. Sławińska D., Sławiński J., (1975), 3rd Ann. Meet. Am. Soc. Photobiology, MAM—B—5 str. 44, Louisville.
29. Schoaf A. R., Steele R. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 1363—1371.
30. Sławiński J., (1971), *Photochem. Photobiol.*, **13**, 489—497.
31. Sławińska D., Sławiński J., *Anal. Chem.* (1975), **47**, 2101—2109.
32. Lundin A., Thore A., (1975), *Anal. Biochem.*, **66**, 47—63.
33. Rhee S. G., Greifner M. I., Chock P. B., (1975), *Anal. Biochem.*, **66**, 259—264.
34. Wettermark G., Stymne H., (1975), *Anal. Biochem.*, **63**, 203—307.
35. Stanley P. E., (1974), w *Liquid Scintillation Counting—Recent Developments* red. Stanley P. E., Scoggins B. A., str. 421—430, Academic Press, New York.
36. Stanley P. E., (1973), w *Chemiluminescence and Bioluminescence*, red. Cormier M. J., Hercules D. M., Lee J., str. 494, Plenum Press, New York.
37. Brunker R. L., (1975), *Anal. Biochem.*, **63**, 418—422.
38. Bowling J. L., Dean J. A., Goldstein G., Dale I. M., (1975), *Anal. Chim. Acta*, **76**, 47—55.
39. Seitz W. R., Hercules D. M., (1973), w *Chemiluminescence and Bioluminescence*, red. Cormier M. J., Hercules D. M., Lee J., str. 427—449, Plenum Press New York.
40. Bostick D. T., Hercules D. M., (1974), *Anal. Letters*, **1**, 347—355; (1975), *Anal. Chem.*, **47**, 447—452.
41. Chapelle E. W., Levin G. V., (1968), *Biochem. Med.*, **2**, 41—52.

42. Holm-Hansen O., (1969), *Limnol. Ocean.*, **14**, 740—741; (1970) *Plant Cell Physiol.*, **2**, 689—700; (1972), *Univ. Calif. San. Diego Report* **10**, 120—124.
43. Shechan T. L., Hercules D. M., inf. prywatna.
44. Weiss B., Lehne R., Strada S., (1972), *Anal. Biochem.*, **45**, 222—227.
45. Water Pollution Control Res. Ser. 17050 ROY 01/72 (1972), U.S. Gov. Print. Off., Washington D.C.
46. Numgester W. I., Paradise L. I., Adair I. A., (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 582—586.
47. Aledort L. M., Weed R. I., Troup S. B., (1966), *Anal. Biochem.*, **17**, 268—273.
48. Lee C. C., Harris F. F., Williams I. O. H., Armstrong D. M., Syers J. K., (1971), *Soil Science Social America Prec.*, **35**, 82—91.
49. Brolin S. E., Berne C., Isacson U., (1972), *Anal. Biochem.*, **50**, 50—54.
50. Serat W. F., Budinger F. E., Mueller P. K., (1965) AIHL Report N 14, State of California Dep. Public Health.
51. Sławińska D., Sławiński J., (1966), *Chemia Analit.*, **11**, 13—26; (1968), *Wiad. Chem.*, **21**, 165—185; **22**, 267—296.
52. Auses I. P., Cook S. L., Maloy I. T., (1975), *Anal. Chem.*, **47**, 244—249.
53. Williams D. C., Seitz W. R., *Clinical Chem.* in press.
54. Iwshenetskii A. A., Blokhin V. A., Lysenko S. V., Pokrovskii G. V., (1973), *Mikrobiologija*, **42**, 169—171.
55. Stone M. O., Steele R. H., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4343—4351.
56. Wehry E. L., Varnes A. W., (1973), *Anal. Chem.*, **45**, 348—351.
57. Pilipenko A. T., Terletsкая A. V., (1972), *Ž. Anal. Chim.*, **27**, 1570—1577.
58. Dubowienko L. I., Kotinets E. J., (1971), *Ukr. Chim. Ž.*, **37**, 1154—1157.
59. Balcerowicz D., Balcerowicz K., Sławińska D., Sławiński J., (1970), *Chemia Analit.*, **15**, 479—490.
60. Milczarek I., Grabikowski E., Murkowski A., Sławiński J., (1972), *Chemia Analit.*, **17**, 31—40.
61. Lytle F. E., (1968), Chemiluminescence and photoluminescence of ruthenium chelates, Diss., Massachusetts Inst. of Technology.
62. Bielakov W. A., Vassilev R. F., (1970), w *Molekularnaja Fotonika*, str. 70—86, Nauka, Leningrad.
63. Kruk I., Sławińska D., (1972), IV Intern. Biophysics Congress Moscow, Abstr., t. 1, str. 52.
64. Sławińska D., Kruk I., (1972), II Ogólnopolska Konferencja Luminescencyjna, Toruń A, str. 207—215, II Ogólnopolska Konferencja Luminescencyjna, Toruń.
65. Lichszteid K., Michalska T., Sławińska D., 113—122.
66. Goda K., Kimura T., Thayer A. L., Kees K., Schoap A. P., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 660—666.
67. Goda K., Chu Jan-Wen, Kimura T., Schoap A. P., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 1300—1306.
68. Alkatis S. A., Liboy W. F., (1973), *Nature*, **244**, 143—144.
69. Brin G. P., Alijev Z. S., Krasnovski A. A., (1971), *Fizjol. Rast.*, **18**, 455—459.
70. Ilatovskii V. A., Shumov Yu. S., Komissarov G. G., (1973), *Ž. Fiz. Chim.*, **47**, 1182—1184.
71. Nilsson R., (1964), *Acta Chem. Scand.*, **18**, 389—401.
72. Sławiński J., Szczodrowska B., Włodarczyk-Graetzer M., (1973), *Acta Biochem. Polon.*, **20**, 119—132.
73. Sławiński J., Włodarczyk-Graetzer M., Szczodrowska B., (1972), *Zeszyty Naukowe A.R. w Szczecinie*, **38**, 469—477.

RECENZJE

Biochemistry of collagen, red. G. N. Ramachandran i A. H. Reddi,

Plenum Press, New York i London, 1976, stron 536

Kolagen, powszechnie występujące zwierzęce białko strukturalne, budzi rosnące zainteresowanie ze względu na niezwykle cechy jego struktury i nadmolekularnej organizacji a także z powodu szybko gromadzących się dowodów znaczenia tego białka w patogenezie niektórych schorzeń.

Recenzowana książka podsumowuje najnowszą, niezwykle szybko postępującą w ostatnich latach wiedzę o strukturze, biosyntezie, degradacji i immunologii kolagenu. Przedstawia także perspektywy i nakreśla kierunki dalszych badań. Napisana jest przez zespół wybitnych specjalistów od wielu lat pracujących doświadczalnie nad kolagenem a jednym z jej redaktorów jest znany badacz struktury białek — G. N. Ramachandran.

Praca zawiera 10 rozdziałów. W pierwszym z nich K. Piez omawia najnowsze badania I rzędowej struktury różnych typów genetycznych kolagenu. Poznana jest dzisiaj całkowita sekwencja jednego z polipeptydowych α łańcuchów kolagenu typu I. Łańcuch ten zawiera 1052 reszty aminokwasów i jest największym z białek o poznanej całkowicie strukturze I-rzędowej. W kolejnym rozdziale G. N. Ramachandran i C. Ramakrishnan zajmują się molekularną strukturą kolagenu prezentując wyniki własnych badań nad konformacją jego łańcuchów polipeptydowych.

Kolagen w przestrzeniach międzykomórkowych występuje głównie w postaci nierozpuszczalnych włókien. Dwa kolejne rozdziały książki napisane przez A. Millera i M. L. Tanzera poświęcone są budowie tych włókien oraz naturze wiązań poprzecznych wewnątrz i międzyłańcuchowych stabilizujących ich strukturę. Tanzer szczególnie omawia typy wiązań poprzecznych, mechanizm ich powstawania oraz ich umiejscowienie w łańcuchach polipeptydowych kolagenu.

Biosynteza kolagenu jest bardzo dokładnie omówiona przez D. J. Prockopa, R. A. Berga, K. I. Kivirikko i J. Uitto. Szczególny nacisk położono na potranslacyjną modyfikację cząsteczek kolagenu a więc na hydroksylację proliny i lizyny oraz glikozylację i oksydacyjną deaminację lizyny. Autorzy omawiają również własności i funkcję prokolagenu, rozpuszczalnego prekursora monomeru kolagenu.

Nie wyjaśniono dotąd w całości mechanizmu fizjologicznej resorpcji kolagenu ani też procesów wzmożonego katabolizmu tego białka w niektórych schorzeniach. Wiadomo jednak, że enzymami uczestniczącymi w degradacji kolagenu są kolagenazy tkankowe. Enzymom tym poświęcony jest rozdział VI napisany przez J. Grossa. Autor ten przed kilkunastu laty po raz pierwszy doniósł o istnieniu kolagenaz tkankowych. W rozdziale tym omawia metody izolowania i oczyszczania kolagenaz oraz ich swoistość substratową i mechanizm działania. Dyskutuje ponadto możliwe mechanizmy regulacji aktywności kolagenaz podkreślając znaczenie biosyntezy tych enzy-

mów w postaci nieaktywnych prekursorów i aktywację tych ostatnich, a także wpływ inhibitorów i aktywatorów tkankowych oraz hormonów.

W pewnych patologicznych stanach obserwuje się nieprawidłową syntezę kolagenu. Polega ona najczęściej na nadmiernej, niekontrolowanej produkcji tego białka, na niedostatecznym wytwarzaniu wiązań poprzecznych lub ich nadmiernej liczbie, lub na zaburzeniu przemiany prokolagenu w kolagen. Zagadnieniom tym poświęcony jest rozdział napisany przez C. M. Lapiera i B. Nusgens.

Pozostałe trzy rozdziały dotyczą immunologii kolagenu (R. Timpl), roli kolagenu w procesie różnicowania tkanek (A. H. Reddi) oraz syntetycznych modeli polipeptydowych łańcuchów o sekwencji kolagenu i zastosowaniu ich do badań struktury i syntezy tego białka (R. S. Bhatnagar i R. S. Rapaka).

Książka jest napisana z doskonałą znajomością przedmiotu. W jasny i ciekawy sposób przedstawia najbardziej aktualne problemy, z uwzględnieniem ostatnich nieopublikowanych wyników doświadczeń autorów, a obszerne piśmiennictwo (w tym także prace polskich autorów) zawiera pozycje z 1976 roku a więc z roku wydania książki.

Pozycja ta niewątpliwie wzbudzi duże zainteresowanie biologów różnych specjalności.

*I. Sopata,
E. Wojtecka-Łukasik*

Horizons in Biochemistry and Biophysics

Tom 2, red. E. Quagliariello, F. Palmieri, T. P. Singer, Addison-Wesley Publishing Company (Advanced Book Program) Reading, Mass., str. 340 + XVI, 1976

Tom drugi tej nowej serii, która według założeń redaktorów ma być „próbą nawiązania kontaktu między naukowcami a studentami” ukazał się po dwu latach od wydania tomu pierwszego.

Tematyka tomu drugiego, zawierającego 9 artykułów, jest szersza niż poprzedniego. Omawiane są następujące zagadnienia:

- Metodologia stosowania mutantów w badaniu transportu cukrów (H. L. Kornberg i P. I. F. Henderson),
- Lipaza i kolipaza trzustkowa jako przykład heterogennej biokatalizy (M. Sémériva i P. Desnuelle),
- Transport metabolitów w mitochondriach za pośrednictwem przenośników (A. Fonyó, F. Palmieri i E. Quagliariello),
- Transport cukrów i aminokwasów w komórkach zwierzęcych (U. Hopfer),
- Gościec a regulacja biosyntezy puryn (M. S. Hershfield i E. Seegmiller),
- Transport substratów poprzez otoczkę chloroplastu (H. W. Heldt),
- Praktyczne zastosowania i teoria optycznych wskaźników spektroskopowych (G. Weber),
- Molekularne aspekty elektrycznego wzbudzenia w lipidowych błonach dwuwarstwowych i błonach komórkowych (P. Mueller),
- Ekspresja genów w czasie cyklu życiowego komórki (P. Volpe).

Zgodnie z założeniami redaktorów, w poszczególnych artykułach przedstawiono w przystępny i interesujący sposób obecny stan wiedzy z danego zakresu, bez zbyt drobiazgowego wnikania w szczegóły, które mogłyby zaciemnić ogólny obraz omawianego zagadnienia. Schematy, tabele oraz literatura podane są z umiarem i dotyczą najbardziej istotnych faktów.

Znaczna część tomu, bo aż 4 artykuły, poświęcona jest zagadnieniu transportu metabolitów przez błony biologiczne. Szczególnie interesujące jest porównanie danych o transporcie metabolitów przez błonę mitochondrialną i osłonkę chloroplastów. W artykule o lipazie trzustkowej przedstawiono modelowy układ interakcji białko-białko w środowisku lipidowym. W artykule „Gościec a regulacja biosyntezy puryn” stwierdzono, że regulacja mechanizmu biosyntezy puryn w patogenezie gościa ma wiele odniesień do poznanej wcześniej tej regulacji u drobnoustrojów. Ostatni artykuł w omawianym zbiorze jest próbą przedstawienia znacznej ilości informacji o ekspresji genów w czasie cyklu komórkowego komórek HeLa. Sposobem przedstawienia wykracza jednak poza profil pozostałych artykułów, głównie ze względu na złożoność problemu i stosowaną terminologię.

Tom 2 „Horyzontów” jest wartościową pozycją i sędzę, że spełni przedstawione we wstępie założenia jego redaktorów, stwarzając pomost między najnowszymi osiągnięciami laboratoriów badawczych a zainteresowaniem studentów i innych czytelników.

Z. Kaniuga

Iron and Copper Proteins

red. K. T. Yasounobu, H. F. Mower i O. Hayaishi

tom 75 *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Plenum Press, Nowy York i Londyn, 1976

Tom zawiera materiały z odbytego na Hawajach w grudniu 1975 roku sympozjum na temat białek związanych z żelazem lub miedzią. Całość została podzielona na 4 części poświęcone kolejno:

- Białkom „żelazowo-siarkowym”, czyli niemitchondrialnym białkom transportującym elektrony;
- Białkom wchodzącym w skład mitochondrialnego układu transportującego elektrony, a więc reduktazie NADH i NADPH-ubichinon, dehydrogenazie bursztynianowej, oksydazie cytochromowej i innym flawoproteidom Fe—S;
- Innym białkom zawierającym żelazo w układzie hemowym i niehemowym, np. systemowi hydroksylazy i monooksydazy kamforowej, cytochromowi P—450, 2,3-dwuoksygenazie indoleaminowej i tryptofanowej oraz transferynie i peroksydazom;
- Białkom zawierającym miedź.

Metaloproteidy stanowią obecnie ogromny dział biochemii. Są to bowiem białka o podstawowym znaczeniu dla funkcji życiowych, przede wszystkim oddechowych, zarówno organizmów zwierzęcych jak roślinnych. Badania nad metaloproteidami znalazły swoje miejsce również w biochemii klinicznej — nieprawidłowości w budowie lub funkcjonowaniu cząsteczek metaloproteidowych enzymów stanowią bowiem molekularne przyczyny licznych zjawisk patogenetycznych w klinice człowieka. Badania metaloproteidów odgrywają także dużą rolę w diagnostyce biochemicznej szeregu schorzeń.

Stąd też wyniki badań nad białkami zawierającymi żelazo lub miedź interesują specjalistów wielu dziedzin.

Omawiany tom zawiera zbiór prac oryginalnych. Brak jakichkolwiek zestawień przeglądowych oraz podstawowych części wstępnych w poszczególnych artykułach sprawia, że książka może służyć tylko biochemikom wprowadzonym głęboko w omawiane problemy i pracującym w dziedzinie metaloproteidów. Książka stanowi kopal-

nię informacji wynikających z rzetelnych, nowoczesnymi metodami przeprowadzonych eksperymentów.

Przykładowo warto wymienić kilka prac zasługujących na uwagę ze względu na bogactwo materiału w nich zawartego. Tak więc praca J. Druma, K. T. Yasounobu i R. E. Cramera (str. 16) przynosi dokładny opis struktury (z sekwencją aminokwasów) 7 dwużelazowych ferredoksyn pochodzących z różnych źródeł. Ferredoksyny stanowią klasę białek o podstawowym znaczeniu dla reakcji przenoszenia elektronów w układach pozamitochondrialnych różnych gatunków wyższych roślin, bakterii, a także w nadnerczach zwierząt. Szczególnie interesująca jest struktura centrum aktywnego tych enzymów, zawierającego atomy żelaza i siarki w połączeniu z resztami cysteiny. Autorzy na podstawie badań dyfrakcji rentgenowskiej przedstawiają modele strukturalne tych enzymów w aspekcie ich zdolności do pełnienia funkcji przenoszenia elektronu.

Piękne badania nad strukturą dwuoksygenaz zawierających żelazo niehemowe — bardzo rozpowszechnionych w przyrodzie enzymów katalizujących przyłączanie 2 atomów molekularnego tlenu do różnych substratów — przedstawione są w pracy M. Nozaki i wsp. (str. 127).

H. Beinert (str. 137) zaproponował nowoczesny schemat łańcucha oddechowego w mitochondriach oparty o najnowsze wyniki badań nad rolą białek zawierających żelazo i siarkę w systemie przenoszenia elektronów. W połączeniu ze wspomnianą wyżej pracą o strukturze i funkcji niemitchondrialnych białek Fe—S (ferredoksyn) badania te stanowią podstawę do syntetycznego ujęcia współczesnej wiedzy o jednolitości systemów przenoszących elektrony w komórkach.

Spośród kilku prac dotyczących cytochromu P—450 szczególnie obiecujące wyniki przedstawił Saprin (str. 314) na temat udziału cytochromu P—450 w mikrosomalnym mechanizmie zapobiegania rozrostom nowotworowym w wątrobie pod wpływem niektórych karcinogenów chemicznych. Z innych prac o dużym znaczeniu dla biochemii klinicznej warto wymienić pracę G. W. Batesa i G. Grahama (str. 400) wykazującą, że w procesie przenoszenia żelaza przez transferynę specyficznym niezbędnym jest jej równoczesny związek z anionem, np. z resztą węglanową. Całkowicie nowych danych o funkcji enzymatycznej ceruloplazminy dostarcza obszerna praca E. Friedmana i H. S. Hsieh (str. 505).

W sumie należy stwierdzić, że prace zebrane w tomie „Iron and Copper Proteins” reprezentują wysoki poziom i stanowią przegląd aktualnych wyników osiągniętych w szeregu wyspecjalizowanych w tej dziedzinie pracowni całego niemal świata.

Jest to książka bardzo pożyteczna, a jej pozornie wąska tematyka posiada ogromne ogólnobiologiczne znaczenie.

Z. Kuratowska

Biological Roles of Sialic Acid

red. A. Rosenberg i C.-L. Schengrund, 1976, Plenum Press,
New York, London

Wybitni naukowcy w dziedzinie badań kwasu sjałowego przedstawili w omawianej książce najnowsze osiągnięcia dotyczące organizmów zwierzęcych.

Powszechnie znanym faktem jest to, że kwas sjałowy stanowi komponentę homolub heterocukrowców, glikoprotein i glikolipidów wchodzących w skład błon po-

wierzchniowych komórek zwierzęcych, błon śródkomórkowych, wydzielin zewnątrzkomórkowych, czy też synaptycznych struktur centralnego układu nerwowego.

Autorzy poszczególnych rozdziałów omawiają szczegółowo takie zagadnienia jak występowanie w przyrodzie, biochemię i biologiczną funkcję kwasu sjałowego, starając się uporządkować dotychczasowe wyniki badań i w miarę możliwości wyciągnąć wnioski o roli kwasu sjałowego.

Pierwsze rozdziały książki traktują o pochodnych kwasu neuraminowego wykrywanych w materiale biologicznym, sposobach izolowania i analizach chemicznych. Następnie autorzy przedstawiają krótki przegląd dotyczący występowania kwasu sjałowego w organizmach żywych począwszy od wirusów poprzez bakterie, bezkręgowce do kręgowców włącznie, oraz rozmieszczenie tego związku w obrębie komórki i w płynach ustrojowych. W podsumowaniu autorzy wyrażają przypuszczenie, że chyba nie ma takiego systemu błon komórkowych, który byłby pozbawiony kwasu sjałowego.

Szeroko omawianym zagadnieniem są procesy anaboliczne obejmujące biosyntezę kwasów sjałowych, jak również polimerów, glikoprotein, mucyn i glikolipidów zawierających kwas sjałowy. Ciekawie i wyczerpująco omówiono również drogi degradacji komponent zawierających kwas sjałowy. Wydaje się, że dla pewnych funkcji biologicznych glikoprotein obecność kwasu sjałowego jest niezbędna. Usunięcie reszt kwasu sjałowego z erytroprotein, czy hormonów o charakterze sjałoglikoprotein niszczy ich aktywność biologiczną. W wielu chorobach, również nowotworowych, obserwowany jest wzrost poziomu kwasu sjałowego w surowicy. Ważną rolę odgrywa kwas sjałowy w kierowaniu limfocytów do węzłów chłonnych. Ciekawe zagadnienie stanowi kwas sjałowy jako receptor dla lektyn, cząsteczek wirusów, hormonów i przeciwciał.

Szczególnie interesujące jest porównanie danych dotyczących metabolizmu komponent zawierających kwas sjałowy w komórkach normalnych, złośliwych czy stransformowanych. Konsekwencją transformacji komórek jest specyficzny blok w biosyntezie gangliozydu, a co za tym idzie redukcja łańcucha oligosacharydu. W związku z powyższym błony plazmatyczne komórek stransformowanych, jak również inne frakcje błon (mitochondrialne, mikrosomalne) cechuje mniejsza zawartość kwasu sjałowego w porównaniu z błonami komórek normalnych.

Rola kwasu sjałowego przejawia się również we wzajemnym oddziaływaniu komórki na komórkę, przyleganiu do szkła, w transporcie aminokwasów i białek w komórkach nowotworowych.

Ostatni rozdział omawianej monografii zawiera informacje na temat sjałidaz pochodzenia bakteryjnego, wirusowego i zwierzęcego oraz ich rolę w procesach rozmnażania, w zmianach okresu półtrwania krążących sjałoglikoprotein, w tworzeniu się zakrzepów, w przysyłaniu sygnałów przez nerwy, we wzajemnym oddziaływaniu komórki na komórkę, w transformacji komórek.

Z uwagi na ważność zagadnień poruszonych w tej książce może ona i powinna zainteresować zarówno biologów jak i biochemików, lekarzy i neurofizjologów.

Recenzowana książka została opracowana bardzo starannie, tekst poparty jest licznymi rycinami, zestawieniami i wzorami omawianych reakcji, a każdy z rozdziałów zaopatrzony jest w spis cytowanej literatury do 1976 roku włącznie.

B. Kędzierska

XVII Supplement *Acta Histochemica*

wyd. Gustav Fischer, Jena

Biomorphose von Zellorganellen und Methoden ihrer submikroskopischen Untersuchung, red. prof. dr med. habil. Gunther Geyer, Instytut Anatomiczny Uniwersytetu Frydryka Shillera w Jenie

Dobłą tradycją biologów w NRD zajmujących się ultrastrukturą i cytochemią stało się organizowanie dorocznych sympozjów, których materiały są następnie publikowane jako suplementy czasopisma *Acta Histochemica*. Ostatni tom tej serii, wydany w 1976 r., zawiera materiały z Sympozjum poświęconego biomorfozie organelli komórkowych i metodom ich submikroskopowego badania. Sympozjum to zorganizowały Towarzystwo dla Badań Topochemicznych i mikroskopowo-elektronowych i zajmujący się również mikroskopią elektronową oddział Towarzystwa Fizycznego NRD. Mimo, że był to zjazd o charakterze roboczej konferencji krajowej, wśród uczestników spotyka się również nazwiska gości z zagranicy, jak np. z Bułgarii, Polski, Węgier i ZSRR.

Tom zawierający materiały z tego sympozjum jest obszerny, liczy 390 stron i jest bogato ilustrowany bardzo dobrymi pod względem technicznym zdjęciami. Daje on przegląd problemów i możliwości badawczych mikroskopii elektronowej tym cenniejszy, że z jednoczesnym wskazaniem laboratoriów i autorów, którzy w danym polu mają już pewne osiągnięcia. Poruszane zagadnienia dotyczą morfogenezy komórki zwierzęcej — badanej na poziomie mikroskopii elektronowej — zarówno w warunkach rozwoju prawidłowego, jak i zachodzącego pod wpływem stanów patologicznych.

W recenzowanym tomie wyróżnić można zwartą grupę referatów mówiących o strukturze funkcjonalnej komórki roślinnej (np. o strukturze plastydów), a także o charakterze kwasów nukleinowych występujących w chloroplastach.

Doniesienia dotyczące spraw metodycznych grupują się głównie wokół zagadnień immunocytochemii, autoradiografii (oczywiście wszystko na poziomie mikroskopu elektronowego), techniki kriorytowania, krioultramikrotomii, analizy rentgenowskiej i oceny stereologicznej elektrogramów. Wybranie tych zagadnień było niewątpliwie świadome a załączone referaty świadczą o tym, że w technikach związanych z tak zwaną niekonwencjonalną mikroskopią elektronową nasi koledzy z NRD osiągnęli w wielu przypadkach wysoki poziom.

A. Przetęcka

Methods in Membrane Biology, 7.

Red. Edward D. Korn, Plenum Press, New York and London, 1976, str. 267.

Tom VII wydawnictwa „Metody stosowane w biologii błon” redagowanego przez E. D. Korna zawiera artykuły dotyczące zagadnień organizacji ultrastrukturalnej błony, rozmieszczenia w niej fosfolipidów oraz charakteru chemicznego jej warstwy powierzchniowej. Pierwszemu zagadnieniu poświęcony jest obszerny artykuł omawiający różne metody badania błon przy pomocy mikroskopu elektronowego. Przegląd ten autorzy poprzedzają zwięzłe i przejrzyste podanym opisem zasad działania mikroskopu elektronowego. Nazbyt częsty brak znajomości tych zasad, wg redaktora

tomu, bywa nie rzadko przyczyną błędów popełnianych przy interpretacji uzyskiwanych elektronogramów. Tym cenniejsze są zatem podane w artykule informacje dotyczące zarówno elementów optyki elektronowej, jak i teoretycznych podstaw przygotowywania materiału biologicznego do tego typu badań. Poza metodami konwencjonalnymi, autorzy omawiają technikę kriorytowania, autoradiografię oraz metody cytochemiczne z uwzględnieniem immunocytochemii i mikroanalizy rentgenowskiej. Całość jest dobrze ilustrowana przykładami wyników uzyskanych przy pomocy wymienionych metod.

Metodyka badania rozmieszczenia fosfolipidów w błonie omawiana jest w dwóch artykułach dotyczących techniki stosowania fosfolipaz i techniki przeprowadzania wymiany fosfolipidów między błonami o różnym charakterze. Obie te techniki służą badaniu asymetrii w rozmieszczeniu fosfolipidów w błonach biologicznych, która ostatnio coraz częściej przyciąga uwagę badaczy. Podobnie jak w poprzednio omówionym artykule, jasne przedstawienie metodyki badań i szeregu szczegółów technicznych, dobrane ilustrujących ją przykładów oraz staranne zestawienie odnośnej literatury decyduje o dużej wartości tych artykułów. Takie same uwagi nasuwają się po przeczytaniu rozdziału traktującego o znakowaniu związkami radioaktywnymi węglowodanów wchodzących w skład warstwy powierzchniowej błony.

Zarówno problemy poruszane w recenzowanym tomie, jak i sposób ich przedstawienia sprawiają, że wielu biologów zainteresowanych strukturą molekularną błon biologicznych będzie do niej często zaglądać.

A. Przelęcka

Reflections on Biochemistry. In honour of Severo Ochoa.

Red.: A. Kornberg, B. L. Horecker, L. Cornudella i J. Oro, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 1976, str. 465.

„Reflections on Biochemistry” — to książka wydana dla uczczenia Profesora Severo Ochoa w jego siedemdziesiątą rocznicę urodzin. We wrześniu 1975 odbyło się z tej okazji w Madrycie sympozjum. W ramach sześciu kolokwium omówiono dziedziny biochemii, których rozwój wiele zawdzięcza jubilatowi. Najogólniej mówiąc są to bioenergetyka, metabolizm lipidów i sacharydów, regulacje metaboliczne, struktura i funkcja kwasów nukleinowych, kod genetyczny, biosynteza białek i pewne aspekty biologii komórki.

Przegląd działalności naukowej S. Ochoa obrazuje nie tylko zakres problematyki, którą osobiście interesował się jubilat, lecz wskazuje także ośrodki badawcze inspirowane rozwój biochemii w ciągu pięćdziesięciolecia. S. Ochoa bowiem pojawiał się jako wyjątkowo utalentowany i twórczy badacz w laboratoriach, w których właśnie w jego czasie aktywność naukowa osiągała najznakomitsze wyniki.

Publikowanie referatów wygłaszanych podczas spotkań naukowych organizowanych ku czci wybitnych uczonych stało się niemal regułą. Teksty jednak zebrane w recenzowanym tomie mają swoisty charakter. Są to mianowicie eseje obrazujące w autobiograficznym świetle rozwój badań, koncepcji i sposobów podejścia eksperymentalnego o dużej różnorodności ujęć, tonu i formy poszczególnych artykułów. Książka dzięki temu mówi nie tylko o rozwoju i aktualnych problemach biochemii, lecz mówi też wiele o tych, którzy w jej rozwoju mieli szczególny udział.

Wśród wybitnych, aż dziesięciu, autorów zebranych w tomie esejów było — jak i sam jubilat — odznaczonych nagrodą Nobla. Nic więc dziwnego, że dzięki kompetencji, erudycji autorów książka daje fascynujący wgląd w półwiecze dynamicznego

rozwoju biochemii. Obrazuje ona trudności techniczne badań w latach dwudziestych, streszcza obecny stan wiedzy i sygnalizuje liczne problemy czekające na swe rozwiązanie. Z tych właściwie względów książka stanowi niespotykane zajmującą lekturę dla wszystkich interesujących się biochemią. Okładkę tomu zdobi barwny rysunek Salvadora Dali.

Z. Zielińska

W związku z recenzją książki pt. „Chemia Fizyczna dla przyrodników” (Post. Biochem. t. 22 (4), 551—555, 1976). Redakcja otrzymała następującą wypowiedź Autorów:

W numerze 4 (1976) *Postępów Biochemii* ukazała się recenzja pt. „Dla kogo ta chemia fizyczna”, pióra Kazimierza Zakrzewskiego, w której Recenzent poirytowany afirmacją autorów stara się zdyskwalifikować napisaną przez nas książkę pt. „Chemia fizyczna dla przyrodników” (PWN, W-wa 1975). Aby nie pozostawić wątpliwości co do zaangażowania i pewnej egzaltacji, nawet pozytywne (niezawinione przez autorów) cechy podręcznika Recenzent obrócił przeciwko autorom.

Nie podejmujemy dyskusji z Recenzentem co do tych punktów, w których wyraża on niemerytoryczne poglądy i wrażenia o treści książki np. czy peptydy należy traktować jako ciało stałe (czy jako co?), czy istnieją roztwory koloidalne, czy ich nie ma itp. Wszelako nie sposób jednej rzeczy podkreślić: książka była nie tylko pisana ale i wielokrotnie przeredagowywana właśnie z myślą o przyrodnikach (również biochemikach). Mieliliśmy jednak stale na uwadze tylko **chemię fizyczną**. Ani program kształcenia, ani kompetencje autorów, ani też chyba rzeczywiste potrzeby dydaktyczne, nie stwarzały potrzeby zajmowania się w książce niczym innym jak chemią fizyczną. A podstawy chemii fizycznej to przede wszystkim metody termodynamiczne podbudowane informacjami o strukturze molekuł. Pretensje Recenzenta co do szczupłej, a nawet lapidarnej treści aspektów biochemicznych są nader dyskusyjne, jeżeli zdawać sobie sprawę czym jest, a czym nie jest (ani biochemią, ani biofizyką) chemia fizyczna jako dyscyplina spełniająca funkcje dydaktyczne. Niestety Recenzent ani w jednym miejscu nie ustosunkował się do tej podstawowej funkcji dydaktycznej; chyba że uwzględnimy akapit w którym pomylił termodynamikę statystyczną z termodynamiką procesów nieodwracalnych.

Naczelną zasadą którą kierowali się autorzy (może nie zawsze dostatecznie konsekwentnie) w trakcie pisania podręcznika, było podawanie informacji, które wynikałyby w sposób udokumentowany z podstawowych praw fizyki. Niestety ten sposób, bardzo ważny z punktu widzenia dydaktyki, powoduje pewne ograniczenie. Przykładowo: współczynnik dyfuzji (a nie jak nazywa Recenzent tę wielkość „stała dyfuzji”) wyznacza się w oparciu o tzw. drugie prawo Ficka, które w symetrii seminiestończonej dyfuzji liniowej posiada postać:

$$\frac{\delta C(x, t)}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C(x, t)}{\delta x^2}$$

Rozwiązanie tego równania wymaga obszernych wiadomości z zakresu teorii równań różniczkowych i transformacji Laplace'a, których studenci ani biologii ani biochemii nie posiadają.

Podobnie z wprowadzeniem pojęcia transportu aktywnego. Ścisłe rozważanie tego sposobu transportu związane jest z dość obszerną znajomością termodynamiki

procesów nieodwracalnych, a ponieważ tej ostatniej do podręcznika nie wprowadzono (być może niesłusznie) autorzy woleli zagadnienie pominąć aniżeli podawać je jedynie w sposób opisowy.

Recenzent twierdzi, że w podręczniku pominięto teorię elektroforezy; jako zjawisko przeciwne do elektroosmozy mogło być z matematycznego punktu widzenia potraktowane bardziej skrótowo, gdyż wyrażenia na ruchliwość elektroforetyczną i elektroosmotyczną są identyczne.

Zastosowanie elektroforezy do rozdziatu, identyfikacji i otrzymania w stanie czystym białek jest już domeną czysto biochemiczną — podobnie jak krzywe ruchliwości przedstawiające zależności ruchliwości cząstek koloidalnych od pH roztworu.

W całej recenzji więcej jest mowy o tym czego nie ma, niż o tym co jest w książce; a przecież książka ta liczy sobie 581 stron; jest to objętość — jak na dyscyplinę pomocniczą — i tak zbyt chyba obszerna (wystarczy porównać obowiązujący program). Pytanie w tej sytuacji czy opisywać metody rezonansowe tylko jako podstawy fizyczne zjawiska, czy też rozwijać wszystkie teoretyczne i praktyczne aspekty metody, wydaje się co najmniej dyskusyjne. Pytań tego typu jest zresztą wiele. Uwzględnienie tylko dezyderatów Recenzenta zwiększyłoby dwukrotnie objętość książki. A wiemy, że dezyderatów takich można by postawić znacznie więcej.

Na koniec chcielibyśmy się ustosunkować do nader kontrowersyjnego stanowiska Recenzenta przejawiającego się niemal w całej recenzji. Dotyczy ono sposobu traktowania biopolimerów w różnych warunkach. Czym one są w stanie czystym, a czym w roztworze, jak powinny być traktowane w przypadku gdy spełniają rolę katalizatora itd.? Otóż z czysto termodynamicznego punktu widzenia roztwory mogą być traktowane jako rzeczywiste wtedy, gdy w opisie ich entalpii swobodnej do pominięcia są potencjały międzyfazowe, a więc wyraz odS. Potrzeba traktowania biopolimerów jako roztworów nierzeczywistych wynika także z różnych zjawisk fizycznych np. rozpraszania światła, procesów kinetycznych, elektrokinetycznych itd. A procesy enzymatyczne? Rzeczywiście, równania kinetyczne mają postać, w której „heterofazowość” nie ujawnia się. Ścisłej — dla opisu ilościowego problem w jakiej postaci występują cząsteczki enzymu nie występuje. Czy nie zachodzi jednak potrzeba zastanowienia się nad fizycznym modelem oddziaływania? Otóż model oddziaływania substrat — enzym jako cząsteczka koloidalna wydaje się najrozsądniejszy. Wszystko to co wiemy o katalizie heterofazowej może być z powodzeniem zastosowane do procesów enzymatycznych z jedną istotną różnicą, że miejsca aktywne na cząstce enzymu mają najprawdopodobniej zdolność dynamicznego sterycznego dopasowywania się. Ale rola sterycznego czynnika w katalizie heterofazowej była znana od dawna.

Podjęliśmy dyskusję w sprawie naszego podręcznika na łamach *Postępów Biochemii* z dużymi oporami, gdyż ton recenzji i autorytatywność stwierdzeń bynajmniej nie zachęcały do wypowiedzi. Zagadnienia dydaktyki na kierunkach biologicznych wydają się jednak zbyt ważne, aby można było zniechęcić fizyko-chemików do udziału w procesie kształcenia biologów.

Lucjan Sobczyk
Adolf Kiska

List do Redakcji został opublikowany w formie przystanej przez Autorów.

Odpowiedź Recenzenta

Nie można nie zgodzić się z twierdzeniem autorów podręcznika „Chemia fizyczna dla przyrodników”, że chemia fizyczna nie jest ani biochemią ani biofizyką. Nie oznacza to jednak, że podręcznik chemii fizycznej dla przyrodników ma być taki sam,

jak podręcznik przeznaczony dla np. chemików-organików czy metalurgów. Truizmem zaś jest, że podręcznik z zakresu jednej dyscypliny naukowej pisany dla studentów czy specjalistów z innej — musi uwzględniać specyficzne potrzeby i problematykę potencjalnych czytelników. Przecież chyba to mieli Autorzy na myśli, pisząc Swoją podręcznik i „wielokrotnie” go przeredagowując.

Podobnie, nie budzi zastrzeżeń zasada, jasno sformułowana w liście Autorów — że w podręczniku należy podawać informacje, które w sposób udokumentowany wynikają z praw fizyki. Ale i tu — choć jest to rzeczą rzadszą w naukach ścisłych niż w innych dziedzinach życia — interpretacja zasady może całkowicie wypaczyć jej sens. Widać to z repliki Autorów na niektóre zarzuty, zawarte w recenzji. Drugie prawo Ficka bez wątplenia wynika z praw fizyki, ale w tekście podręcznika zostało pominięte. Jak się obecnie okazuje, przyczyną tego były zbyt trudne operacje matematyczne, konieczne dla przekształcenia podstawowego równania różniczkowego we wzór ostateczny. Czy trzeba zapewniać Autorów, że czytelnik więcej skorzysta, jeżeli otrzyma ten wzór wraz z uwagą, że jego wyprowadzenie przekracza zakres podręcznika (i ew. z jakich powodów), niż jeżeli pominie się milczeniem istnienie prawa z którego często korzysta się zarówno w pracach doświadczalnych jak m.in. w analizie przemysłowej?

List również wyjaśnia, że z podobnych przyczyn cenzurą objęto transport aktywny. W tym jednak przypadku trudno zgodzić się z argumentacją Autorów. W swoim podręczniku omówili przecież i pojęcie swobodnej energii i potencjału chemicznego. Nic więc nie stało na przeszkodzie, by na 1/2 — 1 stronie tekstu wyjaśnić istotę transportu aktywnego przy pomocy 4—5 równań (w których nb. nie wystąpi inne działanie jak dodawanie i odejmowanie). A wtedy bardziej dociekliwy czytelnik nie pomyśli, że stężenia sodu i potasu w komórce ustalają się wbrew II prawu termodynamiki. Zrozumie natomiast, jak sprzężenie reakcji o wysokiej ujemnej zmianie swobodnej energii z reakcją o zmianie dodatniej pozwala komórce nagromadzać substancje przeciwko gradientowi stężeń, pozostając w pełnej zgodności z prawami termodynamiki. Pisząc podręcznik chemii fizycznej dla przyrodników, trzeba pamiętać iż takie sprzężone reakcje leżą u podłoża wszelkich zjawisk biologicznych, a w podręcznikach biochemii czy biologii ogólnej są na ogół opisywane tylko w pojęciach fenomenologicznych.

Ciekawy i wartościowy jest podany w Liście wywód o mechanizmie reakcji enzymatycznych. Gdyby został on nieco rozbudowany, to bez wątplenia z pożytkiem zastąpiłby to co o tym zagadnieniu napisano w podręczniku. Natomiast replika w sprawie teorii elektroforezy jest kolejnym przykładem niedostosowania podręcznika do potrzeb przyrodników. Oczywiście, że elektroforeza jest odwróceniem elektroosmozy, rzadko jednak takie uproszczenie jest bogate w treść informacyjną. Biopolimery są polielektrolitami, wokół ich cząsteczki wytwarza się więc atmosfera jonowa, uniemożliwiająca zastosowanie prostego wzoru na elektroosmozę do przebiegu elektroforezy. Konieczne staje się wprowadzenie t.zw. funkcji Henry'ego, w podręczniku pominiętej (pomimo że teoria Debye-Hückel jest omówiona). I ta poprawka jednak okazała się niewystarczająca, w wyniku czego już dawno temu zaniechano stosowania elektroforezy do badania własności elektrochemicznych biopolimerów. Wzrosło jednak jej znaczenie jako jednej z najlepszych metod rozdzielowych, lecz tu — elektroforeza swobodna została prawie całkowicie wyparta przez elektroforezę na podłożach stabilizujących. W tej ostatniej zaś zachodzą złożone procesy elektrochemiczne i hydrodynamiczne, których wyjaśnienia ma prawo biolog oczekiwać od podręcznika dla niego przeznaczonego.

Autorzy z ubolewaniem stwierdzają, że recenzja nie ustosunkowała się do funkcji dydaktycznej ich podręcznika. Wykaz usterek, sporządzony z punktu widzenia adresata podręcznika, zwalniał chyba z tego obowiązku. A przecież lista ta nie była

kompletna. Np. wątpić wolno czy spotka się z szeroką aprobatą sposób wyłożenia podstaw termodynamiki, zawierający na 94 stronicach tekstu aż 220 wzorów i równań. A na 184 pytania kontrolne, bardzo cenne narzędzie dydaktyczne, tylko 11 można było (czasem z pewnym trudem) uznać za nawiązujące do problematyki biologicznej. Dydaktyka jest w dużym stopniu wiedzą ścisłą, ale w niemniejszym — sztuką...

Obawiam się, że nic innego zrobić nie można, jak zgodzić się, że się nie zgadzamy co do oceny podręcznika „Chemia fizyczna dla przyrodników”. Pragnę jednak zapewnić Autorów, dla których wiedzy mam głęboki szacunek, że celem moim nie było „zniechęcić fizykochemików do udziału w procesie kształcenia biologów”. Celem moim było, przeciwnie, zachęcić wybitnych fizykochemików — aby możliwie głęboko wniknęli w problematykę biologiczną przed przystąpieniem do pisania podręcznika, przeznaczonego dla przyrodników.

Kazimierz Zakrzewski

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

Cena zł 20.—

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

półrocznie zł 40.—

rocznie zł 80.—

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

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

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

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

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

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

SPIS TREŚCI — Tom XXII, 1976

ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

W. Ostrowski — Kataliza biologiczna w 50-lecie krystalizacji ureazy przez J. B. Sumnera	11
J. Gniot-Szulżycka — Niedobory enzymatyczne leżące u podstaw mukopolisacharozydaz	17
T. Gołaszewski — Kinaza tymidynowa	27
A. Grzeleńska — Fitoaleksyny	53
M. K. Jurkowski — Fosfolipazy zwierzęce	65
E. Próchniewicz — Fizykochemiczne właściwości aktyny i jej rola w skurczu mięśnia	77
J. J. Zimowski — Metabolity witaminy D i ich rola biologiczna	91
B. Rzeszotarska, S. Wiejak — Struktura i funkcja zasadowego inhibitora trypsyny	123
M. Manteuffel-Cymborowska — Biochemiczne aspekty biologicznych rytmów dobowych	148
N. Grankowski — Rola białek rybosomowych <i>Procaryota</i> w procesie translacji	173
B. Borkowska — Cytokiny	197
J. Sędzik — Niektóre aspekty rentgenostrukturalnych badań mieliny	211
Z. Kaniuga — Regulacja włączania CO ₂ w procesie fotosyntezy	247
M. Lercher — Protoplasty roślinne i ich zastosowanie w badaniach biologicznych	307
K. Bańkowski — Dynamika cząsteczkowa związków naturalnych wyznaczana z badań relaksacji spinowo-sieciowej jąder węgla [¹³ C].	323
B. Grzelakowska-Sztabert — Transport i metabolizm folianu w komórkach zwierząt i drobnoustrojów	345
W. Lutz — Przemiana glutationu i transport aminokwasów, cykl γ -glutamylowy	387
J. Piotrowski, E. M. Mogilnicka — Metalotioneina	401
D. Frąckowiak, K. Fiksiński — Przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych	439
R. Dąbrowska — Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni	467
M. Pilarska — Biosynteza eterowych odpowiedników lecytyn i fosfatydyloetanoloamin	483
K. Konopka — Wewnątrzkomórkowy transport żelaza	491
M. Droba, K. Strzałka — Zastosowanie metod immunologicznych do badania struktury błon tylakoidów	511
E. Dahlig — Różne formy molekularne niektórych enzymów metabolizmu węglowodanów w nowotworach wątroby, wątrobie regenerującej i tkankach płodowych	527

RECENZJE KSIĄŻEK

T. Borkowski — Wydawnictwo pt. „Biochemistry of Nucleic Acids” red. K. Burton — Butterworths University Park Press, Medical and Technical Publishing Co Ltd Baltimore	113
A. Przełęcka — <i>Acta Histochemica</i> suppl. XIV (1974) — O wartości poznawczej metod cytochemicznych stosowanych w badaniach enzymatycznych	237
P. Jastreboff — W. J. Ridgman „Experimentation in Biology — An Introduction to Design and Analysis”, Blackie 1975, London, Glasgow	427
Z. Kaniuga — Wolfgang Wiessner „Bioenergetik bei Pflanzen”, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1975	429
A. Przełęcka — <i>Acta Histochemica</i> suppl. XV (1975) Metody instrumentalne w histochemii (zagadnienia histochemii i mikroskopii elektronowej)	430
Z. Zielińska — Biochemistry of Cell Walls and Membranes, red. C. F. Fox	
K. Zakrzewski — L. Sobczyk i A. Kisza (1975) Chemia fizyczna dla przyrodników, PWN, Warszawa	431
I. Szumieli — Biomolekularne podstawy interakcji hormon — komórka, pod red. naukową Doc. dr med. A. Dawidowicza, PZWL, Warszawa, 1975	556

KRONIKA

Wspomnienie — Prof. Włodzimierz Mozołowski — M. Zydowo, L. Żelewski	3
Sprawozdanie z kursu nt. „Zastosowanie izolowanych komórek wątroby i kanałików nerkowych w badaniach metabolicznych, Paryż i Luzarches (Francja), 1975 — J. Bryła	111
Komunikat o Międzynarodowym Zjeździe Towarzystwa Lekarskiego, Warszawa-Kraków, 1976	115
Sprawozdanie z XIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, 4—6.IX.1975 — P. Masłowski, A. Leźnicki	231
Sprawozdanie z V Międzynarodowego Zjazdu Towarzystwa Neurochemicznego, Barcelona, 1975 — S. Niemierko, B. Oderfeld-Nowak, J. Skangiel-Kramska	
Komunikat Komisji Słownictwa PTBioch. — J. Kwiatkowska	240
Sprawozdanie z X Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), Paryż, 1975 — T. Borkowski, E. Gąsior, E. Wałajtyś	421
Sprawozdanie z konferencji nt. „Immobilizowane enzymy i białka”, Berlin-Buch, NRD, 1976 — A. Szewczuk	548

INDEKS AUTORÓW — TOM XXII, 1976

B

Bańkowski K. — Dynamika cząsteczkowa związków naturalnych wyznaczana z badań relaksacji spinowo-sieciowej jąder węgla [¹³ C]	323
Borkowska B. — Cytokininy	197
Borkowski T. (patrz Borkowski T., Gąsior E., Wałajtys E.) — Sprawozdanie z X Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), Paryż, 1975	421
Borkowski T. — recenzja książki pt „Biochemistry of Nucleic Acids” red. K. Burton — Butterworths Univ. Park, Med. and Techn., Publ. Co Ltd, Baltimore	113
Bryła J. — Sprawozdanie z kursu nt. „Zastosowanie izolowanych komórek wątroby i kanalików nerkowych w badaniach metabolicznych, Paryż i Luzarches (Francja), 1975	111

C

Cymborowska M. (patrz Manteuffel-Cymborowska M.) — Biochemiczne aspekty biologicznych rytmów dobowych	148
---	-----

D

Dahlig E. — Różne formy molekularne niektórych enzymów metabolizmu węglowodanów w nowotworach wątroby, wątrobie regenerującej i tkankach płodowych	527
Dąbrowska R. — Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni	467
Droba M., Strzałka K. — Zastosowanie metod immunologicznych do badania struktury błon tylakoidów	511

F

Fiksiński K. (patrz Frąckowiak D., Fiksiński K.) — Przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych	439
Frąckowiak D., Fiksiński K. — Przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych	439

G

Gąsior E. (patrz Borkowski T., Gąsior E., Wałajtys E.) Sprawozdanie z X Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), Paryż, 1975	421
Gniot-Szulżycka J. — Niedobory enzymatyczne leżące u podstaw mukopolisacharydoz	17
Gólaszewski T. — Kinaza tymidynowa	27
Grankowski N. — Rola białek rybosomowych <i>Procaryota</i> w procesie translacji	173
Grzelakowska-Sztabert B. — Transport i metabolizm folianu w komórkach zwierząt i drobnoustrojów	345
Grzelińska A. — Fitoaleksyny	53

J

Jastreboff P. — recenzja książki W. J. Ridgman „Experimentation in Biology — An Introduction to Design and Analysis”, Blackie 1975, London, Glasgow	427
Jurkowski M. K. — Fosfolipazy zwierzęce	65

K

Kaniuga Z. — Regulacja włączania CO ₂ w procesie fotosyntezy	247
Kaniuga Z. — recenzja książki Wolfgang Wiessner „Bioenergetik bei Pflanzen”, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1975	429
Konopka K. — Wewnątrzkomórkowy transport żelaza	491
Kramaska J. — (patrz Niemierko S., Oderfeld-Nowak B., Skangiel-Kramaska J.) — Sprawozdanie z V Międz. Zjazdu Tow. Neurochemicznego, Barcelona, 1975	232

L

Lercher M. — Protoplasty roślinne i ich zastosowanie w badaniach biologicznych	307
Leźnicki A. — (patrz Masłowski P., Leźnicki A.) — Sprawozdanie z XIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, 4—6.IX.1975	231
Lutz W. — Przemiana glutationu i transport aminokwasów, cykl γ -glutamylowy	387

M

Manteuffel-Cymborowska M. — Biochemiczne aspekty biologicznych rytmów dobowych	148
Masłowski P., Leźnicki A. — Sprawozdanie z XIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, 4—6.IX.1975	231
Mogilnicka E. M. (patrz Piotrowski J., Mogilnicka E. M.) — Metalotioneina	401

N

Niemierko S., Oderfeld-Nowak B., Skangiel-Kramaska J. — Sprawozdanie z V Międz. Zjazdu Tow. Neurochemicznego, Barcelona, 1975	232
Nowak B. — (patrz Niemierko S., Oderfeld-Nowak B., Skangiel-Kramaska J.) — Sprawozdanie z V Międz. Zjazdu Tow. Neurochemicznego, Barcelona 1975	232

O

Oderfeld-Nowak B. — (patrz Niemierko S., Oderfeld-Nowak B., Skangiel-Kramaska J.) — Sprawozdanie z V Międz. Zjazdu Tow. Neurochemicznego, Barcelona 1975	232
Ostrowski W. — Kataliza biologiczna w 50-lecie krystalizacji ureazy przez J. B. Sumnera	11

P

Pilarska M. — Biosynteza eterowych odpowiedników lecytyn i fosfatydyloetanolamin	483
Piotrowski J., Mogilnicka E. M. — Metalotioneina	401

Próchniewicz E. — Fizykochemiczne właściwości aktyny i jej rola w skurczu mięśnia	77
Przełęcka A. — recenzja książki <i>Acta Histochemica</i> suppl. XIV (1974) — O wartości poznawczej metod cytochemicznych stosowanych w badaniach enzymatycznych	237
Przełęcka A. — recenzja książki <i>Acta Histochemica</i> suppl. XV (1975) — Metody instrumentalne w histochemii	430

R

Rzeszotarska B., Wiejak S. — Struktura i funkcja zasadowego inhibitora trypsyny	123
---	-----

S

Sędzik J. — Niektóre aspekty rentgenostrukturalnych badań mieliny	211
Skangiel-Kramaska J. — (patrz Niemierko S. Oderfeld-Nowak B., Skangiel-Kramaska J.) — Sprawozdanie z V Międz. Zjazdu Tow. Neurochemicznego, Barcelona 1975	232
Strzałka K. — (Droba M., Strzałka K.) — Zastosowanie metod immunologicznych do badania struktury błon tylakoidów	511
Szewczuk A. — Sprawozdanie z konferencji nt „Immobilizowane enzymy i białka”, Berlin-Buch, NRD, 1976	548
Sztabert B. (patrz Grzelakowska-Sztabert B.) — Transport i metabolizm folianu w komórkach zwierząt i drobnoustrojów	345
Szulżycka J. (patrz Gniot-Szulżycka J.) — Niedobory enzymatyczne leżące u podstaw mukopolisacharozydaz	17
Szumiel I. — recenzja książki <i>Biomolekularne podstawy interakcji hormon-komórka</i> , pod red. naukową Doc. dr med. A. Dawidowicza, PZWL, Warszawa 1975	556

W

Wałajtys E. — (patrz Borkowski T., Gąsior E., Wałajtys E.) Sprawozdanie z X Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), Paryż	421
Wiejak S. (patrz Rzeszotarska B., Wiejak S.) — Struktura i funkcja zasadowego inhibitora trypsyny	123

Z

Zakrzewski K. — recenzja książki L. Sobczyk i A. Kiszka (1975) <i>Chemia fizyczna dla przyrodników</i> , PWN, Warszawa	551
Zielińska Z. — recenzja książki <i>Biochemistry of Cell Walls and Membranes</i> , red. C. F. Fox	431
Zimowski J. J. — Metabolity witaminy D i ich rola biologiczna	91

Ż

Żydowo M., Żelewski L. — Wspomnienie — Prof. dr Włodzimierz Mozołowski	3
Żelewski L. (patrz Żydowo M., Żelewski L.) — Wspomnienie — Prof. dr Włodzimierz Mozołowski	3

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1977

ARTICLES IN POLISH

Volume 23

Number 3

Marek Kański (1918—1976) — Obituary notice (<i>J. Opieńska-Blauth</i>)	295
W. P. Michalski — Structure and Function of Purple Membrane from Halophilic Bacteria of <i>Halobacterium</i> Strain (Dept. Enzymol., Inst. Biochem., University of Warsaw)	297
A. Sołtyk — Early Interactions of Competent Bacteria with Nucleic Acids (Inst. Oncology, Warsaw)	321
B. Mazuś — RNA Polymerases of Eucaryotes with a Special Reference to Polymerases Higher Plants (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warsaw)	347
K. S. Famulski — Non-histone Chromatin Proteins — Endogenous Substrates for Nuclear Protein Kinases (Dept. Enzymol., Inst. Biochem., University of Warsaw)	379
B. Wolska-Mitaszko — The Role of Polyamines in Protein Biosynthesis (Dept. Mol. Biol., Inst. Microbiol., Biochem., M. Curie-Skłodowska University, Lublin)	399
A. L. Pawlak — Homotropic and Heterotropic Interactions in Human Hemoglobin A (Dept. Human Genetics, Pol. Acad. Sci., Poznań)	417
D. Sławińska, J. Sławiński — Chemiluminescent Analysis in Biochemistry (Inst. Phys., Chem., Agriculture Academy, Poznań)	445
Book reviews	478

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 przedstawną 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. Biophys. Acta*, (1972), 276, (1) np.

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

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, 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 egz. 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) pracy) 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: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny 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.

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

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

SPIS TREŚCI

Marek Kański (1918—1976) (<i>J. Opieńska-Blauth</i>)	295
W. P. Michalski — Struktura i funkcja błony purpurowej bakterii słonolubnych z rodzaju <i>Halobacterium</i>	297
A. Sołtyk — Wczesne etapy oddziaływania kompetentnych bakterii z kwasami nukleinowymi	321
B. Mazuś — Polimerazy RNA eukariontów ze szczególnym uwzględnieniem polimeraz roślin wyższych	347
K. S. Famulski — Niehistonowe białka chromatyny jako endogenne substraty jądrowych kinaz białkowych	379
B. Wolska-Mitaszko — Rola poliamin w systemie białka	399
A. L. Pawlak — Homotropowe i heterotropowe oddziaływania w ludzkiej hemoglobinie A	417
D. Sławińska, J. Sławiński — Analiza chemiluminescencyjna w biochemii	445
Recenzje	475
Spis treści — tom XXII, 1976	487