

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 28 (3)
(173-380) (1982)

1982

tom 28 nr 3

PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu jedynie piśmiennictwo z ostatniego roku lub dwu lat. Kwartalnik publikuje także krótkie noty informujące o nowych i ważniejszych osiągnięciach biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych 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 okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, 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 winny rzeczowo 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 szymbalskimi. 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 doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1982 TOM 28 ZESZYT 3

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postfach 28(3)
(173-380) (1982)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (*Poznań*)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (*Warszawa*)

B. Grzelakowska-Sztabert (*Warszawa*)

Członkowie: S. Angielski (*Gdańsk*), M. Chorąży (*Gliwice*), E. Czuryło (*Warszawa*), W. Drabikowski (*Warszawa*), M. Fikus (*Warszawa*), E. Gąsior (*Lublin*), J. Gregorczyk (*Szczecin*), M. Gumińska (*Kraków*), D. Hulanicka (*Warszawa*), W. Jachymczyk (*Warszawa*), J. Kwiatkowska (*Wrocław*), S. Lewak (*Warszawa*), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (*Wrocław*), A. Morawiecki (*Wrocław*), J. Pawełekiewicz (*Poznań*), K. Raczyńska-Bojanowska (*Warszawa*), L. Wojtczak (*Warszawa*), Z. Zielińska (*Warszawa*)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

A. Wieraszkó

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (*Warszawa*), J. Rytka (*Warszawa*), J. Skangiel-Kramska (*Warszawa*), J. Zborowski (*Warszawa*)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1983

Nakład 2300

Oddano do składowania 20.V.1982 r.

Ark. wyd. 15,75; ark. druk. 13,0

Podpisano do druku w marcu 1983 r.

Papier druk. sat. kl. IV 71 g. 70×100

Druk ukończono w kwietniu 1983 r.

Zam. 2511/82

Cena zł 60,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

ANDRZEJ PASZEWSKI *)

Immunoglobuliny — Zmiany genetyczne związane z ich powstawaniem i różnicowaniem

Immunoglobulins — Genetic Rearrangements Involved in their Formation and Differentiation

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Liczba i struktura genów kodujących łańcuch immunoglobulinowy**
- III. Formowanie genów immunoglobulinowych z segmentów w drodze rekombinacji genetycznej**
- IV. Rekombinacyjne sekwencje sygnałne**
- V. Identyfikacja segmentów D w DNA mysim**
- VI. Wykluczenie alleli**
- VII. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Number and structure of genes coding for immunoglobulin chains**
- III. Immunoglobulin gene formation from segments by genetic recombination**
- IV. Recombination signal sequences**
- V. Identification of D segments in mouse DNA**
- VI. Allelic exclusion**
- VII. Concluding remarks**

I. Wstęp

Zdolność wszystkich kręgowców do wytwarzania swoistych białek zwanych przeciwciałami lub immunoglobulinami, mogących rozpoznać i unieczynniać niezwykle wiele różnorodnych struktur molekularnych występujących lub mogących pojawić się w naturze, stanowi bardzo skuteczny mechanizm obronny organizmu przed inwazją obcych mu ciał.

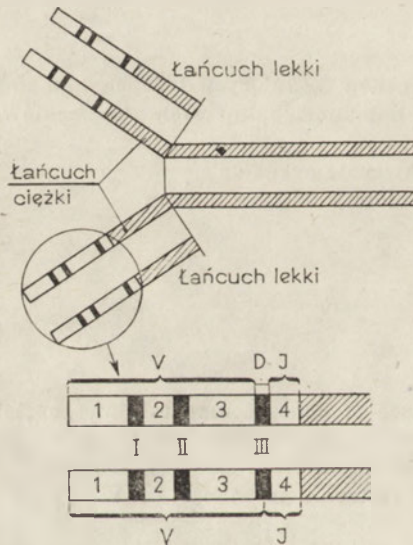
*) doc. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

skrót: kz — kilozasady.

Szacuje się, że każdy osobnik wytwarza ponad milion różnych immunoglobulin.

Pomimo wspomnianej różnorodności wszystkie przeciwciała zbudowane są według jednego podstawowego schematu, który przedstawiono na rycinie 1. Częsteczka przeciwciała składa się z łańcuchów polipeptydowych dwóch typów tzw. lekkich i ciężkich. W każdym z nich wyróżnia się część stałą (ang. *constant*, C) i zmienną (ang. *variable*, V). W części zmiennej, której zadaniem jest wiązanie antygeny, występują odcinki superzmienne V_1 , V_2 i V_3 . Części stałe łańcuchów uczestniczą w eliminowaniu antygeny.

Przez bardzo długi czas intrygowało badaczy pytanie, w jaki sposób organizm jest w stanie wytwarzać tak wiele różnych przeciwciał. Wyszunęto dwie hipotezy tłumaczące to zjawisko: pierwsza to hipoteza linii zarodkowej, przyjmująca osobne geny kodujące każdy ze spotykanych



Ryc. 1. Częsteczki immunoglobulin składają się z czterech łańcuchów: pary łańcuchów ciężkich i pary lekkich. Każdy z nich dzieli się na dwa odcinki spełniające różne funkcje: część zmienną, która uczestniczy w rozpoznawaniu antygeny oraz część stałą, która w przypadku łańcuchów ciężkich decyduje o funkcji efektorowej częsteczki. W części zmiennej wyróżnia się fragmenty 1, 2, 3, 4 tworzące zrąb (ang. *framework*), różniące się stosunkowo nieznacznie w immunoglobulinach różnych typów oraz trzy odcinki superzmienne I, II, III, które decydują o specyficzności antygenowej immunoglobuliny i one w pofalowanej częsteczce białka tworzą miejsce wiążące antygen. Każdy z łańcuchów ciężkich kodowany jest przez cztery segmenty: segment C kodujący część stałą łańcucha, segment J kodujący część zębca, segment D kodujący III odcinek superzmienny oraz segment V kodujący pozostałą część części zmiennej. Łańcuchy lekkie kodowane są przez segmenty C_L , V_L i J_L , nie mają jednak odpowiednika segmentu D. Niektórzy autorzy piszą o segmentach C, V i J jako o genach. Nie jest to jednak zgodne z powszechnym rozumieniem genu, jako jednostki transkrypcji.

łańcuchów immunoglobulinowych oraz druga — hipoteza somatycznej mutacji — zakładająca, że różnorodność immunoglobulin wynika, przynajmniej częściowo, z somatycznych mutacji (ale nie zawsze rozumianej w ścisłym genetycznym znaczeniu) zachodzących w małej liczbie genów linii zarodkowej w procesie immunodyferencjacji. Dopiero badania ostatnich lat, dzięki zastosowaniu technik klonowania i sekwencjonowania DNA, pozwoliły wyjaśnić podstawowe mechanizmy leżące u podstaw tak dużej różnorodności przeciwciał. Materiał w tych badaniach stanowiły głównie szpiczaki mysie (nowotwory szpiku kostnego) charakteryzujące się bardzo szerokim spektrum wytwarzanych immunoglobulin. Wykazano, że w komórkach embrionalnych, w przeciwieństwie do dojrzałych limfocytów, poszczególne segmenty genów kodujących zarówno łańcuchy ciężkie jak i lekkie znajdują się w różnych częściach chromosomu, niektóre w znacznej odległości od siebie. Liczba i rozmieszczenie tych segmentów oraz ich przemieszczanie w chromosomie w czasie różnicowania będą omówione szczegółowiej w dalszej części artykułu. Te procesy tworzenia i różnicowania immunoglobulin poza tym, że zapewniają ich różnorodność, są jednocześnie fascynującym modelem do badania mechanizmów przemian genetycznych związanych z rozwojem i różnicowaniem organizmów eukariotycznych.

II. Liczba i struktura genów kodujących łańcuchy immunoglobulinowe

Pierwsze prace dotyczyły genów kodujących łańcuchy lekkie. Izolowano mRNA tych łańcuchów a następnie, po wyznakowaniu go jodem radioaktywnym, hybrydyzowano z DNA komórek różnych linii. W innych doświadczeniach do hybrydyzacji używano znakowanego fosforem cDNA otrzymanego przez odwrotną transkrypcję mRNA. Wyniki wykazały, że w DNA komórek występuje szereg różnych sekwencji V_L , ale jednocześnie, że nie jest ich na tyle dużo, aby zapewnić obserwowaną różnorodność immunoglobulin (1, 2). Dane te sugerowały, że ta różnorodność może być konsekwencją łączenia się w różnych kombinacjach pewnej liczby segmentów DNA, kodujących określone fragmenty polipeptydów, w funkcjonalne geny. Hipoteza ta została potwierdzona przez T o n e g a w e i jego współpracowników (3).

Badacze ci hybrydyzowali mRNA łańcucha lekkiego znakowanego jodem radioaktywnym z DNA z tkanek embrjonalnych oraz z komórek szpiczaka mysiego, w obu przypadkach strawionych enzymem restrykcyjnym BamHI. Stwierdzono odrębne wzory hybrydyzacyjne. DNA z tkanek zarodkowych wykazywał dwa fragmenty, jeden hybrydujący z sekwencjami C i drugi z V, zaś DNA izolowany z komórek nowotworowych wykazywał tylko jeden fragment hybrydujący zarówno z sekwencjami C jak i z V. Świadczy to, że w czasie różnicowania następowało łą-

czenie segmentów C i V, nie zaś łączenie różnych mRNA w jeden transkrypt. Inaczej mówiąc przegrupowanie materiału genetycznego zachodzi na poziomie DNA a nie RNA. W tej samej pracowni wykazano, że nawet po przegrupowaniu, segment kodujący część zmienną V_L nie jest bezpośrednio dołączony do segmentu kodującego część stałą C_L — oddziela te dwa fragmenty intron o długości 1250 par nukleotydów (4). Również Tonegawa i współpracownicy jako pierwsi sklonowali w bakterii segment V_L łańcucha lekkiego podgrupy λ (5). Obecnie wiadomo, że w genomie myszy znajdują się dwa takie segmenty (6), natomiast liczby segmentów kodujących części zmienne łańcuchów lekkich typu κ oceniana jest na 100-300 (cytowane za (7)).

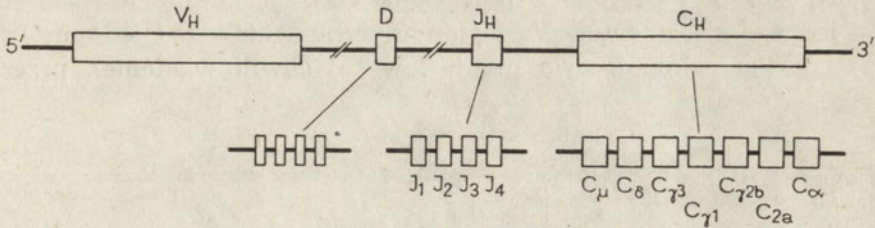
W przypadku łańcuchów immunoglobulinowych ciężkich sytuacja jest bardziej złożona. Im też poświęcimy większość dalszych rozważań, ponieważ na ich przykładzie można prześledzić wszystkie najważniejsze mechanizmy genetyczne leżące u podstaw wytwarzania dużej różnorodności przeciwciał. Przede wszystkim w przypadku łańcuchów ciężkich występuje kilka różnych segmentów C_H kodujących części stałe, od których noszą nazwy poszczególne klasy immunoglobulin: IgM, IgG, IgA itd., zaś liczbę segmentów V_H szacuje się na 200-1000 (cyt. za 7), przy czym wyróżnić można wśród nich „rodziny” segmentów bardzo do siebie podobnych.

Podobnie jak w przypadku genów kodujących łańcuchy lekkie, dla poznania rozmieszczenia i przemieszczeń segmentów genów kodujących łańcuchy ciężkie posługiwano się cDNA otrzymanym z odwrotnej transkrypcji mRNA łańcuchów ciężkich różnych klas immunoglobulin. Hybrydyzowano je następnie z DNA otrzymanym z komórek wytwarzających różne immunoglobuliny. Szczególnie przydatne było tu DNA izolowane z limfocytów nowotworowych hodowanych *in vitro*, które są źródłem przeciwciał wielu klas, a także wykorzystywano komórki embrionalne (8-11). Badania te pozwoliły na ustalenie, że te same fragmenty DNA kodujące poszczególne części łańcucha immunoglobulinowego, które w dojrzałym limfocycie znajdują się w pobliżu siebie, w tkance embrionalnej występują w odrębnych częściach chromosomu. Świadczyło to o zasadniczych przegrupowaniach materiału genetycznego w procesie różnicowania immunoglobulin, polegających na usunięciu (delecji) większych lub mniejszych odcinków chromosomów. Okazało się także, że w czasie różnicowania ulegają delecji również poszczególne segmenty C_H . Przez określenie, jakie segmenty C_H występują w DNA komórek wytwarzających określone immunoglobuliny, można było ustalić kolejność tych segmentów w chromosomie.

Badania nad uszeregowaniem segmentów C_H w chromosomie ujawniły

*) Podgrupa charakteryzuje się dużym podobieństwem zrzębu części zmiennej łańcucha.

jednocześnie, że zmiany klas mogą odbywać się tylko w określonej kolejności i są nieodwracalne, co doskonale tłumaczy model delecyjny zaproponowany przez Honjo i Ketaoka (8). Tak np. w DNA z komórek syntetyzujących immunoglobulinę IgM stwierdza się występowanie wszystkich pozostałych segmentów C_H , zaś w DNA z komórek wytwarzających immunoglobulinę IgG brak jest już segmentów C_μ i C_σ , kodujących części stałe łańcuchów IgM i IgD. Zrozumienie tego zjawiska ułatwia Ryc. 2, na



Ryc. 2. Schemat organizacji segmentów genów kodujących łańcuchy ciężkie immunoglobulin mysich. Nie są zachowane proporcje wielkości poszczególnych odcinków. W części górnej zaznaczono regiony segmentów V_H , D , J_H i C_H . Liczbę pierwszych ocenia się na 200-1000 (7). Segmentów D jest około 10. Pozostałe typy segmentów zaznaczono nieco szczegółowiej: segmentów J_H jest 4, zaś segmentów C_H 7. Ich kolejność określono na podstawie (8-12). Odległości pomiędzy regionami segmentów V_H i D nie są znane, pomiędzy D i J_H wynoszą one ponad 1000 par zasad. Segmenty J_H oddzielone są od siebie odcinkami kilkuset par zasad, zaś cały region J_H oddziela od segmentu C_μ 7,5 tys. par zasad, segment C_μ dzieli od C_σ 2,5 tys. par zasad. Odcinki pomiędzy segmentami C_{2b} i C_{2a} oraz $C_{\gamma 1}$ i $C_{\gamma 2b}$ ocenia się na ok. 20 tys. par zasad (12).

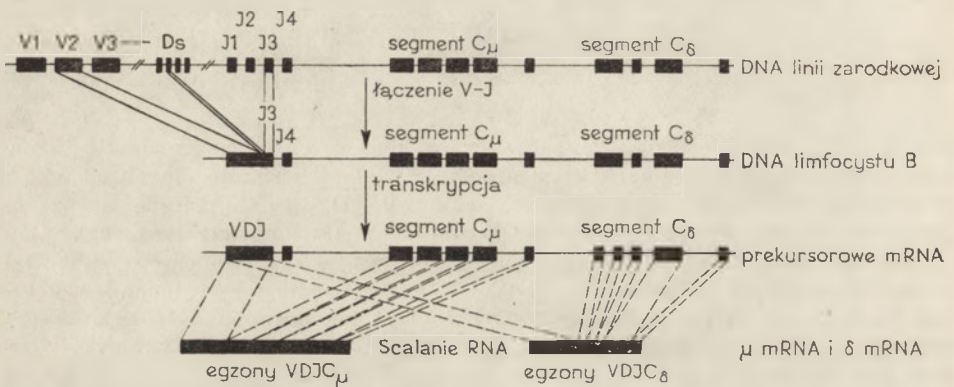
której zaznaczono schematycznie uszeregowanie segmentów genowych na chromosomie komórek embrionalnych. Ponieważ transkrypcja przebiega od końca 5', więc ażeby powstała immunoglobulina np. klasy $IgG_{\gamma 3}$ (ekspresja segmentu $C_{\gamma 3}$) segmenty C_μ i C_σ muszą zostać usunięte. W przypadku immunoglobuliny IgA muszą ulec delecji wszystkie inne segmenty C_H . Schemat ten, podany z pewnym wyprzedzeniem, ułatwi śledzenie dalszych części artykułu, w których przedstawione są dane potwierdzające i uściślające podaną tu kolejność.

III. Formowanie genów immunoglobulinowych z segmentów w drodze rekombinacji genetycznej

Etapy formowania genów kodujących łańcuchy ciężkie immunoglobulin i ich dalszego przekształcania prześledzimy na kilku przykładach zaczynając od genów warunkujących powstawanie klas IgM i IgD, gdyż te właśnie pojawiają się jako pierwsze w cyklu dojrzewania i różnicowania limfocytów B. Immunoglobulina IgM syntetyzowana jest już w bardzo

młodych limfocytach wytwarzanych w szpiku kostnym. Wędrują one następnie do śledziona, gdzie dzielą się i przekształcają w bardziej dojrzałe komórki, które oprócz immunoglobuliny IgM wytwarzają także immunoglobulinę D (IgD). Co ciekawe większość tych komórek wytwarza obie te immunoglobuliny jednocześnie. Jest to szczególny przypadek, ponieważ limfocyty, które przechodzą dalsze różnicowanie tzw. zmianę klasy (ang. *class switch*) wytwarzają już tylko immunoglobulinę jednego typu — IgG, IgA lub IgE.

Jak pokazano na Ryc. 3 w procesie dojrzewania limfocytów następuje fuzja jednego z segmentów V_H z jednym z segmentów D i jednym J (czy to zachodzi zupełnie losowo nie jest w tej chwili wiadome), przez co

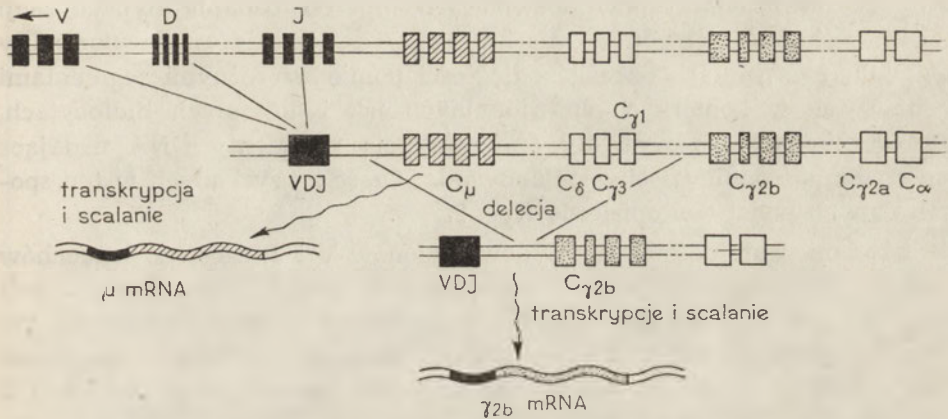


Ryc. 3. Model równoczesnej syntezy immunoglobulin IgM i IgD w limfocytach B. Najpierw w komórkach macierzystych limfocytów B zachodzi połączenie segmentów genowych V, D i J. W czasie tego procesu odcinki DNA oddzielające te segmenty zostają wydeletowane. Następnie syntetyzowane jest pre-mRNA, które podlega dalszej obróbce scalania (ang. *splicing*), w wyniku którego ulega wycięciu intron pomiędzy J i C $_{\mu}$ oraz sekwencje na prawo od C $_{\mu}$, prowadzi to do powstania μ mRNA. Alternatywnie wycięciu podlega cały odcinek od J do C $_{\mu}$ łącznie z egzonami C $_{\mu}$. Powstaje w tym przypadku mRNA. Ponieważ te dwa typy mRNA mają identyczne sekwencje V, D i J, należy oczekiwać, że syntetyzowane białka będą miały jedną specyficzną antygenową (wg 12).

tworzy się zwarty egzon VDJ. Transkrypcja obejmuje egzon VDJ i przebiega dalej na prawo obejmując region C $_{\sigma}$. Powstaje prekursorowe mRNA o długości co najmniej 19,5 tys. zasad. To mRNA może podlegać dwóm typom scalania (ang. *splicing*): albo powstaje mRNA immunoglobuliny IgM (μ mRNA) albo immunoglobuliny IgD (σ mRNA). Scalanie w kierunku powstawania μ mRNA następuje częściej, co przejawia się występowaniem dużej ilości IgM i małej IgD w surowicy mysiej. Są jednak limfocyty wytwarzające tylko IgM, co może świadczyć o tym, że region C $_{\mu}$ został w nich całkowicie usunięty (12).

Wytwarzanie immunoglobulin M i D wymaga tylko jednej rekombinacji genetycznej polegającej na fizycznym złączeniu fragmentów DNA kodu-

jących łańcuch polipeptydowy. Dalsze zróżnicowanie prowadzące do wytwarzania immunoglobulin innych klas zwane zmianą klasy polega na wymianie regionów kodujących stałe fragmenty łańcucha ciężkiego. Zmianę taką przedstawiono na przykładzie przekształcenia „zestawu informującego” immunoglobuliny M na zestaw immunoglobuliny G konkretnie $IgG_{\gamma 2b}$ (Ryc. 4). Jak widać na Ryc. 4, duży odcinek DNA zostaje usunięty, przez co region $C_{\gamma 2b}$ zostaje przyłączony w sąsiedztwie regionu VDJ tworząc nową jednostkę transkrypcyjną. Powstające pre-mRNA podlega scalaniu w wyniku czego powstaje mRNA immunoglobuliny $IgG_{\gamma 2b}$. W podobny sposób następują inne zmiany klasy, przy czym zawsze są one jednokierunkowe, ponieważ usunięty w czasie różnicowania odcinek nie może już być wstawiony z powrotem. Jest to zgodne z delecyjnym modelem zmiany klas, o którym pisaliśmy wyżej.



Ryc. 4. Schemat rekombinacji prowadzących do powstania pełnego genu C_{μ} , a następnie do zmiany klasy z utworzeniem kompletnego genu C_{2b} . W pierwszym etapie następuje łączenie jednego z segmentów V_H z jednym z segmentów D i jednym J_H w egzon VDJ. W wyniku transkrypcji regionu VDJ wraz z segmentem C powstaje pre- μ mRNA, a następnie, w wyniku scalania μ mRNA, na którym przebiega translacja łańcucha ciężkiego immunoglobuliny IgM . W procesie różnicowania limfocytu B może nastąpić usunięcie dużego odcinka DNA zawierającego segmenty C_{μ} , C_{δ} , $C_{\gamma 3}$ i $C_{\gamma 1}$ wraz z przyłączeniem segmentu C_{2b} w pobliżu regionu VDJ. W wyniku transkrypcji i scalania powstaje $_{2b}$ mRNA. Fragmenty zaczerńnione reprezentują segmenty V, D i J, fragmenty zakreskowane egzony C_{μ} , zaś fragmenty zakropkowane egzony $C_{\gamma 2b}$. Pozostałe segmenty C_H zaznaczono w postaci otwartych prostokątów bez wyróżniania egzonów i intronów (wg 13, 14).

Zarówno formowanie genu immunoglobulinowego, tj. łączenie regionów V, D i J w egzon VDJ, jak też późniejsze zmiany klasy są konsekwencją usunięcia określonych odcinków DNA, które musi przebiegać w miarę precyzyjnie. Precyzja taka może być zagwarantowana istnieniem specyficznych sekwencji w DNA, rozpoznawanych przez swoiste enzymy. Sekwencje takie wyznaczają miejsce rekombinacji.

IV. Rekombinacyjne sekwencje sygnałne

Przez hybrydyzowanie radioaktywnych łańcuchów cDNA odpowiadających różnym immunoglobulinom z DNA różnych linii komórkowych, pociętego enzymami restrykcyjnymi i rozdzielonego elektroforetycznie, udało się wyodrębnić fragmenty DNA zawierające poszczególne geny immunoglobulinowe wraz z sekwencjami sąsiadującymi, a z komórek embrionalnych także fragmenty DNA zawierające poszczególne segmenty tych genów. Tak zidentyfikowane fragmenty klonowano następnie w bakteriach przy użyciu różnych wektorów. Obecnie w wielu pracowniach dysponuje się dużą kolekcją plazmidów lub fagów noszących określone sekwencje genów immunoglobulinowych. Dzięki ich sklonowaniu można było otrzymać wystarczającą ilość materiału do ich sekwencjonowania, a także do innych typów doświadczeń, np. do badania hybrydyzacji w mikroskopie elektronowym (17, 18). Te ostatnie prace pozwoliły w wielu przypadkach określić odległości pomiędzy różnymi segmentami genów, tak w komórkach embrionalnych jak i dojrzałych limfocytach, szczególnie gdy przewyższały one długością fragmenty DNA nadające się do bezpośredniego sekwencjonowania. Część z uzyskanych w ten sposób danych podano w opisie do Ryc. 2.

Zbadanie kolejności nukleotydów regionów V i J, zarówno łańcuchów lekkich jak i ciężkich ujawniło występowanie dwóch charakterystycznych sekwencji DNA w ich sąsiedztwie, w pobliżu miejsca gdzie zachodzi rekombinacja. Po stronie 3' regionów V znajdują się zawsze heptamer CACAGTG i dalej w niewielkiej odległości nanomer ACAAAAACC względnie niewielkie modyfikacje tych sekwencji (Tabela 1). Z kolei regiony J poprzedzają nanomer GGTTTTTGT i heptamer CACTGTG. Jest rzeczą bardzo charakterystyczną, że nanomery oddzielone są od heptamerów ok. 12 ± 1 lub ok. 23 ± 1 zasadami, co odpowiada jednemu lub dwóm pełnym skrętom helisy DNA. W ten sposób te specyficzne sekwencje są zorientowane prawie w tym samym kierunku w stosunku do osi helisy, bez względu na to, czy wstawki między nimi są jedno- czy dwuskretowe.

Badając te charakterystyczne sekwencje DNA stwierdzono w przypadku segmentów kodujących łańcuchy lekkie, że te które występują przy segmentach J oddzielone są długimi wstawkami, zaś te przy segmentach V, krótkimi. Zwrócili na to uwagę Early et al. (15) i Sakamoto et al. (13) sugerując, że jest to istotne dla rekombinacji związanej z łączeniem segmentów genów immunoglobulinowych. Sformułowali oni regułę $^{12}/_{23}$ nukleotydowych wstawek wraz z hipotezą mechanizmu samej rekombinacji. Hipoteza ta zakłada, że enzym złączający — swoista rekombinaza, składa się z dwóch różnych podjednostek: jedna rozpoznająca heptamer i nanomer rozdzielone krótką wstawką (12 ± 1 par nukleotydów)

Tabela 1

Dwie charakterystyczne sekwencje nukleotydów spotykane w pobliżu miejsc złączeń segmentów V-J i V-D-J (wg 13)

J DNA segmenty	Nanomer	Liczba nukleotydów w wstawce	Heptamer
J _k 1	GGTTTTGT	23	CACTGTG
J _k 2	AGTTTTGT	23	CAGTGTG
J _k 3	GGGTTTTGT	21	CACTGTA
J _k 4	GGTTTTGT	24	CACTGTG
J _k 5	GGTTTTGT	23	CACTGTG
J _λ 1	GGTTTTGC	12	GACATGT
J _H 1	AGTTT TAGT	22	GACTGTG
J _H 2	GGTTTTGT	23	TAGTGTG
J _H 3	ATTTATTGT	23	CAATGTG
J _H 4	GGTTTTGT	22	TATTGTG
sekwencja podstawowa	GGTTTTGT		CACTGTG
V DNA segmenty	Heptamer		Nanomer
Vk21C	CACAGTG	11	ACAAAAACC
Vk21B	CACAGTG	12	ACAAAAACC
VK41	CACAGTG	12	ACATAAACC
VK2	CACAGTG	12	ACATAAACC
V _λ 1	CACAATG	22	TCAAGAACA
V _λ 11	CACAATG	23	ACAAGAACA
V _H 141	CACAGTG	23	ACAAATACC
sekwencja podstawowa	CACAGTG		ACAAAAACC

Dwa bloki konserwatywnych sekwencji: nanomery i heptamery znajdują się w sąsiedztwie 5' końca segmentów J i 3' końca segmentów V. Sekwencje znajdujące się przy obu typach segmentów wykazują duży stopień komplementarności, co może mieć znaczenie przy tworzeniu struktur rekombinacyjnych związanych z ich łączeniem (por. rys. 8).

i druga, rozpoznająca te same sekwencje sygnałowe, ale rozdzielone dłuższą wstawką (21 ± 1 par nukleotydów).

W przypadku DNA kodującego łańcuchy ciężkie zarówno segmenty V_H jak i J_H mają sekwencje sygnałowe rozdzielone wstawkami długimi. Zgodnie więc z regułą $12/23$ nie powinny być one bezpośrednio ze sobą łączone. Tak jest w rzeczywistości — pomiędzy nie wbudowywany jest jeszcze krótki segment kodujący D (od ang. *diversity* — różnorodność), o czym będzie mowa poniżej.

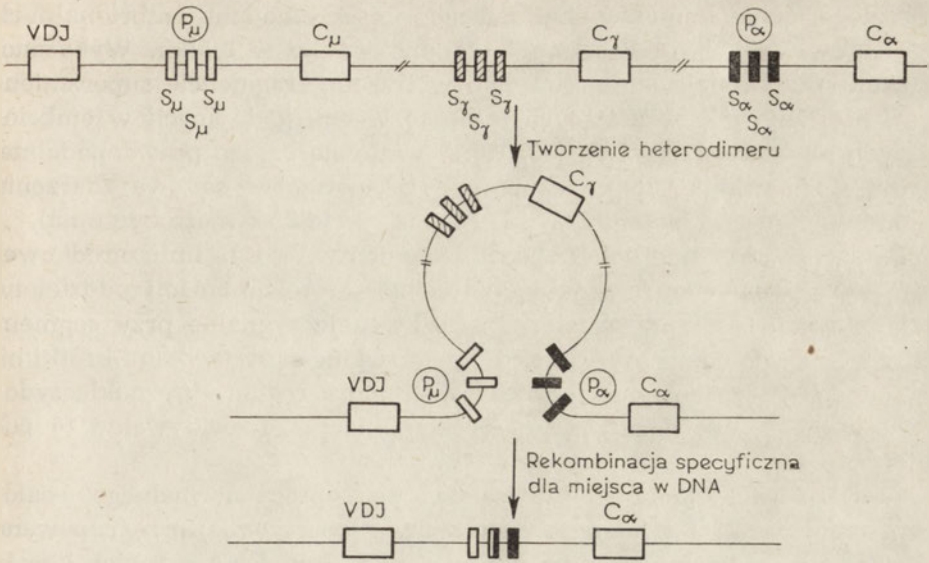
Zmiana klasy immunoglobulin przebiega inaczej aniżeli łączenie regionów VDJ, chociaż i tutaj odgrywają rolę specyficzne sekwencje nukleotydowe. Sekwencje te znajdują się po stronie 5' kolejnych segmentów C_H i są one inne od tych, które uczestniczą w łączeniu segmentów V, D i J. Należy więc sądzić, że przegrupowania segmentów DNA

związane ze zmianami klas zachodzą przy udziale innych białek niż te, które łączą segmenty kodujące części zmienne. Na rycinie 5 podano konkretny przykład zmiany klasy IgM na IgG ilustrujący sposób zachodzenia rekombinacji. W przypadku zmiany klasy IgM na IgA rekombinacja zachodzi w miejscach DNA charakteryzujących się inną sekwencją, co oznacza, że w odcinkach oddzielających poszczególne segmenty C_H istnieją różne sekwencje sygnałne determinujące określone zmiany klas, które najprawdopodobniej rozpoznawane są przez swoiste białka. Złącza genów V, D i J znajdują się w obrębie egzonu VDJ, co powoduje konieczność dosyć dużej precyzji rekombinacji prowadzącej do scalania. W prze-



Ryc. 5. Rekombinacja prowadząca do zmiany klasy immunoglobuliny IgM na IgG linia komórek szpiczakowatych M-141-P-21, (wg 9). Pionową kreską zaznaczono miejsca, w których nastąpiła rekombinacja. Delecja objęła odcinek DNA (pogrubiona linia) zawierający segment C_μ oraz segmenty C_δ - $C_{\gamma 1}$ (nie zaznaczone). Powtarzające się sekwencje, które mogą mieć znaczenie przy rekombinacji zaznaczono ramkami. W przypadku innych zmian klas homologia sekwencji „rekombinacyjnych” może być mniejsza. Jak widać, przy zmianie klasy segmenty VDJ pozostają te same, a więc pozostaje też niezmienniona specyficzność antygenowa wytwarzanej przez daną komórkę immunoglobuliny.

ciwieniu do tego zmiana klasy polega na zastąpieniu egzonów C_μ przez któryś z kolejnych segmentów C_H i a priori może to nastąpić przez rekombinację w dowolnym miejscu odcinka o długości 7,5 kZ oddzielającego segment J_H od egzonów C_μ i w dowolnym miejscu kilku tysięcy zasad po stronie 5' kolejnego segmentu C_H . Sugeruję to, że miejsca, w których zachodzą rekombinacje związane ze zmianą klasy mogą być liczne i rozproszone po całym intronie. Rzeczywiście w intronie pomiędzy J_H i C_μ stwierdzono występowanie trzech sekwencji homologicznych do przedstawionej na rycinie 5. W odcinku DNA po stronie 5' od genu C_α znaleziono aż 17 podobnych do siebie sekwencji 30-to nukleotydowych, które mogą być sygnałami przy zmianie klasy C_μ na C_α , lub zmianie innych klas. Rzeczywiście szczegółowa analiza restrykcyjna DNA różnych klonów komórkowych wytwarzających immunoglobulinę IgA wykazała istotne różnice w intronie oddzielającym segment J od segmentu C_α . Porównanie ich z sekwencjami w innych odcinkach oddzielających od siebie geny C_H wskazuje jednak, że zaobserwowana homologia jest niewystarczająca, aby zapewniała specyficzność rekombinacji. Davis i współpracownicy (16) wysunęli hipotezę, udziału specyficz-



Ryc. 6. Model rekombinacji prowadzącej do zmiany klasy immunoglobuliny. Małe prostokąty symbolizują odcinki DNA rozpoznawane przez białka zaznaczone kółkami, które umożliwiają lub też przeprowadzają rekombinację. Sekwencje nukleotydów w tych odcinkach wskazują, że stopień ich homologii w wielu przypadkach jest niewystarczający, aby wytłumaczyć rekombinację. Postuluje się natomiast, że każda z sekwencji wiąże specyficzne białko. Białka te reagując ze sobą tworzą heterodimer, w obrębie którego zachodzi rekombinacja. Ponieważ przy różnych zmianach klasy immunoglobulin uczestniczą różne sekwencje „rekombinacyjne”, najprawdopodobniej różne są też rozpoznające je białka (wg 5).

nych białek, które rozpoznają określone sekwencje nukleotydowe w DNA i do nich się dołączają. Z kolei te białka reagują z sobą, przez co zbliżają do siebie odpowiednie odcinki DNA umożliwiając zajście rekombinacji w określonym miejscu. Model zmiany klasy proponowany przez tych autorów przedstawiono na rycinie 6. Oczywistym ograniczeniem dowolności miejsc, w których może zajść rekombinacja jest konieczność zapewnienia właściwego scalania pre-mRNA w mRNA, aby mogła prawidłowo przebiegać synteza łańcucha polipeptydowego.

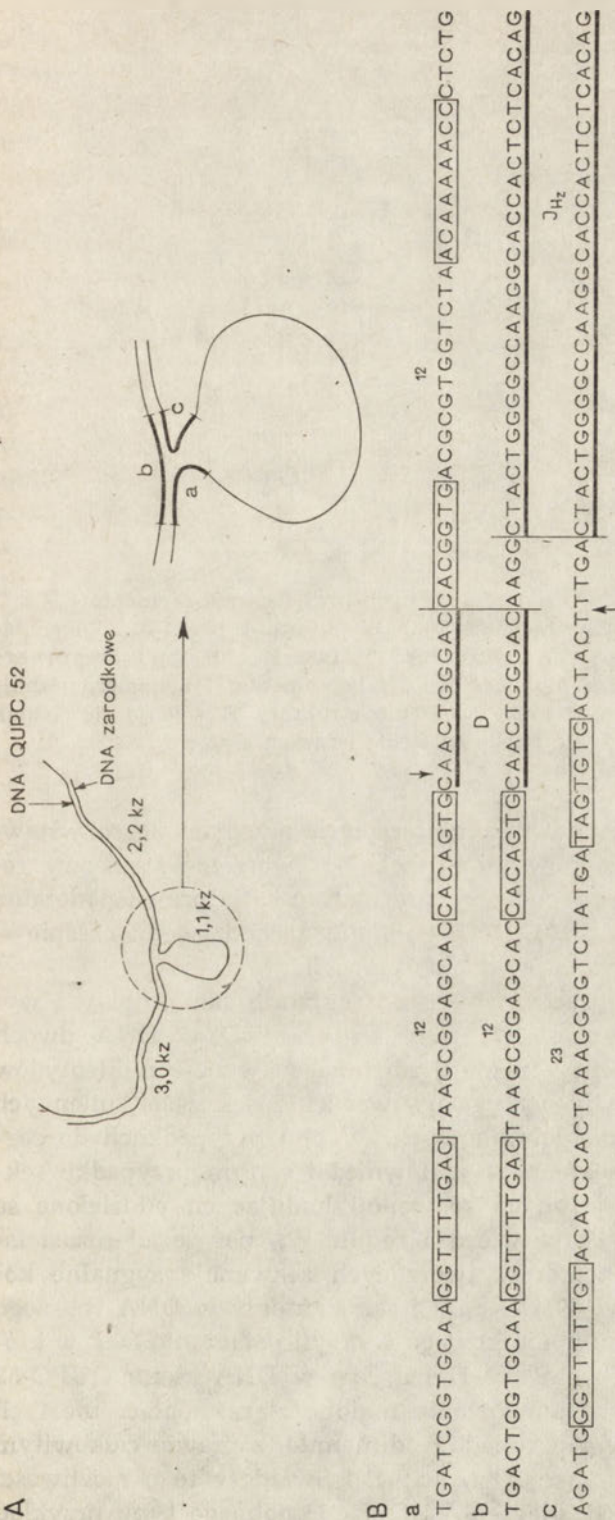
V. Identyfikacja segmentów D w DNA myszy

W przeciwieństwie do genów kodujących łańcuchy lekkie, w których segmenty V_L dołączone są bezpośrednio do segmentów J_L, w przypadku łańcuchów ciężkich sytuacja przedstawia się odmiennie. Jak już wspomniano wyżej pomiędzy segmenty V_H i J_H wbudowany jest jeszcze segment D kodujący zwykle kilka aminokwasów. O istnieniu takiego segmentu wnioskowano na podstawie porównania sekwencji nukleotydów

dojrzałego genu immunoglobulinowego, z sekwencjami embrionalnych segmentów V_H i J_H oraz sekwencji aminokwasów w białku. Wykazano, że krótkie sekwencje aminokwasowe w trzecim fragmencie superzmiennym, nie mają odpowiadających sobie sekwencji kodujących w embrionalnych segmentach V_H i J_H (13, 15). Wydaje się bardzo prawdopodobne, że dla sformowania całego segmentu VDJ potrzebne są dwa zdarzenia rekombinacyjne, tj. łączenie V_H z D i D z J_H (kolejność może być inna).

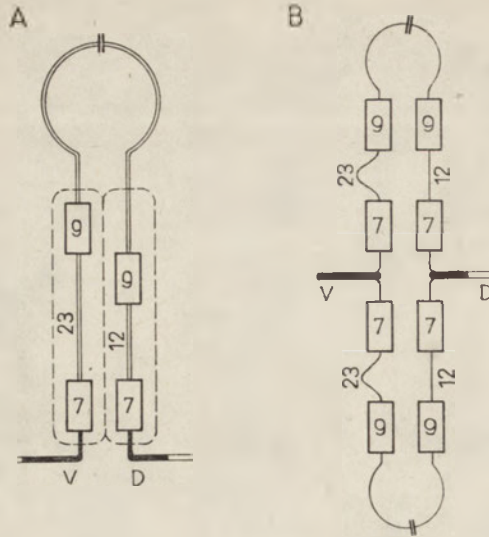
Ponieważ wszystkie dotąd zbadane segmenty V_H i J_H linii zarodkowej mają swoje sekwencje sygnałne potrzebne do rekombinacji oddzielone długimi wstawkami przewidziano, że sekwencje sygnałne przy segmentach D, zarówno od strony V_H jak i J_H oddzielone są wstawkami krótkimi. W ten sposób zachowana zostaje wspomniana reguła $^{12}/_{23}$ nukleotydowych wstawek obowiązująca przy rekombinacji. Przewidywanie to potwierdziło się.

W DNA wielu komórek szpiczakowatych oprócz normalnego, scalonego segmentu VDJ występują niewłaściwie (abortywnie) przegrupowane segmenty J_H w homologicznym chromosomie. Jeśli DNA z takich komórek strawi się określonym enzymem restrykcyjnym i podda elektroforezie, a następnie rozdzielone fragmenty hybryduje z sondą zawierającą sekwencje J_H linii zarodkowej, to obok fragmentów zawierających pełny segment VDJ spotyka się też inne hybrydujące z sondą fragmenty reprezentujące często właśnie abortywnie przemieszczone segmenty J_H . Sakano i wsp. (17) wyodrębnili z DNA komórek linii myelomatycznej QUPC52 fragment 5.2 kb Eco RI hybrydujący z fragmentem 6.2 kb DNA linii zarodkowej noszącym wszystkie cztery segmenty J_H . Stwierdzili w mikroskopie elektronowym, że w fragmencie DNA nowotworowego występują delecje o długości 1.1 kb (ryc. 7). Następnie wyodrębnili przy zastosowaniu odpowiednio dobranych enzymów restrykcyjnych fragmenty DNA stanowiące granice delecji (Ryc. 7B fragmenty a, b i c), w których następnie oznaczyli sekwencje nukleotydów. Zestawienie tych sekwencji (Ryc. 7) uwidoczniało, że w DNA nowotworowym (b) usunięty jest fragment zaczynający się na 5' końcu segmentu J_{H2} , a kończący się w pobliżu odcinka oznaczonego D_{Q52} , który po swojej stronie 5' ma charakterystyczne dla struktury rekombinacyjnej nanomer i heptamer, rozdzielone 12 parami nukleotydów. Co więcej, sekwencjonowanie DNA od strony 3' segmentu D_{Q52} uwidoczniało taką samą strukturę (Ryc. 7B a). Na podstawie tych danych autorzy uważają, że zidentyfikowano jeden z segmentów D, chociaż dotychczas opisane sekwencje aminokwasów w regionie superzmiennym V_{H3} (ten właśnie jest kodowany w części przez segment D) nie zawierają peptydu przewidywanego na podstawie sekwencji nukleotydów D_{Q52} . Należy zwrócić uwagę, że wstawki pomiędzy nano- i heptamerami po obu stronach segmentu D są krótkie — 12-nukleotydowe. Stąd, zgodnie z regułą $^{12}/_{23}$ nukleotydowych wstawek region ten może być dołączany zarówno do segmentów V jak i J, których sek-



Ryc. 7A. Schemat heterodupleksu utworzonego pomiędzy 6 kZ fragmentem EcoRI DNA komórek zarodkowych zawierającym wszystkie cztery segmenty J_H z fragmentem EcoRI 5.2 kZ otrzymanym z DNA szpiczaka QUPC52. W powiększeniu przedstawiona jest okolica pętli z zaznaczonymi odcinkami, których częściową sekwencję podano w części B rysunku.

B. Sekwencje nukleotydów w otoczeniu złącza D-J w DNA klonu myelomny QUPC52 (b) oraz odpowiednio sekwencje w DNA komórek zarodkowych — D (a) i J_{H2} (c). Dla łatwiejszego porównania w rzeczywistości podane są sekwencje komplementarne do (a i c). Charakterystyczne hepta- i nanomery mające znaczenie przy rekombinacji są obramowane. Oddzielone są one od siebie typowymi 12 i 23 nukleotydowymi wstawkami. Sekwencje w a i c składające się na region kodujący w b są podkreślone. Należy zwrócić uwagę na tetranukleotydy AAGG występujący pomiędzy granicami odcinków D i J, który nie ma odpowiednika w sekwencjach zarodkowych — jego pochodzenie nie jest wyjaśnione (wg 9). Strzałki wskazują miejsca połączenia tych samych segmentów D i J znalezionych w DNA klonu limfocytów T B6B1 opisanym przez Kurosawę i wsp. (15). Jak widać prawie cała podkreślona sekwencja D jest usunięta. Trzeba podkreślić, że oba powyższe przykłady reprezentują abortywne połączenia D-J.



Ryc. 8. Typy możliwych struktur rekombinacyjnych przy łączeniu segmentów V z D (identyczne byłyby w przypadku łączenia D-J). Struktura A (wg 15). Białka „łączące” zaznaczono linią przerywaną. Struktura B (wg 19, 20) typu krzyżowego w oparciu o znaczny stopień komplementarności heptamerów i nanomerów znajdujących się przy segmentach V i D. Tworzenie struktury B wydaje się jednak mało prawdopodobne w przypadku daleko od siebie leżących segmentów.

wencje sygnałne dla enzymów rekombinujących przedzielone są wstawkami długimi — 23-nukleotydowymi (Tabela 1). Tworzenie struktury rekombinacyjnej przedstawiono schematycznie na Ryc. 8. Najprawdopodobniej łączenie się segmentów V_H z D i D z J_H nie zachodzi jednocześnie — „montowanie” genu odbywa się w dwóch etapach.

Kurosawa i współpracownicy (18) stosując tę samą, opisaną wyżej technikę, wykryli jeszcze dwa inne segmenty D w DNA dwóch linii limfocytów T. Segmenty te mają zbliżoną sekwencję nukleotydów i kodują peptyd Tyr-Tyr-Gly wykrywany w większości części zmiennych ciężkich łańcuchów immunoglobulinowych. W obu przypadkach do segmentu D dołączony jest segment J_{H3} . Również i w tym przypadku sekwencje sygnałne po obu stronach sekwencji kodujących oddzielone są wstawkami 12 par zasad, co potwierdza regułę $12/23$ par zasad rozdzielających heptamery od nanomerów tworzących sekwencje sygnałne konieczne do rekombinacji V_H -D i D- J_H . Ci sami autorzy w DNA trzeciego badanego przez siebie klonu komórkowego wykryli połączenie D-J, w którym uczestniczą te same segmenty D i J_H , co w DNA klonu QUPC-52 chociaż, jak wykazało sekwencjonowanie regionu złącza, połączenie tych segmentów nastąpiło w tym przypadku odmiennie, z prawie całkowitym usunięciem sekwencji kodującej D (Ryc. 7B). Świadczy to o możliwości somatycznego różnicowania połączeń V_H -D- J_H . Podobnego typu przykład

„elastyczności” połączeń segmentów V i J kodujących łańcuchy lekkie opisano wcześniej (19). Stosując fragmenty DNA zawierające sekwencje D jako sondy, wykryto w DNA komórek zarodkowych dalsze sekwencje do nich homologiczne. Oceniono, że jest ich przynajmniej 10.

VI. Wykluczanie alleli

W przypadku genów immunoglobulinowych, pomimo tego, że w obu homologicznych chromosomach występują identyczne ich segmenty, funkcjonalny gen zostaje „zmontowany” i ulega ekspresji tylko w jednym chromosomie, zaś drugi pozostaje rozproszony lub jest „zmontowany” abortywnie, przez co nie funkcjonuje. Jest to zjawisko tzw. wykluczenia alleli (ang. *allelic exclusion*). Dzięki właśnie takim abortywnym przegrupowaniom udało się zidentyfikować segmenty D, o czym wspominaliśmy wyżej. Abortywne przegrupowanie niefunkcjonalnych genów immunoglobulinowych spotyka się często. Na przykład Coleclough i wsp. (21) stwierdzili takie właśnie przegrupowanie segmentów J_H w 15 na 20 badanych linii komórek transformowanych, w trzech z nich przegrupowania na pewno nie było.

Szereg badaczy przypuszcza, że abortywne przegrupowania mogą być jednym z mechanizmów wyłączania alleli, szczególnie że występują one równie często w komórkach transformowanych jak i normalnych i dotyczą genów kodujących łańcuchy lekkie, co ciężkie. Procesy rekombinacyjne związane z scalaniem segmentów genów immunoglobulinowych mogą czasem przebiegać błędnie (*error prone*) w tym sensie, że w wyniku rekombinacji tworzy się kodon nonsensowny, względnie nie powstaje właściwa sekwencja dla dojrzwania pre-mRNA. Przykłady różnie połączonych tych samych segmentów D i J_H podaliśmy wyżej. Świadczą one o dużej elastyczności enzymów rekombinujących.

VII. Uwagi końcowe

Na wstępie artykułu wspominaliśmy o dwóch hipotezach tłumaczących wielką różnorodność tworzonych przez kręgowce przeciwciał: jedna zakładała odrębne geny dla immunoglobulin wszystkich typów, druga zaś ograniczoną liczbę genów, które w czasie rozwoju i różnicowania mogłyby mutować, co zwiększałoby ich różnorodność.

Wyniki badań ostatnich kilku lat pogodziły z sobą te dwie koncepcje: z jednej strony wykazały, że występuje wiele oddzielnych segmentów kodujących poszczególne fragmenty łańcuchów immunoglobulinowych, a z drugiej, że mogą być one łączone w olbrzymią liczbę kombinacji i że nawet połączenia tych samych segmentów nie zawsze zachodzą w tych

samych miejscach. Cały system jest więc niezwykle elastyczny, co tłumaczy jego „mutacyjność” i niezwykle różnorodność tworzonych przeciwciał.

System immunoglobulinowy jest niezwykle interesujący także z ogólniejszego punktu widzenia, ponieważ ujawnia niektóre mechanizmy zmian genetycznych związanych z różnicowaniem. Trudno w tej chwili powiedzieć, czy mechanizmy te są specyficzne tylko dla tego systemu, czy też mają znaczenie ogólniejsze w procesach rozwoju i różnicowania.

Zaakceptowano do druku 26.03.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Honjo, T., Packman, S., Swan, D., Leder, P. (1976) *Biochemistry*, **15**, 2780—2785.
2. Tonegawa, S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 203—207.
3. Hozumi, N., Tonegawa, S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3628—3632.
4. Brack, C., Tonegawa, S. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5652—5656.
5. Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N., Schuller, R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3518—3522.
6. Brack, C., Hiramata, M., Lenhard-Schuler, R., Tonegawa, S. (1978) *Cell*, **15**, 1—14.
7. Robertson, M. (1981) *Nature (London)*, **290**, 625—627.
8. Honjo, T., Kataoka, T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2140—2144.
9. Corry, S., Adams, J. M. (1980) *Cell*, **19**, 37—51.
10. Corry, S., Jackson, J., Adams, J. M. (1980) *Nature (London)*, **285**, 450—456.
11. Coleclough, C., Cooper, D., Perry, R. P. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1422—1426.
12. Liu, C.-P., Trucker, P. W., Mushinski, J. F., Blattner, F. R. (1980) *Science*, **209**, 1348—1353.
13. Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W., Tonegawa, S. (1980) *Nature (London)*, **286**, 676—683.
14. Molgaard, H. V. (1980) *Nature (London)*, **286**, 257—259.
15. Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L. (1980) *Cell*, **19**, 981—982.
16. Davis, M. M., Kim, S. K., Hood, L. E. (1980) *Science*, **209**, 1360—1365.
17. Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M., Tonegawa, S. (1981) *Nature (London)*, **290**, 562—565.
18. Kurosawa, Y., von Boehmer, H., Haas, W., Sakano, H., Trautner, A., Tonegawa, S. (1981) *Nature (London)*, **290**, 565—570.
19. Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., Tonegawa, S. (1979) *Nature (London)*, **280**, 288—294.
20. Mac, E. E., Seidman, J. G., Leder, J. G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3450—3454.
21. Coleclough, C., Perry, R. P., Karjalainen, K., Weigert, M. (1981) *Nature (London)*, **290**, 373—378.

MACIEJ J. NAŁĘCZ ^{*)}, LECH WOJTCZAK ^{**)}

Ładunek powierzchniowy błon biologicznych i jego funkcje regulacyjne

Surface Charge of Biological Membranes and its Regulatory Functions

Spis treści

- I. Ładunek powierzchniowy błon biologicznych
- II. Budowa podwójnej warstwy jonowej
- III. Potencjał na powierzchni błony
- IV. Metody pomiaru ładunku i potencjału na powierzchni błon
 - IV-1. Elektroforeza
 - IV-2. Pomiary oparte na wiązaniu różnych substancji z błonami
 - IV-3. Pomiary oparte na zmianach właściwości substancji związanych z błonami
- V. Regulacyjny wpływ ładunku powierzchniowego błon na ich funkcje
 - V-1. Transport zjonizowanych substancji przez błonę
 - V-2. Przekazywanie impulsów nerwowych
 - V-3. Aktywność enzymów błonowych
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Surface charge of biological membranes
- II. Structure of the electrical double layer
- III. Membrane surface potential
- IV. Methods for measuring the surface charge and the surface potential of membranes
 - IV-1. Electrophoresis
 - IV-2. Measurements based on binding of some substances to membranes
 - IV-3. Measurements based on changes in characteristics of membrane-bound substances

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

Wykaz stosowanych skrótów: ANS, 8-anilino-1-naftalenosulfonian; CAT₁₂, bromek 4-(dodecylo-dwumetylo-amonio)-1-oksylo-2,2,6,6-czterometylopiperdydy; CPC, chlorek cetylopirydyniowy; CTAB, bromek cetylotrójmetyloamoniowy; EPR, elektronowy rezonans paramagnetyczny; EtBr, bromek etydydy; SDS, sodowy siarczan dodecyli; palmitylo-CoA, tioester kwasu palmitynowego i koenzymu A; TNS, 6-toluidylo-1-naftalenosulfonian.

V. Regulatory effect of the surface charge on some membrane functions**V-1. Transport of ionized substances through membrane****V-2. Transmission of nerve impulses****V-3. Activity of membrane-bound enzymes****VI. Final remarks****I. Ładunek powierzchniowy błon biologicznych**

Błony biologiczne, z uwagi na ich w znacznym stopniu uporządkowaną budowę (zob. np. (1—14)), można traktować pod względem fizycznym jako odrębną fazę w stosunku do otaczającej je cytoplazmy lub cieczy międzykomórkowej. Powierzchnię błony możemy wówczas, z pewnym przybliżeniem, rozpatrywać jako granicę faz. Na granicy błona-środowisko zachodzi zresztą wiele zjawisk fizykochemicznych charakterystycznych dla typowej granicy faz, między innymi niesymetryczne rozmieszczenie ładunków elektrycznych, prowadzące do powstania potencjału elektrycznego na powierzchni. Źródłem asymetrycznego rozmieszczenia ładunków może być zjawisko oddysocjowania jonów a nawet elektronów z jednej fazy i ich asocjacji z fazą sąsiadującą, a także obecność w układzie jonów, których rozpuszczalność lub ruchliwość jest odmienna dla każdej z faz.

W przypadku błon biologicznych głównym mechanizmem powstawania potencjału elektrycznego na powierzchni jest oddysocjowanie protonów przede wszystkim od grup karboksylowych i reszt fosforanowych fosfolipidów i białek błonowych oraz asocjacja protonów ze środowiska do grup aminowych tychże białek i fosfolipidów. Pierwszy z tych procesów pozostawia na błonie niezobojętniony ładunek ujemny, uwalniając do otoczenia ładunek dodatni (protony asocjują z cząsteczkami wody dając jon H_3O^+), podczas gdy drugi proces nadaje błonie ładunek dodatni, pozostawiając w roztworze niezobojętnione jony ujemne. Ponadto w tworzeniu ładunku powierzchniowego błon biologicznych mogą uczestniczyć także inne związki zjonizowane obecne w środowisku i adsorbowane na błonach, np. kwasy tłuszczowe i ich estry z karnityną i koenzymem A, a także jony Mg^{2+} i Ca^{2+} .

Drugi mechanizm tworzenia potencjału powierzchniowego, mianowicie różna rozpuszczalność jonów w obu fazach, ma mniejsze znaczenie w komórce, natomiast bywa wykorzystywany doświadczalnie, zarówno do badania błon biologicznych jak i modelowych błon fosfolipidowych. Stosuje się na przykład lipofilne kationy lub aniony, wykazujące znacznie większą rozpuszczalność w lipidowej warstwie błony niż w otaczającym środowisku wodnym.

Ponieważ wchodzące w skład błon biologicznych fosfolipidy są bądź elektrycznie neutralne (tworzą jony obojętne, jak np. lecytyna), bądź

kwaśne, a białka błonowe z reguły wykazują przewagę grup kwasowych nad zasadowymi (występują tu także wybitnie kwaśne glikoproteiny związane z błoną na zasadzie adhezji), wypadkowy ładunek błon biologicznych jest przy fizjologicznych wartościach pH ujemny. Zmiana pH środowiska powoduje zmianę ładunku powierzchniowego w kierunku wartości mniej ujemnych przy obniżaniu pH (cofanie jonizacji grup kwasowych i zwiększanie stopnia uprotonowania grup aminowych) lub w kierunku wartości bardziej ujemnych przy podwyższaniu pH środowiska (zmniejszenie uprotonowania grup aminowych i podwyższenie stopnia dysocjacji grup kwasowych) (15—20). Punkt izoelektryczny różnych błon naturalnych znajdowano około pH 4 (19, 21—23). *In vitro* ładunek powierzchniowy błony można zmieniać także dodawaniem do zawiesiny błon niewielkich ilości zjonizowanych substancji powierzchniowo czynnych (24—27), kationów dwuwartościowych Mg^{2+} i Ca^{2+} (27—29), przez fosforylację białek błonowych (30) lub przez zmianę składu lipidowego błony (31). W pewnych warunkach ładunek powierzchniowy błony może również podlegać zmianom *in vivo*. Zaobserwowano np., że zmiany w ładunku powierzchniowym błony komórkowej towarzyszą transformacji nowotworowej komórek (32), zmienia się ładunek błon *Chlorella* w czasie cyklu komórkowego (33), jak też zmienia się ładunek powierzchniowy mitochondriów wątroby tworzących megamitochondria pod wpływem kupryzonu (34, 35). Wykazano również, że zmiany ładunku powierzchniowego towarzyszą energizacji błon mitochondriów (36, 37), chloroplastów (38) czy purpurowej błony *Halobacterium halobium* (39). Należy tu dodać, że substancje silnie zmieniające ładunek powierzchniowy błony, jak wolne kwasy tłuszczowe, długołańcuchowe estry koenzymu A czy kationy dwuwartościowe (por. (27)), są obecne w każdej komórce, a ich stężenie może podlegać zmianom. Również kinazy białkowe fosforylujące białka błonowe i tym samym zmieniające ładunek błon (por. (30)) występują w każdej żywej komórce (40). *In vivo* możliwe są także lokalne zmiany pH w pobliżu błon, towarzyszące np. transportowi jonów (H^+ lub OH^-) czy reakcjom oksydoredukcyjnym zachodzącym w komórce. Wydaje się więc wysoce prawdopodobne, że zmiany ładunku powierzchniowego błon mogą w żywych komórkach występować powszechnie, a wypadkowy ładunek błony jest wynikiem szeregu różnych, nakładających się na siebie procesów. Komplikuje to, oczywiście, opisywany system, równocześnie daje jednak podstawę do rozważań nad ewentualnym wpływem regulacyjnym tych zmian na metabolizm komórkowy.

Zanim przejdziemy do wspomnianych możliwości regulacyjnych, zajmijmy się bliżej samą teorią elektrostatycznych oddziaływań na powierzchni błon. Wydaje się to konieczne dla pełniejszego zrozumienia opisywanych zjawisk.

W rozważaniach teoretycznych zakłada się dla uproszczenia, że ładu-

nek powierzchniowy błony jest regularnie rozłożony na całej jej powierzchni (26, 28, 29, 41—46), co nie zawsze ściśle odpowiada rzeczywistości. W przypadku błon chloroplastów uważa się, że ładunek powierzchniowy tworzony jest głównie przez naładowane grupy białek błonowych, pochodzi zatem ze ściśle zlokalizowanych i wyeksponowanych na zewnątrz błony regionów białek integralnych (19, 22, 47). Ponieważ jednak uwzględnienie tych lokalnych oddziaływań elektrostatycznych na powierzchni uniemożliwiłoby matematyczny opis zjawisk, przeważnie pomija się je. Należy jednak pamiętać, że wprowadzając to uproszczenie opisuje się już tylko pewne uśrednione oddziaływania, które nie zawsze pokrywają się z lokalnymi efektami elektrostatycznymi wywołanymi na powierzchni bądź przez konkretne grupy, bądź polarne domeny (zob. np. (48)).

Dla scharakteryzowania uproszczonego pojęcia ładunku powierzchniowego błony używa się wartości średniej gęstości ładunku (σ), wyrażanej w wielkości ładunku elektrycznego przypadającego na jednostkę powierzchni (np. $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ lub C/m^2), bądź też powierzchni (w nm^2) przypadającej na jeden ładunek elementarny.

II. Budowa podwójnej warstwy jonowej

Teoretyczne rozważania elektrostatycznych oddziaływań na powierzchni błon rozpocząć trzeba od scharakteryzowania podwójnej warstwy jonowej tworzącej się na granicy faz błona-środowisko. Dokładne omówienie tych zagadnień znajdzie Czytelnik w bogatej literaturze przeglądowej (np. (28, 29, 41, 42, 44—46, 48—57)), tu zatem ograniczymy się jedynie do skrótowych informacji.

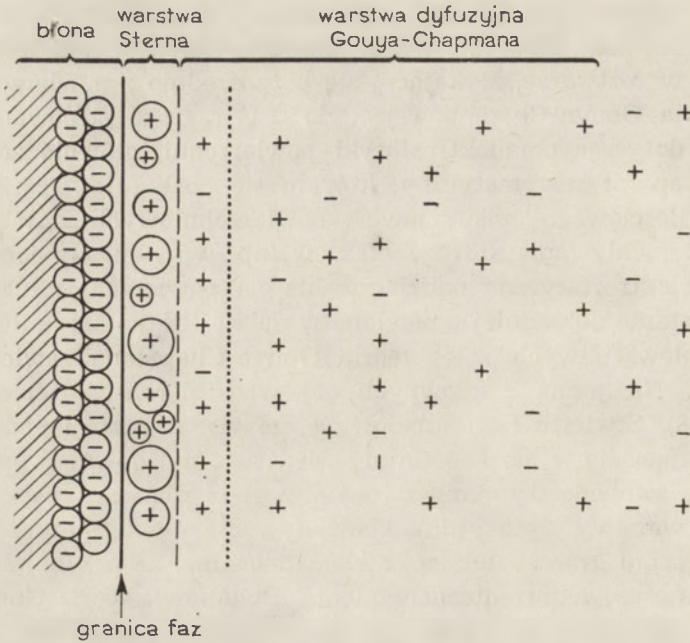
Powierzchniowe grupy polarne błony, posiadające ładunek elektrostatyczny, przyciągają znajdujące się w roztworze wodnym przeciwjony, odpychają zaś jony tego samego znaku. W bezpośrednim sąsiedztwie błony stężenie jonów o znaku przeciwnym do znaku wypadkowego ładunku powierzchniowego błony jest zatem wyższe, co prowadzi do powstania tzw. podwójnej warstwy jonowej. Warstwa ta nie ma określonych granic, lecz „rozmywa się” w głębi roztworu, a jej zakres przestrzenny zależy od temperatury. Stężenie przeciwjonów maleje w miarę oddalania się od granicy faz.

Struktura jonowej warstwy podwójnej była przedmiotem rozważań teoretycznych już od ponad stu lat. Pierwsze propozycje, sformułowane przez Quincke i Helmholtza, zakładały tzw. statyczną budowę warstwy podwójnej. Miała się ona składać z dwóch płaskich warstw przeciwjonów, ściśle związanych ze sobą siłami elektrostatycznymi. Hipotezę tę zmodyfikowali na początku XX w. (niezależnie od siebie) Gouy i Chapman zakładając, że ze względu na ruchliwość termiczną jonów w roztworze nie

tworzą one płaskiej warstwy na powierzchni granicy faz, lecz rozmywają się w głąb roztworu. Powstało w ten sposób pojęcie tzw. jonowej warstwy dyfuzyjnej w roztworze, stykającej się bezpośrednio z powierzchnią fazy stałej. Teoria Gouya-Chapmana jest do dziś szeroko stosowana w rozważaniach dotyczących elektrostatyki powierzchni, głównie ze względu na zwarty aparat matematyczny, którym się posługuje. Teoria ta daje możliwość ilościowego opisu zjawisk powierzchniowych, a także teoretycznego przewidywania szeregu efektów (np. wpływu siły jonowej roztworu na elektrostatyczne oddziaływania na powierzchni) i z tego też względu zostanie dokładniej omówiona w dalszej części artykułu. Jednakże mimo niewątpliwych zalet teoria Gouya-Chapmana zawiera szereg uproszczeń. Na jedną z głównych jej wad pierwszy zwrócił uwagę Stern (58). Stwierdził on mianowicie, że jest nieprawdopodobne, aby jony znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie naładowanej powierzchni miały pełną swobodę wymiany z jonami z głębi roztworu, co zawiera się w pojęciu warstwy dyfuzyjnej. Oddziaływania elektrostatyczne na samej powierzchni granicy faz są bowiem tak silne, że przynajmniej część jonów ulega czasowemu unieruchomieniu. Dodatkowo teoria Gouya-Chapmana traktuje jony jako punktowe ładunki nie posiadające własnych rozmiarów. Uproszczenie takie można stosować w odniesieniu do rozcieńczonego roztworu, gdzie objętość zajmowana przez jony jest znikoma w stosunku do objętości roztworu. Jednakże na powierzchni granicy faz, gdzie jony podlegają znacznemu zagęszczeniu, ich wielkość odgrywa rolę i będzie ograniczać proces zateżniania do granicy odpowiadającej przestrzennemu wysyceniu powierzchni. Uwzględniając te zastrzeżenia, Stern założył, że jonowa warstwa dyfuzyjna nie styka się bezpośrednio z granicą faz lecz jest od niej oddzielona warstwą jonów i dipoli unieruchomionych na powierzchni silnymi oddziaływaniami elektrostatycznymi lub chemicznymi (warstwa ta jest obecnie nazywana warstwą Sterna). Ryc. 1 przedstawia budowę jonowej warstwy podwójnej według Sterna.

Grubości warstwy Sterna nie można ściśle określić. Należałoby tu uwzględnić promienie wolnych jonów i stopień ich uwodnienia. To samo dotyczy grup polarnych na powierzchni błony wraz z uwzględnieniem orientacji przestrzennej tych grup. Dla różnych układów modelowych (np. jednowarstwowej błony lipidowej lub liposomów) przyjmuje się, że warstwa Sterna zajmuje dystans najwyżej kilku angstromów (Å) od powierzchni, podczas gdy warstwa dyfuzyjna może sięgać do kilkuset Å w głąb roztworu (42).

Bardziej złożone są tego typu rozważania w odniesieniu do błon biologicznych. Pominąwszy już uproszczenie traktowania błony biologicznej jak typowej fazy stałej, sama warstwa Sterna może być różnie pojmowana. Przedmiotem dyskusji jest np. zagadnienie białek powierzchniowych. W warunkach fizjologicznych białka te stanowią *de facto* część błony, można je jednak odplukać roztworami o wysokiej sile jonowej (11).



Ryc. 1. Budowa jonowej warstwy podwójnej na granicy faz między fazą stałą i środowiskiem wodnym (według Sterna). Na powierzchni fazy stałej umieszczono, dla uproszczenia, jedynie ładunki ujemne. Linia przerywaną ograniczono warstwę Sterna (w kółkach zaznaczono jony unieruchomione), a linią kropkowaną — warstwę poślizgu.

Powstaje zatem pytanie, czy białka te zaliczać w skład błony, czy też odwrotnie, umieszczać je w warstwie Sterna jako swego rodzaju polijony unieruchomione na powierzchni granicy faz. Ta ostatnia interpretacja prowadzi do wniosku, że warstwa Sterna błon biologicznych może rozciągać się na odległość kilkudziesięciu a nawet kilkuset Å od podwójnej warstwy fosfolipidowej (59, 60). Podobne wątpliwości dotyczą szeregu jonów, które wiążą się z błonami biologicznymi nie tylko na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych, lecz również z powodu chemicznego powinowactwa do składników błony (typowym przykładem mogą być jony Ca^{2+} i Mg^{2+}). Te i podobne pytania wskazują na liczne kłopoty interpretacyjne, z jakimi spotykamy się rozważając elektrostatyczne oddziaływania na powierzchni błon biologicznych. Nie zawsze bowiem teoria, tworzona dla prostych systemów modelowych, daje się łatwo zastosować do znacznie bardziej złożonych układów biologicznych.

W budowie warstwy jonowej wyróżnia się jeszcze tzw. warstwę poślizgu. Jest to wyróżnienie bardziej praktyczne niż teoretyczne i służy do określenia tej części warstwy dyfuzyjnej, która porusza się względem ośrodka wraz z poruszającą się błoną (np. przy elektroforezie swobodnej). Warstwa poślizgu zawiera w sobie warstwę Sterna i być może przylegającą

do niej część warstwy dyfuzyjnej, związaną z błoną oddziaływaniami międzycząsteczkowymi. O położeniu warstwy poślizgu decyduje szorstkość powierzchni bądź lokalna stała dielektryczna (61, 62).

III. Potencjał na powierzchni błony

Potencjałem na powierzchni błony, ψ_s , zwanym często nieściśle potencjałem powierzchniowym, określa się wartość całkowitego spadku potencjału między powierzchnią błony a wewnątrz otaczającego środowiska. Traktując jony znajdujące się w roztworze jako punktowe ładunki elektryczne i przyjmując, że ich stężenie przy błonie uzależnione jest jedynie od oddziaływań elektrostatycznych z powierzchnią, stężenie to (c_1) można wyrazić wzorem Boltzmanna:

$$(1) \quad c_1 = c_0 \exp \frac{-zF\psi_s}{RT}$$

gdzie c_0 oznacza stężenie jonu w roztworze, F — stałą Faradaya ($23\,063 \text{ cal} \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), z — wartościowość jonu („+” lub „-”), R — stałą gazową ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{°K}^{-1}$), T — temperaturę bezwzględną, a ψ_s oznacza potencjał na powierzchni błony. Określenia „exp” używa się dla wygodniejszego zapisu e (podstawa logarytmu naturalnego) podniesionej do potęgi opisanej w dalszej części równania.

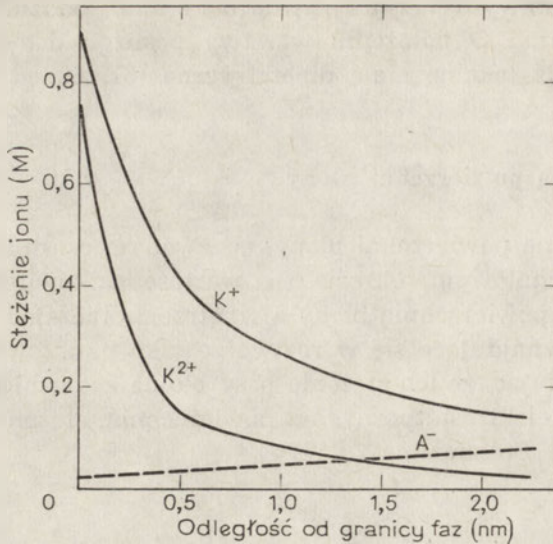
Przekształcając to równanie możemy uzyskać wzór opisujący potencjał na powierzchni błony:

$$(2) \quad \psi_s = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_0}{c_1}$$

Ponieważ jest to zarazem wzór analogiczny do znanego z elektrochemii wzoru Nernsta, więc i całkowity potencjał na powierzchni błony zwany jest niekiedy powierzchniowym potencjałem Nernsta. Przyjmuje się, że obejmuje on całą podwójną warstwę jonową.

Rozkład potencjału w warstwie dyfuzyjnej opisuje wspomniana już teoria Gouya-Chapmana. Zakłada ona, że stężenie jonów w dowolnym punkcie w pobliżu błony jest wypadkową z jednej strony zateżnienia przeciwnonów lub odpychania jonów o tym samym znaku co ładunek błony (zgodnie ze wzorem 1), z drugiej zaś strony dyfuzji tychże jonów, dążącej do wyrównania stężeń przy błonie ze stężeniem w głębi roztworu. Nie wdając się w matematyczny opis zjawiska, przedstawimy tu przykładowo (Ryc. 2) rozkład stężeń jednowartościowych anionów oraz jedno- i dwuwartościowych kationów w pobliżu błony o określonym ujemnym ładunku powierzchniowym.

W teorii Gouya-Chapmana zależność między gęstością ładunku powierzchniowego (σ) fazy stałej (w naszym przypadku błony) a wielkością potencjału na powierzchni granicy faz (ψ_0) wyraża następujący wzór:



Ryc. 2. Rozkład stężeń jednowartościowych anionów oraz jedno- i dwuwartościowych kationów w pobliżu błony o ujemnym ładunku powierzchniowym. Rozkład wyliczono na podstawie teorii Gouya-Chapmana, zakładając, że powierzchnia posiada wypadkowy ładunek o gęstości $\sigma = -0.05 \text{ C/m}^2$, a środowiskiem jest roztwór symetrycznego elektrolitu, odpowiednio $100 \text{ mM K}^+\text{A}^-$ lub $9 \text{ mM K}^{2+}\text{A}^{2-}$. Stężenia A^{2-} są tak małe, że pominięto je na rysunku.

$$(3) \quad \sigma = \pm \left| 2RT\epsilon_0\epsilon_r \sum_n c_{n_0} \left[\exp\left(\frac{-z_n F\psi_0}{RT}\right) - 1 \right] \right|^{-\frac{1}{2}}$$

gdzie ϵ_0 oznacza przenikalność elektryczną (absolutną stałą dielektryczną) próżni, ϵ_r — względną stałą dielektryczną ośrodka ciekłego, c_n jest stężeniem jonu n w środowisku, a z_n jego wartościowością. Pozostałe symbole zostały objaśnione przy wzorze (1) lub mają swoje normalne znaczenie.

Wprowadzenie tego względnie prostego wzoru możliwe było dzięki przyjęciu założenia, że granica faz jest powierzchnią płaską. Założenie to jest praktycznie spełnione, gdy promień krzywizny granicy faz (a więc w naszym przypadku krzywizny błony) jest wielokrotnie (ponad 30-krotnie) większy niż grubość podwójnej warstwy jonowej (50, 54). W przypadku błony plazmatycznej komórek a także błon organelli komórkowych takich jak jądra lub mitochondria warunek ten jest spełniony. Rozwiązanie wzoru wymaga również przyjęcia, że stała dielektryczna roztworu w warstwie przylegającej do błony jest taka sama jak stała dielektryczna wolnego roztworu. Dyskusję tego zagadnienia można znaleźć w pracach Grahame'a (np. 63). Teoria Gouya-Chapmana zakłada ponadto, że jony z fazy ciekłej nie przenikają do fazy stałej, co w odniesieniu do błon biologicznych jest znacznym przybliżeniem. Omówienie tych skomplikowanych układów oraz konieczne poprawki teorii można znaleźć w pracach H a y d o n a (np. 53).

Jeśli środowisko otaczające błonę zawiera elektrolit symetryczny, to jest taki, który dysocjuje na równą ilość jonów o przeciwnym znaku lecz tej samej wartościowości, np. KCl lub $MgSO_4$, równanie (3) upraszcza się do postaci:

$$(4) \quad \sigma = 2(2RT\varepsilon_0\varepsilon_r c_0)^{\frac{1}{2}} \cdot \sinh\left(\frac{zF\psi_0}{2RT}\right)$$

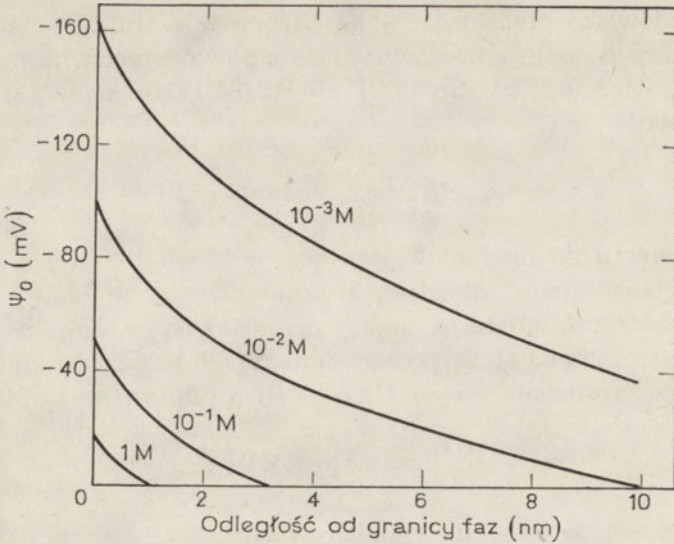
W odniesieniu do błon biologicznych gęstość ładunku jest wielkością niejako „zadaną” przez strukturę i skład chemiczny błony. Interesuje nas zatem zależność odwrotna do tej przedstawionej wzorem (4), a więc jak zmienia się potencjał na powierzchni w zależności od zmian gęstości ładunku. Przekształcenie wzoru (4) daje nam odpowiednie równanie:

$$(5) \quad \psi_0 = \frac{2RT}{zF} \operatorname{arcsinh}[\sigma \cdot (8RT\varepsilon_0\varepsilon_r c_0)^{-\frac{1}{2}}]$$

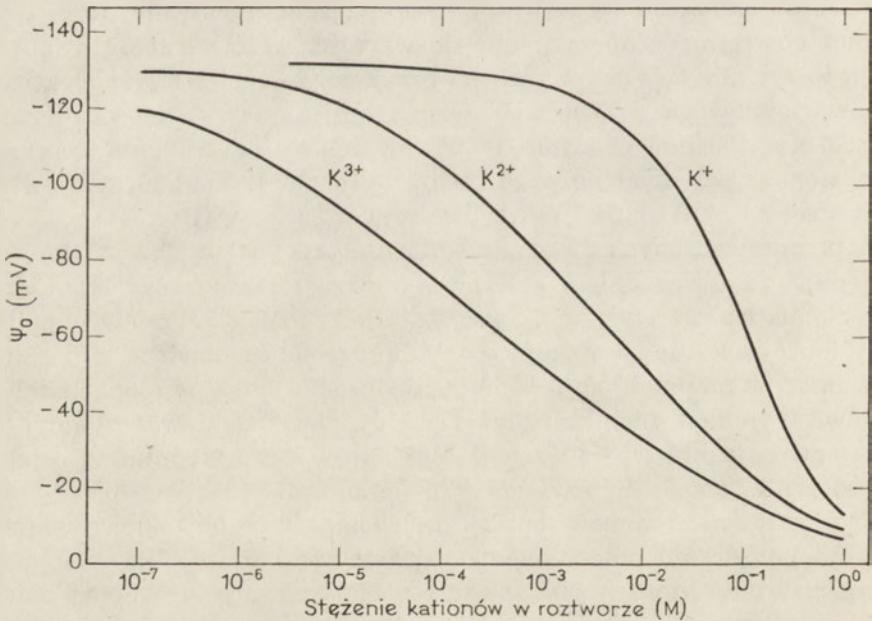
Warto tu dodać, że przy niewielkich wartościach gęstości ładunku powierzchniowego (rzędu $0,01 \text{ C/m}^2$), a więc spotykanych w błonach biologicznych, i przy fizjologicznych stężeniach elektrolitów (do około $0,1 \text{ M}$) funkcja $\operatorname{arc} \sinh$ zbliża się do funkcji liniowej, co umożliwi dalsze przybliżenie znacznie ułatwiające obliczenia. Wynika z tego, że w tych warunkach ψ_0 jest w przybliżeniu proporcjonalne do σ i odwrotnie proporcjonalne do pierwiastka kwadratowego ze stężenia elektrolitu (c_0). ψ_0 jest również odwrotnie proporcjonalne do wartościowości elektrolitu (z). Ilustrują to ryc. 3 i 4. Widać z nich na przykład, że 1 M roztwór elektrolitu jednowartościowego prawie całkowicie znosi potencjał na powierzchni (Ryc. 3) i że 100 mM elektrolit jednowartościowy neutralizuje w tym samym stopniu potencjał na powierzchni co około 10 mM elektrolit dwuwartościowy i około 1 mM elektrolit trójwartościowy (Ryc. 4).

Z przeprowadzonych tu rozważań teoretycznych wynika również, że występuje współzawodnicza zależność w zagęszczaniu różnych kationów przy błonie. Należy więc oczekiwać, że skład jonowy kationów w pobliżu błony może znacznie się różnić od składu w głębi środowiska. Znalazło to potwierdzenie na przykład w pomiarach stężenia jonów w błonach chloroplastów. Wynika z nich, że gdy tylakoidy zawieszano w roztworze zawierającym 10 mM Na^+ i 10 mM Mg^{2+} , to w bezpośrednim sąsiedztwie błon stężenie jonów Mg^{2+} wynosiło około 200 mM (64).

Teoria Gouya-Chapmana opisuje w elegancki sposób budowę warstwy podwójnej i rozkład potencjałów na granicy faz. Przyjmuje ona jednak szereg założeń, które — jak to już podkreślaliśmy — stanowią nieraz znaczne uproszczenie rzeczywistości, zwłaszcza w odniesieniu do układów biologicznych. Mimo to teoria ta zadziwiająco dobrze daje się stosować zarówno do większości układów błon biologicznych jak i modelowych. Najpoważniejszym czynnikiem nie uwzględnianym przez teorię Gouya-Chapmana jest odmienne zachowanie się znacznie zagęszczo-

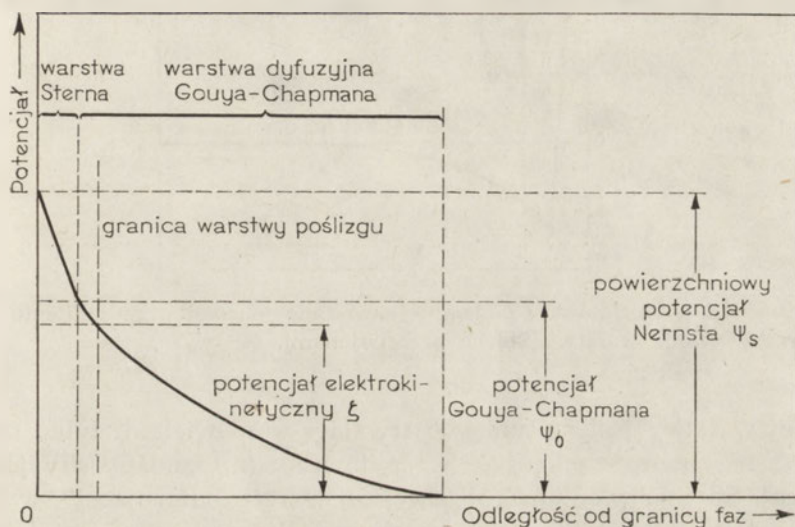


Ryc. 3. Przebieg potencjału w pobliżu granicy faz wg. Gouya-Chapmana, dla środowisk zawierających jednowartościowy symetryczny elektrolit (K^+/A^-) w różnych stężeniach, wahających się od 1 mM do 1 M. Wartości ψ_0 obliczono na podstawie wzoru (5), zakładając, że powierzchnia ma wypadkowy ujemny ładunek o gęstości $\sigma = -0,05 \text{ C/m}^2$.



Ryc. 4. Efektywność kationów jedno-, dwu- i trójwartościowych (symetryczne elektrolity) w zmniejszaniu potencjału ψ_0 . Obliczenia wykonano na podstawie wzoru (5) przy założeniu średniej gęstości powierzchniowej ładunku równej $-0,025 \text{ C/m}^2$ oraz stałej obecności w roztworze 5 mM symetrycznego elektrolitu jednowartościowego.

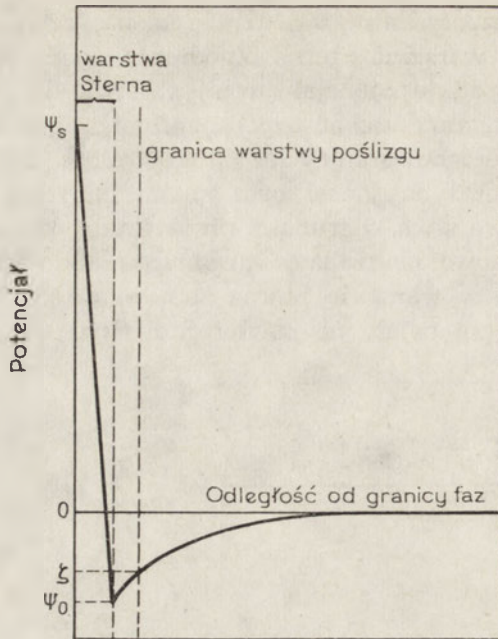
nych jonów w bezpośrednim sąsiedztwie błony, czyli we wspomnianej już w rozdziale II warstwie Sterna. Zgodnie z oryginalnymi założeniami Sterna (58), o spadku potencjału w tej warstwie decydują siły elektrostatycznego przyciągania oraz adsorpcji nagromadzające pewną ilość przeciwjonów na powierzchni granicy faz, która to ilość jest dodatkowo ograniczona rozmiarami tych jonów oraz siłami odpychania między nimi. Tak uformowana warstwa, o grubości nie większej od kilku średnic jonyowych, tylko częściowo neutralizuje graniczny ładunek powierzchniowy. Spadek potencjału w warstwie Sterna stanowi zatem jedynie niewielką część całkowitego potencjału na powierzchni (Ryc. 5).



Ryc. 5. Rozkład potencjałów w podwójnej warstwie jonowej według Sterna.

Z drugiej jednak strony może się zdarzyć, zwłaszcza w przypadku powierzchni o niewielkiej gęstości ładunku, że silna adsorpcja przeciwjonów całkowicie zneutralizuje ten ładunek a nawet nada mu odwrotny znak. Zjawisko takie zwane jest przeładowaniem powierzchni przeciwjonami (49, 63). Przebieg potencjału w tak utworzonej warstwie podwójnej przedstawia Ryc. 6. Należy tu jeszcze zaznaczyć, że przy powyższych założeniach nie obowiązuje wzór Nernsta opisujący całkowity potencjał na powierzchni ψ_s , gdyż stężenie jonów przy błonie (c_i) nie zależy wówczas wyłącznie od oddziaływań elektrostatycznych, lecz także od chemisorpcji.

Rozważania dotyczące potencjału warstwy Sterna mogą ulec dalszym modyfikacjom, gdy przedmiotem opisu staje się błona biologiczna. Zależy to również od przyjętej koncepcji budowy warstwy unieruchomionej. I tak np. autorzy traktujący warstwę Sterna jako „płaszcz” białkowojonowy o dość dużej grubości (59, 60, 65) uważają, że struktura tak ufor-



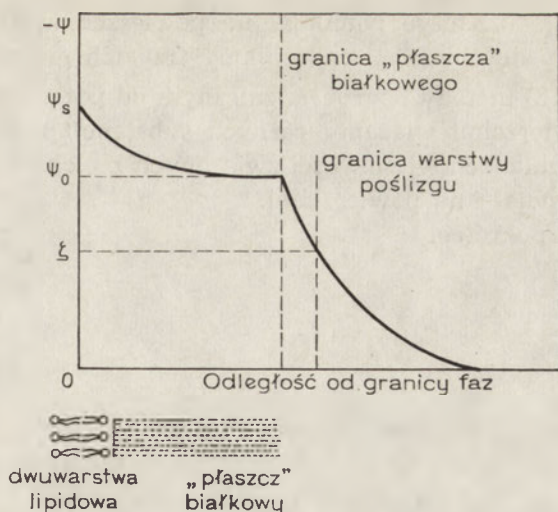
Ryc. 6. Rozkład potencjałów w podwójnej warstwie jonowej przy założeniu możliwości przeladowania warstwy Sterna przeciwjonami.

owanej warstwy jest stosunkowo trwała i w niewielkim tylko stopniu wrażliwa na zmiany zachodzące w środowisku (np. zmiany siły jonowej roztworu). Spełnia więc ona rolę swoistej „strefy buforującej”, w której spadek potencjału jest niewielki i w pewnym przybliżeniu niezależny od składu roztworu (Ryc. 7). Przyjęcie tego rozumowania skłania w zasadzie do wniosku, że znaczące zmiany oddziaływań elektrostatycznych błona-środowisko zachodzą głównie na powierzchni warstwy Sterna, a nie w bezpośrednim sąsiedztwie lipidowej dwuwarstwy.

Pełny opis rozkładu potencjału w pobliżu błony wymaga jeszcze krótkiego omówienia potencjału elektrokinetycznego ζ (Ryc. 5), czyli potencjału na granicy warstwy poślizgu (patrz rozdział II). Ma on znaczenie praktyczne, ponieważ daje się wyliczyć z pomiaru ruchliwości elektroforetycznej komórek, organelli lub fragmentów błon, zgodnie z równaniem Smoluchowskiego:

$$(5) \quad \zeta = \frac{\eta \mu}{\epsilon_0 \epsilon_r}$$

gdzie η oznacza lepkość roztworu, a μ — ruchliwość elektroforetyczną, definiowaną jako prędkość elektroforezy w polu o jednostkowym natężeniu ($\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ponadto przyjmuje się, że wartości η i ϵ_r w warstwie podwójnej są takie same jak w głębi roztworu i że przyłożone



Ryc. 7. Rozkład potencjałów w podwójnej warstwie jonowej utworzonej na powierzchni błony biologicznej. Według Dołowego (60).

pole elektryczne nie zmienia rozmieszczenia jonów w warstwie dyfuzyjnej. Dla cząstek o promieniu porównywalnym z grubością warstwy dyfuzyjnej stosuje się skomplikowany wzór Henry'ego, który w krańcowym przypadku (promień krzywizny cząstki znikomo mały w stosunku do grubości warstwy dyfuzyjnej) przybiera postać:

$$(6) \quad \zeta = \frac{3\eta\mu}{2\epsilon_0\epsilon_r}$$

Ponieważ przyjmuje się, że warstwa poślizgu ma bardzo małą grubość w stosunku do warstwy dyfuzyjnej (por. ryc. 5), można zatem z pewnym uproszczeniem przyjąć, że wartość potencjału elektrokinetycznego (ζ) niewiele różni się od wartości potencjału warstwy dyfuzyjnej (ψ_0), co po zastąpieniu ψ_0 przez ζ we wzorze (3), pozwala na wyliczenie średniej gęstości ładunku powierzchniowego (σ) zgodnie z teorią Gouya-Chapmana.

IV. Metody pomiaru ładunku i potencjału na powierzchni błon

Gęstość ładunku powierzchniowego niektórych modelowych błon fosfolipidowych o znanym składzie, a stąd i wartości potencjału na powierzchni, można wyliczyć, jeśli znamy stopień dysocjacji grup kwasowych i zasadowych oraz przestrzeń zajmowaną na powierzchni przez polarne grupy poszczególnych fosfolipidów (patrz np. (66—68)). Nie jest to jednak możliwe w przypadku błon biologicznych i bardziej złożonych układów modelowych. Stosujemy wówczas metody pomiarowe, które po-

średnio pozwalają oznaczyć potencjał na powierzchni. W zależności od zasady, na jakiej się opierają, wyróżniamy trzy ich grupy. Są to:

1) elektroforeza, 2) metody oparte na zależnym od potencjału lub gęstości ładunku na powierzchni wiązaniu różnych substancji z błonami, 3) metody oparte na zmianach właściwości związanych z błoną substancji w zależności od potencjału na powierzchni.

Omówimy je tu pokrótce.

IV-1. Elektroforeza

Podstawy teoretyczne elektroforezy błon zostały już omówione w rozdziale III. Metoda ta ma długą tradycję, gdyż zaczęto ją stosować już w końcu ubiegłego stulecia. Zarówno więc sama technika jak i używana aparatura były wielokrotnie modyfikowane i doskonalone. Najczęściej stosuje się elektroforezę błon (fragmentów błon, całych komórek lub izolowanych organelli wewnątrzkomórkowych) swobodnie zawieszonych w roztworze elektrolitu. Jest to więc tzw. elektroforeza swobodna. Pomiar szybkości poruszania się cząstek może przy tym polegać na obserwacji przesuwania się zmętnienia zawiesiny (służą do tego aparaty podobne do stosowanych w swobodnej elektroforezie białek), bądź na zbieraniu frakcji i analizowaniu ich metodami fizycznymi i chemicznymi, bądź wreszcie na obserwacji przy pomocy mikroskopu ruchów pojedynczych cząstek; jest to tzw. mikroelektroforeza. Nowoczesna aparatura do mikroelektroforezy odznacza się znacznym stopniem automatyzacji, co pozwala na zmierzenie w krótkim czasie ruchliwości elektroforetycznej dużej liczby cząstek i statystyczne opracowanie wyników. Elektroforeza swobodna błon znajduje obecnie szerokie zastosowanie, zarówno w badaniach podstawowych (17—23, 68—70), jak do preparatywnego izolowania komórek i organelli komórkowych (62, 71, 72), jak wreszcie w diagnostyce klinicznej (62, 73).

Należy jednak pamiętać, że metoda ta ma szereg niedogodności. Najważniejszą z nich jest to, że ruchliwość elektroforetyczna odzwierciedla wielkość potencjału na powierzchni warstwy poślizgu (potencjał elektrokinetyczny, ζ), który z zasady jest niższy (w wartościach bezwzględnych) niż faktyczny potencjał na powierzchni błony, ψ_s . Różnica między potencjałami ζ i ψ_s jest tym większa, im niższe stężenie elektrolitu otaczającego, co stwarza konieczność starannego doboru warunków prowadzenia pomiarów (29, 61, 62, 74). Obliczenia komplikują się również dla cząstek bardzo małych (gdy ich średnica staje się porównywalna z grubością warstwy dyfuzyjnej) oraz gdy kształt cząstki znacznie odbiega od kulistego. Konieczne jest wówczas wprowadzenie dodatkowych poprawek do matematycznego opisu zjawiska (74—76).

IV-2. Metody oparte na wiązaniu różnych substancji z błonami

Substancje amfifilowe, to jest posiadające w obrębie cząsteczki grupy polarne (hydrofilowe) i część apolarną (hydrofobową), wykazują tendencję do wiązania się z błonami biologicznymi i modelowymi. Jeśli część polarna jest ponadto zjonizowana, wiązanie do błony zależeć będzie od ładunku powierzchniowego błony. Na „sondy” ładunku powierzchniowego nadają się takie związki amfifilowe, których wiązanie do błony daje się stosunkowo łatwo i szybko zmierzyć. Stosowane tu bywają najczęściej bądź substancje fluoryzujące, których wydajność fluorescencji lub widmo zmienia się zasadniczo w zależności od tego, czy związek znajduje się w wodzie, czy też w środowisku apolarnym (77—80), bądź też związki paramagnetyczne, których sygnał EPR ma inną charakterystykę w zależności od polarności otaczającego środowiska (36, 38, 81, 82).

Wspólną cechą tych metod pomiarowych jest to, że nie dają one wartości bezwzględnego ładunku czy potencjału na powierzchni, jak metody elektroforetyczne lub omówiona w następnym podrozdziale metoda z użyciem wskaźnika pH, lecz jedynie pozwalają obliczyć zmiany tych wielkości pod wpływem określonych czynników. Niemniej dzięki prostocie stosowania (zwłaszcza w odniesieniu do sond fluorescencyjnych) znajdują szerokie zastosowanie i zostały wyczerpująco omówione w literaturze doświadczalnej i przeglądowej (24, 25, 36, 38, 39, 77—85).

Jako sondy fluorescencyjne stosuje się najczęściej znaczniki anionowe: ANS i TNS, oraz znacznik kationowy, EtBr. Związki te cechuje przesunięcie maksimum widma emisji i znaczne zwiększenie wydajności kwantowej fluorescencji przy przejściu z fazy wodnej do fazy apolarnej (np. błony). Przy odpowiednim doborze długości fali fluorescencję w środowisku wodnym można pominąć jako bliską zero, wobec czego cała mierzona emisja światła odpowiada ilości sondy związanej z błoną. Mierzając intensywność fluorescencji w zależności od stężenia dodanej sondy, łatwo wyliczyć w układzie Lineweavera-Burka lub w układzie Eadie'go-Hofstee'ego stałą powinowactwa (stałą dysocjacji) sondy do błony jak również ilość miejsc wiążących na błonie. Przekształcając odpowiednio wzór Boltzmanna (wzór 1) otrzymujemy równanie pozwalające obliczyć zmianę potencjału na powierzchni ($\Delta\psi_s$) ze stałych powinowactwa sondy (K_d' i K_d'') w dwóch różnych warunkach doświadczalnych (79):

$$(7) \quad \Delta\psi_s = \frac{RT}{zF} \ln \frac{K_d''}{K_d'}$$

Stosowalność tego wzoru została wykazana w przypadku zmian potencjału na powierzchni wywołanych związkami powierzchniowo czynnymi, fosforylacją białek błonowych i zmianą składu lipidowego błony (27, 30, 31, 86, 87). Jednak niektórzy autorzy za miarę zmiany potencjału, a raczej gęstości ładunku powierzchniowego, przyjmują zmianę ilości miejsc wiążących ANS (83).

Jako sondy wykrywane na zasadzie sygnału EPR służą związki o charakterze detergentów, zawierające w łańcuchu hydrofobowym łańcuch o niesparowanym elektronie. W tym przypadku, opierając się na różnicy sygnału EPR, oznaczamy ilość sondy związanej z błoną i wolno rozpuszczonej w środowisku wodnym, z czego oblicza się współczynnik rozdziału sondy między obie fazy (P). Ze zmiany tego współczynnika można obliczyć (analogicznie do wzoru 7) zmianę potencjału na powierzchni (36):

$$(8) \quad \Delta\psi_s = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P'}{P''}$$

Wadą opisanych tu sond fluorescencyjnych jest wysokie powinowactwo ANS i TNS do niektórych białek (88, 89) oraz powinowactwo EtBr do kwasów nukleinowych (77, 90, 91). Ponadto wszystkie sondy (również spinowe), jako zjonizowane związki amfifilowe, same zmieniają gęstość ładunku powierzchniowego błony. Dlatego do pomiaru winny być stosowane w bardzo niskich stężeniach.

IV-3. Pomiary oparte na zmianach właściwości substancji związanych z błonami

Do tej kategorii możemy zaliczyć w zasadzie tylko jedną metodę, opartą na wskaźniku pH ściśle wiążącym się z błoną. Jest nim 4-heptadecylo-umbelliferon (7-hydroksy-4-heptadecylo-kumaryna). Dzięki długiemu łańcuchowi węglowodorowemu związek ten jest praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, natomiast włączony do błony fosfolipidowej zachowuje się jak jej integralny składnik (92, 93).

Zgodnie ze wzorem Boltzmann (wzór 1) w pobliżu negatywnie naładowanej błony zagęszczeniu ulegają wszystkie swobodnie poruszające się w roztworze kationy, w tym również jony wodorowe. Stąd lokalne pH przy błonie (pH_i) będzie miało niższą wartość niż pH w głębi roztworu (pH_o). A zatem pomiar pH tuż przy błonie może nam dać wartość potencjału na powierzchni. Przekształcając odpowiednio wzór Boltzmann otrzymujemy bowiem zależność (66):

$$(9) \quad \text{pH}_i = \text{pH}_o + \frac{F\psi_s}{2,3RT}$$

Stała dysocjacji kwasowej fenolowej grupy 4-heptadecylo-umbelliferonu (pK) wynosi około 6. Jest więc bliska wartości pH, jaka może występować w pobliżu błon przy pH środowiska w pobliżu obojętnego, co sprawia, że stopień dysocjacji tego związku podlega wyraźnym zmianom już przy niewielkich zmianach lokalnego pH. Z drugiej strony niezdysocyjowana i zdysocyjowana forma wskaźnika różnią się wyraźnie intensywnością fluorescencji i położeniem maksimum emisji. Na tej podstawie łatwo oznaczyć stopień zdysojowania sondy włączonej do błony, a stąd

obliczyć lokalne pH i dalej bezwzględny potencjał na powierzchni błony. Metoda ta daje dobre wyniki w odniesieniu do błon modelowych (66, 94). Jej stosowalność do błon biologicznych napotyka jednak na przeszkodę związaną z trudnością wprowadzenia sondy do tych błon.

V. Regulacyjny wpływ ładunku powierzchniowego błon na niektóre ich funkcje

Jak wspomniano już w rozdziale I, wydaje się bardzo prawdopodobne, że zmiany ładunku powierzchniowego błon biologicznych mogą występować *in vivo*. Z drugiej strony zdecydowana większość substancji chemicznych spotykanych w żywym organizmie i oddziałujących z błonami (np. jako związki transportowane przez błonę, będące substratami czy produktami enzymów błonowych lub specyficznie wiążące się z błonami) jest zjonizowana. Lokalne stężenie takich substancji przy błonie zależy zatem od potencjału na powierzchni. Logiczne wydaje się więc przypuszczenie, że zmienna dostępność błony dla związków uczestniczących w procesach transportowych czy reakcjach enzymatycznych będzie tym samym zmieniać kinetykę tych zjawisk.

Omówimy obecnie niektóre funkcje błon, zwracając uwagę na możliwość ich regulacji przez zmiany ładunku (potencjału) na powierzchni struktury błonowej.

V-1. Transport substancji zjonizowanych przez błonę

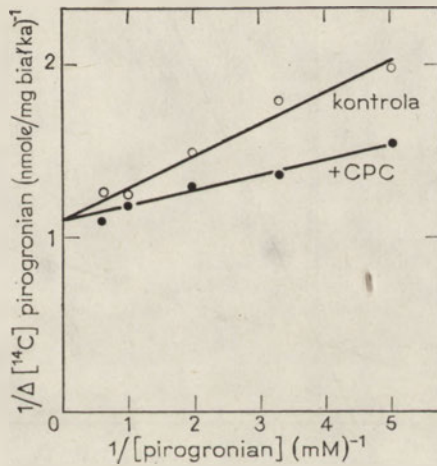
Modelem badań wpływu ładunku powierzchniowego na transport jonów może być sztuczna błona lipidowa. Układy tego typu badane były już od szeregu lat. I tak np. w pracowni van Deenena (95) zaobserwowano, że wypływ radioaktywnego rubidu z liposomów zachodził dość szybko i był jeszcze znacznie stymulowany przez jonofor, walinomycynę, jeśli materiałem, z którego zbudowane zostały liposomy, był fosfatydyloglicerol, a więc fosfolipid kwaśny, warunkujący ujemny ładunek powierzchniowy błony. Natomiast przepuszczalność liposomów dla Rb^+ była prawie całkowicie zniesiona, nawet w obecności walinomycyny, jeśli błonę zbudowano z fosfolipidu zasadowego, lizylofosfatydyloglicerolu, nadającego dodatni ładunek powierzchni. Podobne obserwacje znaleźć można i w innych pracach nad wpływem elektrostatycznych oddziaływań powierzchniowych na przenoszenie jonów rubidu i potasu w obecności walinomycyny (96, 97). Uzyskane dane doświadczalne, jak też ich dobra zgodność z przewidywaniami teorii Gouya-Chapmana (96), w pełni potwierdziły zależność tego transportu od gęstości i znaku ładunku powierzchniowego błony. Podobną zależność stwierdzono zresztą w przy-

padku badań innych układów transportujących jak np. transportu sodu i potasu przez błonę liposomalną w obecności gramicydyny (97), czy transportu potasu w obecności nonaktyny (98). Wyraźną zależność od ładunku powierzchniowego błony stwierdzono też w przypadku wymiany H^+/Mg^{2+} w błonach chloroplastów, badanej z udziałem nigerycyny i specyficznego dla jonów Mg^{2+} jonoforu A23187 (99). Stwierdzono także, że wywołany dodatkiem walinomycyny wpływ jonów K^+ z mitochondriów jest współzawodniczo hamowany dodatkiem zmieniających ładunek powierzchniowy błony jonów Mg^{2+} (100). We wszystkich przypadkach zmianom ulegały mierzone wartości K_m transportu (95—100). Reasumując, można powiedzieć, że transport kationów badany w obecności specyficznych jonoforów, zarówno w błonach liposomalnych jak też w błonach biologicznych, jest stymulowany zmianami ładunku powierzchniowego błon w kierunku wartości bardziej ujemnych oraz współzawodniczo hamowany przez częściową neutralizację ładunku lub jego zmianę w kierunku wartości dodatnich.

Działanie jonoforów jest jednak tylko modelem biologicznych zjawisk transportowych. Nasuwa się więc pytanie, czy obserwowane tu zależności występują również w układach błon naturalnych, nie zawierających dodanych jonoforów. I tak np. opisano współzawodnicze hamowanie transportu jonów K^+ u drożdży przez dodatek do błon kationowych związków o charakterze dwuguanidów (101) oraz, w tym samym materiale, współzawodnicze hamowanie transportu wapnia przez kation etydynowy (102). Stwierdzono też, że lipofilowe kationy CTAB i CPC hamują transport wapnia w mitochondriach (103), a przepuszczalność mitochondriów dla kationów jednowartościowych może być z kolei regulowana zawartością magnezu w błonach, zmieniającą ich ładunek powierzchniowy (104, 105). Z drugiej strony, dodatek długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i ich estrów z koenzymem A, pogłębiających ujemny wypadkowy ładunek błon (por. np. (27)), wyraźnie stymuluje przepuszczalność błon mitochondrialnych dla jednowartościowych kationów (106, 107).

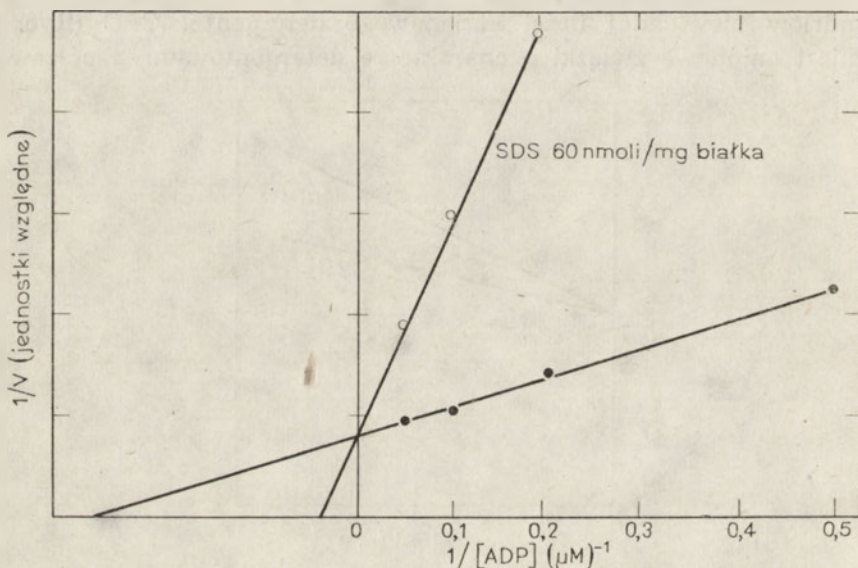
Jeśli transport jonów i zjonizowanych substancji przez błony biologiczne rzeczywiście uzależniony jest od elektrostatycznych oddziaływań na powierzchni błony, należy przypuszczać, że, w przeciwieństwie do wspomnianego wyżej przenoszenia kationów, transport związków o charakterze anionowym będzie współzawodniczo hamowany zmianami ładunku powierzchniowego w kierunku wartości bardziej ujemnych, a stymulowany przez częściową neutralizację ujemnego ładunku błony. I istotnie wykazano tego rodzaju zależności. Zauważono na przykład (108), że transport α -ketoglutaranu do mitochondriów jest współzawodniczo hamowany przez wzrost pH środowiska, któremu, jak wiemy, towarzyszy zmiana ładunku powierzchniowego w kierunku wartości bardziej ujemnych. Odwrotnie, niskie pH środowiska stymuluje proces, obniżając K_m . Taką samą zależność wykryto również w przypadku transportu nieorga-

nicznych anionów przez błony erytrocytów (109). Również wprowadzenie do błon amfifilowych związków powierzchniowo-czynnych, silnie zmieniających ładunek powierzchniowy (por. np. (24—27)), wyraźnie zmienia kinetykę transportu szeregu anionowych substancji w błonach biologicznych. Ciekawe doświadczenia przeprowadzili w tym względzie Mota i wsp. (110). Stosując anionowe lub kationowe pochodne tego samego związku, fenotiotiazyny, wykazali oni, że transport szeregu anionowych metabolitów przez błony erytrocytów króliczych jest współzawodniczo hamowany w obecności pochodnych anionowych, stymulowany zaś w obecności pochodnych kationowych. Interesująca jest też obserwacja, że transport glukozy, a więc substancji niezjonizowanej, nie zmienia się w tych warunkach (110). Zaobserwowano też (111), że transport pirogronianu przez błonę mitochondrialną jest wyraźnie stymulowany (obniżenie mierzonej wartości K_m) pod wpływem dodania do zawiesiny mitochondriów niewielkiej ilości kationowego detergentu, CPC (Ryc. 8). Natomiast anionowe związki o charakterze detergentowym współzawod-



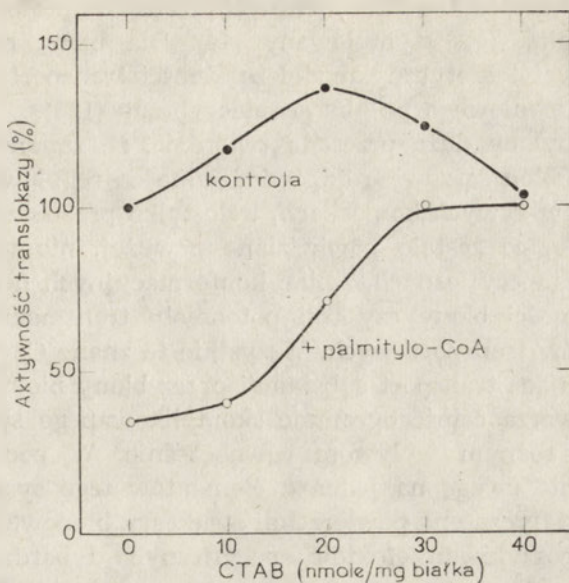
Ryc. 8. Wpływ kationowego detergentu, CPC, na wymianę ($2\text{-}^{14}\text{C}$)pirogronianu-pirogronianu w mitochondriach wątroby szczura. Transport pirogronianu badano przy użyciu techniki szybkiego wirowania przez warstwy. Mitochondria (ok. 10 mg białka/ml) preinkubowano z 1 mM ($2\text{-}^{14}\text{C}$)pirogronianem (ok. 0,1 μCi) w środowisku standardowym (125 mM KCl, 20 mM bufor Tris-HCl, pH 7,4) w obecności antymycyny (5 $\mu\text{g/ml}$) i rotenonu (4 $\mu\text{g/ml}$), w temperaturze 20°C przez 3 min. W próbach traktowanych CPC obecny był również ten związek w ilości 12 nmoli/mg białka. 0,4 ml zawiesiny nakładano następnie na warstwy zawierające kolejno (od góry próbówki): a) 0,4 ml środowiska standardowego + 2,4% dekstran (warstwa płuczająca); b) 0,4 ml środowiska standardowego + 4,8% dekstran + pirogronian w odpowiednim stężeniu (warstwa wymieniająca); c) 0,5 ml oleju silikonowego (Wacker AR200:AR20, 4:2,5); d) 0,2 ml 8% HClO_4 . Natychmiast po nałożeniu zawiesiny mitochondriów próbę odwirowywano (1 min., wirówka UNIPAN). Po wirowaniu odpowiednią objętość kwaśnego ekstraktu pobierano do mieszaniny scyntylacyjnej i liczone. Otrzymane wartości K_m transportu wynosiły: dla kontroli, 0,141 mM; plus CPC, 0,082 mM. Wynik doświadczenia przedstawiono za zgodą Autorów (111).

niczo hamują transport szeregu substancji ujemnie naładowanych do mitochondriów, jak np. fosforanu, jabłczanu, cytrynianu lub nukleotydów adeninowych (112, 113). Zwłaszcza transport ATP i ADP stał się przedmiotem bardziej wnikliwych badań (114, 115). Zaobserwowano, że transport ten jest silnie współzawodniczo hamowany przez palmitylo-CoA. To wyjątkowo silne hamowanie wynika prawdopodobnie nie tylko ze zmian ładunku powierzchniowego błony, ale być może również ze specyficznego wpływu palmitylo-CoA na translokazę nukleotydów adeninowych. Podobieństwo struktury tego estru do struktury ADP może w tym wypadku tłumaczyć współzawodniczy charakter inhibicji (116, 117). Okazało się jednak, że przenoszenie ADP przez błony mitochondrialne może być również współzawodniczo hamowane przez dodatek niewielkich ilości anionowego detergentu, SDS (118) (Ryc. 9). Co więcej, wykazano, że



Ryc. 9. Wpływ SDS na transport ADP do mitochondriów. Wykres w układzie Lineweavera-Burka, według (118).

dodatek kationowego detergentu, CTAB, do zawiesiny mitochondriów znosi hamujący wpływ palmitylo-CoA na translokazę (118) (Ryc. 10). Wiadomo przy tym, że CTAB nie powoduje usunięcia palmitylo-CoA z błony (27, 86). Wytłumaczeniem obserwowanych efektów może być zatem stwierdzenie, że proces przenoszenia nukleotydów adeninowych przez błonę mitochondrialną regulowany jest w znacznym stopniu przez elektrostatyczne oddziaływania na powierzchni błony. Silne odpychanie ujemnie naładowanych cząsteczek ADP przez błonę o pogłębionym obecnością palmitylo-CoA ujemnym ładunku powierzchniowym powoduje zmniejszenie lokalnego stężenia ADP przy błonie (wzór 1) i tym samym



Ryc. 10. Odwracanie przez CTAB hamującego działania palmito-CoA, na transport ADP w mitochondriach. Według (118).

podwyższenie mierzonej wartości K_m transportu. W chwili dodania do układu kationowego detergentu, również lokującego się w błonie (24, 25), wypadkowy ładunek powierzchniowy błony zostaje przesunięty w kierunku wartości mniej ujemnych i obserwowana uprzednio inhibicja zostaje cofnięta.

Podobne do omówionego powyżej działania tioestrów koenzymu A z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi oraz wolnych kwasów tłuszczowych obserwowano też w przypadku szeregu innych procesów transportowych zachodzących w błonach biologicznych (zob. artykuł przeglądowy (107)).

Odrębnym, specyficznym działem badań nad transportem przez błony jest przepuszczalność błon np. mitochondrialnych czy chloroplastowych dla protonów. Zagadnienie to ma duże znaczenie w świetle chemiosmotycznej teorii oksydacyjnej fosforylacji (119, 120). I w tym przypadku wyniki niektórych badań sugerują możliwość regulowania przepływu protonów przez ładunek powierzchniowy błony. Wykazano np., że lipofilowe kationy w rodzaju pierwszorzędowych amin alkilowych (121) lub dwuguanidów (122), a zatem związki lokujące się w błonie i częściowo neutralizujące jej ujemny ładunek powierzchniowy (122), zdecydowanie zmniejszają przepuszczalność błony mitochondrialnej dla protonów i to zarówno w mitochondriach sprzężonych (hamowanie „pompy protonowej”), jak też rozprężonych (hamowanie przenikania H^+ przez błonę w obecności protonoforów). Jeśli jednak ładunek powierzchniowy zmieni

się w kierunku wartości bardziej ujemnych, transport protonów przez błonę mitochondrialną jest stymulowany (44). Dla błony chloroplastowej opracowano nawet teoretyczny model zależności transportu protonów od ładunku powierzchniowego po obu stronach błony (123).

Oczywiście byłoby dużą przesadą twierdzić, że zmiany ładunku powierzchniowego błon są zawsze odpowiedzialne za regulowanie procesów transportowych w żywych komórkach, byle tylko przenoszona substancja była jonowa. To, co zostało powiedziane powyżej, nie neguje bowiem roli oddziaływań specyficznych, zmian konformacyjnych nośników, wpływu zmian płynności błony czy roli potencjału transmembranowego na przebieg procesów transportowych. Wszystkie te znane Czytelnikowi mechanizmy regulujące transport substancji przez błony biologiczne dopiero wzięte razem tworzą całość ogromnie skomplikowanego systemu, podlegającego wielu różnym wpływom równocześnie. W podrozdziale tym zwracamy jedynie uwagę na jeden z elementów tego systemu. Oddziaływania elektrostatyczne na powierzchni struktury błonowej, często pomijane na rzecz poszukiwań efektów specyficznych i bardziej złożonych, mogą jednak w pewnych warunkach znacząco zmieniać badany proces i warto o tym pamiętać.

V-2. Przekazywanie impulsów nerwowych

Rozchodzenie się impulsu elektrycznego wzdłuż błony zachodzi na zasadzie zmiennego transportu jonów sodu i potasu. Przez analogię do omówionych powyżej zagadnień transportowych można zatem przypuszczać, że ładunek powierzchniowy błony może oddziaływać i na ten proces. Istotnie, wykazano np., że przenoszenie impulsu elektrycznego przez izolowane włókna nerwowe żaby uzależnione jest w dużym stopniu od pH środowiska, w którym przeprowadzono pomiar (124). I tak, obniżenie pH z wartości 7,3 do wartości 4,0 (co, jak wiemy, powoduje znaczną neutralizację ujemnego ładunku powierzchniowego błony) powoduje znaczne zahamowanie przenoszenia jonów sodu i potasu przez błonę i w istotny sposób obniża aktywność nerwu. Powrót pH do wartości wyjściowej powoduje cofnięcie hamowania transportu i przywrócenie normalnej aktywności elektrycznej włókna nerwowego. Autorzy przypuszczają przy tym, że wpływ ten jest wynikiem cofnięcia jonizacji określonych ujemnie naładowanych grup na powierzchni błony, uczestniczących w mechanizmie przenoszenia jonów. Byłby to więc przykład na znaczenie regulacyjne lokalnych oddziaływań elektrostatycznych w błonie, choć wpływ zmian ładunku powierzchniowego całej błony nie został w cytowanej pracy wykluczony.

Dysponujemy również obserwacjami sugerującymi wpływ ładunku powierzchniowego na przekazywanie przez błonę impulsów natury che-

micznej. Badano np. wpływ ładunku powierzchniowego błony synapsy nerwowo-mięśniowej w mięśniach szkieletowych na uwalnianie dodatnio naładowanego neurotransmitera, acetylocholino (125). Proces ten był wyraźnie hamowany przez pogłębienie ujemnego ładunku powierzchniowego błony, stymulowany natomiast przez częściową neutralizację ładunku. Prawdopodobnie chodzi tu o zmianę siły elektrostatycznego wiązania acetylocholino przez błony synaptyczne, co może mieć znaczące implikacje fizjologiczne (125). Stwierdzono dalej (126), że również działanie kurary, silnej trucizny będącej mieszaniną alkaloidów specyficjnie blokującą receptory acetylocholinowe w synapsach nerwowo-mięśniowych, jest funkcją ładunku powierzchniowego błony synaptycznej. Pogłębienie ujemnego ładunku tej błony wyraźnie potęgowało działanie kurary, podczas gdy częściowa neutralizacja ładunku zmniejszała porażający wpływ tej trucizny na synapsę. Ponieważ działanie kurary wymaga bezpośredniego kontaktu cząsteczek alkaloidów z błoną, zatem ich lokalne stężenie przy błonie warunkuje rozważany proces. Alkaloidy izocholinolnowe wchodzące w skład kurary mają zdecydowany ładunek dodatni cząsteczek, wobec tego zależność ich stężenia przy błonie od potencjału na powierzchni (wzór 1) może zadowalająco tłumaczyć obserwowany efekt (126).

V-3. Aktywność enzymów błonowych

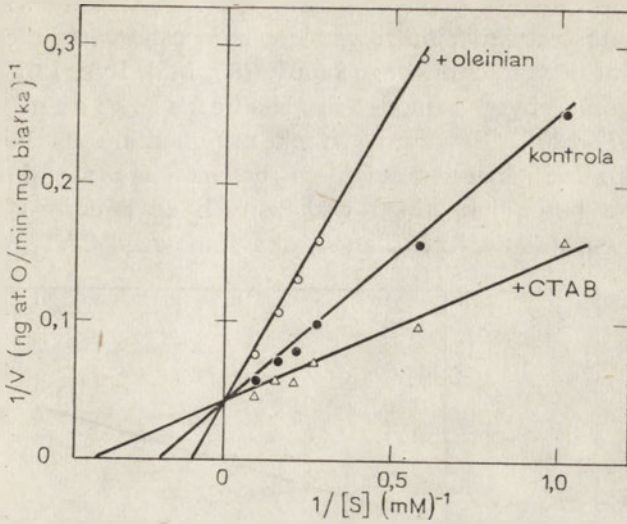
Możliwość elektrycznych oddziaływań między substratem a enzymem znana jest w enzymologii od dawna. Natomiast na rolę podobnych oddziaływań między substratem a otoczeniem enzymu zwróciły uwagę dopiero badania Katchalskiego i współpracowników (127—129). Badacze ci unieruchamiali enzymy proteolityczne na syntetycznych żywnicach o charakterze anionowym lub kationowym. Jako substraty stosowano również syntetyczne oligopeptydy. Stwierdzono, że w takim układzie powinowactwo enzymu wobec substratu zależało zarówno od charakteru jonowego podłoża, na którym osadzony był enzym, jak i oligopeptydu będącego substratem. Zaobserwowana prawidłowość polegała na tym, że unieruchomienie enzymu na podłożu anionowym zwiększało jego powinowactwo do peptydów o przewadze grup dodatnio naładowanych, zmniejszało zaś powinowactwo do substratów o wypadkowej jonizacji ujemnej. Odwrotny efekt obserwowano, gdy ten sam enzym osadzano na podłożu kationowym. Miarą powinowactwa enzymu do substratu była w tych badaniach wartość pozornej (mierzonej) stałej Michaelisa. Charakterystyczną cechą badanych układów było również to, że ładunek elektryczny podłoża nie wpływał znacząco na szybkość maksymalną reakcji przy wysycających stężeniach substratu (V_{max}).

Zaproponowane przez Katchalskiego i współpracowników wytłumaczenie tych efektów opiera się na elektrostatycznym oddziaływaniu mię-

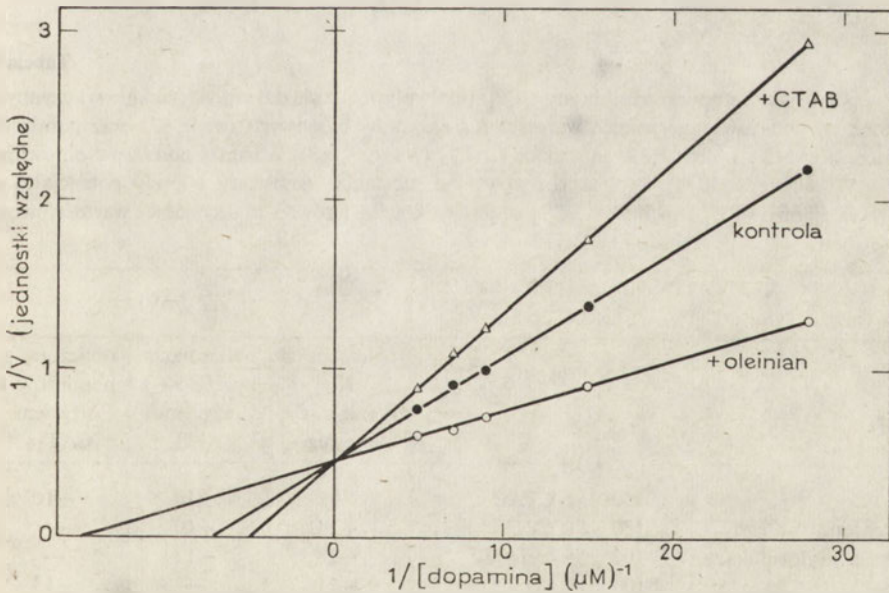
dzy substratem a otoczeniem enzymu, co prowadzi do zmiany lokalnego stężenia substratu w bezpośrednim sąsiedztwie enzymu: zwiększenie stężenia, gdy substrat i podłoże mają przeciwny ładunek i zmniejszenie, gdy ładunki te są równoimienne. A zatem kinetyka reakcji enzymatycznej odzwierciedla stężenia substratu w sąsiedztwie enzymu a nie w całym roztworze. Dlatego przy różnoimiennym ładunku elektrycznym substratu i podłoża, na którym osadzony jest enzym, połowiczne wysycenie enzymu zachodzi przy stężeniu substratu w roztworze niższym niż rzeczywista (prawdziwa) wartość stałej Michaelisa. I odwrotnie, przy ładunkach równoimiennych konieczne jest wyższe stężenie substratu w roztworze, by jego stężenie w sąsiedztwie unieruchomionego enzymu osiągnęło wartość odpowiadającą połowie nasycenia. Stąd zaobserwowane zmiany pozornej stałej Michaelisa. Stosując wzór Boltzmanna (wzór 1) można przewidzieć następującą zależność:

$$(10) \quad K_m(\text{pozorne}) = K_m(\text{prawdziwe}) \exp \frac{zF\psi_s}{RT}$$

O tym, że oddziaływania elektrostatyczne mogą mieć wpływ na aktywność enzymów wbudowanych w błony biologiczne, świadczyły pośrednio obserwacje różnych autorów dotyczące na przykład działania detergentów (24, 25, 130), fosfolipidów (131—135), elektrolitów (136—139) i zmian pH (140—142). Bardziej systematyczne badania w tym kierunku przeprowadzili autorzy niniejszego artykułu zmieniając eksperymentalnie ładunek (a zatem i potencjał) powierzchniowy różnych błon biologicznych i mierząc efekt tych zmian na parametry kinetyczne enzymów błonowych. I tak aktywność enzymów błonowych badano w warunkach, w których potencjał na powierzchni błony zmieniano przez dodanie do zawiesiny błon niewielkich ilości związków powierzchniowo czynnych (27, 86), soli metali dwuwartościowych (27), zmianę pH środowiska (27) lub fosforylację białek błonowych przy pomocy endo- lub egzogennych kinaz białkowych (30, 87). Zaobserwowano, że enzymy reagujące z anionowymi substratami (arylosulfataza, dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu i fosfataza glukozo-6-fosforanu) były współzawodniczo hamowane przez czynniki pogłębiające ujemny ładunek błony i aktywowane przez czynniki zmieniające ten ładunek w kierunku wartości mniej ujemnych. Przykładowy wynik doświadczenia tego typu przedstawia Ryc. 11. W przypadku enzymów reagujących z kationowymi substratami (acetylocholinesteraza, monoamino-oksydaza i oksydaza dwumetyloaniliny) zachodziły zależności odwrotne (Ryc. 12). We wszystkich przypadkach zmianom ulegały wartości pozornej K_m enzymów (27, 30, 86, 87) natomiast V_{max} w zasadzie nie zmieniała się. Co więcej, stwierdzono, że wpływ czynników modyfikujących ładunek powierzchniowy na aktywność badanych enzymów zniknął całkowicie po solubilizacji błony i pojawiał się ponownie po jej zrekonstruowaniu i wbudowaniu do niej enzymu (27, 31, 86, 87, 143, 144). Zaobserwowano

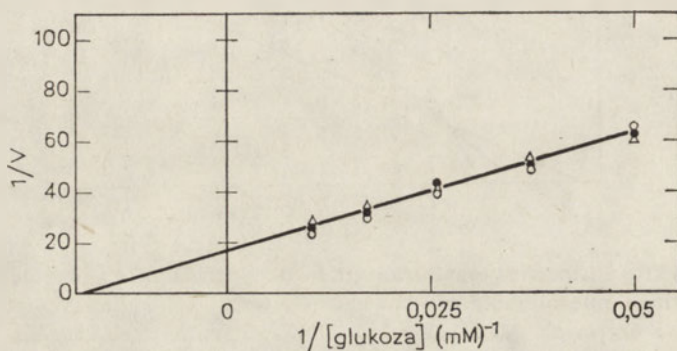


Ryc. 11. Wykres Lineweavera-Burka dla dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanu w mitochondriach mięśni mola woskowego (*Galleria melonella*). Wpływ związków powierzchniowo czynnych. Mierzone wartości K_m enzymu, odnoszące się do D,L-glicero-3-fosforanu, wynosiły: dla kontroli, 6,3 mM; plus oleinian, 13,3 mM; plus CTAB, 3,2 mM. Według (27, 86).



Ryc. 12. Wykres Lineweavera-Burka dla monoaminoooksydazy w mitochondriach wątroby szczura. Wpływ związków powierzchniowo czynnych. Mierzone wartości K_m enzymu wynosiły: dla kontroli, 143 μM ; plus CTAB, 200 μM ; plus oleinian, 69 μM . Według (27, 86).

też, że K_m fosfotransferazy pirofosforan:glukoza mierzone względem glukozy, a więc substratu niezjonizowanego, było całkowicie niewrażliwe na zmiany ładunku powierzchniowego błony ((85, 145), Ryc. 13). Wszystkie te obserwacje zgodne były z modelem Katchalskiego i współpracowników (127—129). Głównym jednak argumentem na korzyść takiej właśnie interpretacji przedstawionych badań stała się duża zgodność wartości zmian potencjału ($\Delta\psi_s$) wyliczonych ze zmiany K_m enzymów i z pomiarów wiązania ANS lub znacznika spinowego CAT_{12} (Tabela 1).



Ryc. 13. Wpływ związków powierzchniowo czynnych na aktywność fosfotransferazy pirofosforan:glukoza. Wykres Lineweavera-Burka, w zależności od rosnących stężeń glukozy. (●), kontrola; (○), plus 80 μM oleinian; (Δ), plus 100 μM CTAB. Szybkość reakcji wyrażono w μmol ach powstającego glukozo-6-fosforanu na minutę i mg białka. Zmierzona wartość K_m wynosiła 60 mM. Według (86).

Tabela 1

Zmiany potencjału na powierzchni błony ($\Delta\psi_s$) pod wpływem związków powierzchniowo czynnych obliczone na podstawie mierzonych wartości K_m enzymów błonowych (wzór 12) oraz pomiarów fluorescencji ANS i widma EPR znacznika CAT_{12} (wzory 7 i 8). Warunki pomiarów omówiono w (86). W obliczeniach przyjęto, że rozpatrywane substancje (substraty i sondy potencjału) są całkowicie zjonizowane, tzn. liczba „z” jest całkowita i równa maksymalnej wartościowości danego jonu.

Materiał błonowy i badany enzym	Dodany związek powierzchniowo czynny	$\Delta\psi_s$ (mV)		
		obliczone z K_m enzymu błonowego	obliczone z pomiarów z użyciem ANS	obliczone z pomiarów z użyciem CAT_{12}
Mikrosomy wątroby szczura, arylosulfataza C	150 μM CTAB	+8	+10	+10
	150 μM CPC	+14	+10	—
	100 μM oleinian	-18	-12	—
	100 μM SDS	-11	—	-13
Mitochondria wątroby szczura, monoamino-oksydaza	69 μM oleinian	-19	-16	—
	71 μM CTAB	+8	+9	+9
	39 μM CPC	+22	+17	—

W tym miejscu wypada zaznaczyć, że wzór 10 na obliczenie pozornej stałej Michaelisa nie może być zastosowany do enzymów błonowych, ponieważ nie znamy w zasadzie wartości rzeczywistej stałej K_m . Przyjmowano wprawdzie (144), że rzeczywistą stałą K_m można by oznaczyć po uwolnieniu enzymu z błony przez jej solubilizację w niejonowym detergencie, lecz założenie takie jest wolne od szeregu zastrzeżeń. Dlatego wzór 10 nadaje się raczej, po prostym przekształceniu, do obliczania zmiany potencjału powierzchniowego ze zmiany pozornej stałej K_m . Jeśli przyjmiemy mianowicie, że potencjałowi ψ'_s odpowiada K'_m (pozorne), a potencjałowi ψ''_s — K''_m (pozorne), przy czym zmianę potencjału na powierzchni oznaczmy jako $\Delta\psi_s = \psi''_s - \psi'_s$, wówczas dzieląc stronami otrzymujemy:

$$(11) \quad \frac{K''_m(\text{pozorne})}{K'_m(\text{pozorne})} = \exp \frac{zF\Delta\psi_s}{RT}$$

a stąd:

$$(12) \quad \Delta\psi_s = \frac{RT}{zF} \ln \frac{K''_m(\text{pozorne})}{K'_m(\text{pozorne})}$$

Właśnie tak obliczone wartości $\Delta\psi_s$ są uwidocznione w Tabl. 1 w porównaniu z wartościami otrzymanymi z pomiarów z użyciem ANS i CAT₁₂.

Zwrócenie uwagi na możliwość oddziaływania na aktywność enzymów przez zmiany potencjału na powierzchni błon rzuca nowe światło na szereg faktów z dziedziny regulacji enzymów błonowych. Pozwala na przykład wytłumaczyć tak zwany efekt solny w aktywności ATP-azy mitochondrialnej, polegający na aktywacji tego enzymu przez sole, np. KCl (146). Możemy przypuszczać, że obecność elektrolitów w wyższych stężeniach obniża potencjał na powierzchni błony mitochondrialnej i dzięki temu zmniejsza odpychanie między anionem ATP i ujemnie naładowaną błoną. Innym przykładem może być współzawodnicze hamowanie aktywności monoaminoksydazy przez kationy dwuwartościowe (147), które częściowo neutralizują ujemny ładunek powierzchniowy zewnętrznej błony mitochondrialnej i tym samym obniżają lokalne stężenie dodatnio naładowanych substratów enzymu. Warto tu również wspomnieć o hamującym wpływie długołańcuchowych amin alkilowych na ATP-azę Na^+/K^+ (148). Związki te wiążąc się z błoną częściowo neutralizują jej ujemny ładunek, co z kolei wpływa na lokalne stężenie kationowego aktywatora enzymu (Na^+ lub K^+). Innym wreszcie przykładem może być regulacja aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanu przez jony Ca^{2+} i Mg^{2+} (aktywacja) oraz długołańcuchowe estry acylowe koenzymu A i długołańcuchowe wolne kwasy tłuszczowe (współzawodnicza inhibicja) (149—154). Substancje te były początkowo traktowane jako specyficzne modulatory aktywności enzymu, okazało się jednak, że dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanu może być z równym powodzeniem aktywowana przez dodatek kationowych detergentów do zawiesiny mito-

chondriów (Ryc. 11), a hamowana np. przez SDS (27, 86). Co więcej, kationowy detergent, CTAB, znosił hamujące działanie palmitoylo-CoA i to w ilości dokładnie stechiometrycznej (27, 86). Wydaje się więc, że opisywane tu efekty z powodzeniem wytłumaczyć można w oparciu o elektrostatyczne oddziaływanie między błoną a substratem enzymu, bez konieczności odwoływania się do oddziaływań specyficznych z enzymem.

Nowego aspektu nabiera również znaczenie składu fosfolipidowego błony w regulowaniu aktywności enzymów błonowych. Wpływ ten interpretowano na ogół bądź jako oddziaływanie bezpośrednie, polegające na tworzeniu specyficznych, funkcjonalnych kompleksów enzym-lipid, bądź pośrednie, sprowadzane do zmian płynności błony, mogących z kolei zmniejszać aktywność enzymów błonowych (zob. np. artykuły przeglądowe (155, 156)). W ostatnich latach zwrócono jednak uwagę na możliwą rolę oddziaływań elektrostatycznych w regulowaniu aktywności enzymatycznych przez lipidy (31, 131—135). Wykazano na przykład (31), że zmiany ładunku powierzchniowego błon spowodowane ich różnym składem lipidowym wywołują zmiany w kinetyce enzymów błonowych dające się przewidzieć na podstawie omówionych rozważań (wzory 10—12). Oznacza to, że skład lipidowy błony, w szczególności zaś zawartość fosfolipidów kwaśnych, może oddziaływać na kinetykę enzymów błonowych za pośrednictwem potencjału elektrycznego na powierzchni. Oczywiście nie wyklucza to innych, specyficznych oddziaływań lipidów na enzymy.

Podaliśmy tu przykłady regulowania przez potencjał i ładunek powierzchniowy błony aktywności enzymów błonowych na zasadzie zmieniania lokalnego stężenia substratu bądź aktywatora enzymu. Warto również wspomnieć, że podobnie może być zmieniane lokalne stężenie inhibitora, o ile jest on związkiem zjonizowanym lub zawiera obciążone ładunkiem elektrycznym ugrupowanie oddziałujące z enzymem. Wydaje się (143), że na tej zasadzie potencjał na powierzchni błony mitochondrialnej wpływa na aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy NADH, regulując lokalne stężenie produktu, NAD^+ , będącego zarazem inhibitorem reakcji.

Na podstawie przedstawionych tu danych i przytoczonych prac można z dużym prawdopodobieństwem sądzić, że ładunek powierzchniowy błon biologicznych w istocie wpływa na aktywność enzymów błonowych. Dla pełniejszego opisu tego zagadnienia trzeba jednak dodać, że omawiany dotychczas model Katchalskiego i współpracowników (127—129) nie zawsze znajduje zastosowanie w rozważaniach obserwowanych zmian kinetycznych. Odnosi się on bowiem jedynie do enzymów mających stosunkowo prostą kinetykę, podlegającą opisowi Michaelisa-Menten. Zawiera też szereg uproszczeń, jak np. założenie równomiernego rozmieszczenia ładunku powierzchniowego, czy braku specyficznego powinowactwa substratu (produktu) badanej reakcji do błony, co nie zawsze jest prawdą. Często natomiast przedmiotem badań nad wpływem elektrosta-

tycznych oddziaływań na kinetykę procesu katalizowanego w błonie stają się skomplikowane błonowe kompleksy enzymatyczne (np. fotosystemy I i II w chloroplastach (157—160), łańcuch oddechowy w mitochondriach (24, 25)) lub enzymy wykazujące złożoną kinetykę o cechach allosteryczności (161, 162). Konieczność uwzględniania w takich wypadkach oddziaływań lokalnych lub sformułowania nowego opisu matematycznego obserwowanych zmian (często dotyczących procesów o charakterze dodatniej lub ujemnej kooperacji) znacznie komplikuje interpretację wyników (162, 163). Przyjęcie opisu uwzględniającego rolę lokalnych oddziaływań elektrostatycznych (np. między substratem i bezpośrednim otoczeniem centrum aktywnego (161, 164)) może też prowadzić do wniosku, że regulacjom „elektrostatycznym” podlegać mogą również enzymy rozpuszczalne (165). Nie mówi się wówczas o ładunku struktury otaczającej enzym lecz o ładunkach umieszczonych na powierzchni samego białka enzymatycznego, w pobliżu jego centrum aktywnego (zob. też (86, 143)).

VI. Uwagi końcowe

Z konieczności omówiliśmy jedynie niektóre procesy błonowe mogące podlegać regulacji przez zmiany ładunku i potencjału na powierzchni błon. Nie wyczerpuje to jednak zagadnienia. Istnieje np. szereg prac omawiających rolę powierzchniowych oddziaływań elektrostatycznych w procesach energizacji mitochondriów, chloroplastów czy błon bakteryjnych (36—39), przypuszczalny udział zmian ładunku powierzchniowego w procesach fuzji błon mitochondrialnych (prowadzących np. do powstania megamitochondriów (34, 35, 86, 166)) czy też regulacyjny wpływ oddziaływań elektrostatycznych na procesy translacji genetycznej (165, 167, 168). Wydaje się zatem, że udział ładunku powierzchniowego błon w określaniu przebiegu różnych procesów błonowych stanowić może dość uniwersalny mechanizm regulacyjny.

Należy tu jednak raz jeszcze podkreślić, że oddziaływania elektrostatyczne charakteryzuje ich niespecyficzność, stanowią więc one często jedynie tło dla innych procesów regulujących funkcje błon biologicznych. Nie należy pomijać wpływu zmian płynności błony, stopnia jej hydratacji, ruchów białek i lipidów błonowych czy też działania różnych specyficznych modulatorów na procesy katalizowane w błonach. Czynniki te, rozpatrywane łącznie z oddziaływaniami elektrostatycznymi na powierzchni błon, dają dopiero pełny obraz skomplikowanego systemu regulacyjnego w biologicznych układach błonowych.

PIŚMIENICTWO

1. Dowben R. M., red. (1973) *Błony biologiczne*, PZWL Warszawa.
2. Finean J. B., Coleman R., Michell R. H. (1978) *Membranes and their cellular functions*, Blackwell Scientific, Oxford.
3. Harrison R., Lunt G. G. (1980) *Błony biologiczne — struktura i funkcje*, PWN, Warszawa.
4. Frąckowiak B. (1971) *Post. Biochem.*, **17**, 235—248.
5. Sarzała M. G. (1974) *Post. Biochem.*, **20**, 403—424.
6. Konwiński M. (1974) w *Cytofizjologia*, red. Ostrowski K., Kawiak J., str. 56—63, PZWL, Warszawa.
7. De Robertis E. D. P., Nowiński W. W., Saez F. A. (1974) *Biologia komórki*, str. 195—215, PWN, Warszawa.
8. Michalski W. (1977) *Post. Biochem.*, **23**, 297—319.
9. Michalak M., Sarzała M. G. (1977) *Post. Biochem.*, **23**, 523—539.
10. Bryła J. (1981) *Regulacja metabolizmu komórki*, str. 244—255, PWN, Warszawa.
11. Vanderkooi G., Green D. E. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 615—621.
12. Singer S. J., Nicolson G. L. (1972) *Science*, **175**, 720—724.
13. Bretscher M. (1974) w *Perspectives of membrane biology*, red. Gitler C., Estrada-O. S., str. 3—23, Academic Press, New York, San Francisco, London.
14. Abrahamson S., Pascher I., red. (1977) *Structure of biological membranes*, Plenum Press, New York, London.
15. Etémadi A.-H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 347—475.
16. James A. M. (1960) *Cell surface ionization*, McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology, str. 623—624.
17. Collins M. (1966) *J. Exp. Zool.*, **163**, 23—48.
18. Heard D. H., Seaman G. V. F. (1960) *J. Gen. Physiol.*, **43**, 635—654.
19. Nakatani H. Y., Barber J., Forrester J. A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **504**, 215—225.
20. Itoh S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **504**, 324—340.
21. Mercer F. V., Hodge A. J., Hope A. B., McLean J. D. (1955) *Aust. J. Biol. Sci.*, **8**, 1—18.
22. Nakatani H. Y., Barber J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **591**, 82—91.
23. Ohsawa K., Ohshima H., Ohki S. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **648**, 206—214.
24. Mehlhorn R. J., Packer L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **423**, 382—397.
25. Mehlhorn R. J. (1976) w *Mitochondria: bioenergetics, biogenesis and membrane structure*, red. Packer L., Gómez-Puyou A., str. 381—387, Academic Press, New York, San Francisco, London.
26. McLaughlin S., Harary H. (1976) *Biochemistry*, **15**, 1941—1948.
27. Wojtczak L., Nałęcz M. J. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **94**, 99—107.
28. McLaughlin S. (1977) w *Current topics in membranes and transport*, red. Bronner F., Kleinzeller A., t. 9, str. 74—144, Academic Press, New York.
29. Barber J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **594**, 253—308.
30. Famulski K. S., Nałęcz M. J., Wojtczak L. (1979) *FEBS Lett.*, **103**, 260—264.
31. Nałęcz M. J., Zborowski J., Famulski K. S., Wojtczak L. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **112**, 75—80.
32. Ambrose E. J., James A. M., Lowick J. H. B. (1956) *Nature*, **177**, 576—577.

33. Korohoda W., Łukiewicz S. (1963) *Folia Biol.*, **11**, 11—17.
34. Nałęcz M. J., Wroniszewska A., Famulski K. S., Wojtczak L. (1980) w *First European Bioenergetics Conference*, str. 377—378, Patron Editore, Bologna.
35. Nałęcz M. J., Wroniszewska A., Famulski K. S., Wojtczak L. (1982) *Eur. J. Cell Biol.*, **27**, 289—295.
36. Quintanilha A. T., Packer L. (1977) *FEBS Lett.*, **78**, 161—165.
37. Wojtczak L., Famulski K. S., Dygas A., Nałęcz M. J. (1980) w *First European Bioenergetics Conference*, str. 227—228, Patron Editore, Bologna.
38. Quintanilha A. T., Packer L. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 206—209.
39. Carmeli C., Quintanilha A. T., Packer L. (1979) w *Membrane Bioenergetics*, red. Lee C. P., Schatz G., Ernster L., str. 547—558, Addison-Wesley Reading, Mass., USA.
40. Weller M. (1979) *Protein phosphorylation*, Pion Limited, London.
41. Overbeek J. Th. G. (1952) w *Colloid science*, red. Kruyt H. R., t. 1, str. 115—193, Elsevier, Amsterdam.
42. Jain M. K. (1972) *The bimolecular lipid membrane: a system*, Van Nostrand Reinhold Co., New York, Cincinnati, Toronto, London.
43. Brown R. H. (1974) *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **28**, 343—355.
44. Theuvenet A. P. R., Borst-Pauwels G. W. F. H. (1976) *J. Theor. Biol.*, **457**, 313—329.
45. Träuble H. (1977) w *Structure of biological membranes*, red. Abrahamson S., Pascher I., str. 509—550, Plenum Press, New York, London.
46. Sherbet G. V. (1978) *The biophysical characterisation of the cell surface*, Academic Press, London.
47. Leech R. M., Murphy D. J. (1976) w *Topics in Photosynthesis*, red. Barber J., t. 1, str. 365—401, Elsevier, Amsterdam.
48. Aveyard R., Haydon D. A. (1973) *An introduction to the principles of the surface chemistry*, Cambridge University Press.
49. Grahame D. C. (1947) *Chem. Rev.*, **41**, 441—501.
50. Verveey E. J. B., Overbeek J. Th. G. (1948) *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier, Amsterdam.
51. Minc S., Stolarczyk L. (1956) *Elementy fizykochemii koloidów*, PWN, Warszawa.
52. Adamson A. W., (1960) *Physical chemistry of surfaces*, Academic Press, New York.
53. Haydon D. A. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 450—457.
54. Haydon D. A. (1964) *Rec. Prog. Surface Sci.*, **1**, 94—158.
55. Scheludko A. (1969) *Chemia koloidów*, WNT, Warszawa.
56. Goulden P. T. (1976) *J. Theor. Biol.*, **58**, 425—447.
57. Ohki S. (1976) w *Progress in surface and membrane science*, red. Cadenhead D. A., Danielli J. F., t. 10, str. 117—252, Academic Press, New York, San Francisco, London.
58. Stern D. (1924) *Z. Electrochem.*, **30**, 508—516.
59. Dołowy K., Holly F. J. (1978) *J. Theor. Biol.*, **75**, 373—380.
60. Dołowy K. (1980) w *Cell Adhesion and Motility*, red. Curtis A. S. G., Pitts J. D., str. 39—63, Cambridge University Press, U.K.
61. Show D. J. (1969) *Electrophoresis*, Academic Press, London.
62. Ostrowski W. (1970) *Elektroforeza w badaniach biochemicznych i klinicznych*, PWN, Warszawa.
63. Grahame D. C. (1953) *J. Chem. Phys.*, **21**, 1054—1064.

64. Nakatani H. Y., Barber J., Minski M. J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **548**, 506—516.
65. Dołowy K. (1975) *J. Theor. Biol.*, **52**, 83—97.
66. Fernández M. S. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 23—26.
67. Small D. M., (1967) *J. Lipid Res.*, **8**, 551—557.
68. Eisenberg M., Gresalfi Z., Riccio T., McLaughlin S. (1979) *Biochemistry*, **18**, 5213—5223.
69. Barber J., Searle G. W. F. (1978) *FEBS Lett.*, **92**, 5—8.
70. Kiremidjian L., Stotzky G. (1975) *J. Cell Physiol.*, **85**, 125—134.
71. Hannig K., Heidrich H.-G. (1974) w *Methods in Enzymology*, red. Fleischer S., Packer L., t. 31, str. 746—761, Academic Press, New York.
72. Łabanowski J. (1979) Rozprawa doktorska, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.
73. Preece A. W., Sablovič D., red. (1979) *Cell Electrophoresis: Clinical Application and Methodology*, INSERM Symposium N° 11, North Holland Publishing Co., Amsterdam, New York, Oxford.
74. Michalik M. (1980) Rozprawa doktorska, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.
75. Hannig K., Wirth H., Meyer B.-H., Zeiler K. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1209—1223.
76. Zeiler K., Löser R., Pascher G., Hannig K. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1225—1244.
77. Dallner G., Azzi A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 589—601.
78. Haynes D. H., Staerk H. (1974) *J. Membr. Biol.*, **17**, 313—340.
79. Haynes D. H. (1974) *J. Membr. Biol.*, **17**, 341—366.
80. Azzi A. (1975) *Q. Rev. Biophys.*, **8**, 237—316.
81. Lee C. P., Drott H., Johansson B., Yonetani T., Chance B. (1971) w *Probes of Structure and Functions of Macromolecules and Membranes*, t. 1, red. Chance B., Lee C. P., Blasie J. K., str. 249—260, Academic Press, New York, London.
82. Mehlhorn R. J., Packer L. (1976) *Biophys. J.*, **16**, 194a.
83. Schäfer G., Rowohl-Quinsthoudt G. (1975) *FEBS Lett.*, **59**, 48—51.
84. Azzi A., Santato M. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 211—217.
85. Azzi A. (1974) w *Methods in Enzymology*, t. 32, red. Fleischer S., Packer L., str. 234—246, Academic Press, New York, San Francisco, London.
86. Nałęcz M. J. (1980) Rozprawa doktorska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.
87. Famulski K. S. (1982) Rozprawa doktorska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.
88. Basu M. K., Finkelstein J. N. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 385—395.
89. Stribowa M., Lapka R., Leblova S. (1979) *FEBS Lett.*, **104**, 309—316.
90. Douthert J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 202—206.
91. Alscher R., Jagendorf A. T. (1978) *Anal. Biochem.*, **86**, 665—671.
92. Fromherz P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 326—334.
93. Fromherz P., Masters B. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **356**, 429—443.
94. Fernández M. S., Fromherz P. (1977) *J. Phys. Chem.*, **81**, 1755—1761.
95. de Gier J., Haest C. W. M., Van der Neut-Kok E. C. M., Mandersloot J. G., Van Deenen L. L. M. (1972) w *Mitochondria: biogenesis and bioenergetics, Biomembranes: molecular arrangement and transport mechanisms*, red. Van den Bergh S. G., Borst P., Van Deenen L. L. M., Riemersma J. C., Slater E. C., Tager J. M., str. 263—278, North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, New York.

96. Casper J., Landuyt-Caufriez M., Deelers M., Ruysshaert J. M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **554**, 23—38.
97. Apel H. J., Bamberg E., Läuger P. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **552**, 369—378.
98. McLaughlin S., Szabo G., Eisenman G. (1971) *J. Gen. Physiol.*, **58**, 667—687.
99. Ben-Hayyim G., Krause G. H. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, **202**, 546—557.
100. Fonyó A., Ligeti E. (1979) *FEBS Lett.*, **79**, 33—36.
101. Peña A. (1973) *FEBS Lett.*, **34**, 117—119.
102. Peña A. (1978) *J. Membr. Biol.*, **42**, 199—213.
103. Nałęcz M. J., Wojtczak L., Carafoli E., Gómez-Puyou A., dane niepublikowane.
104. Wehrle J. P., Jurkowitz M., Scott K. M., Brierley G. P. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 312—323.
105. Duszyński J., Wojtczak L. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 417—424.
106. Wojtczak L. (1974) *FEBS Lett.*, **44**, 25—30.
107. Wojtczak L. (1976) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **8**, 293—311.
108. Palmieri F., Quagliariello E., Klingenberg M. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **29**, 408—416.
109. Ormos G., Manyai S. (1978) *J. Physiol.*, **276**, 501—513.
110. Motais R., Baroin A., Motais A., Baldy S. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 679—688.
111. Kiełducka A., Załuska H. (1978) XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Łódź, Streszczenia, str. 195
112. Wojtczak L., Załuska H. (1979) w *Functions and molecular aspects of biomembrane transport*, red. Quagliariello E., Papa S., Palmieri F., Klingenberg M., str. 327—330, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
113. Morel F., Lauquin G., Lunardi J., Duszyński J., Vignais P. V. (1974) *FEBS Lett.*, **39**, 133—138.
114. Duszyński J. (1975) *Post. Biochem.*, **21**, 275—293.
115. Duszyński J. (1975) Rozprawa doktorska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.
116. Pande S. V., Blanchaer M. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 402—411.
117. Lerner E., Elson A. L., Shrago E. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 1513—1519.
118. Duszyński J., Wojtczak L. (1974) *FEBS Lett.*, **40**, 72—76.
119. Mitchell P. (1977) *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 996—1005.
120. Wojtczak L. (1979) *Post. Biochem.*, **25**, 247—250.
121. Bäuerlein E., Trasch H. (1979) w *Cation flux across biomembranes*, red. Mukohata Y., Packer L., str. 357—363, Academic Press, New York, San Francisco, London.
122. Schäfer G., Rowohl-Quinsthoudt G. (1976) *J. Bioenerg.*, **8**, 72—81.
123. Duniec J. T., Thorne S. W. (1979) *FEBS Lett.*, **105**, 1—4.
124. Drouin H. (1976) *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **3**, 222—229.
125. Van der Kloot W., Kita M. (1973) *J. Membr. Biol.*, **14**, 365—382.
126. Van der Kloot W., Cohen I. (1979) *Science*, **203**, 1351—1354.
127. Goldstein L., Levin Y., Katchalski E. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1913—1919.
128. Katchalski E., Silman I., Goldman R. (1971) *Adv. Enzymol.*, **34**, 445—536.

129. Goldstein L. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4072—4084.
130. Dodgson K. S., Rose F. A., Spencer B., Thomas J. (1957) *Biochem. J.*, **66**, 363—368.
131. White H. L., Glassman A. T. (1977) *J. Neurochem.*, **29**, 987—997.
132. Remy M.-H., David A., Thomas D. (1978) *FEBS Lett.*, **88**, 332—336.
133. Kandaswami C., D'Iorio A. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 847—849.
134. Cunningham C. C., Sinthusek G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **550**, 150—153.
135. Buckland R. M., Radda G. K., Wakefield L. M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 363—375.
136. Wainio W. W., Eichel B., Gould A. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 1521—1525.
137. Davies R. C., Neuberger A. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 306—317.
138. Sluyterman L. A. A., Degraaf M. J. M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 554—561.
139. Barton N., Lipovac V., Rosenberg A. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 8462—8466.
140. Maurel P., Douzou P. (1976) *J. Mol. Biol.*, **102**, 253—264.
141. Maurel P., Douzou P. (1976) *C.R. Acad. Sci. Paris*, **282**, 2107—2110.
142. Douzou P., Maurel P. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **3**, 1013—1015.
143. Nałęcz M. J., Wojtczak L. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 681—689.
144. Wojtczak L., Nałęcz M. J., Famulski K. S., Zborowski J. (1982) *FEBS Lett.*, **139**, 221—224.
145. Soodsma J. F., Nordlie R. C. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 636—643.
146. Verdouw H., Bertina R. M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 385—396.
147. Achee F. M., Gabay S. (1981) *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 3151—3157.
148. Abdelfattah A.-S. A., Koch R. B., (1981) *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 3195—3200.
149. Estabrook R. W., Sacktor B. (1958) *J. Biol. Chem.*, **233**, 1014—1019.
150. Chappell J. B., Hansford R. G. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 686—692.
151. Klingenberg M. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **13**, 247—252.
152. Bukowiecki L., Lindberg O. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 115—125.
153. Ścisłowski P. W. (1977) *Mol. Cell. Biochem.*, **18**, 93—99.
154. Houštek J., Drahotka Z. (1975) *Mol. Cell. Biochem.*, **7**, 45—50.
155. Farias R. N., Bloj B., Morero R. D., Siñeris F., Trucco R. E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 231—251.
156. Sandermann H., Jr. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 209—237.
157. Itoh S. (1978) *Plant Cell Physiol.*, **19**, 149—166.
158. Itoh S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **504**, 324—340.
159. Davis D. J., Krogman D. W., San Pietro A. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 110—116.
160. Yerkes C. T., Babcock G. T. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 19—29.
161. Engasser J. M., Horvath C. (1976) *Appl. Biochem. Bioeng.*, **1**, 194—204.
162. Ricard J., Noat G., Crasnier M., Job D. (1981) *Biochem. J.*, **195**, 357—367.

163. Engasser J. M., Horvath C. (1975) *Biochem. J.*, **145**, 431—435.
164. Wharton C. W., Crook E. M., Brocklehurst K. (1968) *Eur. J. Biochem.*, **6**, 565—578.
165. Douzou P., Maurel P. (1977) *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 14—17.
166. Wakabayashi T., Green D. E. (1977) *J. Electron Microsc.*, **26**, 305—320.
167. Irie M. (1965) *J. Biochem. Tokyo*, **57**, 355—362.
168. Schuber F., Pinck M. (1974) *Biochemie*, **56**, 397—403.

KOMUNIKAT

w sprawie bibliografii prac biochemicznych

W 1982 roku ukazała się „Bibliografia polskich prac biochemicznych 1945—1975”. Z myślą o kontynuowaniu wydawnictwa w mniejszych przedziałach czasowych, Komitet Biochemii i Biofizyki oraz Polskie Towarzystwo Biochemiczne pragną rozpocząć pracę nad zebraniem bibliografii za lata 1976—1980. W związku z tym zwróciliśmy się do kierowników placówek biochemicznych w kraju z prośbą o przysłanie spisu publikacji za ten okres. Ponieważ jednak wiele prac biochemicznych powstaje w innych placówkach, prosimy autorów o przysłanie spisu prac bezpośrednio na adres:

Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska
Katedra Biochemii AM we Wrocławiu
ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław.

Pracę nad bibliografią bardzo ułatwi sporządzenie notek dokładnie według następującego wzorca: nazwiska i inicjały autorów, pełna nazwa instytucji (jeżeli autorzy pochodzą z kilku instytucji krajowych lub zagranicznych prosimy o wymienienie wszystkich placówek). W przypadku, gdy współautorzy pracują w kilku instytucjach krajowych i zagranicznych, prosimy o podanie nazw wszystkich placówek. Jeśli jednak publikacja została wykonana wyłącznie w placówce zagranicznej, to nazwę placówki krajowej, w której pracuje polski autor, należy podać w nawiasie. Podobnie, jeżeli praca została wykonana całkowicie w placówce krajowej, to nazwę placówki zagranicznej współautora należy podać w nawiasie. Tytuł pracy w języku, w jakim ją ogłoszono, skrót nazwy czasopisma, rok, tom, strona. Prace przeglądowe proszę oznaczyć literą B na marginesie wykazu. W spisie nie należy umieszczać komunikatów zjazdowych.

PAWEŁ KRYSIŃSKI *)

Zastosowanie impulsowych technik pomiarowych w badaniach sztucznych błon lipidowych

Applications of Pulse Techniques in the Investigations of Artificial Lipid Membranes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Elektryczne modele zjawisk w błonach
- III. Tworzenie dwuwarstw lipidowych
- IV. Metody badania impedancji błon
- V. Główne kierunki badań prowadzonych technikami impulsowymi
 - V-1. Błony lipidowe z wbudowanymi polimerami oraz detergentami jonoforowymi
 - V-2. Błony lipidowe z wbudowanymi antybiotykami jonoforowymi
 - V-3. Błony lipidowe z polipeptydami tworzącymi pory
 - V-4. Błony lipidowe z wbudowanymi fragmentami błon biologicznych
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Electrical equivalent circuits of membrane phenomena
- III. Formation of lipid bilayers
- IV. Methods for investigation of the membrane impedance
- V. Main trends in pulse techniques
 - V-1. Membranes containing polymers and ionophorous detergents
 - V-2. Membranes containing ionophorous antibiotics
 - V-3. Membranes containing pore-forming polipeptides
 - V-4. Lipid membranes containing incorporated fragments of biological membranes
- VI. Final remarks

I. Wstęp

W ostatnich latach dzięki szybkiemu rozwojowi elektronicznych technik pomiarowych uzyskano możliwość badania takich zjawisk zachodzą-

*) dr, adiunkt, Pracownia Elektrochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 1.

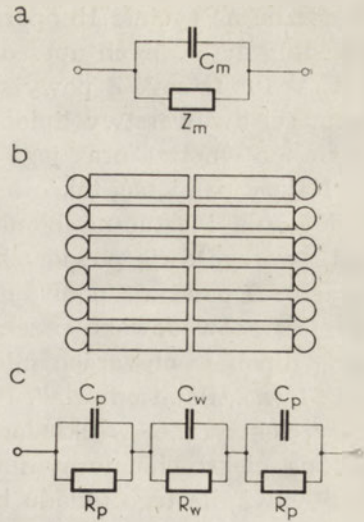
cych w błonie komórkowej i dwuwarstwie lipidowej, które wiążą się z przemieszczeniem ładunku. Zjawisko to towarzyszy z reguły wszystkim procesom czynnego i biernego transportu elektrolitu przez błony. Badaniom zmian powierzchniowej gęstości tego ładunku służą techniki analizujące zjawiska zachodzące na granicach fazowych. Między innymi do tych celów zostały zaadaptowane: mikroelektroforeza (1—3) i pomiar kontaktowej różnicy potencjałów (4—6). Podobnym celom służy metoda pomiaru potencjału przepływu opracowana przez Van Wagena i wsp. (7). Wymienione metody mają tę zaletę, że pozwalają badać błony zewnętrzne nienaruszonych komórek *in vitro*. Do pomiarów elektrycznych właściwości izolowanych błon biologicznych i sztucznych dwuwarstw lipidowych natomiast najczęściej wykorzystuje się techniki impulsowe. Pozwalają one określić pojemność elektryczną i opór badanych błon naturalnych i błon lipidowych oraz, przy założeniu odpowiedniego modelu, parametry procesów kinetycznych w nich zachodzących. Jednakże wnioski wyciągane z badań sztucznych błon lipidowych tylko w przybliżonym stopniu mogą być odniesione do naturalnych błon biologicznych.

W niniejszym artykule omówiono pokrótce podstawowe impulsowe techniki pomiarowe wykorzystywane w badaniach tego typu procesów. Przedstawiono także warunki stosowania technik relaksacyjnych, ich wady i zalety oraz scharakteryzowano elektryczne modele zjawisk zachodzących w błonach, w oparciu o które to modele, zjawiska te są analizowane.

II. Elektryczne modele zjawisk w błonach

Umieszczona w zmiennym lub przemiennym polu elektrycznym izolowana błona komórkowa jak również dwuwarstwa lipidowa zachowuje się jak kondensator o pojemności C_m połączony równolegle z impedancją Z_m^* zależną od amplitudy impulsu pola i jego czasu trwania (Ryc. 1a). Zależność impedancji Z_m od szerokości impulsu i czasu jego trwania wskazuje na nieliniowość badanego układu, co oznacza, że bada-

*) W słownictwie elektronicznym przyjęło się opisywanie elementów elektrycznych obwodów za pomocą ich charakterystycznych właściwości i tak np. zamiast mówić, że w obwodzie znajduje się opornik o oporności (rezystancji) R połączony równolegle z kondensatorem o pojemności C , mówi się, że w obwodzie jest oporność (rezystancja) R połączona równolegle z pojemnością C . Tego rodzaju skróty myślowe są szczególnie celowe przy analizie matematycznej układów, gdzie ważne są wielkości parametrów charakteryzujących poszczególne elementy elektryczne, a nie one same. W tym przypadku impedancja Z_m , zdefiniowana jako stosunek napięcia do płynącego przez układ prądu, charakteryzuje zespół połączonych ze sobą nieznanymi elementami elektrycznymi różnymi od C_m , obrazujących zjawiska mogące zachodzić w błonie. Jej analiza za pomocą technik impulsowych, o czym będzie mowa dalej, umożliwia opis tych zjawisk.



Ryc. 1 a, b, c. Elektryczne modele dwuwarstwy lipidowej

R_p, C_p — oporność i pojemność części polarnej fosfolipidów, R_w, C_w — oporność i pojemność łańcuchów hydrofobowych, C_m — pojemność błony, Z_m — impedancja błony.

ny układ nie spełnia prawa Ohma w różniczkowej postaci. W przypadku gdy w błonie nie zachodzą procesy transportu substancji, adsorpcji ani też żadne procesy metaboliczne prowadzące na przykład do zmian strukturalnych, impedancja Z_m upraszcza się do rezystancji R_m . Jest to najprostszy model zjawisk zachodzących w błonie, charakterystyczny jedynie dla sztucznych dwuwarstw lipidowych nie zawierających układów jonoforowych, specyficznych kanałów-por, ani też nie wykazujących adsorpcji. Układ ten jest konsekwencją modelu błony komórkowej, opartego na podwójnej warstwie lipidowej Danielliego i Davsona (8—16).

Dwuwarstwa lipidowa, dzięki oddziaływaniom hydrofilowo-hydrofobowym lipidów ze sobą oraz z wodą, tworzy strukturę przedstawioną na rycinie 1b. Hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych, zwrócone do wnętrza błony, są dielektrykiem wypełniającym kondensator, utworzony z dwóch warstw hydrofilowych części polarnych po obu stronach tych łańcuchów. Dokładniejsza analiza układu prowadzi do wniosku, że w efekcie rozdzielania ładunku, polarne części lipidów też można charakteryzować za pomocą kondensatorów o pojemności C_p , połączonych szeregowo po obu stronach kondensatora C_w charakteryzującego łańcuchy węglowodorowe (ryc. 1b). Prace Costera i Smitha (17) wykazały, że pojemność C_p jest przynajmniej o rząd wielkości większa niż C_w ($C_p = 30 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$, $C_w = 0,5 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$), co przy połączeniu szeregowym daje:

$$I \quad \frac{1}{C_m} = \frac{1}{C_p} + \frac{1}{C_w} + \frac{1}{C_p}$$

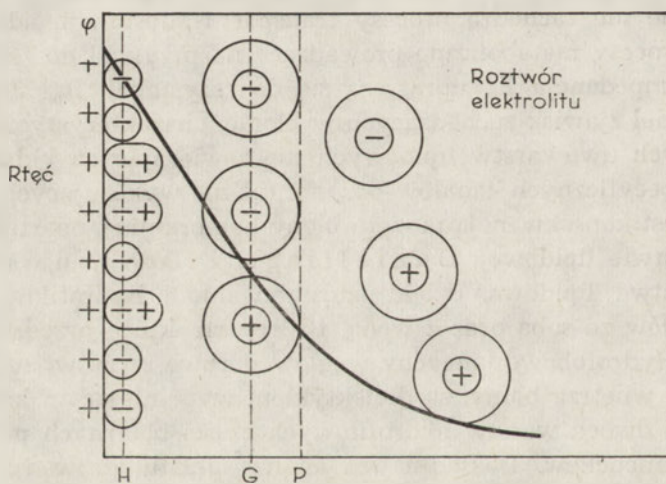
$$\frac{1}{C_m} = \frac{C_p + 2C_w}{C_w \cdot C_p} \Rightarrow C_m = \frac{C_p \cdot C_w}{C_p + 2C_w}$$

$$C_p \gg C_w \Rightarrow C_m = C_w$$

gdzie C_m — pojemność membrany

Widoczne na rycinie 1b oporności R_p i R_w związane są z opornością błony i według cytowanych uprzednio autorów (17) wynoszą: $R_p = 5 \cdot 10^2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ i $R_w = 10^7 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Z powyższego widać, że o sumarycznym oporze i pojemności dwuwarstwy lipidowej decyduje pojemność elektryczna hydrofobowego wnętrza oraz jego oporność.

Należy pamiętać, także o tym, że zarówno *in vivo* jak i *in vitro* błona biologiczna i sztuczna błona lipidowa rozdziela dwa roztwory elektrolitu, tworząc dwie powierzchnie rozdziału faz. Na tak utworzonych granicach faz powstają podwójne warstwy elektryczne (11—16). Ich powstanie jest spowodowane przeniesieniem ładunku przez granicę faz, orientacją dipoli w obszarach międzyfazowych, a także specyficzną adsorpcją oraz tzw. „siłami odbicia”. Hipotezy opisujące strukturę podwójnej warstwy elektrycznej w układach biologicznych, opierają się w dużym stopniu na elektrochemicznym układzie modelowym „rtęć-roztwór elektrolitu”, gdyż dla tego układu budowę podwójnej warstwy elektrycznej stosunkowo dobrze poznano i teoretycznie opisano (18—23).



Ryc. 2. Schemat rozkładu ładunku i przebiegu potencjału w zależności od odległości d , w podwójnej warstwie elektrycznej na granicy faz „rtęć-roztwór elektrolitu”.

H — wewnętrzna płaszczyzna Helmholtza, G — zewnętrzna płaszczyzna Helmholtza (płaszczyzna Gouy), P — płaszczyzna poślizgu.

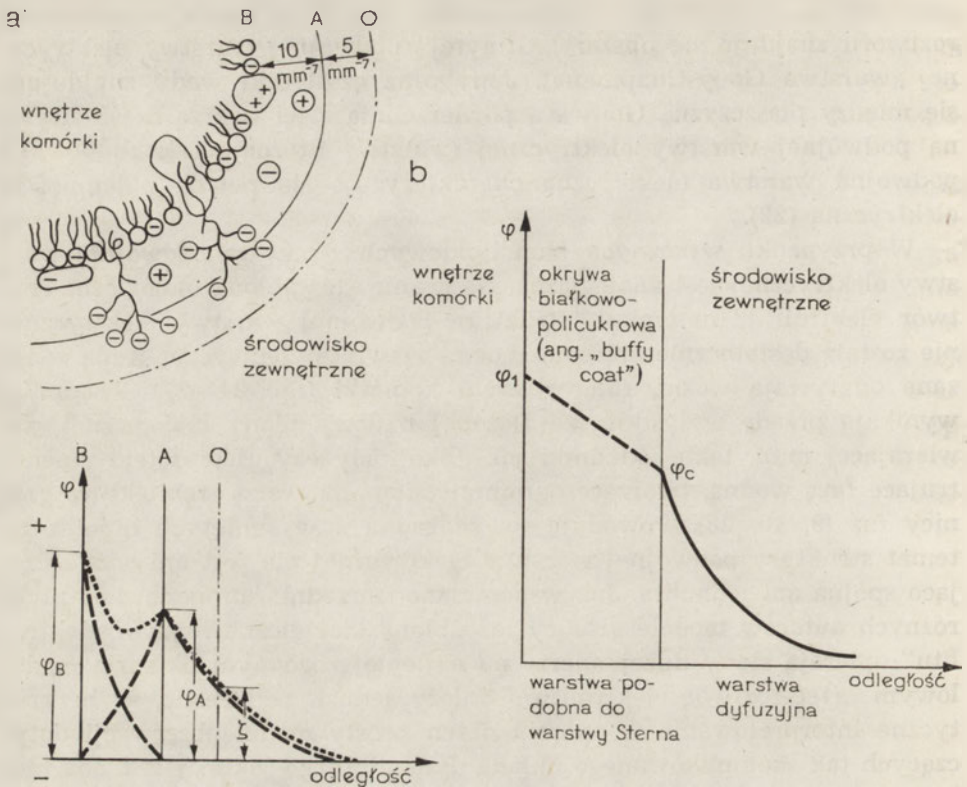
Rycina 2 przedstawia strukturę podwójnej warstwy elektrycznej powstałej na granicy faz „rtęć-roztwór elektrolitu” wraz z zaznaczonym przebiegiem potencjału φ w funkcji odległości d od tej granicy. Na dodatnio naładowanej powierzchni rtęci adsorbują się aniony pozbawione otoczki z cząsteczek wody oraz cząsteczki wody tworzące tzw. wewnętrzną płaszczyznę Helmholtza (H). Dalej w kierunku głębi roztworu, na tzw. zewnętrznej płaszczyźnie Helmholtza albo płaszczyźnie Gouy’a (G) znajdują się jony otoczone cząsteczkami wody utrzymywane siłami elektro-

statycznymi. Między zewnętrzną płaszczyzną Helmholtza a wnętrzem roztworu znajduje się obszar „rozmytej” podwójnej warstwy elektrycznej (warstwa Gouy-Chapmana). Jony oraz cząsteczki wody znajdujące się między płaszczyzną Gouy’a a powierzchnią rtęci tworzą część sztywnej podwójnej warstwy elektrycznej (warstwę Sterna). Tak zbudowana podwójna warstwa elektryczna charakteryzuje się pewną pojemnością elektryczną (22).

W przypadku sztucznych błon lipidowych struktura podwójnej warstwy elektrycznej jest analogiczna. Na granicy faz „błona biologiczna-roztwór elektrolitu” natomiast, struktura podwójnej warstwy elektrycznej nie została dostatecznie opisana, chociaż zjawiska elektryczne z nią związane odgrywają ważną rolę w życiu komórki (np. 24—27). Trudności wynikają przede wszystkim ze złożonej budowy błony biologicznej, zawierającej m.in. takie składniki jak glikolipidy czy glikoproteidy, penetrujące fazę wodną, tworzące ogromnie skomplikowaną architekturę granicy faz (9, 10, 28). Powoduje to, że żadna z wysuniętych hipotez na temat struktury podwójnej warstwy elektrycznej nie jest ani wystarczająco spójna ani jednolita. Jak wspomniano uprzednio, proponowane przez różnych autorów modele granicy faz „błona biologiczna-roztwór elektrolitu” opierają się w dużej mierze na najlepiej zbadanym układzie modelowym „rtęć-roztwór elektrolitu”. Należy jednak podkreślić, że bezkrytyczne interpretowanie w oparciu o ten prosty model obserwacji dotyczących tak skomplikowanego układu dynamicznego jakim jest błona biologiczna, prowadzić może do znacznych błędów. Najlepiej jak dotąd opracowanym układem biologicznym jest granica faz „błona komórkowa erytrocytów ludzkich-roztwór elektrolitu”.

Heard i Seaman (29) np. zakładają, że w przypadku erytrocytów ludzkich umieszczonych w roztworze soli fizjologicznej, granica faz „błona-roztwór” (powierzchnia A, ryc. 3a) znajduje się w odległości ok. 0,5 nm od tzw. powierzchni poślizgu *) (powierzchnia 0, ryc. 3a), w kierunku wnętrza komórki. Na niej znajduje się większość ładunków ujemnych błony erytrocytów. Głębiej w kierunku wnętrza komórki, w odległości około 1 nm od granicy faz leży umownie przyjęta przez autorów powierzchnia grupująca pozostałą część ładunków ujemnych błony (powierzchnia B, ryc. 3a). Przedstawiony na rys. 3a rozkład potencjału, którego źródłem są obie naładowane ujemnie płaszczyzny Heard i Seaman tłumaczą następująco: obszar pomiędzy granicą faz (A) a arbitralnie przyjętą powierzchnią (B) dostępny jest dla jonów, tworzących w obszarze

*) W przypadku, gdy graniczące ze sobą fazy: stała i ciekła poruszają się względem siebie, część sztywna podwójnej warstwy elektrycznej powstałej na granicy rozdziału faz (warstwa Sterna) porusza się wraz z ciałem stałym, a nie otaczającą je cieczą. Powierzchnia graniczna między ruchomą i nieruchomą w stosunku do ciała stałego częścią fazy ciekłej nazywana jest powierzchnią poślizgu. Nie jest ona identyczna z zewnętrzną płaszczyzną Helmholtza.



Ryc. 3 a, b. Modele granicy faz „błona komórkowa-roztwór elektrolitu” z zaznaczonym rozkładem potencjału.

a) model Hearda i Seamana (29), b) model proponowany przez Dołowego i wsp. (30—32) A — granica faz „błona-roztwór” zawierająca większość ładunku ujemnego, B — powierzchnia grupująca pozostałą część ładunku ujemnego, O — powierzchnia poślizgu.

tym warstwę Gouy-Chapmana (warstwę rozmytą) o eksponencjalnym spadku potencjału tak w pobliżu powierzchni A jak i B (ryc. 3a — linia przerywana). O wypadkowym rozkładzie potencjału decyduje więc suma składowych potencjałów pochodzących od powierzchni A i B (ryc. 3a — linia kropkowana).

Ujęcie to jest krytykowane w pracach Dołowego i wsp. (30—32). Adsorpcja jonowa wraz ze strukturalnym wiązaniem wody, dominująca przy tak silnie rozwiniętej powierzchni granicy faz powoduje, że z elektrochemicznego punktu widzenia podwójną warstwę na granicy faz „błona biologiczna-roztwór elektrolitu” lepiej opisuje model Sterna niż Gouy-Chapmana (ryc. 3b). Jednakże jak sądzą Forsyth, Marčelja i wsp. (14), teoria podwójnej warstwy elektrycznej opierająca się tylko na ciągłym rozkładzie ładunku powierzchni błony, nie wystarcza do wyjaśnienia niektórych zjawisk na granicy faz. Należy raczej uwzględnić dyskretny, tzn. nieciągły rozkład ładunku w podwójnej warstwie elektrycznej.

Podwójna warstwa elektryczna na granicy faz: „sztuczna błona lipidowa-roztwór elektrolitu” lub „błona biologiczna-roztwór elektrolitu” również charakteryzuje się pewną pojemnością elektryczną. Zarówno jednak na granicy faz „rtęć-roztwór” jak i „błona-roztwór”, pojemność podwójnej warstwy elektrycznej silnie zależy od siły jonowej elektrolitu, a w przypadku roztworu fizjologicznego jest co najmniej o rząd wielkości większa niż pojemność samej błony (np. 18—22). Analogiczne rozważania do przeprowadzonych powyżej prowadzą do wniosku, że wartość tę w pomiarach impedancji błony można zaniedbać, pod warunkiem, że siła jonowa roztworu będzie w trakcie pomiarów stała, a wartość jej będzie bliska wartości fizjologicznej. Dalsze warunki, spełnienie których z punktu widzenia elektrochemicznego jest niezbędne w pomiarach impedancji błony, będą przedstawione w części opisującej metody pomiaru.

Omówiony powyżej układ sztucznej błony lipidowej rozdzielającej dwa roztwory elektrolitu jest układem prostym, dającym stosunkowo niewiele informacji o strukturze i przewodnictwie (a pośrednio o transporcie czynnym i biernym) błony. Wartości C_m i R_m (ryc. 1a) pozwalają określić zdolność przechodzenia jonów przez błonę, której miarą jest $\frac{1}{R_m}$. Przy założeniu względnej przenikalności elektrycznej wnętrza hydrofobowego błony, wartości te pozwalają określić jego grubość, korzystając z przybliżenia kondensatora płaskiego:

$$II \quad C_m = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon \cdot S}{d}, \quad \text{skąd} \quad d = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon \cdot S}{C_m}$$

gdzie: C_m — pojemność błony (F)

ϵ_0 — przenikalność elektryczna w próżni ($J^{-1} \cdot C^2 \cdot m^{-1}$)

ϵ — względna przenikalność elektryczna (bezwymiarowa)

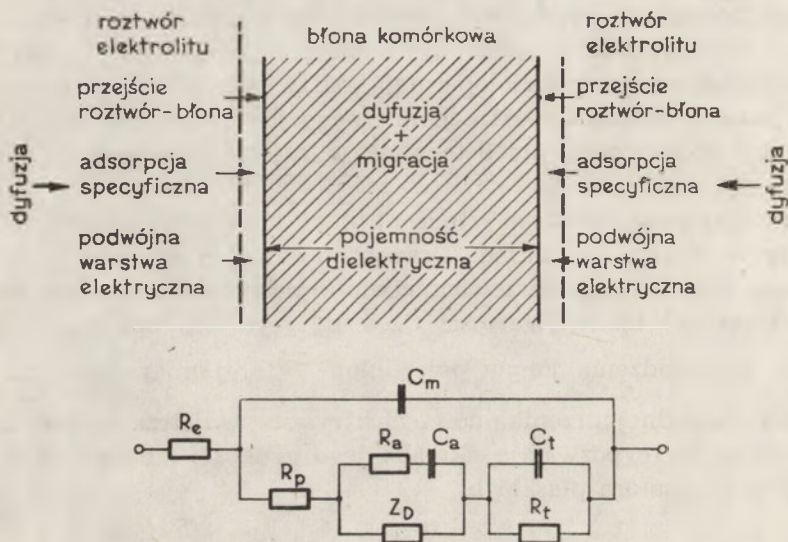
S — pole powierzchni błony (m^2)

d — grubość błony (m)

Wartości pojemności uzyskiwane z pomiarów wahają się od $0,45 \pm \pm 0,05 \mu F \cdot cm^{-2}$ (33) w przypadku dwuwarstw lipidowych zawierających rozpuszczalnik organiczny (rozdz. III), do $0,9 \pm 0,1 \mu F \cdot cm^{-2}$ (33, 34) dla dwuwarstw formowanych z monowarstw (rozdz. III), podobnie jak w przypadku błon naturalnych (34). Przy założeniu względnej przenikalności elektrycznej równej 2,1 jako średniej wartości charakterystycznej dla węglowodorów o długich łańcuchach, obliczona grubość takich błon waha się w granicach 4,2 do 2,2 nm (33).

O wiele ciekawsze układy badawcze stanowią błony o zmodyfikowanym składzie (33—40), z wbudowanymi polimerami (41), jonowymi (42) i niejonowymi detergentami jonoforowymi (33, 43, 44) lub antybiotykami jonoforowymi (45—56). Zastosowanie takich układów pozwala śledzić transport jonów przez sztuczne błony lipidowe, a także modelować go przez działanie czynników zewnętrznych (np. przez zmianę temperatury,

środowiska jonowego). Elektryczne modele zjawisk zachodzących w takich układach są uproszczoną wersją procesów mających miejsce w naturalnych błonach biologicznych. Najogólniejszy jak dotąd, ale też najtrudniejszy do weryfikacji model zjawisk zachodzących w błonach biologicznych, wraz z równoważnym modelem elektrycznym, zaproponowali A. A. Pilla i G. S. Magules (ryc. 4) (57).



Ryc. 4. Schemat zjawisk zachodzących w błonie komórkowej i w jej obu podwójnych warstwach elektrycznych, wraz z równoważnym modelem elektrycznym (57).

R_e — opór elektrolitu, R_p — opór przejścia roztwór-błona, R_a , C_a — opór i pojemność adsorpcji specyficjnej, R_t , C_t — opór i pojemność transportu przez błonę, Z_D — impedancja dyfuzyjnego transportu z roztworu, C_m — pojemność błony wraz z zewnętrzną i wewnętrzną podwójną warstwą elektryczną.

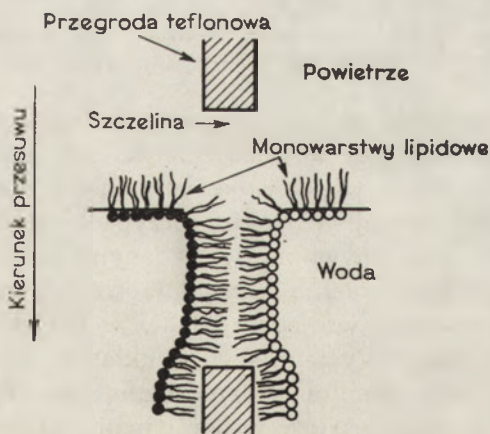
Występowanie tak znacznej ilości elementów w elektrycznym modelu błony e często praktycznie uniemożliwia określenie wielkości ich udziału w mierzonej wartości impedancji dla dostępnego zakresu pomiarowego.

III. Tworzenie dwuwarstw lipidowych

W badaniach procesów zachodzących w błonach biologicznych i sztucznych błonach lipidowych za pomocą technik impulsowych, możliwość pomiaru ich właściwości elektrycznych zapewnia się przez odpowiednią konstrukcję naczynka pomiarowego (52, 57, 58, 59, 60). W naczynku tym rozpięta na szczelinie w przegrodzie teflonowej błona rozdziela dwa roz-

twory elektrolitu o jednakowym lub o różnym składzie. Najczęściej stosowane metody tworzenia sztucznej błony lipidowej w szczelinie teflonowej naczynka pomiarowego polegają bądź na tworzeniu błon z roztworu lipidów w rozpuszczalniku organicznym (np. 48, 50, 52), bądź też na tworzeniu sztucznych błon lipidowych poprzez „łączenie” dwu monomolekularnych warstw lipidowych (np. 36, 37). Metody tworzenia błon z roztworu lipidów w rozpuszczalniku organicznym są zawsze obciążone pewnym błędem związanym z obecnością tego rozpuszczalnika w utworzonej dwuwarstwie. Stosowane z reguły jako rozpuszczalniki n-alkany (oktan, dekan, tetradekan itp.) mogą wpływać na organizację błony lipidowej w sposób zależny od długości swojego łańcucha węglowego. Prace McIntosha, Simona i McDonalda (np. 61) wskazują, że n-alkany o długich łańcuchach węglowodorowych, takie jak tetradekan i heksadekan podwyższają temperaturę przejścia fazowego niektórych fosfolipidów w błonach, wbudowując się równolegle do ich łańcuchów acylowych. Natomiast alkanany o łańcuchach krótszych (np. heksan i oktan), obniżają temperaturę przejścia oraz zwiększają grubość błony przez wbudowanie się między dwie monowarstwy lipidowe. Alkany te tworzą pewnego rodzaju domeny wewnątrz hydrofobowej części błony, co prowadzi do zaniżania wartości mierzonej pojemności elektrycznej powstających w ten sposób błon lipidowych (61).

Z tego powodu bardziej odpowiednia wydaje się metoda tworzenia sztucznych błon lipidowych poprzez „łączenie” ze sobą dwu monowarstw lipidowych rozpostartych na powierzchni granicznej woda/powietrze (36, 37). Dodatkową korzyścią tej metody jest możliwość tworzenia błon asymetrycznych, zbudowanych z dwu różnych monowarstw lipidowych oraz łatwego różnicowania składu roztworu po obu stronach błon. Utrudnieniem natomiast jest konieczność budowy specjalnej aparatury oraz sto-

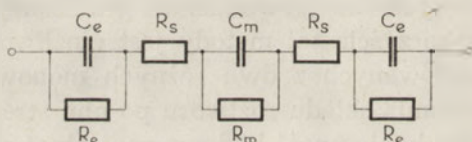


Ryc. 5. Proces tworzenia w szczelinie w przegrodzie teflonowej dwuwarstwy lipidowej z dwu monowarstw rozpostartych na granicy faz „woda-powietrze”.

sunkowo duża pracochłonność postępowania. Aparatura składa się zasadniczo z dwóch naczynek, w których tworzy się monowarstwy, rozdzielonych od siebie teflonową przegrodą mającą możliwość pionowego ruchu względem powierzchni cieczy. W centrum przegrody znajduje się otwór pokryty cienką folią teflonową, w którym tworzyć się będzie błona. W początkowej fazie szczelina w przegrodzie znajduje się ponad powierzchniami cieczy z utworzonymi monowarstwami, po czym w trakcie przesuwania przegrody w dół, szczelina ta zanurza się, dwie monowarstwy łączą się końcami hydrofobowymi, tworząc dwuwarstwę lipidową. Proces ten jest przedstawiony schematycznie na rycinie 5. Obie metody nakładania dwuwarstw lipidowych na otworek w folii teflonowej wymagają dodatkowo sprawdzenia, czy utworzona membrana ma rzeczywiście strukturę bimolekularną (33, 36, 37, 60).

IV. Metody badania impedancji błon

W rozdziale II omówiono wpływ podwójnej warstwy elektrycznej na wielkość impedancji dwuwarstwy lipidowej i błony biologicznej. W pomiarach impedancji błony, w naczyniu pomiarowym znajdują się także przynajmniej dwie elektrody, przy pomocy których podaje się impuls zaburzający i rejestruje odpowiedź badanego układu. Charakteryzują się one również pewną pojemnością i rezystancją (ryc. 6). Aby uniknąć



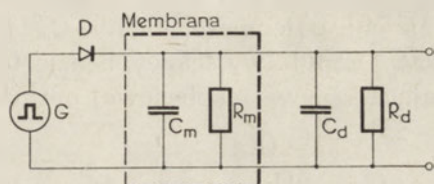
Ryc. 6. Elektryczny model najprostszego układu badawczego: badana błona z dwiema elektrodami pomiarowymi.

R_m , C_m — opór i pojemność błony, R_s — opór elektrolitu między każdą z elektrod i błoną, R_e , C_e — opór i pojemność elektrod pomiarowych.

ich wpływu na mierzoną wielkość impedancji błony należy tak zwiększyć powierzchnię elektrod, aby pojemności ich podwójnych warstw elektrycznych były dużo większe od pojemności dwuwarstwy lipidowej lub błony biologicznej. W takim przypadku impedancja elektrod będzie praktycznie zaniedbywalna w badanym układzie. Można również w dokładnych pomiarach potencjałów transmembranowych stosować elektrody odwracalne względem jonów w roztworze np. kalomelową lub chlorosrebrową. Występujący w układzie opór elektrolitu zawartego między elektrodami a badaną błoną oraz opory elektrod, ze względu na ich niewielką wartość w porównaniu z oporem błony, można zaniedbać. Oprócz naczynka pomiarowego, które wraz z błoną i elektrodami stanowi zasadniczą część bloku aparaturowego, blok ten zawiera

układ generujący impulsy zaburzające oraz dopasowany do warunków pomiarowych układ rejestrujący. W najprostszym przypadku pomiarów metodą impulsową może to być układ przedstawiony na rycinie 7.

Techniki impulsowe stosowane w badaniach impedancji można ogólnie podzielić w dwojaki sposób: albo ze względu na kształt impulsu wchodzącego do badanego układu, albo ze względu na jego charakter. Różnicuje to odpowiedź badanego układu i sposób jej rejestracji. Przyjmując za podstawę kształt, można wyróżnić techniki posługujące się impulsami prostokątnymi, trójkątnymi i sinusoidalnymi, przy czym technika impulsów trójkątnych znajduje większe zastosowanie w analizie procesów elektrodowych (62) niż w badaniach błon biologicznych i membran lipidowych. Ze względu na charakter można wyróżnić impulsy napięciowe



Ryc. 7. Schemat zastępczy układu pomiarowego.

G — generator impulsów prostokątnych, D — dioda, R_m , C_m — opór i pojemność badanej błony, R_d , C_d — opór i pojemność układu rejestrującego.

i impulsy prądowe (lub inaczej: impulsy o wymuszeniu napięciowym-ang. *voltage clamp* i wymuszeniu prądowym-ang. *charge pulse*) (45, 50, 63). Oznacza to, że impuls charakteryzuje się stałą wartością napięcia lub stałą wartością natężenia prądu w czasie swego trwania. Niezależnie jednak od rodzaju techniki impulsowej, polegają one na doprowadzeniu do badanego układu charakteryzującego się impedancją Z_x , impulsu zaburzającego o dokładnie znanych parametrach: amplitudzie, czasie trwania i częstotliwości. Po przejściu przez badany układ (w tym przypadku błonę), impuls charakteryzuje się już zmienionymi parametrami. Ich dokładna analiza pozwala wnioskować o elementach składowych impedancji Z_x , a tym samym o procesach zachodzących w błonie podczas przechodzenia przez nią impulsu zaburzającego. Sposób jej przeprowadzenia, zależny od stopnia komplikacji badanego układu, znaleźć można w pracach źródłowych z zakresu fizyki i elektroniki (64—69).

IV-1. Technika impulsów prostokątnych

Jako przykład techniki impulsów prostokątnych niech posłuży układ przedstawiony na rycinie 7. W układzie tym prostokątny impuls elektryczny z generatora G poprzez diodę D ładuje pojemność membrany C_m . Pojemność ta po zakończeniu impulsu rozładowuje się przez oporność

wewnętrznej membrany R_m (lub w zależności od rozwiązania układu rejestrującego przez zadaną oporność bocznikową). Stała czasowa τ procesu rozładowania (czas relaksacji układu), w tym przypadku zależy od pojemności membrany i jej oporności (64—67):

$$\text{III} \quad \tau = R_m \cdot C_m,$$

gdzie τ — stała czasowa procesu rozładowania (sek).

Należy tak dobrać elektroniczny układ pomiarowy, by zapewnić mały czas ładowania (stała czasowa tego procesu określona jest oporem wewnętrznym generatora, oporem przewodzenia diody i pojemnością membrany) oraz dużą oporność wejściową układu rejestrującego ($R_d \gg R_m$) i jego małą pojemność ($C_d \ll C_m$). Przyjmując, że elektryczny model zastępczy badanej błony lipidowej lub błony biologicznej składa się tylko z równolegle połączonych: pojemności błony C_m i jej oporności R_m , rejestrowany napięciowy impuls wyjściowy będzie taki, jak przedstawia rycina 8. Część opadająca krzywej napięciowej opisuje równanie (65, 66):

$$\text{IV} \quad \frac{U}{U_{\max}} = e^{-\frac{t}{\tau}}$$

gdzie:

$$\tau = R_m \cdot C_m$$

U — amplituda impulsu w chwili t (V)

U_{\max} — maksymalna amplituda impulsu (V)

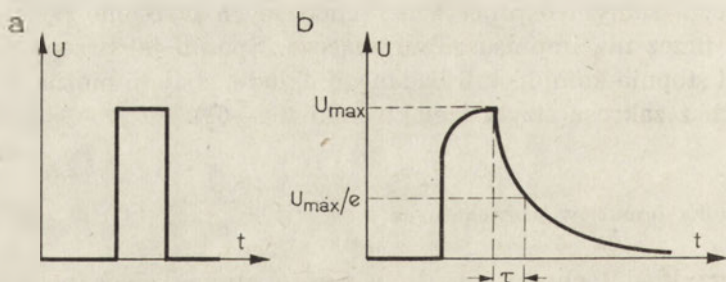
e — podstawa logarytmów naturalnych

t — czas (sek)

τ — stała czasowa układu (sek)

Wielkość pozwalającą określić m.in. pojemność błony można wyznaczyć z obrazu oscyloskopowego impulsu wyjściowego w sposób pokazany na rycinie 8.

W przypadku gdy w błonie zachodzą procesy kinetyczne (np. transportu jonów), analiza impulsu wyjściowego jest trudniejsza, gdyż stała czasowa jest wówczas wypadkową wszystkich tych procesów, a równanie IV



Ryc. 8 a, b. Przebieg napięcia w czasie.

a) na wejściu do badanego układu (błony), b) na zaciskach układu rejestrującego (np. oscyloskopu) U_{\max} — maksymalna amplituda impulsu [V], τ — stała czasowa (sek), e — podstawa logarytmów naturalnych

przyjmuje postać bardziej skomplikowaną, zależną od postulowanego mechanizmu zjawisk (50, 63).

Niektórzy badacze (52) porównując ze sobą technikę prostokątnych impulsów napięciowych i technikę impulsów prądowych uważają, że ta ostatnia lepiej nadaje się do badań zjawisk zachodzących w błonach. Jej zalety w stosunku do techniki impulsów napięciowych są następujące:

1. Wszystkie potrzebne zależności można wyznaczyć w oparciu o dane uzyskane z jednego impulsu, w czasie wystarczająco krótkim do zminimalizowania zmian architektury błony i jej powierzchni.
2. W rozważanej metodzie gradient napięcia w błonie zanika bardzo szybko, więc możliwe jest wyznaczenie jej przewodności i pojemności przy wyższych napięciach, które trwając dłużej powodowałyby rozerwanie błony.
3. Ponieważ zaburzenie jest zadane przez układ generujący, możliwe jest ładowanie błony i zmiana na niej potencjału bez ograniczeń ze strony stałej czasowej procesu ładowania jak w przypadku impulsów napięciowych.
4. Z uwagi na niewielki ładunek wprowadzany do układu można zaniedbać polaryzację stężeniową w stykających się bezpośrednio z błoną warstwach roztworu.

Wadą metody prostokątnych impulsów prądowych są trudności z rejestracją i analizą procesów relaksacyjnych o małych amplitudach.

IV-2. Technika impulsów sinusoidalnych

Metody wykorzystujące impulsy sinusoidalne w szerokim zakresie częstotliwości znajdują szczególne zastosowanie w badaniach własności podwójnej warstwy elektrycznej klasycznych układów elektrochemicznych, pozwalając określić między innymi jej strukturę. Wykorzystuje się je także w badaniach układów biologicznych. Zaletą tych metod jest to, że pozwalają one określić model elektryczny badanego układu, a tym samym zjawiska w nim zachodzące ze stosunkowo prostych pomiarów R i C w funkcji częstotliwości. Teoretycznie wyliczona wartość impedancji w funkcji częstotliwości impulsów dobrze zbudowanego modelu elektrycznego powinna odpowiadać wartości impedancji zmierzonej. Jeśli nie, należy tak dobrać obwód zastępczy, aby teoretycznie wyliczona odpowiedź tego obwodu na generowane impulsy korespondowała w całym zakresie częstotliwości z odpowiedzią badanej sztucznej dwuwarstwy lipidowej lub izolowanej błony biologicznej (57, 70, 71). Oczywiście, może się zdarzyć, że nie będzie można rozdzielić poszczególnych elementów obwodu zastępczego. Sytuacja taka może zaistnieć szczególnie w przypadku izolowanych naturalnych błon biologicznych, z uwagi na różnorodność struktur i procesów w nich zachodzących. Uwaga ta dotyczy

także omówionych powyżej technik stosujących prądowe lub napięciowe impulsy prostokątne. Innym ważnym ograniczeniem jest wspomniana już w rozdziale II nieliniowość badanego układu. Powoduje to znaczne ograniczenie zakresu stosowanych amplitud i czasów trwania impulsów do wartości, przy których analizowany układ będzie z dobrym przybliżeniem układem liniowym, to znaczy mierzone wielkości R i C nie będą zależały od amplitudy impulsu zaburzającego ani od jego czasu trwania. Z powyższych względów znacznie więcej uwagi poświęca się układom modelowym o zadanej strukturze, co stanowi duże ułatwienie w wyjaśnieniu obserwowanych zjawisk. Prace tego typu stanowią podstawę interpretacji zachowań błon naturalnych. Z tego też względu w następnym rozdziale zostanie przedstawionych kilka kierunków badań prowadzonych przy pomocy technik relaksacyjnych oraz uzyskane rezultaty.

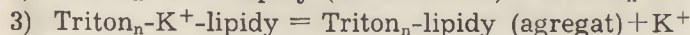
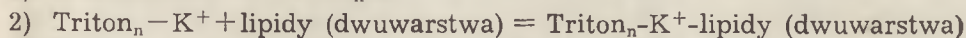
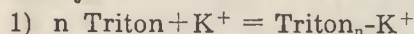
V. Główne kierunki badań prowadzonych technikami impulsowymi

V-1. Układy z wbudowanymi polimerami oraz detergentami jonoforowymi

W badaniach sztucznych błon lipidowych z wbudowanym polistyrenem lub poliizobutylenem stwierdzono na przykład (41), że w trakcie formowania dwuwarstwy lipidowej przechodzi ona przez kilka przejściowych, nietrwałych stanów pośrednich. Ilość tych stanów a także pojemność błony zależy od zawartości polimerów w roztworze, z którego formuje się błony i w przedziale zawartości polimeru 0—40%, pojemność wzrasta prawie dwukrotnie. Wzrost ten autorzy przypisują zmniejszeniu się grubości dwuwarstwy lipidowej (por. wzór II), związanemu prawdopodobnie z wypieraniem organicznego rozpuszczalnika z błony.

W badaniach impedancji sztucznych dwuwarstw lipidowych wiele uwagi poświęca się błonom z wbudowanymi układami jonoforowymi (42—44). Van Zutphen i wsp. (44) badali wpływ niektórych niejonowych detergentów na rezystancję błon lipidowych w stałym polu elektrycznym. Metoda ta nie należy do technik relaksacyjnych, gdyż układ badany nie znajduje się w zmiennym polu elektrycznym. Jednak w tym szczególnym przypadku, ze względu na mechanizm przewodzenia błony lipidowej z wbudowanym detergentem, obserwuje się charakterystyczne relaksacyjne zależności rezystancji błony od czasu. Dwuwarstwy lipidowe rozdzielały wodne roztwory chlorków litu, sodu, potasu, rubidu i cezu. Autorzy stwierdzili, że detergenty o budowie polioksyetylenowych eterów w stężeniach sublitycznych redukują rezystancję błony. Obniżenie to silnie zależy od rodzaju kationu obecnego w roztworze po obu stronach błony i jego wartości maleje w kolejności $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ = Li^+$. Czas potrzebny na maksymalne obniżenie rezy-

stancji błony zależy od stężenia dodanego detergentu. Autorzy sugerują, że detergenty o strukturze eterów polioksyetylenowych działają jako jonofory specyficzne dla jonu potasu. Zaproponowali oni mechanizm transportu jonu K^+ na przykładzie detergentu Triton X-100. Postuluje się tworzenie kompleksu Triton-kation-lipid, z uprzednim utworzeniem agregatów detergentu o składzie zależnym od składu dwuwarstwy lipidowej:



W ujęciu tym reakcja 1) opisuje tworzenie się kompleksu detergent-kation, a reakcja 2) przedstawia oddziaływanie tego kompleksu z lipidami w dwuwarstwie (n -ilość cząsteczek Triton X-100). Przyjmując dalej, że kompleks detergent-kation-lipidy powoduje wzrost przewodności błony przenosząc przez nią kation, następnym etapem jest jego dysocjacja zgodnie z reakcją 3). Porównując inne detergenty (Lubrol WX, Igepal CO) pod względem zdolności do obniżania rezystancji dwuwarstw lipidowych Van Zutphen i wsp. stwierdzili, że zdolność ta zależy ściśle od rodzaju detergentu, przy czym znaczną rolę odgrywa ilość grup oksyetylenowych (CH_2CH_2O) oraz długość łańcucha hydrofobowego.

V-2. Układy z wbudowanymi antybiotykami jonoforowymi

Prowadząc badania wpływu nonaktyny, dinaktyny i trinaktyny na rezystancję błon lipidowych w roztworach jonów Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ i NH_4^+ , Szabo i wsp. (46—49) sugerują, że antybiotyki te tworzą z wymienionymi kationami dodatnio naładowane kompleksy rozpuszczalne w lipidach, mające dzięki temu zdolność penetracji przez błonę jako nośniki jonów. Porównanie wartości przewodności (odwrotności oporności) błon wyznaczone dla różnych kationów alkalicznych przy tym samym ich stężeniu (10^{-2} M/l) oraz stałym stężeniu antybiotyku (10^{-7} M/l) wskazuje, że nonaktyna, monaktyna, dinaktyna oraz trinaktyna działają jako jonofory specyficzne względem potasu. Powodują one, że zdolność przechodzenia jonów przez błony maleje w kolejności $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$, a więc analogicznie do detergentów jonoforowych. Założenie tworzenia kompleksów antybiotyk-kation, mających zdolność penetracji przez błonę prowadzi do wniosku, że przewodność błony zależy powinna od ruchliwości kompleksu w błonie. Ruchliwość kompleksu w błonie zależy natomiast nie tylko od jego rodzaju, ale też od własności fizycznych wnętrza dwuwarstwy lipidowej. Oczywiście jest, że ruchliwość ta wzrastać będzie wraz ze wzrostem płynności błony, co powodować będzie wzrost jej przewodności i odwrotnie, przy zmniejszeniu płynności ruchliwość i przewodność zmaleją. Opierając się na powyższym

autorzy pracy (49) przeprowadzili badania wpływu cholesterolu na przewodność błon lipidowych w obecności monaktyny w roztworze KCl. Cholesterol został wybrany w oparciu o wcześniejsze prace (72, 73) gdzie stwierdzono, że obniża on przepuszczalność dwuwarstw lipidowych dla cząsteczek obojętnych elektrycznie. Postuluje się (74, 75), że jego wpływ polega na unieruchamianiu fosfolipidowych łańcuchów węglowodorowych w dwuwarstwie. Stwierdzone przez autorów (72, 73) obniżenie przewodności błony wraz ze wzrostem zawartości w niej cholesterolu zgadza się z postulowanym (46—49) mechanizmem transportu jonów metali alkalicznych w obecności monaktyny. Obszerniejsze badania wpływu cholesterolu i jego pochodnych na transport jonów przez dwuwarstwy lipidowe przeprowadzili Benz i Cros (63). Stosując technikę *charge pulse* autorzy badali systemy transportu anionów lipofilowych (jonu dipikryloaminowego i czterofenyloboranowego) oraz dodatkowo naładowanego układu Rb^+ -walinomycyna w obecności cholesterolu, epicholesterolu, ergosterolu, stigmasterolu, dihydrosterolu, epikoprostanolu i oleinianu cholesterolu. W badaniach tych stwierdzono, że cholesterol powoduje znaczny wzrost szybkości transportu anionów lipofilowych przez błony monooleinowe. Pozostałe sterole z jedną grupą hydroksylową oraz oleinian cholesterolu nie wykazują analogicznego wpływu na dwuwarstwy lipidowe. Również w przypadku jonoforowego układu walinomycyna- Rb^+ stwierdzono, że jedynie cholesterol powoduje znaczne obniżenie zarówno stałych szybkości asocjacji jon-jonofor, translokacji powstałego kompleksu jak i translokacji wolnego jonoforu. Ponieważ analogiczne obniżenie przewodności błony z wbudowanym cholesterolem dla dodatnio naładowanych cząstek oraz odwrotny efekt dla jonów ujemnych stwierdzono już wcześniej (76—79), Benz i Cros wyciągnęli wniosek, że działanie cholesterolu nie może ograniczać się jedynie do „usztynienia” dwuwarstw lipidowych. Posiadając duży moment dipolowy cholesterol może powodować zmianę potencjału dipolowego na powierzchni błony lipidowej, różnicując w ten sposób kinetykę transportu różnoimiennie naładowanych cząsteczek (76, 77, 80). Zmiana potencjału dipolowego na powierzchni dwuwarstwy lipidowej spowodowana wbudowaniem cholesterolu może także wpływać na ilość jonów i dipoli zaadsorbowanych na granicy faz „błona-roztwór elektrolitu”. Tak więc, zdaniem wspomnianych uprzednio autorów (63), na kinetykę transportu anionów lipofilowych wpływa raczej grubość błony i wielkość potencjału dipolowego, a w mniejszym stopniu płynność dwuwarstwy. Jonoforowy transport jonów dodatnich natomiast silnie warunkowany jest płynnością błony oraz częściowo przez potencjał dipolowy. Różne zachowanie się dwu systemów transportu jonów przez dwuwarstwy lipidowe może być wynikiem różnicowanej lokalizacji powierzchni adsorpcyjnych. Podczas gdy aniony lipofilowe adsorbują się prawdopodobnie na samej powierzchni warstwy dipolowej, to naładowany kompleks jon-jonofor tworzy się prawdopodob-

nie w tej warstwie od strony łańcuchów węglowodorowych cząstek lipidowych. Do podobnych wniosków prowadzą wyniki badań techniką NMR (81).

V-3. Układy z polipeptydami tworzącymi pory

Techniki relaksacyjne stosuje się również do badania efektów wbudowania do dwuwarstwy lipidowej polipeptydowych antybiotyków jak gramicydyna (82—87), alametycyna (56, 88—92), suzukacylina (93, 94) oraz trichotoksyna A-40 (51, 95). Postuluje się tworzenie przez tego typu antybiotyki por (kanałów) w błonie, umożliwiających transport jonów i cząstek obojętnych (84, 86). Na temat mechanizmu transportu istnieje wiele hipotez próbujących wyjaśnić zarówno strukturę (96—98) oraz selektywność (96, 99—103) tego rodzaju kanałów, jak i sposób przechodzenia jonów i cząsteczek częstokroć większych niż średnica pory (96, 99, 101). Hipotezy takie opierają się często na wynikach pomiarów elektrycznych właściwości sztucznych błon lipidowych (51, 90, 95—97). Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników niektórzy badacze uważają, że transport większości jonów i cząsteczek, także tych których transport obserwuje się w obecności opisywanych powyżej jonoforów, zachodzi przez kanały, pory, penetrujące błonę komórkową (96, 104).

V-4. Błony lipidowe z wbudowanymi fragmentami błon biologicznych

Najbardziej zbliżonymi do błon biologicznych układami modelowymi, badanymi między innymi za pomocą technik relaksacyjnych, są błony lipidowe z wbudowanymi bądź to izolowanymi składnikami błon biologicznych (105—115), bądź też całymi fragmentami lub frakcjami tych błon (116, 117, 118). Ogromną korzyścią badań tego rodzaju jest możliwość scharakteryzowania roli środowiska, w jakim znajduje się błona, w funkcjonowaniu poszczególnych białek błonowych, a w szczególności ich udziału w procesach transportu. Dokładnie znany skład i struktura błony pozwala uniknąć przy tym kłopotów związanych ze złożoną strukturą błon biologicznych.

Składnikami błon biologicznych, których funkcje bada się po uprzednim wbudowaniu do błon lipidowych, są między innymi białka błony komórek gram-ujemnych bakterii: *Escherichia coli* (108, 111), *Salmonella typhimurium* (107) i *Pseudomonas aeruginosa* (105). Białka te zwane porynami (ang. *porin*) (119), badane są ze względu na to, że są odpowiedzialne za bierną przepuszczalność błon tych bakterii dla hydrofilowych substancji o ciężarze do 700. Rezultaty prowadzonych badań sugerują, że

białka te zorganizowane w trimery, tworzą w błonie szerokie kanały wypełnione wodą, bardzo mało selektywne w stosunku do jonów metali alkalicznych (107). Przy pH obojętnym, kanały te są ok. 2—4 razy bardziej przepuszczalne dla jonów metali alkalicznych niż dla jonów Cl^- (105, 108). Badania prowadzone nad przepuszczalnością tych kanałów dla dużych jonów, jak: TRIS^+ , glukozoamina⁺, HEPES⁻, czy $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ sugerują, że minimalna średnica por wynosi ok. 0,8 do 1,4 nm, przy długości ok. 7,5 nm (105, 108). Ciekawym przypadkiem wśród grupy gram-ujemnych bakterii będących źródłem poryn jest *Pseudomonas aeruginosa*. Wykazuje ona zwiększoną odporność na hydrofilowe antybiotyki o ciężarze ok. 400, mimo, że zawiera w błonie komórkowej białka, mogące tworzyć kanały przepuszczające cząstki o ciężarze ok. 6000 (105, 120). Izolowana poryna tej bakterii, białko F, wbudowane do błony lipidowej tworzy pory o średnicy ok. 2 nm (105). Wielkość tych kanałów oraz ich mała selektywność sugeruje według autorów (105), że niska przepuszczalność błony dla antybiotyków jest raczej wynikiem stosunkowo niewielkiej ilości otwartych kanałów w błonie *Pseudomonas aeruginosa* w porównaniu do pozostałych bakterii.

Badano także selektywność kanałów tworzonych przez białka pochodzące z retikulum sarkoplazmatycznego, po wbudowaniu ich do błon lipidowych (110). W pracy tej, opierając się na wynikach badań przepuszczalności błon dla kationów jednowartościowych (prowadzonych m.in. technikami relaksacyjnymi), wysunięto hipotezę, że białkowe kanały składają się z kilku członów różniących się średnicą i hydrofobowością wnętrza. Kanał rozpoczyna się szerokim (ok. 1 nm średnicy) wejściem, za którym znajduje się przewężenie o hydrofobowych właściwościach, odpowiedzialne za specyficzną selektywność pory względem jonu K^+ . Najwęższe miejsce tego rejonu, o średnicy 0,4—0,5 nm, znajduje się w odległości ok. 0,6—0,7 nm od jego początku. Ponadto badania sprzężonego z jonem K^+ przepływu wody wskazują na to, że wraz z kationem przechodzi od 3—6 cząsteczek wody (110).

Techniki relaksacyjne znajdują również zastosowanie w badaniach oddziaływań receptor-przebiegacz odpowiedzialnych za przewodzenie bodźców nerwowych. Proteolipidowe receptory istniejące w błonie postsynaptycznej wiążą się specyficznie z przebiegaczem nerwowym — acetylocholiną lub jej pochodnymi na przykład sukcylocholiną, co powoduje przejściową zmianę przewodności błony (60, 112, 117). Badania wbudowanych do błon lipidowych izolowanych receptorów narządu elektrycznego węgorka *Electrophorus electricus* i drętki *Torpedo marmorata* prowadzone przez De Robertisa i wsp. (112, 114) wykazały, że receptor stanowi jednocześnie kanał, który otwiera się w rezultacie oddziaływania receptor-przebiegacz. Przewodność kanału receptorowego jest około 7 razy większa dla jonów K^+ i Na^+ niż dla Cl^- , zaś czas jego otwarcia waha się w granicach 1,3—35 ms (115, 117).

VI. Uwagi końcowe

Przedstawione w powyższym artykule impulsowe techniki pomiarowe oraz przykłady ich zastosowań oczywiście nie wyczerpują tematu. Istnieje cały szereg metod jak i ogromne zróżnicowanie analizowanych układów. Na przykład interesujące wydają się być badania transformacji energii świetlnej w dwuwarstwach lipidowych z wbudowanymi chromoforami, z uwagi na możliwości wykorzystania rezultatów w energetyce czy elektrochemii (magazynowanie energii świetlnej w wysokoenergetycznych związkach chemicznych, konwersja energii słonecznej w energię elektryczną w fotoogniwach, fotoelektroliza wody itp.) (121—124).

Ciekawym rozwiązaniem z punktu widzenia metodyki są układy „błona-jonofor”, w których impulsy prądowe wymuszane są impulsami termicznymi (125, 126). Innym ważnym układem badanym za pomocą technik relaksacyjnych jest wielowarstwowa i wielokomórkowa struktura pęcherza moczowego ropuchy (57, 70, 71, 127, 128) oraz błona pojedynczej ogromnej komórki, jaką jest olbrzymi akson kalmara (129—136).

Badania za pomocą technik impulsowych sztucznych błon lipidowych czy też izolowanych błon biologicznych stanowią ważne źródło informacji o mechanizmach rządzących funkcjonowaniem tak złożonej struktury jak natywna błona. Dlatego też techniki te znajdują coraz szersze zastosowanie w laboratoriach biologicznych na całym świecie.

Zaakceptowano do druku 26.03.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Minc S., Krysiński P., (1978), *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 5, 247—251.
2. Krysiński P., Minc S., (1979), *J. Electroanal. Chem.*, 100, 71—76.
3. Krysiński P., Minc S., (1980), w „Adsorpcja na elektrodach i inhibowanie reakcji elektrodowych. Materiały IV Symp. Sekcji Elektrochemicznej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Jabłonna 1977 r.”, red. Galus Z., str. 241—245, PWN, Warszawa—Łódź.
4. Minc S., Dołowy K., (1973), *Biophysik*, 9, 172—176.
5. Dołowy K., Minc S., (1975), *Biophysik*, 11, 341—345.
6. Dołowy K., Minc S., (1976), *Studia Biophysica*, 60, 35—40.
7. Van Wagenen R. A., Andrade J. D., Hibbs J. B., (1976), *J. Electrochem. Soc.*, 123, 1438—1444.
8. Singer S. J., Nicolson G. L., (1972), *Science*, 175, 720—731.
9. Nicolson G. L., (1973), *J. Cell Biol.*, 57, 373—387.
10. Gondko R., Słomiany B., Ślaska K., (1972), *Postępy Biochemii*, 18, 351—374.
11. Israelachvili J. N., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 469, 221—225.
12. Borkowska M. J., (1977), *Postępy Biologii Komórki*, 4, 185—220.
13. Danielli J. F., Davson H., (1935), *J. Cell. Comp. Physiol.*, 5, 495—508.
14. Forsyth P. A., Marčelja S., Mitchell D. J., Ninham B. W., (1977).. *Biochim. Biophys. Acta*, 469, 335—344.

15. Gruen D. W. R., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **595**, 161—183.
16. Büldt G., Wohlgenuth R., (1981), *J. Membrane Biol.*, **58**, 81—100.
17. Coster H. G. L., Smith J. R., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **373**, 151—164.
18. Koryta J., Dvořák J., Boháčková V., (1980), w *Elektrochemia*, str. 181—211, PWN, Warszawa.
19. Barański A., i inni, (1980), w *Chemia fizyczna*, red. Bielański A., i inni, 4 wyd., str. 1016—1041, PWN, Warszawa.
20. Kortüm G., (1970), w *Elektrochemia*, str. 445—459, PWN, Warszawa.
21. Sparnaay M. J., (1972), w *The electrical double layer. The international encyclopedia of physical chemistry and chemical physics*, red. Eley D. D., Tompkins F. C., str. 1—19, Pergamon Press.
22. Jakuszewski B., (1962), w *Współczesne zagadnienia elektrochemii teoretycznej*, str. 197—229, PWN, Warszawa.
23. Wiese G. R., James R. O., Yates D. E., Healy T. W., (1976), w *Physical chemistry. Series Two*, 6, red. O'M. Bockris, str. 62—72, Butterworths, London.
24. Wnuk W., (1974), *Postępy Biochemii*, **20**, 425—458.
25. Fuhrman G. F., (1965), w *Cell Electrophoresis Symp. Brit. Biophys. Soc.*, red. Ambrose E. J., str. 85—98, Churchill, London.
26. Sachtleben P., (1965), w *Cell Electrophoresis Symp. Brit. Biophys. Soc.*, red. Ambrose E. J., str. 100—114, Churchill, London.
27. Straub E., (1965), w *Cell Electrophoresis Symp. Brit. Biophys. Soc.*, red. Ambrose E. J., str. 125—140, Churchill, London.
28. Steck T. L., (1974), *J. Cell Biol.*, **62**, 1—19.
29. Heard D. H., Seaman G. V. F., (1960), *J. Gen. Physiol.*, **43**, 635—654.
30. Dołowy K., Holly F. J., (1978), *J. theor. Biol.*, **75**, 373—380.
31. Dołowy K., (1980), w *Cell Adhesion and Motility*, Third Symp. of the Brit Soc. for Cell Biol., red. Curtis A. S. G., Pitts J. D., str. 39—63, Cambridge University Press, Cambridge.
32. Dołowy K., Godlewski Z., (1980), *J. theor. Biol.*, **84**, 709—723.
33. Montal M., Mueller P., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **69**, 3561—3566.
34. Fettiplace R., Andrews D. M., Haydon D. A., (1971), *J. Membrane Biol.*, **5**, 227—296.
35. Bretscher M., (1972), *Nature, New Biol.*, **236**, 11—12.
36. Träuble H., Grell E., (1971), *Neurosci. Res. Program Bull*, **9**, 373—380.
37. Montal M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 750—754.
38. Neher E., (1974), *Biochim Biophys. Acta*, **373**, 327—336.
39. Sherwood D., Montal M., (1975), *Biophys. J.*, **15**, 417—434.
40. Benz R., Fröhlich O., Läuger P., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 323—334.
41. Rowin J. G., Rudniew W. S., Bagawiejew I. A., Kołpakowa A. F., (1979), *Kołodnyj Żurnał*, **4**, 808—811.
42. Ksienżek O. S., Omielczenko A. M., Koganow M. M., (1974), *Dokł. A.N. ZSRR*, **218**, 219—221.
43. Weissman G., Sessa G., Weissman S., (1965), *Nature*, **208**, 649—651.
44. Van Zutphen H., Merola A. J., Brierley G. P., Cornwell D. G., (1972), *Arch. Bioch. Biophys.*, **152**, 755—766.
45. Pressman B. C., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 1283—1288.
46. Eisenman G., Ciani S. M., Szabo G., (1969), *Fed. Proc.*, **27**, 1289—1304.
47. Eisenman G., Ciani S. M., Szabo G., (1969), *J. Membrane Biol.*, **1**, 294—345.
48. Ciani S. M., Eisenman G., Szabo G., (1969), *J. Membrane Biol.*, **1**, 1—36.

49. Szabo G., Eisenman G., Ciani S. M., (1969), *J. Membrane Biol.*, **1**, 346—382.
50. Benz R., Lauger P., (1976), *J. Membrane Biol.*, **27**, 171—191.
51. Boheim G., Irmischer G., Jung G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 485—506.
52. Feldberg S. W., Kissel G., (1975), *J. Membrane Biol.*, **20**, 269—300.
53. Knoll W., Stark G., (1977), *J. Membrane Biol.*, **37**, 13—38.
54. Pedersen C. J., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 1305—1309.
55. Hunter M. J., (1974), w *Drugs and transport processes*, red. Callingham B. A., str. 227—240, Macnullan, London.
56. Sandblom J., Hagglund J., Eriksson N. E., (1975), *J. Membrane Biol.*, **23**, 1—19.
57. Pilla A. A., Margules G. S., (1977), *J. Electrochem. Soc.*, **124**, 1697—1706.
58. Mueller P., Rudin D. O., (1969), w *Laboratory techniques in membrane biophysics*, red. Passow H., Stampfi R., str. 141—156, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y.
59. Ti Tien H., (1971), w *Surface and colloid science*, red. Matijević E., t. 4, str. 361—423, Wiley and Sons. N.Y.
60. Harrison R., Lunt G. G., (1980), w *Błony biologiczne, struktura i funkcje*, str. 36—53, 174—180, PWN, Warszawa.
61. McIntosh T. J., Simon S. A., MacDonald R. C., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 445—463.
62. Galus Z., (1977), w *Teoretyczne podstawy elektroanalizy chemicznej*, str. 105—110, PWN, Warszawa.
63. Benz R., Cros D., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **506**, 265—280.
64. Stanton W. A., (1969), w *Technika impulsów*, str. 84—92, WKŁ, Warszawa.
65. Baranowski J., (1970), w *Półprzewodnikowe układy impulsowe*, str. 20—35, WNT, Warszawa.
66. Phillips L. F., (1969), w *Elektronika w laboratoriach fizycznych, chemicznych i biologicznych*, str. 23—29, PWN, Warszawa.
67. Rajski C., (1971), w *Teoria obwodów*, str. 82—86, WNT, Warszawa.
68. Kurzawa S., (1971), w *Liniowe obwody elektryczne*, str. 56—108, 139—172, 184—231, PWN, Warszawa.
69. Atabiekow G. J., (1967), w *Teoria liniowych obwodów elektrycznych*, str. 72—86, 131—200, 359—385, 417—474, WNT, Warszawa.
70. Pilla A. A., (1970), *J. Electrochem. Soc.*, **117**, 467—477.
71. Doblhofer K., Pilla A. A., (1972), *J. Electroanal. Chem.*, **39**, 91—102.
72. De Gier J., Mandersloot J. G., Van Deenen L. L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 666—675.
73. Bean R. C., Shepherd W. C., Chan H., (1968), *J. Gen. Physiol.*, **52**, 495—508.
74. Rand R. P., Luzzati V., (1968), *Biophys. J.*, **8**, 125—137.
75. Darke A., Finer E. G., Flook A. G., Phillips M. C., (1972), *J. Mol. Biol.*, **63**, 265—279.
76. Hladky S. B., Haydon D. A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **318**, 464—468.
77. Szabo G., (1974), *Nature*, **252**, 47—49.
78. Benz R., Fröhlich O., Lauger P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 465—481.
79. Benz R., Lauger P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **468**, 245—258.

80. Haydon D. A., Myers V. B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 429—443.
81. Levine B. A., Sackett J., Williams R. J. P., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **550**, 201—211.
82. Neher E., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 540—544.
83. Kolb H. A., Lauger P., Bamberg E., (1975), *J. Membrane Biol.*, **20**, 133—154.
84. Andersen O. S., Barret E. W., Weiss L. B., (1981), *Biophys. J.*, **33**, 63a.
85. Andersen O. S., Procopio J., (1980), *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **481**, 27—35.
86. Urban B. W., Hladky S. B., Haydon D. A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 331—354.
87. Rudnev V. S., Ermishkin L. N., Fonina L. A., Rovin Yu. G., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **642**, 196—202.
88. Boheim G., (1974), *J. Membrane Biol.*, **19**, 277—303.
89. Hall J. E., (1975), *Biophys. J.*, **15**, 934—939.
90. Roy G., (1975), *J. Membrane Biol.*, **24**, 71—85.
91. Mueller P., (1976), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **264**, 247—265.
92. Gisin B. F., Kobayashi S., Hal J. E., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 115—119.
93. Jung G., Konig W. A., Leibfritz D., Ooka T., Janko K., Boheim G., (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **433**, 164—181.
94. Boheim G., Janko K., Leibfritz D., Ooka T., Konig W. A., Jung G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **433**, 182—199.
95. Irmsher G., Bovermann G., Boheim G., Jung G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 470—484.
96. Finkelstein A., Andersen O. S., (1981), *J. Membrane Biol.*, **59**, 155—171.
97. Bamberg E., Apell H. J., Alpes H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2402—2406.
98. Bamberg E., Lauger P., (1973), *J. Membrane Biol.*, **11**, 177—194.
99. Levitt D. G., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **373**, 115—131.
100. Urban B. W., Hladky S. B., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **554**, 410—429.
101. Eisenman G., Sandblom J., Neher E., (1978), *Biophys. J.*, **22**, 307—340.
102. Rigaud J. L., Gary-Bobo C. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **469**, 246—256.
103. Benyousef M., Rigaud J. L., Gary-Bobo C. M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 219—229.
104. Rothstein A., Cabantchik Z. J., Knauf P., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 3—10.
105. Benz R., Hancock R. E. W., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 298—308.
106. Benz R., (1981), w *Transport in biomembranes. Model systems and reconstruction*, School on Fundamental Aspects of Membrane Phenomena, 2nd Course, Italy.
107. Benz R., Ishii, Nakae T. M., (1980), *J. Membrane Biol.*, **56**, 19—29.
108. Benz R., Janko K., Lauger P., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 238—247.
109. Lea E. J. A., Rich G. T., Segrest J. P., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **382**, 41—50.

110. Miller C., (1981), w *Transport in biomembranes. Model systems and reconstitution*, School of Fundamental Aspects of Membrane Phenomena, 2nd Course, Italy.
111. Lakey J. H., Watts J. P., Lea E. J. A., James R. P., (1981), *ibid.*
112. Parisi M., Reader T. A., De Robertis E., (1972), *J. Gen. Physiol.*, **60**, 454—470.
113. Kemp G., Dolly J. O., Barnard E. A., Wenner C. E., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **54**, 607—613.
114. Reader T. A., De Robertis E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **352**, 192—201.
115. Nelson N., Anholt R., Lindstrom J., Montal M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **77**, 3057—3061.
116. Lidgard G. P., Jones M. N., (1975), *J. Membrane Biol.*, **21**, 1—10.
117. Schindler H., Quast U., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3052—3056.
118. Schindler H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 316—336.
119. Nakae T., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **71**, 877—884.
120. Hancock R. E. W., Decad G. M., Nikaido H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **554**, 323—331.
121. Takahashi F., Kikuchi R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 490—500.
122. Fong F. K., Winograd N., (1976), *J. Am. chem. Soc.*, **98**, 2287—2289.
123. Aizawa M., Suzuki N., Hirano M., Suzuki S., (1978), *Electrochimica Acta*, **23**, 1061—1065.
124. Kaplan T. A., Mahanti S. D., (1975), *J. Chem. Physics*, **62**, 100—107.
125. Moore L. E., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 115—123.
126. Knoll W., Stark G., (1977), *J. Membrane Biol.*, **37**, 13—28.
127. Bobrycki V. A., Mills J. W., Macknight A. D. C., DiBona D. R., (1981), *J. Membrane Biol.*, **60**, 21—33.
128. DiBona D. R., Sherman B., Bobrycki V. A., Mills J. W., Macknight A. D. C., (1981), *J. Membrane Biol.*, **60**, 35—44.
129. Chandler W. K., Meves H., (1965), *J. Physiol.*, **180**, 788—820.
130. Benz R., Conti F., (1981), *J. Membrane Biol.*, **59**, 91—104.
131. Landowne D., Scruggs V., (1978), *Biophys. J.*, **21**, 40a.
132. Landowne D., Scruggs V., (1981), *J. Membrane Biol.*, **59**, 79—89.
133. Landowne D., (1977), *J. Physiol.*, **266**, 43—68.
134. Meves H., (1974), *J. Physiol.*, **243**, 847—867.
135. Hodgkin A. L., Huxley A. F., (1952), *J. Physiol.*, **117**, 500—544.
136. Keynes R. D., Rojas E., (1974), *J. Physiol.*, **239**, 393—434.

KOMUNIKAT

Komisji Słownictwa Biochemicznego P.T. Bioch.

Na określenie masy cząsteczki używa się albo terminu „masa cząsteczkowa” albo „względna masa cząsteczkowa” dawniej określana jako „ciężar cząsteczkowy”). Masę cząsteczkową wyraża się w atomowych jednostkach masy — daltonach (Da). $1 \text{ Da} = 1/12$ masy nuklidu $^{12}_6\text{C}$. Względna masa cząsteczkowa jest to stosunek masy cząsteczkowej do $1/12$ masy nuklidu $^{12}_6\text{C}$, a więc jest wielkością niemianowaną.

Wyznaczając masę cząsteczki w drodze porównania jej pozycji na elektroforegramie, profilu elucji lub ultrawirowania otrzymujemy wartości względnej masy cząsteczkowej.

EUGENIA HERZYK *)

Fosforylacja białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich

Phosphorylation of the Human Erythrocyte Membrane Proteins

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Metodyka badań fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich
- III. Fosforylacja spektryny
 - III-1. Charakterystyka spektryny.
 - III-2. Spektryna jako fosfoproteina
 - III-3. Fizjologiczna rola fosforylacji spektryny
- IV. Fosforylacja głównego białka pasma 3
 - IV-1. Charakterystyka białka pasma 3
 - IV-2. Białko pasma 3 jako fosfoproteina
 - IV-3. Udział białka pasma 3 w procesach transportu przez błonę
- V. Fosforylacja glikoforyny
 - V-1. Charakterystyka glikoforyny
 - V-2. Glikoforyna jako fosfoproteina
- VI. Fosforylacja białek pasm 4.5 i 4.8
- VII. Fosforylacja białka 150 000
- VIII. Fosforylacja białka pasma 2.1
- IX. Mechanizm fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich
 - IX-1. Niezależne od obecności cAMP błonowe kinazy białkowe
 - IX-2. Zależna od obecności cAMP błonowa kinaza białkowa
 - IX-3. Cytoplazmatyczne kinazy białkowe
 - IX-4. Fosfatazy fosfoproteinowe
- X. Stopień fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich
- XI. Patologiczne aspekty fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich

Contents

- I. Introduction
- II. Methods for investigation of the phosphorylation of the human erythrocyte membrane proteins
- III. Phosphorylation of spectrin
 - III-1. Characteristics of spectrin
 - III-2. Spectrin as a phosphoprotein
 - III-3. Physiological role of the phosphorylation of spectrin
- IV. Phosphorylation of band 3 protein
 - IV-1. Characteristics of band 3 protein

- IV-2. Band 3 protein as a phosphoprotein
- IV-3. The role of band 3 protein in membrane transport processes
- V. Phosphorylation of glycophorin
 - V-1. Characteristics of glycophorin
 - V-2. Glycophorin as a phosphoprotein
- VI. Phosphorylation of band 4.5 and 4.8 proteins
- VII. Phosphorylation of 150 000 protein
- VIII. Phosphorylation of band 2.1 protein
- IX. Mechanism of the phosphorylation of the human erythrocyte membrane proteins
 - IX-1. cAMP-independent membrane bound protein kinases
 - IX-2. cAMP-dependent membrane bound protein kinase
 - IX-3. Cytoplasmic protein kinases
 - IX-4. Phosphoprotein phosphatases
- X. Degree of the phosphorylation of the human erythrocyte membrane proteins
- XI. Pathological aspects of the phosphorylation of the human erythrocyte membrane proteins

I. Wstęp

W 1971 roku Palmer i Verpoorte stwierdzili (1), że część białek błony erytrocytów to fosfoproteiny. Późniejsze badania wykazały, że wiele innych błon komórkowych również zawiera ufosforylowane białka. Jak wiadomo, białka błony komórkowej odgrywają decydującą rolę w takich procesach jak transport przez błonę, rozpoznawanie komórek i komunikacja między nimi, kontrola wzrostu, podtrzymywanie kształtu i nadawanie ruchu komórce (2, 3). Wykazano doświadczalnie, że procesem regulującym aktywność przynajmniej niektórych białek błony komórkowej jest ich fosforylacja.

Błona komórkowa erytrocytów ludzkich jest dobrym obiektem badań ze względu na dostępność materiału biologicznego, możliwość izolowania bez cytoplazmatycznych zanieczyszczeń (4), oraz stosunkowo dobrą znajomość jej składników i struktury (5—10), a także właściwości fizykochemicznych (11—15). W niniejszym artykule scharakteryzowano białka błony erytrocytów ludzkich, ulegające fosforylacji oraz przedstawiono sugestie dotyczące fizjologicznej roli tego procesu.

II. Metodyka badań fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich

Badania fosforylacji białek błony erytrocytów ludzkich prowadzi się najczęściej poprzez znakowanie białek radioaktywnym fosforem ^{32}P pod-

*) Mgr, Pracownia Elektrochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa.

czas inkubacji cieni erytrocytów (tj. komórek pozbawionych cytoplazmy) z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ lub też całych komórek z $[\text{P}^{32}]\text{P}_i$. Następnie białka rozdziela się elektroforetycznie i oznacza ilość obecnego radioaktywnego fosforu w poszczególnych pasmach elektroforetycznych. Najdogodniejsze warunki rozdzielania białek błony erytrocytów uzyskano prowadząc elektroforezę w żelu poliakryloamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu. Większość białek wybarwia się błękitem Coomassie, glikoproteiny o dużej zawartości cukrów uwidaczniają się natomiast dopiero przy działaniu mieszaniną: kwas nadjodowy — odczynnik Schiffa. Szeroko została zaakceptowana nomenklatura pasm elektroforetycznych zaproponowana przez Stecka (7). Przedstawiona jest ona w tabeli 1. Prowadzi się także prace nad określeniem miejsc fosforylacyjnych poszczególnych białek m.in. stosując trawienie proteolityczne oraz analizę aminokwasów.

Tabela 1

Pasma elektroforetyczne, występujące podczas rozdzielania białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich w żelu poliakryloamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu (wg. nomenklatury Stecka (7)).

Czynnik wybarwiający	Numer pasma	Ciężar cząsteczkowy	Nazwa białka
błękit Coomassie	1	210—250 000	spektryna
	2	200—220 000	
	2.1	200 000	ankyryna
		150 000	
	3	88—105 000	aktyna G3PD
	4.1	78 000	
	4.2	72 000	
	4.5	50—58 000	
	4.8	45—50 000	
	5	43 000	
6	35 000		
7	29 000		
mieszanina: kwas nadjodowy — odczynnik Schiffa	PAS-1	83 500—90 000	glikoforyna
	PAS-2	50—64 000	
	PAS-3	30 000	
	PAS-4	70 000	

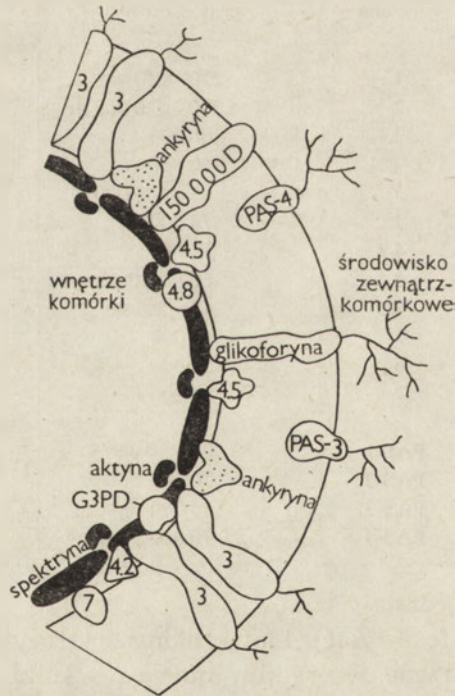
Rezultaty badań fosforylacji białek błony erytrocytów znacznie różnią się między sobą. Przede wszystkim inne są wyniki badań fosforylacji białek cieni oraz białek błony całych erytrocytów, co wydaje się być wywołane m.in. obecnością cytoplazmatycznych kinaz białkowych (16, 17). Ponadto fosforylacja cieni erytrocytów bardzo zależy od warunków ich otrzymywania i inkubacji z donorem grup fosforanowych (18—21).

III. Fosforylacja spektryny

III-1. Charakterystyka spektryny

Marchesi i Steers pierwsi wyizolowali spektrynę z błony komórkowej erytrocytów ludzkich (22). Stwierdzili oni, że spektryna stanowi około 20% wszystkich białek błony oraz że polimeryzuje w obecności dwuwartościowych kationów, tworząc włókienka dobrze widoczne w mikroskopie elektronowym.

Podczas elektroforezy białek błony w żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu, spektryna migruje najwolniej i dzieli się na dwa pasma — pasmo 1 o ciężarze cząsteczkowym około 230 000 i pasmo 2 — 210 000 (6, 23). Używając antyspektrynowych przeciwciał połączonych z ferrytyną stwierdzono, (24), że spektryna jest białkiem peryferycznym, tzn. położonym na dwuwarstwie lipidowej i luźno z nią związanym, umiejscowionym od strony cytoplazmy (Ryc. 1). Jest ona rozpuszczalna w wodzie i ulega wymyciu z błony przy zastosowaniu roztworów o niskiej sile jonowej lub zawierających kwas etylenodwuamionoczeroctowy (22, 23, 25).



Ryc. 1. Rozmieszczenie białek w błonie komórkowej erytrocytów ludzkich.

Podano nazwę białka lub numer pasma, jakie ono tworzy podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu. Sieć spektrynowo-aktynową zaznaczono kolorem czarnym. Od zewnętrznej strony błony uwidoczniono łańcuchy policukrowe. Dla przejrzystości rysunku nie przedstawiono dwuwarstwy lipidowej.

Jest wiele danych potwierdzających hipotezę, że spektryna odgrywa główną rolę w podtrzymywaniu struktury błony i zarazem kształtu erytrocytów (22, 26—29). I tak w temperaturze około 50°C, przy której spektryna zmienia swoją konformację (27), następuje skokowe zmniejszenie zdolności do deformacji komórek, drastyczne zmniejszenie elastyczności błony oraz spadek odporności na hipotoniczną i mechaniczną hemolizę a także gwałtowna zmiana parametrów elektrochemicznych błony (15, 26, 27, 30—38). Podobne zmiany właściwości błony obserwuje się przy wartościach pH mniejszych od 5.5, przy których spektryna ulega agregacji i izoelektrycznemu strąceniu (39—41). O tym, że spektryna odgrywa decydującą rolę w określaniu struktury błony świadczy również fakt, że niemożliwe jest uzyskanie cieni erytrocytów w warunkach wywołujących utratę lub denaturację spektryny (29), a ekstrakcja spektryny z cieni powoduje ich fragmentację (22).

Spektryna polimeryzuje tworząc tetramery — (białko pasma 1 + białko pasma 2)₂ (42, 43), oddziałuje także specyficznie z aktyną (46—49) — również peryferycznym białkiem, mającym ciężar cząsteczkowy 43 000, stanowiącym 4% białek błony (7, 44, 45). Podczas elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecylu aktyna migruje jako pasmo 5. Na podstawie stwierdzonych oddziaływań spektryny z aktyną i faktu polimeryzacji spektryny wnioskuje się, że spektryna i aktyna tworzą sieć przymocowaną do błony od strony cytoplazmy, wpływającą na kształt i zdolność erytrocytów do deformacji (9, 25, 26, 30, 39, 45, 46, 50—54). Przedstawia się przy tym często analogię z funkcjonowaniem miozyny i aktyny mięśni (55, 56), do których pod wieloma względami są podobne spektryna i białko pasma 5 erytrocytów (49).

III-2. Spektryna jako fosfoproteina

Badania włączania ³²P do białek błony podczas inkubacji cieni erytrocytów z [γ -³²P] ATP wykazały, że najsilniejsze znakowanie występuje w białku pasma 2 spektryny (18, 21, 57—59). Do fosforylacji spektryny nieodzowna jest obecność co najmniej 10⁻⁴ M Mg²⁺, proces ten jest stymulowany przez jony jednowartościowe (Na⁺, K⁺, Li⁺, NH₄⁺) oraz jony Ca⁺ w niskich stężeniach (18). Zostało dowiedzione, że cAMP nie ma wpływu na fosforylację spektryny (18, 57—59). Spektryna ulega także znakowaniu podczas inkubacji całych erytrocytów ludzkich z [³²P]P_i (60—63), co pozwala przypuszczać, że jest ona fosforylowana *in vivo*.

Fosforylacja spektryny zachodzi specyficznie w pojedynczym fragmencie cząsteczki. Po trawieniu białka przez CNBr radioaktywny fosfor znajduje się we fragmencie o ciężarze cząsteczkowym 19 000, natomiast po trawieniu przez trypsynę — we fragmencie o ciężarze cząsteczkowym 4800 (65).

Badania Dunbara i Ralstona (62) nad włączaniem ^{32}P do spektryny podczas inkubacji erytrocytów z $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ prowadzono drogą analizy radioaktywności frakcji białek rozpuszczalnych w wodzie, rozdzielonych na kolumnie. Chromatograficzne rozdzielenie wykazało pięć frakcji, które zidentyfikowano stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu (Tabela 2). Autorzy rozróżnili dwa typy połączenia P_i ze spektryną — kowalencyjne i niekowalencyjne. Pierwsze z nich, opisywane także przez innych badaczy (18, 63, 65), reprezentujące fosforylację reszt serynowych (90%) i treoninowych (10%) spektryny, występuje w każdym stanie agregacji tego białka (wysocze spolimeryzowany — frakcja I, tetramery — frakcja II, dimery — frakcja III). Niekowalencyjne połączenie P_i ze spektryną, będące w zasadzie asocjacją cząsteczek ATP, obserwowano tylko w przypadku spolimeryzowanej spektryny, występującej we frakcji I. Badacze sugerowali, że ATP jest związany ze spektryną za pośrednictwem aktyny, gdyż stężenia ATP i aktyny we frakcji I są sobie równe.

Tabela 2

Chromatograficzne rozdzielenie rozpuszczalnych w wodzie białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich (62).

Numer frakcji	Białka
I	spolimeryzowana spektryna, białka pasm 4.5 i 5
II	tetramery spektryny
III	dimery spektryny
IV	białka pasm 4.5, 5 i 7
V	hemoglobina

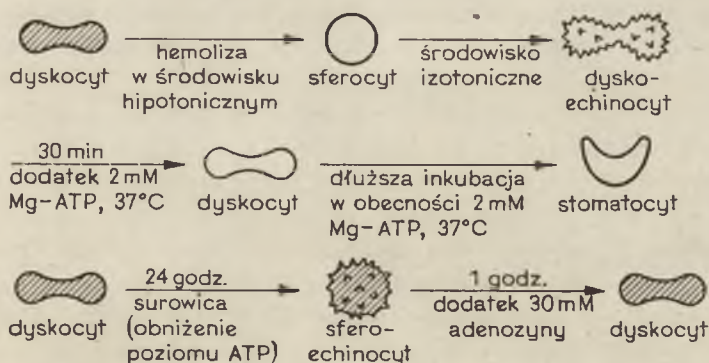
III-3. Fizjologiczna rola fosforylacji spektryny

Fosforylacja spektryny odgrywa doniosłą rolę w konformacji sieci spektrynowo-aktynowej. Stwierdzono, że usunięcie grup fosforanowych z wyizolowanej z błony spektryny uniemożliwia jej interakcję z aktyną (47). Obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATP lub inkubacja erytrocytów w temperaturze około 50°C , przy której następuje drastyczne zmniejszenie stopnia fosforylacji spektryny, zmniejsza wydajność ekstrakcji tego białka z błony (57, 73).

Siec spektrynowo-aktynowa, której konformację warunkuje fosforylacja spektryny, jest prawdopodobnie odpowiedzialna za kształt, podatność na deformację i stabilność struktury erytrocytów (68—72). Świadczy o tym zarówno stwierdzony od dawna wpływ poziomu ATP na te parametry komórek (68—72), jak i bezpośrednia korelacja między stopniem fosforylacji spektryny, zależnym od stężenia ATP a kształtem erytrocytów (57) (Ryc. 2). Obniżenie poziomu ATP w komórce pociąga jednak za sobą wiele innych efektów, które maskują defosforylację spektryny.

Obserwuje się na przykład znaczny wzrost stężenia jonów Ca^{2+} (52, 69), które w małych stężeniach stymulują fosforylację, ale w dużych powodują specyficzne sieciowanie (ang. *cross-linking*) spektryny (74). Sugeruje się też pośredni wpływ jonów wapnia na sieć spektrynowo-aktynową wskutek ich oddziaływania z innymi białkami błony (75). Stwierdzono również wpływ jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} na konformację czystej spektryny lub wyizolowanego polimeru spektrynowo-aktynowego. Obecnością tych efektów maskujących można tłumaczyć stwierdzony w pracy (203) brak powiązań między kształtem i deformacyjnością erytrocytów a poziomem ATP.

Znaczące są prace Sheetza i Singera (64, 76), którzy badali zmiany kształtu cieni erytrocytów pod wpływem ATP (Ryc. 2). Zmiany te zależą od obecności jonów Mg^{2+} i są proporcjonalne do ilości włączonego ^{32}P z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ do spektryny. Ponieważ podobne zmiany kształtu cieni erytrocytów wywołuje dodanie antyspektrynowych przeciwciał, badacze ci sugerowali, że ATP poprzez fosforylację spektryny wpływa na utworzenie spektrynowo-aktynowej sieci. Powiązanie zjawiska utworzenia sieci ze zmianą kształtu cieni opierali oni na wysuniętej wcześniej koncepcji sprzężonej dwuwarstwy (ang. *bilayer couple*) (77, 78). Hipoteza ta sugeruje, że o kształcie erytrocytu decyduje stosunek powierzchni zewnętrznej do wewnętrznej warstwy błony. Gdy jest on większy od jedności, komórka przyjmuje kształt echinocyta (inaczej ang. *crenate*, dosłownie karbowany), gdy jest mniejszy od jedności — kształt sferyczny lub stomatocyta (inaczej ang. *cup*, dosłownie filiżanki). Pomędzy tymi kształtami istnieje występujący normalnie *in vivo* kształt erytrocytu — dwuwklęsłego dysku (dyskocyt). Zniszczenie sieci spektrynowo-aktynowej pod wpływem obniżenia poziomu ATP powodowało by zmniejszenie powierzchni wewnętrznej warstwy błony i tym samym zmianę kształtu z dwuwklęsłego dysku do echinocyta.



Ryc. 2. Zmiany kształtu cieni erytrocytów (64, 76) i całych erytrocytów (57, 69) pod wpływem zmian poziomu ATP.

Całe komórki zakreskowano, cienie zaznaczono konturem.

Sieć spektrynowo-aktynowa warunkuje także uporządkowanie białek w błonie komórkowej erytrocytów, prawdopodobnie głównie białek pasm 3 i PAS-1 (25, 79—84). Zmiana konformacji sieci powoduje na przykład modyfikacje lateralnego ruchu integralnych białek błony. Może to być spowodowane zarówno oddziaływaniem typu sieć — białko, jak sugerowano w niektórych pracach (25, 81), jak i wpływem tej sieci na asocjację lipidów, która powoduje „wypychanie” białek z określonych obszarów matrycy lipidowej (92).

Biorąc pod uwagę stwierdzone oddziaływanie spektryny z lipidami (87—91) postuluje się (85), że sieć spektrynowo-aktynowa jest także odpowiedzialna za asymetryczny rozkład fosfolipidów w błonie erytrocytów. Zmiana konformacji sieci zwiększa bowiem usuwanie fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy (a więc fosfolipidów umiejscowionych głównie po cytoplazmatycznej stronie błony) przez fosfolipazę A_2 (97). Zjawisko to zachodzi na przykład przy działaniu na błonę czynników utleniających grupy SH, co prowadzi do połączenia spektryny w oligomery o ciężarze cząsteczkowym 10^6 i powoduje spadek jej fosforylacji (93—96). Również inne procesy, wywołujące defosforylację spektryny powodują zakłócenie asymetrycznego rozkładu fosfolipidów w błonie (86, 90, 98). Wcześniej podawano, że agregacja erytrocytów przez fitohemaglutyninę P, która zależy od organizacji strukturalnej fazy lipidowej błony, koreluje się ze stężeniem ATP w komórce (99). Prawdopodobnie jest to spowodowane zależnością konformacji sieci spektrynowo-aktynowej od wewnątrzkomórkowego poziomu ATP.

IV. Fosforylacja głównego białka pasma 3

IV-1. Charakterystyka białka pasma 3

Główne białko trzeciego pasma elektroforetycznego stanowi 25—30% białek błony erytrocytów ludzkich (6, 7, 21, 23) i ma ciężar cząsteczkowy 88 000—105 000 (6, 7, 23, 100—103). Zawiera aż 39% aminokwasów niepolarnych, jest więc bardziej hydrofobowe od typowych białek rozpuszczalnych w wodzie (100). Analiza białka pasma 3 wykazuje obecność 5—8% cukrów (9), białko to jest więc glikoproteiną (103, 104), ale w odróżnieniu np. od PAS-1 nie zawiera prawie wcale kwasu sjałowego (100). Białko pasma 3 jest białkiem integralnym (Ryc. 1), tzn. zanurzonym w dwuwarstwie lipidowej. Przechodzi ono całkowicie przez błonę, przy czym jego ułożenie jest asymetryczne (7, 52, 102, 105). Asymetrię tę reprezentuje przykładowo obecność łańcuchów cukrowych związanych z tym białkiem tylko od zewnętrznej strony błony (100, 103, 106). Białko pasma 3 jest podatne na atak obecnych w środowisku enzymów proteolitycznych (5, 94, 102, 105, 107—110) oraz na znakowanie czynnikami nie

przechodzącymi przez błonę (102, 111), co sugeruje, że część cząsteczki tego białka wystaje po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Ponadto odsłonięcie wewnętrznej strony błony (cienie, fragmenty błon, „odwrócone” pęcherzyki) zwiększa podatność białka pasma 3 na działanie enzymów i czynników znakujących (102) oraz umożliwia trawienie tego białka przez trypsynę (105). Świadczy to, że białko pasma 3 wystaje również po cytoplazmatycznej stronie błony. Białko pasma 3 jako integralne, nie wymywa się z błony przy działaniu kwasem etylenodwuaminoczerooctowym a także roztworami o wysokich pH, niskich czy wysokich siłach jonowych (51). Dopiero działanie detergentów (sodowy siarczan dodecyłu, Triton X-100) powoduje uwolnienie tego białka z błony (7, 112) bez otoczenia lipidowego (6, 23), przy czym niejonowy detergent Triton X-100 nie powoduje żadnych zmian konformacyjnych białka pasma 3 (113). Trudność wyekstrahowania białka pasma 3 świadczy o jego silnym związaniu z błoną, prawdopodobnie głównie siłami hydrofobowymi.

Pasma 3 jest homogenne pod wieloma względami (np. asocjacji 93) czy proteolitycznego trawienia (102, 105, 107), mimo to podczas elektroforetycznego rozdzielania występuje jako rozmyty szczyt, co prawdopodobnie wynika z różnych ilości przyłączonych doń cukrów (100, 106) lub niewielkich różnic między wspólnie migrującymi białkami (93, 114).

Wydaje się, że główne białko pasma 3 tworzy *in situ* niekowalencyjne dimery (7, 93, 94, 112, 115) — świadczy o tym możliwość łatwego indukowania wiązań dwusiarczkowych, łączących molekuly tego białka od wewnętrznej strony błony (93, 115). Izolacja białka pasma 3 przez detergenty nie zmienia jego asocjacji (116).

IV-2. Białko pasma 3 jako fosfoproteina

Zarówno inkubacja całych erytrocytów ludzkich z [³²P]P_i, jak i cieni z [³²P]ATP powoduje znaczną fosforylację białka pasma 3 (18, 21, 57—61), przy czym analiza aminokwasów wykazuje podobny rozkład radioaktywności w obu przypadkach. Stwierdzono, że znakowanie białka pasma 3 w cieniach jest większe niż w całych komórkach (17).

Fosforylacji ulega przede wszystkim seryna, w mniejszym stopniu treonina (63). Główne miejsce fosforylacyjne usytuowane jest w fragmencie 22 000 (63), otrzymywanym przez trawienie fragmentu 41 000, stanowiącego rozpuszczalny w wodzie produkt działania trypsyny na cienie (115). Inni autorzy (101) podają, że główne miejsce fosforylacyjne tego białka występuje w fragmencie 10 000, leżącym przy końcu NH₂, zanurzonym w cytoplazmie, a drugie miejsce w fragmencie 7000 blisko końca COOH (fragmentacja chymotrypsyną).

Różni badacze stwierdzali (21, 57, 58, 117) lub negowali (19, 21, 59) wpływ cAMP na fosforylację białka pasma 3. Zbadano, że jego fosforyla-

cję regulują jednowartościowe kationy, lecz dotąd nie poznano charakteru tej regulacji. I tak obserwowano zarówno zmniejszenie fosforylacji białka pasma 3 przez kationy jednowartościowe (18, 19), jak też stymulację fosforylacji tegoż białka przez Na^+ a defosforylacji przez K^+ (118). Badania wykazały, że Ca^{2+} hamuje fosforylację białka pasma 3 (19, 21).

IV-3. Udział białka pasma 3 w procesach transportu przez błonę

Jaką rolę spełnia białko pasma 3 w błonie komórkowej? Początkowo sugerowano, że ze względu na występowanie w błonie w znacznej ilości (rzędu 10^5 cząsteczek na komórkę) może ono pełnić strukturalną rolę (102). Późniejsze badania wykazały, że białko pasma 3 bierze udział w ułatwionej dyfuzji glukozy. Świadczy o tym znakowanie tego białka przez izotopowe pochodne inhibitorów transportu glukozy, takich jak D-glukozyloizotiocyanian (119) i cytochalazyna B (120).

C a b a n t c h i k i R o t h s t e i n wykazali (114, 121—123), że białko pasma 3 jest także odpowiedzialne za transport anionów przez błonę. Znaleźli oni inhibitor tego transportu, wiążący się kowalencyjnie z błoną — kwas 4,4'-dwuizotiocyjano-2,2'-stilbenodwusulfonowy (DIDS) i pokazali, że jego izotopowa pochodna w 95% znakuje białko 95 000. Przez proteolityczne trawienie owego kompleksu (chymotrypsyna, pronaza), wykazali, że miejsce wiążące znajduje się we fragmencie 65 000, występującym po zewnętrznej stronie błony. Po działaniu chymotrypsyną na cienie pozbawione peryferycznych białek, odnajduje się ono we fragmencie 15 000 i jest odległe o fragment o ciężarze cząsteczkowym 9000 od końca COOH i o fragment o ciężarze cząsteczkowym 6000 od NH_2 końca (124). Ponieważ miejsce wiążące DIDS musi znajdować się blisko zewnętrznej powierzchni błony, fragment ten jest zapewne pozwijany i przechodzi przez błonę kilkakrotnie.

Zakładając prosty mechanizm transportu anionów poprzez błonę i znając jego szybkość można wyliczyć, że konieczny jest udział w tym transporcie około 10^5 „miejsz” w błonie (104). Tylko dwa białka występują w takiej ilości — białko pasma 3 i spektryna, przy czym udział spektryny w transporcie jest wątpliwy, jako że jest ona białkiem peryferycznym. Sugeruje się, że transport anionów nie odbywa się przez rotację białka pasma 3, gdyż jak wykazano jest ono unieruchomione w błonie, ale raczej przez ruch jonów wzdłuż cząsteczki tego białka (104). Z badań nad zależnością pojemności cieplnej błon erytrocytów ludzkich od temperatury wynika, że inhibitory anionowego transportu zmieniają przejścia fazowe fosfolipidów prawdopodobnie znajdujących się blisko białka pasma 3, przy czym inhibitory kowalencyjne (jak np. DIDS) i niekowalencyjne (np. środki znieczulające) działają z różną efektywnością (125).

Białko pasma 3 bardzo mocno oddziałuje z lipidami (126), może więc to być wywołane zmianą jego konformacji. Ciekawe, że jony Ca^{2+} i Mg^{2+} modułują transport anionów (127), co tłumaczy się ich oddziaływaniem z białkiem odpowiedzialnym za transport.

Białko pasma 3 bierze także udział w transporcie wody do erytrocytów (128). Możliwe zatem, że pasmo 3 jest zespołem białek o podobnym ciężarze cząsteczkowym, położeniu i orientacji spełniających różne specyficzne funkcje związane z transportem przez błonę (114). Jest prawdopodobne, że procesem stymulującym ów transport jest fosforylacja określonego białka. Słuszność tych przypuszczeń potwierdza fakt, że podczas elektroforezy białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich, w tym samym miejscu co inhibitory transportu glukozy, anionów i wody, znajduje się również białko o aktywności ATP-azy aktywowanej przez Na^+ , K^+ i Mg^{2+} (90). Obserwuje się przy tym ścisły związek reakcji tej ATP-azy z fosforylacją białka pasma 3 przez ATP (90). ATP-aza aktywowana przez Na^+ , K^+ i Mg^{2+} odpowiada za aktywny transport jednowartościowych kationów, ponieważ występuje stechiometryczna zależność między hydrolizą ATP a transportem $3\text{Na}^+ + 2\text{K}^+$, a obie reakcje hamowane są przez te same czynniki (129—131). O identyczności białka pasma 3 i ufosforylowanego produktu pośredniego w układzie ATP-azy aktywowanej przez Na^+ , K^+ i Mg^{2+} świadczyć może bardzo duża szybkość wymiany grup fosforanowych związanych z tym białkiem (18, 118). Hipotezę taką potwierdza wpływ jonów Na^+ , K^+ i Mg^{2+} na fosforylację białka pasma 3 (Na^+ stymuluje fosforylację, K^+ — defosforylację) oraz inhibicja defosforylacji tego białka przez strofantynę G — czynnik blokujący transport jednowartościowych jonów przez błonę (118). Interesujący jest również stymulujący wpływ wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} na przepuszczalność błony dla jonów K^+ . Związanie jonu Ca^{2+} z określonym błonowym receptorem powoduje „otwarcie” kanału dla K^+ (132—134). Z drugiej strony wiadomo, że jony Ca^{2+} , jak to podano wcześniej, w istotny sposób stymulują defosforylację białka pasma 3 (19, 21). Niektórzy autorzy twierdzą jednak, że białko pasma 3 nie może być acylofosforanowym produktem pośrednim ATP-azy (58), gdyż związane z nim fosforany znakowane ^{32}P nie są uwalniane podczas działania hydroksyloaminą (135), czy też w temperaturze 25°C oraz $\text{pH} = 7.4$ (118).

Fosforylacja białka pasma 3 może wpłynąć także na metabolizm komórkowy, ponieważ *in vitro* białko to jest zasocjowane po cytoplazmatycznej stronie błony z dehydrogenazą aldehydu fosfoglicerynowego (G3PD, białko wędrujące podczas elektroforezy białek błony erytrocytów w żelu poliakryloamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu jako pasmo 6) (116, 136) oraz z aldolazą (137). Miejsca wiążące występują prawdopodobnie blisko miejsc fosforylacyjnych białka pasma 3 (116, 137). Asocjacja ta ma prawdopodobnie charakter elektrostatyczny, gdyż zanika przy podwyższeniu siły jonowej. Nie można wykluczyć jednak specyficz-

nych oddziaływań między białkiem pasma 3 a G3PD i aldolazą, ze względu na to, że enzymy te mogą być uwalniane z cytoplazmatycznej strony błony przez niektóre produkty pośrednie glikolizy (136, 138).

V. Fosforylacja glikoforyny

V-1. Charakterystyka glikoforyny

Glikoforyna (ang. *glycophorin*) jest główną glikoproteiną błony komórkowej erytrocytów ludzkich (23, 139). Została ona po raz pierwszy scharakteryzowana w pracach Marchesi i wsp. (139). Znana jest sekwencja aminokwasów tego białka (104, 140). Zawiera ona 64% cukrów, w tym aż 28% kwasu sjałowego (7), co stanowi 90% całego kwasu sjałowego obecnego w błonie erytrocytu (103). Ciężar cząsteczkowy glikoforyny wynosi 50 000—64 000 (7, 139, 141, 142). Sugeruje się, że niedokładność oznaczenia wynika z różnic warunków rozpuszczania błony (141). Wcześniej podawano wartości 83 500—90 000 (23, 102, 111), ale okazało się, że wędrujące jako osobne pasma elektroforetyczne w żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu PAS-1 i PAS-2 są w rzeczywistości różnymi formami tej samej cząsteczki (141). PAS-1 migruje w rejonie pasma 3 (7, 60), ale jako białko bogate w cukry nie wybarwia się błękitem Coomassie. Jego obecność można wykryć mieszaniną: kwas nadjodowy — odczynnik Schiffa. Glikoforyna występuje w ilości około 5 000 000 cząsteczek na komórkę (7) w postaci oligomerów (143). Trawienie proteolityczne (5, 94, 105, 107, 144) oraz znakowanie przez FMMP (102, 110, 111) wykazało, że podobnie jak białko pasma 3, glikoforyna penetruje dwuwarstwę lipidową (Ryc. 1). Białko to jest ułożone w błonie asymetrycznie (52, 105, 139, 142, 145) z cukrami zwróconymi na zewnątrz komórki (106). Koniec COOH znajduje się od strony cytoplazmy, koniec NH₂ od strony zewnętrznej komórki (142, 146). Glikoforyna jest bardzo mocno związana z błoną — nawet jej modyfikacja czy denaturacja nie powodują ekstrakcji z błony (147), wmywana jest dopiero przez detergenty (51). Szczególnie silnie z glikoforyną jest związany fosfatydyloinozytol (60). Orientacja glikoforyny w błonie oraz jej zdolności receptorowe (np. wobec wirusa grypy, przeciwciał, aglutynin (7, 103)) wydają się mieć duże znaczenie (139). Miejscami receptorowymi są cukry, z których kwas sjałowy, będący końcowym cukrem wielu łańcuchów oligosacharydowych, jak wiadomo, nadaje również ładunek powierzchni komórki (145, 148).

V-2. Glikoforyna jako fosfoproteina

Stwierdzono (60, 63), że glikoforyna jest również fosfoproteina. Niektórzy badacze podawali, że podczas inkubacji cieni erytrocytów z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, jak i całych komórek z $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ uzyskuje się podobny rozkład znakowanych miejsc (60), natomiast inni uzyskiwali włączanie znakowanego fosforu do glikoforyny tylko w przypadku całych komórek (63). Tłumaczyć to można albo całkowitym zajęciem miejsc fosforylacyjnych w cieniach i bardzo wolną wymianą, jak też utratą podczas hemolizy komórki specyficznej kinazy, potrzebnej do fosforylacji glikoforyny.

Po fragmentacji oczyszczonej glikoforyny przez CNBr stwierdzono, że radioaktywność występuje we fragmencie 6000, złożonym z około 35 aminokwasów, wystającym ponad cytoplazmatyczną stroną błony (60, 63). Nie stwierdzono większego wpływu cAMP (60, 63) a także czynników zmieniających kształt erytrocytów lub modulujących aktywność enzymów na fosforylację glikoforyny (68). Nie wiadomo, czy fosforylacja glikoforyny spełnia jakąś fizjologiczną rolę. Bardzo mała ilość związanych z tym białkiem reszt fosforanowych (60, 63) sugeruje, że jest to mało prawdopodobne. Jednak trzeba zdawać sobie sprawę, że *in vivo* może być ona znacznie większa.

VI. Fosforylacja białek pasm 4.5 i 4.8

Elektroforetyczne rozdzielenie białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich w żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecyłu wykazuje pojawienie się kilku pasm wybarwiających się błękitem Coomassie z różną intensywnością, pomiędzy szerokim pasmem 3 a pasmem 5 (6, 7, 23, 63). Dodatek cAMP do cieni inkubowanych z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wywołuje pojawienie się radioaktywności dwóch białek z tego regionu — białka pasma 4.5 i 4.8 (17—19, 21, 57—61, 149, 150). Białka te stanowią 2—4% białek błony (58) i mają ciężar cząsteczkowy odpowiednio: białka pasma 4.5 — 50 000—58 000 (6, 19, 59), białko pasma 4.8 — 45 000—50 000 (6, 59). O ile białko pasma 4.5 jest prawdopodobnie mocno związane z błoną (nie wymywa się roztworami o niskich siłach jonowych (19), tylko częściowo jest usuwane przez czynniki denaturujące np. NaOH (147), to białko pasma 4.8 może być prawie całkowicie wyekstrahowane razem ze spektryną (117). Ilość grup fosforanowych związanych z tymi białkami maleje w obecności jednowartościowych kationów i jonów Ca^{2+} (19, 20) i osiąga maksimum przy $\text{pH} = 6.5$ (103). Ciekawe, że fosforylacja białek pasm 4.5 i 4.8 zachodzi jedynie w obecności jonów Mg^{2+} (20, 151).

Białka pasm 4.5 i 4.8 ulegają znakowaniu także w całych erytrocytach inkubowanych z $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ (17), co więcej w stosunku do cieni znakowanych przez $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ w obecności cAMP, w komórkach fosforylacja tych

białek jest większa (17, 59). Jak wykazały badania z [^3H]cAMP, cAMP może wnikać do erytrocytów w znacznej ilości (17, 152). Dodatek tego nukleotydu do środowiska inkubacyjnego erytrocytów, zawierającego [^{32}P]P_i powoduje zwiększenie znakowania białek pasm 4.5 i 4.8 (17, 152), natomiast całkowita ilość włączonego ^{32}P do białek błony nie ulega zmianie. Jest to rezultat różny od uzyskanego w przypadku dodania cAMP do cieni inkubowanych z [γ - ^{32}P]ATP, kiedy to wzrasta całkowita ilość włączonego do białek ^{32}P (59, 117, 118).

Sugeruje się, że białka pasm 4.5 i 4.8 wchodzą w skład kinaz białkowych. Zagadnienie to będzie dokładniej omówione w rozdziale IX-2.

VII. Fosforylacja białka 150 000

Zaobserwowano, że jony Ca^{2+} stymulują włączanie ^{32}P z [γ - ^{32}P]ATP do białka 150 000 w cieniach erytrocytów ludzkich (153—156). Stwierdzono także, że wstępne trawienie komórek pronazą nie zmienia ilości włączonego radioaktywnego fosforu do białka 150 000, zatem jego miejsca fosforylacyjne znajdują się od cytoplazmatycznej strony błony (153, 157). Zbadano, że jeden erytrocyt zawiera w błonie 700 miejsc fosforylacyjnych białek tego typu (154). Zmiany pH oraz działanie hydroksyloaminy powodują usuwanie związanych z białkiem 150 000 grup fosforanowych — sugeruje to acylofosforanowy charakter tego wiązania (154).

Jony La^{3+} obecne na zewnątrz komórek powodują wzrost fosforylacji tego białka, podczas gdy jony Hg^{2+} — inhibicję (158). Defosforylację białka 150 000 stymulują natomiast jony Mg^{2+} (154). Jest to prawdopodobnie związane ze stymulacją przez jony Mg^{2+} przejścia tej fosfoproteiny ze stanu o małej reaktywności do stanu o dużej reaktywności względem wody. Obniżenie ilości znakowanego białka 150 000 po dodaniu jonów Mg^{2+} jest jednak o wiele mniejsze niż można oczekiwać w oparciu o taki mechanizm. Istnieją różne możliwości wytłumaczenia tego faktu, a mianowicie: defosforylacja białka 150 000 limituje stopień hydrolizy ATP, Mg^{2+} podwyższa zarówno jego fosforylację jak i defosforylację, lub też obecność Mg^{2+} przesuwą równowagę reakcji fosforylacji w stronę powstawania fosfoproteiny (154).

Aktywność ATP-azy aktywowanej przez Ca^{2+} i Mg^{2+} w cieniach erytrocytów znana była od dawna (156, 157, 159, 160). Stechiometryczna zależność między hydrolizą ATP a transportem Ca^{2+} przez błonę (161), a także bardzo niskie wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} w stosunku do środowiska (162, 163), sugerowały że ATP-aza aktywowana przez Ca^{2+} i Mg^{2+} reprezentuje aktywny transport Ca^{2+} przez błonę (157, 164, 165). Potwierdziły to doniesienia wykazujące, że owa ATP-aza błony ludzkich erytrocytów może istnieć w dwóch formach, zależnie od stężenia jonów Ca^{2+} (166). Występuje też ścisła zależność między poziomem fosforylacji

białek błony a przepuszczalnością błony dla Ca^{2+} (167). Jak wykazały ostatnie prace (155), fosfoproteina 150 000 jest pośrednikiem w układzie ATP-azy aktywowanej przez Ca^{2+} i Mg^{2+} .

VIII. Fosforylacja białka pasma 2.1

Dłuższy czas poszukiwano miejsca w błonie, do którego przyłączona jest spektryna. Badania wskazywały (80, 169) na selektywne oddziaływanie spektryny z proteolitycznym fragmentem o ciężarze cząsteczkowym 72 000, pochodzącym z pewnego integralnego białka błony, niezależne od obecności aktyny. Jak stwierdzono później, fragment ten jest częścią białka o ciężarze cząsteczkowym 200 000, migrującego jako pasmo 2.1 podczas elektroforezy białek błony erytrocytów w żelu poliakrylamidowym w obecności sodowego siarczanu dodecylu (170—173). Zaproponowano nazwę tego białka — ankyryna (ang. *ankyrin* z gr. *ankyra* — kotwica) (170). Liczba cząsteczek ankyryny w błonie komórkowej erytrocytów sięga 100 000. Białko to jest mocno związane z błoną, przede wszystkim z białkami integralnymi, co sugerują badania wykazujące zmiany topografii wewnątrz błonowych cząstek pod wpływem zmian konformacyjnych spektryny (25, 39, 81, 174). Ankyryna nie jest wymywana z błony przez roztwory o niskich siłach jonowych (19), jednak wydaje się, że nie jest to białko transmembranowe, jak białko pasma 3 czy glikoforyna (Ryc. 1). Oprócz rozpuszczalnego w wodzie fragmentu 72 000, białko pasma 2.1 zawiera jeszcze fragment hydrofobowy 100 000, związany mocno z błoną (170).

Ankyryna podlega znakowaniu podczas inkubacji erytrocytów z $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ (170). Fosforylacja tego białka jest zależna od obecności cAMP (17, 19, 59), przy czym stymulacja fosforylacji ankyryny przez cAMP jest ilościowo podobna w cieniach i w całych komórkach (17). Nie wiadomo, jakie jest znaczenie fosforylacji białka pasma 2.1. Być może polega ono na determinowaniu konformacji sieci spektrynowo-aktynowej.

IX. Mechanizm fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich

Fosforylacja białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich odbywa się za pośrednictwem enzymów — kinaz białkowych (17—21, 58—61, 63, 117, 118, 149, 151, 175). Różnią się one między sobą miejscem występowania (w błonie lub w cytoplazmie), wrażliwością na jedno- i dwuwartościowe kationy oraz cykliczne nukleotydy (cAMP) a także substratami. W procesie defosforylacji białek błony komórkowej biorą natomiast udział specyficzne fosfoproteinowe fosfatazy (18, 19, 57, 176). Charakterystykę poszczególnych enzymów przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3

Enzymy biorące udział w procesie fosforylacji i defosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich.

Rodzaj enzymu	Lokalizacja	Wpływ cAMP na aktywność enzymu	Wpływ jonów na aktywność enzymu		substraty
			stymulacja	inhibicja	
kinazy białkowe	błona	brak wpływu	kationy jednowartościowe, Mg^{2+} , Ca^{2+} w małych stężeniach	brak danych	spektryna, białko pasma 3
		brak wpływu	brak danych	kationy jednowartościowe, Ca^{2+}	białko pasma 3
		stymulacja aktywności	Mg^{2+}	kationy jednowartościowe, Ca^{2+}	białka pasm 2.1, 4.5, 4.8
	cytoplazma	brak wpływu	brak danych	brak danych	białka pasm 3, 4.5, 4.8, 7
		stymulacja aktywności	brak danych	brak danych	glikoforyna
fosfatazy fosfoproteinowe	błona	brak danych	Mg^{2+}	P_i , PP_i	białka pasm 3, 4.5
	cytoplazma	brak danych	brak danych	P_i , PP_i , Mg^{2+}	spektryna

P_i — jon fosforanowy

PP_i — jon pirofosforanowy

IX-1. Niezależne od obecności cAMP błonowe kinazy białkowe

Jedną z tych kinaz jest kinaza białkowa niezależna od cAMP, stymulowana przez jednowartościowe kationy oraz jony Mg^{+2} i Ca^{2+} w małych stężeniach (18, 59, 61). Nie wymywa się ona z błony roztworami o niskich siłach jonowych (18), ekstrahuje ją dopiero roztwór 1 M NH_4Cl (151). Kinaza ta fosforyluje białko pasma 2 spektryny i słabo białko pasma 3 (18—21, 58, 59, 61, 63, 180). O tym, że oba te białka fosforylowane są przez tę samą kinazę świadczy fakt, że w tym samym stopniu ich fosforylacja jest hamowana przez kazeinę (177). Zjawisko stymulacji fosforylacji przez jednowartościowe kationy można tłumaczyć w różny sposób, a mia-

nowicie: aktywacją specyficznego fosfatazy, zmianą konformacji substratu, zmianą konformacji kinazy lub zmianą fizycznych oddziaływań kinaza — substrat, głównie typu elektrostatycznego. Według niektórych autorów najbardziej prawdopodobne są dwie ostatnie możliwości (18). Kinaza ta jest aktywna *in vivo*, o czym świadczą badania włączania ^{32}P do spektryny i białka pasma 3 w całych komórkach (60—63, 68).

Inną błonową kinazą białkową, niezależną od cAMP, lub zależną w niewielkim stopniu, jest kinaza hamowana przez jednowartościowe kationy i jony Ca^{2+} (7, 18, 19, 57, 58), biorąca udział w fosforylacji białka pasma 3.

IX-2. Zależna od obecności cAMP błonowa kinaza białkowa

W błonie komórkowej erytrocytów ludzkich stwierdzono obecność kinazy, zależnej w znacznym stopniu od obecności cAMP i w mniejszym stopniu od innych cyklicznych nukleotydów (20). Występuje ona wyłącznie po cytoplazmatycznej stronie błony (178, 179). Kinaza ta jest częściowo wymywana z błony przez roztwory o niskich siłach jonowych (19, 61), rozpuszcza się całkowicie w 0.5% Triton X-100, NaBO_3 , przy $\text{pH} = 8$ (117). Zawodzą natomiast próby ekstrakcji tej kinazy z błony 1 M roztworem NH_4Cl (151). Sugeruje się, że podjednostka enzymu wiążąca cAMP jest ściśle związana z błoną, natomiast podjednostka katalityczna — jedynie luźno zasocjowana (20). Zależna od obecności cAMP błonowa kinaza białkowa wymaga dla swej aktywności obecności jonów Mg^{2+} , jej działanie hamują jednowartościowe kationy i jony Ca^{2+} (18, 20, 21, 58, 59, 61, 117, 151, 175). Stopień stymulacji fosforylacji białek przez cAMP za pośrednictwem tej kinazy zależy od warunków inkubacji (chemiczny skład buforu, pH , siła jonowa, stężenie jonów Mg^{2+} , czas, temperatura) (19—21, 61). Maksimum aktywności tego enzymu przypada na $\text{pH} = 6.5$ (20).

Zależna od obecności cAMP kinaza błonowa fosforyluje białka pasm 2.1, 4.5 i 4.8 (20, 58, 61, 117, 151). Substratami tej kinazy mogą być także histony i protaminy (21, 151, 175).

Próbowano zidentyfikować ową kinazę, poszukując w błonie miejsc wiążących ^3H cAMP lub porównując zdolności wiązania cAMP przez „odwrócone” i normalne pęcherzyki z cieni erytrocytów ludzkich. Stwierdzono, że miejsca wiążące ^3H cAMP występują od wewnętrznej strony błony (178, 179), ale wątpliwości budził fakt, że stężenie cAMP wymagane do połowicznego nasycenia tych miejsc było 10—100 razy mniejsze niż potrzebne do osiągnięcia połowy maksymalnego poziomu fosforylacji (20, 151). Używając światłoczułej pochodnej cAMP zbadano, że miejscem wiążącym cAMP są dokładnie białka pasm 4.5 i 4.8 (117, 150), choć opisywano także wiążące cAMP białko o ciężarze cząsteczkowym 55 000 jako PAS-2 (202). Wiele jest potwierdzeń (59, 117, 151), że białka pasm:

4.5 i 4.8 to rzeczywiście regulatorowe podjednostki zależnej od cAMP kinazy białkowej. Zarówno cAMP jak i jego światłoczuła pochodna wiążą się bowiem z tymi białkami w błonie i równolegle stymulują ich fosforylację (154).

W erytrocytach *in vivo* prawdopodobnie nie zachodzi fosforylacja białek błony stymulowana przez cAMP, gdyż stężenie tego nukleotydu wewnątrz komórki jest bardzo niskie (179). Co prawda znaczne ilości cAMP mogą być transportowane do erytrocytów (152) i rzeczywiście w obecności zewnątrzkomórkowego cAMP wzrasta włączanie ^{32}P do białek pasm 2.1, 4.5 i 4.8 w całych komórkach (17, 152), ale jonowe środowisko wnętrza komórki znacznie różni się od tego, jakie zapewnia maksymalną fosforylację białek błony zależną od cAMP (68).

Badania kinaz białkowych zależnych od cAMP są istotne, ponieważ nukleotyd ten może być regulatorem wielu procesów, zachodzących w komórkach eukariotycznych poprzez stymulację fosforylacji określonych białek (20, 58, 167, 180). Hipoteza taka opiera się o stwierdzony wpływ cAMP na takie procesy jak agregacja, czy różnicowanie komórkowe (181), wzrost i inhibicja kontaktowa komórek ssaków (182, 183), przepuszczalność błon (167, 184, 185) oraz przewodzenie impulsów nerwowych (186).

IX-3. Cytoplazmatyczne kinazy białkowe

W cytoplazmie erytrocytów znajdują się także zależne i niezależne od obecności cAMP kinazy białkowe (16, 17, 151, 187), stanowiące około 20—30% aktywności wszystkich kinaz zawartych w komórce (117, 151). Przykładowo inkubacja ludzkich erytrocytów z $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ i cAMP prowadzi do fosforylacji białka pasma 7, które w cieniach nie jest fosforylowane (17), a znakowanie białek pasm 3, 4.5 i 4.8 jest zwiększone w przypadku całych komórek w stosunku do cieni (17, 59). W pracy (187) rozróżniano dwie cytoplazmatyczne, niezależne od cAMP kinazy białkowe: jedną o ciężarze cząsteczkowym 30 000, fosforylującą białka pasm 2 i 3 oraz drugą, o ciężarze cząsteczkowym około 100 000, której substratami są białka pasm 2, 2.1, 3 i PAS-1.

IX-4. Fosfatazy fosfoproteinowe

W nieobecności ATP białka błony komórkowej erytrocytów ludzkich ulegają defosforylacji (57, 188). Wykazują to badania utraty radioaktywności pierwotnie znakowanych ^{32}P białek cieni, która nie może być związana z degradacją białek, jako że rozkład pasm podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w obecności sodowego siarczanu dołączył pozostaje niezmienny. Utracona radioaktywność odnajdywana jest w postaci nieorganicznych fosforanów (173).

Działanie cykliw fosforylacji-defosforylacji białek błony w całych erytrocytach potwierdzają na przykład zmiany fosforylacji białka pasma 2 spektryny pod wpływem wahań wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, skorelowane także ze zmianą kształtu (57). Odwracalność fosforylacji białek błony świadczy o obecności fosfatazy fosfoproteinowej (18, 19, 57, 176). Początkowo aktywność tej fosfatazy odkryto w cytoplazmie (176), przez stwierdzenie, że dodatek nawet bardzo rozcieńczonego ekstraktu cytoplazmatycznego do czyszczonej, ^{32}P znakowanej spektryny, powoduje jej defosforylację. Cytoplazmatyczną fosfatazę hamują takie czynniki jak P_i , PP_i , ATP, ADP, 10 mM Mg^{2+} , 100 mM KCl oraz 2,3-dwufosfoglicerol. *In vitro* aktywność fosfatazy jest niewielka — wymiana ^{32}P jest bardzo powolna. Może to wynikać właśnie ze stosunkowo wysokich stężeń fosforanów i nukleotydów wewnątrz komórki (176).

Później pojawiły się doniesienia o fosfatazach fosfoproteinowych związanych z błoną erytrocytów (18, 19, 173, 189), różniących się właściwościami od fosfotaz cytoplazmatycznych. Defosforylację białek pasm 2, 3, 4.5 przez fosfatazy błonowe obserwowano w obecności jonów Mg^{2+} , przy czym różne stężenia tego jonu są potrzebne do maksymalnej defosforylacji poszczególnych białek (173) (białko pasma 2 — większe od 20 mM, białko pasma 3 — 3 mM, białko pasma 4.5 — mniejsze od 20 mM). P_i , PP_i , ATP i ADP są również silnymi inhibitorami aktywności błonowej fosfatazy, ale na przykład 10 mM Mg^{2+} silnie stymuluje defosforylację białka pasma 2, 2,3-dwufosfoglicerol hamuje defosforylację białek pasm 2 i 3, a 100 mM KCl — tylko białka pasma 4.5 (173).

Po defosforylacji, białka błony są zdolne do powtórnej fosforylacji w tych samych miejscach, dotyczy to przynajmniej białek pasm 2 i 4.5 (173), co potwierdza obecność swoistych cykliw fosforylacji-defosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów.

X. Stopień fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich

Ilościowe ujęcie zjawiska fosforylacji białek błony jest bardzo trudne. Oznaczenia analityczne wymagają bowiem niezwykle dokładnego i ostrożnego oddzielenia białek od lipidów, natomiast pomiary radioaktywności białek po inkubacji błony z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ lub całych komórek z $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$, mimo że proste, dostarczają tylko informacji o ilości wymienialnego fosforu w białkach.

Stopień fosforylacji białek błony erytrocytów zależy bardzo od warunków badania — ilości i charakteru obecnych w środowisku jonów, siły jonowej, pH a także od aktywności defosforylujących białka fosfataz. Biorąc pod uwagę możliwości powiązania fosforylacji białek błony ze strukturą i funkcjami błony komórkowej niezwykle istotny jest skład i parametry roztworu podstawowego we wszystkich badaniach erytro-

cytów *in vitro*. Mimo trudności, badacze próbują określać choćby przybliżone wartości poziomu fosforylacji poszczególnych białek błony erytrocytów (Tabela 4).

Stopień fosforylacji białek cieni erytrocytów zależy znacznie od stężenia ATP. I tak według pracy (64) przy stężeniu ATP mniejszym od 0.1 mM fosforylacja spektryny jest nieznaczna i wzrasta stopniowo osiągając przy stężeniu 8 mM wartość 1 mol P_i /mol białka pasma 2. Wolfe i Lux badali poziom fosforylacji białek błony całych erytrocytów (61). Przy założeniu, że cała ilość ATP wewnątrz komórki jest dostępna do wymiany izotopowej, uzyskali oni znacznie wyższe wartości niż poprzednicy. Użycie przez nich komputerowego modelowania doprowadziło jednak do wniosku, że tylko 36% wewnątrzkomórkowego ATP bierze udział w wymianie $[^{32}P]P_i$ wobec czego poziom fosforylacji jest odpowiednio niższy (Tabela 4).

Tabela 4

Stopień fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich.

Białko	Stopień fosforylacji białka (mol P_i /mol białka) w/g pracy:					
	(58)	(64)	(61)		(63)	
spektryna	0,79 _r	1 _r	2,5 _r	0,9 _k	1,8 _a	1,05 _r
białko pasma 3	0,024 _r	brak danych	0,4 _r	0,14 _k	0,90 _a	0,35 _r
białko pasma 4.5	0,17 _r	brak danych	brak danych	brak danych	brak danych	brak danych
glikoforyna	brak danych	brak danych	brak danych	brak danych	0,20 _a	0,15 _r

a — oznaczenie analityczne

k — oznaczenie przy użyciu komputerowego modelowania

r — oznaczenie z pomiarów radioaktywności

Waxman równocześnie z prowadzeniem badań nad ilością włączonego ^{32}P do poszczególnych białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich, oznaczał analitycznie zawartość fosforanów w wyekstrahowanych i wysoce oczyszczonych od lipidów frakcjach (63). Mniejsze wartości poziomu fosforylacji uzyskane z badań znakowania białek przez ^{32}P niż z oznaczeń analitycznych wykazują, że tylko część grup fosforanowych związanych z białkami jest wymienialna. Może to wynikać z faktu, że większość ^{32}P związanego z błoną erytrocytów po długiej inkubacji z $[^{32}P]P_i$ ma postać stabilnych estrów fosforanowych (wiązanie z seryną i treoniną), różniących się od labilnych kwaśnych fosforanów. Działanie Cl_3CCOOH i hydroksyloaminy nie powoduje bowiem większego usuwania ^{32}P z białek, czyni to dopiero alkaliczna hydroliza (18, 58).

XI. Patologiczne aspekty fosforylacji białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich

Sugestie, że fosforylacja białek błony (głównie spektryny) jest odpowiedzialna za kształt i zdolność erytrocytów do deformacji (47, 57, 64, 73, 76) zwróciły uwagę na fosforylację tych białek w erytrocytach, charakteryzujących się anomalnym kształtem. Badania takie zapoczątkowali Greenquist i Shohet (190, 191), którzy stwierdzili spadek aktywności kinazy związanej z błoną oraz mniejszą stymulację fosforylacji przez cAMP cieni erytrocytów pacjentów chorych na dziedziczną sferocytozę, w stosunku do cieni z erytrocytów ludzi zdrowych. Obserwacje te potwierdzili inni autorzy (57, 104, 192—195) znajdując zmniejszoną fosforylację błony jak i fosforylację poszczególnych białek — pasm 2, 3 i 4.5 (57, 195), zmniejszoną stymulację fosforylacji pod wpływem cAMP (104) oraz zmieniony stosunek znakowanej fosfotreoniny do fosfoseryny (194) w cieniach erytrocytów pacjentów z dziedziczną sferocytozą. Podobne zmiany fosforylacji białek błony erytrocytów stwierdzono w wypadku anemii sierpowatych (196).

Nie wiadomo, czy aktywność kinaz białkowych w cieniach jest taka sama jak w całych erytrocytach. Stwierdzono bowiem, że fosforylacja cieni zależy od warunków inkubacji (61, 149). Nie powinny więc dziwić wyniki uzyskane przez innych autorów, świadczące o jednakowej fosforylacji białek błony cieni lub całych erytrocytów pochodzących ze zdrowych i chorych dawców (61, 197—199). Faktem jest jednak, że erytrocyty pacjentów z dziedziczną sferocytozą mają zmniejszoną elastyczność błony i dużą podatność na fragmentację, co warunkuje krótki czas ich życia (200), ale prawdopodobne są sugestie, że owe zmiany, nawet jeśli wywołane anomalną fosforylacją, nie są pierwotne etiologicznie (189, 201).

Zaakceptowano do druku 15.02.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Palmer F. B., Verpoorte J. A., (1971), *Can. J. Biochem.*, **49**, 337—347.
2. Guidotti G., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 731—752.
3. Harrison R., Lunt G. G., (1980), *Błony biologiczne*, (ang. "Biological Membranes" — 1975, Blackie, Glasgow and London), str. 16—23, 81—90, 159—230, PWN Warszawa.
4. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119—130.
5. Steck T. L., Fairbanks G., Wallach D. F. H., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2617—2624.
6. Trayer H. R., Nozaki Y., Reynolds J. A., Tanford Ch., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4485—4488.
7. Steck T. L., (1974), *J. Cell. Biol.*, **62**, 1—19.
8. Singer S. J., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 805—833.
9. Tanner M. J. A., Boxer D. H., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 333—347.

10. Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Cooley C. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **300**, 159—182.
11. Minc S., Dołowy K., (1973), *Biophys.*, **9**, 172—176.
12. Dołowy K., Minc S., (1975), *Biophys.*, **11**, 341—345.
13. Minc S., Krysiński P., (1978), *Bioelectrochem. Bioenerget.*, **5**, 247—251.
14. Krysiński P., Minc S., (1979), *J. Electroanal. Chem.*, **100**, 71—76.
15. Kuźniak E., Minc S., (1980), *Acta Haematol. Pol.*, **11**, 288—294.
16. Hosey M. M., Tao M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 102—109.
17. Plut D. A., Hosey M. M., Tao M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **82**, 333—337.
18. Avruch J., Fairbanks G., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5507—5514.
19. Fairbanks G., Avruch J., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5514—5521.
20. Guthrow C. E. Jr., Allen J. E., Rasmussen H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8145—8153.
21. Roses A. D., Appel S. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1408—1411.
22. Marchesi V. T., Steers Jr. E., (1968), *Science*, **159**, 203—204.
23. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2606—2617.
24. Nicolson G. L., Marchesi V. T., Singer S. J., (1971), *J. Cell. Biol.*, **51**, 265—272.
25. Elgsaeter A., Branton D., (1974), *J. Cell. Biol.*, **63**, 1018—1030.
26. Williamson J. R., Shanahan M. O., Hochmuth R. M., (1975), *Blood*, **46**, 611—624.
27. Brandts J. F., Erickson L., Lipko K., Schwartz K., Taverna R. D., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3450—3454.
28. Ralston G. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 83—94.
29. Johnson R. M., Kirkwood D. H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 58—66.
30. Evans E. A., Waugh R., Melnick L., (1976), *Biophys. J.*, **16**, 585—595.
31. Teitel P., (1965), *Nature*, **206**, 409—410.
32. Ham T. H., Shen S. C., Fleming E. M., Castle W. B., (1948), *Blood*, **3**, 373—403.
33. Ham T. H., Sayre R. W., Dunn R. F., Murphy J. R., (1968), *Blood*, **32**, 862—871.
34. Murphy J. R., (1967), *J. Lab. Clin. Med.*, **69**, 758—775.
35. Rakow A. L., Hochmuth R. M., (1975), *Biorheology*, **12**, 1—3.
36. Rakow A. L., Hochmuth R. M., (1975), *Biophys. J.*, **15**, 1095—1100.
37. Crum L. A., Coakley W. T., Deeley J. O. T., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **554**, 76—89.
38. Hainfeld J. F., Steck T. L., (1977), *J. Supramol. Struct.*, **6**, 301—311.
39. Elgsaeter A., Shotton D. M., Branton D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 101—122.
40. Gratzer W. B., Beaven G. H., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 403—409.
41. Kirkpatrick F. H., (1976), *Life Sci.*, **19**, 1—18.
42. Ralston G. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 163—172.
43. Ralston G. B., Dunbar J., White M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 354—348.
44. Cohen C. M., Foley S. F., (1980), *J. Cell. Biol.*, **86**, 694—698.
45. Fowler V., Taylor D. L., (1980), *J. Cell. Biol.*, **85**, 361—376.
46. Pinder J. C., Bray D., Gratzer W. B., (1975), *Nature*, **258**, 765—766.
47. Pinder J. C., Bray D., Gratzer W. B., (1977), *Nature*, **270**, 752—754.
48. Rosenthal A. S., Kregenow F. M., Moses H. L., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **196**, 254—262.

49. Sheetz M. P., Painter R. G., Singer S. J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4486—4492.
50. Singer S. J., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 805—833.
51. Yu J., Fischman D. A., Steck T. L., (1973), *J. Supramol. Struct.*, **1**, 233—248.
52. Palek J., Stewart G., Lionetti F. J., (1974), *Blood*, **44**, 583—597.
53. Johnson R. M., Taylor G., Meyer D. B., (1980), *J. Cell. Biol.*, **86**, 371—376.
54. Tsukita S., Tsukita S., Ishikawa H., (1980), *J. Cell. Biol.*, **85**, 567—576.
55. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Postępy Biochem.*, **16**, 405—420.
56. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Postępy Biochem.*, **19**, 343—359.
57. Shohet S. B., Greenquist A. C., (1977), *Blood Cells*, **3**, 115—133.
58. Rubin Ch. S., Rosen O. M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 421—429.
59. Hosey M. M., Tao M., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1561—1568.
60. Shapiro D. L., Marchesi V. T., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 508—517.
61. Wolfe L. C., Lux S. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3336—3342.
62. Dunbar J. C., Ralston G. B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 283—291.
63. Waxman L., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 300—314.
64. Birchmeier W., Singer S. J., (1977), *J. Cell. Biol.*, **73**, 647—659.
65. Wyatt J. L., Greenquist A. C., Shohet S. B., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 1279—1285.
66. Marchesi V. T., Pallade G. E., (1967), *J. Cell. Biol.*, **35**, 385—404.
67. Blostein R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6673—6677.
68. Nakao M., Nakao T., Yamazoe S., (1960), *Nature*, **187**, 945—946.
69. Weed R. I., LaCelle P. L., Merrivill E. W., (1969), *J. Clin. Invest.*, **48**, 795—809.
70. Penniston J. T., Green D., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 339—350.
71. Penniston J. T., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 410—412.
72. Lutz H. U., Liu S. Ch., Palek J., (1977), *J. Cell. Biol.*, **73**, 548—560.
73. Lux S. E., John K. M., Ukena T. E., (1978), *J. Clin. Invest.*, **61**, 815—827.
74. Anderson D. R., Davis J. L., Carraway K., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6617—6623.
75. Church A., Fairbanks G., Palek J., (1975), *Blood*, **46**, 1004.
76. Sheetz M. P., Singer S. J., (1977), *J. Cell. Biol.*, **73**, 638—646.
77. Sheetz M. P., Singer S. J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4457—4461.
78. Sheetz M. P., Singer S. J., (1976), *J. Cell. Biol.*, **70**, 193—203.
79. Heusinkveld R. S., Goldstein D. A., Weed R. I., LaCelle P. L., (1977), *Blood Cells*, **3**, 175—182.
80. Bennett V., Branton D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2753—2763.
81. Nicolson G. L., Painter R. G., (1973), *J. Cell. Biol.*, **59**, 395—406.
82. Bennett V., Stenbuck P. J., (1979), *Nature*, **280**, 468—473.
83. Koch G. L. E., Smith M. J., (1978), *Nature*, **273**, 274—278.
84. Flanagan J., Koch G. L. E., (1978), *Nature*, **273**, 278—281.
85. Haest C. W. M., Plasa G., Kamp D., Deuticke B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 21—32.

86. Gazitt Y., Loyter A., Reichler Y., Ohad J., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 479—492.
87. Sweet C., Zull J. E., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 135—141.
88. Mombers C., van Dijck P. W. M., van Deenen L. L. M., de Gier J., Verkleij A. J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 152—160.
89. Juliano R. L., Kimelberg H. K., Papahadjopoulos D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 894—905.
90. Gazitt Y., Ohad J., Loyter A., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 1—14.
91. Mombers C., Verkleij A. J., de Gier J., van Deenen L. L. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 271—281.
92. Gerritsen W. J., Verkleij A. J., van Deenen L. L. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 26—41.
93. Steck T. L., (1972), *J. Mol. Biol.*, **66**, 295—306.
94. Wang K., Richards F. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 8005—8018.
95. Hosey M. M., Plut D. A., Tao M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **506**, 211—220.
96. Haest C. W. M., Kamp D., Plasa G., Deuticke B., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **469**, 226—230.
97. Haest C. W. M., Deuticke B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 353—365.
98. Shukla S. D., Billah M. M., Coleman R., Michell R. M., Finnean J. B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 48—57.
99. Singer J. A., Morrison M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 553—563.
100. Yu J., Steck T. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9170—9175.
101. Drickamer L. K., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5115—5123.
102. Bretscher M. S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **59**, 351—357.
103. Bretscher M. S., (1973), *Science*, **181**, 622—629.
104. Ho M., Guidotti K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 675—683.
105. Findlay J. B. C., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4398—4403.
106. Steck T. L., Dawson G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2135—2142.
107. Bender W. W., Garan H., Berg H. C., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 783—797.
108. Phillips D. R., Morrison M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1103—1108.
109. Triplett R. B., Carraway K. L., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2897—2903.
110. Phillips D. R., Morrison M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1766—1771.
111. Bretscher M. S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 775—781.
112. Kirkpatrick F. H., Gordesky S. E., Marinetti G. V., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 154—161.
113. Kirkpatrick F. H., Sandberg H. E., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 209—218.
114. Cabantchik Z. J., Rothstein A., (1974), *J. Membr. Biol.*, **15**, 227—248.
115. Steck T. L., Ramos B., Strapazon E., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1154—1161.
116. Yu J., Steck T. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9176—9184.
117. Rubin Ch. S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9044—9052.
118. Avruch J., Fairbanks G., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1216—1220.
119. Taverna R. D., Langdon R. G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 593—599.

120. Lin S., Spudich J. A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 1417—1476.
121. Cabantchik Z. J., Rothstein A., (1974), *J. Membr. Biol.*, **15**, 207—226.
122. Cabantchik Z. J., Knauf P. A., Rothstein A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 239—302.
123. Grinstein S., Ship S., Rothstein A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 294—304.
124. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 127—139.
125. Snow J. W., Brandts J. F., Low P. S., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **512**, 579—591.
126. Klappauf E., Schubert D., (1978), *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **82**, 889—890.
127. Low P. S., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **514**, 264—273.
128. Brown P. A., Feinstein M. B., Sha'afi R. I., (1975), *Nature*, **254**, 523—525.
129. Hoffman J. F., (1966), *Am. J. Med.*, **41**, 666—670.
130. Sen A. K., Post R. L., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 345—352.
131. Skou J. C., (1965), *Physiol. Rev.*, **45**, 596—617.
132. Romero P. J., (1976), *J. Membr. Biol.*, **29**, 329—343.
133. Knauf P. A., Riordan J. R., Schuhman B., Wood-Guth J., Passow H., (1975), *J. Membr. Biol.*, **25**, 1—22.
134. Romero P. J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 178—181.
135. Hokin L. E., Sastry P. S., Galsworthy P. R., Yoda A., (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 177—184.
136. Kant J. A., Steck T. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8457—8964.
137. Strapazon E., Steck T. L., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1421—1424.
138. Shin B. C., Carraway K. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1436—1444.
139. Marchesi V. T., Tillack T. W., Jackson R. L., Segrest J. P., Scott R. E., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1445—1449.
140. Tomita M., Marchesi V. T., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2964—2968.
141. Marton L. S. G., Garvin J. E., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 1457—1462.
142. Segrest J. P., Kahane I., Jackson R. L., Marchesi V. T., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 167—183.
143. Marchesi V. T., Furthamayr H., Tomita M., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 667—698.
144. Morrison M., Mueller T. J., Huber C. T., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2658—2660.
145. Staros J. V., Richards F. M., Maley B. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8174—8178.
146. Jackson R. L., Segrest J. P., Kahane I., Marchesi V. T., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3131—3138.
147. Steck T. L., Yu J., (1973), *J. Supramol. Struct.*, **1**, 220—232.
148. Eylar E. H., Madoff M. A., Brody O. V., Oncley J. L., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1992—2000.
149. Boivin P., Galand C., (1977), *Pathol. Biol.*, **25**, 461—465.
150. Guthrow C. E., Rasmussen H., Brunswick D. J., Cooperman B. S., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3344—3346.

151. Rubin Ch. S., Erlichman J., Rosen O. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6135—6139.
152. Thomas E. L., King L. E. Jr., Morrison M., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, 459—464.
153. Knauf P. A., Proverbio F., Hoffman J. F., (1974), *J. Gen. Physiol.*, **63**, 324—336.
154. Rega A. F., Garrahan P. J., (1975), *J. Membr. Biol.*, **22**, 313—327.
155. Niggli V., Penniston J. T., Carafoli E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9955—9958.
156. Schatzmann H. J., Buergin H., (1978), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **307**, 125—147.
157. Schatzmann H. J., Vincenzi F. F., (1969), *J. Physiol.*, **201**, 369—395.
158. Hasitz M., Sarkadi B., Gárdos G., (1978), *Mol. Cell. Biochem.*, **22**, 147—152.
159. Lee K. S., Shin B. C., (1969), *J. Gen. Physiol.*, **54**, 713—729.
160. Dunham E. T., Glynn I. M., (1961), *J. Physiol.*, **156**, 274—293.
161. Makinose M., Hasselbach W., (1971), *FEBS Lett.*, **12**, 271—272.
162. Harrison D. G., Long C., (1968), *J. Physiol.*, **199**, 367—381.
163. Long C., Monat B., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 829—836.
164. Weiner M. L., Lee K. S., (1972), *J. Gen. Physiol.*, **59**, 462—475.
165. Schatzmann H. J., (1973), *J. Physiol.*, **235**, 551—569.
166. Scharff O., Foder B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 67—77.
167. Weller M., (1978), *Mol. Cell. Biochem.*, **20**, 95—102.
168. Weidekam E., Brdiczka D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 51—58.
169. Bennett V., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2292—2299.
170. Bennett V., Stenbuck P. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2533—2541.
171. Luna B., Kidd G., Branton D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2526—2532.
172. Yu J., Goodman S. R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2340—2344.
173. Fischer S., Tortolero M., Piau J. P., Delaunay J., Schapira G., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 463—471.
174. Shotton D., Thompson K., Wofsy L., Branton D., (1978), *J. Cell. Biol.*, **76**, 512—531.
175. Boivin P., Galand C., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 473—480.
176. Graham C., Avruch J., Fairbanks G., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 701—708.
177. Vickers J. D., Brierley J., Rathbone M. P., (1979), *J. Membr. Biol.*, **49**, 123—138.
178. Rubin C. S., Rosenfield R. D., Rosen O. M., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3735—3738.
179. Kant J. A., Steck T. L., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 116—122.
180. Rubin C. S., Rosen O. M., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 831—887.
181. Bonner J. T., Barkley D. L., Hall E. M., Konijn F. M., Mason J. W., O'Keefe G., Wolfe P. B., (1969), *Dev. Biol.*, **20**, 72—87.
182. Otten J., Johnson G. S., Pastan I., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1192—1198.
183. Sheppard J. R., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1316—1320.
184. Orloff J., Handler J., (1967), *Am. J. Med.*, **42**, 757—768.
185. Chang K. J., Maras N. A., Cuatrecasas P., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6854—6865.

186. Maeno H., Johnson E. M., Greengard P., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 134—142.
187. Hosey M. M., Tao M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4578—4583.
188. Tortolero M., Fischer S., Piau J. P., Delaunay J., Schapira G., (1979), *Proc. FEBS Meet.*, (1978), **54**, 225—233.
189. Beutler E., Guinto E., Johnson C., (1977), *Blood Cells*, **3**, 135—152.
190. Greenquist A. C., Shohet S. B., (1974), *FEBS Lett.*, **48**, 133—135.
191. Greenquist A. C., Shohet S. B., (1975), *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1**, 515—531.
192. Jacob H. S., Ruby A., Overland E. S., Mazia D., Kurth D., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 1800—1805.
193. Jacob H. S., Yawata Y., Matsumoto N., Abman S., White T. J., (1975), *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1**, 235—247.
194. Moret V., Michielin E., Falezza G. C., De Sandre G., (1977), *Clin. Chim. Acta*, **77**, 359—363.
195. Matsumoto N., Yawata Y., Jacob H. S., (1977), *Blood*, **49**, 233—239.
196. Hosey M. M., Tao M., (1976), *Nature*, **263**, 424—425.
197. Boivin P., Galand C., (1977), *Biomed. Express.*, **27**, 34—36.
198. Beutler E., West C., Blume K. G., (1976), *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 328—333.
199. Zail S. S., vanden Hoek A. K., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1078—1086.
200. Smith B. D., LaCelle P. T., (1975), *Blood*, **46**, 1005.
201. Allen D. W., Cadman S., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 1—9.
202. Haley B. E., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3852—3857.
203. Feo C., Mohandas N., (1977), *Blood Cells*, **3**, 153—161.

KOMUNIKATY

Komisja do Spraw Wydawnictw Komitetu Cytobiologii PAN zamierza publikować corocznie bibliografię prac autorów polskich z zakresu biologii komórki. Obecnie przystępujemy do zebrania informacji o publikacjach doświadczalnych, przeglądowych i książkowych wydanych z datą 1983 roku.

Spisy publikacji prosimy sporządzać według wzoru cytowania w „Postępach Biologii Komórki”, grupując osobno prace doświadczalne, przeglądowe i książkowe (komunikatów i doniesień zjazdowych nie uwzględniamy). W uzupełnieniu, prosimy o podanie placówki, w której wykonane zostały prace.

Informacje bibliograficzne prosimy nadesłać na adres:

Doc. dr hab. Jerzy Warchoł
Zakład Histologii i Embriologii,
Instytut Biostruktury,
Akademia Medyczna w Poznaniu,
ul. Święcickiego 6
60-781 Poznań
w terminie do 31 marca 1984 roku.

Sekretarz Komitetu Cytobiologii
Dr hab. Jerzy Sikora

Znana brytyjska firma produkująca chemikalia i biochemikalia, Koch-Light Laboratories, zawiadamia swych odbiorców za pośrednictwem naszego Pisma, że w wyniku reorganizacji jej obecna nazwa i adres są następujące:

KOCH-LIGHT Ltd.
37 Hollands Road
Haverhill, Suffolk CB9 8PU
Anglia

Przedstawicielem firmy na kraje Europy wschodniej jest w dalszym ciągu pan P. Tausik.

ELŻBIETA I. WAŁAJTYS-RODE *)

Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach zwierzęcych

Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Complex in Animal Tissues

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Ogólna charakterystyka kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej
- III. Mechanizmy regulacji aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej
 - III-1. Inhibicja kompleksu przez produkty reakcji
 - III-2. Regulacja aktywności przez fosforylację kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej
- IV. Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w sercu i mięśniach szkieletowych
- V. Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkance tłuszczowej. Wpływ insuliny
- VI. Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w wątrobie
- VII. Uwagi końcowe

Contents

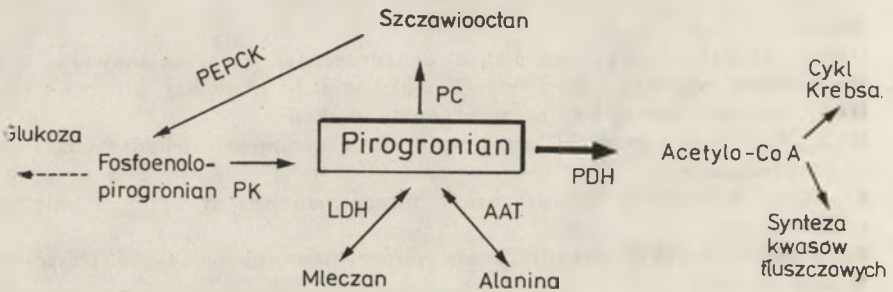
- I. Introduction
- II. General characteristics of pyruvate dehydrogenase complex
- III. Mechanisms of regulation of the pyruvate dehydrogenase complex activity
 - III-1. End-product inhibition
 - III-2. Regulation of the activity of the complex by its phosphorylation
- IV. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex in heart and skeletal muscles
- V. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex in adipose tissue. Effect of insulin
- VI. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex in liver
- VII. Concluding remarks

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

Wykaz stosowanych skrótów: CoA — koenzym A; TPP — pirofosforan tiaminy; hydroksyetylo-TPP — karboanionowa forma pirofosforanu hydroksyetylo-tiaminy; Lip. (S.S) — liponian w formie utlenionej; Lip. (SH.S-acetylo) — acetylohydroliponian; Lip. (SH.SH) — dihydroliponian; NAD⁺, NADH — dwunukleotyd nikotynoamidoadeninowy i forma zredukowana; FAD, FADH₂ — dwunukleotyd flawinoadeninowy i forma zredukowana.

I. Wstęp

Pirogronian zajmuje kluczową pozycję w metabolicznych szlakach rozpadu i syntezy węglowodanów, lipidów i aminokwasów w tkankach zwierzęcych. Na schemacie 1 pokazano najważniejsze enzymy, których substratem jest pirogronian. Należy zaznaczyć, że tylko w komórkach parenchymatycznych wątroby zachodzą wszystkie reakcje umieszczone w tym schemacie, natomiast w innych tkankach, zależnie od ich specjalizacji, dominują tylko niektóre szlaki metaboliczne. W tkance mięśniowej i mózgu acetylo-CoA utworzony w wyniku katalitycznej aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej jest prawie całkowicie utleniany w cyklu Krebsa. Natomiast w tkance tłuszczowej, wątrobie i gruczołach mlecznych znaczna część tego związku jest zużywana do syntezy



Ryc. 1. Enzymy biorące udział w metabolizmie pirogronianu w tkankach zwierzęcych

PK — kinaza pirogronianowa (EC 2.7.1.40)

LDH — dehydrogenaza mleczanowa (EC 1.1.1.27)

AAT — aminotransferaza alaninowa (EC 2.6.1.2)

PC — karboksylaza pirogronianowa (EC 6.4.1.1)

PEPCK — karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa (EC 4.1.1.32)

PDH — kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (EC 1.2.4.1 + EC 2.3.1.12 + EC 1.6.4.3)

kwasów tłuszczowych i steroli. Sprawia to, że kompleks dehydrogenazy pirogronianowej może uczestniczyć zarówno w procesach katabolicznych, dostarczając energię komórce, jak i w procesach biosyntezy.

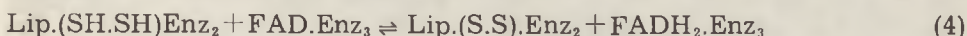
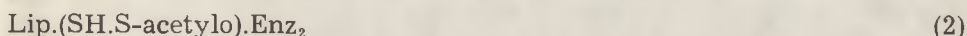
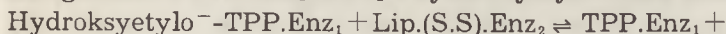
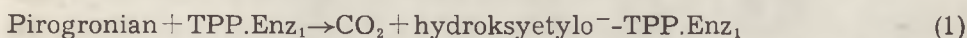
Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że kompleks dehydrogenazy pirogronianowej wyodrębniony z różnych tkanek jest regulowany przez podobne, jakkolwiek nie identyczne mechanizmy uzależniające aktywność kompleksu od warunków metabolicznych występujących w komórce. Ogólnie stwierdzono, że aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej zależy od substratu oddechowego dostępnego w badanej tkance. Aktywność kompleksu w mięśniach szkieletowych, sercu i wątrobie ulega znacznemu obniżeniu w obecności kwasów tłuszczowych i ciał ketonowych, co sprawia, że właśnie te substancje są aktywnie utleniane w stanie głodzenia i w cukrzycy (1—5). Sprzyja to zabezpieczeniu pozostałych rezerw węglowodanowych w organizmie. W powyższych warunkach aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej ulega ob-

nizieniu przez współdziałanie inhibicji przez produkty reakcji i kowalencyjnej modyfikacji białka enzymatycznego przez jego fosforylację. Aktywność kompleksu może również podlegać regulacji przez bezpośrednie oddziaływanie hormonu na tkankę, jak to stwierdzono na przykładzie aktywacji dehydrogenazy pirogronianowej w tkance tłuszczowej w obecności insuliny (6—8).

W prezentowanym artykule zostaną omówione mechanizmy regulacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w różnych tkankach. Wykorzystane tu będą wyniki uzyskane w badaniach oczyszczonego kompleksu enzymatycznego, izolowanych mitochondriów i komórek oraz perfundowanych narządów, a także prace przeglądowe dotyczące tego zagadnienia (9—14).

II. Ogólna charakterystyka kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej

W skład kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej występującego wyłącznie w mitochondriach (10), wchodzi trzy składniki katalityczne (EC 1.2.4.1 + EC 2.3.1.12 + EC 1.6.4.3) i dwa regulatorowe (brak numerów klasyfikacyjnych). Enzymy spełniające funkcje katalityczne przeprowadzają reakcje prowadzące do oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu i utworzenia acetylo-CoA i NADH według reakcji 1 do 5 (15—17):



Sumarycznie:



Reakcje (1) i (2) są katalizowane przez dekarboksylazę pirogronianową EC 1.2.4.1 (oksydoreduktaza pirogronian:liponian, acetylująca akceptor), która wymaga obecności pirofosforanu tiaminy (TPP) i magnezu. Enzym ten jest oznaczony skrótem TPP·Enz₁. Należy zaznaczyć, że nazwa „dekarboksylaza pirogronianowa” jest wprowadzona zamiast nazwy „dehydrogenaza pirogronianowa”, przez wielu autorów (4, 10, 13) ponieważ nazwa „dehydrogenaza pirogronianowa” jest używana potocznie na określenie całego kompleksu enzymatycznego równoznacznie z nazwą „kompleks dehydrogenazy pirogronianowej”.

Reakcja (3) jest katalizowana przez acetylotransferazę liponianową EC 2.3.1.12 (S-Acetylotransferaza acetylo-CoA: dihydroliponian), zawiera-

jącą kowalencyjnie związaną resztę liponianową w postaci utlenionej [Lip.(S.S)]. Enzym ten jest oznaczony jako Lip.(S.S).Enz₂.

Reakcja (4) i (5) są katalizowane przez dehydrogenazę liponianową EC 1.6.4.3 (oksydoreduktaza NADH:amid kwasu liponowego), która jest flawoproteiną. Enzym ten oznaczono jako FAD.Enz₂.

Należy zaznaczyć, że kompleks dehydrogenazy pirogronianowej katalizować może również utlenianie 2-oksomaślanu do propionylo-CoA oraz 3-hydroksypirogronianu do hydroksyacetylo-CoA. Szybkość reakcji przy stężeniu wymienionych substratów równym 1 mM wynosi, odpowiednio, około 50% i 5% szybkości reakcji z tym samym stężeniem pirogronianu jako substratu (18).

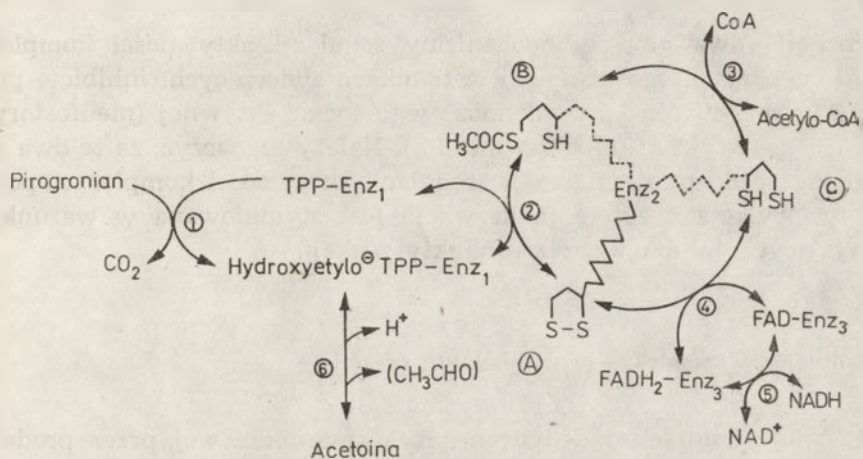
Centralną pozycję w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej zajmują jednostki acetylotransferazy liponianowej, do której są przyłączone jednostki dekarboksylazy pirogronianowej i dehydrogenazy liponianowej. Wyizolowana z kompleksu dekarboksylaza pirogronianowa jest tetramerym składającym się z dwu podjednostek α i dwu podjednostek β (19—20). W kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej z tkanek zwierzęcych występują również enzymy pełniące funkcje regulacyjne. Są to: specyficzna kinaza kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej katalizująca fosforylację podjednostki α tetramery dekarboksylazy pirogronianowej, oraz fosfataza ufosforylowanego kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej odszczepiająca tę resztę fosforanową (17, 19, 21—24).

Enzymy regulatorowe występują w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej pochodzącej z tkanek zwierzęcych oraz roślin wyższych, nie stwierdzono ich natomiast w kompleksie pochodzącym z bakterii (9), ani z drożdży (25).

Poszczególne reakcje kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej zachodzą przy udziale ruchliwej reszty liponianowej dołączonej kowalencyjnie do grupy ϵ -aminowej lizyny acetylotransferazy liponianowej. Powstaje wtedy ruchome „ramię” umożliwiające rotację reszty liponianowej między centrami aktywnymi pozostałych enzymów kompleksu, kolejno tworząc utleniony liponian, acetylohydroliponian i dihydroliponian (26, 27). Mechanizm ten jest przedstawiony na schemacie 2.

Szczegółowe badania budowy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej prowadzone przez grupę Reed'a (17, 18, 28—30) oraz przez innych badaczy (16, 19, 31, 32) dostarczyły danych dotyczących wielkości, struktury i ciężaru cząsteczkowego wyizolowanego kompleksu, jakkolwiek wiele jeszcze brakuje do całkowitego poznania jego budowy przestrzennej. Całkowita ilość łańcuchów polipeptydowych kompleksu wynosi 75—150, a ciężar cząsteczkowy szacuje się na $7-10 \times 10^6$ daltonów (16). W kompleksie pochodzącym z serca świni stwierdzono występowanie 24 jednostek dekarboksylazy pirogronianowej, 24 jednostek acetylotransferazy liponianowej i 12 jednostek dehydrogenazy liponianowej. Molarny stosunek jednostek wyznaczony metodą izotopowego piętnowania wolnych

grup aminowych kompleksu przez amidynację z użyciem metylo[1-¹⁴C]acetymidu (33), wynosi: 1 tetramer ($\alpha_2 \beta_2$) dekarboksylazy pirogronianowej do 1 monomeru acetylotransferazy liponianowej i do 0.5 monomeru dehydrogenazy liponianowej (32). Wyniki powyższych badań łącznie z danymi uzyskanymi ze szczegółowej analizy budowy poszczególnych składników oraz z wyznaczania ciężaru cząsteczkowego kompleksu pozwalają na przyjęcie modelu ośmiościanu o symetrii 4:3:2, jako najbardziej prawdopodobnej struktury rdzenia kompleksu utworzonego z jednostek acetylotransferazy liponianowej (19, 32). Natomiast w kompleksie izolowanym z nerki wołu znaleziono 30 jednostek dekarboksylazy pirogronia-



Ryc. 2. Reakcje katalizowane przez poszczególne enzymy wchodzące w skład kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (składniki katalityczne)

Numery 1–5 odpowiadają reakcjom, których sumaryczne wzory są umieszczone w tekście; A – utleniona forma liponianu; B – acetylohydroliponian; C – dihydroliponian; pozostałe skróty opisano w tekście.

nowej, 60 jednostek acetylotransferazy liponianowej i 12 jednostek dehydrogenazy liponianowej, co odpowiada modelowi dwunastościanu pięciokątnego o symetrii 5:3:2 (29). Model taki znajduje potwierdzenie w badaniach prowadzonych przy użyciu mikroskopu elektronowego (16, 30, 34).

Dekarboksylacja pirogronianu (reakcja 1), ze względu na wysoką ujemną wartość zmiany swobodnej energii, jest reakcją nieodwracalną i stanowi miejsce regulacji aktywności całego kompleksu enzymatycznego dehydrogenazy pirogronianowej (35). Pozostałe reakcje katalizowane przez składniki kompleksu (reakcje 2–5) są odwracalne, w konsekwencji czego liponian może być zredukowany w obecności NADH lub acetylowany przez acetylo-CoA, powodując inhibicję aktywności kompleksu przez produkty reakcji (4, 36, 37). Cooper i współautorzy (36) sugerują, że acetylacja oraz redukcja ruchliwej reszty liponianowej związa-

nej z kompleksem ma wpływ na szybkość jego fosforylacji. Zagadnienie to zostanie omówione w dalszej części artykułu.

Bliższe szczegóły dotyczące budowy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej z tkanek zwierzęcych a także kinetyki reakcji katalizowanych przez ten kompleks można znaleźć w pracach poświęconych temu zagadnieniu (10, 19, 22, 27, 31, 35, 38).

III. Mechanizmy regulacji aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej

Poznano dwa główne mechanizmy regulacji aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach zwierzęcych: inhibicję przez produkty reakcji oraz przemienność jego form: aktywnej (nieufosforylowanej) i nieaktywnej (ufosforylowanej). Należy zaznaczyć, że te dwa mechanizmy ściśle współdziałają w regulacji aktywności kompleksu, ponieważ fosforylacja a zatem inaktywacja jest stymulowana w warunkach sprzyjających inhibicji przez produkty reakcji.

III-1. Inhibicja kompleksu przez produkty reakcji

Inhibicję kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez produkty reakcji zaobserwowali Garland i Randle w 1964 roku (39), co następnie potwierdzili inni badacze (40—42). Acetylo-CoA i NADH są silnymi kompetycyjnymi inhibitorami kompleksu odpowiednio względem CoA i NAD^+ . Proponowany mechanizm tej inhibicji polega na tym, że przy wysokich stosunkach acetylo-CoA/CoA i NADH/NAD⁺ obniża się ilość związanych z kompleksem reszt liponianowych występujących w formie utlenionej, czyli Lip.(S.S)Enz₂. To z kolei prowadzi do wzrostu w kompleksie ilości jednostek dekarboksylazy pirogronianowej w formie hydroksyetylo⁻-TPP.Enz₁ i ograniczenia szybkości dekarboksylacji pirogronianu zależnej od ilości dekarboksylazy pirogronianowej w formie TPP-Enz₁ (patrz schemat 2).

Równie efektywnym jak acetylo-CoA inhibitorem kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej jest propionylo-CoA hamujący kompleks w sposób kompetycyjny względem CoA (43).

W Tabeli I zestawiono dane dotyczące kinetycznych właściwości kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej pochodzącej z różnych tkanek zwierzęcych. Wysokie powinowactwo kompleksu zarówno względem substratów jak i produktów reakcji sprawia, że zmiany stosunku stężeń NADH/NAD⁺ oraz acetylo-CoA/CoA są ważnym czynnikiem regulującym jego aktywność.

Tabela 1

Stale kinetyczne kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej pochodzącej z różnych tkanek

Źródło enzymu	Związek	Stale kinetyczne	
		K_m (mM)	K_i (mM)
Serce świni (35, 40, 43)	pirogronian	2×10^{-5} ; $2,8 \times 10^{-7}$	
	TPP	1×10^{-6}	
	CoA	5×10^{-6} ; 3×10^{-6}	
	NAD ⁺	4×10^{-5} ; $2,5 \times 10^{-5}$	
	Mg ²⁺	5×10^{-6}	
	acetylo-CoA		$2,9 \times 10^{-5}$; 5×10^{-6}
Serce wołu (44) Nerka świni (43)	propionilo-CoA		5×10^{-6}
	pirogronian	$3,5 \times 10^{-5}$	
	NAD ⁺	1×10^{-5}	
	NADH		2×10^{-6}
Nerka wołu (41)	pirogronian	4×10^{-5}	
	NAD ⁺	8×10^{-5}	
	CoA	2×10^{-5}	
Wątroba świni (45)	pirogronian	$4,3 \times 10^{-5}$	
	NAD ⁺	$6,4 \times 10^{-5}$	
	CoA	$8,3 \times 10^{-6}$	
	NADH		3×10^{-4}
	acetylo-CoA		$4,3 \times 10^{-5}$

III-2. Regulacja aktywności przez fosforylację kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej

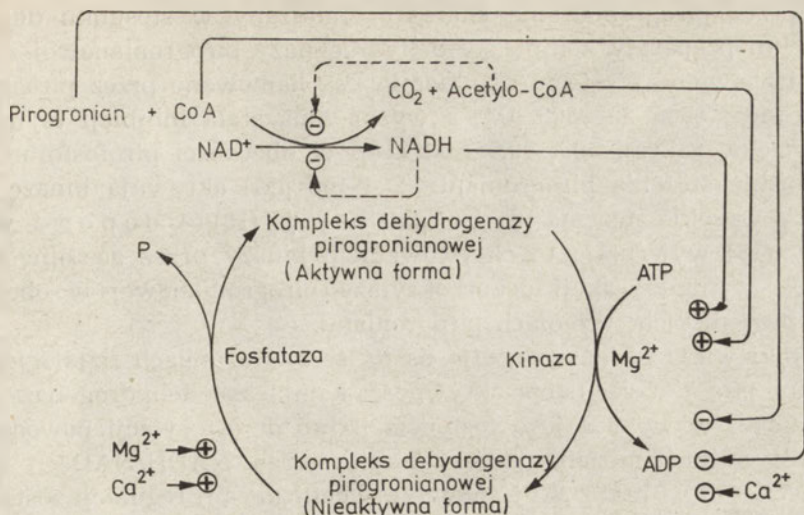
W 1969 roku Linn i wsp. (21, 22) opublikowali dane dotyczące występowania kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w ufosforylowanej (nieaktywnej) i nieufosforylowanej (aktywnej) formie. Przekształcanie wzajemnie tych form kompleksu katalizuje zależna od ATP kinaza dehydrogenazy pirogronianowej oraz fosfataza dehydrogenazy pirogronianowej. Kinaza jest ściśle związana z acetylotransferazą liponianową w kompleksie. Kinaza ta katalizuje fosforylację reszty serynowej w łańcuchu polipeptydowym α -podjednostki dekarboksylazy pirogronianowej przez kowalencyjne związanie grupy fosforanowej dostarczanej przez ATP-Mg^{2-} (44, 45). Fosfataza jest znacznie luźniej związana z kompleksem dehydrogenazy pirogronianowej i może być od niego oddzielona przez szybkie wirowanie (17).

Jak stwierdzono w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej izolowanym z serca wołu występuje około 5 cząsteczek kinazy i tyleż fosfatazy (17). Należy zaznaczyć, że wyizolowana kinaza wykazuje wysoką aktywność tylko po ponownym połączeniu z acetylotransferazą liponianową w kompleksie z którego pochodzi (44). Fosfataza dehydrogenazy pirogronianowej wykazuje znacznie mniejszą specyficzność substratową, bowiem fosfataza pochodząca z serca świni działa na ufosforylowany kompleks wyizolowany z ciała tłuszczowego lub serca szczura.

Badania nad efektem fosforylacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej na szybkość poszczególnych reakcji katalizowanych przez składniki kompleksu pozwoliły stwierdzić, że zahamowaniu ulegają reakcje w których bierze udział hydroksyetylo⁻-TPP.Enz₁, czyli tworzenie kompleksu hydroksyetylo⁻-TPP.Enz₁ (reakcja 1) oraz powstawanie związanego z transacetylazą liponianową acetylohydroliponianu z pirogronianu (reakcja 2). Szybkość pozostałych reakcji, a mianowicie utleniania i redukcji reszty liponianowej oraz oddziaływania acetylo-CoA z transacetylazą liponianową dającego w wyniku związany z tym enzymem acetylohydroliponian (reakcje 3, 4 i 5), nie ulega zmianie (35).

Właściwości kinazy i fosfatazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej były przedmiotem badań wielu grup badawczych (4, 10, 18, 35—37, 47—51). Wyniki tych badań są podsumowane na schemacie 3 uwzględniającym czynniki mogące mieć znaczenie w regulacji obu enzymów w warunkach fizjologicznych.

Izolowana z różnych tkanek fosfataza dehydrogenazy pirogronianowej wymaga obecności jonów wapnia i magnezu (10, 52). Stwierdzono, że w obecności magnezu w stężeniu wysycającym (około 1 mM) dodanie wapnia aktywuje fosfatazę pięciokrotnie (52, 53). Użycie buforu Ca^{2+} /EGTA pozwoliło stwierdzić, że fosfataza jest wrażliwa na zmiany stężenia wapnia w zakresie 0.1—10 μM (53). Stała aktywacji fosfatazy przez



Ryc. 3. Współdziałanie mechanizmów inhibicji przez produkty reakcji i fosforylacji w regulacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej

Inhibicję przez produkty reakcji oznaczono linią przerywaną; fosforylację — defosforylację białka kompleksu oznaczono linią ciągłą; + aktywacja; - hamowanie. P oznacza fosforan nieorganiczny.

wapń wynosi około $1 \mu\text{M}$ (10). Wapń obniża K_m fosfatazy względem ufosforylowanej dehydrogenazy pirogronianowej oraz wobec magnezu (52, 53). Pettite i wsp. (47) sugerują, że w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej wapń niezbędny jest do wiązania fosfatazy z acetylotransferazą liponianową. Znanymi inhibitorami fosfatazy są fluorki (54).

Regulacja aktywności kinazy dehydrogenazy pirogronianowej jest znacznie bardziej skomplikowana. Ogólnie można stwierdzić, że kinaza jest hamowana przez substraty kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (pirogronian, NAD^+ , CoA, TPP) a także przez ADP i aktywowana przez produkty reakcji kompleksu (NADH, acetylo-CoA i acetoinę) (22, 28, 44, 48). Należy zaznaczyć, że acetylo-CoA i NADH oddziałują na aktywność kinazy w sposób synergistyczny (36). Kinazę dehydrogenazy pirogronianowej hamuje również magnez w wysokim stężeniu, chlorowcopochodne kwasów karboksylowych (mono-, dwu- i trójchlorooctan, dwu- i trójfluorooctan, dwuchloropropionian) oraz octan i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, jak n-maślan, izo-maślan, propionian i n-walerianian (10, 18, 55, 56).

Hamowanie aktywności kinazy przez ADP wykazuje właściwości hamowania kompetycyjnego względem ATP, jakkolwiek obserwuje się również obniżenie V_{max} reakcji (18, 44). Stwierdzono, że hamowanie to wymaga obecności jednowartościowych kationów a mianowicie K^+ lub NH_4^+ (57).

Pirofosforan tiaminy wykazuje mieszany typ inhibicji kinazy dehydrogenazy pirogronianowej względem ATP. Również hamowanie tego en-

zymu przez pirogronian ma charakter mieszany w stosunku do ATP, przy czym preparaty kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej z serca świni pozbawione pirofosforanu tiaminy są hamowane przez pirogronian w zakresie stężeń 25—500 μM , a wyznaczona stała inhibicji tej reakcji mieści się w zakresie 0.4—0.9 mM (18). W obecności pirofosforanu tiaminy niskie stężenia pirogronianu (25—100 μM) aktywują kinazę, podczas gdy wysokie stężenia (do 500 μM) hamują (18). Cooper i współautorzy (18) wyjaśniają to aktywowaniem kinazy przez acetoinę utworzoną w wyniku reakcji dekarboksylazy pirogronianowej w obecności TPP i przy niskich stężeniach pirogronianu.

Wyniki wielu badań wskazują na to, że w warunkach fizjologicznych najważniejsza jest regulacja aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w wyniku jego fosforylacji lub defosforylacji powodowana zmianami mitochondrialnymi stosunków stężeń NADH/NAD^+ i acetylo-CoA/CoA (36, 37, 48). Wyjaśnienie mechanizmu tej regulacji zostało zaproponowane przez Coopera i wsp. (4, 36) sugerujących udział w tym procesie ruchliwych reszt liponianowych związanych z kompleksem. Badacze ci zakładają, że reszta liponianowa w formie utlenionej zajmuje pozycję w kompleksie w pobliżu α -podjednostki dekarboksylazy pirogronianowej zapobiegając jej fosforylacji przez efekt zawady przestrzennej. Acetylacja lub redukcja liponianu w obecności acetylo-CoA i NADH powoduje przesunięcie reszty liponianowej w pobliże centrów aktywnych acetylotransferazy liponianowej i dehydrogenazy liponianowej, co prowadzi do umożliwienia ponownej fosforylacji dekarboksylazy pirogronianowej przez kinazę (4, 36). Jest również możliwe, że zredukowana lub zacylowana forma reszty liponianowej aktywuje kinazę w sposób bezpośredni (37). Hipotezę tę potwierdzają dane dotyczące wzrostu aktywności kinazy w obecności pirogronianu w niskich stężeniach. W warunkach takich następuje acetylacja reszt liponianowych kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej a zatem aktywacja kinazy (58). Powyższy mechanizm wyjaśnia znaczne obniżenie aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w obecności NADH i acetylo-CoA w wyniku współdziałania inhibicji przez produkty reakcji oraz przez fosforylację kompleksu spowodowaną aktywacją kinazy.

Badania prowadzone przez Pratta i Roche'a (59) postulują rolę pirogronianu i nukleotydów adeninowych a zwłaszcza ADP w regulacji aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez fosforylację. Pirogronian wiąże się w obecności ADP w sposób specyficzny z kompleksem jaki tworzy kinaza-ADP. Fakt, że w obecności ADP (kompetycyjnego inhibitora kinazy względem ATP) zmieniają się kinetyczne właściwości inhibicji kinazy przez pirogronian z inhibicji o charakterze mieszanym na inhibicję o charakterze niekompetycyjnym, wynika z sekwencyjnego wiązania z kinazą najpierw ADP, a następnie pirogronianu. Ponadto stwierdzono, że ADP i pirogronian oddziałują na kinazę w spo-

sób synergistyczny. Ma to ogromne znaczenie w warunkach fizjologicznych ponieważ sprawia, że w stanie wysoko energetycznym komórki, charakteryzującym się wysokim stosunkiem mitochondrialnego ATP/ADP, kinaza jest stosunkowo nieczuła na inhibicję przez pirogronian. W warunkach spadku energii, prowadzącym do obniżenia stosunku ATP/ADP, kinaza ulega inaktywacji, co prowadzi do wzrostu ilości kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w formie aktywnej. Mechanizm ten pozwala na precyzyjną regulację dostępności mitochondrialnego pirogronianu dla procesu glukoneogenezy w warunkach wysokoenergetycznych lub produkcję acetylo-CoA przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej w warunkach obniżenia poziomu energetycznego komórki.

Dalsze badania nad kompleksem dehydrogenazy pirogronianowej wykazały, (32, 46, 60, 61), że kinaza fosforyluje kolejno trzy reszty serynowe w α -łańcuchu każdego $\alpha_2\beta_2$ tetrameru dekarboksylazy pirogronianowej, przy czym inaktywację reakcji dekarboksylacji powoduje fosforylacja tylko jednej reszty serynowej (centrum 1) zgodnie z równaniem:

kompleks dehydrogenazy pirogronianowej ($\alpha_2\beta_2$) + ATP → kompleks dehydrogenazy pirogronianowej ($\alpha_2P\beta_2$) + ADP

Jest to tzw. fosforylacja inaktywująca. Dwie następne reszty fosforanowe są przyłączane do następnych grup serynowych wg. wzoru:

kompleks dehydrogenazy pirogronianowej ($\alpha_2P\beta_2$) + 2ATP → kompleks dehydrogenazy pirogronianowej ($\alpha_2P_2\beta_2$) + 2ADP

Dodatkowe czyli tzw. nieinaktywujące fosforylacje (centrum 2 i 3) wpływają na obniżenie szybkości defosforylacji i reaktywacji ufosforylowanego kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez fosfatazę (51, 60). Fizjologiczna rola mechanizmów regulacji aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez fosforylację będzie omówiona w dalszej części artykułu. Należy bowiem podkreślić, że zarówno kinaza jak i fosfataza w izolowanych mitochondriach i komórkach a także w perfundowanych tkankach wykazują podobne właściwości do cechujących oczyszczone enzymy.

IV. Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w sercu i mięśniach szkieletowych

Pirogronian powstający w mięśniach z glikogenu lub glukozy ulega w mitochondriach utlenieniu przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej i następnie w cyklu Krebsa, lub przekształceniu do mleczanu względnie alaniny. Szybkość utleniania pirogronianu zależy od aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, a ilość tworzonego mleczanu uzależniona jest od możliwości reoksydacji przez łańcuch oddechowy równoważników redukujących wytwarzanych w procesie glikolizy. Utlenianie NADH jest ograniczone przede wszystkim dostępnością

tlenu w tkance, co sprawia, że w warunkach niedotlenienia mleczan staje się głównym produktem glikolizy w mięśniach. Gdy oddychanie nie jest limitowane dostępnością tlenu, szybkość utleniania pirogronianu w mitochondriach zależy od zmiany stężenia ATP spowodowanych wzmożoną pracą mięśni oraz od dostępności innych substratów oddechowych. Jak to już poprzednio stwierdzono substraty oddechowe powstające z rozpadu lipidów, takie jak kwasy tłuszczowe i ciała ketonowe są utleniane ze znacznie większą szybkością niż pirogronian. Inhibicja utleniania pirogronianu w sercu i mięśniach szkieletowych w obecności tych substratów była przedmiotem intensywnych badań (39, 62—72). W powyższych warunkach aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej ulega znacznemu obniżeniu przez połączone mechanizmy fosforylacji i hamowania przez produkty reakcji (3, 39, 62—72), co jest spowodowane znacznym wzrostem stosunków mitochondrialnych acetylo-CoA/CoA i NADH/HAD⁺ (65—67, 69—72). Nie stwierdzono natomiast znamienego wzrostu stosunku ATP/ADP w mitochondriach utleniających palmitylokarnitynę (65, 69, 71). Podobne zmiany aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej obserwuje się w stanach głodzenia i w cukrzycy, charakteryzujących się zwiększonym zużyciem kwasów tłuszczowych i ciał ketonowych, czemu towarzyszy wzrost stosunku acetylo-CoA/CoA w tkance (39, 67, 73).

Dalsze badania wykazały, że mechanizm hamowania kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w pewnych warunkach jest bardziej złożony. Mianowicie, reaktywacja, czyli defosforylacja nieaktywnego kompleksu w perfundowanym sercu lub w izolowanych mitochondriach serca szczurów po 48 godz. głodzeniu lub z cukrzycą alloxanową jest znacznie obniżona w porównaniu do obserwowanej u zwierząt normalnie karmionych (68, 70). Badania przeprowadzone przez zespół Randle'a (51, 60, 68, 70) sugerują, że fosforylacja dodatkowych miejsc (centrum 2 i 3) w podjednostce dekarboksylazy pirogronianowej będąca wynikiem długotrwałego niedoboru insuliny w cukrzycy lub po przedłużonym okresie głodzenia a także w wyniku perfuzji mięśnia sercowego w obecności octanu sprawia, że tak zmodyfikowane białko kompleksu jest znacznie wolniej defosforylowane przez fosfatazę. Należy podkreślić, że pirogronian hamuje, a wzrastające stosunki stężeń ATP/ADP, NADH/NAD⁺ i acetylo-CoA/CoA stymulują dodatkowe fosforylacje kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (51). Dotychczasowe badania potwierdziły wzrost stosunku acetylo-CoA/CoA w mitochondriach serca szczurów głodzonych lub z cukrzycą alloxanową, nie stwierdzono natomiast wzrostu stosunku ATP/ADP ani NADH/NAD⁺ (67).

Wiele trudności sprawia wyjaśnienie mechanizmu powiązania zmian aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej z wydajnością łańcucha oddechowego i procesu oksydacyjnej fosforylacji. Opublikowane dane wskazują, że w sercu i mięśniach szkieletowych zmiany wywołane

obciążeniem pracą powodują równoległe zmiany w ilości aktywnej nieufosforylowanej formy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (64, 72, 74—76). Wydaje się oczywistym, że aktywność kinazy dehydrogenazy pirogronianowej spada wraz z obniżeniem mitochondrialnego stosunku ATP/ADP towarzyszącym wzmożonemu rozpadowi ATP w czasie skurczu mięśnia (77). Jednakże, jakkolwiek łatwo jest wykazać, że w izolowanych mitochondriach zmiany stosunku ATP/ADP zawsze są skorelowane ze zmianami ilości formy aktywnej kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, to dotychczasowe metody badań nie są wystarczająco dokładne do ustalenia istnienia takiej korelacji w komórce czy tkance *in vivo* (78, 79).

Atrakcyjną hipotezę dotyczącą mechanizmu regulacji aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej zaproponowali Denton i wsp. (80) oraz Hansford (62, 81). Jest ona oparta na obserwacji, że w mitochondriach serca aktywność fosfatazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej wzrasta a kinazy maleje wraz ze wzrostem stężenia wapnia dodawanego do środowiska inkubacyjnego w zakresie od 0.1 do 1.0 μM . Badania tych autorów pozwoliły ustalić, że zmiany stopnia fosforylacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej zależą od zmian stężeń niezwiązanego wapnia w mitochondriach. W komórce mięśniowej zmiany stężenia wewnątrzmitochondrialnego wapnia odzwierciedlają zmiany stężenia wapnia w cytoplazmie zachodzące w wyniku skurczu mięśni. Jednak ustalenie precyzyjnych powiązań między tymi procesami wymaga dalszych badań.

Należy podkreślić, że wykryto równoczesną aktywację dehydrogenaz cyklu Krebsa w tym samym zakresie zmian stężenia niezwiązanego wapnia w mitochondriach (80, 82, 83). Aktywacji ulegają dehydrogenaza α -ketoglutaranowa oraz zależna od NAD^+ dehydrogenaza izocytrynianowa. Powoduje to korelacje aktywacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej i zwiększenia produkcji acetylo-CoA ze wzmożeniem jego utleniania w cyklu Krebsa. Zmiany stężenia niezwiązanego wapnia w mitochondriach umożliwiają zwiększenie szybkości utleniania równoważników redukujących w łańcuchu oddechowym bez konieczności znacznego obniżenia mitochondrialnego stosunku ATP/ADP. Ze względu na znaczne trudności metodyczne jakie nasuwa pomiar stężenia niezwiązanego wapnia w mitochondriach ustalenie mechanizmu tych zmian pozostaje kwestią przyszłości.

V. Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkance tłuszczowej. Wpływ insuliny

Tkanka tłuszczowa jest jednym z głównych miejsc syntezy lipidów u zwierząt. Podczas syntezy kwasów tłuszczowych z glukozy kompleks

dehydrogenazy pirogronianowej dostarcza acetylo-CoA, który następnie jest transportowany jako cytrynian do cytoplazmy, gdzie stanowi źródło acetylo-CoA do syntezy kwasów tłuszczowych. Aktywacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkance tłuszczowej przez insulinę jest znana od około 10-ciu lat (10, 84—92). Wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska nastęrcza jednak dużo trudności a badania dostarczają kontrowersyjnych wyników. Inkubacja adipocytów w obecności insuliny powoduje defosforylację i aktywację kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (8, 10, 84, 86—88, 93—99). Wiele danych przemawia za tym, że efekt insuliny nie wynika bezpośrednio ze znanego wpływu tego hormonu na wzrost transportu glukozy przez błonę komórkową lub na metabolizm trójglicerydów (10, 87, 100). W toku wieloletnich badań stwierdzono, że insulina nie zmienia w sposób znaczący wewnątrzmitochondrialnego stosunku stężeń efektorów kinazy dehydrogenazy pirogronianowej, takich jak ATP/ADP lub NADH/NAD⁺ (101—103). Paetzke-Brunner i współautorzy (99) stosując technikę frakcjonowania komórek z ciała tłuszczowego szczura przy użyciu digitoniny wykazali, że insulina obniża w sposób znamieny wewnątrzmitochondrialny stosunek acetylo-CoA/CoA, co z kolei wpływa na stan ufosforylowania kompleksu powodując zwiększenie ilości formy aktywnej. Inni badacze jednak nie potwierdzili tego (11). Dostępne dane doświadczalne nie zezwalają na wyjaśnienie mechanizmu działania insuliny na kompleks dehydrogenazy pirogronianowej w tkance tłuszczowej. Nie oddziałują one za pośrednictwem zmian stężenia cyklicznego AMP w komórce, bowiem prostaglandyny, które również aktywnie obniżają to stężenie, nie wykazują jednoznacznego wpływu na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (87, 88).

Bezpośrednie pomiary włączania ³²P do kompleksu nie wykazały inhibicji aktywności kinazy dehydrogenazy pirogronianowej pod wpływem insuliny (97). Natomiast uzyskano kontrowersyjne wyniki dotyczące zmian w aktywności fosfatazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w ekstraktach tkankowych po podaniu insuliny. Pewni badacze stwierdzili aktywację (91, 93), natomiast inni nie wykryli żadnych zmian (11, 49, 53, 101, 102).

Wydaje się, że insulina może oddziaływać na aktywację fosfatazy dehydrogenazy pirogronianowej między innymi przez zmiany stężenia niezwiązanego wapnia w mitochondriach. Bezpośredni wpływ wapnia na aktywację kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w skrawkach lub izolowanych mitochondriach z tkanki tłuszczowej (10, 53, 93, 104), oraz na oczyszczoną fosfatazę (52) był wielokrotnie demonstrowany. Nie uzyskano jednak dotychczas danych dotyczących wpływu insuliny na zmiany stężenia wapnia w mitochondriach (10, 105). Ostatnie badania dostarczyły dowodów na występowanie zależnego od insuliny niskocząsteczkowego związku, izolowanego z błony komórkowej adipocytów, aktywującego *in*

in vitro kompleks dehydrogenazy pirogronianowej w sposób analogiczny do efektu insuliny *in vivo* (106, 107). Czynnikiem ten jest być może długo poszukiwanym kandydatem do roli pośrednika oddziaływania insuliny w komórce. Wpływ insuliny może być odwrócony przez adrenalinę lub hormon adreno-kortykotropowy (ACTH) (84, 108, 109). Oddziaływanie hormonów na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej ma istotne znaczenie w regulacji lipogenezy w tkance tłuszczowej, ponieważ szybkość dostarczania acetylo-CoA jest jednym z czynników ograniczających szybkość tego szlaku metabolicznego (110).

W odróżnieniu od opisanego powyżej krótkotrwałego działania insuliny na kompleks dehydrogenazy pirogronianowej w tkance tłuszczowej obserwuje się również efekt długotrwałego niedoboru insuliny w czasie głodzenia lub cukrzycy. Wpływ ten polega na znacznym zmniejszeniu ilości aktywnej formy kompleksu podczas gdy całkowita ilość kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej nie ulega zmianie (22, 24, 49, 111). Wpływ długotrwałego braku insuliny na zmiany ilości formy aktywnej kompleksu może być związany ze wzmożeniem metabolizmu kwasów tłuszczowych występującym w opisanych warunkach i nie ulega odwróceniu przez inkubację adipocytów w obecności insuliny (10). Oznacza to, że zmiany jakie zachodzą w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej w tkance zwierząt z cukrzycą powodują trwałe zmniejszenie wrażliwości kompleksu na działanie insuliny. Należy podkreślić, że jakkolwiek długotrwały wpływ niedoboru insuliny na obniżenie ilości kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w formie aktywnej występuje w wielu tkankach, to krótkotrwałe oddziaływanie insuliny, polegające na wzroście ilości formy aktywnej kompleksu w obecności hormonu, zaobserwowano tylko w tkance tłuszczowej.

VI. Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w wątrobie

W wątrobie funkcjonuje wiele dróg metabolicznych przetwarzających pirogronian (schemat 1). U zwierząt normalnie karmionych pirogronian służy jako substrat do syntezy kwasów tłuszczowych natomiast w czasie głodzenia lub w innych stanach charakteryzujących się wysokim poziomem glukagonu we krwi pirogronian jest przekształcany głównie do glukozy i glikogenu. Specyficzny metabolizm wątroby jako głównego, oprócz nerek, producenta glukozy zużywanej przez inne tkanki sprawia, że w warunkach glukoneogenezy aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej jest wydatnie zmniejszona. Analogicznie jak to zostało opisane dla serca, mięśni szkieletowych i tkanki tłuszczowej hamowanie to zachodzi poprzez współdziałanie inhibicji przez produkty reakcji oraz przez fosforylację kompleksu spowodowane wzmożonym utlenianiem kwasów tłuszczowych powodujących wzrost mitochondrialnych stosunków stężeń acetylo-CoA/CoA oraz NADH/NAD⁺ (112—120).

Na podstawie wielu badań stwierdzono ścisłą korelację między mitochondrialnym stosunkiem stężeń ATP/ADP i zmianami ilości formy aktywnej kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (115, 118, 121—125). Jednak usiłowania zmierzające do stwierdzenia występowania takiej zależności w mitochondriach lub hepatocytach utleniających kwasy tłuszczowe dają kontrowersyjne wyniki. Wałajtys-Rode (126) wykazała znamienne wzrost stosunku ATP/ADP w mitochondriach utleniających palmitylkarnitynę, podczas gdy nieznaczne zmiany tego stosunku stwierdzono we frakcji mitochondrialnej hepatocytów inkubowanych z oleinianem (124).

Ostatnie badania dostarczyły danych stwierdzających, że glukagon oprócz wpływu na zwiększenie mobilizacji i utleniania kwasów tłuszczowych powoduje wzrost mitochondrialnego potencjału błonowego (127) oraz stymulację przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym pomiędzy cytochromem b i c (128). Towarzyszy temu wzrost mitochondrialnego stężenia ATP (129, 130). Nie zaobserwowano jednak bezpośredniego oddziaływania glukagonu na zmiany ilości formy aktywnej kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w izolowanych hepatocytach (131). Podobnie nie potwierdzono krótkotrwałego wpływu insuliny na kompleks dehydrogenazy pirogronianowej w wątrobie. Również podanie surowicy antyinsulinowej zwierzętom nie powoduje żadnej zmiany aktywności kompleksu (96). Należy tu zaznaczyć, że transport i zużycie glukozy przez wątrobę jest uzależnione w znacznie mniejszym stopniu od insuliny niż to jest obserwowane w innych tkankach (132, 133). Długotrwały niedobór insuliny u zwierząt z cukrzycą alloxanową powoduje znaczne obniżenie ilości kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w formie aktywnej, a także zmniejsza znamienne wrażliwość kompleksu na jego reaktywację w obecności pirogronianu (133a). Sugeruje to, że kompleks dehydrogenazy pirogronianowej w wątrobie podlega trwałym zmianom polegającym na fosforylacji dodatkowych reszt serynowych podobnie jak to stwierdzono w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej w sercu zwierząt z cukrzycą.

Patzelt i współautorzy (134) sugerują, że aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w warunkach umożliwiających lipogenezę w wątrobie jest zależna od mitochondrialnego stężenia pirogronianu. Nie wiadomo jeszcze czy obniżanie aktywności kinazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez pirogronian ma znaczenie w warunkach fizjologicznych. Dotychczas opublikowane dane dotyczące pomiarów mitochondrialnego stężenia pirogronianu uzyskane po frakcjonowaniu digitoniną hepatocytów inkubowanych w obecności mleczanu, wykazują wartości około 1 mM (130). Wartość ta jest w zakresie stałej inhibicji kinazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej względem pirogronianu. Należy zaznaczyć, że wartość ta jest 20—30 razy większa od stałej Michaelisa kompleksu względem pirogronianu jako substratu (18).

Pozostaje kwestią dalszych badań ustalenie czy transport pirogronianu do mitochondriów może być czynnikiem ograniczającym aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w różnych warunkach metabolicznych (135—136).

Również nie jest wyjaśniona rola wewnątrzmitochondrialnego niezwiązanego wapnia w aktywacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w wątrobie, bowiem wazopresyna powodująca obniżenie wapnia w mitochondriach aktywuje kompleks (138), podczas gdy obniżenie mitochondrialnego stężenia wapnia i magnezu przy użyciu jonoforu powoduje inhibicję kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, która jest odwracalna przez dodanie obu kationów (122).

VII. Uwagi końcowe

Omówione przykłady roli kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w różnych tkankach wskazują na ogromne znaczenie jakie spełnia regulacja jego aktywności w zapewnieniu normalnego funkcjonowania całego organizmu, a zwłaszcza w zapewnieniu zaopatrzenia tkanek obwodowych w glukozę. Wniosek ten jest potwierdzony przez doświadczenia z użyciem dwuchlorooctanu, znanego inhibitora kinazy kompleksu katalizującego przekształcenie nieaktywnego kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w jego aktywną formę. Podanie dwuchlorooctanu szczurom głodzonym lub z cukrzycą alloksanową powoduje znaczne obniżenie stężenia pirogronianu, mleczanu, alaniny i glukozy we krwi (56, 139—141).

Znana jest od dawna inhibicja utleniania glukozy i pirogronianu w różnych tkankach przez α -ketokwasy o rozgałęzionym łańcuchu węglowym, jednak mechanizm tego zjawiska nie był wyjaśniony (142—150). Ostatnie badania wykazały, że wzmożony metabolizm tych związków prowadzi do znacznego zahamowania kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez prawdopodobnie nagromadzające się estry acylo-CoA będące pośrednikami przemiany α -ketoizokaproinianu lub α -ketoizowalerianianu w wątrobie (114) i w innych tkankach.

Na zakończenie należy podkreślić znaczenie badań dotyczących poznania mechanizmów regulacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w wyjaśnieniu patologii przemian węglowodanów, jak to jest obserwowane w cukrzycy lub przy wrodzonych zaburzeniach metabolicznych spowodowanych zahamowaniem lub całkowitym brakiem aktywności składników kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (151—152).

Zaakceptowano do druku 25.03.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Garland P. B., Randle P. J., (1964), *Biochem. J.*, **93**, 678—687.
2. Randle P. J., England P. J., Denton R. M., (1970), *Biochem. J.*, **117**, 677—695.

3. Wieland O. H., Funcke H. V., Löffler G., (1971), *FEBS Lett.*, **15**, 295—298.
4. Kerbey A. L., Randle P. J., Cooper R. H., Whitehouse S., Pask H. T., Denton R. M., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 327—348.
5. Kerbey A. L., Radcliffe P. M., Randle P. J., (1977), *Biochem. J.*, **164**, 509—519.
6. Jungas R. L., (1971), *Metabolism*, **20**, 43—53.
7. Denton R. M., Coore H. G., Martin B. R., Randle P. J., (1971), *Nature*, **231**, 115—116.
8. Weiss L., Löffler G., Schirmann A., Wieland O. H., (1971), *FEBS Lett.*, **15**, 229—231.
9. Reed L. J., (1969), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **1**, 233—251.
10. Denton R. M., Randle P. J., Bridges B. J., Cooper R. M., Kerbey A. L., Pask H. T., Severson D. L., Stansbie D., Whitehouse S., (1975), *Mol. Cell. Biochem.*, **9**, 27—53.
11. Denton R. M., Hughes W. A., (1978), *Int. J. Biochem.*, **9**, 545—553.
12. Randle P. J., (1978), *Trends in Biochem. Sci.*, **3**, 217—219.
13. Denton R. M., Halestrap A. P., (1979), *Assays in Biochem.*, **15**, 37—77.
14. Sołtysiak-Pawluczuk D., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 379—399.
15. Ulrich J., Mannschreck A., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **1**, 110—116.
16. Hayakawa T., Kanzaki T., Kitamura P., Fukuyoshi Y., Sakurai Y., Koike K., Suematsu T., Koike M., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3660—3670.
17. Linn T. C., Pelley J. W., Pettit F. H., Hucho F., Randall D. D., Reed L. J., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 327—342.
18. Cooper R. H., Randle P. J., Denton R. M., (1974), *Biochem. J.*, **143**, 625—641.
19. Barrera C. R., Namihara G., Hamilton L., Munk P., Eley M. H., Linn T. C., Reed L. J., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 343—358.
20. Hamada M., Hiraoka T., Koike K., Ogasahara K., Kanzaiki T., Koike M., (1976), *J. Biochem.*, (Tokyo), **79**, 1273—1285.
21. Linn T. C., Pettit F. H., Hucho F., Reed L. J., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 227—234.
22. Linn T. C., Pettit F. H., Reed L. J., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, 234—241.
23. Severin S. E., Feigina M. M., (1977), *Adv. Enzyme Regul.*, **15**, 1—12.
24. Wieland O. H., Siess E., (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **15**, 947—954.
25. Kresze G. B., Ronft H., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 573—579.
26. Nawa H., Brady W. T., Koike M., Reed L. J., (1960), *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 896—903.
27. Koike M., Reed L. J., Carroll W. R., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 30—39.
28. Roche T. E., Reed L. J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 840—846.
29. Reed L. J., (1974), *Accounts of Chem. Res.*, **7**, 40—46.
30. Reed L. J., Oliver R. M., (1963), *Brookhaven Symp. Biol.*, **21**, 397—407.
31. Hamada M., Otsuka K., Tanaka N., Ogasahara K., Koike K., Hiraoka T., Koike M., (1975), *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 187—197.
32. Sugden P. H., Randle P. J., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 659—668.
33. Bates D. L., Harrison R. A., Perham R. N., (1975), *FEBS Lett.*, **60**, 427—430.

34. Ishikawa E., Oliver R. M., Reed L. J., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 534—541.
35. Walsh D. A., Cooper R. H., Denton R. J., Bridges B. J., Randle P. J., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 41—67.
36. Cooper R. H., Randle P. J., Denton R. J., (1975), *Nature*, **257**, 808—809.
37. Cate R. L., Roche T. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 496—503.
38. Butterworth P. J., Tsai C. S., Eley M. H., Roche T. E., Reed L. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1921—1925.
39. Garland P. B., Randle P. J., (1964), *Biochem. J.*, **91**, 6c—7c.
40. Wieland O. H., von Jagow-Westermann B., Stukowski B., (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 329—334.
41. Tsai C. S., Burgett M. W., Reed L. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8348—8352.
42. Cleland W. W., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8353—8355.
43. Bremer J., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **8**, 535—540.
44. Hucho F., Randall P. D., Roche T. E., Burgett M. W., Pelley J. W., Reed L. J., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 328—340.
45. Roche E. T., Cate R. L., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 664—677.
46. Yeaman S. J., Hutcheson E. T., Roche T. E., Pettit F. H., Brown J. R., Reed L. J., Watson D. C., Dixon G. H., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2364—2369.
47. Pettit F. H., Roche T. E., Reed L. J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 563—571.
48. Pettit F. H., Pelley J. W., Reed L. J., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 575—582.
49. Stansbie D., Denton R. M., Bridges B. J., Pask H. T., Randle P. J., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 225—236.
50. Butler J. R., Pettit F. H., Davis P. F., Reed L. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1667—1674.
51. Kerbey A. L., Radcliffe P. M., Randle P. J., Sugden P. H., (1979), *Biochem. J.*, **181**, 427—433.
52. Denton R. M., Randle P. J., Martin B. R., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 161—163.
53. Severson D. I., Denton R. M., Pask H. T., Randle P. J., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 225—237.
54. Siess E. A., Wieland O. K., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 96—105.
55. Whitehouse S., Randle P. J., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 651—653.
56. Whitehouse S., Cooper R. H., Randle P. J., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 761—774.
57. Roche T. E., Reed L. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1341—1348.
58. Cate R. L., Roche T. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1659—1665.
59. Pratt M. L., Roche T. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7191—7196.
60. Sugden P. H., Hutson N. J., Kerbey A. L., Randle P. J., (1978), *Biochem. J.*, **169**, 433—435.
61. Sugden P. H., Kerbey A. L., Randle P. J., Waller C. A., Reid K. B., (1979), *Biochem. J.*, **181**, 419—426.
62. Hansford R. G., Cohen L., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**, 65—81.
63. Wieland O. H., Siess E., Schulze-Wethmar F. H., v. Funcke H. G., Winton B., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 593—601.
64. Hagg S. A., Taylor S. I., Ruderman N. B., (1976), *Biochem. J.*, **158**, 203—210.

65. Hansford R. G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1552—1560.
66. Portenhausser R., Wieland O. H., Wenzel H., (1977), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 647—658.
67. Kerbey K. L., Radcliffe P. M., Randle P. J., (1977), *Biochem. J.*, **164**, 509—519.
68. Hutson N. J., Randle P. J., (1978), *FEBS Lett.*, **92**, 73—76.
69. Olson M. S., Dennis S. C., Routh C. A., Debuysere M. S., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 121—131.
70. Hutson N. J., Kerbey A. L., Randle P. J., Sugden P. H., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 669—680.
71. Olson M. S., Dennis S. C., Debuysere M. S., Padma A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7369—7375.
72. Henning G., Löffler G., Wieland O. H., (1975), *FEBS Lett.*, **59**, 142—145.
73. Goodman M. N., Berger M., Ruderman N. B., (1974), *Diabetes*, **23**, 881—888.
74. Hiltunin J. K., Hassinen I. E., (1976), *Biochem. Biophys. Acta*, **440**, 377—390.
75. Illingworth J. A., Mulling R., (1976), *Bioch. Soc. Trans.*, **4**, 291—292.
76. Pearce F. J., Wałajtys-Rode E. I., Williamson J. R., (1980), *J. Mol. Cell. Cardiology*, **12**, 499—510.
77. Hansford R. G., (1980), *Curr. Top. Bioenerg.*, **10**, 217—278.
78. Wieland O. H., v. Jagow-Westermann B., (1969), *FEBS Lett.*, **3**, 271—274.
79. Hucho F., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 499—505.
80. Denton R. M., Mc Cormack J. G., Edgell N. J., (1980), *Biochem. J.*, **190**, 107—117.
81. Hansford R. G., (1981), *Biochem. J.*, **194**, 721—732.
82. Denton R. M., Richards D. A., Chin J. G., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 899—906.
83. Mc Cormack J. G., Denton R. M., (1979), *Biochem. J.*, **180**, 533—544.
84. Coore H. G., Denton R. M., Martin B. R., Randle P. J., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 105—130.
85. Jungas R. L., (1970), *Endocrinology*, **86**, 1368—1375.
86. Ingles R. L., Taylor S. I., (1972), w *Insulin Action* (Fritz I. B., ed.) str. 369—413, Academic Press. New York.
87. Martin B. R., Denton R. M., Pask H. T., Randle P. J., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 763—773.
88. Taylor S. I., Mukherjee C., Jungas R. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 73—81.
89. Berman B. G., Halperin M. I., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 885—889.
90. Berman B. G., Halperin M. I., (1973), *Can. J. Biochem.*, **51**, 1544—1547.
91. Sica V., Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2282—2291.
92. Weiss L., Löffler G., Wieland O. H., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 363—377.
93. Mukherjee C., Jungas R. L., (1975), *Biochem. J.*, **148**, 229—235.
94. Soorana S. R., Saggerson E. D., (1976), *FEBS Lett.*, **69**, 144—148.
95. Denton R. M., (1975), *Proc. Nutr. Soc.*, **34**, 217—224.
96. Stansbie D., Brownsey R. W., Crettaz M., Denton R. M., (1976), *Biochem. J.*, **160**, 413—416.
97. Hughes W. A., Denton R. M., (1976), *Nature*, **264**, 471—473.

98. Hughes W. A., Brownsey R., Denton R. M., (1977), w *Phosphorylated Proteins and Related Enzymes* (Pinne L. ed.), str. 13—17, Information Retrieval. London.
99. Paetzke-Brunner I., Schön H., Wieland O. H., (1978), *FEBS Lett.*, **93**, 307—311.
100. Evans G., Denton R. M., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1288—1291.
101. Denton R. M., Hughes W. A., Bridges B. J., Brownsey R. M., Mc Cormack J. G., Stansbie D., (1978), *Horm. Cell. Regul.*, **2**, 191—208.
102. Denton R. M., Bridges B. J., Brownsey R. W., Evans G. L., Hughes W. A., Mc Cormack J. G., (1978), w *Regulations of Fatty Acid and Glycerolipid Metabolism* (Dils R., Knudsen J., eds), str. 21—30, Pergamon Press, Oxford.
103. Wieland O. H., Weiss L., Löffler G., Brunner I., Bard S., (1975), w *Metabolic Interconversion of Enzymes* (Shaltiel S., ed.), str. 125—135, Springer Verlag, Berlin.
104. Mc Cormack J. G., Denton R. M., (1980), *Biochem. J.*, **190**, 95—105.
105. Severson L. D., Denton R. M., Bridges B. J., Randle P. J., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 209—223.
106. Kiechle F. L., Jarett L., Kotagol N., Popp D. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2945—2951.
107. Seals J. R., Czech M. P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2894—2099.
108. Jungas R. L., (1971), *Metab. Clin. Exp.*, **20**, 43—53.
109. Taylor S. I., Jungas R. L., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 12—19.
110. Smith S. J., Saggerson E. D., (1978), *Biochem. J.*, **174**, 119—130.
111. Wieland O. H., Siess E. A., Weiss L., Löffler G., Patzelt C., Portenhauser R., Hartman V., Schirmann A., (1973), *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27**, 371—400.
112. Teufel H., Henahan L. A., Shipp J. C., Boning S., Wieland O. H., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 182—186.
113. Ogata K., Hanson R. W., Weinhouse S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 756—763.
114. Wałajtyś-Rode E. I., Williamson J. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 413—418.
115. Portenhauser R., Wieland O. H., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 308—314.
116. Wieland O. H., Patzelt C., Löffler G., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 426—433.
117. Patzelt C., Löffler G., Wieland O. H., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 117—122.
118. Taylor S. I., Mukherjee C., Jungas R. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2028—2035.
119. Batenburg J. J., Olson M. S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 533—540.
120. Batenburg J. J., Olson M. S., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1364—1370.
121. Wieland O. H., Portenhauser R., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **45**, 577—588.
122. Wałajtyś E. I., Gotesman D. P., Williamson J. R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1857—1865.
123. Siess E. A., Wieland O. H., (1975), *FEBS Lett.*, **52**, 226—230.
124. Siess E. A., Wieland O. H., (1976), *Biochem. J.*, **156**, 91—102.

125. Shrago E., Ball M., Sul H. S., Baquer N. Z., McLean P., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **75**, 83—89.
126. Wałajtys-Rode E. I., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 229—237.
127. Halestrap A. P., (1978), *Biochem. J.*, **172**, 389—398.
128. Halestrap A. P., (1978), *Biochem. J.*, **172**, 399—405.
129. Bryła J., Harris E. J., Plumb J. A., (1977), *FEBS Lett.*, **80**, 433—448.
130. Siess E. A., Brocks D. G., Lattke H. K., Wieland O. H., (1977), *Biochem. J.*, **166**, 225—235.
131. Claus T. H., Pilkis S. J., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 52—68.
132. Cahill G. F., Jr. Ashmore J., Earle A. S., Zottu S., (1958), *Amer. J. Physiol.*, **192**, 491—496.
133. Williams T. F., Exton J. H., Park C. R., Regen D. M., (1968), *Amer. J. Physiol.*, **215**, 1200—1209.
- 133a. Wałajtys-Rode E. I., Wojtczak A. B., Załuska H., (1977), w *Abstracts of 11th FEBS Meeting*, Copenhagen, abstr. no. A1—2 003.
134. Patzelt C., Wieland O., Löffler G., (1973), w *Isolated Liver Perfusion and its Applications* (Bartosek I., Guitani A., Miller L. L., eds) str. 117—122, Raven Press, New York.
135. Waymack P. P., DeBuysere M. S., Olson M. S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9773—9781.
136. Kiełducka A., Paradies G., Papa S., (1981), *J. Bioenerg. Biomembr.*, **13**, 123—132.
137. Murphy E., Coll K., Rich T. L., Williamson J. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6600—6608.
138. Hems D., A., McCormack J. G., Denton R. M., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 627—629.
139. Blackshear P. J., Holloway P. A. H., Alberti K. G. M. M., (1974), *Biochem. J.*, **142**, 279—286.
140. Blackshear P. J., Holloway P. A. H., Alberti K. G. M. M., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 447—456.
141. Blackshear P. J., Holloway P. A. H., Alberti K. G. M. M., (1975), *Biochem. J.*, **150**, 379—387.
142. Lysiak W., Muzalewska A., Angielski S., (1970), *Acta Biochem. Pol.*, **17**, 121—130.
143. Bowden J. A., Mc Arthur C. L., Fried M., (1971), *Biochem. Med.*, **5**, 101—108.
144. Mc Arthur C. L., Bowden J. A., (1972), *Int. J. Biochem.*, **3**, 193—198.
145. Johnson W. A., Connelly J. L., (1972), *Biochemistry* **11**, 2416—2421.
146. Patel M. S., Auerbach V. H., Grover W. D., Wilbur D. O., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1793—1796.
147. Clark J. B., Land J. M., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 25—29.
148. Land J. M., Mowbray J., Clark J. B., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 823—830.
149. Sullivan S. G., Dancis J., Cox R. P., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 225—234.
150. Chang T. W., Goldberg A. L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3696—3701.
151. Blass J. P., Cederbaum S. D., Gibson G. E., (1975), w *Normal and Pathological Development of Energy Metabolism* (Hommes F. A., Van den Bergh C. J., eds) str. 193—210, Academic Press, New York.
152. Tanaka K., (1975), w *Biology Brain Dysfunction* (Gaul G. E., ed.) **3**, str. 47—143, Plenum, New York.

EDWARD BAŃKOWSKI *)

Polimorfizm molekularny kolagenu kręgowców.

Molecular Polymorphism of Vertebrate Collagen

Spis treści

- I. Ogólne informacje o budowie kolagenu
- II. Podstawowe typy kolagenu kręgowców
- III. Kolagen typu I
- IV. Kolagen typu II
- V. Kolagen typu III
- VI. Kolagen typu IV
 - VI-1. Kolagen typu „Col IV”
- VII. Kolagen typu V (Kolagen AB)
- VIII. Inne typy kolagenu
- IX. Fizjopatologiczne aspekty polimorfizmu kolagenu

Contents

- I. General information on collagen structure
- II. Main types of vertebrate collagen
- III. Type I collagen
- IV. Type II collagen
- V. Type III collagen
- VI. Type IV collagen
 - VI-1. Type “Col IV” collagen
- VII. Type V collagen (AB Collagen)
- VIII. Other types of collagen
- IX. Physiopathological aspects of collagen polymorphism

I. Ogólne informacje o budowie kolagenu

Kolagen jest podstawowym składnikiem substancji międzykomórkowej różnych tkanek, stanowiącym około 30% wszystkich białek ustrojowych. Białko to wykazuje szereg nietypowych cech w zakresie składu chemicznego i budowy przestrzennej.

*) Doc. dr hab., Zakład Biochemii Akademii Medycznej, ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok-8.

Około 33% reszt aminokwasowych kolagenu stanowi glicyna, a około 22% stanowią cykliczne iminokwasy. Na szczególną uwagę zasługuje obecność hydroksyproliny i hydroksylizyny, aminokwasów niezmiernie rzadko spotykanych w innych białkach zwierzęcych oraz bardzo niska zawartość aminokwasów siarkowych i aromatycznych. Grupy OH hydroksylizyny są miejscem wiązania składników cukrowych, galaktozy i galaktozylglukozy.

Glicyna jest równomiernie rozmieszczona na całej długości łańcuchów, dlatego białko to może być rozpatrywane jako polimer trójpeptydu o składzie Gly—X—Y. W pozycji X najczęściej występuje prolina lub hydroksyprolina.

Podstawową jednostką strukturalną kolagenu jest tropokolagen, cząsteczka o masie około 300 000 daltonów, złożona z trzech łańcuchów polipeptydowych, zwanych podjednostkami α (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat cząsteczki tropokolagenu.

Linie ciągłe przedstawiają trójspiralny trzon cząsteczki. Linie przerywane przedstawiają telopeptydy. Linie poprzeczne, zespalaające łańcuchy, przedstawiają międzyłańcuchowe wiązania wodorowe.

Obecność dużej liczby reszt prolinowych i hydroksyprolinowych sprawia, iż łańcuchy kolagenowe nie tworzą typowej α — spirali. Reszty iminokwasowe usztywniają cząsteczkę tropokolagenu. Azot iminokwasowy, uczestniczący w tworzeniu wiązań peptydowych, jest wbudowany w strukturę pierścieniową, co ogranicza możliwości rotacji łańcucha polipeptydowego. Potrójna spirala, wytworzona przez łańcuchy kolagenowe, jest bardziej rozciągnięta w porównaniu z α — spiralą. Odległość osiowa sąsiadujących ze sobą reszt aminokwasowych wynosi 29,1 nm, podczas, gdy w przypadku α — spirali wynosi ona jedynie 15 nm.

Tak duże rozciągnięcie łańcuchów kolagenowych uniemożliwia wytwarzanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, pozwala jednak na wytworzenie wiązań typu wodorowego pomiędzy sąsiadującymi ze sobą łańcuchami (Ryc. 1). Grupa C=O proliny wbudowanej w pozycji X jest silnie elektroujemnym fragmentem cząsteczki, tworzącym stabilne wiązanie wodorowe z grupą N—H glicyny znajdującej się w sąsiednim łańcuchu.

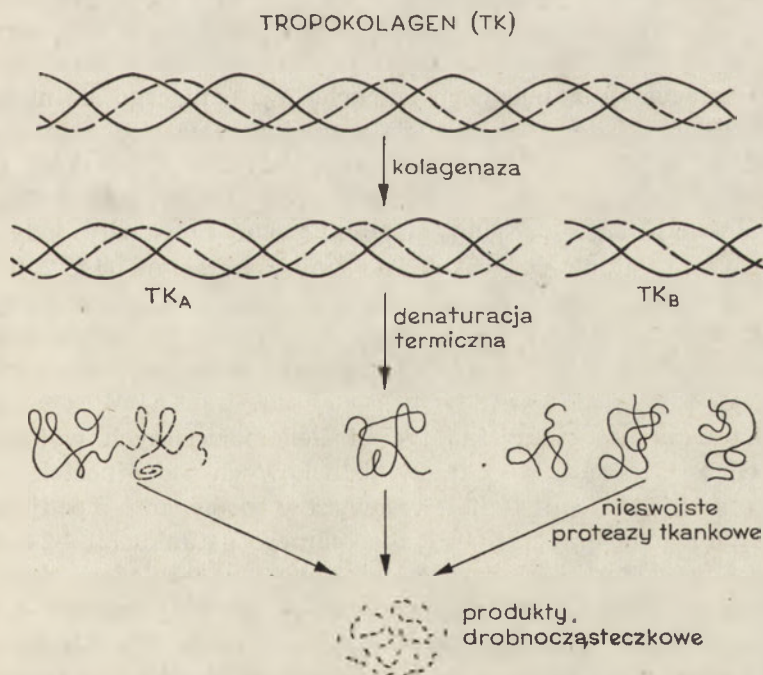
Wykazano, że na jedną trójkę reszt aminokwasowych Gly—X—Y przypada jedno wiązanie wodorowe. Wiązania te utrwalają strukturę potrójnej spirali. W miarę dojrzewania kolagenu jego struktura przestrzenna jest stabilizowana przez wiązania poprzeczne typu kowalencyjnego. Struktura przestrzenna kolagenu jest nietrwała. Denaturacja termiczna tego białka zachodzi już w temp. 35-40°.

Końcowe odcinki łańcuchów α , stanowiące około 5-10% ich długości,

zwane telopeptydami, nie są objęte strukturą potrójnej spirali (Ryc. 1). Mają one inny skład i odmienną sekwencję aminokwasową w porównaniu z trójspiralnymi częściami tropokolagenu. Pojedyncze reszty lizyny i hydroksylizyny, zawarte w telopeptydach, ulegają enzymatycznej dezaminacji oksydacyjnej z wytworzeniem peptydowo związanych semialdehydów: allizyny i hydroksyalizyny. Biorą one udział w wytwarzaniu międzyłańcuchowych, kowalencyjnych wiązań poprzecznych.

Proces biosyntezy kolagenu i potranslacyjnej modyfikacji tego białka wykazuje szereg cech specyficznych. Produkt biosyntezy — protokolagen nie zawiera reszt hydroksyproliny i hydroksylizyny ani składników cukrowych. W temperaturze organizmu wykazuje strukturę nieuporządkowaną. Białko to podlega wieloetpowej potranslacyjnej modyfikacji. Proces ten można podzielić na następujące etapy:

- hydroksylacja niektórych reszt prolilowych i lizylowych z wytworzeniem reszt hydroksyproliny i hydroksylizyny
- glikozylacja niektórych reszt hydroksylizylowych
- transport nowopowstałego białka (protokolagenu) do przestrzeni pozakomórkowej
- konwersja protokolagenu w tropokolagen, polegająca na proteolitycznym odłączeniu końcowych fragmentów łańcuchów protokolagenu, zwanych propeptydami
- powstawanie włókien kolagenowych — fibrogenesa.



Ryc. 2. Schemat procesu enzymatycznej degradacji kolagenu.

Budowa tropokolagenu, proces biosyntezy i potranslacyjnej modyfikacji tego białka zostały dość szczegółowo opisane w poprzednich artykułach poglądowych opublikowanych w Postęпах Biochemii (1—8) i w innych czasopismach (9—15).

Struktura potrójnej spirali chroni kolagen przed działaniem nieswoistych enzymów proteolitycznych. Niektóre bakterie beztlenowe (*Clostridia*), produkują enzym: kolagenazę, trawiącą kolagen do produktów drobno-cząsteczkowych (16).

Proces degradacji kolagenu tkankowego zachodzi pod działaniem kolagenaz tkankowych. W odróżnieniu od kolagenaz bakteryjnych powodują one rozpad cząsteczki tropokolagenu na dwa trójspiralne fragmenty: tropokolagen A i tropokolagen B. Pierwszy z nich stanowi 75% a drugi 25% masy tropokolagenu. Produkty te wykazują niższą temperaturę denaturacji cieplnej niż tropokolagen. Ulegają one denaturacji już w temperaturze organizmu. Zdenaturowane produkty ograniczonej kolagenolizy podlegają działaniu nieswoistych proteaz tkankowych, które trawią je do produktów drobnocząsteczkowych: peptydów i aminokwasów (10, 16, 17) (Ryc. 2).

II. Podstawowe typy kolagenu kręgowców

W końcu lat pięćdziesiątych wykazano, że włókno kolagenowe jest utworzone przez agregację i precyzyjne ułożenie pojedynczych cząsteczek tropokolagenu (18). Szczegółowe badania przeprowadzone w latach sześćdziesiątych wykazały, że cząsteczka tropokolagenu składa się z dwu identycznych łańcuchów α_1 i jednego łańcucha α_2 , różniącego się nieznacznie od poprzednich składem i sekwencją aminokwasową (19). Ponieważ taki skład podjednostkowy wykazuje kolagen z wielu źródeł, jak skóra, ścięgna, kości, przyjął się pogląd, że kolagen kręgowców stanowi jednorodną postać molekularną, o składzie podjednostkowym $(\alpha_1)_2 \alpha_2$ i wykazuje jedynie niewielkie różnice gatunkowe w składzie aminokwasowym (14, 20). Pogląd ten nie przetrwał jednak próby czasu. Decydujące znaczenie w postępie badań w tej dziedzinie miało zastosowanie degradacji łańcuchów kolagenowych bromocyjanem oraz rozwój badań nad sekwencją aminokwasową białek (14).

Na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych wykazano, że kolagen chrząstki składa się z trzech jednakowych podjednostek α różniących się znacznie składem aminokwasowym w porównaniu z podjednostkami α_1 i α_2 kolagenu innych tkanek tego samego gatunku (21—24). Łańcuchy kolagenu chrząstki są bardziej zbliżone pod względem składu chemicznego i właściwości chromatograficznych do podjednostek α_1 niż α_2 , dlatego nazwano je podjednostkami α_1 typu II lub α_1 (II), natomiast podjednostki kolagenowe α_1 , występujące w innych tkankach, nazwano podjednostkami α_1 — typu I, lub w skrócie α_1 (I) (25).

Kolagen o składzie podjednostkowym $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ nazwano kolagenem typu I, natomiast kolagen chrząstki o składzie podjednostkowym $[\alpha_1(II)]_3$ nazwano kolagenem typu II (14, 25).

W roku 1971 Miller i wsp. (26), badając produkty bromocyjanowej degradacji kolagenu nierozpuszczalnego skóry, stwierdzili obecność dwu peptydów, które nie mogły pochodzić z rozpadu podjednostek α typu I ani typu II. Wykazano, że peptydy te pochodzą z rozpadu podjednostek innego typu, nazywanych podjednostkami α_1 typu III. Białko to występuje przede wszystkim w skórze, w ścianie tętnic i w ścianie macicy (25—29). Nazwano je kolagenem typu III. Białku temu przypisuje się skład podjednostkowy $[\alpha_1(III)]_3$ (14).

Badania Kefalidesa i wsp. (30) nad strukturą błon podstawnych doprowadziły do wykrycia kolagenu typu IV. Według pierwotnej koncepcji białko to miało mieć skład podjednostkowy $[\alpha_1(IV)]_3$, jednak późniejsze badania sugerują występowanie tego białka w co najmniej dwu odmianach (31—33).

Z błon płodowych (34, 35), z błony *Descemeta* (36) i innych tkanek (37—40) wyizolowano kolagen typu V. Nie ustalono ostatecznie składu podjednostkowego tego białka. Wiadomo jednak, iż składa się co najmniej z dwu typów podjednostek.

Wykaz typów kolagenu i ich skład podjednostkowy przedstawia tabela 1.

Tabela 1

Skład podjednostkowy różnych typów kolagenu.

Typy kolagenu	Skład podjednostkowy	Główne miejsca występowania	Pozycje piśmiennictwa
Typ I	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ $[\alpha_1(I)]_3$	ściany tętnic, kości, ścięgna, ściana macicy, skóra	14, 15, 67—71
Typ II	$[\alpha_1(II)]_3$	chrząstki	22, 23, 78
Typ III	$[\alpha_1(III)]_3$	ściany tętnic, skóra, ściana macicy	25—29, 127, 184
Typ IV	$[\alpha_1(IV)]_3$ $[\alpha_1(IV)]_3$ i $[\alpha_2(IV)]_3$ C ₂ D	błony podstawne	30, 32, 176, 184 196 198
Typ V	$\alpha_A(\alpha_B)_2$ $(\alpha_A)_3$ i $(\alpha_B)_3$ $\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$	łożysko, rogówka oka, skóra, naczynia krwionośne, kości	34, 201, 221, 224, 225, 238

Poszczególni autorzy stosują różną symbolikę do oznaczania tych samych podjednostek kolagenu typu V: $\alpha_A = A = \alpha_2(V)$, $\alpha_B = B = \alpha_1(V)$, $\alpha_C = C = \alpha_3(V)$

III. Kolagen typu I

Kolagen typu I jest główną i najlepiej poznaną formą kolagenu. Znaczna część kolagenu typu I (kilka-kilkanaście procent) rozpuszcza się w natywnej formie w roztworach soli obojętnych i w rozcieńczonych kwasach (19). Jedną z najbardziej charakterystycznych cech kolagenu typu I jest rozpad tego białka podczas denaturacji termicznej (w 40°) na podjednostki, dające się rozdzielić metodą chromatografii na kolumnie z karboksymetylocelulozą (41). Produkty te są wypłukiwane gradientem chlorku sodowego (0.0—0.1 M) w buforze octanowym w następującej kolejności α_1 , β_{11} (dimer dwu podjednostek α_1), β_{12} (dimer złożony z podjednostek α_1 i α_2) oraz w ostatniej kolejności wypłukują się podjednostki α_2 . Zahamowanie powstawania kowalencyjnych wiązań poprzecznych przez latyrogeny sprawia, iż produkty denaturacji kolagenu latorycznego są prawie całkowicie wolne od dimerów (podjednostek β). W produktach denaturacji stwierdza się jedynie podjednostki α_1 i α_2 , o stosunku ilościowym 2:1.

Z płodowych ścięgien cielęcych wyizolowano dwa odrębne typy m RNA, z których jeden jest matrycą do biosyntezy łańcucha α_1 (I) a drugi do biosyntezy łańcucha α_2 (42).

Łańcuch α_1 (I) kolagenu skóry ludzkiej (43) i kolagenu skóry świnki morskiej (44) zawiera siedem reszt metionylowych, stąd rozpada się pod działaniem bromocyjanu na osiem peptydów dających się łatwo rozdzielić przy pomocy standardowych metod chromatograficznych i sączenia molekularnego (43—45). Łańcuch α_1 (I) zawiera 1052 reszty aminokwasowe. Najpierw ustalono sekwencję pierwszych 418 reszt aminokwasowych poczynając od końca aminowego łańcucha α_1 (I) kolagenu skóry szczura (46—53). Późniejsze badania doprowadziły do poznania sekwencji pozostałych 634 reszt aminokwasowych tego łańcucha (54—58), jednakże zostały one przeprowadzone na kolagenie skóry cielęcej.

Łańcuch α_2 kolagenu skóry ludzkiej zawiera pięć reszt metionylowych. Pod działaniem bromocyjanu rozpada się na sześć peptydów. Różnią się one wyraźnie od produktów rozpadu łańcucha α_1 (I) (43).

Odpowiadające sobie „CNBr-peptydy”, powstałe przez rozkład łańcucha α_1 (I) i α_2 kolagenu ścięgien, kości, zębiny i skóry zwierząt różnych gatunków wykazują niemal identyczny skład aminokwasowy (46, 47, 60—63). Znikome różnice w tym składzie mogą być wynikiem przede wszystkim zmiennych warunków potranslacyjnej modyfikacji tego białka.

Spostrzeżenia te, uzupełnione wynikami badań nad sekwencją aminokwasową, pozwalają sądzić, że łańcuchy α_1 (I) lub α_2 kolagenu skóry, ścięgien, kości i zębiny są identyczne pod względem składu oraz sekwencji aminokwasowej i są produktami tego samego genu strukturalnego (14), niezależnie od tkanki, z której kolagen ten pochodzi.

Zawartość składników cukrowych w łańcuchach α_1 (I) i α_2 nie jest tak

stała (14, 64), jak skład aminokwasowy. Stopień glikozylacji reszt hydroksylizylowych zależy bowiem od zmiennych warunków potranslacyjnej modyfikacji tego białka (6). Z badań Stoltz'a i wsp. (64) wynika, że łańcuch $\alpha_1(I)$ kolagenu skóry szczurzej zawiera dwie jednostki dwusacharydowe (Glc-Gal-Hyl) i jedną jednostkę monosacharydową (Gal-Hyl). Łańcuch α_2 , pochodzący z tego samego źródła (65, 66), zawiera jedną jednostkę monosacharydową i jedną jednostkę dwusacharydową.

Odmianą kolagenu typu I jest kolagen o składzie podjednostkowym $[\alpha_1(I)]_3$ (67—71). Łańcuchy α_1 tego kolagenu są genetycznie identyczne z podjednostkami α_1 kolagenu o składzie $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$.

Kolagen, o takim składzie podjednostkowym, został po raz pierwszy wyizolowany z mysiego nowotworu (*teratocarcinoma*), indukowanego przez wirus onkogenny (72) oraz z nowotworu mysiego, powstałego przez transformację nowotworową ślinianki mysiej wirusem *polyoma* (70). Komórki pochodzące z tego nowotworu, hodowane *in vitro*, zachowują zdolność syntezy kolagenu o składzie $[\alpha_1(I)]_3$ (70, 72).

Początkowo sądzono, że trimer $[\alpha_1(I)]_3$ jest wynikiem błędu w procesie „zwijania” łańcuchów kolagenowych w nienaturalnych warunkach, jakie stwarza tkanka nowotworowa, bądź hodowla tkankowa i przypuszczano, że proces taki nie zachodzi w normalnych tkankach. Jednakże Uitto (67) wykazał, że taka odmiana kolagenu typu I jest stałym składnikiem normalnej skóry ludzkiej. Obecność trimery $[\alpha_1(I)]_3$ wykazano ponadto w ścięgnach i kościach sklepienia czaszki embrionów kurzych (73) oraz w komórkach endotelialnych aorty, hodowanych *in vitro* (42). Obydwie odmiany kolagenu typu I można od siebie oddzielić przez frakcjonowane wysalanie. Identyczność łańcuchów $\alpha_1(I)$, pochodzących z trimerów $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ i $[\alpha_1(I)]_3$, potwierdzono na drodze elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, chromatografii na CM-celulozie, badań produktów degradacji wspomnianych łańcuchów bromocyjanem oraz oznaczeń ich składu aminokwasowego.

Pewne różnice w składzie aminokwasowym dotyczą jedynie ilości hydroksyproliny i hydroksylizyny. Zawartość hydroksylizyny w łańcuchach $\alpha_1(I)$, pochodzących z trimery $[\alpha_1(I)]_3$, jest dwukrotnie wyższa niż w łańcuchach $\alpha_1(I)$ izolowanych z trimery $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$. Jednakże zawartość lizyny jest odpowiednio niższa, tak że suma Lys+Hyl w łańcuchach $\alpha_1(I)$ z obydwu źródeł jest jednakowa. Na uwagę zasługuje wyższa zawartość 3-hydroksyproliny, podczas, gdy względna zawartość 4-hydroksyproliny i pozostałych aminokwasów jest nie zmieniona (67). Podobne wnioski wynikają z badań nad kolagenem $[\alpha_1(I)]_3$ z innych źródeł (72, 73).

Wiadomo, że wydajność procesu hydroksylacji reszt prolinowych i lizylowych jest uzależniona od struktury przestrzennej wewnątrzkomórkowego prekursora tropokolagenu, zwanego protokolagenem. Brak uporządkowanej, trójspiralnej struktury ułatwia proces hydroksylacji, zarówno reszt prolinowych i lizylowych. Powstanie odpowiedniej liczby reszt

hydroksyproliłowych i hydroksylizyłowych umożliwia przyjęcie struktury potrójnej spirali i tym samym hamuje hydroksylację dalszych reszt proliłowych i lizyłowych (74, 75). Wyższa zawartość hydroksylizyny w trimerze $[\alpha_1(I)]_3$ może być wynikiem powolniejszego wykształcania potrójnej spirali w tej odmianie kolagenu niż w trimerze $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ (67). W ten sam sposób można tłumaczyć wyższą zawartość 3-hydroksyproliny (76), natomiast podobną zawartość 4-hydroksyproliny w obydwu odmianach kolagenu typu I jest bliska wartości maksymalnej, spowolnienie tworzenia struktury trójspirальной nie może zatem wpływać na liczbę reszt hydroksyproliłowych tego białka (6, 77).

Fizjologiczna rola kolagenu typu I o składzie podjednostkowym $[\alpha_1(I)]_3$ nie jest jasna. Obecność hydroksylizyny w cząsteczce stabilizuje międzyłańcuchowe wiązania poprzeczne. Być może ta odmiana kolagenu, z uwagi na wyższą zawartość hydroksylizyny, może zwiększać stabilność, rozciągliwość i mechaniczną wytrzymałość włókien kolagenowych (67).

IV. Kolagen typu II

Cząsteczka tropokolagenu typu II składa się z trzech jednakowych podjednostek α_1 typu II (22, 23, 78), różniących się składem aminokwasowym i cukrowym od podjednostek α_1 typu I. Ta postać kolagenu występuje w tkance chrzęstnej (14, 79—81). Kolagen typu II wykazuje szereg podobieństw fizykochemicznych do kolagenu typu I. Obydwa białka wykazują zbliżony ciężar cząsteczkowy, podobną lepkość w roztworach i zbliżone właściwości optyczne (14, 22, 82).

Białko to jest bardzo trudno rozpuszczalne. Zahamowanie powstawania wiązań poprzecznych za pomocą lityrogenu wybitnie zwiększa rozpuszczalność kolagenu chrząstki w roztworach soli obojętnych, jednakże rozpuszczalność kolagenu chrząstki w kwasach pozostaje na niskim poziomie. Zjawisko to tłumaczy się powstawaniem (w kwaśnym środowisku) wielocząsteczkowych, nierozpuszczalnych kompleksów na skutek oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanym kolagenem a kwaśnymi proteoglikanami, będącymi nośnikami ładunku ujemnego (14, 21).

Ekstrakt solny z niektórych chrząstek zawiera zarówno kolagen typu I jak i kolagen typu II. Oddzielenie wymienionych typów tego białka jest dość łatwe. Pierwszy z nich wytrąca się przez wysolenie chlorkiem sodowym przy stężeniu 2,2 M, drugi pozostaje w supernatancie. Dializa supernatantu wobec roztworu o niskiej sile jonowej (np. 0,01 M Na_2HPO_4) powoduje precypitację kolagenu typu II. Ten sam efekt można osiągnąć przez podwyższenie stężenia chlorku sodowego do 4,4 M (83).

Zastosowanie ograniczonej proteolizy homogenatu chrząstki papainą, w temperaturze 4°, (84) lub pepsyną (17, 85, 86) umożliwia ekstrakcję

około 20% kolagenu chrząstki. Stwierdzono, że wspomniane proteazy trawią telopeptydowe fragmenty łańcuchów α_1 (II) zarówno od końca aminowego, jak i karboksylowego, a więc usuwają fragmenty cząsteczki, uczestniczące w tworzeniu międzyłańcuchowych wiązań poprzecznych. Zmniejszenie stopnia spolimeryzowania kolagenu chrząstki sprawia, iż staje się on rozpuszczalny w roztworach soli (14, 85).

Ograniczona proteoliza chrząstki jest bardzo dogodną metodą umożliwiającą szybką i wydajną preparatykę znacznych ilości kolagenu typu II, pozbawionego N-końcowych i C-końcowych fragmentów telopeptydowych, a tym samym wolnego od międzyłańcuchowych kowalencyjnych wiązań poprzecznych. Z nieznanymi powodami ograniczona proteoliza chrząstki zwierząt starych nie zwiększa rozpuszczalności kolagenu tej tkanki (14).

Rozkład kolagenu typu II bromocyjanem prowadzi do powstania 14 peptydów w równych proporcjach molowych, co potwierdza pogląd, iż kolagen ten jest zbudowany z jednakowych podjednostek. Badania nad sekwencją aminokwasową „CNBr peptydów”, powstałych przez rozkład kolagenu typu II, pochodzącego z chrząstki różnych narządów kilku gatunków ssaków (86, 87), wskazuje na wysoki stopień homologii strukturalnej. Rozmieszczenie reszt metionylowych w łańcuchu α_1 (II) jest inne niż w łańcuchu α_1 (I) i α_2 . Jedynie 5 spośród 14 „CNBr peptydów”, pochodzących z rozpadu podjednostek α_1 (II), wykazuje homologię względem analogicznych produktów rozkładu łańcucha α_1 (I). Porównanie sekwencji aminokwasowej środkowego fragmentu łańcuchów α_1 (I) i α_1 (II) (od reszty 404 do 477) wykazało, że ten odcinek łańcucha α_1 (I) kolagenu bydłowego (88) różni się w 16 pozycjach, w porównaniu z analogicznym fragmentem łańcucha α_1 (II) tego samego zwierzęcia (89), podczas gdy odpowiedni fragment łańcucha α_1 (I) kolagenu szczura (pomimo, iż pochodzi z innego gatunku) różni się sekwencją aminokwasową jedynie w 2 pozycjach (90).

Kolagen typu II cechuje się wysoką zawartością hydroksylizyny i hydroksylizylopo pochodnych glikozydów, przy równocześnie zmniejszonej zawartości lizyny (22). Badania nad sekwencją aminokwasową łańcucha α_1 (II) wykazały, że każda reszta lizylova, zajmująca trzecią pozycję w tryplecie aminokwasowym Gly—X—Y, jest hydroksylowana i glikozylowana (89, 91). Według opinii Millera (14), wysoki stopień glikozylacji kolagenu typu II jest spowodowany wysoką zawartością reszt hydroksylizylowych lub szerszym zakresem specyficzności enzymów glikozylujących w chondrocytach niż w komórkach syntetyzujących kolagen typu I.

Kolagen typu II, zarówno w roztworze (92, 93) jak i w postaci włóknistej (94) jest mniej podatny na działanie kolagenazy tkankowej niż kolagen typu I. Według oceny wiskozymetrycznej kolagen chrząstki jest trawiony przez kolagenazę błony maziowej stawów sześć razy wolniej niż kolagen typu I. Zjawisko to wiąże się prawdopodobnie z wyższą za-

wartością składników cukrowych w kolagenie typu II. Mogą one stanowić przeszkodę przestrzenną utrudniającą kontakt enzymu z substratem. Nie jest także wykluczone, że brak łańcucha α_2 w kolagenie chrząstki może mieć również wpływ na przebieg kolagenolizy (92).

Z badań M a l e m u d a i wsp. (95) wynika, że chondrocyty chrząstki stawowej produkują specyficzną formę kolagenazy trawiącej kolagen typu II.

Kolagen typu II wykazuje odmienne właściwości antygenowe w porównaniu z kolagenem typu I (96). Uzyskano swoiste przeciwciała skierowane przeciwko kolagenowi typu II. Przy użyciu techniki immunofluorescencyjnej można dokładnie zlokalizować rozmieszczenie tego typu kolagenu w chrząstce (97).

Na uwagę zasługuje fakt, iż struna grzbietowa dwu i półdnioowego zarodka kurzego zawiera kolagen typu II (98). Ten embrionalny narząd jest prawdopodobnie pierwszym miejscem pojawienia się kolagenu typu II w czasie rozwoju osobniczego. W większości chrząstek występuje kolagen typu II (80, 81, 99—102), jednakże niektóre postacie chrząstki zawierają zarówno kolagen typu II, jak i typu I (14, 22, 99). Stwierdzono, że w hodowlach komórek chrząstki mostkowej i stawowej zarodka kurzego powstaje kolagen typu I: 40% i kolagen typu II: 60% (99). Nie jest wykluczone, że hodowle komórek chrząstki, oprócz chondrocytów, zawierają inne komórki mezenchymalne produkujące kolagen typu I (14). Peryferyjne obszary chrząstki mostkowej kurczęcia zawierają kolagen typu I i II, natomiast głębsze warstwy tej chrząstki posiadają wyłącznie kolagen typu II (14, 22). Chrząstka międzykręgowa człowieka zawiera wyłącznie kolagen typu II (103). Powierzchnowe warstwy chrząstki stawowej ptaków obfitują w kolagen typu I, natomiast w miejscach położonych dalej od powierzchni stopniowo wzrasta zawartość kolagenu typu II (104).

Interesujący polimorfizm kolagenu wykazuje chrząstka międzykręgowa świni. Wykazano, że jej wewnętrzna część, zwana jądrem miążdżystym, zawiera wyłącznie kolagen typu II, natomiast część obwodowa, zwana pierścieniem włóknistym, składa się z niemal równych ilości kolagenu typu I i II (105, 106). Zewnętrzna część pierścienia włóknistego zawiera wyłącznie kolagen typu I (107). Według opinii Millera (14) chrząstka szklista produkuje niemal wyłącznie kolagen typu II, podczas, gdy chrząstka włóknista syntetyzuje obydwa typy kolagenu. Jakkolwiek zasadniczym typem kolagenu produkowanego przez chrząstkę stawową królika jest typ II, to jednak przeniesienie komórek tej chrząstki do hodowli *in vitro* sprawia, iż produkują one kolagen typu I (108).

Komórki chrząstki bydłowej, hodowane *in vitro*, produkują kolagen typu II, natomiast po inkubacji z enzymami lizosomalnymi wątroby szczura, te same komórki podejmują biosyntezę kolagenu typu I (109, 110). Chondrocyty, pochodzące z kręgosłupa zarodka kurzego produkują kola-

gen typu II, natomiast te same komórki, hodowane w obecności bromodeksozydurydyny, produkują dwa typy kolagenu: I i II (100, 111, 112).

Przeszczepialny nowotwór; chrząstniakomięsak (*chondrosarcoma*), pasażowany na szczurach rasy Sprague-Dawley, produkuje kolagen typu II. Obserwacja ta wskazuje, że transformacja nowotworowa chondrocytów nie pozbawia tych komórek zdolności do biosyntezy kolagenu typowego dla tkanki chrzęstnej (113).

Istnieją podstawy ku temu, aby sądzić, że komórka tkanki chrzęstnej, chondrocyt, zawiera materiał genetyczny kodujący kolagen typu I i II, jednakże różne czynniki środowiskowe sprawiają, iż wzajemne relacje ilościowe pomiędzy wymienionymi typami kolagenu, produkowanego przez tę komórkę, są bardzo zróżnicowane.

Charakterystyczną cechą kolagenu typu II jest tworzenie włókien o małej średnicy przekroju (10-20 nm), często bez wyraźnego poprzecznego prążkowania, charakterystycznego dla włókien kolagenowych z innych tkanek (114—116). Przypuszcza się, że obecność dużej ilości składników cukrowych w kolagenie chrząstki jest czynnikiem ograniczającym polimeryzację kolagenu chrząstki (bok do boku) w procesie fibrogenyzy (14). Tego typu struktura nadaje chrząstce odporność na obciążenie, sztywność połączoną z umiarkowaną skłonnością do odkształcenia oraz sprężystość (14).

Kolagen typu II jest dość silnym immunogenem. Śródskórne wstrzyknięcie kolagenu typu II szczurom wywołuje w 40% przypadków odczyn zapalny w obrębie stawów (117).

V. Kolagen typu III

Kolagen typu III nie występuje w tkankach samodzielnie, lecz towarzyszy kolagenowi typu I (102, 118—126). Obydwa typy omawianego białka przechodzą do roztworów podczas ekstrakcji tkanek. Ich rozdzielanie jest dość łatwe. Kolagen typu III wytrąca się z roztworu chlorkiem sodowym przy stężeniu 1,5 M, podczas, gdy kolagen typu I wytrąca się przy stężeniu 2,4—2,6 M (14, 27, 127).

Kolagen typu III jest bardzo trudno rozpuszczalny. Jedynie znikome ilości tego białka można wyekstrahować z tkanek roztworami soli obojętnych (128—130). Ograniczona proteoliza tkanek pepsyną wybitnie zwiększa rozpuszczalność kolagenu typu III (27, 127, 131). Mechanizm wzrostu rozpuszczalności tego typu kolagenu, wskutek działania pepsyny, jest prawdopodobnie podobny, jak w przypadku kolagenu typu II.

Cząsteczka tropokolagenu typu III składa się z trzech podjednostek α_1 typu III, o masie cząsteczkowej 95 000 daltonów, zespolonych mostkami dwusiarczkowymi. Po redukcji mostków -S-S- dwutiotreiolem lub β -merkaptotanołem następuje rozpad wspomnianego białka na poje-

dyncze łańcuchy α_1 (III) (27, 28, 127, 132). Mostki dwusiarczkowe mogą powstawać także pomiędzy łańcuchami α_1 (III) należącymi do różnych, sąsiadujących ze sobą cząsteczek tropokolagenu. Noszą one nazwę dwusiarczkowych wiązań międzycząsteczkowych (14). Jeden łańcuch α_1 (III) posiada 2 reszty cyteilowe. W porównaniu z łańcuchem α_1 (I) i α_1 (II) wykazuje wyższą zawartość glicyny i hydroksyproliny (27).

Rozkład łańcucha α_1 (III) bromocyjanem prowadzi do uwolnienia 9 peptydów różniących się masą cząsteczkową (27, 28, 127, 128) i właściwościami chromatograficznymi (130) od produktów rozpadu łańcuchów α_1 (I) i α_1 (II) (14, 128). Produkty bromocyjanowej degradacji kolagenu typu III, pochodzącego od różnych gatunków, są bardzo podobne (128, 133, 134). Rozmieszczenie reszt metionylowych w łańcuchu α_1 (III) jest inne niż w łańcuchach α_1 (I) i α_1 (II), jednakże wspólną cechą wszystkich trzech łańcuchów α_1 jest obecność metioniny w pozycjach 402 i 551.

K ü h n i wsp. (135—140) ustalili pełną sekwencję aminokwasową łańcucha α_1 (III) kolagenu skóry cielęcej. Stwierdzono, że obok odcinków homologicznych względem łańcucha α_1 (I) występują fragmenty o sekwencji aminokwasowej odmiennej niż w łańcuchu α_1 (I).

Kolagen typu III jest bardzo ubogi w składniki cukrowe. Na jeden łańcuch α_1 (III) kolagenu skóry cielęcej przypada jedynie 0,1 jednostki monosacharydowej (Gal-Hyl) i 0,8 jednostki dwusacharydowej (Glc-Gal-Hyl) (141). Pozwala to sądzić, że nie wszystkie łańcuchy α_1 (III) są glikozylowane.

H o r w i t z i wsp. (142) wykazali, że kolagenaza wyizolowana z granulocytów ludzkich jest piętnastokrotnie mniej aktywna wobec kolagenu typu III niż wobec kolagenu typu I. M i l l e r i wsp. (17) wykazali, że kolagen typu III jest trawiony przez kolagenazę tkankową 5 razy wolniej niż kolagen typu II. Badanie sekwencji aminokwasowej produktów proteolizy wykazało, że fragment cząsteczki tropokolagenu typu III, w sąsiedztwie wiązania podatnego na działanie kolagenazy tkankowej, wykazuje inną kolejność aminokwasów niż kolagen typu I i II (17).

Na uwagę zasługuje fakt, że rolę kolagenazy, trawiącej kolagen typu III, może pełnić elastaza wyizolowana z ludzkich leukocytów obojętno-chłonnych (143). Enzym ten rozrywa wiązanie peptydowe pomiędzy Ile a Thr w miejscu odległym o 4 reszty aminokwasowe od miejsca działania kolagenazy wyizolowanej z błony maziowej stawów (144). Elastaza leukocytarna nie trawi kolagenu typu I i II (145). Podobne, proteolityczne działanie na kolagen typu III wykazuje termolizyna wyizolowana z bakterii (146). Co więcej kolagen typu III jest podatny na proteolityczne działanie trypsyny. Wykazano, że enzym ten rozrywa wiązanie peptydowe pomiędzy resztami argininy i glicyny, w pobliżu miejsca podatnego na działanie kolagenazy. Należy sądzić, że ten fragment cząsteczki tropokolagenu typu III nie jest objęty strukturą potrójnej spirali (147).

Obecność znacznych ilości kolagenu typu III stwierdzono przede wszy-

stkim: w skórze (120, 131, 147, 148), w ścianach naczyń krwionośnych (145, 150—152), w ścianie macicy (27) i w zastawkach wsierdza (123). Wzajemne relacje ilościowe pomiędzy kolagenem typu I i III w skórze różnych kręgowców zmieniają się w trakcie rozwoju osobniczego. We wczesnym okresie płodowym skóra zawiera niemal równe ilości kolagenu typu I i III, jednakże w okresie noworodkowym kolagen typu III stanowi jedynie 20% kolagenu skóry i na podobnym poziomie utrzymuje się w późniejszych okresach życia (100, 101, 128, 153—155). Błizny skórne świnki morskiej zawierają wyłącznie kolagen typu I (156, 157), natomiast ziarnina skóry szczurzej (158) i blizny skóry ludzkiej (159) wykazują obecność kolagenu typu III w ilościach typowych dla skóry płodowej.

Optymalizacja składu podłoża hodowli fibroblastów skóry ludzkiej w równym stopniu zwiększa biosyntezę kolagenu typu I i III (160). Osteoblasty sklepienia czaszki noworodków mysich, hodowane *in vitro*, produkują początkowo wyłącznie kolagen typu I, natomiast po kilku dniach od założenia hodowli, pojawia się kolagen typu III (102). Podobną właściwość wykazują fibroblasty embrionów kurzych (119).

Zawartość kolagenu typu III w ścianach dużych naczyń krwionośnych nie zmienia się w trakcie rozwoju osobniczego i stanowi około połowy ogólnej ilości kolagenu naczyniowego (161, 162). Część ściany naczyniowej bezpośrednio przylegająca do śródbłonna naczyniowego zawiera wyłącznie kolagen typu III (163). Obecność kolagenu typu III wykazano ponadto w marskiej wątrobie (164), w płucach (165), w dziąsłach (166), w zębach (62), tkance okołozębnej (121, 167—169), w mięśniaku gładkomórkowym (170) i w zastawkach sercowych (121, 171).

Kolagen typu III tworzy włókna o mniejszej średnicy niż kolagen typu I (172). Według nomenklatury histologicznej noszą one nazwę włókien retikuliny (164). Nadają one tkankom rozciągliwość i sprężystość (14). Kolagen typu III wykazuje kilkakrotnie większą aktywność w agregowaniu krwinek płytkowych niż kolagen typu I. Przypuszcza się, że kolagen typu III pełni istotną rolę w hamowaniu krwawienia w przypadku uszkodzenia ciągłości ściany naczyniowej (173).

VI. Kolagen typu IV

Kolagen typu IV jest składnikiem błon podstawnych. Według oceny morfologicznej błony podstawne są tworamami jednorodnymi, bezpostaciowymi, bez charakterystycznego dla kolagenu poprzecznego prążkowania (30). Są one produkowane przez komórki wywodzące się z różnych listków zarodkowych. Dość dobrze poznano kolagen syntetyzowany przez: komórki warstwy podstawnej naskórka (30), nabłonek torebki soczewki oka (174—177), nabłonek rogówki (178), korę nerki (179), kłębki nerkowe (180—182), śródbłonki naczyń krwionośnych (183), nabłonek ściany

pęcherzyka żółtkowego (184). Obecność błon podstawnych, zawierających kolagen, wykazano ponadto w przeszczepialnym mięsaku mysim (*EHS-sarcoma*) (32, 185) oraz w włókniaکو-mięsaku (*fibrosarcoma*) występującym u człowieka (186).

Błony podstawne posiadają złożoną strukturę molekularną. Składają się z kolagenu typu IV połączonego wiązaniami wodorowymi i kowalencyjnymi z substancją o charakterze glikoproteidowym (30, 187—189), co sprawia, iż kolagen typu IV jest prawie całkowicie nierozpuszczalny. Przeprowadzenie tego białka w stan rozpuszczalny wymaga przynajmniej redukcji mostków -S-S-, alkilacji grup sulfhydrylowych oraz działania stężonych roztworów (8 M) mocznika (30, 179, 190), jednak w większości przypadków, wyodrębnienie kolagenu z błon podstawnych, wymaga działania pepsyny w roztworze o pH około 2 (179, 189, 191). W tych warunkach glikoproteina ulega strawieniu do produktów drobnocząsteczkowych, natomiast kolagen nie jest trawiony i przechodzi do roztworu. Kwaśne środowisko jest optymalne dla działania pepsyny, a ponadto stwarza właściwe warunki dla utrzymania kolagenu w roztworze. Uwolniony z kompleksu kolagen może być wytrącony chlorkiem sodowym (31, 32, 179, 192, 193).

Kolagen typu IV zawiera niezwykle wiele hydroksyproliny i hydroksylizyny. Łączna zawartość lizyny i hydroksylizyny jest znacznie większa niż w kolagenach wszystkich innych typów, natomiast suma zawartości proliny i hydroksyproliny jest zbliżona do ich zawartości w kolagenach pozostałych typów. Na uwagę zasługuje fakt, iż znaczną część hydroksyproliny stanowi jej izomer: 3-hydroksyprolina (około 11%). W kolagenach innych typów występuje niemal wyłącznie 4-hydroksyprolina. Podobnie, jak w kolagenach innych typów, glicyna stanowi 1/3 reszt aminokwasowych omawianego białka, natomiast zawartość alaniny jest ponad trzykrotnie mniejsza. Wśród składników aminokwasowych kolagenu typu IV występuje cysteina (30).

Kolagen typu IV cechuje się wysoką zawartością składników cukrowych: glukozy i galaktozy. Stanowią one (w zależności od tkanki) od 10,0 do 12,5% masy kolagenu. Obydwie heksozy występują niemal wyłącznie w postaci jednostek dwusacharydowych zespolonych z grupą —OH hydroksylizyny (Glc-Gal-Hyl). Jedynie pojedyncze reszty hydroksylizylowe (około 5%) są związane wyłącznie z galaktozą (30). Wprawdzie w kolagenie typu IV wykryto znikome ilości innych heksoz, jak mannoza (0,2%) i aminoheksoz (0,1%), należy jednak sądzić, że są to zanieczyszczenia pochodzące z glikoproteiny towarzyszącej kolagenowi. Z obliczeń wynika bowiem, że na 1 mol oczyszczonego kolagenu przypadają ułamkowe ilości moli wymienionych składników cukrowych (30).

Skład podjednostkowy kolagenu typu IV nie został w pełni wyjaśniony. Badania K e f a l i d e s a i wsp. (30, 181, 191), a także innych autorów, nad kolagenem błon podstawnych doprowadziły do wyizolowania

białka składającego się z trzech jednakowych podjednostek, zespolonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Nazwano je podjednostkami α_1 typu IV. Powyższe badania sugerują, iż tropokolagen błon podstawnych posiada skład podjednostkowy $[\alpha_1(\text{IV})]_3$ (30, 32, 176, 184, 191, 194). Łańcuch $\alpha_1(\text{IV})$ pochodzący z kolagenu torebki soczewki oka owczego lub bydłęcego, rozpada się pod działaniem bromocyjanu na 12 peptydów o masie cząsteczkowej od 500 do 20 000 daltonów. Peptydy pochodzące od tych dwu gatunków wykazują wysoki stopień homologii (30).

Jednakże późniejsze badania nad strukturą molekularną kolagenu typu IV wskazują na bardziej złożoną budowę tego białka (32, 33) i na obecność co najmniej dwu różnych podjednostek (31, 177, 195—197).

Istotne znaczenie dla postępu badań nad heterogennością kolagenu błon podstawnych miało odkrycie, iż w obrębie trójspiralnej części kolagenu typu IV występuje przynajmniej jedno miejsce podatne na proteolityczne działanie pepsyny (32, 192, 195, 198), podobnie, jak w kolagenie typu III występuje miejsce podatne na działanie trypsyny (147). Według Schuppana i wsp. (104) miejsc takich jest więcej. Struktura przestrzenna kolagenu typu IV nie jest bowiem jednorodna. Trójspiralne odcinki są oddzielone od siebie fragmentami o innej, „niehelikalnej” strukturze przestrzennej, podatnymi na działanie pepsyny i innych nieswoistych proteaz. Działanie tych enzymów powoduje rozpad łańcuchów kolagenu typu IV prowadząc do uwolnienia peptydów o różnej długości, zależnie od warunków proteolizy (104, 192, 196, 198—201).

Do izolowania kolagenu typu IV stosuje się proteolizę błon podstawnych w celu strawienia składnika glikoproteidowego i przeprowadzenia kolagenu w postać rozpuszczalną. W tych warunkach należy się liczyć z możliwością daleko idącej degradacji łańcuchów kolagenowych. Biorąc to pod uwagę należy sądzić, że kolagen o składzie podjednostkowym $[\alpha_1(\text{IV})]_3$ jest tylko jedną z form kolagenu występującego w błonach podstawnych.

Badania produktów degradacji bromocyjanowej oraz sekwencji aminokwasowej różnych peptydów uwalniających się podczas trawienia błon podstawnych ludzkiego łożyska (31, 189, 198, 200), ludzkiej nerki (33, 199), torebki soczewki oka bydłęcego (31, 174) oraz mięsaka mysiego (*ESH-sarcoma*) (196) wykazały, że niektóre z nich, nie mogą pochodzić z opisanego wcześniej łańcucha $\alpha_1(\text{IV})$. Wysłunięto przypuszczenie, iż kolagen typu IV jest białkiem niejednorodnym, zawierającym dwojakiemu rodzaju podjednostki. Zaproponowano im różne nazwy $\alpha(\text{IV})$ i $\alpha'(\text{IV})$ (31), C i D (174, 175, 179, 198, 199) bądź $\alpha_1(\text{IV})$ i $\alpha_2(\text{IV})$ (202, 203). Nie ustalono, wzajemnej relacji wspomnianych podjednostek. Nie wiadomo, czy trójspiralny tropokolagen typu IV, pochodzący z wymienionych źródeł, składa się z jednakowych, czy z różnych podjednostek.

Z badań Timpla i wsp. (196) wynika, że kolagen typu IV, pochodzący z błon podstawnych mięsaka mysiego (*ESH-sarcoma*), składa się

z dwu typów cząsteczek trójspiralnych o składzie podjednostkowym $[\alpha_1(\text{IV})]_3$ i $[\alpha_2(\text{IV})]_3$. Uzyskano odrębne przeciwciała skierowane przeciwko łańcuchom $\alpha_1(\text{IV})$ i $\alpha_2(\text{IV})$ (203). Kresina i Miller (198) wykazali natomiast, że kolagen typu IV z błon podstawnych łożyska ludzkiego ma skład podjednostkowy C_2D , jednak uważają, że podjednostki C i D izolowane z błon podstawnych z zastosowaniem ograniczonej proteolizy są produktami częściowej degradacji naturalnie występujących większych podjednostek C' i D'. Podobny pogląd reprezentuje Dixit (179). Uważa on, że podjednostki C i D kolagenu kory nerki są produktami ograniczonej proteolizy łańcuchów, określanymi przez autora symbolami C-1 i D-1. Powyższe badania wskazują, że kolagen błon podstawnych ma różny skład podjednostkowy w zależności od tkanki, z której pochodzi.

Podjednostki kolagenu typu IV są większe od łańcuchów innych typów kolagenu (32, 194). Ich masę cząsteczkową ocenia się na około 140 000—160 000 daltonów (32, 189, 204, 205), podczas gdy prokolagen typu IV jest produkowany w formie łańcuchów o masie cząsteczkowej 160 000—185 000 daltonów (176, 184, 193, 202, 204, 206—209). Przyjął się pogląd, że produkt biosyntezy kolagenu typu IV („prokolagen IV”), w odróżnieniu od innych typów kolagenu, w większości przypadków nie ulega proteolitycznej konwersji w tropokolagen, lecz jest bezpośrednio wbudowany do struktur kolagenowych błon podstawnych (176, 204, 210, 211). Zjawisko to wykazano między innymi w hodowlach *in vitro* komórek pęcherzyka żółtkowego szczura (184), komórek torebki soczewki oka (176, 212), komórek płynu owodniowego człowieka (213), a także *in vivo* w błonie podstawnej kłębków nerkowych (204).

Kolagen typu IV zawiera fragmenty propeptydowe (192, 193, 214—216) podobne do tych, jakie występują w strukturze włókien kolagenowych ludzi i zwierząt z wrodzonym niedoborem peptydazy prokolagenowej (15). W patologii ludzkiej schorzenie to nosi nazwę zespołu Ehlersa-Danlosa — typu VII, w patologii zwierząt (krów i owiec) choroba ta nosi nazwę dermatosparaktozy (15).

Podczas izolacji kolagenu typu IV z większości tkanek ssaków obok łańcuchów równych lub większych od podjednostek α , znajdowano znaczne ilości produktów, pochodzenia kolagenowego, o masie cząsteczkowej rzędu kilkudziesięciu tysięcy daltonów (31, 174, 175, 198, 199). Jest to prawdopodobnie skutkiem trawienia miejsc podatnych na działanie pepsyny w obrębie trójspiralnej części kolagenu typu IV.

W ludzkich granulocytach obojętnochłonnych wykazano obecność proteazy trawiącej w sposób wybiórczy kolagen typu IV. Enzym ten jest nieaktywny wobec kolagenu typu I, II, III. Trawi kolagen w obrębie trójspiralnej części cząsteczki. Wielkocząsteczkowe produkty proteolizy (m. cz. 70 000, 50 000 i 30 000) są odporne na działanie trypsyny w 20°, co świadczy o zachowaniu przez nie trójspiralnej struktury. Po ogrzaniu roztworu powyżej punktu topnienia produkty te są trawione kompletnie

do produktów drobnocząsteczkowych, zarówno przez trypsynę, jak i przez omawianą proteazę. Enzym ten wykazuje optymalne działanie w pH od 7 do 9. Jest hamowany przez substancje chelatujące i surowicę krwi (217).

Na uwagę zasługuje spostrzeżenie, iż kolagen typu IV nie agreguje krwinek płytkowych, jednakże jego obecność nie hamuje agregacji przez kolagen innych typów (39).

VI-1. Kolagen typu „Col IV”

Interesującego odkrycia dokonali Tim pl i wsp. (218). Z błon podstawnych mięsaka EHS (*EHS-sarcoma*), pasażowanego na myszach latyrycznych (219), wyizolowali odmianę kolagenu typu IV, nazwaną przez nich symbolem „Col IV”, bardzo odbiegającą swoim składem i właściwościami od innych znanych typów kolagenu (218).

Skład aminokwasowy, pod względem jakościowym, wskazuje na kolagenowy charakter tego białka, jednakże zawartość poszczególnych aminokwasów bardzo różni „Col IV” od kolagenu innych typów, w tym także od kolagenów błon podstawnych. Zawartość glicyny jest typowa dla kolagenu, natomiast zawartość hydroksyproliny jest podobna, jak w kolagenach typu I, II lub III, wynosi bowiem 90 reszt Hyp na 1000 reszt aminokwasowych. Obecność 3-hydroksyproliny, tak bardzo typowej dla kolagenu błon podstawnych, jest jedynie śladowa. Zawartość proliny jest bardzo niska, natomiast ilość hydroksylizyny odpowiada górnej granicy zawartości tego aminokwasu w kolagenie typu IV. Na szczególną jednak uwagę zasługuje niezwykle wysoka zawartość cysteiny: 45 reszt Cys na 1000 reszt aminokwasowych. Takiej ilości cysteiny nie obserwowano w żadnym kolagenie innego typu. Obecność tak wysokiej zawartości reszt cysteiny stwarza możliwość powstawania wielkiej liczby mostków dwusiarczkowych. Obecność tych wiązań nadaje kolagenowi typu „Col IV” niezwykle stabilność, nadaje mu oporność na działanie kolagenazy bakteryjnej i pepsyny.

Badania spektropolarymetryczne wykazały, że kolagen typu „Col IV” ma strukturę potrójnej spirali, a struktura ta wykazuje niezwykle trwałość. Temperatura denaturacji cieplnej tego białka wynosi około 70°, podczas gdy temperatura denaturacji kolagenów (194, 220), w tym również kolagenu wyizolowanego wcześniej z tego samego guza (32), waha się w granicach 35-40°. Pierwotna masa cząsteczkowa „Col IV” nie została ustalona. Kolagen ten został bowiem wyizolowany z produktów trawienia błon podstawnych pepsyną i kolagenazą. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że pewien fragment cząsteczki „Col IV” uległ proteolitycznemu odłączeniu. Wyizolowany produkt wykazywał masę cząsteczkową około 200 000 daltonów (218).

Skład podjednostkowy tego białka jest trudny do ustalenia. Wprawdzie w wyniku redukcji i alkilacji kolagen typu „Col IV” rozpada się na 3 główne łańcuchy: B, C, D o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio: 39 000, 28 000 i 14 000 daltonów oraz kilka innych fragmentów, występujących w mniejszych ilościach, to jednak nie daje to wglądu w skład podjednostkowy natywnego białka. Biorąc pod uwagę fakt, iż do izolacji tego białka z błon podstawnych użyto pepsyny i kolagenazy, należy się liczyć z możliwością hydrolizy niektórych wiązań peptydowych. Mostki dwusiarczkowe zespalają produkty proteolizy. Uwolnione w wyniku redukcji i alkilacji polipeptydy nie muszą więc odpowiadać podjednostkom występującym w natywnym kolagenie typu „Col IV” (218).

Oporność omawianego typu kolagenu na działanie kolagenazy bakteryjnej wiąże się niewątpliwie z bardzo trwałą strukturą przestrzenną. Rozerwanie mostków dwusiarczkowych i denaturacja w stężonym roztworze mocznika sprawiają, iż białko to ulega pod działaniem kolagenazy bakteryjnej całkowitej degradacji do krótkich peptydów (218).

VII. Kolagen typu V (Kolagen AB)

Kolagen typu V, (podobnie jak kolagen typu I i III) nie jest związany z określonymi strukturami tkankowymi. Jego obecność wykazano w wielu tkankach i narządach, jak błony płodowe (35), skóra (198, 201), kości (221), mięsz płucny (222), mięsień szkieletowy (223), macica (224), łożysko (34, 198, 225, 226), ściany tętnic (227) oraz w hodowlach *in vitro* komórek mięśni gładkich (122). Kolagen typu V towarzyszy kolagenowi typu I.

Na szczególną uwagę zasługuje kolagen typu V, występujący w dość dużej ilości w zrębie rogówki oka (35, 38, 183, 228, 229). Zasadniczym elementem strukturalnym tej tkanki jest kolagen typu I. Stanowi on około 80% całkowitej zawartości kolagenu w zrębie rogówki (161—163, 230—232), natomiast pozostałe 20% stanowi kolagen typu V. Rogówka jest jednym z nielicznych narządów, gdzie kolagen typu I występuje bez współobecności kolagenu typu III. Jedynie rogówka bydłęca, zamiast kolagenu typu V, zawiera kolagen typu III (37, 233).

Białko to jest całkowicie odporne na ekstrakcję roztworami soli i rozcieńczonych kwasów, co wskazuje na wysoki stopień spolimeryzowania, wynikający z dużej ilości wiązań poprzecznych. Przeprowadzenie kolagenu typu V w stan rozpuszczalny wymaga ograniczonej proteolizy pepsyną (38).

Skład aminokwasowy kolagenu typu V jest dość specyficzny. Niska zawartość alaniny i duża ilość hydroksylizyny upadabniają go do kolagenu błon podstawnych. Z drugiej strony brak cysteiny oraz niewysoka

zawartość hydroksyproliny zbliżają go do kolagenu typu I (tabela 2).

Skład podjednostkowy kolagenu typu V nie został dotąd w pełni wyjaśniony. Z wstępnych badań wynikało, że białko to składa się z dwu rodzajów podjednostek, określanymi symbolami α_A i α_B , bądź krócej A i B. Od nazwy tych podjednostek wywodzi się druga nazwa kolagenu typu V. Niektórzy autorzy nazywają to białko kolagenem AB (201, 234, 235). Z badań Laurain i wsp. (201) wynika, że stosunek ilościowy łańcuchów α_A do α_B wynosi 1:2, stąd przypuszczają, że tropokolagen typu V ma skład podjednostkowy $\alpha_A(\alpha_B)_2$, w skrócie AB_2 . Podobny pogląd reprezentują Hong i wsp. (34), Bentz i wsp. (225) oraz inni (236, 237). Jednakże w niektórych tkankach wzajemne relacje ilościowe łańcuchów α_A i α_B nie dadzą się wyrazić liczbami całkowitymi. Nasuwa to przypuszczenie, że tropokolagen typu V może występować także w składzie podjednostkowym $(\alpha_A)_3$ lub $(\alpha_B)_3$ (221, 238).

Z badań Browna i wsp. (238, 239) wynika, że skóra i błony maziowe stawów bydłęcych zawierają ponadto dodatkowe łańcuchy kolagenowe, oznaczane przez nich symbolem α_C . Wspomniani autorzy uważają, że są to fragmenty kolagenu typu V, o składzie podjednostkowym $(\alpha_C)_3$. Nie wykluczają oni możliwości, iż łańcuchy α_A , α_B i α_C powstają ze wspólnego prekursora.

Podobnego odkrycia dokonali A bedin i wsp. (224). Wyizolowali oni z macicy bydłowej kolagen typu V, o składzie podjednostkowym $\alpha_1(V)$ $\alpha_2(V)$ $\alpha_3(V)$. Odpowiada to symbolice BAC. Wspomniani autorzy uważają, że podjednostka $\alpha_3(V)$ może uczestniczyć w tworzeniu cząsteczek tropokolagenu w połączeniu z podjednostkami $\alpha_1(V)$ lub $\alpha_2(V)$, bądź tworzyć cząsteczki o składzie podjednostkowym $[\alpha_3(V)]_3$.

Little i wsp. (40, 72) wyizolowali kolagen typu V z hodowli komórek mysich linii MB-4 pochodzących z blastocysty oraz linii TSD-4 wywodzących się z przeszczepialnego potworniakoraka (*teratocarcinoma*). Białko to składa się z podjednostek jednakowego rodzaju. Wymienieni autorzy nazywają je łańcuchami $\alpha_1(V)$, a wspomnianemu białku przypisują skład podjednostkowy $[\alpha_1(V)]_3$.

Wprawdzie kolagen typu V towarzyszy kolagenowi typu I, jednak do chwili obecnej nie rozstrzygnięto, czy tworzy on oddzielne włókna, czy też jest wkomponowany we włókna kolagenowe utworzone przez kolagen typu I. Badania immunofluorescencyjne przemawiają raczej za drugą z wymienionych możliwości (38).

Kolagen typu V jest oporny na działanie kolagenazy z błony maziowej stawów (240). Z hodowli makrofagów pęcherzyków płucnych wyizolowano proteinazę trawiaącą wybiórczo kolagen typu V. Enzym ten jest nieaktywny wobec kolagenu typu I. Wspomniane komórki produkują równocześnie kolagenazę trawiaącą kolagen typu I. Obydwa enzymy można rozdzielić drogą chromatografii na DEAE-celulozie. Można przypuszczać, że degradacja kolagenu typu I i V przez makrofagi pęcherzyków płuc-

nych zachodzi niezależnie od siebie (241, 242). Podobny enzym wyizolowano z makrofagów otrzewnowych myszy (243).

Kolagen typu AB, podobnie jak kolagen typu IV, nie agreguje krwinek płytkowych (39).

VIII. Inne typy kolagenu

Opisane w poprzednich rozdziałach typy kolagenu, prawdopodobnie nie wyczerpują zagadnienia heterogenności tego białka. Z badań *Burgesona i Hollistera* (244) wynika, że chrząstka szklista człowieka, oprócz kolagenu typu II, zawiera pięć dodatkowych białek o charakterze kolagenowym. Stanowią one łącznie około 10% kolagenu chrząstki szklistej. Trzy z nich zostały wyizolowane i wstępnie scharakteryzowane. Autorzy (244) proponują oznakowanie podjednostek tych „nowych” typów kolagenu symbolami 1α , 2α , 3α . Różnią się one istotnie składem aminokwasowym od kolagenu innych typów.

Obecność dodatkowych, dotychczas bliżej nie określonych, typów kolagenu wykazano ponadto w chrząstce ptaków (245) oraz w embrionalnej chrząstce jagniąt (246).

Furuto i Miller (190) wyizolowali z łożyska ludzkiego białko kolagenowe, złożone z łańcuchów o masie cząsteczkowej około 40 000 daltonów, bogate w cysteinę, hydroksylizylo pochodne glikozydy i zawierające znaczne ilości glukozaminy. Ten ostatni składnik nie wchodzi w skład kolagenu innych typów.

Swann i Sotman (247) wyizolowali z ciała szklistego oka bydłęcego odmianę kolagenu bardzo przypominającą kolagen typu II. Pod działaniem bromocyjanu białko to rozpada się na peptydy podobne do produktów uwalnianych z kolagenu wyżej wspomnianego typu. Jednakże niższa zawartość alaniny i zdecydowanie wyższa zawartość glukozy i galaktozy skłaniają do przypuszczeń, że kolagen ciała szklistego oka nie jest typowym kolagenem typu II, lecz stanowi jego odmianę.

Kolageny wyizolowane z nabłoniaka *Guerin* (248) i włókniakomięsaka szczurzego, indukowanego przez metylocholanren (249), różnią się znacznie składem aminokwasowym od kolagenu innych typów. Nie jest wykluczone, iż zostaną one określone jako nowe typy kolagenu.

IX. Fizjopatologiczne aspekty polimorfizmu kolagenu

Wyżej opisane fakty upoważniają do stwierdzenia, że kolagen, uważany do niedawna za białko jednorodne, o funkcjach podporowych, jest w istocie dość zróżnicowaną grupą białek. Różnice w składzie podjednostkowym i aminokwasowym poszczególnych typów kolagenu ilustrują tabele: 1 i 2.

Tabela 2

Skład aminokwasowy podjednostek różnych typów kolagenu. Przedstawiono zawartość poszczególnych aminokwasów w przeliczeniu na 1000 reszt aminokwasowych, z zaokrągleniem do liczb całkowitych.

	α_1 (I)	α_2	α_1 (II)	α_1 (III)	α_1 (IV)	C	D	Col. IV	α_A	α_B	α_C
3-Hydroksyprolina	1	0	2	0	11	7	5	2	1	1	1
4-Hydroksyprolina	96	90	103	129	130	119	114	90	110	99	91
Kw. asparaginowy	48	46	42	49	51	45	52	68	50	50	42
Tronina	22	22	26	15	23	16	27	25	26	22	19
Seryna	43	45	26	44	37	32	31	19	34	23	34
Kw. glutaminowy	81	78	87	73	84	83	68	85	88	100	98
Prolina	132	109	115	110	61	56	62	62	105	125	99
Glicyna	337	343	329	336	310	360	337	323	325	325	332
Alanina	107	105	104	88	33	33	42	41	57	41	49
Cysteina	0	0	0	2	8	0	0	45	0	1	1
Walina	21	34	16	12	29	24	23	28	31	21	29
Metionina	8	4	11	8	10	14	12	4	10	7	8
Izoleucyna	7	21	8	14	30	26	32	23	18	20	20
Leucyna	22	37	26	17	54	52	51	51	39	44	56
Tyrozyna	3	4	2	2	6	6	5	13	2	2	2
Fenylalanina	14	13	15	9	27	25	29	12	11	12	9
Hydroksylizyna	5	8	23	6	45	60	46	39	23	46	43
Lizyna	33	27	13	29	10	8	9	14	13	15	15
Histydyna	2	10	2	8	10	6	8	15	10	6	14
Arginina	53	53	50	47	33	24	42	43	52	42	42
Glic-Gal-Hyl	2	1*	5	0,8	34	42	29	brak	9	18	17
Gal-Hyl	1	1*	4	0,1	2	2	1	danych	5	12	6
skóra szczura wg (64), *)wg (66)			chrząstka mo- stkowa kurczę- cia wg (21)	skóra cielęca wg (141)**	klebki nerko- we człowieka wg (181)	kora nerkowa człowieka wg (199)	mięsak mysi — ESH		łożysko ludzkie wg (226)		

***) W cytowanej publikacji autorzy przedstawiają liczbę reszt poszczególnych aminokwasów w jednym łańcuchu α_1 (III), zawierającym 1056 reszt aminokwasowych. Dokonano prze-liczeń na 1000 reszt aminokwasowych.

Obecność w tkankach wyspecjalizowanych enzymów kolagenolitycznych, trawiących w sposób wybiórczy kolagen określonych typów, skłania do przypuszczeń, że metabolizm poszczególnych kolagenów regulowany jest przez odrębne mechanizmy. Zmienność typów kolagenu w zależności od charakteru tkanki pozwala sądzić, iż każdy z opisanych kolagenów pełni w organizmie wyspecjalizowane funkcje. Współistnienie obok siebie pewnych typów kolagenu, np. I i III, bądź I i V nasuwa przypuszczenie, iż w pewnych sytuacjach kolageny dwu różnych typów uzupełniają się nawzajem pod względem funkcjonalnym.

Wykazano, że naruszenie wzajemnych proporcji pomiędzy pewnymi typami kolagenu stanowi molekularne podłoże niektórych chorób tkanki łącznej. Oto przykłady. W letalnej postaci nieprawidłowego kostnienia (*osteogenesis imperfecta*) wykazano niedobór kolagenu typu I w stosunku do kolagenu typu III (250—253). W jednej z postaci zespołu Ehlersa-Danlosa (typ IV) wykazano brak kolagenu typu III (254). Są podstawy do przypuszczeń, iż osobnicza skłonność do powstawania blizn przerostowych wiąże się z nadmierną biosyntezą kolagenu typu III (159).

Być może dalszy postęp badań nad polimorfizmem kolagenu pozwoli na wyjaśnienie patomechanizmu wielu chorób tkanki łącznej.

Zaakceptowano do druku 22.03.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Ardelt W., (1965), *Post. Biochem.*, **11**, 413—426.
2. Skonieczna M., Sopata I., Wize J., Wojtecka-Łukasik E., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 85—104.
3. Ardelt W., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 105—117.
4. Jeleńska M. M., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 137—149.
5. Tomaszewski J., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 115—124.
6. Bańkowski E., Gałasiński W., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 481—502.
7. Mazanowska A., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 3—20.
8. Jeleńska M. M., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 291—307.
9. Sopata I., (1972), *Reumatologia*, **10**, 171—180.
10. Bańkowski E., (1972), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **26**, 207—223.
11. Grant M. E., Prockop D. J., (1972), *New England J. Med.*, **286**, 194—199.
12. Grant M. E., Prockop D. J., (1972), *New England J. Med.*, **286**, 242—249.
13. Gallop P. M., Paz M. A., (1975), *Physiol. Rev.*, **55**, 418—487.
14. Miller E. J., (1976), *Mol. Cell. Biochem.*, **13**, 165—192.
15. Kivirikko K. J., Risteli L., (1976), *Med. Biol.*, **54**, 159—182.
16. Bańkowski E., Gałasiński W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 41—49.
17. Miller E. J., Harris E. D., Chung E., Finch J. E., McCroskey P. A., Butler W. T., (1976), *Biochemistry*, **15**, 787—792.
18. Hodge A. J., Schmitt F. O., (1960), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **46**, 186—197.

19. Piez K. A., (1967), *Treatise on Collagen*, red. Ramachandran G. N., **1**, 207—252, Academic Press, New York.
20. Nold J. G., Kang A. H., Gross J., (1970), *Science*, **170**, 1096—1098.
21. Miller E. J., Matukas V. J., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 1264—1268.
22. Miller E. J., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1652—1659.
23. Trelstad R. L., Kang A. H., Igarashi S., Gross J., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4993—4998.
24. Miller E. J., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3030—3035.
25. Uitto J., Lichtenstein J. R., (1976), *J. Invest. Dermat.*, **66**, 59—79.
26. Miller E. J., Epstein E. H., Jr, Piez K. A., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 1024—1029.
27. Chung E., Miller E. J., (1974), *Science*, **183**, 1200—1201.
28. Chung E., Keele E. M., Miller E. J., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3459—3464.
29. Epstein E. H., Jr., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3225—3231.
30. Kefalides N. A., (1975), *J. Invest. Dermatol.*, **65**, 85—92.
31. Glanville R. W., Rauter A., Fietzek P. P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **95**, 383—389.
32. Timpl R., Martin G. R., Bruckner P., Wick G., Wiedeman H., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 43—52.
33. Daniels J. R., Chu G. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3531—3537.
34. Hong B. S., Davidson P. F., Cannon D. J., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4278—4282.
35. Berguson R. E., ElAdli F. A., Kaitila I. I., Hollister D. W., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2579—2583.
36. Davison P. F., Cannon D. J., (1977), *Exp. Eye Res.*, **25**, 129—137.
37. Schmut O., (1977), *Exp. Eye Res.*, **25**, 505—509.
38. Pöschl A., von der Mark K., (1980), *FEBS Letters*, **115**, 100—104.
39. Trelstad R. L., Carvalho A. C. A., (1979), *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 499—505.
40. Little Ch., Church R. L., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 632—639.
41. Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S., (1963), *Biochemistry*, **2**, 58—66.
42. Tolstoshev P., Haber R., Crystal R. G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 818—826.
43. Epstein E. H., Scott R. D., Miller E. J., Piez K. A., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1718—1724.
44. Clark C. C., Bornstein P., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1468—1474.
45. Miller E. J., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 444—449.
46. Bornstein P., (1967), *Biochemistry*, **6**, 3082—3093.
47. Bornstein P., (1969), *Biochemistry*, **8**, 63—71.
48. Hulmes D. J. S., Miller A., Parry D. A. D., Piez K. A., Woodhead-Galloway J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **79**, 137—148.
49. Kang A. H., Bornstein P., Piez K. A., (1967), *Biochemistry*, **6**, 788—795.
50. Butler W. T., Ponds S. L., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2076—2081.
51. Butler W. T., (1969), *Biochemistry*, **8**, 44—50.
52. Balian G., Click E. M., Bornstein P., (1971), *Biochemistry*, **10**, 4470—4478.
53. Balian G., Click E. M., Hermodson M. A., Bornstein P., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3798—3806.

54. Fietzek P. P., Wendt P., Kell I., Kühn K., (1972), *FEBS Letters*, **26**, 74—76.
55. Fietzek P. P., Rexrodt F. W., Hopper K. E., Kühn K., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 396—400.
56. Wendt P., von der Mark K., Rexrodt F., Kühn K., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 196—183.
57. Fietzek P. P., Rexrodt F. W., Wendt P., Stark M., Kühn K., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 163—168.
58. Rauterberg J., Fietzek P., Rexrodt F., Becker U., Stark M., Kühn K., (1972), *FEBS Letters*, **21**, 75—79.
59. Butler W. T., (1973), *Ala. J. Med. Sci.*, **10**, 103—106.
60. Butler W. T., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1540—1548.
61. Miller E. J., (1973), *Clin. Orthop.*, **92**, 260—280.
62. Volpin D., Veis A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1452—1464.
63. Click E. M., Bornstein P., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4699—4706.
64. Stoltz M., Furthmayr H., Timpl R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 461—468.
65. Clark C. C., Fietzek P. P., Bornstein P., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **56**, 327—333.
66. Aguilar J. H., Jacobs H. G., Butler W. T., Cunningham L. W., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5106—5113.
67. Uitto J., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 371—379.
68. Benya P. D., Padilla S. R., Nimni M. E., (1977), *Biochemistry*, **16**, 865—872.
69. Narayanan A. S., Page R. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5464—5471.
70. Moro L., Smith B. D., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 33—41.
71. Munksgaard E. C., Rhodes M., Mayne R., Butler W. T., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **82**, 609—617.
72. Little C. D., Church R. L., Miller R. A., Ruddle F. K., (1977), *Cell*, **10**, 287—295.
73. Jimenez S. A., Bashey R. I., Benditt M., Yankowski R., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1354—1361.
74. Miller E. J., Matukas V. J., (1974), *Federation Proc.*, **33**, 1197—1204.
75. Martin G. R., Byers P. H., Piez K. A., (1975), *Adv. Enzymol.*, **42**, 167—191.
76. Risteli J., Tryggvason K., Kivirikko K. I., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 485—492.
77. Prockop D. J., Berg R. A., Kivirikko K. I., Uitto J., (1976), *Biochemistry of Collagen*, red. Ramachandran G. N. i Reddi A. H., 163—273, Plenum, New York.
78. Uitto J., Hoffmann H. P., Prockop D. J., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 654—662.
79. Cheah K. S. E., Grant M. E., Jackson D. S., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1025—1031.
80. Miller E. J., van der Korst J. K., Sokoloff L., (1969), *Arthritis and Rheumatism*, **12**, 21—29.
81. Glimcher M. J., Seyer J., Brickley D. M., (1969), *Biochem. J.*, **115**, 923—926.
82. Igarashi S., Trelstad R. L., Kang A. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **295**, 514—519.
83. Trelstad R. L., Kang A. H., Tool B. P., Gross J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6469—6473.

84. Strawich E., Nimni M. E., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3905—3911.
85. Miller E. J., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4903—4909.
86. Eyre D. R., Muir H., (1975), *Connect. Tiss. Res.*, **3**, 165—170.
87. Miller E. J., Lunde L. G., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3153—3159.
88. Fietzek P. P., Wendt P., Kell I., Kühn K., (1972), *FEBS Letters*, **26**, 74—76.
89. Butler W. T., Miller E. J., Finch J. E., Inagami T., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 190—195.
90. Butler W. T., Underwood S. P., Finch J. E., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2946—2953.
91. Butler W. T., Miller E. J., Finch J. E., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3000—3006.
92. Wooley D. E., Lindberg K. A., Glenville R. W., Evanson J. M., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 437—444.
93. Wooley D. E., Glenville R. W., Lindberg K. A., Bailey A. J., (1973), *FEBS Letters*, **34**, 267—269.
94. Harris E. D., McCroskery P. A., (1974), *New England J. Med.*, **290**, 1—6.
95. Malemud C. J., Norby D. P., Sapolsky A. I., Matsuta K., Howell D. S., Moskowicz R. W., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **657**, 517—529.
96. Nowack H., Hahn E., Timpl R., (1975), *Immunol.*, **28**, 561—568.
97. Linsenmayer T. F., Hendrix M. J. C., Gibney E., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 440—446.
98. Linsenmayer T. F., Trelstad R. L., Gross J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 39—45.
99. Seyer J. M., Vinson W. C., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 272—279.
100. Schiltz J. R., Mayne R., Holtzer H., (1973), *Differentiation*, **1**, 97—108.
101. Bradley K., McConnell-Breul S., Crystal R. G., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2828—2832.
102. Scott D. M., Kent G. N., Cohn D. V., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 384—391.
103. Osebold W. R., Pedrini V., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **434**, 390—405.
104. Schuppan D., Timpl R., Glenville R. W., (1980), *FEBS Letters*, **115**, 297—300.
105. Eyre D. R., Muir H., (1974), *FEBS Letters*, **42**, 192—196.
106. Ludowieg J. J., Adams J., Wang A., Parker J., Fudenberg H. H., (1973), *Connect. Tiss. Res.*, **2**, 21—29.
107. Eyre D. R., Muir H., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 267—270.
108. Layman D. L., Sokoloff L., Miller E. J., (1972), *Exptl. Cell. Res.*, **73**, 107—112.
109. Deshmukh K., Nimni N., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 424—431.
110. Deshmukh K., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 726—729.
111. Mayne R., Vail M. S., Miller E. J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4511—4515.
112. Pawlowski P. I., Brierley G. T., Lukens L. N., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7695—7699.

113. Smith B. D., Martin G. R., Miller E. J., Dorfman A., Swarm R., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 181—186.
114. Bonucci E., (1971), *Clin. Orthop.*, **78**, 108—139.
115. Stark M., Miller E. J., Kühn K., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **27**, 192—196.
116. Bruns R. R., Trelstad R. L., Gross J., (1973), *Science*, **181**, 269—271.
117. Trentham D. E., Townes A. S., Kang A. H., (1977), *J. Exp. Med.*, **146**, 857—868.
118. Trelstad R. L., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 717—725.
119. Herrmann H., Dessau W., Fessler L. I., von der Mark K., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **105**, 63—74.
120. Smith B. D., McKenney K. H., Lustberg T. J., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2980—2985.
121. Limeback H. J., Sodek J., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **100**, 541—550.
122. Mayne R., Vail M. S., Miller E. J., (1978), *Biochemistry*, **17**, 446—452.
123. Bashey R. I., Bashey H. M., Jimenez S. A., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 885—894.
124. Steinmann B. U., Redd A. H., (1980), *Biochem. J.*, **186**, 919—924.
125. Sasse J., von der Mark H., Kühl U., Dessau W., von der Mark K., (1981), *Devel. Biol.*, **83**, 79—89.
126. Laurent M., Kern P., Courtois Y., Regnault F., (1981), *Exp. Cell. Res.*, **134**, 23—32.
127. Epstein E. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3225—3231.
128. Byers P. H., McKenney K. H., Lichtenstein J. R., Martin G. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5243—5248.
129. Anesey J., Scott P. G., Veis A., Chyatte D., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 946—952.
130. Lenaers A., Lapiere C. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta.*, **400**, 121—131.
131. Chandrarajan J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 180—186.
132. Schneir M., Miller E. J., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 240—244.
133. Seyer J. M., Kang A. H., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1158—1164.
134. Seyer J. M., Kang A. H., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3404—3411.
135. Fietzek P. P., Allmann H., Rauterberg J., Henkel W., Wachter E., Kühn K., (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 809—820.
136. Dewes H., Fietzek P. P., Kühn K., (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 821—832.
137. Bentz H., Fietzek P. P., Kühn K., (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 833—840.
138. Lang H., Glanville R. W., Fietzek P. P., Kühn K., (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 841—850.
139. Dewes H., Fietzek P. P., Kühn K., (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 851—860.
140. Allmann H., Fietzek P. P., Glanville R. W., Kühn K., (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 861—868.
141. Rauterberg J., Allmann H., Henkel W., Fietzek P. P., (1976), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1401—1407.

142. Horwitz A. L., Hance A. J., Crystal R. G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 897—901.
143. Gadek J. E., Fells G. A., Wright D. G., Crystal R. G., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1815—1822.
144. Mainardi C. L., Hasty D. L., Seyer J. M., Kang A. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 12006—12010.
145. Starkey P. M., Barrett A. J., Burleigh M. C., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 386—397.
146. Wang H. M., Chen J., Pettigrew D. W., Sodek J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **533**, 270—277.
147. Miller E. J., Finch E. J., Chung E., Butler W. T., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 631—637.
148. Blackwell B. A., Bensusan H. B., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 94—101.
149. Bruckner P., Bächinger H. P., Timpl R., Engel J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **90**, 595—603.
150. Burke J. M., Balian G., Ross R., Bornstein P., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3243—3249.
151. Pietilä K., Nikkari T., (1980), *Atherosclerosis*, **37**, 11—19.
152. Mayne R., Vail M. S., Miller E. J., Blose S. H., Chacko S., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 462—469.
153. Fessler L. I., Timpl R., Fessler J. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2531—2537.
154. Shuttleworth C. A., Forrest (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 391—395.
155. Vinson W. C., Seyer J. M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 58—65.
156. Shuttleworth C. A., Forrest L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 454—457.
157. Shuttleworth C. A., Forrest L., Jackson D. S., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 207—216.
158. Bailey A. J., Sims T. J., Lous M. L., Bazin S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1160—1165.
159. Bailey A. J., Bazin S., Sims T. J., Lous M. L., Nicoletis C., Delaunay A., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 412—421.
160. Booth B. A., Polak K. L., Uitto J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **607**, 145—160.
161. Rauterberg J., von Bassewitz D. B., (1975), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 95—100.
162. McCullagh K. A., Balian G., (1975), *Nature*, **258**, 73—75.
163. Gay S., Balleisen L., Remberger K., Fietzek P. P., Adelman B. C., Kühn K., (1975), *Klin. Wschr.*, **53**, 899—902.
164. Gay S., Fietzek P. P., Remberger K., Eder M., Kühn K., (1975), *Klin. Wschr.*, **53**, 205—208.
165. Reiser K. M., Last J. A., (1980), *Anal. Biochem.*, **104**, 87—98.
166. Ballard J. B., Butler W. T., (1974), *J. Oral. Pathol.*, **3**, 176—184.
167. Butler W. T., Biekedal-Hansen H., Beegle W. F., Taylor R. E., Chung E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8907—8912.
168. Sodek J., Limeback H. F., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10496—10502.
169. Gotoh Y., Saito S., Sato A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 253—262.
170. Henkel W., Rauterberg J., Glanville R. W., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **96**, 249—256.

171. Mannschott P., Herbage D., Weiss M., Buffevant C., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **434**, 177—183.
172. Wiedemann H., Chung E., Fujii T., Miller E. J., Kühn K., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 363—368.
173. Balleisen L., Gay S., Marx R., Kühn K., (1975), *Klin. Wschr.*, **53**, 903—905.
174. Gay S., Miller E. J., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 370—378.
175. Dixit S. N., Kang A. H., (1979), *Biochemistry*, **18**, 5686—5692.
176. Heathcote J. G., Sear C. H. J., Grant M. E., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 283—294.
177. Dixit S. N., (1978), *FEBS Letters*, **85**, 153—157.
178. Kefalides N. A., Cameron J. D., Tomicheck E. A., Yanoff M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 730—733.
179. Dixit S. N., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **106**, 563—570.
180. Böck P., (1978), *Histochemistry*, **55**, 269—270.
181. Kefalides N. A., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 226—234.
182. West T. W., Fox W., Jodlowski M., Freytag W., Hudson B. G., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10451—10459.
183. Chung E., Rhodes R. K., Miller E. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1167—1174.
184. Minor R. R., Clark C. C., Strause E. L., Koszalka T. R., Brent R. L., Kefalides N. A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1789—1794.
185. Timpl R., Glanville R. W., Wick G., Martin G. R., (1979), *Immunology*, **38**, 109—116.
186. Alitalo K., Vaheri A., Krieg T., Timpl R., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **109**, 247—255.
187. Hudson B. G., Spiro R. C., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4229—4238.
188. Tanzer M., Kefalides N. A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 775—780.
189. Sage H., Woodbury R. C., Bornstein P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9893—9900.
190. Furuto D. K., Miller E. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 290—295.
191. Dehm P., Kefalides N. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6680—6686.
192. Schwartz D., Veis A., (1978), *FEBS Letters*, **85**, 326—332.
193. Heathcote J. G., Bailey A. J., Grant M. E., (1980), *Biochem. J.*, **190**, 229—237.
194. Gelman R. A., Blackwell J., Kefalides N. A., Tomicheck E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 492—496.
195. Mayne R., Zettergren J. G., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4065—4072.
196. Timpl R., Bruckner P., Fietzek P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **95**, 255—263.
197. Robey P. G., Martin G. R., (1981), *Collagen Rel. Res.*, **1**, 27—38.
198. Kresina T. F., Miller E. J., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3089—3097.
199. Dixit S. N., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 379—384.
200. Bailey A. J., Sims T. J., Duance V. C., Light N. D., (1979), *FEBS Letters*, **99**, 361—366.
201. Laurain G., Delvincourt T., Szymanowicz A. G., (1980), *FEBS Letters*, **120**, 44—48.
202. Crouch E., Sage H., Bornstein P., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 745—749.

203. Risteli J., Schuppan D., Glanville R. W., Timpl R., (1980), *Biochem. J.*, **191**, 517—522.
204. Butkowski R. J., Todd P., Grantham J. J., Hudson B. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10503—10513.
205. Schwartz D., Chin-Quee T., Veis A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 21—27.
206. Killen P. D., Striker G. E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3518—3522.
207. Adamson E. D., Ayers S. E., (1979), *Cell*, **16**, 953—965.
208. Howard B. V., Macarak E. J., Gunson D., Kefalides N. A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2361—2364.
209. Tryggvason K., Gehron Robey P., Martin G. R., (1980), *Biochemistry*, **419**, 1284—1289.
210. Olsen B. R., Alper R., Kefalides N. A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 220—228.
211. Kefalides N. A., (1975), *Dermatologica*, **150**, 4—15.
212. Heathcote G. J., Sear C. H. J., Grant M. E., (1978), *Biology and Chemistry of Basement Membranes*, red. Kefalides N. A., 335—342, Academic Press, New York.
213. Crouch E., Bornstein P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4197—4204.
214. Schwartz D., Veis A., (1979), *Biopolymers*, **18**, 2363—2367.
215. Sato T., Spiro R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4062—4071.
216. Schwartz D., Veis A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 29—37.
217. Uitto V. J., Schwartz D., Veis A., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **105**, 409—417.
218. Timpl R., Risteli J., Bächinger H. P., (1979), *FEBS Letters*, **101**, 265—268.
219. Orkin R. W., Gehron P., McGoodwin E. B., Martin G. R., Valentine T., Swarm R., (1977), *J. Exp. Med.*, **145**, 204—220.
220. Bańkowski E., Mitchell W. M., (1973), *Biophys. Chem.*, **1**, 73—86.
221. Rhodes R. K., Miller E. J., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3442—3448.
222. Madri J. A., Furthmayr H., (1979), *Am. J. Pathol.*, **94**, 323—332.
223. Duance V. C., Restall D. J., Beard H., Bourne F. J., Bailey A. J., (1977), *FEBS Letters*, **79**, 248—252.
224. Abedin M. Z., Ayad S., Weiss J. B., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 1237—1245.
225. Bentz H., Bächinger H. P., Glanville R., Kühn K., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 563—567.
226. Sage H., Bornstein P., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3815—3822.
227. Ooshima A., (1981), *Science*, **213**, 666—667.
228. Conrad G. W., Dessau W., von der Mark K., (1980), *J. Cell. Biol.*, **84**, 501—512.
229. Freeman I. L., (1978), *Invest. Ophthalmol.*, **17**, 171—177.
230. Katzman R. L., Kang A. H., Dixit S. N., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 367—369.
231. Linsenmayer T. F., Smith G. N., Hay E. D., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 39—43.
232. von der Mark K., von der Mark H., Timpl R., Trelstad R. L., (1977), *Devel. Biol.*, **59**, 75—85.
233. Praus R., Brettschneider I., Adam M., (1979), *Exp. Eye. Res.*, **29**, 469—477.

234. Dabbous M. K., Hommouda O., Brinkley P., (1981), *Mol. Cell. Biochem.*, **34**, 87—94.
235. Fessler L. J., Kumamoto C. A., Meis M. E., Fessler J. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9640—9645.
236. Sage H., Pritzl P., Bornstein P., (1981), *Biochemistry*, **20**, 3778—3781.
237. Fessler L. J., Robinson W. J., Fessler J. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9646—9651.
238. Brown R. A., Weiss J. B., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 71—75.
239. Brown R. A., Shuttleworth C. A., Weiss J. B., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 866—872.
240. Chiang T. M., Mainardi C. L., Seyer J. M., Kang A. H., (1980), *J. Lab. Clin. Med.*, **95**, 99—107.
241. Mainardi C. L., Seyer J. M., Kang A. H., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1108—1115.
242. Mainardi C. L., Seyers J. M., Kang A. H., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1108—1115.
243. Sakamoto M., Alfant M., Sakamoto S., (1981), *J. Biochem.*, **90**, 715—720.
244. Burgeson R. E., Hollister D. W., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 1124—1131.
245. Trelstad R. L., Kang A. H., (1974), *Exp. Eye. Res.*, **18**, 395—406.
246. Linsenmayer T. F., (1974), *Devel. Biol.*, **40**, 372—377.
247. Swann D. A., Sotman S. S., (1980), *Biochem. J.*, **185**, 545—554.
248. Bańkowski E., Gałasiński W., Gindzieński A., Rzczycki W., (1975), *Acta Biochim. Polon.*, **22**, 221—227.
249. Bańkowski E., Gindzieński A., Pawlicka E., Rzczycki W., (1975), *Mol. Cell. Biochem.*, **8**, 23—30.
250. Penttinen R. P., Lichtenstein J. R., Martin G. R., McKusick V. A., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 586—589.
251. Fujii K., Kajiwara T., Kurosu H., (1977), *FEBS Letters*, **82**, 251—254.
252. Sykes B., Francis M. I. O., Smith R., (1977), *N. Engl. J. Med.*, **296**, 1200—1203.
253. Steinmann B. U., Martin G. R., Baum B. I., Crystal R. G., (1979), *FEBS Letters*, **101**, 269—272.
254. Pope F. M., Martin G. R., Lichtenstein J. R., Penttinen R., Gerson B., Rowe D. W., McKusick V. A., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1314—1316.

EWA WŁOCH ^{*)}, STANISŁAW WIĘCKOWSKI ^{**)}

Karotenoidy aparatu fotosyntetycznego

The Carotenoids of the Photosynthetic Apparatus

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Ogólna charakterystyka karotenoidów wyizolowanych z chloroplastów i chromatoforów
- III. Lokalizacja karotenoidów
- IV. Karotenoproteiny
- V. Elektrochromizm karotenoidów *in vivo*
- VI. Rola karotenoidów w fotosyntezie

Contents

- I. Introduction
- II. General characteristics of carotenoids isolated from chloroplasts and chromatophores
- III. Localization of carotenoids
- IV. Carotenoproteins
- V. Electrochromism of carotenoids *in vivo*
- VI. Functions of carotenoids in photosynthesis

I. Wstęp

Karotenoidy występują obok chlorofilów w komórkach wszystkich fotoautotrofów. Do tej pory dość dokładnie poznano budowę chemiczną

^{*)} Mgr, ^{**)} Prof. dr hab., Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Al. Mickiewicza 3, 31-120, Kraków.

Używane skróty: PSI—fotoukład I; PS II—fotoukład II; LHC—kompleks chlorofil *a/b*-białko zbierający energię świetlną (ang. *light-harvesting chlorophyll a/b protein complex*); Chl—chlorofil; BChl—bakteriochlorofil (obok skrótu podawane jest położenie (w nm) głównego pasma absorpcji barwnika w zakresie promieniowania długofalowego); P700—forma chlorofilu *a* występująca w centrum reakcji PSI; P680—forma chlorofilu *a* występująca w centrum reakcji PS II; P800, P870—formy bakteriochlorofilu; T—wzbudzony stan trypletowy karotenoidów (Kar) lub barwników chlorofilowych

i najważniejsze właściwości fizyko-chemiczne większości naturalnych karotenoidów^{*)}, natomiast wciąż ograniczona jest nasza wiedza na temat ich występowania w błonach tylakoidów oraz roli w procesie fotosyntezy. Stwierdzono, że *in vivo* karotenoidy wykazują nieco inne właściwości fizyko-chemiczne niż *in vitro*, np. *in vivo* główne pasma absorpcji w zakresie promieniowania widzialnego są przesunięte o kilkanaście nm w kierunku fal dłuższych w stosunku do analogicznych pasm absorpcji barwników w rozpuszczalnikach organicznych (4, 5, 6). Wynika to zapewne ze specyficznego oddziaływania otoczenia na cząsteczki karotenoidów. Informacje na temat charakteru tego oddziaływania usiłuje się uzyskać w badaniach prowadzonych za pomocą różnych technik, m.in. spektrofotometrii absorpcyjnej w zakresie światła widzialnego lub podczerwieni, spektrofotometrii błyskowej (nano- i pikosekundowej), spektrometrii masowej, spektroskopii Ramana, ¹H i ¹³C jądrowego rezonansu paramagnetycznego i mikroskopii fotoelektronowej. Wiele ważnych informacji uzyskano również z pomiarów dyspersji optycznej, dichroizmu liniowego i dichroizmu kołowego. Największe znaczenie w tego typu pracach mają jednak metody spektroskopowe.

W niniejszym artykule starano się dokonać przeglądu najważniejszych wyników badań nad właściwościami, naturą i rolą karotenoidów *in vivo*.

II. Ogólna charakterystyka karotenoidów wyizolowanych z chloroplastów i chromatoforów

Wprowadzenie do badań chromatografii adsorpcyjnej (kolumnowej i cienkowarstwowej), oraz cieczowej wysokociśnieniowej doprowadziło do wydzielenia z materiału roślinnego ponad 400 różnych karotenoidów (1, 7, 8). Niektóre z tych barwników lub produkty ich przemian gromadzą się także w chromoplastach lub kulach tłuszczowych w organach pozbawionych zdolności do fosforylacji (np. owoce, płatki kwiatów). Zwykle kilka różnych karotenoidów występuje w komórkach poszczególnych grup roślin (Tabl. I). Na przykład z chloroplastów roślin wyższych wyizolowano β -karoten (Ryc. 1, I), luteinę (II), wiolaksantynę (III), neoksantynę (IV), zeaksantynę (V) i kilka innych w ilościach śladowych. Z komórek bakterii fotoautotroficznych wydzielono około 80 różnych karotenoidów (9).

Do karotenoidów zalicza się karoteny (węglowodory) i ksantofile zawierające tlen w postaci jednej lub kilku grup hydroksylowych (np. zeaksantyna, rodopina), metoksylowych (np. spirilloksantyna, VI), epoksydo-

^{*)} Pełny przegląd piśmiennictwa na temat chemii karotenoidów został przedstawiony w ostatnich latach w kilku artykułach opublikowanych w pracach zbiorowych pod redakcją Islera (1), Goodwina (2), oraz w monografii Goodwina (3).

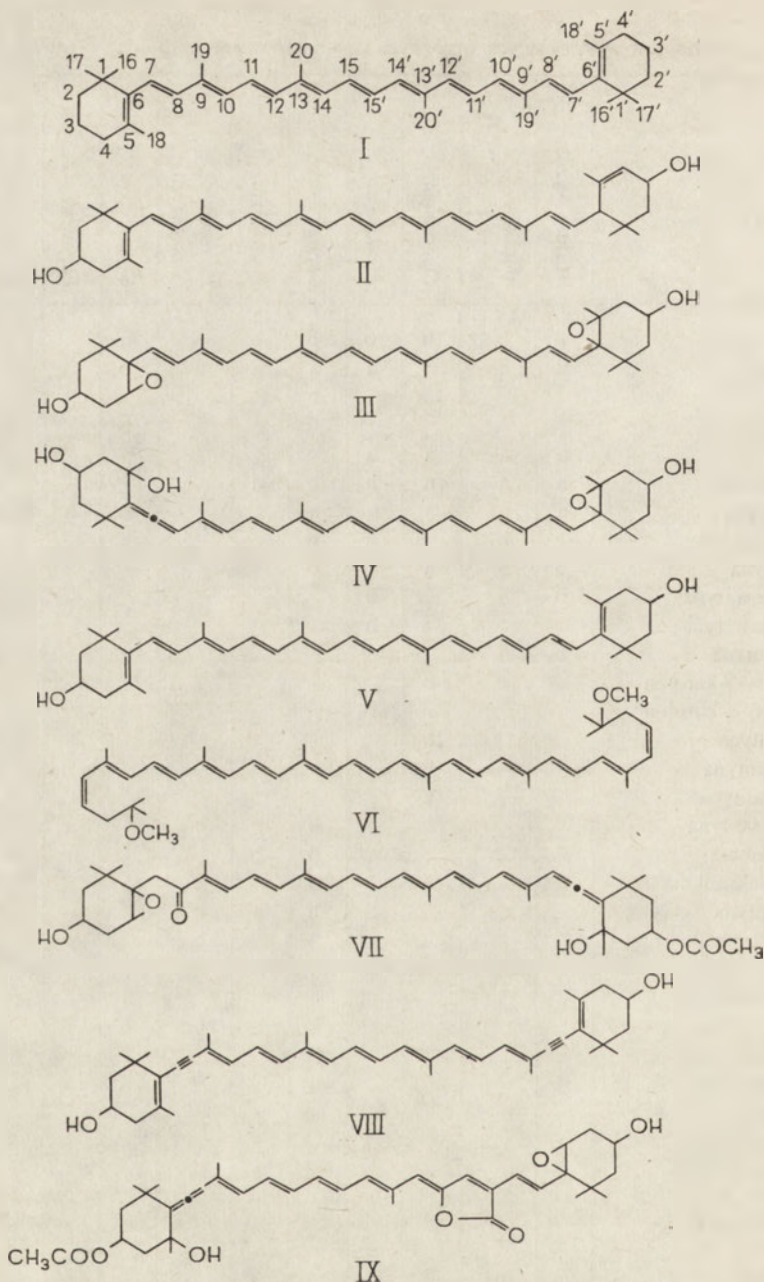
Tabela 1

Przykłady karotenoidów występujących w różnych roślinach (opracowano na podstawie 2, 9, 175).

	Rośliny wyższe	Mszaki i paprotniki	<i>Chlorophyta</i>	<i>Rhodophyta</i>	<i>Chrysoophyta</i>	<i>Phaeophyta</i>	<i>Pyrrophyta (Dinophyceae)</i>	<i>Cryptophyta</i>	<i>Englenophyta</i>	<i>Cyanophyta</i>	Fotoautotrofy bakteryjne
α-karoten	b	b	b	b	b			a			
β-karoten	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
γ-karoten					b					b	b
ε-karoten								b			
Luteina	a	a	a	a							
Wiolaksantyna	a	a	a	b	b	a					
Neoksantyna	a	a	a		a				a		
Anteraksantyna	b	b		b	b						
Zeaksantyna	b	b	a	a	b				a	a	
β-kryptoksantyna	b	b		b							
α-kryptoksantyna				b							
Rodoksantyna	b	b									
2-hydroksy-β-karoten			b								
2-hydroksy-α-karoten			b								
Loroksantyna			b								
Pirenoksantyna			b								
Syfonaksantyna			b								
Diadinoxantyna					b	b	b		a		
Diatoksantyna					b	b					
Waucheriaksantyna					b	b					
Fukoksantyna					b	a	b				
Dinoksantyna					b		b		b		
Perydynina							a				
Alloksantyna								a			
Krokoksantyna								b			
Monadoksantyna								b			
Heteroksantyna					a				a		
Astaksantyna									b		
Echinenon									b		b
Izokryptoksantyna										a	
Mutatochrom										b	
Myksoksantofil										a	
Okenon											b
Rodopinal											b
Lykopenal											b
Sferoidenon											b
Sferoiden											b
Spirilloksantyna											b
Rodopina											b

a — występuje w dużych ilościach lub we wszystkich gatunkach danej grupy

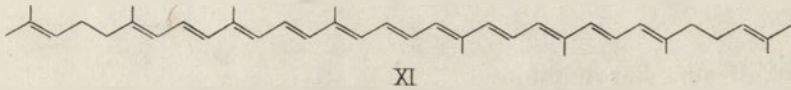
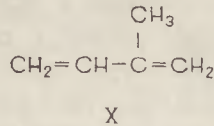
b — występuje w ilościach śladowych lub tylko w niektórych gatunkach danej grupy



Ryc. 1. Struktura chemiczna niektórych karotenoidów.

I — β -karoten (β,β -karoten); II — luteina (β,ϵ -karoten-3,3'-diol); III — wiolaksantyna (5,6,5',6'-diepoksy-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -karoten-3,3'-diol); IV — neoksantyna (5',6'-epoksy-6,7-didehydro-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -karoten-3,5,3'-triol); V — zeaksantyna (β,β -karoten-3,3'-diol); VI — spirylloksantyna (1,1'-dimetoksy-3,4,3',4'-tetrahydro-1,2,1',2'-tetrahydro- ψ,ψ -karoten); VII — fukoksantyna (5,6-epoksy-3,3',5'-trihydrokso-6',7'-didehydro-5,6,7,8,5',6'-heksahydro- β,β -karoten-8-on-3'-octan); VIII — alloksantyna (7,8,7',8'-tetrahydro- β,β -karoten-3,3'-diol); IX — perydynina (5',6'-epoksy-3,5,3'-trihydrokso-6,7-di-dehydro-5,6,5',6'-tetrahydro-10,11,20-trinor- β,β -karoten-19',11'-olid-3-octan).

wych (np. anteraksantyna), karboksylowych (np. torularodina), ketonowych (np. echinenon) lub (i) aldehydowych (np. likopenal). Najczęściej omawiane barwniki mają typową strukturę tetraterpenów (C_{40}), czyli w ich budowie można dopatrzeć się 8 reszt izoprenowych (Ryc. 2, X). Szkielet cząsteczki karotenoidów C_{40} jako całość jest zwykle strukturą symetryczną.



Ryc. 2. Struktura chemiczna izoprenu (X) i likopenu (XI).

Formalnie za prototyp karotenoidów uważa się likopen (3), związek acykliczny zawierający system sprzężonych podwójnych wiązań (XI). W ciągu ewolucji jedna lub obie połowy cząsteczki likopenu mogły ulec określonym zmianom, tzn. uwodorowaniu, odwodorowaniu, cyklizacji, utlenieniu, wewnętrznej przebudowie (w wyniku czego nastąpiło przesunięcie podwójnych wiązań i położenie grup metylowych) i to w rezultacie mogło przyczynić się do powstania występujących dziś w naturze karotenoidów. Przyjmuje się również, że w niektórych przypadkach cząsteczka związku macierzystego uległa wydłużeniu co doprowadziło do powstania karotenoidów C_{45} i C_{50} . Nie oznacza to jednak, że likopen jest metabolitem pośrednim w biosyntezie wszystkich karotenoidów (10).

W błonach tylakoidów roślin wyższych i glonów występują głównie karotenoidy C_{40} ; zawierają one na ogół dwa pierścienie oraz 11 lub mniej podwójnych wiązań w układzie sprzężonym (Ryc. 1). Rzadziej w roślinach należących do tych grup spotyka się karotenoidy acykliczne lub zawierające tylko jeden układ pierścieniowy. W niektórych z nich, poza systemem sprzężonych podwójnych wiązań, występują także wiązania allenowe (np. neoksantyna (IV), fukoksantyna (VII)) lub acetylenowe (np. alloxantyna (VIII), diatoksantyna, diadinoksantyna).

Karotenoidy występujące w komórkach bakteryjnych posiadają na ogół strukturę alifatyczną (9, 11), choć znaleziono również takie, w których jest obecny jeden lub dwa pierścienie aromatyczne (np. okenon (12)), lub jononu (np. β -karoten, echinenon (13, 14)). W karotenoidach chromatoforów bakteryjnych występują podwójne wiązania przy C-3,4 i (lub) C-3',4' i grupy ketonowe przy C-2 i (lub) C-2' oraz przy C-4. Ponadto nie wykryto w nich wiązań allenowych i acetylenowych, a także epoksydów i furanoksydów. Nie spotyka się u bakterii fotoautotroficznych również karotenoidów C_{45} i C_{50} (7, 9).

Na ogół karotenoidy izolowane są ze struktur lamellarnych w postaci wolnej, co oznacza, że *in vivo* nie tworzą one trwałych połączeń chemicznych z innymi związkami. Jedynie w kilku przypadkach udało się wyizolować odpowiednie glikozydy lub estry. Na przykład w sinicach występuje myksoksantofil, który jest 2-0-ramnozydem myksolu (15, 16). Natomiast glony należące do *Derbesidales*, *Cadiales* i kilku innych grup zawierają śladowe ilości syfoneiny, czyli estru wyższych kwasów tłuszczowych i syfonoksantyny (17). Również z niektórych szczepów bakterii *Rhodopseudomonas acidophila* wyizolowano glikozydy pewnych karotenoidów, np. β -glukozylorodopinę (18, 19). Dyskutowane są również połączenia karotenoidów z białkami (patrz str. 339).

III. Lokalizacja karotenoidów

Do tej pory uzyskano wiele danych na temat składu chemicznego błon tylakoidów i zachodzących tam ciągów reakcji. Uzyskano również pewne informacje na temat przestrzennego rozmieszczenia karotenoidów w strukturach lamellarnych chloroplastów. Na przykład stosując techniki immunologiczne wykazano, że część cząsteczek luteiny, wiolaksantyny i neoksantyny kontaktuje się z zewnętrzną powierzchnią błony, gdyż dodanie specyficznych przeciwciał wywołuje aglutynację „nieotwartych” tylakoidów (20, 21, 22). Porównując widma liniowego dichroizmu z widmami absorpcyjnymi w obszarze 450-540 nm niektórzy badacze (23, 24) doszli do wniosku, że cząsteczki omawianych barwników są odpowiednio zorientowane w błonie. Według danych Reich i wsp. (25) kąt nachylenia dłuższej osi cząsteczki w stosunku do płaszczyzny błony wynosi około 16° . Wyniki innych badań wskazują jednak, że nie wszystkie karotenoidy są w jednakowy sposób uporządkowane (26). Należy jeszcze dodać, że przypuszczalnie nie są one rozmieszczone w sposób homogenny, lecz tworzą nietrwałe kompleksy z globulami białkowymi i chlorofilem.

Z licznych badań wynika, że lamelle stromy są wzbogacone w karoteny, natomiast względnie więcej barwników ksantofilowych znajduje się w lamellach gran (27, 28, 29), co zapewne łączy się z nierównomiernym rozmieszczeniem obu fotoukładów: PS II ma dominować w lamellach gran, natomiast PS I występuje zarówno w lamellach gran jak i lamellach stromy.

Traktując wyizolowane błony tylakoidów digitoniną, Tritonem X-100, siarczanem dodecyłu sodu lub innym detergentem, a następnie stosując wirowanie różnicowe lub inne techniki rozdziału (np. elektroforezę w żelu poliakrylamidowym) wyodrębniono kilka typów cząstek subchloroplastowych, przy czym jedne z nich były wzbogacone w centra reakcji, natomiast inne — w barwniki anten energetycznych lub LHC. Wykazano

dalej, że skład karotenoidowy wyodrębnionych cząstek jest różny, np. we frakcji wzbogaconej w LHC dominują ksantofile (31), natomiast β -karotenu jest względnie więcej we frakcjach wzbogaconych w anteny energetyczne PS I lub PS II (32, 33), względnie w centra reakcji PS I (34, 35, 36) lub PS II (37)*. Sugeruje się nawet interakcję pomiędzy β -karotenem a chlorofilem *a* w centrach reakcji PS I roślin wyższych i glonów (38, 39).

W centrach reakcji fotochemicznych bakterii wykryto różne karotenoidy, np. z centrów reakcji *Rhodospseudomonas viridis* wyizolowano dihydrolikopen (40), z *Rhodospseudomonas sphaeroides* szczep 2.4.1 — sferoiden (42), a z *Rhodospseudomonas sphaeroides* szczep *Ga* — chloroksan-tynę (42). Dotychczas nie wykryto karotenoidów w centrach reakcji jedynie w kilku badanych przypadkach m.in. u mutantu *Rhodospseudomonas sphaeroides* R 26 (43, 44).

W skład każdego centrum reakcji fotoautotroficznych bakterii wcho-dzą: jedna cząsteczka karotenoidu, cztery cząsteczki bakteriochlorofilu, dwie cząsteczki bakteriofeofityny, trzy łańcuchy peptydowe, jeden atom żelaza i jedna lub dwie cząsteczki ubichinonu (42, 43, 44). Z niektórych danych doświadczalnych wynika jednak, że przynajmniej pewne foto-autotrofy bakteryjne (np. *Rhodospirillum rubrum*) zawierają więcej niż jeden typ centrów reakcji (45).

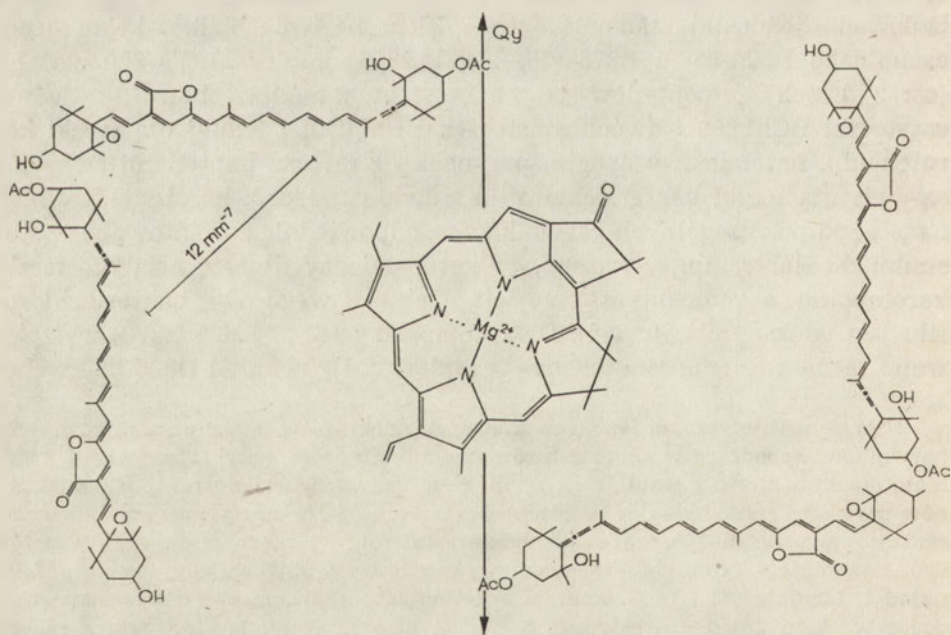
Określono dość dokładnie także skład karotenoidowy anten ener-getycznych bakterii. Na przykład z *Rhodospseudomonas sphaeroides* wyizolowano jednostki stanowiące kompleksy barwnik-białko, które ozna-czono jako B800-850 i B875 (46, 47); każdy kompleks B800-850 złożony jest z dwóch polipeptydów, trzech cząsteczek bakteriochlorofilu (jednej cząsteczki BChl 800 i dwóch cząsteczek BChl 850) i jednej cząsteczki ka-rotenoidu, natomiast w drugim przypadku z dwoma peptydami związane są dwie cząsteczki bakteriochlorofilu i dwie cząsteczki karotenoidów (49). Cząsteczki poszczególnych barwników są odpowiednio zorientowane w sto-sunku do siebie, np. wykazano, że kąt pomiędzy dłuższą osią cząsteczki karotenoidu a momentem przejścia elektronowego Q_y bakteriochloro-filu jest większy niż 70° (50). Dwa kompleksy (B800-850 i B870) wyizolo-wano także z *Rhodospseudomonas capsulata* (51). W skład B800-850 wcho-

*) W fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów uczestniczą m.in. zespoły barwników wchodzące w skład centrów reakcji lub anten energetycznych. W chro-matoforach bakterii fotoautotroficznych z każdym łańcuchem transportu elektro-nów związany jest jeden taki zespół barwników, przy czym na jedno centrum reakcji przypada 40-200 cząsteczek bakteriochlorofilu i nieco mniej karotenoidów (30), natomiast w glonach i roślinach wyższych występują zespoły tworzące foto-układ I, fotoukład II i LHC. Energia świetlna zabsorbowana przez barwniki wcho-dzące w skład anten energetycznych i LHC przekazywana jest na centra reakcji PS I lub PS II. W przypadku glonów i roślin wyższych na jedno centrum reakcji PS I przypada około 400 cząsteczek chlorofilu i kilkakrotnie mniej cząsteczek karotenoidów.

dają trzy peptydy o ciężarach cząsteczkowych 14 000, 10 000 i 8000 (52); karotenoidy mają być związane tylko z polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 8000 (52, 53).

Rozpuszczalny w wodzie kompleks zbierający energię wyizolowano również z glonów należących do *Dinoflagellata* (*Glenodinium* sp., *Gonyaulax polyedra*, *Amphidinium crynocephaleum*). W tym przypadku na jedną cząsteczkę białka (o ciężarze cząsteczkowym 30 000-35 000) przypadają cztery cząsteczki perydyniny (IX) i jedna cząsteczka chlorofilu *a* (54, 55). Na podstawie wyników analizy widma absorpcyjnego, widma dichroizmu kołowego i polaryzacji fluorescencji zaproponowano model ułożenia barwników w kompleksie (56, 57, 58); cząsteczki perydyniny mają występować w postaci dimerów symetrycznie ułożonych w stosunku do cząsteczki chlorofilu (Ryc. 3). Cały taki agregat znajduje się w szczelinie białka globularnego, które jest zarazem odpowiedzialne za utrzymanie kompleksu barwnikowego w stanie fotochemicznie aktywnym, gdyż denaturacja prowadzi do zahamowania przekazywania energii wzbudzenia elektronowego z perydyniny na chlorofil *a* (59).

Wciąż ograniczone są nasze wiadomości na temat sposobu powiązania karotenoidów ze składnikami najbliższego otoczenia zarówno w centrach reakcji jak również w antenach energetycznych i LHC. Z analizy widma CD wynika, że otoczenie karotenoidów w centrach reakcji różni się od otoczenia tych barwników w antenach energetycznych. Do tej pory



Ryc. 3. Topografia barwników fotosyntetycznych w kompleksie perydynina-chlorofil-białko (wg. 58, 59).

nie uzyskano jednak szczegółowszych informacji na ten temat. Widma Ramana wskazują, że w antenach energetycznych karotenoidy występują w konformacji całkowicie *trans*, natomiast w centrach reakcji — jako *mono-* (60) lub *di-cis* (61); formy *cis* są nietrwałe i podczas izolacji ulegają przekształceniu w formę całkowicie *trans* (62). Wprowadzenie karotenoidów do centrów reakcji bezkarotenoidowego mutantu *Rhodospirillum rubrum* (szczep G9) wywoływało efekt hyperchromowy w widmie absorpcyjnym P800 i przesunięcie batochromowe — w widmie P870 (60). Przypuszczalnie wprowadzone karotenoidy oddziałują bezpośrednio z cząsteczkami bakteriochlorofilu lub indukują zmiany konformacyjne w białkach, z którymi powiązane są odpowiednie formy bakteriochlorofilu. Należy dodać, że podczas wprowadzania do centrów reakcji karotenoidy ulegają izomeryzacji do form *cis* (61); formy *cis* zapewne łatwiej są wbudowywane w hydrofobowe szczeliny białka.

IV. Karotenoproteiny

Wielu badaczy uważa, że karotenoidy *in vivo* są niekowalencyjnie powiązane z odpowiednimi białkami hydrofobowymi (34, 63, 64, 65). Takie kompleksy wyizolowano dotychczas tylko z niektórych organizmów zwierzęcych i roślinnych. Na przykład krustacyjaninę, połączenie astaksantyny z białkiem, wyizolowano z homara (66, 67) i żółwia (68). Występująca w jajach żółwia owowerdyna jest połączeniem astaksantyny z lipoproteinami (69). Kompleksy luteiny i kantaksantyny z białkiem występują w pozachloroplastowych globulach w cystach glonu *Protosiphon botryoides* (70). Ponadto karotenoproteiny wyizolowano z plamki ocznej *Euglena gracilis* (71) i z komórek *Scenedesmus obliquus* (72). Do tej pory nie poznano jednak natury wiązań pomiędzy chromoforem a białkiem w wyżej wymienionych przykładach.

Czynione są również próby wyizolowania kompleksów karotenoid-białko z błon tylakoidów. Na przykład Nishimura i Takamatsu (73) uzyskali taki kompleks stosując selektywną ekstrakcję acetonowym roztworem wodorotlenku amonu. Otrzymane w ten sposób frakcje cząstek subchloroplastowych o średnicy 26 nm i ciężarze cząsteczkowym $5,7\text{--}8,3 \times 10^7$ (74) zawierały karoten w ilości około 2% w przeliczeniu na suchą masę (73). Kompleksy te wykazywały charakterystyczne widmo absorpcyjne z głównymi pasmami absorpcji przy 460, 496 i 537 nm, co oznacza, że pasma te były przesunięte o około 50 nm w kierunku fali dłuższych w porównaniu z analogicznymi pasmami absorpcji karotenu w roztworze eteru. Zdaniem Nishimura i Takamatsu (73) tylko około 1% karotenu występuje *in vivo* w postaci takiego kompleksu i dlatego jest on trudno wykrywalny. Istnieją sugestie, iż może to być β -karoten wchodzący w skład centrów reakcji (75).

Podobny kompleks β -karoten-białko wyizolowali również V e r n o n i wsp. (29) z chloroplastów szpinaku traktowanych roztworem Tritonu X-100. Jednakże z późniejszych badań wynika (76), że stosując chromatografię na DEAE celulozie, zamiast wirowania różnicowego, z chloroplastów, traktowanych roztworem Tritonu X-100 można wyizolować frakcje β -karotenu o identycznych własnościach spektralnych do opisanego wcześniej kompleksu β -karoten-białko. W kompleksie takim stosunek barwnika do białka jest mniej więcej 10-krotnie niższy niż wynikałoby to z danych opublikowanych przez V e r n o n a i wsp. (29). Przypuszczalnie mamy tutaj do czynienia nie z kompleksem karoten-białko lecz z określonym rodzajem agregatów β -karotenu. Próby otrzymania takich agregatów *in vitro* jak dotychczas nie powiodły się (76).

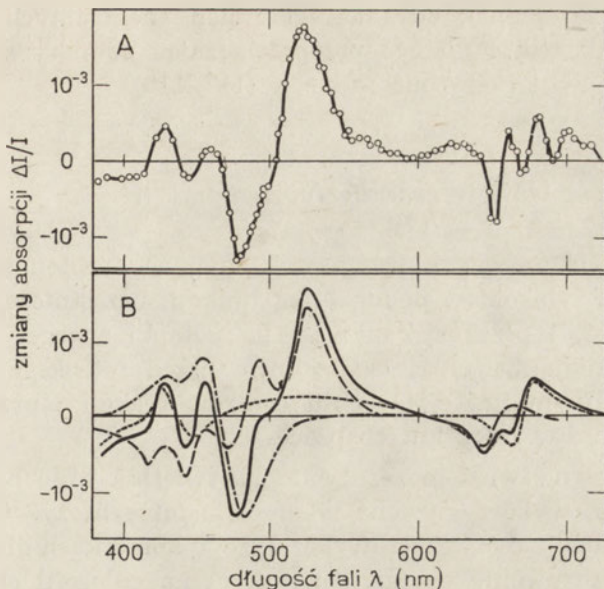
V. Elektrochromizm karotenoidów *in vivo*

Po raz pierwszy D u y s e n s (77) stwierdził, że oświetlenie światłem błyskowym aktywnych fotochemicznie chloroplastów prowadzi do zmian w widmie absorpcyjnym barwników fotosyntetycznych. Wykazano później, że jest to elektrochromizm (78, 79, 80), gdyż wytwarzane pod wpływem światła pole elektryczne w poprzek błony tylakoidu wywołuje zmiany w widmie absorpcyjnym barwników (81, 82, 83, 84, 85). Zjawisko elektrochromizmu dotyczy zarówno karotenoidów jak również barwników chlorofilowych (81, 82, 83, 86, 87, 88), przy czym główne zmiany absorpcji w pasmie 515-520 nm^{*)} (Ryc. 4) są związane przede wszystkim ze zmianami w widmie absorpcyjnym karotenoidów (94, 95, 96), lub kompleksu ksantofil-chlorofil b np. luteina-chlorofil b^{**)} (92, 93). Zjawisko elektrochromizmu obserwuje się nie tylko w przypadku chloroplastów roślin wyższych, ale także w chloroplastach glonów (87) i chromatoforów bakterii (97, 98, 99, 100, 101). Wykazano również, że tylko barwniki należące do określonych pul mogą podlegać temu procesowi (100, 97); w przypadku bakterii mają to być karotenoidy związane z kompleksem B800-850 (101, 102).

Teoretycznie wielkość elektrochromizmu jest proporcjonalna do wielkości momentów dipolowych (dipoli stałych i indukowanych) cząsteczek i do wielkości pola elektrycznego (103, 104, 105). W przypadku barwników fotosyntetycznych *in vivo* wielkość ta zależy także od efektywności rozdziału ładunków elektrycznych w centrach reakcji, efektywności transportu elektronów, natężenia przepływu protonów odpowiedzialnych za fotofosforylację i od natężenia przepływu jonów przez błonę tylakoidu

*) Zmianom absorpcji w paśmie około 515 nm towarzyszy przesunięcie tego pasma o 7-10 nm w kierunku dłuższych fal (89, 90, 91, 92, 93).

***) Barwniki, których widmo ulega zmianie podczas błysków świetlnych w paśmie 515-520 nm oznacza się czasem symbolem P515.



Ryc. 4. A. Indukowane światłem zmiany w widmie absorpcyjnym wyizolowanych chloroplastów, B. Elektrochromizm wyizolowanych barwników fotosyntetycznych: chlorofil a, -.-.- chlorofil b, - - - - karotenoidy, — suma wszystkich barwników (wg. 96).

(106, 107, 108, 85). Dlatego też kinetyka powstawania i zaniku zmian w widmie absorpcyjnym zależy od obecności jonoforów (np. gramicydyna, walinomycyna), inhibitorów transportu elektronów (np. 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik), niektórych jonów (np. K^+ , Cl^-) względnie czynników rozsprzęgających fosforylację np. karbonylocyjanek p-trichlorometaksyfenylhydrazonu (81, 109, 110, 111, 112).

Mechanizm oddziaływania pola elektrycznego na barwniki fotosyntetyczne w błonach tylakoidów nie został jeszcze wyjaśniony. Jedną z hipotez (113) zakłada, że rozdział ładunków w centrach reakcji indukuje zmiany konformacyjne w składnikach lipidowo-białkowych błony, co prowadzi do zmian we wzajemnych orientacjach zjonizowanych grup i przez to kompleks P515 zostaje eksponowany na działanie powstającego pola elektrycznego.

Zmiany absorpcji w paśmie około 515 nm zachodzą zarówno w przypadku oświetlania chloroplastów światłem absorbowanym przez barwniki PS I jak również PS II (112, 113, 114, 115); w temperaturze $-170^\circ C$ zanikają zmiany absorpcji w paśmie około 520 nm indukowane przez światło absorbowane przez PS I (116).

Jeżeli pierwotny akceptor elektronów PS II (Q) znajduje się w formie zredukowanej to zachodzi również wzrost absorpcji w zakresie 515-545 nm na skutek powstawania metastabilnych stanów trypletowych karotenoidów (patrz dalej). Kinetyka powstawania i zaniku stanów tryple-

towych różni się jednak od kinetyki zmian spektralnych związanych z elektrochromizmem i dlatego przeprowadzając pomiary spektroskopowe można te zjawiska odróżnić od siebie (117, 118).

VI. Rola karotenoidów w procesie fotosyntezy

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że karotenoidy występujące w błonach tylakoidów pełnią kilka funkcji: uczestniczą w absorpcji energii świetlnej i przekazywaniu jej na pułapki energetyczne (centra reakcji), ochraniają barwniki chlorofilowe przed fotooksydacją, uczestniczą w normalnym funkcjonowaniu centrów reakcji i przypuszczalnie czynne są jeszcze w kilku innych procesach.

Od dość dawna wiadomo, że energia świetlna absorbowana przez karotenoidy jest wykorzystywana w procesie fotosyntezy. Goedheer (6, 119), jako jeden z pierwszych wykazał, że w komórkach glonów i roślin wyższych przekazywanie energii z karotenu na chlorofil *a* odbywa się z wydajnością prawie 100%, natomiast na ogół ze znacznie mniejszą wydajnością — z barwników ksantofilowych na chlorofil *a*. W komórkach niektórych glonów, np. *Synechococcus cedrorum*, *Porphyridium cruentum*, przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego z barwników ksantofilowych na chlorofile jest tak małe, iż jest ono niewykrywalne za pomocą standardowych metod spektroskopowych.

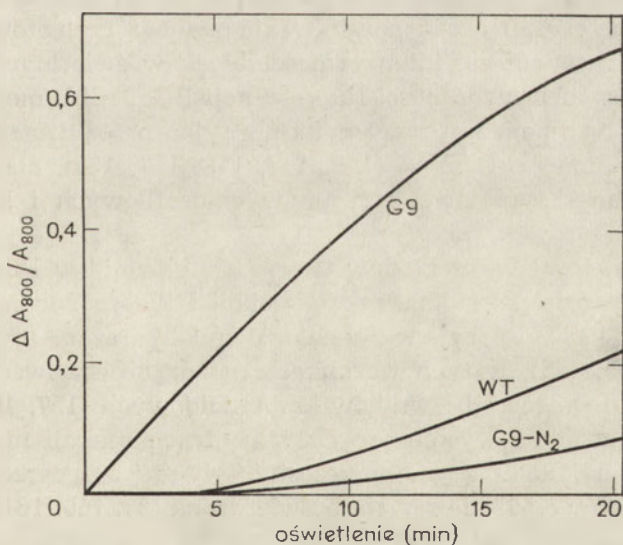
Wydajność przekazywania energii wzbudzenia elektronowego w komórkach fotoautotrofów bakteryjnych zależy od typu karotenoidu i od gatunku (względnie szczepu) bakterii. Na przykład przekazywanie energii ze sferoidyny na bakteriochlorofil u *Rhodospirillum rubrum* odbywa się z wydajnością 90%, natomiast ze spirylloksantyny — tylko z około 20—30% (120, 121). Wydajność ta zależy zapewne od odległości cząsteczek akceptora od donora energii oraz od ich wzajemnej orientacji (122).

Przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego z karotenoidów na chlorofile jest typu *singlet-singlet* (120, 121).

W piśmiennictwie dyskutowanych jest kilka możliwych mechanizmów migracji energii pomiędzy barwnikami fotosyntetycznymi. Jedna z hipotez opiera się na teorii indukowanego rezonansu Förstera (123). Według tej teorii efektywność przekazywania energii uzależniona jest m.in. od współczynnika orientacji cząsteczek akceptora w stosunku do donora, odległości pomiędzy akceptorem a donorem, stopnia nakładania się widma fluorescencyjnego donora z widmem absorpcyjnym akceptora oraz od wydajności kwantowej fluorescencji donora. W błonach tylakoidów występują optymalne warunki do efektywnego przekazywania energii wzbudzenia elektronowego na drodze indukowanego rezonansu pomiędzy cząsteczkami chlorofilu. Natomiast przekazywanie energii z karo-

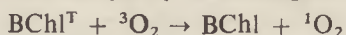
tenoidów na chlorofile odbywa się przypuszczalnie w inny sposób (124, 125), między innymi dlatego, iż karotenoidy nie wykazują zjawiska fluorescencji. Ponadto bardzo krótki czas życia pierwszego wzbudzonego singletu (poniżej pikosekundy) utrudnia migrację energii zgodnie z teorią Förstera (126). Utrudnienie to występuje nawet wówczas, gdy czas życia wzbudzonych singletów nieco wydłuży się na skutek dimeryzacji, jak to ma miejsce w przypadku perydyniny (58). Thrash i wsp. (127) starali się jednak udowodnić, że transport energii wzbudzenia elektronowego z karotenu na chlorofil może odbywać się zgodnie z teorią indukowanego rezonansu z najniższego (zabronionego) wzbudzonego stanu singletowego. Niektórzy badacze uważają, iż migracja energii z karotenoidów na chlorofil wiąże się z transportem ekscytonów (58) lub (i) bezpośrednią wymianą elektronów pomiędzy wzbudzonym stanem donora a cząsteczką akceptora (125). Wysłunięto również pogląd (np. 58), że jeżeli odległość pomiędzy donorem (karotenoid) a akceptorem (chlorofil) jest bardzo mała (około 0,3 nm) to wówczas należy traktować te dwie cząsteczki jako jedną „supercząsteczkę” i wówczas zjawiska fizyczne związane z pochłonięciem kwantu energii świetlnej nie stanowią wypadkowej zjawisk fizycznych zachodzących w każdej z osobna.

Ochronną funkcję karotenoidów wykazano badając wrażliwość na światło widzialne mutantów pozbawionych tych barwników (Ryc. 5); chlorofile form zmutowanych były znacznie bardziej wrażliwe na nieodwra-

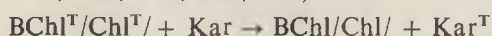


Ryc. 5. Fotoutlenianie (zmiany absorpcji przy 800 nm) bakteriochlorofilu P800 w centrach reakcji dwóch typów *Rhodospirillum rubrum*: WT — typ normalny, G9 — typ bezkarotenoidowy (G9-N₂ — pomiary wykonane na typie bezkarotenoidowym w atmosferze azotu). Preparat zawierający 2,5 μM centrów reakcji, 50 mM węglanu (pH 10,0) i 0,1% Tritonu X-100 oświetlano silnym światłem białym (wg. 133).

calne fotoutlenianie niż chlorofile form normalnych (128, 129, 130, 131, 132, 133). Dokładniejsze badania wykazały, że w nieobecności karotenoidów energia ze wzbudzonego stanu trypletowego cząsteczek bakteriochlorofilu lub chlorofilu ulega przekazaniu na tlen cząsteczkowy w wyniku czego powstaje bardzo aktywny tlen singletowy (134, 135, 136):



W obecności karotenoidów reakcja nie zachodzi, gdyż barwniki te bardzo szybko i efektywnie przejmują energię od BChl^T (lub Chl^T) a także od ${}^1\text{O}_2$ (137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144):



Energia wzbudzonego stanu trypletowego karotenoidu (Kar^T) ulega bezpromienistemu rozproszeniu. Stwierdzono, że połowiczny czas przeniesienia energii z BChl^T na karotenoidy wynosi około 20 ns, tzn. odbywa się około 1×10^8 razy szybciej niż dezaktywacja BChl^T przez ${}^3\text{O}_2$ (143).

Stany trypletowe barwników anten energetycznych i LHC powstają z większą wydajnością wówczas gdy centra reakcji są „zajęte” tzn. pierwotny akceptor elektronów (Q) PS II występuje w formie zredukowanej (118, 143, 145). Wydajność kwantowa powstawania stanów trypletowych wynosi zaledwie 0,02 lub mniej (143), co oznacza, że tylko nieznaczna część cząsteczek w jednostce fotosyntetycznej ulega równocześnie tego typu wzbudzeniu. Być może tylko cząsteczki należące do określonej puli karotenoidów ulegają względnie łatwo wzbudzeniom do stanów trypletowych. Ponadto częstotliwość powstawania stanów trypletowych maleje wraz ze zwiększaniem się intensywności błysków świetlnych (143, 145). Równoczesny spadek wydajności fluorescencji BChl (Chl) może świadczyć o tym, że fluorescencja jest wygaszana nie tylko przez centra reakcji pozostające w stanie utlenionym (143, 147, 148, 149, 150), ale także przez wzbudzone stany trypletowe barwników chlorofilowych i karotenoidów (151, 152, 153).

Stany trypletowe karotenoidów tworzą się głównie w PS II (118, 147, 153, 154), zwłaszcza po zablokowaniu reakcji Hilla za pomocą takich inhibitorów jak karbonylocyjanek p-chlorofenylohydrazon, azydek, hydroksylamina (155, 156); w tych warunkach można obserwować nawet nieodwracalne „blednięcie” barwników karotenoidowych (157, 158, 156).

Rola karotenoidów występujących w centrach reakcji nie została jeszcze wyjaśniona. Sugestia jakoby uczestniczyły one bezpośrednio w transporcie elektronów (159) nie została potwierdzona (37, 160, 161).

W przypadku bakterii pochłonięcie kwantu energii świetlnej wywołuje ostatecznie przemieszczenie ładunku elektrycznego z pierwotnego donora elektronów P (dimer bakteriochlorofilu) na pierwotny akceptor I (bakteriofeofityna), po czym elektron jest przemieszczany na X (kompleks żelazo-ubichinon). Jeżeli X utrzymać w stanie zredukowanym (np. przez oświetlenie silnym światłem, lub wprowadzenie odpowiedniego

egzogennego reduktora) to wówczas nie tylko wydłuża się czas życia P^+I^- , ale również bakteriochlorofil przechodzi, przynajmniej częściowo, w wzbudzony stan trypletowy (143). W obecności karotenoidów $BChl^T$ jest niewykrywalny, natomiast pojawiają się wzbudzenia karotenoidów do stanów trypletowych (162). Porównanie kinetyki redukcji P^+ do P i utleniania I^- do I z kinetyką powstawania Kar^T również wskazuje na możliwość przenoszenia energii z $BChl^T$ na Kar w centrach reakcji (163). Z tego wynikałoby, że karotenoidy znajdujące się w centrach reakcji pełnią również funkcje ochronne, tzn. przejmując energię z $BChl^T$ uniemożliwiają powstawanie 1O_2 . Wykrycie korelacji pomiędzy wbudowywaniem różnych karotenoidów do centrów reakcji bezkarotenoidowego mutantu *Rhodospirillum rubrum* a efektywnością transportu energii i efektywnością fotoprotekcji (Tabl. II) może również stanowić dowód na poparcie tego stwierdzenia.

Tabela 2

Niektóre właściwości karotenoidów wprowadzonych do centrów reakcji z *Rhodospirillum rubrum* (wg 133)

Karotenoid	Stosunek karotenoid/P800	Efektywność przenoszenia energii	Efektywność fotoprotekcji
β -karoten	0	—	—
Luteina	0	—	—
Spirylloksantyna	1,2	0,20	1,0
Sferoiden	1,2	0,90	1,0
Sferoidenon	1,0	0,35	0,2
Chloroksantyna	0,4—1,5	0,30	0,4

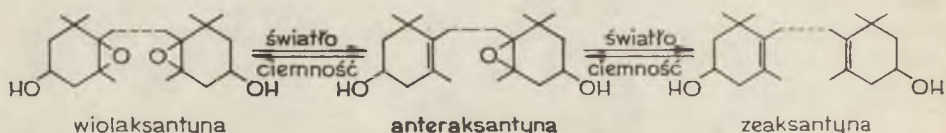
Prowadząc badania chloroplastów roślin wyższych i glonów stwierdzono, że w centrach reakcji zachodzi nie tylko przekazywanie energii z Chl^T na Kar , ale odbywa się również transport energii wzbudzenia elektronowego typu singlet-singlet z β -karotenu na chlorofil *a* (38). Nie obserwuje się przejścia wzbudzonych stanów singletowych cząsteczek karotenu we wzbudzone stany trypletowe (146). Z tego wynika, że cząsteczki karotenu nie tylko chronią P700 i P680 przed fotooksydacją lecz również pełnią rolę barwników anten energetycznych. Trzeba jeszcze dodać, że stany trypletowe (wzbudzone) chlorofilu są łatwiej wykrywalne w centrach reakcji PS II niż PS I (118, 164).

Wyniki badań Searle'a i Wesselsa (161) wskazują, że usunięcie β -karotenu z centrów reakcji PS I za pomocą rozpuszczalników niepolarnych prowadzi do obniżenia natężenia fotoredukcji $NADP^+$. Może to wskazywać, iż β -karoten jest również niezbędny do utrzymania PS I w stanie wysokiej aktywności fotochemicznej.

Rezonansowe przekazywanie energii w centrach reakcji z barwników chlorofilowych na karotenoidy wymaga aby cząsteczki donora i akcep-

tora były odpowiednio do siebie ułożone; najefektywniej proces ten odbywa się wówczas, gdy dłuższa oś cząsteczki karotenu (w przypadku roślin wyższych i glonów) będzie przebiegała wzdłuż Q_y P700. Z analizy widma wzbudzenia dichroizmu liniowego i polaryzacji fluorescencji w subchloroplastowych cząstkach wynika, że warunek ten jest spełniony *in vivo* (36).

Rola karotenoidów występujących w błonach tylakoidów nie ogranicza się zapewne do uczestniczenia w procesach pochłaniania kwantów energii świetlnej i przekazywania ich na pułapki energetyczne, oraz do ochrony barwników chlorofilowych przed fotoutlenianiem. Przepuszczalnie uczestniczą one jeszcze w innych, mniej dokładnie zbadanych procesach. Na przykład Mengel i wsp. (165) zasugerowali, że β -karoten bierze udział w przenoszeniu elektronów w poprzek błony tylakoidu. Badacze ci obserwowali bowiem stymulowany światłem transport elektronów w sztucznej podwójnej błonie lipidowej, do której wbudowano również cząsteczki chlorofilu i β -karotenu. Innym przykładem może być t.zw. cykl wiolaksantynowy (166, 167, 168). W cyklu tym wiolaksantyna ulega odwracalnej deepoksydacji do zeaksantyny poprzez anteraksantynę (Ryc. 6); w normalnych warunkach deepoksydacja zachodzi w świetle, natomiast epoksydacja może odbywać się również w ciemności (169, 170). Wykazano również, że deepoksydacja przebiega po wewnętrznej stronie błony tylakoidu (171) i jest katalizowana przez specyficzną deepoksydazę



Ryc. 6. Reakcje cyklu wiolaksantynowego.

(172, 173). Ciężar cząsteczkowy tego enzymu wynosi około 60 000 (172) a w jego skład wchodzi także monogalaktozyldigliceryd (173). Zwiększenie kwasowości wewnątrz tylakoidu powoduje podwyższenie aktywności enzymu; optymalne pH wynosi około 5 (174). Proces epoksydacji zeaksantyny zachodzi po zewnętrznej stronie błony tylakoidu (171) przy udziale O_2 i przypuszczalnie odpowiedniej epoksydazy. Rola cyklu wiolaksantynowego w procesie fotosyntezy nie została do tej pory wyjaśniona. Według niektórych badaczy (171) dzięki procesom epoksydacji i deepoksydacji odpowiednich karotenoidów ulegają zmianie właściwości powierzchni błon tylakoidów, co może mieć znaczenie w procesie regulacji transportu elektronów i protonów.

Przedstawione wyżej informacje na temat roli karotenoidów w procesie fotosyntezy uzyskano głównie dzięki badaniom spektroskopowym wykonanym na wyizolowanych chloroplastach (chromatoforach), tylakoidach lub odpowiednich fragmentach błon tylakoidów. Należy jednak pamiętać,

iz podobne badania prowadzone są również na układach modelowych, tzn. odpowiednio zbudowanych liposomach, micelach lub sztucznych błonach lipidowych. Uzyskane w ten sposób informacje nie zawsze odnoszą się jednak do barwników w jednostkach fotosyntetycznych. Z tego też powodu wyniki badań modelowych nie zostały uwzględnione w niniejszym artykule.

Zaakceptowano do druku 22.03.1982

PISMIENICTWO

1. Isler O., red., (1971), *Carotenoids*, str. 932, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.
2. Goodwin T. W., red., (1976), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 1, str. 870, Academic Press, London, New York, San Francisco.
3. Goodwin T. W., (1980), *The Biochemistry of the Carotenoids*, 1, str. 377, Chapman and Hall, London and New York.
4. Deroche M. E., Briantais J. M., (1974), *Photochem. Photobiol.*, **49**, 233—240.
5. Ji T. H., Hess J. L., Benson A. A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 676—685.
6. Goedheer J. C., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 252—264.
7. Weedon B. C. L., (1971), w *Carotenoids*, red. Isler O., str. 29—59, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.
8. Weedon B. C. L., (1979), *Pure and Appl. Chem.*, **51**, 435—445.
9. Liaaen-Jensen S., (1978), w *The Photosynthetic Bacteria*, red. Clayton W. R. K. and Sistrom W. R., str. 233—247, Plenum Press, New York and London.
10. Britton G., (1976), w *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* red. Goodwin T. W., 1, str. 262—327, Academic Press, London, New York, San Francisco.
11. Eimhjellen K. E., Liaaen-Jensen S., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 21—40.
12. Schmidt K., Pfennig N., Liaaen-Jensen S., (1965), *Arch. Mikrobiol.*, **52**, 182—189.
13. Volk W., Pennington D., (1950), *J. Bact.*, **59**, 169—178.
14. Britton G., Singh R. K., Goodwin T. W., Ben-Aziz A., (1975). *Phytochem.*, **14**, 2427—2438.
15. Hertzberg S., Liaaen-Jensen S., (1969), *Phytochem.*, **8**, 1259—1280.
16. Halfen L. H., Francis G. W., (1972), *Arch. Mikrobiol.*, **81**, 25—37.
17. Kleining H., (1969), *J. Phycol.*, **5**, 281—284.
18. Pfennig N., Eimhjellen K. E., Liaaen-Jensen S., (1965), *Arch. Mikrobiol.*, **51**, 258—266.
19. Schmidt K., (1971), *Arch. Mikrobiol.*, **77**, 231—239.
20. Lehmann-Kirk U., Schmid G. H., Radunz A., (1979), *Z. Naturforsch.*, **34c**, 427—430.
21. Radunz A., Schmid G. H., (1975), *Z. Naturforsch.*, **30c**, 622—627.
22. Radunz A., (1978), *Z. Naturforsch.*, **33c**, 941—947.
23. Breton J., Roux E., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 557—563

24. Breton J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **59**, 1011—1017.
25. Reich R., Scheerer R., Sewe K. U., Witt H. T., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 285—294.
26. Faludi-Daniel Á., Breton J., (1975), *Photochem. Photobiol.*, **22**, 125—127.
27. Park R. B., Nolan W. G., (1974), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **227**, 580—586.
28. Bailey J. L., Krentz W., (1969) w *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner H., **1**, str. 149—158, Tübingen.
29. Vernon L. P., Ke B., Mollenhauer H. H., Shaw E. R., (1969), w *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner H., **1**, str. 137—148, Tübingen.
30. Aagaard J., Siström W. R., (1972), *Photochem. Photobiol.*, **15**, 209—225.
31. Ogawa T., Obata F., Shibata K., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 223—234.
32. Wessels J. S. C., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 497—500.
33. Shiozawa J. A., Alberte R. S., Thornber J. P., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 385—397.
34. Thornber J. P., Trospen T. L., Strouse C. E., (1977), w *The Photosynthetic Bacteria*, red. Clayton R. K., Siström W. R., str. 133—155, Plenum Press, New York.
35. Bengis C., Nelson N., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2783—2788.
36. Junge W., Schaffernicht H., Nelson N., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 73—85.
37. Cox R. P., Bendall D. S., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **347**, 49—59.
38. Öquist G., Samuelsson G., Bishop N. J., (1980), *Physiol. Plant.*, **50**, 63—70.
39. Öquist G., Samuelsson G., (1980), *Physiol. Plant.*, **50**, 57—62.
40. Thornber J. P., (1971), w *Methods in Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., **23A**, str. 688—691, Academic Press, New York, London.
41. Van der Rest M., Gingras G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6446—6453.
42. Cogdell R. J., Parson W. W., Kerr M. A., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 83—93.
43. Straley S. C., Parson W. W., Mauzerall D. C., Clayton R. K., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 597—609.
44. Okamura M. Y., Steiner L. A., Feher G., (1976), *Biochemistry*, **13**, 1394—1403.
45. Van Grondelle R., Duysens L. M., Van der Wal H. N., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 169—187.
46. Siström W. R., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 419—421.
47. Siström W. R., (1978), w *The Photosynthetic Bacteria*, red. Clayton R. K., Siström W. R., str. 841—848, Plenum Press, New York and London.
48. Cogdell R. J., Crofts A. R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **502**, 409—416.
49. Broglie R. M., Hunter C. N., Delepelaire R., Niederman R. A., Chua N-H, Clayton R. K., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 87—91.
50. Vermeglio A., Breton J., Paillet G., Cogdell R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 514—530.
51. Lien S., Gest H., San Pietro A., (1973), *J. Bioenerget.*, **4**, 423—434.
52. Feick R., Drews G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 499—513.
53. Webster G. D., Cogdell R. J., Lindsay J. G., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **591**, 521—330.

54. Prezelin B. B., Haxo F. T., (1976), *Planta (Berl.)*, **128**, 133—141.
55. Siegelman H. W., Kycia J. H., Haxo F. T., (1977), *Brookhaven Symp. Biol.*, **28**, 162—169.
56. Song P. S., Koka P., Prezelin B. B., Haxo F. T., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4422—4427.
57. Song P. S., (1978), *Trends in Biochem. Sci.*, **2**, 25—27.
58. Song P. S., Jung J., (1980), *J. Korean Agricultural. Chemical. Society*, **23**, 73—83.
59. Koka P., Song P. S., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **495**, 220—231.
60. Boucher F., Vander Rest M., Gingras G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **461**, 339—357.
61. Agalidis J., Lutz M., Reiss-Husson F., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **588**, 264—274.
62. Lutz M., Agalidis I., Herro G., Gogdell R. J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **503**, 287—303.
63. Sauer K., (1974) w *Bioenergetics of Photosynthesis*, red. Govindjee, str. 115—181, Academic Press, New York.
64. Clayton R. K., Clayton B. J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **283**, 492—504.
65. Schwenker U., St-Onge M., Gingras G., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **351**, 246—260.
66. Cheesman D. F., Zagalsky P. F., Ceccaldi H. J., (1966), *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, **164**, 130—142.
67. Salares R., Young N. M., Bernstein W. J., Carey P. R., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4751—4756.
68. Zagalsky P. F., Ceccaldi H. J., Daumas R., (1970), *Comp. Biochem. Biophys.*, **34**, 579—589.
69. Ceccaldi H. J., Cheesman D. F., Zagalsky P. F., (1966), *C. R. Soc. Biol.*, **160**, 587—597.
70. Berkaloff C., (1977), *Plant Sci. Lett.*, **10**, 45—48.
71. Heelis D. V., Heelis P. F., Kernick W. A., Phillips G. O., (1980), *Cytobios.*, **29**, 135—143.
72. Powles R., Briton G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **453**, 270—276.
73. Nishimura M., Takamatsu K., (1957), *Nature*, **180**, 699—701.
74. Nishimura M., Takamatsu K., (1960), *Plant Cell Physiol.*, **1**, 305—309.
75. Okayama S., Butler W. L., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 769—774.
76. Więckowski S., Droba M., (1978), *Plant Sci. Lett.*, **13**, 397—404.
77. Duysens L. N. M., (1954), *Science*, **120**, 353—354.
78. Labhard H., (1961), *Helv. Chim. Acta*, **44**, 447—456.
79. Liptay W., (1969), *Angew. Chem.*, **81**, 195—231.
80. Malley M., Feher G., Mauzerall D. J., (1968), *J. Molec. Spectrosc.*, **25**, 544—547.
81. Junge W., Witt H. T., (1968), *Z. Naturforsch.*, **23b**, 244—254.
82. Witt H. T., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 355—427.
83. Larkum A. W. D., Bonner W. D., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **256**, 396—408.
84. Strichartz S., Chance B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **256**, 71—84.
85. Schapendonk A. H. C. M., Vredenberg W. J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 613—621.
86. Rumberg B., (1964), *Nature*, **204**, 860—862.
87. Amesz J., Visser J. W. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 62—69.
88. Fork D. C., Brown J. S., (1975), *Carnegie Inst. Year Book*, **74**, 776—779.

89. Okada M., Murata N., Takamiya A., (1970), *Plant Cell Physiol.*, **11**, 519—530.
90. Crofts A. R., Prince R. C., Holmes N. G., Crowther D., (1974), w *Proc. 3rd Int. Congr. Photosynth.*, red. Avron M., str. 1131—1144, Elsevier, Amsterdam.
91. Holmes N. G., Crofts A. R., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **459**, 492—505.
92. Sewe K.-U., Reich R., (1977), *Z. Naturforsch.*, **32c**, 161—171.
93. Sewe K.-U., Reich R., (1977), *FEBS Letters*, **80**, 30—34.
94. Chance B., Strehler B., (1957), *Plant Physiol.*, **32**, 536—538.
95. Schmidt S., Reich R., Witt H. T., (1971), *Naturwissen.*, **58**, 414.
96. Reich R., Scheerer R., Sewe K.-U., Witt H. T., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 285—294.
97. De Grooth B. G., Amesz J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 247—258.
98. Murata N., Fork D., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **461**, 365—378.
99. Heathcote P., Vermeglio A., Clayton R. K., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **461**, 358—364.
100. Holmes N. G., Crofts A. R., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **461**, 141—150.
101. Holmes N. G., Hunter C. N., Niederman R. A., Crofts A. R., (1980), *FEBS Letters*, **115**, 43—48.
102. Matsuura K., Ishihawa T., Nishimura M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 339—344.
103. Reinwald E., Stiehl H. H., Rumberg S., (1969), *Z. Naturforsch.*, **23b**, 1616—1617.
104. Amesz J., De Grooth B. G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 301—313.
105. Amesz J., Duysens L. N. M., (1977), w *Primary Processes of Photosynthesis*, red. Barber W. J., str. 149—185, Elsevier/North-Holland Biomedical Press., Amsterdam.
106. Neumann J., Jagendorf A. T., (1964), *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 109—119.
107. Ikehara N., Nishimura M., (1973), *Plant and Cell Physiol.*, **14**, 77—90.
108. Wraight C. A., Cogdell R. J., Chance B., (1978), w *The Photosynthetic Bacteria*, red. Clayton R. K., Sistron W. R., str. 471—511, Plenum Press, New York and London.
109. Jackson J. B., Crofts A. R., (1969), *FEBS Letters*, **4**, 185—189.
110. Nishimura M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **197**, 69—77.
111. Witt H. T., (1971), *Quart. Rev. Biophys.*, **4**, 365—477.
112. Hope A. B., Morland A., (1980), *Aust. J. Plant. Physiol.*, **7**, 699—711.
113. Schapendonk A. H. C. M., Vredenberg W. J., Tonk W. J., (1979), *FEBS Letters*, **100**, 325—330.
114. Schliephake W., Junge W., Witt H. T., (1968), *Z. Naturforsch.*, **23b**, 1571—1578.
115. Yamamoto Y., Nishimura M., (1978), *Plant and Cell Physiol.*, **19**, 785—790.
116. Conjeand H., Michel-Villaz M., Vermeglio A., Mathis P., (1976), *FEBS Letters*, **71**, 138—141.
117. Renger G., Wolff Ch., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 47—57.
118. Kramer H., Mathis P., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **593**, 319—329.

119. Goedheer J. C., (1970), *Photosynthetica*, 4, 97—106.
120. Cogdell R. J., Hipkins M. F., Mac Donald W., Nuscott T. G., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 634, 191—202.
121. Goedheer J. C., (1959), *Biochim. Biophys. Acta*, 35, 1—8.
122. Knox R. S., (1977) w *Topics in Photosynthesis*, red. Barber J., 2, str. 55—98, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
123. Förster Th., (1959), *Disc. Faraday Soc.*, 27, 7—17.
124. Song P. S., Chae Q., Fujita M., Baba H., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 819—824.
125. Naqvi R. K., (1980), *Photochem. Photobiol.*, 31, 523—524.
126. Song P. S., Moore T. A., (1974), *Photochem. Photobiol.*, 19, 435—441.
127. Thrash R. J., Fong H. L. B., Leroi G. E., (1979), *Photochem. Photobiol.*, 29, 1049—1050.
128. Griffiths M., Sistro W. R., Cohen-Bazire G., Stanier R. Y., (1955), *Nature*, 176, 1211—1214.
129. Cohen-Bazire G., Stanier R., (1958), *Nature*, 181, 250—252.
130. Mathews-Roth M. M., Wilson T., Fujimori E., Krinsky N. I., (1974), *Photochem. Photobiol.*, 19, 217—222.
131. Maxwell W. A., Mac Millan J. D., Chichester C. O., (1966), *Photochem. Photobiol.*, 5, 567—577.
132. Robertson D. S., Bachmann M. D., Anderson J. C., (1966), *Photochem. Photobiol.*, 5, 797—805.
133. Boucher F., Van der Rest M., Gingras G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 461, 339—357.
134. Takahama U., Nishimura M., (1975), *Plant and Cell Physiol.*, 16, 737—748.
135. Foot C. S., (1968), *Science*, 162, 963—970.
136. Foot C. S., Denny R. W., Weaver L., Chang Y., Peters J., (1970), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 171, 139—148.
137. Chessin M., Livingston R., Truscott T. C., (1966), *Trans. Faraday Soc.*, 62, 1519—1524.
138. Mathis P., (1969), w *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner W., 2, str. 818—822, Tübingen.
139. Mathis P., (1970), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 271, 1094—1096.
140. Mathis P., Galmiche J., (1967), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 264, 1903—1906.
141. Wolff Chr., Witt H. T., (1969), *Z. Naturforsch.*, 24b, 1031—1037.
142. Witt H. T., Wolff Chr., (1970), *Z. Naturforsch.*, 25b, 387—388.
143. Monger T. G., Cogdell R. J., Person W. W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 449, 136—153.
144. Monger T. G., Parson W. W., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 460, 393—407.
145. Kung M. C., De Vault D., (1976), *Photochem. Photobiol.*, 24, 87—91.
146. Rademaker H., Hoff A. J., Van Grondelle R., Duysens L. N. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 592, 240—257.
147. Maroti P., Lavorel J., (1979), *Photochem. Photobiol.*, 29, 1147—1151.
148. Butler W. L., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3420—3422.
149. Joliot A., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 460, 142—151.
150. Jursinic P., Govindjee, (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 461, 253—267.
151. Mauzerall D., (1976), *Biophys. J.*, 16, 87—91.
152. Campillo A. J., Kollman V. H., Shapiro S. L., (1976), *Biophys. J.*, 16, 93—97.

153. Breton J., Geacintov N. E., Swenberg Ch. E., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **548**, 616—635.
154. Mathis P., Butler W. Z., Satoh K., (1979), *Photochem. Photobiol.*, **30**, 603—614.
155. Suzuki R., Fujita Y., (1977), *Plant Cell Physiol.*, **18**, 623—631.
156. Fujita Y., Suzuki R., (1973), *Plant Cell Physiol.*, **14**, 261—273.
157. Yamashita K., Konishi K., Itoh M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 511—524.
158. Takahama U., (1979), *Plant Cell Physiol.*, **20**, 213—218.
159. Knaff D. B., Arnon D. J., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 963—969.
160. Knaff D. B., Malkin R., Myron J. C., Stoller M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **459**, 402—411.
161. Searle G. F. W., Wessels J. S. C., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **504**, 84—99.
162. Cogdell R. J., Monger T. G., Parson W. W., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **408**, 189—199.
163. Clayton R. K., (1978), w *The Photosynthetic Bacteria*, red., Clayton R. K., Sistrion W. R., str. 387—396, Plenum Press, New York and London.
164. McIntosh A. R., Bolton J. R., (1976), *Nature*, **263**, 443—445.
165. Mangel M., Berus D. S., Ilani A., (1975), *J. Membrane Biol.*, **20**, 171—180.
166. Sapozhnikov D. J., Krasovskaya T. A., Mayeskaya A. N., (1957), *Dokl. Akad. Nauk USSR*, **113**, 465—467.
167. Yamamoto H. Y., Nakayama T. O. M., Chichester C. O., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 168—173.
168. Sapozhnikov D. J., (1973), *Pure and Appl. Chem.*, **35**, 47—61.
169. Yamamoto H. Y., Change J. L., Aihara M. S., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 342—347.
170. Hager A., (1967), *Planta (Berl.)*, **74**, 130—148.
171. Yamamoto H. Y., (1979), *Pure and Appl. Chem.*, **51**, 639—648.
172. Hager A., Perz H., (1970), *Planta (Berl.)*, **93**, 314—322.
173. Yamamoto H. Y., Chenchin E. E., Yamada D. K., (1975), w *Proc. 3rd Int. Congr. Photosynth.*, red. Avron M., **3**, str. 1999—2006, Elsevier, Amsterdam.
174. Hager A., (1969), *Planta (Berl.)*, **89**, 224—243.
175. Straub O., (1971), w *Carotenoids*, red. Isler O., str. 771—850, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart.

WALDEMAR M. PRZYBYSZEWSKI *) , JANINA MALEC **)

Molekularne i komórkowe efekty działania hydroksymocznika

Molecular and Cellular Effects of Hydroxyurea

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Efekty molekularne
 - II-1. Reduktaza rybonukleotydów jako enzym docelowy
 - II-2. Zmiany wewnątrzkomórkowej puli dNTP pod wpływem HU
 - II-3. Synteza DNA w obecności HU
 - II-4. Inne miejsca działania HU niż reduktaza rybonukleotydów
- III. Efekty komórkowe
- IV. Biochemiczne podstawy śmierci komórek po zadziałaniu HU i odwracalność jego cytotoksyczności
- V. Powstawanie komórek opornych na HU
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Molecular effects
 - II-1. Ribonucleotide reductase as a target enzyme
 - II-2. Changes in dNTP intracellular pools in HU-treated cells
 - II-3. DNA synthesis in HU-treated cells
 - II-4. Other than ribonucleotide reductase sites of action of HU in the cell
- III. Cellular effects
- IV. Biochemical basis of cell death after treatment with HU and reversal of its cytotoxicity
- V. Resistance to HU
- VI. Concluding remarks

*) Mgr. **) Doc. dr hab. Zakład Biochemii, Instytut Hematologii. 00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5.

Wykaz stosowanych skrótów: HU — hydroksymocznik, NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego, NADPH — zredukowana forma NADP, ADP — adenozy-no-5'-dwufosforan, CDP — cytydino-5'-dwufosforan, GDP — gwanozyno-5'-dwufosforan, UDP — urydino-5'-dwufosforan, ATP — adenozy-no-5'-trójfosforan, dATP — 2'-dezoksyadenozy-no-5'-trójfosforan, dCTP — 2'-dezoksy-cytydino-5'-trójfosforan, dGTP — 2'-dezoksygwanozyno-5'-trójfosforan, dTTP — tymidino-5'-trójfosforan, dNTP — 2'-dezoksynukleozydo-5'-trójfosforany, TdR — tymidyna, dCMP — 2'-dezoksy-cytydino-5'-monofosforan.

I. Wprowadzenie

Hydroksymocznik jest prostym organicznym związkiem chemicznym (NH_2CONHOH , masa cząsteczkowa 76) z grupy związków określanych jako alifatyczne kwasy hydroksamowe (1—5). Po raz pierwszy został zsyntetyzowany w 1869 r. a jego efektywność w systemach biologicznych wykazano 59 lat później, bo dopiero w 1928 r. (5). Cechuje się wysoką polarnością (5). Zastosowany w stężeniach niskich jest bardziej lipofilny, zaś w stężeniach wysokich ma charakter bardziej hydrofilny (6).

Działanie HU na komórki zarówno prokariotów jak i eukariotów wywołuje hamowanie syntezy DNA. Efekt ten jest wykorzystywany praktycznie w chemioterapii nowotworów oraz w eksperymentalnych badaniach biologicznych i biochemicznych (patrz artykuł przeglądowy poz. 7). Ostatnie lata przyniosły jednakże szereg informacji świadczących o tym, że działanie HU nie jest ani tak selektywne, ani tak dobrze poznane, jak to się pierwotnie wydawało. Tak więc pełne wyjaśnienie mechanizmów i skutków jego działania wymaga jeszcze dalszego opracowania.

II. Efekty molekularne

II-1. Reduktaza rybonukleotydów jako enzym docelowy

Według wielu dobrze udokumentowanych badań HU hamuje syntezę DNA poprzez hamowanie aktywności enzymu reduktazy rybonukleotydowej (8—19). Enzym ten katalizuje zastąpienie grup OH w pozycji 2' rybozy przez atom wodoru z NADPH jako donoru (20, 21). Opisano dwie formy reduktaz rybonukleotydowych (12, 20, 21): dwufosforanów rybonukleozydów (E.C.1.17.4.1) obecną w *E. coli*, drożdżach i organizmach wielokomórkowych oraz trójfosforanów rybonukleozydów (E.C.1.17.4.2) występującą w *Lactobacillus leihmanii* i w niektórych innych mikroorganizmach.

Pierwsza forma składa się z dwu nieidentycznych a komplementarnych podjednostek, z których jedna zawiera dwa związane atomy żelaza i rodnik tyrozylowy jako część łańcucha polipeptydowego. W *E. coli* są to dwa rozpuszczalne białka B1 i B2, występujące w stosunku stechiometrycznym 1:1, B1 = 160 000 i B2 = 78 000. Białko B2 o spektrum 350-420 nm cechuje się ponadto obecnością 2Fe^{+3} związanych niehemowo (10, 21—23). Enzym z komórek ssaków (grasicy cielęcej) składa się z podjednostek określanych jako M1 = 84 000, której forma natywna zachowuje się w warunkach doświadczalnych jak białko monomeryczne, i M2 = 58 000, wykazująca cechy oligomeru i spectrum absorpcyjne 404 nm (24, 25). Prawdopodobnie podjednostki M1 i M2 nie występują w stosunku stechiometrycznym (25). Komplementarność obu podjednostek jest warunkiem aktywności enzymatycznej tak w *E. coli* jak i w grasicy (23, 24).

Druga forma reduktazy, wymagająca koenzymu w postaci kobamidu, jest białkiem monomerycznym o ciężarze cząsteczkowym 76 000, z adenylozylkobalamina jako dysocjującym kofaktorem (12, 20, 21). Każda z obu form tworzy system składający się z trzech białek enzymatycznych: reduktazy rybonukleotydydowej (E.C.1.17.4.1. lub E.C.1.17.4.2.), tioredoksyny oraz reduktazy tioredoksynowej (E.C.1.6.4.5.) (20, 21). Jest to raczej system funkcjonalny niż jednostka strukturalna. Oba wymienione enzymy allosterycznie regulują formowanie się dezoksyrybonukleotydydów z odpowiednich rybonukleotydydów (15, 21) i w ten sposób limitują syntezę DNA.

Obecność HU powodowała hamowanie aktywności zarówno oczyszczonego enzymu z *E. coli* (10) jak i aktywności enzymatycznej w wyciągach komórek ssaków (14). Hamowanie było odwracalne pod nieobecność HU (8—11). Badania *in vitro* z użyciem enzymów z *E. coli*, *Lactobacillus leihmanii* i wątrobiaka Novikoffa wykazały, że HU powodował hamowanie redukcji rybonukleotydydów przez enzymy *E. coli* (9—12) i wątrobiaka Novikoffa (12—14). Nie miał natomiast wpływu na reakcję katalizowaną przez enzym z *Lactobacillus leihmanii* (12), który redukuje trójfosforany rybonukleotydydów i jest białkiem monomerycznym.

Działanie HU jest specyficzne wobec białka B2 systemu reduktazy dwufosforanów rybonukleotydydów (10, 17, 21), co stwierdzono stosując ^{14}C -HU. Następuje przy tym nieodwracalna inaktywacja białka B2 związanego z HU (10, 11). W medium bez HU następuje rekonstrukcja białka B2 z apoproteiny B2 i Fe^{+2} , co obserwuje się tylko w obecności tlenu. Powstały w wyniku utlenienia jon Fe^{+3} jest niezbędny do pierwotnego ukształtowania się centrum aktywnego enzymu (23). W przeciwieństwie do białka B2 enzymu z *E. coli*, białko M2 enzymu z grasicy cielęcej jest *in vitro* odwracalnie inaktywowane przez HU (24). Na podstawie wyników badań oczyszczonej reduktazy rybonukleotydydowej z wątrobiaka szczura przypuszcza się, że działanie HU polega na odwracalnym wiązaniu wolnego jonu żelazowego podjednostki M2 (14). Podobne wyniki uzyskano w transformantach *E. coli* fagiem T4. W tym przypadku jednak dodatkowym działaniem HU było uszkodzenie wolnego rodnika w zawierającej żelazo podjednostce B2, co prawdopodobnie powodowało jej nieodwracalne uszkodzenie (17).

Jak już wspomniano, HU należy do pierwszorzędowych alifatycznych kwasów hydroksamowych, które charakteryzują się działaniem poprzez wiązanie wolnego jonu żelazowego. Mogą one powodować wzrost ekskrecji jonu żelazowego ponieważ są silnymi czynnikami chelatującymi (1, 3, 26, 27). Zdolność chelatowania stanowi więc właściwość HU typową dla tej grupy związków.

Porównanie wpływu HU na aktywność reduktazową enzymu *E. coli* dla ADP, GDP, CDP i UDP wykazało większą wrażliwość aktywności reduktazowej dla CDP i ADP niż dla GDP i UDP (15). Wynik ten na-

suwał przypuszczenie, że przynajmniej w *E. coli* działają dwa niezależne systemy redukcji rybonukleotydów. Przypuszczenie takie było jednak sprzeczne z wynikami wcześniejszych badań wykazujących działanie w komórkach prokariotów tylko jednego systemu redukcji rybonukleotydów (16). Za działaniem tylko jednego systemu redukcji przemawiały również wyniki badania wpływu HU na aktywność reduktazy rybonukleotydów indukowanej w *E. coli* fagiem T4. Nie stwierdzono bowiem działania różnicowego w redukcji czterech substratów (17). Zagadnienie pozostaje zatem nadal otwarte.

Próby powiązania aktywności reduktazy rybonukleotydomowej z określonymi strukturami subkomórkowymi w bakteriach nie powiodły się (21). Stwierdzono natomiast, że w komórkach wątrobiaka Novikoffa reduktaza CDP jest związana z gładkimi błonami siateczki endoplazmatycznej, zaś w komórkach mięsaka (*Sarcoma M1*) — z frakcją mitochondrialną i jądrową (28).

Aktywność reduktazy rybonukleotydomowej zmienia się w komórce podczas cyklu komórkowego: najniższa jest w fazie G1, wzrasta stopniowo w ciągu fazy S i G2 (20, 29, 30). Z badań, w których zastosowano cykloheksimid i aktynomycynę wywnioskowano, że enzym ulega rozpadowi w komórkach będących w fazie G1 i następnie jest resyntetyzowany (29).

Konsekwencją hamowania aktywności reduktazy rybonukleotydomowej przez HU są zmiany wewnątrzkomórkowej zawartości dNTP, które warunkują odpowiedź komórki na działanie HU.

II-2. Zmiany wewnątrzkomórkowej zawartości dezoksynukleozydotrójfosforanów pod wpływem hydroksymocznika

W warunkach fizjologicznych wewnątrzkomórkowa zawartość poszczególnych dNTP a także ich rozmieszczenie w komórce ulegają ciągłym zmianom w różnych okresach życia komórki. W czasie fazy G1 wszystkie dNTP są obecne tak w cytoplazmie jak i w jądrze, jednakże rozdział ich pomiędzy te dwa kompartmenty znacznie się różni. I tak dATP, dCTP i dGTP jest więcej w cytoplazmie zaś dTTP w jądrze. W czasie fazy S poziom wszystkich czterech dNTP wzrasta w jądrze, a dTTP występuje tylko w jądrze (31). Komórki znajdujące się w mitozie charakteryzują się dużą zawartością dNTP (32). Po wyjściu komórek z mitozy dNTP są rozkładane, dzięki czemu ich zawartość w komórkach znajdujących się w fazie G1 jest niska (33). Przed rozpoczęciem syntezy DNA stężenie dNTP zaczyna wzrastać, a wzrost postępuje w ciągu fazy S (18, 21, 33).

Poszczególne dNTP nie występują w stosunkach równoważnych. Stężenie dNTP purynowych jest zawsze znacznie niższe niż pirymidyno-

wych (18, 19, 21, 33—35). Na przykład fibroblasty chomika badane w środku fazy S zawierały w 10^6 komórek 10 pmoli dGTP, 27 pmoli dATP, 76 pmoli dCTP i 104 pmoli dTTP (33).

Gdy do podłoża, w którym wzrastają komórki zostanie dodany HU, obserwuje się spadek stężenia dGTP i dATP a wzrost stężenia dCTP i dTTP. Zmiany takie notowano w komórkach zarodka myszy (18), L5178Y (19) i L₉₂₉ myszy (34), fibroblastach chomika (33), komórkach grasicy (35), wątrobiaku Novikoffa (36) i *E. coli* (9). Dodanie HU do hodowli fibroblastów w fazie G1 cyklu komórkowego hamowało rozpoczęcie syntezy DNA, pomimo że tworzenie dTTP, dCTP i dGTP odbywało się nadal tak, jakby komórki miały rozpocząć syntezę DNA prawidłowo. Zahamowane zostało natomiast tworzenie dATP (33).

Obserwacje powyższe są podstawą wniosków, że hamowanie syntezy DNA jest konsekwencją wyczerpania się wewnątrzkomórkowych zasobów przede wszystkim dNTP purynowych lub nawet tylko samego dATP. Powstawanie selektywnego niedoboru dATP i dGTP jest jednakże trudne do wyjaśnienia w świetle poglądu, że dNTP pirymidynowe są tworzone z odpowiednich rybonukleotydów przez ten sam enzym, który redukuje rybonukleotydy purynowe (37). Scott i Forsdyke (35) biorą pod uwagę następujące możliwości: niejednakową wrażliwość reduktazy rybonukleotydowej na działanie HU wobec nukleotydów purynowych i pirymidynowych; wybiórczy lub też większy rozpad nukleotydów purynowych niż pirymidynowych w obecności HU, prowadzący w konsekwencji do powstania nadwyżek nukleotydów pirymidynowych. Podobną trudność sprawia interpretacja badań, w których stwierdzono, że obecność HU nie zmienia aktywności redukowania fosforanu cytydyny do dwufosforanu dezoksycytydyny w komórkach mysiego zarodka (18), limfoblastach L5178Y myszy (19) wątrobiaka Novikoffa (36). Natomiast hamuje tę aktywność w komórkach ludzkiego czerniaka, raka jelita i szyjki macicy oraz w megaloblastach szpiku kostnego człowieka i szczura (38). Dla wyjaśnienia tych obserwacji Plageman i Erbe (36) sugerują działanie mechanizmu regulacji odpowiedniej aktywności reduktazowej przez allosteryczne efekторы nukleotydowe.

II-3. Synteza DNA w obecności hydroksymocznika

Hamowanie syntezy DNA w wyniku działania HU nie jest całkowite. Fakt ten stwierdzili liczni autorzy w komórkach ssaków (39—45), roślin (46), drożdży (47) oraz wirusów (48—50). Jednakże inkorporacja znakowanej tymidyny ogranicza się w obecności HU do małych fragmentów DNA, które nie łączą się w DNA wielkocząsteczkowy. Mogą one ulec prawidłowemu połączeniu dopiero po umieszczeniu komórek w środowisku bez HU (39—41, 43, 44, 49, 50). Pomimo zastrzeżeń sugerujących

że znakowane w tych warunkach fragmenty DNA mogą stanowić artefakty (45), większość autorów uważa syntezę krótkich fragmentów DNA w obecności HU za dowiedzioną. Wielkość syntetyzowanych fragmentów jest różna w różnych rodzajach komórek: w wirusach *polyoma* (49, 51) i SV40 (50) 4—5 S, w adenowirusach (48) — 10 S, w komórkach drożdży i mysich L (43, 47) — 7 S. We wszystkich badanych komórkach wielkość syntetyzowanych fragmentów była podobna do wielkości fragmentów pośrednich w syntezie DNA (fragmentów Okazaki), obserwowanych w odpowiednich komórkach syntetyzujących DNA bez obecności HU. Losy fragmentów DNA syntetyzowanych w czasie i krótko po działaniu HU były dokładnie badane w komórkach CHO (40). Stwierdzono, że po usunięciu HU wielkość znakowanego DNA wzrastała linearnie z szybkością $0.98 \pm 0.12 \times 10^6$ daltonów/min w ciągu 2,3 godziny co stanowiło $1/3$ — $1/2$ czasu trwania fazy S. Po zakończeniu tego etapu DNA o masie cząsteczkowej około 1.4×10^8 był szybko włączany w DNA o ciężarze 3.8×10^8 .

Dla wyjaśnienia dlaczego obecność HU, zapobiegając łączeniu się małych fragmentów DNA, nie hamuje równocześnie syntezy nowych fragmentów, powodując w konsekwencji ich akumulację, Laipis i Levin (50) sformułowali na podstawie badań wirusa SV40 hipotezę, że polimerazy prowadzące syntezę podłańcuchów DNA charakteryzują się niższą wartością K_m dla dNTP niż polimerazy odpowiedzialne za łączenie tych podłańcuchów. A więc, gdy w wyniku zahamowania aktywności reduktazy przez HU wewnątrzkomórkowe stężenie dNTP obniża się do krytycznie niskiego poziomu, może zachodzić jeszcze pewna synteza krótkich fragmentów DNA, ale ich łączenie ulega już drastycznemu ograniczeniu. Podobny wniosek wyciągnęli Martin i wsp. (43) z wyników badań komórek L.

Porównując stopień hamowania syntezy DNA jądrowego i cytoplazmatycznego stwierdzono, że HU wywiera mniejszy wpływ na syntezę tego drugiego. I tak w komórkach HeLa (52, 53) oraz w komórkach normalnej i regenerującej wątroby szczura (54, 55) obserwowano znacznie słabsze hamowanie syntezy DNA w mitochondriach niż w jądrach. W pierwotniakach HU hamował syntezę jądrowego DNA, nie miał natomiast wpływu na syntezę DNA w kinetoplaście (56, 57). W grzybach obecność HU powodowała wzrost ilości mitochondrialnego DNA na komórkę (58, 59). W plasmodium *Physarum polycephalum* cytoplazmatyczna i jąderkowa frakcja DNA komórki syntetyzowane są prawdopodobnie w fazie G2 cyklu komórkowego. Działanie 60 mM HU w tym okresie cyklu nie powodowało hamowania inkorporacji tymidyny do DNA (60).

W świetle powyższych wyników powstaje pytanie czy obserwowana w obecności HU synteza małych fragmentów DNA nie odnosi się głównie do DNA cytoplazmatycznego, który jest z natury mniejszy niż DNA jądrowy. Odpowiedzi dostarczają między innymi doświadczenia Coyle i Straussa (44). Po oddzieleniu jąder i cytoplazmy komórek wyzna-

kowanych tymidyną w obecności HU stwierdzili oni, że pomimo pewnego zwiększenia proporcji znakowania w DNA cytoplazmatycznym, w jądrach pozostawało jeszcze około 96% radioaktywności. A zatem małe fragmenty DNA pochodziły głównie z jąder.

W oparciu o liczne prace (61—68), z których wnioskowano, że HU nie hamuje replikacyjnej syntezy DNA, związek ten był szeroko stosowany do hamowania syntezy replikacyjnej w badaniach procesów replikacji DNA. Wniosek wywodził się z obserwacji, że w komórkach poddanych działaniu czynników uszkadzających DNA, obecność HU nie hamowała ani włączania znakowanej tymidyny do DNA, przyjmowanego jako miarę aktywności replikacji DNA, ani szybkości wycinania dimerów pirymidynowych. Szereg autorów wykazało jednakże, że także i replikacyjna synteza DNA ulega hamowaniu przez HU. Umieszczenie komórek naświetlonych promieniami UV w pożywce z dodatkiem HU prowadzi do akumulacji jednopasmowych pęknięć DNA, zaś na poziomie komórkowym wyraża się dekondensacją chromosomów oraz wzmożeniem efektu letalnego (69—76). Uszkodzenia DNA mogą ulec zmniejszeniu po dodaniu do środowiska komórek egzogenych prekursorów DNA (75, 76). Ich replikacja jest więc pośrednio zależna od aktywności reduktazy rybonukleotydów. Pozostaje jednak pytanie jaki jest wobec tego mechanizm indukowanego przez uszkodzenie DNA pobudzenia włączania znakowanej tymidyny do DNA. Jako wyjaśnienie proponuje się zmniejszenie wewnątrzkomórkowej puli TdR w obecności HU co z kolei powoduje stopniowe podwyższanie aktywności właściwej wewnątrzkomórkowej znakowanej TdR (76).

Badania wpływu HU na powstawanie aberacji chromosomalnych w wyniku działania innych czynników chemicznych uszkadzających DNA (*thiotepa*, *bleomycyna*), wykazały, że HU dodany do środowiska komórek w czasie G2-profazy potęguje częstotliwość występowania aberacji (77). Wyniki takie sugerują działanie w tej fazie cyklu komórkowego systemu replikacji wrażliwego na HU.

Trudne do wyjaśnienia w świetle znanych mechanizmów działania HU jest powstawanie pęknięć matrycowego pasma DNA w obecności HU w wysokich stężeniach. Pęknięcia występowały już po 30 min działania HU na komórki w hodowli, ilość ich osiągała szczyt po 60 min, poczem stopniowo zanikały (78). Opierając się na spostrzeżeniu, że uszkodzeniom DNA można było zapobiec wprowadzając do pożywki równocześnie z HU mieszaninę czterech dNTP, autorzy sugerują, że czynnikiem wywołującym je jest obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia dNTP. Pęknięcia tworzyły się, zdaniem autorów, tylko w niewielkiej ilości cząsteczek DNA, które były zaangażowane w procesie replikacji w momencie gdy stężenie dNTP osiągnęło jakiś krytycznie niski poziom. W miarę trwania inkubacji z HU coraz mniej cząsteczek DNA ulega replikacji, stąd powstawanie nowych pęknięć stopniowo wygasa a wcześniej powstałe są stopniowo reperowane.

II-4. Inne miejsca działania hydroksymocznika niż reduktaza rybonukleotydów

Badania efektów działania HU na inne miejsca w komórce niż reduktaza rybonukleotydów były prowadzone tylko wrywkowo i nie przyniosły wyników na tyle znaczących, aby zmienić poglądy na mechanizmy działania tego związku. Nie mniej jednak wydaje nam się, że przynajmniej ważniejsze prace z tego zakresu powinny być wymienione w przedstawionym artykule choćby z tego względu, aby badań zakończonych wynikiem negatywnym nie powtarzać, a o wynikach pozytywnych, które dziś wydają się mało znaczące, w odpowiednim momencie wiedzieć.

Badania efektów działania HU na inne niż reduktaza enzymy związane z syntezą DNA wykazały, że w zasadzie nie wpływał on na aktywność polimerazy DNA z wyjątkiem stężeń bardzo wysokich (około 1 M), w których aktywność tego enzymu stymulował (79—81).

Wyniki badań skutków działania HU na syntezę RNA i białek komórkowych nie są jednoznaczne. Szereg doświadczeń wykazało, że hamowaniu syntezy DNA nie towarzyszy wczesne obniżenie syntezy RNA i białek (54, 79, 82, 83). Nie stwierdzono również hamującego wpływu HU na włączanie znakowanego mrówczanu do frakcji rozpuszczalnej w kwasie ani adeniny do RNA (80). Bakteriostatyczne stężenie HU dla *E. coli*, wywołujące zahamowanie syntezy DNA, nie miało wpływu na syntezę rybosomalnego RNA ani nie zmieniało indukcji β -galaktozydazy (84). Istnieją jednakże dane doświadczalne wskazujące na obniżenie syntezy RNA i białka przez działanie HU. Przykładem są prace na limfocytach obwodowych, w których w obecności HU występowało obniżenie włączania znakowanej leucyny do osadu wytrąconego kwasem trójchlorooctowym, podczas gdy w obecności 5-fluorodezoksyurydyny obniżenia nie obserwowano (83). Pomiarzy włączania znakowanych aminokwasów do białek komórek raka Ehrlicha (85) oraz limfoblastów L5178Y (86) w hodowli wykazały, że po przekroczeniu pewnego stężenia HU występuje wyraźne obniżenie syntezy białek już po 30 min. W komórkach L myśzy HU wywoływał rozpad polisomów (87). W stosunkowo niskim stężeniu (10^{-5} M) hamował aktywność L-ornityno-dekarboksylazy, enzymu związanego z biosyntezą poliamin oraz DNA. Po przeniesieniu komórek do pożywki bez HU obserwowano powrót prawidłowej aktywności ornityno-dekarboksylazy z równoczesną replikacją DNA (88). Interferował z reakcjami transferaz w błonie komórkowej fibroblastów zarodka chomika, gdzie hamował przenoszenie galaktozy, N-acetylo-D-glukozyminy i kwasu sjałowego, przy nieupośledzonym przenoszeniu glukozy. Powodował także zmniejszenie włączania D-glukozyminy w oligoproteiny i glikolipidy (89).

W komórkach L5178Y, inkubowanych w obecności niskich stężeń HU, obserwowano po upływie 24-48 godzin wzrost aktywności enzymów lizosomalnych przy równoczesnym obniżeniu aktywności enzymu pozali-

zosomalnego — dehydrogenazy mleczanowej (90). W badaniach *in vivo* również stwierdzono, że po czterech dniach podawania HU szczurom aktywność kwaśnej fosfatazy i 5'-nukleotyduazy w wątrobie znacząco wzrastała przy tylko niewielkim wzroście aktywności glukozy-6-dehydrogenazy i oksydazy cytochromowej. W przeciwieństwie do wątroby aktywność kwaśnych hydrolaz trzustki nie zmieniała się a w nerkach ulegała obniżeniu. Poziom glikogenu i lipidów w wątrobie w tym samym czasie był obniżony (91).

III. Efekty komórkowe

W 1965 r. ukazała się klasyczna już dziś praca Sinclaira (92), w której wykazał on różnicujący efekt letalny HU w zależności od fazy cyklu komórkowego w komórkach chomika w hodowli. Gdy komórki syntetyzujące DNA w czasie zadziałania HU ulegały uszkodzeniu letalnemu, to przy zastosowaniu tego samego stężenia HU komórki znajdujące się w fazie G1 przeżywały, ale nie podejmowały syntezy DNA aż do umieszczenia komórek w świeżej pożywce bez inhibitora, zaś komórki w fazie G2 kontynuowały dalej cykl komórkowy aż do momentu, w którym powinnyby rozpocząć następną fazę syntezy DNA.

Cytotoksyczne efekty działania HU zależą od trzech czynników: stężenia związku, czasu działania i wrażliwości komórek (39, 93, 94). Stąd też odpowiedź komórek na działanie HU przy takim samym stężeniu może różnić się znacznie w komórkach różnych rodzajów. Nie określając zatem ściśle stężeń HU można je schematycznie podzielić na dwa zakresy: stężenia wysokie powodujące wczesny efekt letalny oraz stężenia względnie niskie, ale jeszcze efektywne w hamowaniu syntezy DNA, wywołujące odwracalną akumulację komórek w interfazie (stosowane w technikach synchronizacji wzrostu komórek).

Nie zostało jednoznacznie określone w jakiej fazie cyklu komórkowego następuje maksymalna akumulacja komórek w obecności HU. Część autorów przedstawia dowody na blokadę cyklu komórkowego na granicy faz G1/S (95—102), część zaś utrzymuje, że komórki w fazie G1 wchodzi w fazę S i dopiero na jej początku następuje blokada (39, 40, 93). Szczegółowe badania komórkowych efektów działania HU na komórki roślinne (103) wykazały, że w warunkach optymalnych dla synchronizacji wzrostu komórek, występuje postępująca akumulacja komórek w fazie S. Wywołane obecnością HU hamowanie syntezy DNA zwalnia wchodzenie komórek w fazę S. Ostatecznie jednak komórki z fazy G1 przechodzą do fazy S i ulegają akumulacji na jej początku. Komórki znajdujące się w późniejszych okresach fazy S w zwolnionym tempie kontynuują przechodzenie przez dalsze etapy fazy S. Komórki w fazie G2 wchodziły w mitozę z opóźnieniem, co stwierdzili i inni autorzy (104).

Niektórzy autorzy zwracają uwagę na skrócenie cyklu komórkowego po pierwszym podziale synchronicznym, które występowało i w hodowlach komórkowych (99, 105) i *in vivo* (54, 100, 106). W komórkach CHO stwierdzono skrócenie fazy G1 w następnej generacji komórek po ustaniu działania HU (107).

W komórkach poddanych działaniu HU obserwowano różne zmiany morfologii: nieprawidłowe mitozy, fuzję chromatyny z utworzeniem chromocentrów, asocjację chromocentrów lub DNA z błoną jądrową oraz tworzenie się mostków chromatynowych z chromatyny do błony jądrowej (42, 102, 108—111). W badaniach wątroby szczura poddanego działaniu HU *in vivo* stwierdzono liczne wakuole autofagiczne (92).

Badając efekty krótkotrwałej inkubacji limfoblastów L5178Y w pożywce z HU stwierdzono, że już po 60 min działania względnie wysokich stężeń, następuje częściowe zahamowanie proliferacji komórek, utrzymujące się pomimo przeniesienia komórek do środowiska pozbawionego HU. Po około 12 godzinach od czasu zakończenia inkubacji w HU pojawiają się w znacznych ilościach komórki olbrzymie, o wielkościach spotykanych tylko sporadycznie w hodowlach kontrolnych (112).

Tworzenie komórek olbrzymich zostało opisane w wielu liniach komórkowych. Może ono występować zarówno spontanicznie, w bardzo niskich ilościach, jak i pod wpływem czynników uszkodzających ciągłość łańcuchów DNA w chromatynie, takich jak promieniowanie jonizujące (113) lub promienie lasera (114) oraz związki alkilujące (115). Wydaje się, że powstawanie komórek olbrzymich w wyniku działania HU można wiązać ze wspomnianym poprzednio (II-3) powstawaniem pęknięć matrycowego pasma DNA.

HU wywiera działanie mutagenne (58, 116—122) oraz teratogenne powodując już po jednorazowym podaniu powstawanie licznych anomalii rozwojowych (123—138). Jako związek drobnocząsteczkowy szybko dyfunduje przez błony biologiczne, przechodząc przez barierę łożyska (126) oraz woreczka żółtkowego (130). Okres półtrwania HU w surowicy ludzkiej wynosi około 5,5 godziny (7). W zarodku szczura znajdującym się w organizmie matki czas ten wynosi 15 min, w zarodku małpy około 265 min (126).

Z badania myszy wynika, że 30-50% wstrzykniętego HU przechodzi do moczu w postaci mocznika a głównym narządem metabolizującym ten związek jest wątroba (139, 140).

IV. Biochemiczne podstawy śmierci komórek po zadziałaniu hydroksymocznika i odwracalność jego cytotoksyczności

Wszystkie badania skutków działania HU wykazały jednoznacznie, że wczesny efekt letalny obejmuje wybiórczo komórki znajdujące się

w fazie S w momencie pierwszego kontaktu z tym związkiem. Liczba zabitych komórek zależy głównie od stężenia HU a tylko w niewielkim stopniu od czasu jego działania (38, 81, 92—94, 110, 137). Drugim równie ważnym czynnikiem jest aktywność syntezy DNA komórek (93, 94, 142). Ostatecznie jednak, po dostatecznie długim czasie, coraz większa część populacji komórkowej ulega nieodwracalnemu uszkodzeniu. Tak więc należałoby przyjąć że wywołane przez HU uszkodzenia obejmują stopniowo komórki w różnych punktach cyklu komórkowego (93, 143).

Wielu autorów uważa, że przyczyną śmierci komórek w wyniku zahamowania syntezy DNA jest „niezrównoważony wzrost” (*unbalanced growth*) manifestujący się postępującym nieprawidłowym wzrostem objętości komórek. Jako hipotetyczny mechanizm tego procesu na poziomie komórkowym postuluje się stopniowe wchodzenie komórek w „poronny pseudo-cykl komórkowy”, charakteryzujący się znaczną intensywnością syntezy białka i niektórych innych makromolekuł bez innych równoległych procesów przygotowujących komórkę do podziału, a przede wszystkim bez syntezy DNA (144). Ostatnie obserwacje zdają się świadczyć, że niezrównoważony wzrost obejmuje nie tylko komórki aktualnie proliferujące ale również komórki spoczynkowe, jeżeli tylko nie utraciły potencjalnych możliwości podziału (144). Molekularny mechanizm tego procesu nie jest jeszcze dobrze poznany. Niezrównoważony wzrost komórek obserwowano również pod działaniem HU (94, 96, 141, 144, 145). Wydaje się jednak, że jeżeli śmierć komórek następuje w wyniku niezrównoważonego wzrostu to czas trwania zahamowania syntezy DNA musi być względnie długi. Tak jak to ma miejsce w przypadku arabinozydu cytozyny lub 5-fluorodezoksyurydyny. I rzeczywiście w wielu układach doświadczalnych stwierdzono, że efekt letalny HU występował w czasie jego działania nie krótszym od czasu jednej generacji (82, 146). Coyle i Strauss (44) sprawdzali możliwą współzależność efektów molekularnych działania HU i efektu letalnego w komórkach HEp-2 *in vitro* i stwierdzili, że zahamowanie syntezy DNA było odwracalne aż do 24 godzin inkubacji z HU. Po przeniesieniu komórek do pożywki bez inhibitora następowała wtedy szybko konwersja małych fragmentów DNA w DNA wielkocząsteczkowy. Po upływie dłuższego czasu działania HU obserwowano wzrastającą ilość małych fragmentów DNA, które nie ulegały już konwersji w DNA wielkocząsteczkowy w nieobecności HU. W tym samym czasie zaczynała się uwidocznić fragmentacja DNA matrycowego, której towarzyszyło zmniejszenie zdolności komórek do tworzenia kolonii. Na tej podstawie autorzy wyciągnęli wniosek, że podstawę nieodwracalnego uszkodzenia komórek stanowiła akumulacja pęknięć obu pasm DNA. Był to jednak wynik wielogodzinnego działania inhibitora.

Tymczasem wiele danych wskazuje, że wybiórcze działanie letalne na komórki w fazie S zachodzi w krótkim czasie. Na przykład stwierdzono,

że letalne uszkodzenie komórek chomika V79 w hodowli występowało już po 3 godzinach działania HU (94, 147), zaś mięsaka (*Sarcoma 180*) w ciągu początkowych 2-4 godzin i przez następne 12 godzin już się nie nasilało (93). Letalne uszkodzenie limfoblastów L5178Y *in vitro* obserwowano już po 60 min działania HU (112). Jeszcze krótszy czas wystarczał dla wywołania efektów teratogennych. Patologiczne zmiany na poziomie ultrastruktury komórek obserwowano w zarodkach już po upływie 15-45 min od momentu wstrzyknięcia HU ciężarnym królikom, szczurom lub myszom (110, 127, 137, 148), zaś poważne zaburzenia morfologiczne sercowo-naczyniowe po upływie 3-6 min (149).

Wyniki badań nad teratogennym działaniem HU stały się podstawą hipotezy De Sessa (150), że HU wywiera dwa rodzaje działania farmakologicznego: hamowanie syntezy DNA oraz szybkie, wybiórcze zabijanie komórek w fazie S. Działania te miałyby być całkowicie odrębne i wzajemnie niezależne. Dla wyjaśnienia tego drugiego mechanizmu działania De Sessa zaproponował inicjowanie przez HU niekontrolowanych reakcji łańcuchowych wolnych rodników.

Dane doświadczalne wskazują, że 1-10% podanego *in vivo* HU jest przekształcane w kwas acetohydroksaminowy. Związek ten jest nietrwały i może spontanicznie lub w wyniku hydrolizy enzymatycznej tworzyć wolną hydroksylaminę (4, 79, 151). W obecności tlenu hydroksylamina ulega oksydatywnej transformacji w rodniki nitroksylowe HNO, nadtlenek wodoru oraz rodniki pośrednie $\cdot\text{OH}$, $\text{NH}_2\text{O}\cdot$, $\text{OHN-HOO}\cdot$, które z kolei zwrótnie reagując z hydroksylaminą stają się akceleratorami reakcji w których same powstają (152-155). Rodniki mogą reagować z niemal wszystkimi makromolekułami komórki, powodując uszkodzenie DNA i enzymów, peroksydację błon organelli komórkowych itd. Ponieważ tylko niewielka ilość cząsteczek HU ulega tym procesom, przeważająca ich część spełnia swoją podstawową funkcję inhibitora syntezy DNA przez zahamowanie aktywności enzymu docelowego.

Za powyższą hipotezą przemawiały mało skuteczne próby odblokowania syntezy DNA i proliferacji komórek w obecności HU przez dostarczenie egzogennych prekursorów DNA. Skuteczności takiego postępowania należałoby się spodziewać w wypadku, gdyby jedynym miejscem działania HU w komórce była reduktaza rybonukleotydów. Próby takie wykonywano w komórkach w hodowli dodając do pożywki dezoksyrybonukleozydy tylko purynowe, tylko pirymidynowe lub wszystkie cztery (3, 8, 156-159). Stopień odwrócenia działania HU był nie jednakowy w różnych komórkach, nigdy jednak pełny. W badaniach nad zmniejszeniem teratogennego działania HU u zwierząt stwierdzono, że fizjologiczne pirymidyny nieco ten efekt osłabiały a dCMP podany jednocześnie z HU dawał całkowitą ochronę (128). Wyniki te uważa jednak De Sessa za jeszcze jeden dowód na poparcie hipotezy rodnikowej, powołując się na prace, w których pirymidynowe zasady w kwasach nukleinowych sta-

nowiły *in vitro* główną tarczę dla rodników powstałych z hydroksylaminy (152—154).

Konsekwencją hipotezy rodnikowej było założenie, że związki typu zmiataaczy rodników (*scavengers*) np. antyoksydanty, powinny stanowić ochronę przed cytotoksycznym, nieswoistym, szybkim działaniem HU. Dla zmodyfikowania działania teratogennego HU De Sessa użył antyoksydantu fenolowego, galusanu propylu, osiągając pewne złagodzenie cytotoksyczności (160). Złagodzenie osiągnięto dzięki opóźnieniu o kilka godzin letalnego działania HU na komórki zarodka.

Opierając się na tym samym założeniu wykonano próby osłonięcia limfoblastów L5178Y w hodowli przed toksycznym działaniem HU stosując zmiatacze rodników oraz enzymy oksydoredukcyjne. Jako „indeks ochronny” przyjęto odblokowanie późnego zahamowania syntezy DNA, wywołanego krótkotrwałym działaniem HU w wysokich stężeniach oraz zapobiegnięcie tworzeniu komórek olbrzymich. Osiągnięto niemal pełne odwrócenie efektów cytotoksycznych stosując benzoesan sodu, kwas acetylosalicylowy, α -tokoferol, katalazę, peroksydazę lub dysmutazę nadtlenkową (161).

Za powstawaniem nadtlenku wodoru z HU i jego udziałem w wywołaniu uszkodzeń DNA *in vivo* przemawiają doświadczenia, w których stwierdzono uszkodzenia DNA w ludzkich komórkach limfoidalnych inkubowanych z HU w obecności układu aktywującego w postaci mikrosomów wątroby oraz NADPH. Dodanie katalazy do mieszaniny inkubacyjnej niemal całkowicie chroniło DNA przed uszkodzeniem (162).

V. Powstawanie komórek opornych na hydroksymocznik

HU okazał się świetnym czynnikiem selekcyjującym odporne mutanty w hodowlach komórkowych. Wyzolowano 4 linie opornych komórek CHO oraz 1 linię komórek L. Oporność na HU zachowuje się jak normalna cecha genetyczna (157, 163). Linie odporne zachowały swój oporny fenotyp przez ponad dwuletni okres hodowli bez inhibitora. Szybkość selekcjonowania linii opornych na HU była podobna do szybkości selekcjonowania przez inne leki np. metotreksat. Doświadczenia z zastosowaniem techniki hybrydyzacji wykazały, że oporność na HU zachowuje się jak cecha dominująca lub kodominująca, która może być zastosowana jako genetyczny marker hybryd komórek somatycznych. Porównanie własności kinetycznych częściowo oczyszczonej reduktazy rybonukleotydów z komórek dzikich i opornych wykazało, że enzymy te różnią się wartościami K_i dla trzech badanych substratów (164). Wskazywało to, że mutanty odporne zawierały enzym o zmienionej strukturze, którego aktywność jest mniej wrażliwa na działanie HU. Sugerowało to z kolei, że linie odporne powstały z mutacji genu strukturalnego. Ci sami autorzy wyizolowali linie komórkowe z podwyższonym poziomem reduktazy wrażliwej na

HU (165), są więc one prawdopodobnie nosicielami zmiany w genie regulatorowym. W przypadku *E. coli* proces adaptacyjny do obecności HU przebiegał równolegle ze wzrostem aktywności nieorganicznej pirofosfatazy (166). Wirusy EHV1, EHV3 (167) i Epstein-Barr (168) kodują własną reduktazę częściowo lub całkowicie niewrażliwą na HU.

VI. Uwagi końcowe

Badania nad mechanizmem i efektami działania HU mają poważne znaczenie ze względu na jego zastosowanie jako narzędzia pracy biologa i biochemika jak i, i to przede wszystkim, ze względu na jego zastosowania w klinice jako leku przeciwnowotworowego. W ostatnim 10-leciu, kiedy to nastąpił wyraźny powrót zainteresowania kliniki tym lekiem, okazało się, że główne jego właściwości scharakteryzowane *in vitro* potwierdziły się *in vivo*. Niemniej jednak nadal istnieje ogromna luka pomiędzy informacjami, których dostarczyły laboratoria a zapotrzebowaniem klinik. Luka ta uwydatnia się ze szczególną ostrością w próbach określenia optymalnych formuł t.zw. chemioterapii łączonej (*combination chemotherapy*). Zagadnienie to powinno być opracowywane, jak się wydaje, z co najmniej dwóch punktów widzenia: 1. wykorzystania swoistych efektów działania HU dla pogłębienia efektywności innych środków przeciwnowotworowych oraz odwrotnie, 2. ochrona komórek nienowotworowych przed działaniem toksycznym terapii przeciwnowotworowej. W zakresie pierwszym pewne wyniki zostały już osiągnięte w drodze wykorzystania swoistych zmian w wewnątrzkomórkowych zawartościach dNTP pod wpływem działania HU, TdR i arabinozydu cytozyny (169, 170). Pewne wyniki osiągnięto również wykorzystując HU do różnicowego manipulowania cyklem komórkowym komórek nowotworowych aby następnie poddać je działaniu innego środka cytostatycznego np. promieniowania X (171).

Sprawa nieswoistych mechanizmów działania HU została przez nas celowo wyeksponowana. Ostatnie doniesienia zdają się wskazywać na szerszą i ważną rolę wolnych rodników w toksyczności leków przeciwnowotworowych typu antybiotyków działających przez wiązanie się z DNA. Przykładem niech będą chociażby wyniki badań nad cytotoksycznością adriamycyny (172, 173), mitomycyny C (174) i daunomycyny (175), oraz próby osłabienia ich toksyczności *in vitro* i *in vivo*.

Optymalne wykorzystanie HU w chemioterapii zależy w dużym stopniu od badań biochemicznych.

Zaakceptowano do druku 22.03.1982

Praca została napisana w ramach badań finansowanych z Programu Rządowego PR-6 (umowa Nr 2501)

PISMIENICTWO

1. Grady R. W., Graziano J. H., Akers H. A., Cerami A., (1976), *J. Pharmacol. Exptl. Therapy.*, **196**, 478—482.
2. Neilands I. B., (1967), *Science.*, **56**, 1443—1447.
3. Young C. W., Schoechtman G., Hodas S., Balis M. E., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 535—540.
4. Fishbein W. N., Carbone P. P., (1963), *Science.*, **142**, 1069—1070.
5. Chan J. T., Beck W. T., Khwaja T., Mayer K., Lien E. J., (1977), *J. Pharmaceut. Science.*, **66**, 1556—1561.
6. Parker G. R., (1978), *J. Pharmaceut. Science.*, **67**, 513—516.
7. Timson J., (1975), *Mutation Res.*, **32**, 115—132.
8. Adams R. L. P., Lindsay J. G., (1966), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1314—1317.
9. Neuhard J., (1967), *Biochem. Biophys. Acta.*, **145**, 1—6.
10. Krakoff I. H., Brown N. C., Reichard P., (1968), *Cancer Res.*, **28**, 1559—1565.
11. Bono V. H., Jr. Wells J. H., (1968), *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **9**, 7—10.
12. Elford H. L., (1968), *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **33**, 129—133.
13. Moore E. C., (1968), *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **9**, 51—54.
14. Moore E. C., (1969), *Cancer Res.*, **29**, 291—295.
15. Yeh Y. C., Tessman I., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1323—1324.
16. Yeh Y. C., Tessman I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3252—3254.
17. Berglund O., Sjöberg B. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 253—254.
18. Skoog L., Nordenskjöld B., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 81—89.
19. Theiss J. C., Fischer G. A., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 73—79.
20. Moore E. C., (1977), *Adv. Enzyme Regul.*, **15**, 101—120.
21. Thelander L., Reichard P., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 133—158.
22. Brown N. C., Eliasson R., Reichard P., Thelander L., (1968), *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **30**, 522—527.
23. Petersson L., Gräslund A., Ehrenberg A., Sjöberg B. M., Reichard P., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6706—6712.
24. Thelander L., Eriksson S., Äkerman M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7426—7432.
25. Mattaliano R. J., Sloan A. M., Plumer E. R., Klippenstein G. L., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 667—674.
26. Crichton R. R., Roman F., Roland F., (1980), *J. Inorg. Biochem.*, **13**, 305—316.
27. Feiner R. R., Rosenkranz H. S., (1972), *Israel J. Med. Sci.*, **8**, 562—564.
28. Silajewa S. A., Debow S. S., Czesnokowa N. B., (1972), *Waprosy Med. Chimii.*, **18**, 400—405.
29. Murphree S., Stublefield E., Moore E. C., (1969), *Exptl. Cell Res.*, **58**, 118—122.
30. Turner M. K., Abrams R., Lieberman G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3725—3731.
31. Skoog L., Bjursell G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6434—6438.
32. Tobey R. A., Gurley R. L., Hildebrand C. E., Kraemer P. M., Ratliff R. L., Walters R. A., (1975), w *Probs and Problems*, red. Richmond C. R., Peterson D. F., Hullaney P. F., Anderson E. C., pp. 152—167, Technical Information Center, New York.

33. Walters R. A., Tobey R. A., Ratliff R. L., (1973), *Biochem. Biophys. Acta.*, **319**, 336—347.
34. Adams R. L. P., Berryman S., Thomson A., (1971), *Biochem. Biophys. Acta.*, **240**, 455—462.
35. Scott F. W., Forsdyke D. R., (1980), *Biochem. J.*, **190**, 721—730.
36. Plageman P. G. W., Erbe J., (1974), *J. Cell Physiol.*, **83**, 321—336.
37. Reichard P., (1972), *Adv. Enzyme Regul.*, **10**, 3—16.
38. Frenkel P., Skinner W. N., Smiley J. D., (1964), *Cancer Chemotherapy Rep.*, No. 40, 19—22.
39. Ramseier H. P., Burkhalter M., Gautsch J. R., (1977), *Exptl. Cell Res.*, **105**, 445—453.
40. Walters R. A., Tobey R. A., Hildebrand C. E., (1976), *Biochem. Biophys. Acta.*, **447**, 36—44.
41. Manso-Martinez R., Avila J., (1978), *Mol. Cell Biochem.*, **20**, 183—189.
42. Ockey C. H., Allen T. D., (1975), *Exptl. Cell Res.*, **93**, 275—282.
43. Martin R. F., Radford I., Pardee., (1977), *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, **74**, 9—15.
44. Coyle M. B., Strauss B., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 2314—2319.
45. Wheatley D. N., (1974), *British J. Cancer.*, **30**, 173—178.
46. Soifer V. N., Tsieminis K. K., Turbin N. V., (1974), *Dokl. Akad. Nauk SSSR. Ser. Biol.*, **213**, 1449—1450.
47. Johnston L. H., (1980), *Current Genet.*, **2**, 175—180.
48. Winnacker E. L., (1975), *J. Virol.*, **15**, 74—78.
49. Magnusson G., (1973), *J. Virol.*, **12**, 600—608.
50. Laipis P. J., Levine A. J., (1973), *Virology*, **56**, 580—594.
51. Magnusson G., Pigiet V., Winnacker E. L., Abrams R., Reichard P., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 412—415.
52. Vesco C., Penman S., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 249—257.
53. Matakcia P., Roberti S., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 882—893.
54. Robes H. M., Iseler G., Tuczec H. W., Kerler R., (1974), *Experientia*, **30**, 1116—1117.
55. Bagnat-Mahieu L., Goutier R., Baes C., (1971), *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 141—149.
56. Filho S. A., Pereira de Almeida E. R., Gander E. S., (1978), *Acta Tropica.*, **35**, 229—237.
57. Knight S. A., (1976), *J. Parasitol.*, **62**, 515—522.
58. Dujardin G., Robert B., Clavilier L., (1978), *Molec. Gen. Genet.*, **160**, 101—110.
59. Petes T. D., Fangman W. L., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 603—609.
60. Fouquet H., Böhme R., Wick R., Sauer H. W., (1975), *J. Cell Sci.*, **18**, 27—39.
61. Cleaver J. E., (1968), *Biophys. J.*, **8**, 775—791.
62. Cleaver J. E., (1969), *Radiation Res.*, **37**, 334—348.
63. Cleaver J. E., Thomas G. H., Trasko J. E., Lett J. T., (1972), *Exptl. Cell Res.*, **74**, 67—80.
64. Cleaver J. E., (1970), *Photochem. Photobiol.*, **12**, 17—28.
65. Smith C. A., Hanawalt P. C., (1976), *Biochem. Biophys. Acta.*, **432**, 336—347.
66. Lampidis T. J., Little J. B., (1977), *Exptl. Cell Res.*, **110**, 41—46.

67. Clarkson J. M., (1978), *Mutation Res.*, **52**, 273—284.
68. Trosko I. E., Yager I. D., (1974), *Exptl. Cell Res.*, **88**, 47—55.
69. Ben-Hur E., Ben-Ishai R., (1971), *Photochem. Photobiol.*, **13**, 337—345.
70. Cleaver J. E., (1981), *Mutation Res.*, **82**, 159—171.
71. Collins A. R. S., Schor S. L., Johnson R. T., (1977), *Mutation Res.*, **42**, 413—432.
72. Schor S. L., Johnson R. T., Waldren C. A., (1975), *J. Cell Sci.*, **17**, 539—565.
73. Johnson R. T., Collins A. R. S., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 361—369.
74. Collins A. R. S., (1977), *Biochem. Biophys. Acta.*, **478**, 461—473.
75. Burg K., Collins A. R. S., Johnson R. T., (1977), *J. Cell Sci.*, **28**, 29—48.
76. Erixon K., Ahnström G., (1979), *Mutation Res.*, **59**, 257—271.
77. Hansson K., Hartley-Asp B., (1981), *Hereditas.*, **94**, 21—27.
78. Walker I. G., Yatscoff R. W., Sridhar R., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 403—407.
79. Young C. V., Hodas S., (1964), *Science.*, **146**, 1172—1174.
80. Riccieri G., Dusco D., (1970), *Italian J. Biochem.*, **19**, 1—16.
81. Kim I. H., Gelbard A. S., Perez A. G., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 1301—1306.
82. Pfeifer S. E., Tolmach L. J., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 124—129.
83. Sobel J. S., (1975), *Chem. Biol. Interact.*, **11**, 33—39.
84. Rosenkranz H. S., Garro A. J., Levy I. A., Carr H. S., (1966), *Biochem. Biophys. Acta.*, **114**, 501—515.
85. Malec J., Kornacka L., Wojnarowska M., Mościcka M., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 103—107.
86. Kwiatkowska J., Kopeć J., Gołos B., Przybyszewski W. M., Sitarzka E., Malec J., (1981), *Streszczenia-XVIII Zjazd Pol. Tow. Biochem. Wrocław*, str. 232.
87. Craig N., (1973), *J. Cell Physiol.*, **82**, 133—150.
88. Cress A. E., Gerner E. W., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 773—780.
89. Hawtrey A. O., Scott-Burden T., Robertson G., (1974), *Nature*, **252**, 58—60.
90. Przybyszewski W. M., Grabarczyk M., Czartoryska B., Sitarzka E., Malec J., (1981), *Streszczenia-XVIII Zjazd Pol. Tow. Biochem. Wrocław*, str. 233.
91. Korfsmeier K. H., (1974), *Histochem.*, **38**, 203—211.
92. Sinclair W. K., (1965), *Science.*, **150**, 1729—1731.
93. Ford S. S., Shackney S. E., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 2628—2634.
94. Sinclair W. K., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 297—308.
95. Mironescu S., Ellem K. A. O., (1977), *J. Cell. Physiol.*, **90**, 281—294.
96. Tobey R. A., Crissman H. A., (1972), *Exptl. Cell Res.*, **75**, 460—464.
97. Bhuyan B. K., Fraser T. J., Gray L. S., Kuentzel S. L., Neil G. L., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 888—892.
98. Morau R. E., Strauss M. J., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 1616—1622.
99. Vogel V., Schempp W., Sigwarth I., (1978), *Human Genet.*, **45**, 193—198.
100. Demski V. I., (1976), *Biull. Exp. Biol. Med.*, **81**, 760—762.
101. Carnevali F., Maritti L. D., (1977), *Chromosoma.*, **63**, 33—37.

102. Wheeler G. P., Bowden B. J., Adamson D. J., Vail M. H., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 2661—2664.
103. Navarrete H. M., Perez-Villamil B., Lopez-Saez J. F., (1979), *Exptl. Cell Res.*, **124**, 151—157.
104. Schneiderman M. H., Kimler B. F., Leeper D. B., Dewey W. C., (1978), *Exptl. Cell Res.*, **115**, 465—467.
105. Clain E., Brulfert A., (1980), *Planta.*, **150**, 26—31.
106. Robes H. M., Iseler G., Czichos S., Tuzcek H. V., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 1105—1111.
107. Cres A. E., Gerner E. W., (1977), *Exptl. Cell Res.*, **110**, 347—353.
108. Worthington D. H., Nachtwey D. S., Wagenaar E. B., (1975), *Exptl. Cell Res.*, **92**, 435—443.
109. Nagl W., (1973), *Cytobiol.*, **8**, 140—145.
110. Herken R., Merker H. J., Krowke R., (1978), *Teratology.*, **18**, 103—118.
111. Gale G. R., Kendall S. M., McLain H. H., Dubois S., (1964), *Cancer Res.*, **24**, 1012—1018.
112. Gołos B., Malec J., (1982), w przygotowaniu.
113. Stevenson A. F. G., Cremer T., Messerschmidt O., (1977), *Strahlenschutz in Forschung und Praxis*, ed. Messerschmidt O., Möhrle G., Zimmer R., Holeczke F., Kainberger F., Kärcher K. H., Mader H., Seyss R., 18, str. 20. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
114. Cremer T., Turner A., Liaw L., Berus M. W., (1981), *Exptl. Cell Res.*, **134**, 49—63.
115. Nakanishi K., Fujita S., (1977), *Cell Struct. Funct.*, **2**, 261—270.
116. Chiu S. M., Hastings P. J., (1973), *Genetics.*, **73**, 29—43.
117. Carmi P., Radauskoski M., Stamberg J., Koltin Y., (1977), *Molec. Gen. Genet.*, **158**, 17—21.
118. Simchen G., Idar D., Kassir Y., (1976), *Molec. Gen. Genet.*, **144**, 21—27.
119. Carmi P., Koltin Y., Stamberg J., (1978), *Genet. Res. (Cambridge)*, **31**, 215—226.
120. Hotta Y., Stern H., (1971), *J. Molec. Biol.*, **55**, 337—339.
121. Zimmerman F. K., (1971), *Mutat. Res.*, **11**, 327—337.
122. Adams M., Warr J. R., (1976), *Mutat. Res.*, **41**, 217—224.
123. Amortegni A. J., Feinberge S. S., Figallo E. M., (1976), *Biol. Neonate.*, **29**, 216—221.
124. Theisen C. T., (1979), *Develop. Biol.*, **69**, 612—626.
125. Adlard B. P. F., Dobbing J., (1975), *Pediatric. Res.*, **9**, 139—142.
126. Wilson J. G., Scott W. J., Ritter E. J., Fradkin R., (1975), *Teratology.*, **11**, 169—178.
127. DeSesso J. M., Jordan R. L., (1977), *Teratology.*, **15**, 199—211.
128. Chaube S., Murphy M. L., (1973), *Teratology.*, **7**, 79—88.
129. Scott W. J., Ritter E. J., Wilson J. G., (1971), *Develop. Biol.*, **26**, 306—315.
130. Miller S. A., Runner M. N., (1975), *Develop. Biol.*, **45**, 74—80.
131. Murphy M. L., Chaube S., (1964), *Cancer Chemother. Rep.*, **40**, 1—7.
132. Chaube S., Murphy M. L., (1966), *Cancer Res.*, **26**, 1448—1457.
133. Butcher R. E., Scott W. J., Kazmaier K., Ritter E. J., (1973), *Teratology.*, **7**, 161—165.
134. Mecklenburg R. S., Hetzel W. D., Gulyas B. J., Lipsett M. B., (1975), *Endocrinology.*, **96**, 564—570.

135. Fritz H., Hess R., (1980), *Agents and Action.*, 10/4, Birkhäuser Verlag, Basel.
136. Brunner R. L., McLean M., Vorhees C. V., Butcher R. E., (1978), *Teratology*, **18**, 379—384.
137. Herken R., (1980), *Teratology*, **21**, 9—14.
138. Wilson I. G., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 104—109.
139. Adamson R. H., Ague S. L., Hess S. M., Davidson J. D., (1965) *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, **150**, 322—334.
140. Calvin M., Born V. H., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 1516—1519.
141. Parris D. S., Bates R. C., Stout E. R., (1975), *Exptl. Cell Res.*, **96**, 422—425.
142. Plager J., (1975), *Cell Tissue Kinet.*, **8**, 517—528.
143. Strauss M. J., Morau R. E., (1978), *Cell Tissue Kinet.*, **11**, 529—542.
144. Ross D. W., (1981), *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, **37**, 225—235.
145. Ross D. W., (1976), *Cell Tissue Kinet.*, **9**, 379—387.
146. Rosenkranz H. S., Jacobs S. J., Carr H., (1968), *Biochem. Biophys. Acta.*, **161**, 428—441.
147. Rajewsky M. F., (1970), *Exptl. Cell Res.*, **60**, 269—270.
148. DeSesso J. M., (1981), *Teratology*, **23**, 197—215.
149. Milicovsky S., DeSesso J. M., (1980), *Teratology*, **22**, 115—124.
150. DeSesso J. M., (1979), *Medical Hypotheses.*, **5**, 937—951.
151. Jacobs S. J., Rosenkranz H. S., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 1084—1094.
152. Freese E. B., Gerson I., Taber H., Rhaese H. J., Freese E., (1967), *Mutation Res.*, **4**, 517—531.
153. Freese E., Sklarow S., Freese E. B., (1968), *Mutation Res.*, **5**, 343—348.
154. Freese E., Freese E. B., Graham S., (1966), *Biochem. Biophys. Acta.*, **123**, 17—25.
155. Freese E., Freese E. B., (1965), *Biochemistry.*, **4**, 2419—2433.
156. Yarbrow I. W., (1968), *Cancer Res.*, **28**, 1082—1087.
157. Lewis W. H., Wright J. A., (1978), *J. Cell Physiol.*, **97**, 73—86.
158. Mahler W. C., (1964), *Cancer Chemother. Rep.*, **34**, 1—6.
159. Pollack R. D., Rosenkranz H. S., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 1214—1224.
160. DeSesso J. M., (1981), *Teratology*, **24**, 19—35.
161. Przybyszewski W. M., Malec J., (1982), w przygotowaniu.
162. Andrae U., Greim H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 50—58.
163. Lewis W. H., Wright J. A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 926—933.
164. Lewis W. H., Wright J. A., (1978), *J. Cell Physiol.*, **97**, 87—98.
165. Lewis W. H., Wright J. A., (1979), *Somatic Cell Genet.*, **5**, 83—96.
166. Heinonen J., Joronen I., Tuokko H., (1976), *Chem. Biol. Interact.*, **12**, 91—98.
167. Allen G. P., Cohen J. C., Randall C. C., O'Callaghan D. J., (1978), *Intervirology.*, **9**, 276—285.
168. Mele J., Glaser R., Nonoyama M., Zimmerman J., Rapp F., (1974), *Virology.*, **62**, 102—111.
169. Streifel J. A., Howell S. B., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 5132—5144.
170. Ritch P. S., Occhipini S. J., Cuninghame R. E., Shackney S. E., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 3881—3890.

171. Sinclair W. K., (1981), *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, **7**, 631—637.
172. Myers C. A., McGuire W. P., Liss R. W., Ifrim J. J., Grotzinger K., Young R. C., (1977), *Science.*, **197**, 165—167.
173. Svingen B. A., Povis G., Appel P. L., Scott M., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 3395—3399.
174. Doroshov J. W., (1981), *J. Pharmacol. and Exptl. Therapy.*, **218**, 206—211.
175. Bozzi A., Mavelli I., Mondovi B., Strom R., Rotilio G., (1981), *Biochem. J.*, **194**, 369—372.

Po złożeniu maszynopisu do druku, ukazała się praca w której autorzy postulują, że cytotoksyczność HU wynika z zahamowania syntezy DNA, które wywołuje szereg następujących po sobie procesów: a) częściowe zahamowanie reperacyjnej syntezy DNA w obecności wysokiego stężenia leku, którego następstwem jest wzrost liczby pęknięć pojedynczego pasma DNA (ang. *gaps*) i następcze gromadzenie się krótkich fragmentów pojedynczych pasm DNA, b) wzrost ilości pęknięć obu pasm DNA wskutek działania nukleaz, c) niepełna reperacja pęknięć dwupasmowego DNA objawiająca się jako pęknięcie chromatyd, d) uszkodzenie chromosomów, które powoduje ostatecznie śmierć komórki.

(Radford I. R., Martin R. F., Finch L. R., Hodgson G. S., (1982) *Biochim. Biophys. Acta.*, **696**, 154—162.)

RECENZJE

Freeze-etching — Methods and Application in Membrane Research

ed.: H. W. Meyer, XXIII Supplement czasopisma Acta Histochemica, 1981, 294 strony.

Recenzowany tom zawiera materiały z międzynarodowego sympozjum, które odbyło się w lipcu 1979 roku, w zamku Kapellendorf, w NRD. Poświęcone było ono w całości problemom metodycznym związanym ze stosowaniem techniki mrożenia i rytowania ("freeze-etching") materiału biologicznego oraz osiągnięciom, jakie zastosowanie tej techniki przyniosło w dziedzinie badań nad błonami biologicznymi. Takie ustawienie obrad sprawiło, że materiały sympozjalne składają się na rodzaj monografii pozwalającej czytelnikowi na ogólne zorientowanie się w metodzie, jak również wprowadzającej go w najbardziej fascynujące zagadnienia dotyczące najnowszych koncepcji struktury funkcjonalnej błon. Autorami tej monografii jest liczne, międzynarodowe grono specjalistów wysokiej klasy wśród których jest wielu pionierów tego typu badań.

Wiadomo, że przy stosowaniu techniki mrożenia-rytowania ostatecznym przedmiotem badań jest oglądana w mikroskopie elektronowym delikatna replika powierzchni błony, przy czym mogą to być repliki jej dwóch powierzchni zewnętrznych: od strony środowiska zewnątrzkomórkowego i od strony cytoplazmy, oraz — co najistotniejsze — dwie komplementarne repliki dwóch komplementarnych powierzchni przełupu zamrożonej błony. Już samo przygotowanie replik nastęrcza biologowi szereg trudności, dla pokonania których — oprócz zwykłych zdolności manipulacyjnych niezbędna jest ogólna wiedza na temat metod kriogennych i umiejętność posługiwania się aparaturą pracującą w warunkach wysokiej próżni. Konieczna tu jest właściwa kontrola całego procesu, czyli umiejętność panowania nad różnego rodzaju artefaktami, które w warunkach wymaganej obróbki materiału mogą występować. Artefakty pojawiać się mogą w wyniku zachodzenia takich zjawisk, jak kontaminacja powierzchni przełupu kryształkami lodu pojawiającymi się w wyniku osadzania się pary wodnej, deformacje plastyczne wywołane zmianami termicznymi, rozciąganie się i kurczenie materiału, przesunięcia i zapadanie się niektórych jego obszarów. Problemy te rozpatrywali w trakcie omawianego Sympozjum głównie fizycy współpracujący z biologami.

Metoda mrożenia-rytowania, jak wiadomo, dała badaczom możliwość przyjrzenia się po raz pierwszy obrazowi wnętrza błony biologicznej. Interpretacja tego obrazu dostarcza jednakże badaczowi następnej serii trudności, z których musi on zdawać sobie sprawę. Przyjmuje się powszechnie, że przełupanie wnętrza błony zachodzi wzdłuż linii rozgraniczającej reszty hydrofobowe dwuwarstwy lipidowej. W replikach przełupu lipidy stanowią raczej homogenne tło, natomiast wyróżniają się wyraźnie struktury globularne, które miałyby odpowiadać białkom, zależnie od usytuowania w błonie związanym trwale z jedną, lub drugą powierzchnią przełupu. Otóż ostatnio wysunięto przypuszczenie, poparte wynikami ciekawych prac doświadczalnych, prezentowanych również na omawianym Sympozjum, według którego obrazy struktur globularnych widoczne na replikach wnętrza rozłupanej błony odpowiadają nie tylko białkom, lecz również „odwróconym” micelom lipidowym, lub lipopolisacharydowym, tworzącym się we wnętrzu błony w obecności

jonów wapnia. Kryterium morfologicznym pozwalającym na rozróżnienie tak powstałych struktur lipidowych od wewnątrzblonowych białek ma być brak (dla białek), lub obecność (dla lipidów) odpowiadających im zagłębień w replice komplementarnej powierzchni przelupu tejsze błony. Opanowanie tej drugiej serii trudności związanej z interpretacją wyników pozwoliło badaczom posługującym się tą techniką na wysunięcie ciekawych wniosków dotyczących struktury funkcjonalnej błon biologicznych. I tak w referatach sympozjalnych, poza wspomnianymi już problemami, poruszano problem asymetrii w rozmieszczeniu struktur globularnych w błonie, przedstawiono dane morfologiczne świadczące o redystrybucji cząstek globularnych między dwiema komplementarnymi warstwami błony erytrocytów oraz o możliwości zachodzenia w błonie (na przykładzie błony pęczniących tonoplastów drożdży) ruchów cząstek białek zarówno w kierunku poziomym, jak i pionowym; przedstawiono także obrazy termotropowych zmian w strukturze błony prowadzących do rozdzielenia regionów lipidowych od białkowych, wydzielenie wśród lipidów „domen” tworzonych przez cząsteczki lipidów różniące się od pozostałych ich aktualną fazą, przedstawiono obrazy zmian w strukturze błony plazmatycznej towarzyszących fuzji organelli komórkowych a także całych komórek, wywołanej obecnością jonów wapnia. Już z tego pobieżnego i niepełnego przeglądu czytelnik może się zorientować, że istotnie recenzowany tom zasługuje na miano monografii prezentującej możliwości techniczne metody mrożenia-rytowania oraz najważniejsze osiągnięcia jakie zastosowanie tej metody przyniosły naszej znajomości struktury funkcjonalnej błon biologicznych. Autorami tej „monografii” jest grupa kilkunastu prelegentów Sympozjum — badaczy z różnych stron Europy. Należy również podkreślić wysoki poziom edytorski i techniczny recenzowanego tomu.

Chciałabym jeszcze zaznaczyć, że książka ta ma dla nas jeszcze jedną wartość. Technika mrożenia-rytowania jest u nas rozpowszechniona w minimalnym stopniu, znamy ją niemal wyłącznie z literatury. W kraju, o ile się orientuję, są jedynie dwa ośrodki, które dysponują odpowiednią aparaturą i którym udało się wyjść poza etap trudności piętrzących się przy jej uruchomieniu i rozpocząć autentyczne badania naukowe. Otóż omawiany tom pozwala na zorientowanie się gdzie i do rozwiązywania jakich zagadnień jest ona stosowana. Nie bez znaczenia jest fakt, zwłaszcza w naszej obecnej sytuacji ekonomicznej, że wiele reprezentowanych na omawianym Sympozjum Pracowni znajduje się blisko nas, w krajach sąsiadujących z nami, zatem możliwość korzystania ze współpracy z nimi przy rozwiązywaniu konkretnych zagadnień nie powinna nastęrczać większych trudności.

A. Przetęcka

“Cellular Immunology — Selected Readings and Critical Commentary” compiled by Vicky L. Sato i Malcolm L. Gefter.

Addison-Wesley Publishing Company. Advanced Book Program — World Science Division. Reading, Massachusetts. London—Amsterdam—Don Mills, Ontario—Sydney—Tokyo. 1981, stron 647.

Tytuł książki można z pewną swobodą, przełożyć jako „Wybrane lektury z immunologii komórkowej”. Trud wyboru lektur i napisania komentarza podjęli po latach wykładów i seminariów z immunologii komórkowej Vicky Sato z Harvard University i Malcom Gefter z Massachusetts Institute of Technology. Obaj w pewnym momencie swej naukowej działalności porzucili dotychczasowe zainteresowania, by swe wysiłki, talenty i zapał skoncentrować na problemach immunologii ko-

mórkowej i wprowadzać innych w tę — jak piszą we wstępie — ekscytującą dziedzinę współczesnej biologii. Wielką trudność, zdawało się barierą nie do przezwyciężenia, stanowił szczególnie język immunologii, różny od języka stosowanego w genetyce molekularnej czy bioenergetyce. W drodze wspólnych seminariów z immunologami Sato i Gefter skompletowali zbiór prac i artykułów pomocnych w nauczaniu immunologii komórkowej. Część z nich włączyli do „Wybranych lektur”. Intencją obu był taki dobór prac, aby wprowadzały czytelnika stopniowo w podstawowe zagadnienia immunologii komórkowej, wskazując specyfikę eksperymentowania i rozwój przewodnich idei. Liczbę prac limitowała jednak objętość książki a ich dobór — ograniczona dostępność prac oryginalnych ze względu na konieczność uzyskania zgody na przedruk.

Książka składa się z 10 rozdziałów. Każdy rozpoczyna krytyczny wstęp wprowadzający w zagadnienie i rekomendujący wybrane jako lektury prace doświadczalne. Kolejne rozdziały omawiają następujące zagadnienia:

Rozdział I — Wczesne badania kooperacji komórek w odpowiedzi immunologicznej; Rozdział II — Komórki B; Rozdział III — Funkcjonalne zróżnicowanie limfocytów T; Rozdział IV — Komórki T jak supresory syntezy przeciwciał; Rozdział V — Tolerancja; Rozdział VI — Makrofagi i kwestia prezentowania antygenów; Rozdział VII — Rozpoznawanie antygenów przez komórki T; Rozdział VIII — Nadawanie kompetencji przez limfocyty; Rozdział IX — Regulacja syntezy przeciwciał: „Network theory” Jernego; Rozdział X — Biologia molekularna układu odpornościowego.

Sato i Gefter dedykują „Wybrane lektury z immunologii komórkowej” studentom immunologii i naukowcom innych specjalności. Szczególnie pożyteczna będzie to lektura dla młodych adeptów różnych dziedzin biologii komórkowej.

Z. Zielińska

Pathobiochemie der Leber.

R. J. Haschen

VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981, stron 167, cena 21,9 M.

Biochemia kliniczna, dyscyplina naukowa młoda, uzyskała duże wiano i od biochemii i od medycyny wewnętrznej, jednakże teren jej zainteresowań ciągle jeszcze jest w trakcie definiowania. Każda więc publikacja, która zakreśla ten teren i porządkuje jest wyczekiwana przez biochemików klinicznych a także przez analityków w zakresie diagnostyki laboratoryjnej. Omawiana książka, której tytuł w języku polskim brzmieć zapewne powinien „Biochemia kliniczna wątroby” należy do takich właśnie publikacji. Nie jest to duże dzieło, wszystkiego razem ok. 150 stron a więc rzeczywiście skromnie jak na problemy wątroby. Autor wykazał dużą dyscyplinę ograniczając niezbędne wprowadzenie z biochemii fizjologicznej, jak i dygresje związane z kliniką wątroby. Znakomita większość książki poświęcona jest biochemicznemu aspektowi procesów patologicznych oraz możliwościom wykorzystania tej wiedzy w diagnostyce biochemicznej. Biochemik kliniczny może wyprowadzić odczuć niedosyt konkretnych wyrażonych językiem biochemicznym, ale zapewne autorowi zależało bardzo na nie odstraszeniu od książki również lekarzy klinicystów.

Omawiając treść książki należy podkreślić więc bardzo skrótowe wprowadzenie w biochemię wątroby, ograniczone w zasadzie do przypomnienia schematów, syn-

tez cukrowców, lipidów i białek. Doprowadzało to czasami do nadmiernych uproszczeń jak np. zatarcie różnicy między metabolizmem chylomikronów i VLDL, względnie do pominięcia, jak np. wpływu stopnia ukrwienia narządu, będącego źródłem enzymu ekskrecyjnego, na jego aktywność we krwi. Skrótowno opisane są też przyczyny uszkodzenia wątroby: choroby inwazyjne, hipoksja, intoksykacja, cholestazy, nie-dobory substratów.

Rozdział piąty poświęcony jest biotransformacji (u nas stosuje się raczej termin detoksykacja) a więc unieczynnianiu szkodliwych apolarnych związków endo- i egzogennych usuwanych drogą żółci. Omówione są etapy utleniania z udziałem cytochromu P₄₅₀, redukcji i reakcji zwiększających polarność tzn. wiązania z kwasem glukuronowym siarkowym itd. Interesujące jest zestawienie testów oceny funkcji detoksykacyjnej wątroby.

Rozdział o schorzeniach układu krążenia jelitowo-wątrobowego kwasów żółciowych, poza przypomnieniem podstawowych funkcji fizjologicznych, przedstawia mechanizmy cholestazy wewnątrz- i zewnątrzwątrobowej. Podkreślona jest przydatność oznaczania kwasów żółciowych we krwi dla oceny schorzeń dróg żółciowych wewnątrzwątrobowych z zaznaczeniem, że ich stężenie jest jednak sumą ekstrakcji kwasów z krwi i wchłaniania z przewodu pokarmowego. Omówione zostało też zachowanie się enzymów błon w cholestazie. Wzrost aktywności tych enzymów we krwi może wynikać z indukcji (np. fosfataza alkaliczna) albo z solubilizacji przez kwasy żółciowe.

Szerzej omówiono również kamice żółciową i warunki przesycenia żółci a właściwie miceli żółci cholesterolu. Wydaje się, że autor za mało dobitnie podkreśla różnicę między stężeniem bezwzględnym cholesterolu w żółci a jego zawartością względną w micelach wyrażoną wskaźnikiem litogenności.

W rozdziale o polekowych uszkodzeniach wątroby omówiono kilka grup leków stwarzających największe zagrożenie. Podkreślone są trudności diagnozowania tych uszkodzeń, które w większości wypadków nie powodują ciężkich, ostrych objawów.

Książkę zamyka rozdział o podstawach racjonalnej biochemicznej diagnostyki schorzeń wątroby i dróg żółciowych. Przedstawia on możliwości obiektywizacji wyników testów biochemicznych za pomocą statystyki wielowariantowej. Testom biochemicznym przyporządkowane są, wyrażone liczbowo, oceny ich czułości i specyficzności. Kolejno omówione są: — diagnostyka podstawowa stwierdzająca chorobę,

— analiza korelacji parametrów różnicujących uszkodzenie mięszu, cholestazę, upośledzenie zdolności syntezy, reakcje układu siateczkowo-śródbłonkowego,

— dyskryminacyjna analiza wielowariantowa z podziałem na 17 i 5 klas schorzeń,

— różnicowanie hepatopatii chronicznych i cholestaz. Wykorzystano w tych wariantach diagnozowania kilkanaście aktywności enzymatycznych a także stężenia bilirubiny, cholesterolu, albumin, IgM, IgG, IgA i in. Autor podkreśla znaczenie wielowariantowej analizy dyskryminacyjnej z jednej strony jako pomocy w diagnozowaniu, a z drugiej strony jako narzędzia do oceny wartości testów biochemicznych. Jak wiadomo testów tych jest dużo: część ma już jednak tylko znaczenie historyczne a na wiele klinika nadal czeka.

W tekście nie ma odnośników literaturowych; jedynie na końcu rozdziałów autor podaje przegląd zalecanej literatury. Nie jest to najwygodniejsze dla zainteresowanych określonym problemem i szukających w tego rodzaju monografiach dokładnych odsyłaczy źródłowych.

T. Badzio

Bioenergetics — An Introduction to the Chemiosmotic Theory

David G. Nicholls.

Academic Press, London—New York, 1982, 190 stron, cena 5,50 funtów bryt.

W 1978 r. Peter Mitchell otrzymał nagrodę Nobla za swą koncepcję oksydacyjnej fosforylacji (patrz *Postępy Biochemii*, 25, 247—250; 1979). Wzmogło to zainteresowanie teorią „chemiosmotyczną” także poza kręgiem specjalistów. Oryginalne prace Mitchella czyta się trudno i dlatego nawet wśród ludzi pracujących w zakresie oksydacyjnej fosforylacji odczuwa się pilną potrzebę bardziej przystępnego opracowania. Na zapotrzebowanie to odpowiada omawiana książka D. G. Nicholla. Jest to niezwykle cenne wprowadzenie w zagadnienia bioenergetyki, a teorii chemiosmotycznej w szczególności. Autor jest młodym, bardzo utalentowanym badaczem. Ma zarazem nieprzeciętne zdolności wykładowcy. Dzięki temu trudne nawet problemy omawiane są w książce językiem prostym, przystępnym i zrozumiałym, ale zarazem w sposób nie trywializujący zagadnienia. Zarówno to jak i urocze rysunki A. B. Tulpa, znanego ilustratora *Trends in Biochemical Sciences*, sprawiają, że książkę czyta się z prawdziwą przyjemnością.

L. Wojtczak

Mitochondrialer Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung

Rolf Dargel

VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1981, 210 stron, 34,70 marek NRD.

Minęło 50 lat od czasu, gdy Władimir A. Engelhardt pierwszy zwrócił uwagę na udział nieorganicznego fosforanu w procesach oddychania komórkowego, pracy uważanej obecnie za początek studiów nad oksydacyjną fosforylacją. Historia badań nad utlenianiem komórkowym jest dłuższa, a nowoczesne jej podstawy stworzyły prace Ottona Warburga i Heinricha Wielanda na przełomie pierwszego i drugiego dziesięciolecia XX wieku. Obecna nasza wiedza na temat biologicznych procesów oksydoredukcyjnych i sprzężonej z nimi syntezy ATP stała się już odrębną, obszerną gałęzią biochemii. Mimo ogromnej ilości ukazujących się stale z tego zakresu prac doświadczalnych i dość licznych w literaturze światowej artykułów przeglądowych mało jest jak dotąd dobrych opracowań podręcznikowych. Należy do nich omawiana książka Rolfa Dargela, profesora biochemii na Uniwersytecie Fryderyka Schillera w Jenie.

Jest to opracowanie bardzo systematyczne i w miarę wyczerpujące, o ile tę obszerną wiedzę można zamknąć na 200 stronicach tekstu. Na wstępie omawia Autor strukturę mitochondriów i ich błon. Przechodzi następnie do opisu mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Szczegółowo charakteryzuje przy tym poszczególne nośniki transportu elektronów jak również złożone kompleksy, jakie w łańcuchu oddechowym daje się wyodrębnić. W dalszym ciągu omawia oksydacyjną fosforylację: fakty doświadczalne i koncepcje teoretyczne sprzężenia energetycznego. Obrabzu dopełnia opis struktury i właściwości funkcjonalnych mitochondrialnej ATP-azy, kompleksu enzymatycznego odpowiedzialnego za syntezę ATP w „sprzężonych” mitochondriach.

Istotnym elementem czynności mitochondriów jest transport metabolitów przez błony mitochondrialne. Temu zagadnieniu, w którym zresztą Autor sam pracuje,

poświęcony jest odrębny rozdział. Książkę kończy rozdział o regulacji metabolizmu mitochondriów.

W sumie jest to cenny traktat o funkcji mitochondriów. Opracowywanie dzieła zakończył Autor w 1979 r. i do tego czasu uwzględniona jest literatura przedmiotu. Należy żałować, że książka ukazała się drukiem dopiero w 1981 r.

L. Wojtczak

SPIS TREŚCI

A. Paszewski — Immunoglobuliny — zmiany genetyczne związane z ich powstawaniem i różnicowaniem	175
M. J. Nałęcz, L. Wojtczak — Ładunek powierzchniowy błon biologicznych i jego funkcje regulacyjne	191
P. Krysiński — Zastosowanie impulsowych technik pomiarowych w badaniach sztucznych błon lipidowych	227
E. Herzyk — fosforylacja białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich	251
E. I. Wałajtys-Rode — Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach zwierzęcych	279
E. Bańkowski — Polimorfizm molekularny kolagenu kręgowców	301
E. Włoch, St. Więckowski — Karotenoidy aparatu fotosyntetycznego	331
W. M. Przybyszewski, J. Malec — Molekularne i komórkowe efekty działania hydroksymocznika	353
Recenzje książek:	
Freeze-etching — Methods and Application in Membrane Research	373
Cellular Immunology — Selected Readings and Critical Commentary	374
Pathobiochemie der Leber	375
Bioenergetics — An Introduction to the Chemiosmotic Theory	377
Mitochondrialer Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung	377

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1982

ARTICLES IN POLISH

Volume 28

Number 3

A. Paszewski — Immunoglobulins — Genetic Rearrangements Involved in their Formation and Differentiation (Institute of Biochemistry and Biophysics, Pol. Acad. Sci., Warszawa)	175
M. J. Nałęcz, L. Wojtczak — Surface Charge of Biological Membranes and its Regulatory Functions (Nencki Institute of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warszawa)	191
P. Krysiński — Applications of Pulse Techniques in the Investigations of Artificial Lipid Membranes (Dept. of Chemistry, Warsaw University, Warszawa)	227
E. Herzyk — Phosphorylation of the Human Erythrocyte Membrane Proteins (Dept. of Chemistry, Warsaw University, Warszawa)	251
E. I. Wałajtys-Rode — Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Complex in Animal Tissues (Nencki Institute of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warszawa)	279
E. Bańkowski — Molecular Polymorphism of Vertebrate Collagen (Dept. of Biochemistry, Med. Acad., Białystok)	301
E. Włoch, St. Więckowski — The Carotenoids of the Photosynthetic Apparatus (Inst. Mol. Biol., Jagiellonian University, Kraków)	331
W. M. Przybyszewski, J. Malec — Molecular and Cellular Effects of Hydroxyurea (Inst. of Hematology, Warszawa)	353
Book Reviews	373

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

Piśmiennictwo: w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej 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.:

Pipa 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) nazwisko pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

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

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż ninie 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 „górze” 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 zatem uzyskać zgodę na przedruk lub wykorzystanie danych i przedłożyć ją Redakcji. W razie modyfikowania rycin zaczerpniętych z opublikowanych prac należy także przedłożyć Redakcji do wglądu kopie oryginalnych ilustracji.

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

SPIS TREŚCI

A. Paszewski — Immunoglobuliny — zmiany genetyczne związane z ich powstawaniem i różnicowaniem	175
M. J. Nałęcz, L. Wojtczak — Ładunek powierzchniowy błon biologicznych i jego funkcje regulacyjne	191
P. Krysiński — Zastosowanie impulsowych technik pomiarowych w badaniach sztucznych błon lipidowych	227
E. Herzyk — fosforylacja białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich	251
E. I. Wałajtys-Rode — Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach zwierzęcych	279
E. Bańkowski — Polimorfizm molekularny kolagenu kręgowców	301
E. Włoch, St. Więckowski — Karotenoidy aparatu fotosyntetycznego	331
W. M. Przybyszewski, J. Malec — Molekularne i komórkowe efekty działania hydroksymocznika	353
Recenzje książek:	
Freeze-etching — Methods and Application in Membrane Research	373
Cellular Immunology — Selected Readings and Critical Commentary	374
Pathobiochemie der Leber	375
Bioenergetics — An Introduction to the Chemiosmotic Theory	377
Mitochondrialer Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung	377