

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 29 (1)
(1-96) (1983)

1983

tom 29 nr 1
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 okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autóra(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy chcą 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 następane obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 29 ZESZYT 1
1983

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 29 (1)
(1-96) (1983)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: 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 1780

Ark. wyd. 6,5; ark. druk. 6,0

Pap. d. b. mat. kl. III 90 g. 70×100

Zam. 3242/12/82

Oddano do składania 3.XII.1982 r.

Podpisano do druku w kwietniu 1983 r.

Druk ukończono w czerwcu 1983 r.

Cena zł 90,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

JERZY DUSZYŃSKI *)

Regulacja funkcjonowania szlaku metabolicznego

Control of Flux through the Metabolic Pathway

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Szlak metaboliczny w równowadze dynamicznej
- III. Enzym jako czynnik regulujący przepływ w szlaku
 - III-1. Enzymy regulatorowe
 - III-2. Reakcje bliskie i dalekie równowagi termodynamicznej
 - III-3. Siła kontrolowania enzymu
- IV. Zmiana stężenia metabolitu jako bezpośredni czynnik regulujący przepływ przez szlak metaboliczny
 - IV-1. Siła kontrolowania metabolitu
 - IV-2. „Elastyczność”
- V. Mechanizmy zmian przepływu przez szlak w równowadze dynamicznej.

Contents

- I. Introduction
- II. Metabolic pathway in steady state
- III. Enzyme as a regulatory factor
 - III-1. Regulatory enzymes
 - III-2. Nonequilibrium and equilibrium reactions
 - III-2. Enzyme control strength
- IV. Change in the metabolite concentration as a regulatory factor
 - IV-1. Metabolite control strength
 - IV-2. Elasticity
- V. Mechanism of change in the flux through metabolic pathway.

I. Wstęp

Regulacja metabolizmu komórkowego jest przedmiotem zainteresowania wielu pracowni biochemicznych. Po okresie, w którym badano głównie skład oraz wzajemne powiązania szlaków metabolicznych, a który

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

moglibyśmy nazwać okresem budowania mapy metabolicznej, nadszedł czas analizy mechanizmów regulacji metabolizmu.

Jak każda dziedzina i ta gałąź biochemii wykształciła własne słownictwo. Właściwe mu specyficzne terminy osadzają zjawiska w kontekście funkcjonowania szlaku, jego produktywności. Często przy rozpatrywaniu tych terminów znajdujemy określenia z innej dziedziny biochemii, które im, mniej lub bardziej ściśle, odpowiadają. I tak dla przykładu, ważnymi terminami w dziedzinie regulacji metabolizmu są wyrażenia: „przepływ przez reakcję” lub „przepływ przez szlak metaboliczny”. Pod tymi terminami rozumiemy wypadkową szybkość reakcji lub procesu, tj. różnicę pomiędzy szybkością reakcji w kierunku tworzenia produktów (v_1) i szybkością reakcji w kierunku przeciwnym (v_{-1}). Jednakże użycie terminu „szybkość reakcji” wiąże się zwykle z opisem zmiany ilości jej substratów czy produktów. Jest to termin kinetyczny. Tymczasem w szlaku metabolicznym działającym w stanie równowagi dynamicznej, stężenia metabolitów reakcji nie zmieniają się. W tym bowiem układzie wytworzone cząsteczki produktów reakcji są zużywane jako substraty reakcji następnej, a zużyte cząsteczki substratów są zastępowane nowymi cząsteczkami powstałymi w wyniku działania reakcji poprzedzającej w szlaku opisywaną reakcję. Termin „przepływ”, analogiczny w pewnych przypadkach do terminu „szybkość”, opisuje działanie enzymu w kategoriach jego produktywności, nawet przy mylącej z pozoru niezmienności stężeń produktów i substratów.

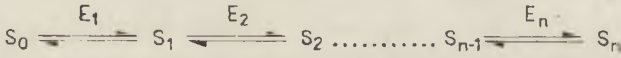
Przepływ przez reakcję opisać można równaniem kinetycznym. Przybiera ono zwykle postać nieliniowego równania różniczkowego. Zbiór takich równań, z którym mamy do czynienia przy próbie analizy przepływu na poziomie całej drogi metabolicznej, jest nierozwiązywalny. W ograniczony sposób trudność tę można pokonać przy użyciu komputera. Nieliczne prace, w których charakterystyka kinetyczna drogi metabolicznej określana jest za pomocą symulacji komputerowej, ciągle mają w sobie zbyt wiele założeń co do parametrów systemu, czy też szczegółów mechanizmu działania enzymów (1—4). Dlatego też w rozważaniach nad regulacją przepływu przez szlak metaboliczny dominują, i na nich też się skupimy, inne podejścia teoretyczne.

Polskie piśmiennictwo biochemiczne zostało wzbogacone ostatnio doskonałym podręcznikiem omawiającym regulację metabolizmu (5). Przedstawiony poniżej tekst jest próbą przybliżenia nowych osiągnięć z tej dziedziny.

II. Szlak metaboliczny w równowadze dynamicznej

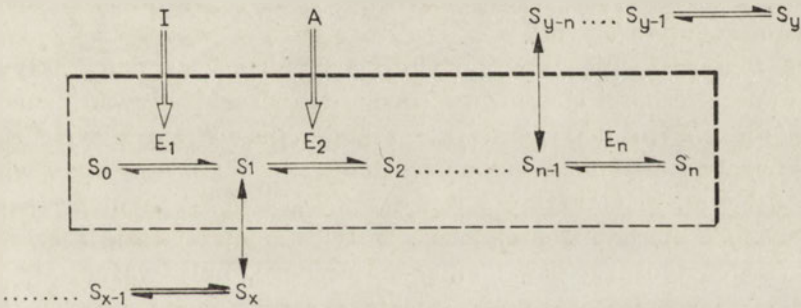
Weźmy pod uwagę hipotetyczny szereg enzymów (E_1 - E_n) katalizujących szlak metaboliczny (Ryc. 1). Założmy, że droga ta działa w warunkach równowagi dynamicznej, co oznacza, że szybkość zużywania substratu

początkowego (S_0) i powstawania produktu końcowego (S_n) jest taka sama i nie zmienia się w czasie. Przyjmijmy też, że wszystkie enzymy szlaku katalizują reakcje odwracalne, a reakcja ostatnia (katalizowana przez enzym E_n) jest nieczuła na produkt. W przypadku szlaku metabolicznego opisanego ryciną 1, określonemu stężeniu S_0 odpowiada określona szybkość przepływu (J) i ustalone stężenia poszczególnych metabolitów pośrednich ($S_1—S_{n-1}$).



Ryc. 1. Schemat szlaku metabolicznego.

Rycina 1 przedstawia drogę metaboliczną całkowicie wyizolowaną od innych przemian komórkowych. W rzeczywistości droga ta działa pośród wielkiej ilości przemian komórkowych, w licznych z nimi powiązaniach. Często koenzymy czy metabolity pośrednie są wspólne dla wielu przemian. Dlatego też model przedstawiony na rycinie 1 powinien być uzupełniony o możliwości modulowania wielkości pul metabolitów pośrednich, jak i możliwości oddziaływania na enzymy szlaku przez inhibitory i aktywatory, uwalniane w innych procesach metabolicznych (rycina 2).



Ryc. 2. Oddziaływanie szlaku metabolicznego z innymi przemianami metabolizmu komórkowego. Strzałki podwójne oznaczają działanie inhibitora (I) i aktywatora (A) enzymów szlaku. Strzałki pojedyncze oznaczają reakcje, na drodze których metabolity pośrednie omawianego szlaku włączają się w inne przemiany komórkowe.

W przypadku szlaku przedstawionego na rycinie 2, zmiana stężenia substratu, stężenia metabolitu pośredniego, czy też ilości enzymu, zaburzy układ równowagi dynamicznej. Konsekwencją tego jest zazwyczaj zmiana szybkości przepływu. Gdy parametr ten ustali się, co z reguły następuje po krótkim okresie stanu przejściowego, szlak przechodzi w nowy stan równowagi dynamicznej. Można więc stwierdzić, że szybkość przepływu przez szlak metaboliczny może być kontrolowana na drodze wywoływania zmian: a) w poziomie aktywności enzymów szlaku, b) w stężeniach substratu początkowego (S_0), metabolitów pośrednich ($S_1—S_{n-1}$) lub też koenzymów szlaku.

III. Enzym jako czynnik regulujący przepływ w szlaku

III-1. Enzymy regulatorowe

Kinetykę reakcji może modyfikować nie tylko zmiana w stężeniu jednego z metabolitów reakcji. Może być ona modyfikowana również na drodze oddziaływania enzymów z cząsteczkami innymi niż te, które spotykamy w zapisie reakcji. Tymi efektorami mogą być niewielkie cząsteczki, np. koenzymy, inne metabolity lub jony metali. Często też oddziaływania cząsteczki enzymu z innymi polipeptydami lub wprowadzenie do niej nowych, kowalencyjnie związanych grup, np. fosforylacja czy adenylation cząsteczki enzymu, prowadzi do zmiany właściwości kinetycznych. Wydzielenie w cząsteczce enzymu centrum aktywnego i miejsc regulatorowych, wprowadzenie teorii allosteryczności są dokonaniem dziś dość znanymi. Tak więc korzystając z faktu, że na ten temat istnieje w literaturze szereg doskonałych prac przeglądowych (patrz 5), w ramach tego artykułu nie będę dalej tego tematu rozwijał.

Przez pewien czas zakładano, że za każdym z wyżej wymienionych oddziaływań — jeżeli tylko jest ono „przekonywująco” specyficzne i wyraźne — musi kryć się jakiś „fizjologiczny sens”. Dlatego też enzymy, dla których wykryto tego typu oddziaływania, nazwano **enzymami regulatorowymi**.

Dziś wiemy, że nie zawsze wykrycie możliwości zmiany aktywności czy też specyficzności enzymu na drodze takich oddziaływań oznacza, że w komórce enzym taki pełni rolę regulacyjną. Wiele z tych efektów obserwowanych jedynie w układzie izolowanego enzymu okazywało się biochemicznymi artefaktami. Istnieje też możliwość, że niektóre efekty są związane z mechanizmami, które we wcześniejszej fazie rozwoju, zarówno filogenetycznego jak i ontogenetycznego, były ważne, ale w aktualnej fazie ważność zatraciły. Niektóre z nich mogą wreszcie odgrywać rolę regulacyjną tylko w jakiejś ekstremalnej sytuacji fizjologicznej.

III-2. Reakcje bliskie i dalekie równowagi termodynamicznej

W tej sytuacji wprowadzono dodatkowe kryterium regulatorowego znaczenia enzymu. W myśl tego kryterium uważa się, że jedynie enzymy katalizujące reakcje, które są w stanie dalekim od równowagi, mogą mieć znaczenie regulatorowe (6).

Powróćmy do ryciny 2 i przeanalizujmy działanie enzymu E_2 . Katalizuje on reakcję charakteryzującą się stałą równowagi $K_{eq} = S_2/S_1$. Gdy stosunek S_2/S_1 zrówna się z wartością stałej równowagi, wtedy szybkości reakcji w obu kierunkach są sobie równe ($v_1 = v_{-1}$), a wypadkowy prze-

plyw jest równy zeru. Jest więc rzeczą oczywistą, że w funkcjonującej drodze metabolicznej stężenie metabolitów reakcji (S_1 i S_2) kształtują się w ten sposób, że ich stosunek odbiega od wartości K_{eq} . Ten stosunek określa wartość ilorazu masowego (Γ).

Z klasycznego wzoru na energię swobodną reakcji $\Delta G = RT \ln(\Gamma/K_{eq})$ i trochę mniej znanej zależności $v_1/v_2 = \Gamma/K$ wynika, że oddalenie od stanu równowagi zwiększa przepływ przez reakcję. Za opinią, że jedynie enzymy katalizujące reakcje oddalone od równowagi wchodzi w rachubę przy określaniu punktów regulacji stoi następujące rozumowanie.

W przypadku enzymu wysoce aktywnego, który nawet przy nieznaczonej ΔG zapewnia wystarczający przepływ przez reakcję, metabolity reakcji są w układzie stężeń zbliżonym do K_{eq} . Dopiero drastyczna zmiana aktywności takiego enzymu może doprowadzić do zmiany układu stężeń. Natomiast w przypadku enzymu pracującego z dala od równowagi możemy powiedzieć, że enzym ten z „trudem”, posiłkując się znaczną energią swobodną reakcji, zapewnia przepływ przez odpowiadający mu etap szlaku. Tu nawet nieznaczna zmiana aktywności enzymu będzie miała odzwierciedlenie w zmianie stężeń metabolitów reakcji. Stąd nawet delikatne oddziaływanie modyfikujące taki enzym wpłynie na działanie pozostałej części szlaku.

Jest to więc pogląd, że punktu regulacji należy oczekiwać w miejscu względnie mało aktywnych enzymów. Myśl ta jest analogiczna do tej, którą w roku 1862 wyraził J. Liebig przy analizie czynników wyznaczających wielkość plonów w rolnictwie (7). J. Liebig wprowadził wtedy tzw. prawo minimum głoszące, że wielkość plonu zależy w istotny sposób od czynnika będącego w minimum; gdy czynnik ten ulegnie poprawie, plon proporcjonalnie wzrasta, lecz tylko do pewnej osiągalnej w danych warunkach wielkości.

W roku 1905 F. F. B l a c h m a n nadał temu prawu następującą formę (8): Jeśli na jakiś proces biologiczny wpływa szereg czynników, to jego natężenie ograniczone jest przez czynnik występujący w minimalnej ilości (*limiting factor*) w stosunku do wymagań stawianych przez organizm.

Podział na reakcje bliskie i oddalone od równowagi (tak w skrócie nazywa się reakcje, które w warunkach działającego szlaku metabolicznego wykazują stan stężeń metabolitów reakcji mniej więcej zgodny ze stałą równowagi lub też znacznie od tej stałej odbiegający) jest podziałem umownym. Zwykle za reakcje bliskie równowagi uważa się te reakcje, których stosunek Γ/K_{eq} jest większy od 0.2 (6). Czy jednak rzeczywiście reakcje charakteryzujące się $\Gamma/K_{eq} > 0.2$ nie mogą mieć znaczenia regulacyjnego? Szereg danych wskazuje na to, że tak nie jest, że reakcje charakteryzujące się stosunkiem Γ/K_{eq} w granicach 0.3—0.5 mogą także mieć znaczenie regulacyjne (9). Co więcej, ustalenie rzeczywistych aktywności metabolitów, skorygowanych ze względu na występowanie frak-

cji związanej, ewentualnie zlokalizowanej w innym kompartmentcie itp., sprawia ciągle duże kłopoty metodyczne. Ostatnio pojawiają się też prace postulujące zjawiska mikrokompartmentacji (10—12) czy też bezpośrednio przekazywanie metabolitów z jednej cząsteczki enzymu na drugą (*metabolite channelling, metabolite tunneling*). W sytuacji występowania tych zjawisk samo znaczenie wyrażenia Γ/K_{eq} może być poddane w wątpliwość. Dlatego też coraz to większa ilość badaczy odchodzi od posługiwania się jedynie kryterium bliskości czy oddalenia od równowagi przy oszacowaniu ewentualnych punktów regulacyjnych. Wprowadza się nowe kryterium — siłę kontrolowania.

III-3. Siła kontrolowania enzymu

O tym, jak zmiana aktywności wybranego enzymu wpływa na szybkość przepływu przez cały szlak metaboliczny, możemy dowiedzieć się określając współczynnik siły kontrolowania lub w skrócie **siłę kontrolowania** (C_1):

$$C_1 = \frac{\delta J}{\delta E_1} \frac{E_1}{J} \quad \text{równanie 1}$$

gdzie J to przepływ przez drogę metaboliczną, E_1 wyraża zaś stężenie enzymu. W przedstawionym wzorze zmianę aktywności enzymu wyrażono przez zmianę w ilości enzymu. Tak więc siła kontrolowania to współczynnik, który określa, jaką względną zmianę w przepływie przez szlak $\left(\frac{\delta J}{J}\right)$ spowoduje zmiana ilości określonego enzymu (wyważona przez uwzględnienie absolutnej wielkości, $\left(\frac{\delta E_1}{E_1}\right)$). Siłę kontrolowania do rozważań nad regulacją metabolizmu wprowadzili Higgins (13—14), Kacser i Burns (15—16) oraz Heinrich ze współpracownikami (17—19).

Z wszystkich dostępnych nam danych o kinetyce reakcji enzymatycznej wiemy, że szybkość jej opisać można następującym wyrażeniem:

$$v = E \tau f(S_1, S_2, S_3 \dots I_1, I_2 \dots Co_1, Co_2 \dots k_1, k_2 \dots k_{eq}) \quad \text{równanie 2}$$

Wynika z niego, że szybkość reakcji jest funkcją stężenia substratów (S), inhibitorów (I), koenzymów (Co) oraz zależy od wielkości stałych szybkości (k) i stałej równowagi (K_{eq}); jednakże bez względu na stopień skomplikowania reakcji szybkość ta jest wprost proporcjonalna do stężenia enzymu (E) i liczby obrotów (τ). Konsekwencją tego właśnie faktu jest prawidłowość (16), że w pracującym w warunkach równowagi dynamicznej szlaku metabolicznym suma sił kontrolowania wszystkich enzymów jest równa jedności:

$$\sum_n^{j=1} C_{E_1}^j = 1 \quad \text{równanie 3}$$

Tę to prawidłowość nazywamy zasadą sumowania do jedności sił kontrolowania enzymów szlaku metabolicznego pracującego w warunkach równowagi dynamicznej.

W rozpatrywanym szlaku metabolicznym dla każdego etapu wartość szybkości przepływu jest taka sama (liniowa struktura szlaku) i stąd możemy powiedzieć, że wartość szybkości przepływu zależy od ilości wszystkich poszczególnych enzymów:

$$J_1 = f(E_1, E_2 \dots E_n) \quad \text{równanie 4}$$

Korzystając, że dla tego przypadku można zróżniczkować cząstkowo wyrażenie J_1 względem niezależnych zmiennych ($E_1, E_2 \dots E_n$) otrzymujemy wyrażenie:

$$\Delta J_1 = \frac{\delta J_1}{E_1} \Delta E_1 + \frac{\delta J_1}{E_2} \Delta E_2 + \dots + \frac{\delta J_1}{E_n} \Delta E_n \quad \text{równanie 5}$$

Przekształcając to wyrażenie otrzymujemy:

$$\frac{\Delta J_1}{J_1} = \left(\frac{\delta J_1}{\delta E_1} \frac{E_1}{J_1} \right) \frac{\Delta E_1}{E_1} + \left(\frac{\delta J_1}{\delta E_2} \frac{E_2}{J_1} \right) \frac{\Delta E_2}{E_2} + \dots + \left(\frac{\delta J_1}{\delta E_n} \frac{E_n}{J_1} \right) \frac{\Delta E_n}{E_n} \quad \text{równanie 6}$$

Zauważmy, że wyrażenia w nawiasie są tożsame z definicją siły kontrolowania (równanie 1) i stąd możemy zapisać:

$$\frac{\Delta J_1}{J_1} = C_1 \frac{\Delta E_1}{E_1} + C_2 \frac{\Delta E_2}{E_2} + \dots + C_n \frac{\Delta E_n}{E_n} \quad \text{równanie 7}$$

Ponieważ szybkość przepływu przez każdy etap jest proporcjonalna do stężenia enzymu (równanie 2), to jednoczesne podniesienie stężenia wszystkich enzymów o taki sam niewielki czynnik nie wpłynie na stężenia metabolitów pośrednich:

$$\text{jeśli } \frac{\Delta E_1}{E_1} = \alpha \quad \text{to} \quad S_1 = \text{constant} \quad \text{równanie 8}$$

W tej sytuacji szybkość przepływu przez wszystkie etapy tego szlaku zmieni się jednakowo o ten sam czynnik:

$$\frac{\Delta J_1}{J_1} = \alpha \quad \text{równanie 9}$$

Przy α bliskim 0 ze wzorów 7, 8 i 9 otrzymujemy następujące równanie:

$$\alpha = C_1 \alpha + C_2 \alpha + \dots + C_n \alpha \quad \text{równanie 10}$$

Ta zależność może być spełniona tylko wtedy, gdy suma wszystkich sił kontrolowania będzie równa jedności. W ten sposób udowodniliśmy zasadę sumowania do jedności sił kontrolowania (równanie 3).

Tak więc każdemu enzymowi szlaku można przypisać odpowiadającą mu siłę kontrolowania. Znajomość sił kontrolowania niesie nie tylko jakościową, ale i ilościową informację o predyspozycji enzymu do odgrywania roli regulatorowej w szlaku metabolicznym. Zdecydowana większość enzymów w szlaku charakteryzuje się niskimi siłami kontrolowania ($C_1 < 0.05$). Ich rola regulacyjna jest mało prawdopodobna. W tej

sytuacji bowiem dopiero duża zmiana w stężeniach efektora może wpłynąć na przepływ na poziomie całego szlaku. Enzymy o niskiej sile kontrolowania są z reguły enzymami pracującymi w warunkach bliskich równowagi. W każdym szlaku funkcjonuje również jeden lub co najwyżej kilka enzymów o wysokiej sile kontrolowania. To o nich mówimy, że kontrolują przepływ. Enzymy o wysokiej sile kontrolowania są z zasady enzymami pracującymi w warunkach odległych od stanu równowagi. Nawet subtelne zmiany w stężeniu efektora takiego enzymu spowodują dostrzegalne zmiany przepływu na poziomie całego szlaku. Tak więc za tym, że na ten właśnie punkt skieruje się działanie regulacyjne, stoi przeswiadczenie o ogólnej efektywności procesów życiowych, o tym, że w procesie ewolucji wszelkie procesy biologiczne zostały zoptymalizowane. Pojęcie siły kontrolowania znacznie precyzyjniej ujmuje problem „czynnika ograniczającego” w regulacji, niż to czynią ujęcia operujące kategoriami bliskości i oddalenia od równowagi.

Ważnym osiągnięciem ostatnich lat jest opracowanie metody pomiaru sił kontrolowania enzymu przy zastosowaniu inhibitorów (20). Do momentu opracowania tej metody jedynym sposobem pomiaru sił kontrolowania było stosowanie żmudnych metod genetycznych i otrzymywanie na tej drodze materiałów biologicznych o różnych poziomach enzymu. Z pomiarów szybkości działania szlaku na tym właśnie materiale wyciągano wnioski o wielkości siły kontrolowania enzymu (9, 20). Pod koniec lat siedemdziesiątych zwrócono uwagę, że do identyfikacji miejsc regulatorowych mogą być użyte inhibitory (21—24). Już wcześniej stosowano inhibitory do wykrywania reakcji kontrolujących przepływ w szlaku. Ogólnie przyjęte podejście można scharakteryzować w następujący sposób. Jeżeli przy miareczkowaniu enzymu inhibitorem znajdowano zmianę w przepływie przez szlak nawet przy najmniejszych stężeniach inhibitora (hiperboliczna krzywa miareczkowania) wtedy uważano, że enzym kontroluje przepływ przez szlak. Gdy w takim doświadczeniu przepływ przez szlak zmieniał się dopiero przy wyższych stężeniach inhibitora (sigmoidalna krzywa miareczkowania), wtedy sądzono, że enzym, na który ten inhibitor działa, nie kontroluje przepływu przez szlak. Okazało się, że na podstawie tych krzywych miareczkowania można obliczyć siłę kontrolowania enzymu. W przypadku inhibitora niekompetytywnego oblicza się ją używając następującego wzoru:

$$(C_i)_{I=0} = -\frac{K_i}{J} \left(\frac{\delta J}{\delta I} \right)_{I=0} \quad \text{równanie 11}$$

gdzie K_i oznacza stałą inhibitorową, J oznacza przepływ przez niezahamowany szlak, a wyrażenie $(\delta J / \delta I)_{I=0}$ to nachylenie krzywej miareczkowania szybkości przepływu inhibitorem (I), dla punktu $I = 0$. W przypadku inhibitora kompetytywnego wzór ten jest znacznie bardziej złożony:

$$C_i = - \frac{K_i(S_i/K_{S_i} + S_{i+1}/K_{S_{i+1}} + 1)}{J} \left(\frac{\delta J}{\delta I} \right)_{I=0} \quad \text{równanie 12}$$

We wzorze tym występują obok elementów już omówionych przy wprowadzeniu poprzedniego wzoru jeszcze i stężenia metabolitów reakcji (S_i , S_{i+1}) i stałe Michaelisa (K_{S_i} , $K_{S_{i+1}}$).

IV. Zmiana w stężeniu metabolitu jako bezpośredni czynnik regulujący przepływ przez szlak metaboliczny

IV-1. Siła kontrolowania metabolitu

Szybkość przepływu przez szlak metaboliczny może być modulowana nie tylko przez zmiany na poziomie enzymów szlaku, ale także bezpośrednio przez zmianę w puli jednego z metabolitów. Zmiana taka może być wywołana przez aktywację czy też zahamowanie przemian komórkowych charakteryzujących się wspólnymi ze szlakiem, który rozpatrujemy, metabolitami pośrednimi (Ryc. 2).

Możemy więc, analogicznie do podejścia przedstawionego w równaniu 1, podać miarę wpływu zmiany stężenia metabolitu (S) na szybkość przepływu przez szlak metaboliczny (J):

$$C_{S_i} = \frac{\delta J}{\delta S} \frac{S}{J} \quad \text{równanie 13}$$

Przy granicznych wartościach $\delta S \rightarrow 0$ możemy to wyrażenie zapisać w następującej formie

$$C_{S_i} = \left(\frac{dJ}{J} \right) / \left(\frac{dS}{S} \right) = \frac{d \ln J}{d \ln S} \quad \text{równanie 14}$$

Współczynnik C_{S_i} jest różnie nazywany w literaturze anglosaskiej: *response coefficient* (15), *sensitisation index* (25) czy wreszcie *sensitivity* (26). Można by zaproponować dla niego polską nazwę — **siła kontrolowania metabolitu**.

W zrozumieniu znaczenia tego współczynnika może pomóc przekształcenie (zcałkowanie) równanie 12 do następującej formy:

$$J = k S^{C_{S_i}} \quad \text{równanie 15}$$

Z tego równania jasno wynika, że przepływ przez szlak metaboliczny jest bardzo czuły na zmianę w puli metabolitu o wysokiej sile kontrolowania.

IV-2. „Elastyczność”

Metabolity pośrednie spajają enzymy szlaku w jedną strukturę, w szlak metaboliczny. To one przenoszą informację o zmianie działania jednego z enzymów (inhibicja lub stymulacja enzymu) poprzez wywoły-

wanie zmian w zachowaniu innych enzymów. Tę zdolność przenoszenia informacji można analizować przy pomocy parametru nazwanego współczynnikiem elastyczności (elasticity).

Z całego szlaku przedstawionego na rycinie 2 przeanalizujemy etap katalizowany przez enzym E_3 . O tym, jak na szybkość tej reakcji wpłynie zmiana w stężeniu metabolitu S_2 , mówi współczynnik elastyczności, czy też jak to przyjmujemy dalej elastyczność. Zauważmy, że w tym przypadku mówimy o zmianie przepływu jedynie przez jeden etap szlaku, przez jedną reakcję enzymatyczną, a nie jak to czyniliśmy przy wprowadzeniu pojęcia siły kontrolowania metabolitu — o zmianie przepływu przez cały szlak.

Elastyczność określona jest wzorem:

$$\frac{\delta v_1}{v_1} / \frac{\delta S_1}{S_1} \rightarrow \frac{\delta \ln v_1}{\delta \ln S_1} = \varepsilon_{v_1}^S \quad \text{równanie 16}$$

gdzie v_1 oznacza przepływ przez reakcję, a S_1 to stężenie metabolitu. Tak więc elastyczność to współczynnik, który określa, jaką względną zmianę w przepływie przez wyodrębnioną reakcję $\left(\frac{\delta v_1}{v_1}\right)$ wywoła zmiana (wyważona przez uwzględnienie wielkości absolutnej puli tego metabolitu) stężenia określanego metabolitu tej reakcji $\left(\frac{\delta S_1}{S_1}\right)$.

Dla każdego enzymu określić można wiele typów elastyczności. Można więc mówić o elastyczności reakcji względem metabolitów reakcji, ale także o elastyczności względem inhibitora lub koenzymu. Elastyczność jest lokalną, a nie systemową, właściwością. Dlatego też w praktyce dla jej określenia często bada się enzym wyizolowany i, starając się o utrzymanie wszelkich innych parametrów na poziomach odpowiadających stężeniom komórkowym, zmienia się stężenie tylko tego parametru, względem którego określamy elastyczność badanej reakcji. Czytelnik zorientowany, jak wielka jeszcze jest niejasność związana z wiedzą o rzeczywistych, komórkowych aktywnościach metabolitów, inhibitorów i koenzymów, sam od razu znajdzie wiele zastrzeżeń wobec takiego podejścia.

Wróćmy do szlaku przedstawionego na rycinie 2. Poziomy enzymów E_2 i E_3 mogą być tak zmienione, że zmiany te z punktu widzenia przepływu przez szlak zniosą się. Innymi słowy jeden z enzymów został zaktywowywany, a drugi zahamowany tak, że ogólny przepływ nie ulega zmianie. W takim układzie stężenie S_2 zmieni się, gdyż jeżeli przepływ nie zmienia się, to zmniejszenie poziomu enzymu musi być zrekompensowane zmianą stężenia S_2 .

Możemy to zapisać w następujący sposób:

$$(dv/v)_E + (dv/v)_S = 0 \quad \text{równanie 17}$$

gdzie $(dv/v)_E$ oznacza ewentualny efekt zmiany poziomu enzymu na przepływ.

a $(dv/v)_S$ oznacza ewentualny efekt zmiany w poziomie metabolitu. Korzystając z równoważności $dv/v = dE$ oraz z równania 16 możemy powyższe równanie zapisać następująco:

$$dE_2/E_2 + \epsilon_{S_2}^2 (dS_2/S_2) = 0 \quad \text{równanie 18}$$

$$dE_3/E_3 + \epsilon_{S_2}^3 (dS_2/S_2) = 0 \quad \text{równanie 19}$$

Na poziomie szlaku przepływ jest niezmienny, co zapisać możemy w następujący sposób:

$$dJ/J = 0 = C_2 (dE_2/E_2) + C_3 (dE_3/E_3) \quad \text{równanie 20}$$

Łącząc równanie 18, 19 i 20 otrzymujemy zależność:

$$C_2 \epsilon_{S_2}^2 + C_3 \epsilon_{S_2}^3 = 0 \quad \text{równanie 21}$$

co możemy też zapisać w następującej formie:

$$C_2/C_3 = -\epsilon_{S_2}^3/\epsilon_{S_2}^2 \quad \text{równanie 22}$$

Ogólnie możemy powiedzieć, że suma iloczynów $\epsilon \cdot C$ wszystkich reakcji, w których bierze udział określony metabolit, jest równa zero. Tę cechę szlaku metabolicznego pracującego w warunkach równowagi dynamicznej nazywa się właściwością spójności (connectivity property). Zapisujemy właściwość spójności wzorem ogólnym:

$$\sum_n C_i \epsilon_i^s = 0 \quad \text{równanie 23}$$

Jest to uogólniona postać równania 22.

Ta właściwość szlaku w równowadze dynamicznej pozwala nam na połączenie ogólnych właściwości szlaku (charakteryzowanych przez siły kontrolowania enzymów, C_i) z właściwościami lokalnymi (charakteryzowanymi przez elastyczność, ϵ). W ten sposób możemy w sposób znacznie bardziej kompleksowy analizować pracę szlaku metabolicznego.

V. Mechanizmy zmian przepływu przez szlak w równowadze dynamicznej

W wypadku drogi metabolicznej przedstawionej na rycinie 2 przyjmijmy, że E_1 charakteryzuje się wysoką siłą kontrolowania, a enzymy E_2 i następne cechują się znikomymi siłami kontrolowania. Jest to najprostszy hipotetyczny układ szlaku metabolicznego.

Ze wzoru przedstawionego równaniem 22 wynika, że substrat pośredni S_1 będzie miał wysoką elastyczność w stosunku do reakcji katalizowanej przez E_2 i względnie niską elastyczność, obdarzoną znakiem ujemnym (co określa hamowanie reakcji przez produkt), w stosunku do reakcji katalizowanej przez E_1 .

To stwierdzenie jest zgodne z opisaną poprzednio obserwacją, że przepływ przez reakcje znajdujące się w stanie bliskim równowagi jest znacznie bardziej czuły na zmianę stężenia substratu, niż w przypadku reakcji działającej w warunkach oddalenia od równowagi (27). Można to zilustro-

wać następującym przykładem. Załóżmy, że reakcja działa: a) w układzie oddalonym od równowagi, b) w układzie bliskim równowagi. W układzie a) przepływ v_1 ustalmy na 11 jednostek, a w kierunku przeciwnym (v_{-1}) na 1 jednostkę. W tym układzie przepływ wypadkowy będzie się równał 10 jednostkom. Podwyższenie o 10% przepływu v_1 , podniesie przepływ wypadkowy do 11 jednostek, a więc też o około 10%. W układzie b) przepływ v_1 ustalmy na 110 jednostek, a w kierunku v_{-1} na 100 jednostek. I w tym układzie przepływ wypadkowy będzie wynosił 10 jednostek. Gdy podniesiemy przepływ v_1 o 10%, wzrośnie on do wartości 121 jednostek. W tym przypadku, przy nienaruszonym v_{-1} , przepływ wypadkowy wzrośnie do 21 jednostek, a więc o 210%. Tak więc, reakcje odznaczające się niską siłą kontrolowania będą z reguły charakteryzować się wysoką elastycznością substratową.

Jeżeli podziałamy aktywatorem na reakcję katalizowaną przez E_1 (wysoka siła kontrolowania), zwiększy się przepływ przez nią i zmieni się stężenie S_1 . Ta zmiana zostanie następnie przeniesiona przez łańcuch reakcji bliskich równowagi jako zwiększony przepływ. Stężenia metabolitów tych reakcji zmieniają się jedynie nieznacznie. Tak można sobie wyobrazić najprostszy mechanizm stymulacji drogi metabolicznej przedstawionej na rycinie 2.

Jest to obraz bardzo uproszczony. Jeżeli bowiem stężenie S_1 wzrośnie nieznacznie, to wzrośnie również stężenie S_2 . Jest to konsekwencją założenia, że reakcja katalizowana przez E_2 jest bliska równowagi. Zwiększenie stężenia S_2 wpłynie na zwiększenie szybkości reakcji powrotnej i tym samym znacznie zmniejszy się efekt zwiększenia przepływu wypadkowego przez reakcję katalizowaną przez enzym E_2 . Żeby więc istotnie szereg enzymów działających w warunkach bliskich równowagi przeniósł efekt stymulacji E_1 w formę zwiększonego przepływu przez szlak, ich elastyczności względem substratów muszą rosnać w miarę przesuwania się wzdłuż szlaku (27).

Zaakceptowano do druku 6.09.1982

PIŚMIENNICTWO

1. McMinn C. L., Ottoway J. H., (1976), *J. Theor. Biol.*, **56**, 57—73.
2. Ottoway J. H., (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 1161—1167.
3. Garfinkel D., (1971), *Computers and Biomedical Res.*, **4**, 18—42.
4. Bohnensack R., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **634**, 203—218.
5. Bryła J., (1981), *Regulacja metabolizmu komórki*, PWN Warszawa, str. 1—596.
6. Rolleston F. S., (1972), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **5**, 47—75.
7. Liebig J. V., (1878) *Die chemie in ihrer Anwendung auf Agricultur und Physiologie*, P. H. Collier.
8. Blachman, cytat za Z. Obmiński, (1977), *Ekologia lasu*, PWN, str. 131.
9. Groen A. K., van der Meer R., Westerhoff H. V., Wanders R.

- J. A., Akerboom T. P. M., Tager J. M., (1982), w *Metabolic Compartmentation* (H. Sies, wyd.) Academic Press, Nowy York, str. 9—37.
10. Duszyński J., Mueller G., LaNoue K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6149—6157.
 11. Schoolwerth A. C., LaNoue K. F., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3403—3411.
 12. Veech R. L., (1978), w *Microenvironments and Metabolite Compartmentation*, (Srere P. A., Estabrook R. W., wyd.) Academic Press, New York, str. 17—61.
 13. Higgins J., (1963), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **108**, 305—321.
 14. Higgins J., (1965), w *Control of Energy Metabolism*, (Chance B., Estabrook R. W., Williamson J. R.) Academic Press, New York, str. 13—46.
 15. Kacser H., Burns J. A., (1973), *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **32**, 65—104.
 16. Kacser H., Burns J. A., (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 1149—1160.
 17. Heinrich R., Rapoport T. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 89—95.
 18. Heinrich R., Rapoport T. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 97—105.
 19. Heinrich R., Rapoport T. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 107—120.
 20. Groen A. K., Wanders R. J. A., Westerhoff H. V., van der Meer R., Tager J. M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2754—2757.
 21. Böhme G., Hartung K. J., Kunz W., (1978) w *Bioenergetics at Mitochondrial and Cellular Levels*, (Wojtczak L., Lenartowicz E., Zborowski J., red.) Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa, str. 79—102.
 22. Lemaster J. J., Sowers A. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1248—1251.
 23. Rognstad R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1875—1878.
 24. Yout E. A., Harris R. A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **633**, 122—133.
 25. Davies J. I., Williams P. A., (1971), *J. Theor. Biol.*, **30**, 41—57.
 26. Crabtree B., Newsholme E. A., (1978) *Eur. J. Biochem.*, **89**, 19—22.
 27. Newsholme E. A., (1980), *FEBS Letters*, **117** Supplement, K121—K134.

JERZY DUSZYŃSKI *)

Regulacja oddychania mitochondrialnego

Regulation of Mitochondrial Respiration

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Układ oksydacyjnej fosforylacji
- III. Potencjały składowe układu oksydacyjnej fosforylacji i procesy bezpośrednio je naruszające
- IV. Model regulacji oddychania opracowany przez Wilsona i współpracowników
- V. Krytyka modelu Wilsona
- VI. Słowniczek ważniejszych wyrażen i skrótów

Contents

- I. Introduction
- II. The oxidative phosphorylation system
- III. Potentials of the oxidative phosphorylation system and reactions affecting these potentials directly
- IV. Regulation of cellular respiration as proposed by Wilson et al.
- V. Critical appraisal of the Wilson approach to the regulation of respiration
- VI. Glossary of common symbols and abbreviations

I. Wstęp

Oddychanie mitochondrialne czyli pobieranie tlenu przez mitochondria jest związane z funkcjonowaniem łańcucha oddechowego, a ściślej rzecz biorąc, z aktywnością enzymu działającego na końcu sekwencji oksydo-redukcyjnych składników łańcucha oddechowego, tj. oksydazy cytochromowej. W reakcji katalizowanej przez ten enzym elektrony, wywodzące się pierwotnie z substratów oddechowych, i protony oddziałują z tlenem. W wyniku tej reakcji zużywa się tlen, a powstaje woda.

W rozumieniu regulacji oddychania mitochondrialnego następuje przewrót. W artykule tym główny akcent położono właśnie na nowe, wyłaniające się koncepcje mechanizmu regulacji oddychania mitochondrialnego.

Szereg pojęć z dziedziny regulacji metabolizmu, podstawowych dla pełnego rozumienia tego tekstu zostało szczegółowo omówionych w specjalnie im poświęconym artykule przeglądowym (1).

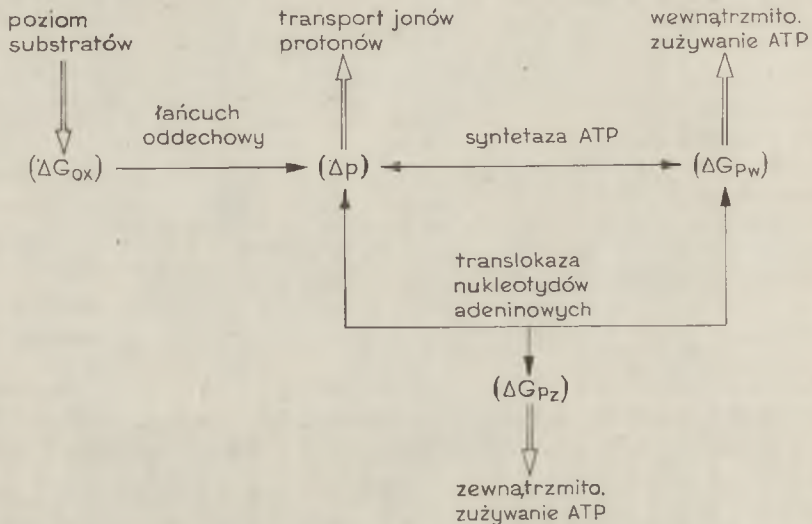
II. Układ oksydacyjnej fosforylacji

Działanie oksydazy cytochromowej (2—5), jak i całego łańcucha oddechowego związane jest z serią przemian, które określamy nazwą oksydacyjnej fosforylacji. W wyniku tych przemian energia wyzwolona przy

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

utlenianiu substratów oddechowych zasila reakcję powstawania cząsteczki ATP, z ADP i fosforanu. W naszych rozważaniach przyjmujemy chemiosmotyczne podejście do problemów oksydacyjnej fosforylacji (6—9).

Według tego, zaproponowanego oryginalnie przez Petera Mitchella w roku 1961, a dziś prawie że powszechnie przyjętego podejścia, działanie łańcucha oddechowego prowadzi do powstania gradientu protonów (ΔpH) po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej. Gradient ten i jego pochodna, potencjał elektryczny na błonie ($\Delta \Psi$), składają się na ogólny potencjał błonowy, zwany siłą protonomotoryczną (Δp), którą wyrażoną w miliwoltach opisuje następujący wzór: $\Delta p = \Delta \Psi + 59 \Delta \text{pH}$.



Schemat 1. Układ oksydacyjnej fosforylacji. W nawiasach umieszczono potencjały: ΔG_{ox} — oksydoredukcyjny, Δp — siła protonomotoryczna, ΔG_{Pw} — fosforylacyjny wewnątrzmitochondrialny, ΔG_{Pz} — fosforylacyjny zewnątrzmitochondrialny. Pojedynczymi strzałkami zaznaczono enzymy układu oksydacyjnej fosforylacji, strzałkami podwójnymi reakcje bezpośrednio wpływające na poszczególne potencjały.

Δp jest siłą napędową syntetazy ATP. Aktywność tego enzymu, umieszczonego na matriksowej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej, prowadzi do powstania ATP z ADP i fosforanu, a w konsekwencji do powstania znacznego potencjału fosforylacyjnego w mitochondrialnej matriks (ΔG_{Pw}). Potencjał fosforylacyjny — jest funkcją ilorazu masowego reakcji syntetazy ATP, a więc wyrażenia $\text{ATP}/\text{ADP} \cdot \text{P}_i^*$). Działanie translokazy nukleotydów adeninowych, systemu przenoszącego nukleotydy adeninowe przez błonę mitochondrialną (10—11), prowadzi do powstania na bazie ΔG_{Pw} zewnątrzmitochondrialnego potencjału fosforylacyjnego

*) (patrz słowniczek ważniejszych wyrażen i skrótów).

(ΔG_{Pz}). Na skutek elektrogennego charakteru wymiany katalizowanej przez translokazę (najprawdopodobniej jest to wymiana jednej cząsteczki ATP^{4-} na jedną cząsteczkę ADP^{3-}), jak i faktu, że potencjał elektryczny błony jest obdarzony znakiem dodatnim po stronie zewnętrznej błony, ΔG_{Pz} jest w układzie fosforylujących mitochondriów wyższy od ΔG_{Pw} (12—14). Wszystkie omówione powyżej przemiany przedstawione zostały w schemacie 1.

Mechanizm oksydacyjnej fosforylacji jest od lat polem niezwykle intensywnych badań. O ich nasileniu niech świadczy fakt, że wśród przeciwników podejścia chemiosmotycznego znajdują się i tacy, którzy go jeszcze nie przyjęli, pozostając przy swoich poglądach ogłoszonych jeszcze w „czasach przedchemiosmotycznych” (15—21), jak i tacy, którzy już po przyjęciu podejścia chemiosmotycznego zaczynają je podważać i odrzucać (22—27). W ramach tego artykułu nie będziemy jednak dyskutować tych zagadnień. Zdaniem naszym, przyjęcie podejścia chemiosmotycznego jest ciągle jeszcze jak najbardziej uzasadnione i owocne.

III. Potencjały składowe układu oksydacyjnej fosforylacji i procesy bezpośrednio je naruszające

W schemacie 1 oprócz przedstawienia podstawowych składników układu oksydacyjnej fosforylacji, którą można nazwać układem czterech potencjałów: oksydoredukcyjnego (ΔG_{ox}), błonowego (Δp), wewnątrzmitochondrialnego fosforylacyjnego (ΔG_{Pw}) i zewnątrzmitochondrialnego fosforylacyjnego (ΔG_{Pz}), wymieniono też reakcje bezpośrednio wyczerpujące lub budujące poszczególne potencjały.

Pierwotnym źródłem energii, zasilającym cały układ oksydacyjnej fosforylacji, jest proces utleniania substratów oddechowych. Poziom substratów oddechowych, ich stężenie jak i stopień redukcji, będzie więc czynnikiem bezpośrednio wyznaczającym wielkość ΔG_{ox} . Na wielkość ΔG_{ox} wpływać też będzie stopień aktywności łańcucha oddechowego, który ΔG_{ox} zużywa. Aktywność łańcucha oddechowego prowadzi do ustanowienia Δp . Działanie rozprzegaczy, np. dwunitrofenolu czy CCCP zwiększających przepuszczalność błony dla protonów (9, 31, 32), bezpośrednio wpływa na wielkość Δp . Procesy transportu Ca^{2+} (33) lub K^+ w obecności walinomycyny, w których niezbalansowany ładunek przenoszony jest przez błonę mitochondrialną, również bezpośrednio wpływają na Δp . ΔG_{Pw} zużywany jest bezpośrednio przez reakcje zużywające ATP w mitochondrialnej matriks. Do takich procesów należy np. synteza cytruliny z ornityny, przebiegający w mitochondrialnej matriks etap cyklu mocznikowego, w którym na każdą nowo powstałą cząsteczkę cytruliny zużywane są dwie cząsteczki ATP. Wreszcie działanie takich enzymów jak ATPaza (29) czy heksokinaza w obecności glukozy (30), dodanych do zawiesiny mitochondriów prowadzi do zmniejszenia ΔG_{Pz} .

To samo można osiągnąć przez dodanie do zawiesiny mitochondriów ADP (28).

Przy stymulacji wszystkich wymienionych reakcji zaobserwowano zmiany w szybkości oddychania. Ogólna prawidłowość, którą możemy sformułować na tym etapie naszych rozważań, jest następująca: podwyższenie ΔG_{ox} i zużywanie któregośkolwiek z pozostałych potencjałów składowych układu oksydacyjnej fosforylacji prowadzi do zwiększenia submaksymalnych szybkości oddychania.

Można zaobserwować ściśle określoną zależność ilościową w szybkościach procesu oddychania i procesu, który bezpośrednio zmienia wartości potencjału składowego. W przypadku potencjałów fosforylacyjnych i oddychania ilościowe powiązanie tych procesów określa stosunek P/O. Po raz pierwszy oznaczył wartość P/O oksydacyjnej fosforylacji Ochoa (35). Było to na początku lat czterdziestych. Zdziwiałe jest więc, że to zdawało by się proste z technicznego punktu widzenia oznaczenie do dziś jest przedmiotem kontrowersji (36). Przyczyną tego stanu rzeczy jest między innymi fakt, że nasze rozumienie procesu oksydacyjnej fosforylacji niepomniernie wzrosło i stąd wzrosła również ilość parametrów, które należy kontrolować lub korygować. Ostatnio wprowadzono metodę korygującą wpływ biernego, powrotnego transportu protonów na wartość P/O (37).

Precyzyjne oznaczenie wartości P/O może stać się podstawą do oznaczenia stechiometrii procesów składowych oksydacyjnej fosforylacji. Przez stechiometrię rozumiane są w tym przypadku ilościowe zależności przebiegu procesu i ruchu H^+ przez błonę mitochondrialną, a więc dla przykładu: ilość H^+ zużywanych przy syntezie ATP i przy transporcie ATP przez błonę, czy wreszcie najbardziej dziś kontrowersyjna stechiometria ilości przenoszonych H^+ przy utlenianiu poszczególnych substratów przez łańcuch oddechowy. P/O można traktować jako stosunek ilości H^+ potrzebnych do syntezy transportu ATP do ilości H^+ wyrzucanych przez łańcuch oddechowy przy utlenianiu substratu. Na podstawie oznaczenia P/O dla różnych substratów oddechowych można więc wnioskować o stosunkach ilościowych w stechiometrii działania łańcucha oddechowego z tymi substratami (38). Oznaczenie P/O może również dostarczyć wiadomości o koszcie energetycznym transportu ATP. Na podstawie porównania stosunków P/O układów, w których: a) ATP metabolizowany był wewnątrz mitochondriów, b) ATP metabolizowany był na zewnątrz mitochondriów, stwierdzono, że koszt transportu ATP przez wewnętrzną błonę mitochondrialną jest równy połowie ilości energii potrzebnej do syntezy ATP w mitochondrialnej matriks (39).

Bez względu jednak na trudności w precyzyjnym oznaczeniu stechiometrii procesów oksydacyjnej fosforylacji ciągle jeszcze główna zasada, że zużywanie któregośkolwiek z następujących potencjałów: Δp , ΔG_{P_w} , ΔG_{P_z} prowadzi do stymulacji oddychania, wydaje się aktualna.

W literaturze pojawiają się co prawda doniesienia podważające tę zasadę. W roku 1975 E. J. Davis i L. Lumeng opublikowali pracę (29) stwierdzającą, że ΔG_{Pw} nie zmienia się przy zmianie szybkości mitochondrialnego oddychania przez zużywanie ΔG_{Pz} . Było to sprzeczne z oczekiwaniem. W myśl bowiem teorii chemiosmotycznej (schemat 1) należało oczekiwać zmian w ΔG_{Pw} , jako elementu następującej sekwencji wydarzeń. Obniżenie ΔG_{Pz} pociągnie za sobą obniżenie ΔG_{Pw} . Dopiero to, aktywując zużywającą „chemiosmotyczne” protony syntetazę ATP, pociągnie za sobą stymulację wyrzucającego protony procesu oddychania.

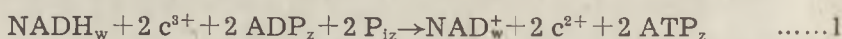
Można przyjąć, że omawiana praca Davisa (29) była jednym z czynników promocyjnych późniejszych prac, postulujących bezpośrednio oddziaływanie translokazy nukleotydów adeninowych i syntetazy ATP, a tym samym potencjałów Δp i ΔG_{Pz} (40). Dalsze badania nie potwierdziły tego typu koncepcji. Gdy użyto nowej, precyzyjniejszej metody oznaczania wewnątrzmitochondrialnych nukleotydów adeninowych na tle egzogennych nukleotydów (12), okazało się, że przy wyczerpywaniu ΔG_{Pz} i równoległej stymulacji oddychania obserwuje się istotne zmiany w ΔG_{Pw} (12, 41).

Również ciągle niepewne wydają się dane o braku znaczących zmian w Δp przy stymulacji oddychania na drodze zużywania ΔG_{Pz} (22, 24, 25, 27). Ponownie możemy przypomnieć, że w myśl teorii chemiosmotycznej (schemat 1) łańcuch oddechowy „odczuwa” jedynie zmiany albo na poziomie swoich substratów (ΔG_{ox}), albo na poziomie swojego produktu, czyli Δp . Tak więc, w myśl tradycyjnego modelu chemiosmotycznego zużywanie ΔG_{Pz} powinno prowadzić do stymulacji oddychania na następującej drodze. Zużywanie G_{Pz} prowadzi do obniżenia G_{Pw} , a to pociąga za sobą stymulację enzymu budującego ten potencjał, tj. syntetazy ATP. Aktywność syntetazy ATP związana jest ze zużywaniem uprzednio wyrzuconych na zewnątrz mitochondriów protonów, lub inaczej mówiąc, ze zużywaniem Δp . To właśnie jest bezpośrednią przyczyną stymulacji działalności łańcucha oddechowego, a więc układu, który buduje Δp . Dlatego też przy stymulacji oddychania przez zużywanie ΔG_{Pz} , oczekiwany jest spadek wartości Δp .

Obserwowane w doświadczeniach zmiany w Δp są zwykle niewielkie. Przy przejściu mitochondriów ze stanu spoczynkowego w stan aktywny (przejście stanu 4 w stan 3 (28)) Δp zmienia się o około 10—15 mV (42—43), na tle ogólnej jego wartości rzędu 200 mV. Różnice wynoszą więc, w tym skrajnym przypadku przechodzenia od minimalnej do maksymalnej szybkości oddychania, tylko około 5% wielkości mierzonej. Na dodatek, pomiary Δp są technicznie trudne (16, 44—47). Stąd też nasza niepewność w stosunku do prac, w których ogłaszane są obserwacje, że Δp nie zmienia się przy stymulacji oddychania na drodze zużywania ΔG_{Pz} (22, 24, 25, 27).

IV. Model regulacji oddychania opracowany przez Wilsona i współpracowników

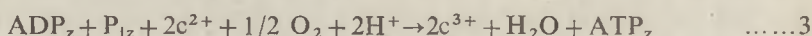
Z powyższych danych wynika, że potencjały składowe układu oksydacyjnej fosforylacji, a więc ΔG_{ox} , Δp , ΔG_{P_w} i ΔG_{P_z} są we wzajemnej zależności. Ten to właśnie element wyeksponowali w swoim modelu regulacji oddychania mitochondrialnego Wilson i współpracownicy (2, 5, 48—52). Poglądy ich można streścić następująco. Pomiedzy wewnątrzmitochondrialnym ΔG_{ox} , ΔG_{P_z} oraz stanem oksydoredukcyjnym składników łańcucha oddechowego od NADH do cytochromu c włącznie, zachodzi stan bliski równowagi termodynamicznej. Rozumiemy przez to, że reakcja sumaryczna:



pracuje w warunkach stanu bliskiego równowagi (w równaniu 1 wyznacznikami „w” oznaczono stężenia mitochondrialne, a wyznacznikami „z” stężenia zewnątrzmitochondrialne). Oznacza to, że układ stężeń substratów i produktów reakcji opisanej równaniem 1 jest zbliżony do tego, jaki opisuje równanie 2:

$$K_{eq} = \left(\frac{\text{NADH}_w}{\text{NAD}_w^+} \right)^{1/2} \frac{\text{ADP}_w \text{P}_{1w} \text{c}^{3+}}{\text{ATP}_z \text{c}^{2+}} \quad \dots\dots 2$$

Jedyną reakcją z całego układu oksydacyjnej fosforylacji, znajdującą się z dala od równowagi termodynamicznej, jest, jak twierdzą Wilson i współpracownicy (5, 53), praktycznie nieodwracalna reakcja katalizowana przez oksydazę cytochromową (reakcja 3).



Szybkość tej reakcji, a tym samym szybkość oddychania, jest zależna od stopnia redukcji cytochromu c. A ponieważ z równania 2 możemy wyprowadzić, że

$$\frac{\text{c}^{2+}}{\text{c}^{3+}} = \frac{1}{K_{eq}} \left(\frac{\text{NADH}_w}{\text{NAD}_w^+} \right)^{1/2} \frac{\text{ADP}_w \text{P}_{1w}}{\text{ATP}_z} \quad \dots\dots 4$$

stąd twierdzenie, że szybkość oddychania zależy od ΔG_{ox} (NAD_w/NAD) i ΔG_{P_z} . Obniżenie ΔG_{P_z} lub podwyższenie ΔG_{ox} prowadzi do podwyższenia stopnia redukcji cytochromu c (równanie 4), a tym samym do zwiększenia szybkości oddychania (równanie 3).

Przyjęcie zasady, że układ oksydacyjnej fosforylacji pracuje w warunkach stanu bliskiego równowagi na swoich dwóch pierwszych miejscach sprzężenia, pociąga za sobą ważne konsekwencje. Oznacza to, że jednym z podstawowych czynników regulujących oddychanie komórkowe jest potencjał fosforylacyjny. Jest on jednym z czynników, tak jak

to przedstawiono w równaniu 4, wpływających bezpośrednio na stopień redukcji cytochromu c, a więc na poziom substratu oksydazy cytochromowej. W przeszłości postulowano, że zależność szybkości metabolizmu energetycznego od stanu puli nukleotydów adeninowych lepiej jest charakteryzować przy użyciu takich wyrażen jak: stosunek ATP/ADP (29, 54—55) lub zaproponowany przez Atkinsona ładunek energetyczny (56). Prace Wilsona i współpracowników wykazały, że potencjał fosforylacyjny jest do opisu tych przemian wyrażeniem najdogodniejszym. I rzeczywiście, w układzie zawiesiny mitochondriów (50), jak i izolowanych komórek wątrobowych (57) stwierdzono, że szybkość oddychania zależała od wartości potencjału fosforylacyjnego, a nie od wysokości stosunku ATP/ADP. Ten ważny punkt najlepiej przedstawiają wyniki następującego doświadczenia (57). Izolowane komórki wątrobowe inkubowano w obecności glicerolu. W trakcie inkubacji obserwowano akumulację glicerofosforanu, i co za tym idzie, wyczerpywanie wewnątrzkomórkowego ATP i spadek stosunku ATP/ADP. Mimo to szybkość oddychania, podobnie jak potencjał fosforylacyjny nie zmieniała się istotnie. Wyniki tego doświadczenia przedstawia tabela I (57).

Tabela I

Wpływ glicerolu na stężenia metabolitów w izolowanych komórkach wątrobowych (według 57)

	Kontrola	10 mM glicerol		
		2 min.	5 min.	15 min.
ATP/ADP	4.02	2.60	1.99	1.57
ATP/ADP P _i	1346	1203	1380	1277
ładunek energii oddychanie	0.76	0.68	0.65	0.58
($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$)	1.57	1.64	1.41	1.20

Według Wilsona i współpracowników szybkość oddychania mitochondrialnego zależy więc bezpośrednio od poziomu substratów oksydazy cytochromowej (równanie 4) i od kinetyki katalizowanej przez nią reakcji. Ważnym dokonaniem grupy Wilsona i Erecińskiej było stwierdzenie, że wyrażenie odzwierciedlające zależność aktywności enzymu od stężenia tlenu jest znaczącym czynnikiem równania kinetycznego reakcji oksydazy cytochromowej (58, 59). Do tej pory uważano, że dzięki niezwykle wysokiemu, jak zakładano, powinowactwu oksydazy cytochromowej do tlenu (podawano zwykle wartości K_m około 1 μM), zmiana w stężeniu tlenu w trakcie doświadczenia nie wpływa na oddychanie mitochondriów. Czynniki ten zaczynał odgrywać rolę dopiero w warunkach bardzo zbliżonych do anerobiozy. Jak wykazały badania Wilsona i współpracowników, założenia te były fałszywe. Niezwykle złożona reakcja katalizowana przez oksydazę cytochromową (2), jest czuła na stężenie tlenu w znacz-

nie szerszym zakresie. O tym, jak złożona jest to reakcja, świadczyć może zaproponowany ostatnio do jej opisu wzór kinetyczny (5):

$$v = \frac{(1 - k_{-2}/K c^{2+})k_2 O_2 a_{3T}}{\alpha + \beta O_2} \quad \dots\dots 5$$

gdzie α i β to wyrażenia zależne od stanu redukcji cytochromu c, k_{-2} i k_2 to stałe szybkości reakcji, a K to stała równowagi.

Jak widzimy, początkowo prosta konstrukcja Wilsona i współpracowników (51), opisująca oddychanie komórkowe i mitochondrialne, w trakcie rozwoju zaczyna być coraz to bardziej złożona (5). Model traci na swojej klarowności, a pewne jego elementy, jak ten opisany równaniem 5, są spekulacjami trudnymi do weryfikacji doświadczalnej.

V. Krytyka modelu Wilsona i współpracowników

Powstały na początku lat siedemdziesiątych model Wilsona, Erecińskiej i Krebsa był niewątpliwie dużym osiągnięciem. W dziesięć lat później zaczyna być on poważnie podważany, jako niewystarczający opis regulacji oddychania.

Z początku, głównym źródłem krytyki modelu był fakt, że nie zawierał on takich elementów jak Δp i ΔG_{Pw} . Był to więc opis posługujący się tradycyjnymi, a nie chemiosmotycznymi kategoriami. Stąd też wiele procesów i obserwacji nie mogło być przy jego pomocy opisanych, jak dla przykładu stymulacja oddychania związana z pobieraniem Ca^{2+} przez mitochondria. Ta tradycyjność opisu była, jak się wydaje, przyczyną pierwszych prób jego modyfikacji. Do nich należy np. próba przedstawienia regulacji oddychania mitochondrialnego w kategoriach termodynamiki procesów nieodwracalnych (60—63).

Ujęcie Wilsona, Erecińskiej i Krebsa (5) opisuje regulację szlaku posługując się schematem tej jednej reakcji ograniczającej pracującej w warunkach odległych od równowagi, i pozostałych reakcji, pracujących w warunkach zbliżonych do równowagi i nie mających żadnego znaczenia regulacyjnego. Dziś wiemy, jak skrajną sytuacją jest taki właśnie przypadek (1). Podział reakcji na obdarzone znaczeniem regulacyjnym i na nie wykazujące takiego znaczenia, jedynie na podstawie kryterium bliskości czy odchylenia reakcji od warunków równowagi, jest dziś poważnie podważany. Tradycyjne rozumowanie, na którym oparty jest pogląd o braku znaczenia regulacyjnego enzymów działających w warunkach równowagi (64), można streścić następująco. Gdy aktywujemy enzym pracujący w warunkach równowagi, w stężeniach substratów i produktów reakcji przezeń katalizowanej nie zajdzie większa zmiana, albowiem i tak były one bliskie układowi stężeń, który charakteryzuje stan równowagi. Stąd też zmiana aktywności tego enzymu nie

oddziaływanie na inne etapy szlaku metabolicznego i nie może mieć w takim razie znaczenia regulacyjnego. Podobne rozumowanie można przeprowadzić omawiając przypadek inhibicji takiego enzymu. Dopiero drastyczne zahamowanie aktywności enzymu mogłoby wpłynąć na działanie całego szlaku.

Podział enzymów na bliskie i oddalone od równowagi jest często trudny do przeprowadzenia, gdy rozpatrujemy przypadek określonego szlaku metabolicznego. Stąd też nierzadko trudno jest wyznaczyć za pomocą tego kryterium enzymy o znaczeniu regulacyjnym. W komórce reakcje są jedynie, bardziej lub mniej, odsunięte od warunków równowagi. Granica oddzielająca enzymy pracujące w warunkach bliskich równowagi od tych, pracujących z dala od równowagi jest umowna. Zwykle przyjmuje się, że enzymy pracujące w warunkach stosunku ilorazu masowego reakcji do stałej równowagi reakcji (Γ/K_{eq}) większego od 0.2, można uznać za enzymy bliskie równowagi (64). Ale czy rzeczywiście takie reakcje nie mogą mieć znaczenia regulacyjnego?

W modelu Wilsona, Erecińskiej i Krebsa postulowano stan równowagi pomiędzy ΔG_{Pz} i wewnątrzmitochondrialnym ΔG_{ox} (reakcja 2). Jeżeli tak jest, to w zgodzie z ogólną prawidłowością termodynamiczną, równowaga istnieje też na poziomie wszystkich reakcji pośrednich. Jedną z takich reakcji, tak jak to przedstawiono na schemacie 1, jest translokacja nukleotydów adeninowych. Na tym właśnie punkcie skupiły się badania kilku grup, które postawiły sobie za cel stwierdzenie, czy w fosforylujących mitochondriach translokaza nukleotydów adeninowych pracuje w warunkach bliskich równowagi (30, 65—67, 61, 12, 55).

Translokazę nukleotydów adeninowych opisano już wcześniej (68—70). W ramach tego artykułu przypomnijmy jedynie, że jest to układ katalizujący transport nukleotydów adeninowych przez błonę mitochondrialną. ADP i ATP, bowiem tylko te nukleotydy są substratami translokazy, transportowane są na zasadzie wymiany. Na każdą cząsteczkę ATP przeniesioną z mitochondrialnej matryks do przestrzeni pozamitochondrialnej przypada cząsteczka ADP wnikać do mitochondriów. System ten jest układem transportowym; jak więc zdefiniować w tym wypadku stan równowagi?

Substratami translokazy są, najprawdopodobniej, w pełni zjonizowane cząsteczki, ATP^{4-} i ADP^{3-} (10—11). Oznacza to, że korzystając z potencjału elektrycznego na błonie ($\Delta \Psi$) translokaza buduje różnice stężeń ATP/ADP po obu stronach błony. Stan równowagi opisuje więc następujące równanie (71):

$$\Delta \Psi = RT/F \ln (ATP/ADP)_{zew.} / (ATP/ADP)_{wew.} \quad \dots\dots 6.$$

Na podstawie tego wzoru i w oparciu o dane przedstawiające stężenia wewnątrz- i zewnątrz-mitochondrialne nukleotydów adeninowych w wątrobie, próbowano obliczyć $\Delta \Psi$ błony mitochondrialnej w tym organie

(72—73). Podejście to jest jednak utrudnione faktem, że tylko nieskompleksowane z jonami wapnia i magnezu nukleotydy adeninowe są substratami translokazy i dlatego też przedstawiony wzór (równanie 6) jedynie do takich postaci nukleotydów się odnosi. W komórce, zarówno w mitochondriach jak i w cytoplazmie, jedynie bardzo niewielka frakcja ATP czy ADP pozostaje nieskompleksowana. Obliczenie stężeń nieskompleksowanych, całkowicie zjonizowanych nukleotydów na podstawie oznaczonych w komórce lub mitochondriach stężeń całkowitych jest bardzo trudne (11). Duże kłopoty sprawia też dokładne oznaczenie wartości potencjału błonowego innymi metodami (17, 45—46). Dlatego też podejście, w którym sprawdza się czy translokaza jest w równowadze na podstawie porównywania wartości i zmierzonych różnic w stosunkach ATP/ADP (równanie 6), jest poddawane w wątpliwość.

O wiele pewniejsze wydaje się podejście polegające na porównaniu pul nukleotydów adeninowych w mitochondriach pracujących z różnym obciążeniem translokazy nukleotydów adeninowych. Przykładem może być doświadczenie, którego wyniki podano w tabeli II (65).

Tabela II

Pule nukleotydów adeninowych w preparatach mitochondrialnych oddychających z tą samą szybkością i syntetyzujących a) cytrulinę i b) glukozo-6-fosforan (według 65)

	Wewnątrzmitoch.	Zewnątrzmitoch.
a) synteza cytruliny		
ATP	10.2 (nmole/mg białka)	153 (μ M)
ADP	3.1 (nmole/mg białka)	2.9 (μ M)
ATP/ADP	3.3	53
b) synteza glukozo-6-fosforanu		
ATP	9.6 (nmole/mg białka)	151 (μ M)
ADP	3.0 (nmole/mg białka)	6.6 (μ M)
ATP/ADP	3.2	23

W tabeli przedstawiono wewnątrz- i zewnątrz-mitochondrialne stosunki ATP/ADP w zawiesinie mitochondriów, które inkubowano w dwóch układach: a) syntezy glukozo-6-fosforanu, w którym translokaza pracuje intensywnie i b) syntezy cytruliny, w którym obciążenie translokazy jest nieznaczące. Stwierdzono, że przy identycznej szybkości oddychania, wewnątrzmitochondrialne stosunki ATP/ADP są takie same w obu tych układach. Taka sama jest też wartość potencjału elektrycznego na błonie, $\Delta \Psi$ (nie pokazano). W wewnątrzmitochondrialnych stosunkach ATP/ADP obserwujemy jednak istotne różnice. Wytlumaczyć je można jedynie zakładając, że translokaza nukleotydów adeninowych w fosforylujących mitochondriach nie jest ani w równowadze, ani też blisko równowagi. Dalsze prace poparły tę konkluzję (74—75).

Czy jednak wykazanie, że translokaza nie jest w tych warunkach w równowadze, jest równoznaczne z postulowaniem jej roli regulacyjnej (1)? Wiemy jak umowne jest określenie granicy między reakcjami bliskimi i oddalonymi od równowagi. Na skutek tej umowności dwie grupy, po wykonaniu prawie że identycznych doświadczeń i uzyskaniu podobnych wyników, wyciągały przeciwne wnioski. Na podstawie miareczkowania atraktylozydem hepatocytów w warunkach aktywnej glukoneogenezy Akerboom i wsp. (60) postulowali regulacyjną rolę translokazy nukleotydów adeninowych, podczas gdy Stubbs i wsp. (76) wykluczali ją.

W rozpatrywaniu roli regulacyjnej enzymu bardzo pomocne okazuje się kryterium siły kontrolowania (C_i) (77—78, 1). Jest ono znacznie precyzyjniejsze od omawianego powyżej kryterium oddalenia reakcji od stanu równowagi. Siła kontrolowania to współczynnik określający, jak zmiana aktywności, wybranego enzymu (E_i) wpływa na przepływ przez szlak metaboliczny (J):

$$C_i = \frac{\delta J}{\delta E_i} \frac{E_i}{J} \quad \dots\dots 7$$

Współczynnik ten został niezależnie wprowadzony przez Higginsa (79, 80), Kacsera i Burnsa (77, 78) i Heinricha ze współpracownikami (81—83). Wysoka siła kontrolowania świadczy o dużej możliwości odgrywania przez enzym roli regulacyjnej. Dodajmy jeszcze, że suma sił kontrolowania wszystkich enzymów szlaku jest równa jedności ($\sum C_i = 1$), tak więc za wysokie siły kontrolowania można uznać te przewyższające wartość 0.2. Olbrzymie znaczenie dla szerszego wprowadzenia analizy sił kontrolowania do badań biochemicznych miało opracowanie metody, według której możliwe jest ich oznaczenie z zastosowaniem inhibitorów (84). To właśnie dzięki tej metodzie grupa J. M. Tagera z Amsterdamu zmierzyła w fosforylujących mitochondriach siłę kontrolowania translokazy nukleotydów adeninowych w odniesieniu do mitochondrialnego oddychania (85). Okazało się, że siła ta zmienia się w zależności od obciążenia tego układu transportującego. W mitochondriach zawieszonych w środowisku z heksokinazą i glukozą przy maksymalnej szybkości oddychania (stan III (28)) siła ta może osiągnąć wartość około 0.3. Jest to już znaczna siła kontrolowania. Badania te potwierdzają więc możliwość roli regulacyjnej translokazy nukleotydów adeninowych (30, 65, 67).

Wahania w wartości siły kontrolowania translokazy nukleotydów adeninowych są związane ze zmiennością wielkości sił kontrolowania innych reakcji układu oksydacyjnej fosforylacji w zależności od szybkości oddychania. Stwierdzono, że reakcjami charakteryzującymi się znacznymi siłami kontrolowania mogą być: bierna przenikalność błony dla protonów (wysoka siła kontrolowania szybkości oddychania zbliżonych do stanu

IV (28)), reakcja heksokinazy (wysoka siła kontrolowania przy szybkościach pośrednich między stanem IV i III (28)), transport substratów.

W chwili obecnej zmierzono już siłę kontrolowania translokazy nukleotydów adeninowych w stosunku do oddychania hepatocytów produkujących glukozę (86). Okazało się, że i w tym układzie translokaza posiada znaczącą siłę kontrolowania.

Przedstawione badania są jeszcze dalekie od ukończenia. Wielu jednak z opisanych tu obserwacji nie można ująć w kategoriach konstrukcji Wilsona, Erecińskiej i Krebsa. Przytoczone tu: zachowanie się translokazy nukleotydów adeninowych jak układu odsuniętego od równowagi (85, 12, 65, 30, 67, 75), jej wysoką siłę kontrolowania w odniesieniu do oddychania w mitochondriach (85) jak i w izolowanych komórkach wątrobowych (86), niską siłę kontrolowania oksydazy cytochromowej w stosunku do mitochondrialnego oddychania (85, 87) trudno wyjaśnić z punktu widzenia modelu Wilsona i współpracowników. Dlatego też w chwili obecnej jesteśmy w fazie budowania innego, znacznie bardziej dynamicznego i szerszego opisu regulacji oddychania mitochondrialnego.

VI. Słowniczek ważniejszych wyrażań i skrótów.

ΔpH — różnica pH w dwóch przestrzeniach rozdzielonych wewnętrzną błoną mitochondrialną.

$\Delta\Psi$ — (błonowy potencjał elektryczny, potencjał błonowy) różnica potencjału elektrycznego dwóch przestrzeni rozdzielonych wewnętrzną błoną mitochondrialną; wyrażana w mV.

Δp — ($\Delta\mu_{H^+}$, siła protonomotoryczna, różnica potencjałów elektrochemicznych protonów w dwóch przestrzeniach rozdzielonych wewnętrzną błoną mitochondrialną, tj. w matriks mitochondrialnej i w przestrzeni pozamitochondrialnej (pomiędzy przestrzeniami międzybłonową a przestrzenią zewnątrzmitochondrialną nie ma bariery dla H^+); $p = \Delta\Psi + 59 \Delta pH$, wyrażana w mV.

Potencjał fosforylacyjny — swobodna energia reakcji katalizowanej przez syntezę

$$ATP; \Delta G = \Delta G^\circ + 2.3 RT \log_{10} \frac{ADP P}{ATP}, \text{ gdzie } \Delta G^\circ = 2.3 RT \log_{10} K_{eq}. \text{ Jest to}$$

ujęcie uproszczone, albowiem przyjmujące następującą formułę reakcji katalizowanej przez syntetazę ATP; $ADP + P_i \rightarrow ATP$. Uwzględnienie bardziej dokładnego zapisu tej reakcji: $ATP Mg^{2-} + H_2O \rightarrow ADP Mg^{-} + P_i^{-} + H^+$, sprawia, że do wyrażenia na potencjał fosforylacyjny wprowadza się ostatnio poprawki na efekty pH i stężenia Mg^{2+} .

ΔG_{P_w} — potencjał fosforylacyjny w mitochondrialnej matriks.

ΔG_{P_z} — potencjał fosforylacyjny w przestrzeni pozamitochondrialnej.

ΔG_{ox} — potencjał oksydoredukcyjny substratów łańcucha oddechowego; wyrażana w mV.

Spoczynkowy stan oddychania — (stan IV w terminologii Chance'a i Williamsa (28)) szybkość oddychania mitochondriów zawieszonych w izotonicznym medium z dodatkiem substratu oddechowego, ale z wyczerpanym akceptorem fosforanu (ADP).

Aktywny stan oddychania — (stan III w terminologii Chance'a i Williamsa (18)) szybkość oddychania mitochondriów zawieszonych w izotonicznym medium, w skład którego wchodzi substrat oddechowy, ADP i P_i .

Rozprzegacz — substancja zdolna do przenoszenia protonów przez błonę lipidową. Jej cząsteczka może przyjmować lub oddysocjowywać proton. W obu formach, zarówno uprotonowanej jak i zdysocjowanej, cząsteczka rozprzegacza przenika przez błonę. Działanie rozprzegaczy powoduje zniesienie Δp .

P/O — liczba cząsteczek ADP, które zostają ufosforylowane do ATP przy przejściu dwóch elektronów z substratu oddechowego, przez łańcuch oddechowy, na tlen (zredukowanie $1/2 O_2$ do wody).

P_i — ortofosforan.

c^{2+} — zredukowany cytochrom c.

c^{3+} — utleniony cytochrom c.

K_{eq} — stała równowagi reakcji, stosunek iloczynu stężeń produktów do iloczynu stężeń substratów reakcji w warunkach jej równowagi.

Γ — iloraz masowy reakcji, stosunek iloczynu stężeń produktów do iloczynu stężeń substratów reakcji w warunkach branych pod uwagę.

Siła kontrolowania — (C_i) współczynnik określający, jak wahania w ilości określonego enzymu (E_i) wpływają na przepływ przez cały szlak metaboliczny.

R — stała gazowa = $0.0083 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

T — temperatura wyrażona w skali Kelvina K.

F — stała Faradaya = $0.0965 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$.

CCCP — karbonylocjanek chlorofenylohydrazyn.

Uwaga. Dla uproszczenia zapisu równań, przy wyrażaniu stężeń ominięto tradycyjne nawiasy kwadratowe.

Zaakceptowano do druku 6.09.1982

PISMIENICTWO

- Duszyński J., *Post. Biochem.*, **29**, 3—15, 1983.
- Wilson D. F., Owen C. S., Holian A., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 749—762.
- Erecińska M., Veech R. L., Wilson D. F., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 412—421.
- Wikstrom M. K. F., Krab K., (1974), *Biochem. Biophys. Acta*, **549**, 177—222.
- Wilson D. F., (1980) w *Membrane Structure and Function*, red. Bittar E. E., str. 153—195, John Wiley and Sons, New York.
- Mitchell P., (1961), *Nature* **191**, 423—427.
- Mitchell P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **95**, 1—20.
- Mitchell P., (1979), *Science* **206**, 1148—1159.
- Nichols D. G., (1982) *Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory*, Academic Press, London.
- LaNoue K., Mizani S. M., Klingenberg M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 191—198.
- Duszyński J., Savina M. V., Wojtczak L., (1978), *FEBS Lett.*, **86**, 9—13.
- Letko G., Kuster U., Duszyński J., Kunz W., (1980), *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 196—203.
- Slater E. C., Rosing J., Mol A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 534—553.
- Heldt H. W., Klingenberg M., Milowancew M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 434—440.
- Slater E. C., (1977), *Annu. Rev. Biochem.*, **96**, 1015—1026.
- Tedeschi H., (1979), *Trends Biochem. Sci.*, **4**, N182—N185.
- Holian A., Wilson D. F., (1980), *Biochemistry* **19**, 4213—4221.

18. Boyer P. D., (1977), *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 38—41.
19. Williams R. J. P., (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 1—44.
20. Yaguzhinsky L. S., Krasiskaya J. P., Dragunova S. F., Zni-chenko V. P., Evtodienko Yu. V., (1979), *Biofizika* **24**, 1100—1103.
21. Tu S.-J., Lam E., Ramirez F., Marecek J., (1981), *Biochemistry* **113**, 391—396.
22. Azzone G. F., Pozzan T., Massari S., Bragadin M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **501**, 296—306.
23. Chefurka W., (1981), *Comp. Biochem. Physiol.*, **69**, 361—370.
24. Sorgato M. C., Branca D., Ferguson S. J., (1980), *Biochem. J.*, **188**, 945—948.
25. Rottenberg H., (1975), *Bioenergetics* **7**, 61—74.
26. Van Dam K., Wiechmann A. C. H., Hellingeverf K. J., Arents J. C., Westerhoff H. V., (1977), w Proc. 11th FEBS Meeting Copenhagen, str. 121—132, Pergamon Press, Oxford.
27. Kell D. B., (1979), *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 54—99.
28. Chance B., Williams G. R., (1955), *J. Biol. Chem.*, **217**, 409—427.
29. Davis E. J., Lemeng L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2275—2282.
30. Kuster U., Bohnensack R., Kunz W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta* **440**, 391—402.
31. Skulachev V. P., Yaguzhinsky L. S., Jasaitis A. A., Liberman R. A., Topali V. P., Zofina L. A., (1969), w The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, red. Papa S., Tager J. M., Quagliariello E., Slater E. C., str. 283—298, Adriatica Editrice, Bari.
32. van Dam K., Kraayenhof R., (1969), w The Energy Level and Metabolite Control in Mitochondria, red. Papa S., Tager J. M., Quagliariello E., Slater E. C., str. 299—308, Adriatica Editrice, Bari.
33. Carafoli E., Rossi C. S., Lehninger A. L., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2254—2261.
34. Mitchell P., Moyle J., (1967), *Biochem. J.*, **105**, 1147—1162.
35. Ochoa S., (1943), *J. Biol. Chem.*, **151**, 493—505.
36. Hinkle P. C., Yu M. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2450—2455.
37. Duszyński J., Bogucka K., Letko G., Kuster U., Wojtczak L., (1981), w Vectorial Reactions in Electron and Ion Transport in Mitochondria and Bacteria, red. Palmieri F., Elsevier, North Holland, Amsterdam.
38. Brand M. D., (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 874—880.
39. Duszyński J., Bogucka K., Letko G., Kuster U., Kunz W., Wojtczak L., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 217—223.
40. Vignais P. V., Vignais P. M., Doussiere J., (1975), *Biochim Biophys. Acta*, **376**, 219—230.
41. Brawand F., Folly G., Walter P., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 285—289.
42. Nicholls D. G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 305—315.
43. Azzone G. F., Bragadin M., Pozzan T., Dell'Antone P., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **459**, 96—109.
44. Skulachev V. P., (1971), *Curr. Top. Bioenerg.*, **4**, 127—190.
45. Rottenberg H., (1979), *Methods in Enzymology*, **55**.
46. Shen C., Boens C. C., Ogawa S., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 243—249.
47. Kunz W., Bohme G., Kunz W. S., Schonfeld P., (1981), w Vectorial Reactions in Electron and Ion Transport in Mitochondria and Bacteria, red. Palmieri F., Elsevier, North Holland, Amsterdam.

48. Wilson D. F., Erecińska M., (1972), w *Mitochondria/Biomembranes*, str. 119—132, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
49. Wilson D. F., Erecińska M., Owen C. S., Mela L., (1974), w *Dynamics of Energy Transducing Membranes*, red. Ernster L., Estabrook R. W., Slater E. C., str. 221—231, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
50. Holian A., Owen C. S., Wilson D. F., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 164—171.
51. Wilson D. F., Stubbs M., Veech R. L., Erecińska M., Krebs H. A., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 57—64.
52. Erecińska M., Wilson D. F., (1978), *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 219—223.
53. Erecińska M., Wilson D. F., Nishiki K., (1978), *Am. J. Phys.*, **234**, 82—89.
54. Lowry O. H., Carter J., Ward J. B., Glaser L., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6511—6521.
55. Bohnensack R., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **634**, 203—218.
56. Atkinson D. F., (1971), w *Metabolic Pathways*, red. Vogel H. J., tom 5, str. 1—21, Academic Press, New York.
57. Erecińska M., Stubbs M., Miyata Y., Ditre C. M., Wilson D. F., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 20—35.
58. Wilson D. F., Owen C. S., Erecińska M., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 494—504.
59. Wilson D. F., Erecińska M., Drown C., Silver J. A., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 485—493.
60. Akerboom T. P. M., Bookelman H., Zuurendonk P. F., van der Meer R., Tager J. M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 413—420.
61. van der Meer R., Akerboom T. P. M., Groen A. K., Tager J. M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 421—428.
62. van der Meer R., (1979), *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 64—65.
63. Rottenberg H., (1979), *Progress in Surface and Membrane Sci.*, **12**, 245—325.
64. Rolleston F. G., (1972), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **5**, 47—75.
65. Kuster U., Letko G., Kunz W., Duszyński J., Bogucka K., Wojtczak L., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **636**, 32—38.
66. Letko G., Kuster U., (1979), *Acta Biol. Med. Ger.*, **38**, 1379—1385.
67. Kunz W., Bohnensack R., Kuster U., Letko G., Schonfeld P., (1979), w *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport*, red. Quagliariello E., Palmieri F., Papa S., Klingenberg M., str. 313—316, Elsevier, Amsterdam.
68. Duszyński J., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 275—293.
69. Vignais P. V., Lauquin G. J. M., (1979), *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 90—92.
70. Klingenberg M., (1979), *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 249—252.
71. Klingenberg M., Rottenberg H., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 125—130.
72. Soboll S., Elbers R., Scholz R., Heldt H. W., (1980), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 69—77.
73. Soboll S., Bunger R., (1981), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**, 125—132.
74. Wanders R. J. A., van Woerkom G. M., Nooteboom R. F., Meijer A. J., Tager J. M., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **113**, 295—302.

75. Wanders R. J. A., Groen A. K., Meijer A. J., Tager J. M., (1981), *FEBS Letters*, **132**, 201—206.
76. Stubbs M., Vignais P. V., Krebs H. A., (1978), *Biochem J.*, **172**, 333—342.
77. Kacser H., Burns J. A., (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 1149—1161.
78. Kacser H., Burns J. A., (1973), w *Rate Control of Biological Processes*, red. Davies D. D., str. 65—109, Cambridge University Press, London.
79. Higgins J., (1963), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **108**, 305—321.
80. Higgins J., (1965) w *Control of Energy Metabolism*, red. Chance B., Estabrook R. K., Williamson J. R., str. 13—46, Academic Press, New York.
81. Heinrich R., Rapoport T. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 89—95.
82. Heinrich R., Rapoport T. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 97—105.
83. Heinrich R., Rapoport T. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 107—120.
84. Groen A. K., van der Meer R., Westerhoff H. V., Wanders R. J. A., Akerboom T. P. M., Tager J. M., (1982), w *Metabolic Compartmentation* (wyd. H. Sies), Academic Press, New York, str. 9—37.
85. Groen A. K., Wanders R. J. A., van der Meer R., Westerhoff H. V., Tager J. M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2754—2757.
86. Duszyński J., Groen A. K., Wanders R. J. A., Tager J. M., w przygotowaniu.
87. Letko G., Kuster U., Bohnensack R., Bohme G., Kunz W., (1981), 9th Colloquium on Bioenergetics and Mitochondria-Wernigerode, Abstract Book, L 4.2.

ANDRZEJ KOZIK *)

Chromatograficzne i elektroforetyczne metody wyznaczania parametrów oddziaływania białko—ligand.

Chromatographic and Electrophoretic Methods for Determination of the Parameters of Protein—Ligand Interactions

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Teoretyczny opis wiązania ligandu przez białko**
- III. Chromatograficzne sączenie molekularne**
 - III-1. Najprostsze zastosowania**
 - III-2. Metody równowagowe**
- IV. Ilościowa chromatografia powinowactwa**
- V. Klasyczne metody elektroforetyczne**
- VI. Elektroforeza powinowactwa**

Contents

- I. Introduction**
- II. Theoretical characteristics of ligand binding to proteins**
- III. Gel filtration**
 - III-1. The simplest applications**
 - III-2. Equilibrium methods**
- IV. Quantitative affinity chromatography**
- V. Classical electrophoretic methods**
- VI. Affinity electrophoresis**

I. Wstęp

Odwracalne tworzenie kompleksów białek z drobnocząsteczkowymi ligandami odgrywa kluczową rolę w najważniejszych procesach biochemicznych. Kompleksy takie powstają wskutek oddziaływania enzymów z substratami i efektorami, apoenzymów z koenzymami, hormonów z receptorami komórkowymi, leków i witamin z białkami transportującymi itd.

*) Dr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków.

Badaniom mechanizmu wiązania różnych substancji przez białka przynajmniej się przeto w wielu dziedzinach biochemii znaczenie podstawowe.

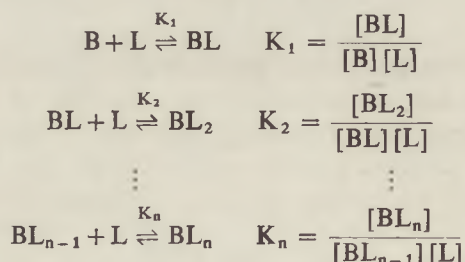
Pierwszym etapem takich badań jest termodynamiczna charakterystyka omawianego równowagowego procesu. Najważniejsze parametry termodynamiczne opisujące ilościowo kompleks białko-ligand, to maksymalna liczba cząsteczek ligandu przypadająca na jedną makrocząsteczkę białkową, precyzująca stechiometrię kompleksu, oraz stała równowagi jego tworzenia, która jest miarą mocy rozważanego oddziaływania. Opracowano wiele metod doświadczalnego wyznaczania tych parametrów.

Stosunkowo rzadko wykorzystywane były do tych celów techniki chromatograficzne i elektroforetyczne. W ostatnich latach zaproponowano wiele istotnych modyfikacji i udoskonaleń klasycznych metod tej grupy. Wykazano również możliwość zastosowania do badania oddziaływania białko-ligand burzliwie rozwijających się technik powinowactwa biologicznego.

Niniejszy artykuł stanowi przegląd różnych metod chromatograficznych i elektroforetycznych pod kątem ich zastosowania do wyznaczania parametrów wiązania drobnocząsteczkowych ligandów przez białka. Uwytklono niektóre szczególnie korzystne cechy tych metod w porównaniu z innymi technikami służącymi podobnym celom. Zasadniczy przegląd poprzedzony jest krótką informacją o teoretycznych sposobach analizy danych uzyskiwanych doświadczalnie.

II. Teoretyczny opis wiązania ligandu przez białko

Wielkościami, charakteryzującymi oddziaływanie białko-ligand a wyznaczalnymi doświadczalnie są: stopień wiązania, wyrażany zwykle jako średnia liczba cząsteczek ligandu związanego przez jedną cząsteczkę białka (r), oraz równowagowe stężenie ligandu ($[L]$). Z wykresu ($[L]$), stanowiącego izotermę wiązania (1) można odczytać termodynamiczne parametry tylko po założeniu określonego modelu oddziaływania (2). Najczęściej stosowany ogólny model opiera się na prawie działania mas i zakłada istnienie wielostopniowej równowagi (3, 4):



B oznacza tutaj białko, L — monowalentny ligand, n — liczbę miejsc

wiązących ligand w makrocząsteczce. Z zależności tych łatwo wyprowadza się równanie Adaira (5):

$$r = \frac{K_1 [L] + 2K_1 K_2 [L]^2 + \dots + nK_1 K_2 \dots K_n [L]^n}{1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [L]^n} \quad (\text{równanie 1})$$

W najprostszym możliwym przypadku, gdy wszystkie miejsca wiążące są identyczne i nie oddziałują ze sobą, otrzymuje się równanie (6—8):

$$r = \frac{nK[L]}{1 + k[L]} \quad (\text{równanie 2})$$

gdzie k — oznacza tzw. mikroskopową (wewnętrzną) stałą asocjacji charakteryzującą hipotetyczną równowagę:

miejsce nieobsadzone + L \rightleftharpoons miejsce związane z L.

Zależność między stałą k a stałymi z równania 1 jest następująca:

$$K_i = k \frac{n-i-1}{i}$$

Jeżeli wszystkie miejsca wiążące można podzielić na m klas, w obrębie których miejsca są identyczne i niezależne, wtedy (9, 10):

$$r = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i [L]}{1 + k_i [L]} \quad (\text{równanie 3})$$

Dopasowywanie równań teoretycznych do danych doświadczalnych przeprowadza się obecnie najczęściej metodami numerycznymi przy zastosowaniu maszyn cyfrowych (11—15). Tracą natomiast na znaczeniu metody graficzne, oparte na liniowych transformacjach równania 2, np. na wykresie Scatcharda (6):

$$\frac{r}{[L]} = kn - kr \quad (\text{równanie 4})$$

Wykres Scatcharda $\frac{r}{[L]}$ ($[L]$) nie jest już linią prostą w przypadku modelu makrocząsteczki z kilkoma klasami miejsc identycznych i nieoddziałujących ze sobą (10). Przy rozkładzie takich krzywoliniowych wykresów na proste składowe wielu badaczy kieruje się intuicją, co z reguły prowadzi jednak do rażących błędów (16). Podano kilka teoretycznie prawidłowych graficznych metod analizy (9, 13, 17, 18). W praktyce można je jednak zastosować tylko do analizy układów, w których występują najwyżej 2 klasy miejsc wiążących.

Krzywoliniowość wykresu Scatcharda może wskazywać również na oddziaływanie wzajemne między miejscami wiążącymi czyli tzw. kooperatywność (19, 20). Przyłączenie cząsteczek ligandu do pewnych miejsc może zmniejszać (kooperatywność ujemna) lub zwiększać (kooperatywność dodatnia) powinowactwo innych miejsc do ligandu. Efekty takie są

charakterystyczne m.in. dla enzymów allosterycznych (21, 22). Często stosowany, ilościowy sposób charakteryzowania kooperatywności w układach białko-ligand polega na podaniu tzw. współczynnika Hilla (23) tj. współczynnika n_H w równaniu

$$r = \frac{nk [L]^{n_H}}{1 + k [L]^{n_H}} \quad (\text{równanie 5})$$

przy czym $n_H \leq n$. W przypadku kooperatywności ujemnej $n_H < 1$, w przypadku kooperatywności dodatniej $n_H > 1$.

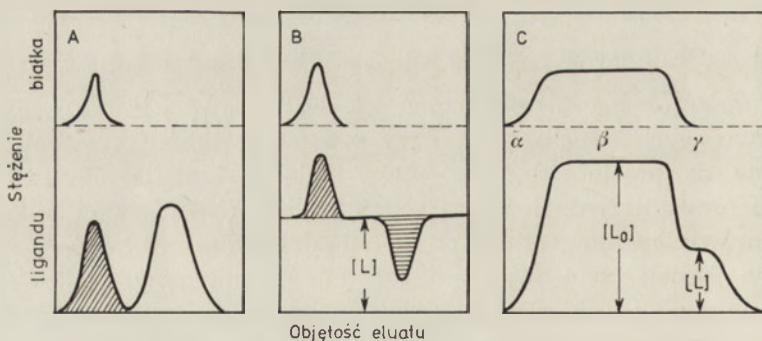
III. Chromatograficzne sączenie molekularne

III-1. Najprostsze zastosowania

W przypadkach, gdy tworzenie kompleksu białko-ligand jest procesem bardzo powolnym (24), izotermę wiązania można wyznaczyć w bardzo prosty sposób. Białko inkubuje się z ligandem do ustalenia równowagi, po czym oddziela się ligand wolny od białka zawierającego ligand związany (ryc. 1A). Z ilości ligandu we frakcji białkowej oblicza się wartości r i $[L]$, odnoszące się do wyjściowej mieszaniny inkubacyjnej. Stanowią one współrzędne pojedynczego punktu izotermy.

Metodą tą wyznaczano m.in. parametry oddziaływania hormonów steroidowych z receptorami, przy zastosowaniu chromatografii na żelach Sephadex, zarówno kolumnowej (25—27) jak i cienkowarstwowej (28).

Jeżeli w trakcie chromatografii może występować częściowa dysocjacja kompleksu białko-ligand, mierzone wartości r są systematycznie заниżane. Powoduje to nie tylko błędy w oszacowaniu parametrów wiązania,



Ryc. 1. Profile wymywania w metodach chromatograficznego sączenia molekularnego, wykorzystywanych do wyznaczania parametrów oddziaływania ligand-białko. A. Prosty rozdział ligandu związanego z białkiem od ligandu wolnego, B. Metoda Hummela i Dryera, C. Technika analizy czołowej. Z zakreskowanych obszarów na Ryc. A i B oblicza się ilość ligandu związanego z białkiem.

ale również zniekształcenia wykresu Scatcharda, co prowadzić może do przyjęcia fałszywego modelu badanej równowagi (29).

Częściowa dysocjacja kompleksu ligand-białko może występować wskutek kompetycyjnego wiązania ligandu przez żel, zachodzącego w trakcie chromatografii. Adsorpcję na żelach Sephadex obserwowano w przypadku wielu ligandów, m.in. sterydów i licznych barwników. Zaproponowano metody uwzględniania tego zjawiska w obliczeniach prawidłowych wartości funkcji r (27, 30). Mieszaninę inkubacyjną odpowiadającą pojedynczemu punktowi na izotermie wiązania dzieli się na kilka porcji, które poddaje się sączeniu molekularnemu na kolumnach zawierających różne ilości żelu (27). Wyznaczone wartości r są tym mniejsze im wyższa jest zawartość żelu w kolumnie. Z ekstrapolacji do zerowej zawartości żelu otrzymuje się poprawioną wartość r , używaną do konstrukcji wykresu Scatcharda. Opisana procedura ekstrapolacyjna pozwala również na uwzględnienie stosunkowo rzadkiego zjawiska adsorpcji białek na żelach chromatograficznych. Stwierdzono np. że albumina surowicy wiąże się z żelem Sephacryl (31).

Opisana w tym rozdziale prosta metoda chromatograficznego wyznaczania parametrów wiązania wymaga odpowiedniego doboru żelu, tak aby następowało dokładne oddzielenie ligandu związanego od ligandu wolnego. Przedstawiono teoretyczną analizę wpływu niepełnych rozdzielów na kształt i parametry wykresu Scatcharda (32). W badaniach oddziaływania białek z drobnocząsteczkowymi ligandami czynnik ten nie odgrywa jednak poważniejszej roli.

III-2. Metody równowagowe

Teoretycznie poprawniejsze metody muszą uwzględniać fakt, że w trakcie chromatografii mieszaniny białka i ligandu równowadze tworzenia kompleksu towarzyszy równowaga podziału wszystkich składników pomiędzy fazę ruchomą i fazę stacjonarną. Jest to szczególnie ważne wtedy, gdy asocjacja lub dysocjacja kompleksu przebiega z szybkością porównywalną lub wyższą niż prędkość, z jaką prowadzi się rozdział chromatograficzny (33).

Najstarsza z tych metod opisana została przez Hummela i Dryera (34). Na kolumnę z żelem, zrównoważoną i przemywaną buforem zawierającym ligand w określonym stężeniu, nakłada się próbkę białka rozpuszczonej w tym samym roztworze. W trakcie strefowej chromatografii białko ulega nasyceniu ligandem do takiego stopnia r , jaki odpowiada użytemu stężeniu ligandu $[L]$. Profil elucji (ryc. 1 B) charakteryzuje się linią podstawową, określającą równowagowe stężenie ligandu $[L]$, dodatnim szczytem zawartości ligandu pokrywającym się ze szczytem białkowym, oraz ujemnym pasmem o objętości wpływu takiej, jak dla

ligandu wolnego. Ilość ligandu związanego obliczyć można przez scałkowanie szczytu dodatniego lub ujemnego.

Chromatografia musi zapewnić całkowity rozdział obu pasm, przy czym białko nie może być oddzielane od kompleksu. Wymaganie to można łatwo spełnić wybierając taki typ żelu, w którym białko oraz kompleks wypływają w objętości pustej. Ponadto tworzenie kompleksu musi być procesem dostatecznie szybkim. Nie jest natomiast konieczne uwzględnianie ewentualnego zjawiska wiązania ligandu przez żel.

Zaletą metody Hummela i Dryera jest prostota oraz stosunkowo niewielkie zużycie białka. Pod względem precyzji z pewnością nie ustępuje ona klasycznej dializie równowagowej (35).

Omawianą technikę zastosowano z powodzeniem m.in. do badania oddziaływania pochodnych tryptofanu (35) oraz detergentów (36) z albuminą surowicy, różnych enzymów z ich efektorami i substratami (37—39), solubilizowanych receptorów błonowych z toksynami (40), czynników białkowych z fluoryzującą sondą hydrofobową — anilinaftalenosulfonianem (41, 42) i in.

Teoretyczne rozważania nad kształtami profili elucji w chromatografii żelowej prowadzonej techniką analizy czołowej wykazały możliwość zastosowania tej metody do badania szybko ustalających się równowag, m.in. typu $P+nQ \rightleftharpoons PQ_n$ (43—47). Zasada metody jest następująca (ryc. 1 C). Na kolumnę zrównoważoną buforem wprowadza się mieszaninę białko-ligand aż do zaobserwowania w wycieku plateau (obszar β na ryc. 1 C) o stężeniu składników identycznym, jak w mieszaninie wyjściowej. Wymywanie kontynuuje się przy użyciu buforu, przy czym na zstępującym ramieniu profilu elucji pojawia się drugie plateau (obszar γ), którego poziom odpowiada równowagowemu stężeniu ligandu $[L]$ (48, 49). Metoda jest stosowalna w przypadkach, gdy kompleks oraz wolne białko poruszają się w żelu z jednakową szybkością, znacznie jednak wyższą niż wolny ligand. Migracja kompleksu białkowego musi być ponadto niezależna od stężenia zarówno białka jak i ligandu (48). Nie jest konieczne jakiegokolwiek uwzględnianie ewentualnego oddziaływania żel-ligand, gdyż w momencie ustalenia plateau pojemność wiążąca żelu zostaje wysyciona w stopniu, odpowiadającym wartości równowagowego stężenia ligandu, lub całkowicie w przypadku adsorpcji nieodwracalnej. W odróżnieniu od metody Hummela i Dryera technika czołowa pozwala na badanie układów, w których kinetyka wiązania jest stosunkowo wolna. Ponieważ pomiary stężenia ligandu w obszarach plateau β i γ wykonuje się w wielu frakcjach, wyznaczone wartości mogą być uśredniane i poddawane statystycznej analizie. Zapewnia to dużą precyzję oznaczenia (49).

Niewątpliwym ograniczeniem metody jest natomiast konieczność zużycia dużych ilości białka. W niektórych przypadkach można jednak

frakcje z obszaru plateau β wykorzystać do wyznaczenia kolejnego punktu izotermy wiązania, odpowiadającego wyższemu stężeniu ligandu.

Technika wysycania równowagowego (50—52) oparta jest na bezpośrednim optycznym skanowaniu małej chromatograficznej kolumny, wysycanej roztworem zawierającym białko i ligand. Stosunek mierzonych wartości absorbancji (po uwzględnieniu linii podstawowej, otrzymanej po zrównoważeniu żelu buforem) w obszarze zawierającym żel oraz w obszarze ponad żelem jest równy tzw. przekrojowi podziału ξ , reprezentującemu objętość rozdziału składnika na jednostkę długości kolumny. Dla składnika j:

$$\xi_j = \alpha + \beta \sigma_j$$

gdzie: α oznacza przekrój objętości pustej, β — przekrój objętości wewnętrznej, a σ — współczynnik podziału. W wyniku pomiarów otrzymuje się wartości ξ , α i β , znormalizowane do jednostkowej powierzchni przekroju kolumny. Równowagowe stężenie ligandu $[L]$ oblicza się z równania (51):

$$[L] + \frac{Q_L([L])}{\xi_g - \xi_b} = [L_0] \frac{\bar{\xi}_L - \xi_b}{\bar{\xi}_g - \xi_b} \quad (\text{równanie 6})$$

w którym $[L_0]$ oznacza całkowite stężenie ligandu, a $Q_L([L])$ — stężenie ligandu związanego przez żel. Przekroje podziału oblicza się nasycając kolumnę buforem zawierającym substancję nie ulegającą wiązaniu przez żel, np. glicyloglicynę ($\xi_g = \alpha + \beta$), buforem zawierającym samo białko (ξ_b , zwykle równe α) lub buforem zawierającym białko w stężeniu $[B_0]$ i ligand w stężeniu $[L_0]$ ($\bar{\xi}_L$). Izotermę wiązania ligandu przez żel $Q_L([L])$ należy wyznaczyć wcześniej, nasycając kolumnę buforem zawierającym sam ligand, w stężeniu $[L]$ i korzystając z równania:

$$Q_L = [L] (\xi_L - \xi_g) \quad (\text{równanie 7})$$

Znając $[L]$ łatwo obliczyć stopień wiązania r jako $[L_0] - [L]/[B_0]$.

Technika charakteryzuje się ogromną precyzją, jeszcze większą niż w przypadku analizy czołowej. Wynika to z faktu, że każdy z ok. 100—200 punktów otrzymywanych w wyniku skanowania traktować można jako niezależny eksperyment, co pozwala na krytyczne opracowanie statystyczne mierzonych wielkości. Duża szybkość ustalania się równowagi tworzenia kompleksu nie jest warunkiem koniecznym. Ze względu na spektrofotometryczny charakter pomiarów zakres zastosowań ogranicza się do układów, w których widma mieszanin ligand wolny-ligand związany charakteryzują się występowaniem punktu izobestycznego poza zakresem absorpcji białka. Inną wadą jest dość duże zużycie białka. Metoda wysycania równowagowego była następnie modyfikowana (53). Podobne zasady wykorzystane zostały w tzw. szerokostrefowej modyfikacji

techniki Hummela i Dryera (51). Wszystkie te metody nie zyskały jednak popularności z uwagi na konieczność użycia skomplikowanego układu eksperymentalnego.

Trudności te usunięto w opracowanej ostatnio technice cyklicznego podziału żelowego (54), w której roztwór zawierający białko i ligand przepływa w sposób ciągły przez zawieszinę żelu. Rejestruje się absorbancję krążącego roztworu.

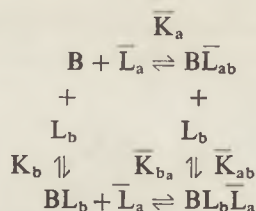
Najpierw kalibruje się układ, wyznaczając stężeniową zależność współczynnika podziału ligandu między fazę stacjonarną i ruchomą. Tym samym określa się zarazem stopień wiązania ligandu przez żel. Po wprowadzeniu do obwodu określonej ilości białka i ligandu i po ustaleniu się równowagi, oznacza się stężenie ligandu w krążącym roztworze. Uwzględniając wartość współczynnika podziału, odczytaną z krzywej kalibracyjnej, można obliczyć ilość ligandu w fazie stacjonarnej, a następnie r i $[L]$.

Zaletą techniki jest szybkie ustalanie się równowagi podziału, a także możliwość znacznej miniaturyzacji i zminimalizowania zużycia białka. Zachowana została wysoka precyzja oznaczeń, ale również wada, w postaci ograniczenia do układów izobestycznych.

IV. Ilościowa chromatografia powinowactwa

Tzw. chromatografia powinowactwa opiera się na wykorzystaniu podłoż chromatograficznych, zawierających różne ligandy unieruchomione kowalencyjnie. Ten rodzaj chromatografii adsorpcyjnej pozwala na szybkie i efektywne izolowanie białek specyficznych względem wybranego ligandu. Ogólne zasady metody oraz zakresy zastosowań omawiane są w licznych artykułach przeglądowych (55, 56), a także obszerniejszych opracowaniach (57—62). Kierunek, polegający na wykorzystaniu tej techniki do wyznaczania parametrów oddziaływań białek z innymi substancjami, określa się mianem „ilościowej chromatografii powinowactwa” (63).

Jej rozwój datuje się od momentu, gdy Andrews i wsp. (64), zaobserwowawszy wpływ rozpuszczalnych monosacharydów na zwiększoną adsorpcję galaktozylotransferazy wymywanej strefowo z α -laktoalbuminy sprzężonej z Sepharose, wyprowadzili równania opisujące ilościowo oddziaływania między wymienionymi składnikami. W podobny sposób zbadano kilka analogicznych układów, w których ligand rozpuszczalny indukuje wiązanie białka przez ligand unieruchomiony (65—68). Przykładowy sposób analizy (68) opiera się na następującym schemacie równowag:

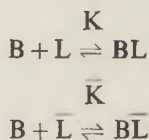


gdzie \bar{L} oznacza ligand związany z podłożem chromatograficznym, L — ligand wolny, \bar{K} — stałe asocjacji kompleksów rozpuszczalnych, K — stałe asocjacji dla kompleksów unieruchomionych. Objętość wypływu białka V oblicza się z równania:

$$V = V_0 + \frac{(V_0 - V_p) \{ \bar{K}_a [\bar{L}_a] + K_b \bar{K}_{ba} [L_b] [\bar{L}_a] \}}{1 + K_b [L_b]} \quad (\text{równanie 8})$$

gdzie V_p — oznacza pustą objętość kolumny, V_0 — objętość wypływu w razie braku oddziaływania białka z ligandami.

W opisanych układach ligand związany z żelzem oraz ligand wolny to całkowicie różne substancje. Większość zastosowań praktycznych oparto jednak na zjawisku kompetycji między ligandem rozpuszczalnym a unieruchomionym ligandem o podobnej naturze chemicznej. W najprostszym przypadku białka monowalencyjnego rozważa się zatem dwie równowagi:



W obecności ligandu rozpuszczalnego w stężeniu $[L]$ białko jest wymywane z kolumny w objętości V , określonej równaniem (69):

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{(1 + \bar{K} [B])}{f^{-1}(V_0 - V_p) \bar{K} [L]} + \frac{K [L]}{f^{-1}(V_0 - V_p) K [L]} \quad (\text{równanie 9})$$

gdzie f oznacza frakcję fazy nieruchomej dostępną dla białka a znaczenie pozostałych symboli podano w opisie równania 8. Parametry wiązania odczytuje się z wykresu $\frac{1}{V - V_0}$ ($[L]$). Objętość wypływu białka V można wyznaczyć metodą ciągłego wymywania (69—72), w której roztwory o stałych stężeniach białka wprowadza się w sposób ciągły na kolumnę do chwili otrzymania dobrze wykształconych frontów elucji, wykorzystywanych do obliczania stałych wiązania. Opisano wariant metodyczny, w którym oznacza się nie objętość elucji lecz ilość związanego białka (73). Wadą wszystkich metod wymywania ciągłego jest stosunkowo duże zużycie białka.

Inny sposób wyznaczania objętości V polega na zrównoważeniu ko-

lumny roztworami o różnym stężeniu ligandu rozpuszczalnego strefowym wymywaniu białka. Wyniki pomiarów analizuje się według równania (74):

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{1}{(V_0 - V_p)\bar{K}[L]} + \frac{K[L]}{(V_0 - V_p)\bar{K}[L]} \quad (\text{równanie 10})$$

Jest ono analogiczne do równania 9 z $f = 1$ i $K[B] \ll 1$. Ostatnie założenie warunkuje szczególną zaletę techniki strefowego wymywania kompetycyjnego — konieczność zużywania minimalnej ilości białka. Tylko czułość detekcji białka w wycieku może być pod tym względem czynnikiem ograniczającym. Inna zaleta to możliwość ilościowego badania słabych oddziaływań tj. przypadku, dla którego wiele klasycznych metod (np. dializa równowagowa) daje wyniki obarczone dużymi błędami. Najniższe wartości K , wyznaczone przy zastosowaniu strefowego wymywania kompetycyjnego są rzędu 100 M^{-1} (75).

Omawianą technikę zastosowano do wyznaczania stałych K i \bar{K} dla oddziaływania różnych ligandów z nukleazą ze *Staphylococcus* (74, 76), rybonukleazą (75, 77, 78), chymotrypsyną (79), trypsyną (80, 81), karboksypeptydazą B (68) oraz fragmentem Fab immunoglobuliny A (82 a). Zmodyfikowany wariant metodyczny wykorzystano do oszacowania stałej K dla układu AMP-dehydrogenaza mleczanowa (83). Dla tego samego układu opracowano inną modyfikację (84), polegającą na wymywaniu w gradiencie stężenia rozpuszczalnego ligandu. Stałą K dla badanego ligandu odczytywano z krzywej kalibracyjnej, sporządzonej dla szeregu ligandów o znanych wartościach K .

Ograniczeniem metody kompetycyjnego wymywania strefowego jest trudność oszacowania efektywnego stężenia unieruchomionego ligandu a co za tym idzie — niepewność oznaczenia stałej K . Największą jednak wadą jest zawężenie zakresu zastosowań głównie do białek monowalencyjnych. Próby jej adaptacji do układów poliwalencyjnych ($n > 1$) podjęto dla kompleksów immunoglobulina A-fosfocholina (82 a, b) oraz konkanawalina A-cukry (85). Wyprowadzone równania nie mają charakteru ogólnego, a ponadto są skomplikowane i można je analizować wyłącznie metodami numerycznymi.

Uproszczony sposób traktowania układów poliwalencyjnych (86) polega na użyciu żelu o bardzo niskiej zawartości ligandu unieruchomionego. W tych warunkach jedna cząsteczka białka nie może jednocześnie wiązać dwóch cząsteczek unieruchomionego ligandu. Układ zachowuje się przeto jak monowalencyjny, co pozwala na zastosowanie równania 10.

W przypadku wyższych stężeń ligandu unieruchomionego, wiązanie z białkiem poliwalencyjnym może wykazywać efekty kooperatywności, uwarunkowanej czynnikami sterycznymi. Ostatnio przedstawiono teoretyczną analizę tego zjawiska (87).

Tak czy inaczej, jeżeli ilość miejsc wiążących w rozpuszczalnym białku (n) nie jest z góry znana, nie można jej wyznaczyć przy zastosowaniu ilościowej chromatografii powinowactwa, przynajmniej w chwili obecnej. Natomiast nie przedstawia trudności wyznaczenie izotermi wiązania ligandów przez unieruchomione białka, co zaprezentowano na przykładzie oddziaływania pewnych leków z unieruchomioną albuminą surowicy (88). Wyznaczając objętości wymywania ligandów (V_L) z kolumny z unieruchomionym białkiem techniką analizy czołowej oraz posługując się równaniem 11:

$$v_L - v_L^0 = v_z [\bar{B}] \frac{1}{[L]} r \quad (\text{równanie 11})$$

w którym V_z oznacza objętość fazy żelowej, otrzymano krzywoliniowy wykres Scatcharda, interpretowany za pomocą modelu dwóch klas miejsc wiążących.

V. Klasyczne metody elektroforetyczne

Techniki elektroforetyczne pozwalają na mierzenie ruchliwości elektroforetycznej białek — wielkości, która ulega znacznym zmianom wskutek oddziaływania białkowych makrojonów z innymi jonowymi substancjami. Z tego typu oddziaływaniami związany jest jednak szereg teoretycznych i praktycznych problemów, nie spotykanych w przypadku obojętnych ligandów. Zagadnienia te omówione są w cytowanych już pracach (3, 4). Oddziaływania elektrostatyczne sprawiają, że miejsca wiążące jony nie są niezależne. Uwzględnienie tego efektu prowadzi do wyrażenia na stałą mikroskopową:

$$k_1 = (k_0)_1 e^{-2wZ_B Z_L} \quad (\text{równanie 12})$$

gdzie: Z_B — oznacza ładunek białka, Z_L — ładunek ligandu, a w jest pewną stałą, zależną m.in. od promienia makrojonu i ligandu. Równanie 3 przybiera wtedy złożoną postać:

$$r = \sum_{i=1}^m \frac{n_i (k_0)_i [L] e^{-2wZ_B Z_L}}{1 + (k_0)_i [L] e^{-2wZ_B Z_L}}$$

Jeżeli niewielka ilość jonów wiąże się z białkiem o małym ładunku netto, wtedy człon wykładniczy w równaniu 12 jest zaniedbywalny, co oznacza, że elektrostatyczne oddziaływania między miejscami wiążącymi można zignorować.

W przypadku, gdy ligandem jest jon metalu, badaną równowagę należy najczęściej rozpatrywać jako współzawodnictwo ligandu z jonami wodorowymi o te same miejsca wiążące.

Każdy z kompleksów mieszaniny równowagowej, BL_j ($j = 0, 1, 2, \dots, n$), charakteryzuje się odrębną wartością ruchliwości u_{BL_j} . Tzw. składnikowe ruchliwości elektroforetyczne białka (\bar{u}_B) i ligandu (\bar{u}_L) zdefiniowane są równaniami:

$$\bar{u}_B = \left\{ \sum_{j=0}^n u_{BL_j} [BL_j] \right\} \frac{1}{[B_0]} \quad (\text{równanie 13})$$

$$\bar{u}_L = \left\{ u_L [L] + \sum_{j=1}^n j u_{BL_j} [BL_j] \right\} \frac{1}{[L_0]} \quad (\text{równanie 14})$$

Zasadniczo są to wielkości mierzalne, podobnie jak u_B i u_L . Z połączenia równań 13 i 14 z równaniami opisującymi obowiązujące równowagi (rozdz. II) należy wyznaczyć parametry badanego oddziaływania. W przypadkach wiązania małych jonów przez białka, n jest na ogół na tyle duże, że omawiany układ równań można rozwiązać dopiero po wprowadzeniu dodatkowych upraszczających założeń.

Najstarsza z technik elektroforetycznych, elektroforeza ruchomej granicy (elektroforeza czołowa), jest już w chwili obecnej mało popularna w typowych pracowniach biochemicznych. Ogólne zasady pomiarów ruchliwości elektroforetycznej tą techniką omawiane są we wszystkich szerszych opracowaniach poświęconych elektroforezie (np. 89). Podstawowe problemy, związane z zastosowaniem do wyznaczania parametrów oddziaływania białek z substancjami jonowymi omówili Nichol i wsp. (90), zawiązując jednak dyskusję do kompleksów makrocząsteczka-makrocząsteczka. Rzeczywiście jednak, czołowa elektroforeza szczególnie nadaje się do badania tego typu równowag, dla których $n = 1$ (np. 91—94). Dawniejsze zastosowania do układów białko-ligand drobnocząsteczkowy (95—98) wymagały mierzenia wartości \bar{u}_B , \bar{u}_L , u_B i u_L , oraz znajomości $[B_0]$ i $[L_0]$ w próbce. $[L]$ obliczano zakładając, że miejsca wiążące ligand są identyczne i nie oddziałują ze sobą oraz że każda cząsteczka ligandu związana z białkiem powoduje zmianę ruchliwości elektroforetycznej białka o tę samą wartość Δ :

$$u_{BL_j} = u_B + \Delta \cdot j = u_B (1 + j \cdot \delta) \quad (\text{równanie 15})$$

Koniec końcem jednak, znajomość wartości δ nie była konieczna.

Stosunkowo niedawno zaproponowano znacznie uproszczoną wersję metodyczną (99), w której próbkę białka, przed poddaniem elektroforezie, dializuje się względem nadmiaru buforu zawierającego ligand, którego stężenie $[L]$ staje się w ten sposób znane z góry. Pozostają wtedy do wyznaczenia wartości \bar{u}_B i u_B . Stosuje się równanie:

$$\frac{\bar{u}_B - u_B}{u_B} = \frac{n \delta k [L]}{1 + k [L]} \quad (\text{równanie 16})$$

Zaletą tej techniki jest prostota oraz możliwość badania słabych oddziaływań, takich jak w przypadku układu owoalbumina-jon HPO_4^{2-} , z k rzędu 100 M^{-1} . Poważną wadą jest niemożność obliczenia ilości miejsc wiążących n , bez uprzedniej znajomości parametru δ . Dla oszacowania jego wartości należy odwołać się do teorii ruchliwości elektroforetycznej Henry'ego (100) lub Abrahamsona (101), których omówienie znaleźć można w każdym szerszym opracowaniu poświęconym elektroforezie. Ogólnym ograniczeniem technik elektroforezy ruchomej granicy jest konieczność zużycia znacznych ilości białka.

Wykazano, że precyzyjne pomiary ruchliwości elektroforetycznej możliwe są również przy zastosowaniu strefowej elektroforezy bibułowej (102, 103). Technikę tę wykorzystano w badaniach oddziaływania jonów cynku i kadmu z albuminą surowicy (104), wzorując się pod względem sposobu interpretacji na wcześniejszym wariancie elektroforezy czołowej (105). Fundamentalnym założeniem była proporcjonalność ruchliwości elektroforetycznej i ładunku białka:

$$\Delta Z_B = \Delta u \cdot f$$

Współczynnik f obliczano z równania Henry'ego lub korzystano z opublikowanych korelacji empirycznych (106). Biorąc pod uwagę kompetycję pomiędzy jonami metalu i jonami wodorowymi i zakładając prosty model wiązania, otrzymano parametry oddziaływania z zależności $\frac{1}{\Delta u \cdot f}$ od $\frac{1}{[L]}$.

Ostatnio na przykładzie układu owoalbumina-fosforan zaprezentowano sposób wykorzystania standardowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym do wyznaczania parametrów oddziaływania białko-jon (107). Przy odpowiednim doborze warunków eksperymentalnych, ruchliwości białka \bar{u}_B i u_B w równaniu 16 można zastąpić przez względne współczynniki przesunięcia R_r . Metoda jest niewątpliwie najłatwiejsza do wykonania z wszystkich dotąd omówionych. Pozwala na badanie bardzo słabych oddziaływań, ze stałymi k rzędu 100 M^{-1} i zużywa minimalne ilości białka. Do badania można używać próbek nieoczyszczonych, zawierających wiele składników białkowych! Można przypuszczać, że w najbliższym czasie technika ta zyska powszechne uznanie. Jej ograniczeniem, wspólnym jednak dla wszystkich metod elektroforetycznych, jest aprioryczne założenie najprostszego modelu oddziaływania białko-ligand.

VI. Elektroforeza powinowactwa

Termin „elektroforeza powinowactwa” rezerwuje się najczęściej dla technik elektroforetycznych, prowadzonych w żelach zawierających unieruchomione ligandy. Ogólne zasady i zakres zastosowań tej metody omawiano w kilku artykułach przeglądowych (108—111). W chwili obecnej,

jedynym kierunkiem elektroforezy powinowactwa, który wykorzystywano do wyznaczania parametrów oddziaływania drobnocząsteczkowych ligandów z białkami, jest elektroforeza w żelach poliakryloamidowych. Posługiwano się w niej formalizmem analogicznym jak w przypadku chromatografii powinowactwa. W przypadku białek monowalencyjnych, odległość l na jaką pasmo białkowe wędruje w żelu zawierającym ligand unieruchomiony (\bar{L}) oraz ligand wolny (L), związane jest ze stałymi asocjacji K , \bar{K} równaniem (112):

$$\frac{l}{l_0 - l} = \frac{1 + K[L]}{\bar{K}[\bar{L}]} \quad (\text{równanie 17})$$

gdzie l_0 — oznacza ruchliwość w przypadku braku oddziaływania z żelem, tj. przy $l = 0$. Parametry wiązania łatwo odczytać z wykresu $\frac{l}{l_0 - l}$ ($[\bar{L}]$).

Równanie powyższe jest słuszne przy szeregu założeń. M.in. ruchliwość białka oraz kompleksu BL muszą być identyczne, tworzenie kompleksów musi być reakcją bardzo szybką, stężenie białka w wędrującej strefie musi być znacznie niższe niż $[L]$ i $[\bar{L}]$.

Szereg trudności związany jest z metodyką unieruchamiania ligandu. Jak dotąd, jedynym praktycznie osiągalnym sposobem jest przeprowadzenie polimeryzacji żelu poliakryloamidowego w obecności makrocząsteczkowej, rozpuszczalnej pochodnej ligandu, która po utworzeniu polimeru ulega fizycznemu uwięzieniu w jego sieci. Po raz pierwszy metodą taką posłużono się w przypadku naturalnych, niezmodyfikowanych polisacharydów (113), których unieruchamianie pozwoliło później na wyznaczanie parametrów wiązania pewnych patologicznych immunoglobulin (114—116) oraz lektyn (117) z cukrami. Częściej jednak rozpuszczalne, wysokocząsteczkowe dekstrany stanowią nośniki, do których przyłącza się ligandy zgodnie ze zwykłą metodyką chromatografii powinowactwa (118). Tego typu żele wykorzystano do badania oddziaływania trypsyny z p-aminobenzoamidyną (119) oraz szeregu białek z *Blue Dextran* (120). Alternatywna droga syntezy makrocząsteczki niosącej ligand polega na kopolimeryzacji nienasyconej pochodnej ligandu z akryloamidem. Otrzymuje się liniowe, rozpuszczalne kopolimery, których masę cząsteczkową i zawartość ligandu można w pewnych granicach kontrolować (121). Technikę tę zastosowano w badaniach oddziaływań lektyn (112, 122—128) i oksydazy galaktozy (129) z cukrami, różnych enzymów z unieruchomionym AMP (130, 131). Można również syntezować kopolimery, niosące grupy reaktywne, które następnie podstawia się ligandem. To podejście wykorzystano do unieruchomienia p-aminobenzoamidyny (119) i AMP (132).

Nośniki ligandu muszą posiadać dostatecznie dużą masę cząsteczkową, gdyż całkowite unieruchomienie ligandu jest warunkiem stosowal-

ności równania 17. Ogromną wadą opisanej metodyki jest mikroheterogenność rozmieszczenia ligandu, która zapewne wpływa na wyznaczone parametry K i \bar{K} , chociaż nie opublikowano dotąd prac ujmujących ilościowo tej efekt (111).

Oba powyższe ograniczenia można usunąć, przeprowadzając bezpośrednio syntezę żeli poliakryloamidowych zawierających kowalencyjnie związany ligand. Tego typu żele sporządzano przez dodanie glukozydów allilowych do zwykłej mieszaniny polimeryzacyjnej (133, 134). Sposoby takie nie były jednak jeszcze stosowane w ilościowych badaniach oddziaływań białko-ligand.

Dokładność wyznaczenia wartości \bar{K} ściśle zależy od prawidłowego przyjęcia stężenia unieruchomionego ligandu (równanie 17). W wielu przypadkach jednak nie wszystkie reszty unieruchomionego ligandu są dostępne dla białka, wskutek czego efektywne $[\bar{L}]$ jest niższe niż wyznaczone z całkowitej zawartości ligandu w żelu.

Dalszymi wadami metody ilościowej elektroforezy powinowactwa są: niemożność wyznaczenia stałych K dla naładowanych ligandów oraz ograniczenie do białek monowalencyjnych. Do tej pory omawianą metodą zbadano tylko jeden układ bardziej złożony — dimeryczną fosforylazę glikogenu (135). Opublikowane ostatnio teoretyczne rozważania (136), nie testowane jednak do tej pory eksperymentalnie, sugerują, że wartość K można oznaczyć również dla białek poliwalencyjnych ($n > 1$). W tych przypadkach zamiast \bar{K} otrzymuje się \bar{K}/n . Być może w tym duchu należałoby interpretować pewne wątpliwości, które budzi praca nad oddziaływaniem albuminy surowicy z żelem zawierającym węglowodoro-we podstawniki (137).

Wszystkie te ograniczenia tracą jednak na znaczeniu w konfrontacji z ogromnymi zaletami tej metody (111). Jest ona szybka, łatwa do zastosowania i zużywa minimalne ilości białka. Pozwala ilościowo charakteryzować wyjątkowo słabe oddziaływania (stałe rzędu 10^{-1} M^{-1}). Parametry wiązania można wyznaczyć jednocześnie dla kilku form białka, np. izoenzymów. W ogóle próbka białka nie musi być oczyszczona! Ponadto metoda jest praktycznie jedyną, która pozwala wykrywać i ilościowo charakteryzować heterogenność białek pod względem powinowactwa do unieruchomionych ligandów (112, 124, 125, 138—140). Chromatografia powinowactwa jest na ogół mało przydatna do tego celu, gdyż charakteryzuje się stosunkowo niską rozdzielczością (111).

Zaakceptowano do druku 27.07.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Deranleau D. A., (1969), *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4044—4049.
2. Thakur A. K., Jaffe M. L., Rodbard D., (1980), *Anal. Biochem.*, **107**, 279—295.

3. Tanford C., (1961), *Physical Chemistry of Macromolecules*, str. 526—586, John Wiley and Sons, Inc., New York—London.
4. Steinhardt J., Beychok S., (1964) w *The Proteins*, red. Neurath H., 2 wyd., t. 2, str. 140—304, Academic Press, New York—London.
5. Adair G. S., (1925), *J. Biol. Chem.*, **63**, 529—545.
6. Scatchard G., (1949), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660—672.
7. Klotz I. M., (1946), *Arch. Biochem.*, **9**, 109—117.
8. Klotz I. M., Walker F. M., Pivan R. B., (1946), *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1486—1490.
9. Rosenthal H. E., (1967), *Anal. Biochem.*, **20**, 525—532.
10. Klotz I. M., Hunston D. L., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3065—3069.
11. Feldman H. A., (1972), *Anal. Biochem.*, **48**, 317—338.
12. Weder H. G., Schildknecht J., Lutz R. A., Kesselring P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 475—481.
13. Klotz I. M., Hunston D. L., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 314—328.
14. Munson P. J., Rodbard D., (1980), *Anal. Biochem.*, **107**, 220—239.
15. Peters F., Pingoud V. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **714**, 442—447.
16. Nørby J. G., Ottolenghi P., Jensen J., (1980), *Anal. Biochem.*, **102**, 318—320.
17. Kane P. M., Pegg P. J., Johnson E., (1969), *J. Clin. Endocrinol., Metabol.*, **29**, 1126—1130.
18. Hunston D. L., (1975), *Anal. Biochem.*, **63**, 99—109.
19. Whitehead E. P., (1978), *Biochem. J.*, **171**, 501—504.
20. Knack I., Röh m K.-H., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **614**, 613—624.
21. Levitzki A., (1978), *Quantitative Aspects of Allosteric Mechanisms*, Springer-Verlag, Berlin.
22. Bryła J., (1981), *Regulacja metabolizmu komórki*, str. 188—209, PWN, Warszawa.
23. Hill A. V., (1910), *J. Physiol.*, **40**, IV—VII.
24. Wood G. C., Cooper P. F., (1970), *Chromatogr. Rev.*, **12**, 88—109.
25. Puca G. A., Bresciani F., (1969), *Nature (London)*, **223**, 745—747.
26. Hansson V., Tveter K. J., (1971), *Acta Endocrinol.*, **66**, 745—749.
27. Godefroi V. C., Brooks S. C., (1973), *Anal. Biochem.*, **51**, 335—344.
28. Töpert M., Zabel I., Ziegler M., (1974), *Anal. Biochem.*, **62**, 514—522.
29. Swillens S., Dumont J. E., (1975), *Biochem. J.*, **149**, 779—782.
30. Ackers G. K., (1973), w *Methods in Enzymology*, red. Hirs C. H. W., Timasheff S. N., t. 27, str. 441—456, Academic Press, New York.
31. Oshima G., Uchiyama H., Nagasawa K., (1981), *Anal. Biochem.*, **111**, 366—371.
32. Bonifacino J. S., Paladini A. C., (1981), *Anal. Biochem.*, **118**, 213—220.
33. Kremmer T., Boross L., (1979), *Gel Chromatography. Theory, Methodology, Applications*, str. 195—200, Akadémiai Kiadó, Budapest.
34. Hummel J. P., Dryer W. J., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 530—532.
35. Fairclough G. F. Jr., Fruton J. S., (1966), *Biochemistry*, **5**, 673—683.
36. Makino S., Reynolds J. A., Tanford C., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4926—4932.

37. Stevens R. A. J., Phelps C. F., (1976), *Biochem. J.*, **159**, 65—70.
38. Beaudette N. V., Langerman N., Kisliuk R. L., Gaumont Y., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 272—278.
39. Malik N., Butterworth P. J., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 113—120.
40. Henderson R., Wang J. H., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4565—4569.
41. Ishihama A., Hurwitz J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6680—6689.
42. Arai K., Arai T., Kawakita M., Kaziro Y., (1957), *J. Biochem.* (Tokyo), **77**, 1095—1106.
43. Nichol L. W., Winzor D. J., (1964), *J. Phys. Chem.*, **68**, 2455—2463.
44. Nichol L. W., Winzor D. J., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 591—594.
45. Nichol L. W., Ogston A. G., Winzor D. J., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 517—521.
46. Nichol L. W., Jackson W. J. H., Smith G. D., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**, 438—439.
47. Gilbert G. A., Kellett G. L., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6079—6086.
48. Cooper P. F., Wood G. C., (1968), *J. Pharm. Pharmacol.*, **20**, 150S—156S.
49. Keresztes-Nagy S., Mais R. F., Oester Y. T., Zaroslinki J. F., (1972), *Anal. Biochem.*, **48**, 80—89.
50. Brumbaugh E. E., Ackers G. K., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6315—6317.
51. Brumbaugh E. E., Ackers G. K., (1971), *Anal. Biochem.*, **41**, 543—559.
52. Warshaw H. S., Ackers G. K., (1971), *Anal. Biochem.*, **42**, 405—421.
53. Ackers G. K., Brumbaugh E. E., Ip S. H. C., Halvorson H. R., (1976), *Biophys. Chem.*, **4**, 171—179.
54. Ford C. L., Winzor D. J., (1981), *Anal. Biochem.*, **114**, 146—152.
55. Chudzik J., Koj A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 73—84.
56. Rode W., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 113—127.
57. Jakoby W. B., Wilchek M., (1974), *Methods in Enzymology*, t. 34, Academic Press, New York.
58. Lowe C. R., Dean P. D. G., (1974), *Affinity Chromatography*, John Wiley and Sons, New York.
59. Dunlap R. B., (1974), *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, Plenum Press, New York—London.
60. Sundaram P. V., Eckstein F., (1978), *Theory and Practice in Affinity Techniques*, Academic Press, London—New York—San Francisco.
61. Egly J. M., (1979), *Proceedings of the Third International Symposium on Affinity Chromatography and Molecular Interactions*, Inserm Symposia Series, Paris.
62. Turkova J., (1980), *Affinajna chromatografija*, Izdatielstwo „Mir”, Moskva.
63. Chaiken I. M., (1979), *Anal. Biochem.*, **97**, 1—10.
64. Andrews P., Kitchen B. J., Winzor D. J., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 897—900.
65. Brinkworth R. I., Masters C. J., Winzor D. J., (1975), *Biochem. J.*, **151**, 631—636.
66. Dunn B. M., Gilbert W. A., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 533—540.
67. Danner J., Dunn B. M., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1436.

68. Danner J., Somerville J. E., Turner J., Dunn B. M., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3039—3045.
69. Nichol L. W., Ogston A. G., Winzor D. J., Sawyer W. H., (1974), *Biochem. J.*, **143**, 435—443.
70. Lowe C. R., Harvey M. J., Craven D. B., Dean P. D. G., (1973), *Biochem. J.*, **133**, 499—506.
71. Kasai K., Ishii S., (1975), *J. Biochem. (Tokyo)*, **77**, 261—264.
72. Nishikata M., Kasai K., Ishii S., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**, 1475—1484.
73. Bottomly R. C., Storer A. C., Trayer I. P., (1976), *Biochem. J.*, **159**, 667—676.
74. Dunn B. M., Chaiken I. M., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2382—2385.
75. Taylor H. C., Chaiken I. M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6991—6994.
76. Dunn B. M., Chaiken I. M., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2343—2349.
77. Chaiken I. M., Taylor H. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2044—2048.
78. Taylor H. C., Chaiken I. M., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 864.
79. Gilbert W. A., (1978), Praca doktorska, Uniwersytet Florydy.
80. Ishii S., Kasai K., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 1051—1060.
81. Malanikova M., Turkova J., (1977), *J. Solid Phase Biochem.*, **2**, 237—249.
82. a) Eilat D., Chaiken I. M., (1979), *Biochemistry*, **18**, 790—794.
b) Chaiken I. M., Eilat D., McCormick W. M., (1979), *Biochemistry*, **18**, 794—795.
83. Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 1—6.
84. Brodelius P., Mosbach K., (1976), *Anal. Biochem.*, **72**, 629—636.
85. Oda Y., Kasai K., Ishii S., (1981), *J. Biochem. (Tokyo)*, **89**, 285—296.
86. Veronese F. M., Bevilacqua R., Chaiken I. M., (1979), *Mol. Pharmacol.*, **15**, 313—321.
87. Pincus M. R., DeLisi C., Reudell M., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **675**, 392—396.
88. Lagercrantz C., Larsson T., Karlsson H., (1979), *Anal. Biochem.*, **99**, 352—364.
89. Samiński J. M., (1971), w *Biopolimery. Fizykochemiczne metody oczyszczania, rozdzielania i badania*, red. Samsonow G. W., str. 50—120, PWN, Warszawa.
90. Nichol L. W., Bethune J. L., Kegeles G., Hess E. L., (1964), w *The Proteins*, red. Neurath H., 2 wyd., t. 2, str. 305—403, Academic Press, New York—London.
91. Longsworth L. G., McInnes D. A., (1942), *J. Gen. Physiol.*, **25**, 507—513.
92. Cann J. R., Klapper J. A. Jr., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 2446—2451.
93. Cann J. R., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 707—711.
94. Nichol L. W., Smith G. D., Winzor D. J., (1973), *J. Phys. Chem.*, **77**, 2912—2918.
95. Smith R. F., Briggs D. R., (1950), *J. Phys. and Colloid Chem.*, **54**, 33—47.
96. Alberty R. A., Marvin H. H. Jr., (1950), *J. Phys. and Colloid Chem.*, **54**, 47—55.

97. Alberty R. A., Marvin H. H. Jr., (1951), *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3220—3223.
98. Cann J. R., (1970), *Interacting Macromolecules*, str. 58—70, Academic Press, New York.
99. Drewe R. H., Winzor D. J., (1976), *Biochem. J.*, **159**, 737—741.
100. Henry D. C., (1931), *Proc. R. Soc. London Ser. A*, **133**, 106—129.
101. Abrahamson H. A., Gorin M. H., Moyer L. S., (1939), *Chem. Rev.*, **24**, 345—366.
102. Schilling K., Waldmann-Meyer H., (1959), *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1—13.
103. Waldmann-Meyer H., Schilling K., (1959), *Acta Chem. Scand.*, **13**, 13—27.
104. Waldmann-Meyer H., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 3337—3345.
105. Schilling K., (1957), *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1103—1128.
106. Longworth L. G., Jacobsen C. F., (1949), *J. Phys. and Colloid Chem.*, **53**, 126—141.
107. Ward L. D., Winzor D. J., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 650—654.
108. Hořejší V., Tichá M., Kocourek J., (1979), *Trends Biochem. Sci.*, **4**, N6—N7.
109. Bøg-Hansen T. C., (1979), w *Proceedings of the Third International Symposium on Affinity Chromatography and Molecular Interactions*, str. 399—416, Inserm Symposia Series, Paris.
110. Bøg-Hansen T. C., Takeo K., (1980), *Electrophoresis*, **1**, 67—71.
111. Hořejší V., (1981), *Anal. Biochem.*, **112**, 1—8.
112. Hořejší V., Tichá M., Kocourek J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **499**, 290—300.
113. Siepmann R., Stegelmann H., (1967), *Naturwissenschaften*, **54**, 116—117.
114. Takeo K., Kabat E. A., (1978), *J. Immunol.*, **121**, 2305—2310.
115. Sugii S., Kabat E. A., (1980), *Carbohydr. Res.*, **82**, 113—124.
116. Sugii S., Takeo K., Kabat E. A., (1979), *J. Immunol.*, **123**, 1162—1168.
117. Čeřovský V., Tichá M., Hořejší V., Kocourek J., (1980), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **3**, 163—172.
118. Parikh I., March S., Cuatrecasas P., (1974) w *Methods in Enzymology*, red. Jakoby W. B., Wilchek M., t. 34, str. 77—102, Academic Press, New York.
119. Čeřovský V., Tichá M., Turková J., Labský J., (1980), *J. Chromatogr.*, **194**, 175—181.
120. Tichá M., Hořejší V., Barthová J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **534**, 58—63.
121. Hořejší V., Smolek P., Kocourek J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **538**, 293—298.
122. Hořejší V., Tichá M., Kocourek J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **499**, 301—308.
123. Hořejší V., Chaloupecká O., Kocourek J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **539**, 287—293.
124. Hořejší V., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **577**, 389—393.
125. Hořejší V., Tichá M., Novotný J., Kocourek J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **623**, 439—448.
126. Hauzer K., Tichá M., Hořejší V., Kocourek J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **583**, 103—109.

127. Turková R., Tichá M., Kocourek J., (1980), *J. Chromatogr.*, **192**, 408—412.
128. Ek K., Gianazza E., Righetti P. G., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **626**, 356—365.
129. Hořejší V., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **577**, 383—388.
130. Nakamura K., Kawahara A., Ogata H., Takeo K., (1980), *J. Chromatogr.*, **192**, 351—362.
131. Nakamura K., Kawahara A., Takeo K., (1980), *J. Chromatogr.*, **196**, 85—99.
132. Tichá M., Barthová J., Labský J., Semanský M., (1980), *J. Chromatogr.*, **194**, 183—189.
133. Hořejší V., Kocourek J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 338—343.
134. Hořejší V., Kocourek J., (1974), w *Methods in Enzymology*, red. Jakoby W. B., Wilchek M., t. 34, str. 178—181, Academic Press, New York.
135. Shimomura S., Fukui T., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2287—2294.
136. Hořejší V., (1979), *J. Chromatogr.*, **178**, 1—13.
137. Chen J.-L., Morawetz H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9221—9223.
138. Bøg-Hansen T. C., Bjerrum O. J., Brogren C. H., (1977), *Anal. Biochem.*, **81**, 78—87.
139. Bøg-Hansen J., Prahl P., Lowenstein H., (1978), *J. Immunol. Methods*, **22**, 293—307.
140. Kerckaert J.-P., Bayard B., Biserte G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 99—108.

LILIANA BIELECKA *) , ROMAN S. LORENC **)

Białko wiążące witaminę D ***)

Vitamin D Binding Protein

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Polimorfizm genetyczny białka wiążącego witaminę D (DBP = G_c)
- III. Struktura i właściwości fizyko-chemiczne białka wiążącego witaminę D z surowicy
- IV. Wiązanie witaminy D i jej metabolitów przez inne białka
- V. Białko cytosolowe wiążące witaminę D
- VI. Biologiczna rola białka wiążącego witaminę D

Contents

- I. Introduction
- II. Genetic polymorphism of vitamin D binding protein (DBP = G_c)
- III. Structure and physico-chemical properties of serum vitamin D binding protein
- IV. Nonspecific binding of vitamin D and its metabolites
- V. Cytosolic vitamin D binding protein
- VI. Biological role of vitamin D binding protein

Wykaz stosowanych skrótów: DBP — białko wiążące witaminę D (Vitamin D Binding Protein), G_c — czynnik grupowo-specyficzny; skrót określający zarówno gen, jak i jego produkt — białko, G_{c1}, G_{c2} — allele genu G_c, DBP = G_c — podwójna nazwa białka wiążącego witaminę D, G_{c1a} — pasmo białkowe anodowe w rozdziale elektroforetycznym, G_{c1k} — pasmo białkowe katodowe w rozdziale elektroforetycznym, 1,25 (OH)₂D₃ — 1,25 dwuhydroksycholekalciferol, 24,25 (OH)₂D₃ — 24,25 dwuhydroksycholekalciferol, 25,26 (OH)₂D₃ — 25,26 dwuhydroksycholekalciferol, 25 OHD₃ — 25 hydroksycholekalciferol, SDS — siarczan dodecyłu.

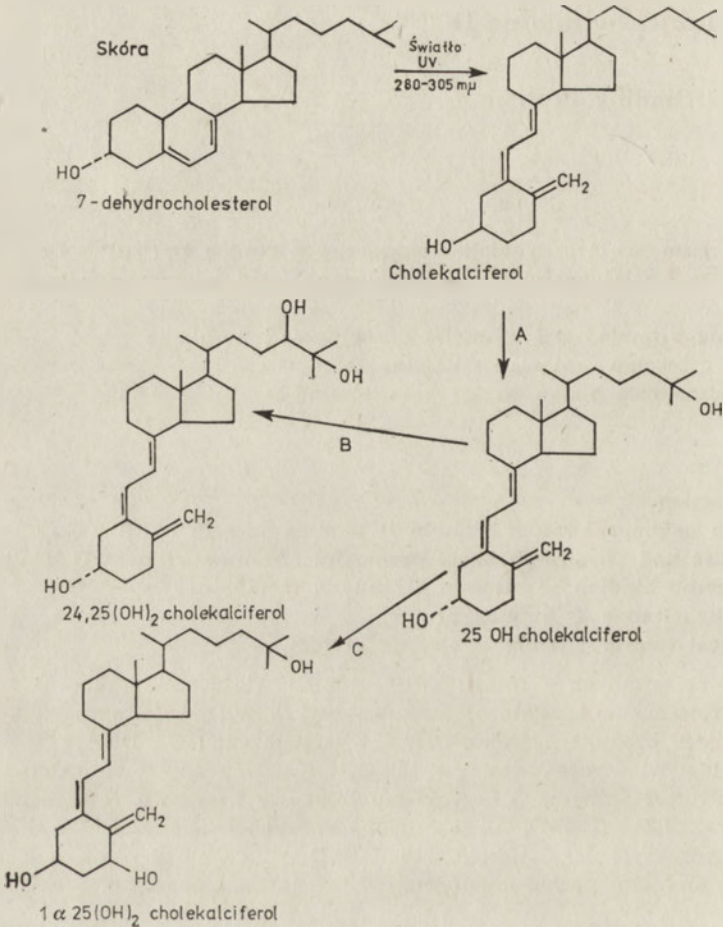
I. Wstęp

W wyniku prowadzonych w ostatnim dziesięcioleciu badań dotyczących witaminy D stwierdzono, że podlega ona w ustroju wielostopniowym przemianom metabolicznym (1, 2, 3). Metabolizmowi podlegają za-

*) Mgr, **) Doc. dr hab. Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej Centrum Zdrowia Dziecka, 04-736 Warszawa-Międzylesie, Aleja Dzieci Polskich 20.

***) Już po korekcie tego artykułu Redakcja otrzymała zalecenia Komisji Słownictwa Biochemicznego P.T.Bioch. dotyczące słownictwa witamin D. W tabeli na stronie 66 podano zalecane obecnie nazwy związków wymienionych w artykule.

równy syntetyzowana w skórze, pod wpływem promieniowania ultrafioletowego z 7 hydroksycholekalciferolu witaminy D₃ jak i dostępny z pokarmem ergosterol (witamina D₂) (3, 4, 5). W efekcie przemian witaminy D powstaje szereg jej metabolitów (Ryc. 1) przy czym biologicznie najaktywniejszymi metabolitami witaminy D są jej dihydroksylowe



Ryc. 1. Schemat metabolizmu witaminy D u ssaków na przykładzie szczura. a. Zachodząca w wątrobie konwersja witaminy D₃ (cholekalciferol) do 25 OHD₃. b. Nerkowa konwersja 25 OHD₃ do 24,25 (OH)₂D₃. Czynniki stymulujące konwersję: stężenie wapnia w surowicy krwi ≥ 10 mg%, fosforanów ≥ 7 mg%. c. Nerkowa konwersja 25 OHD₃ do 1,25 (OH)₂D₃. Czynniki stymulujące konwersję: stężenie wapnia w surowicy < 10 mg%, fosforanów < 7 mg% parathormon, hormon wzrostu, prolaktyna, estrogeny. Podana w diecie witamina D₂ ergokalciferol podlega identycznym przemianom jak cholekalciferol.

pochodne uważane za hormony. Są to w przypadku witaminy D₃ 1,25 dihydroksycholekalciferol oraz metabolizowany z witaminy D₂ 1,25 dihydroksyergokalciferol. Wstępnym krokiem na drodze syntezy metaboli-

tów witaminy D jest dołączenie tlenu do łańcucha bocznego w pozycji 25. Reakcja ta przebiega w wątrobie (6), a uczestnicząca w niej 25-hydroksylaza cholekalciferolu występuje zarówno we frakcji mitochondrialnej, jak i mikrosomalnej hepatocytów (7). Powstający 25 OHD transportowany jest następnie do nerki. W nerce w efekcie działań 1α -hydroksylazy 25-cholekalciferolu lub 24-hydroksylazy 25-cholekalciferolu 25 OHD metabolizowany jest do $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ lub $24,25(\text{OH})_2\text{D}$. Kierunek metabolizmu uzależniony jest od stężenia jonów wapnia, fosforanów w surowicy krwi oraz zaopatrzenia ustroju w witaminę D lub w parathormon (1, 2, 8). Docelowymi tkankami działania $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ są: jelito, kość, nerka, skóra, przystarczyce oraz przysadka (9—14). Witamina D oraz jej metabolity transportowane są w postaci związanej ze specyficznym białkiem. Białko to, nazwane białkiem wiążącym witaminę D — DBP (Vitamin D Binding Protein) — odznacza się wysokim powinowactwem do witaminy D i jej metabolitów.

W niniejszej pracy starano się przedstawić historię odkrycia białka wiążącego witaminę D, ustalenia dotyczące jego właściwości fizykochemicznych oraz roli fizjologicznej.

II. Polimorfizm genetyczny białka wiążącego witaminę D (DBP = G_c)

W wielu laboratoriach w Europie i USA, zajmujących się oczyszczaniem i badaniem DBP z surowicy, stwierdzono immunologiczną identyczność tego białka z grupowo-specyficznym (G_c) składnikiem białkowym krwi ludzkiej (15). Ludzkie białko G_c zostało wykryte przeszło 20 lat temu przez Hirschfelda (16). Przez długie lata nie wiadano nic o roli tego białka, co znalazło odbicie w nazwie nadanej przez odkrywcę — składnik grupowo-specyficzny. Dopiero w 1975 r. Daiger stwierdził, że białko G_c wiąże witaminę D i jej metabolity (15).

Do tego czasu białko G_c znane było jedynie jako genetyczny znacznik w badaniach ludzkich populacji. Białko to wykazuje polimorfizm genetyczny. Zastosowanie immunoelektroforezy ujawniło trzy główne fenotypy białka: G_c1-1 , G_c2-1 , G_c2-2 . Są one produktem pojedynczego, autosomalnego genu z dwoma współdominującymi allelami G_c1 i G_c2 , obecnymi w populacjach ludzkich na całym świecie (17, 18).

Elektroforeza na żelu poliakryloamidowym wykazała obecność dwóch pasm białkowych: G_c1_a i G_c1_k , w surowicy ludzi homozygotycznych w stosunku do allelu G_c1 (G_c1-1) i jednego pasma białkowego G_c2_k w surowicy ludzi homozygotycznych w stosunku do allelu G_c2 (G_c2-2) (18).

Pasma białkowe G_c1_a ma punkt izoelektryczny bliższy anody, a pasmo białkowe G_c1_k ma punkt izoelektryczny bliższy katody. Obserwowane

różnice w ruchliwości elektroforetycznej G_{c1a} i G_{c1k} wynikają z różnej zawartości kwasu sjalowego.

Jak podaje *Svasti* i wsp. (18) G_{c1a} zawiera 1,16% tego kwasu, G_{c1k} 0,17% a G_{c2k} 0,57%. Enzym sjalidaza (neuraminidaza) redukuje ruchliwość elektroforetyczną G_{c1a} do tej jaką ma G_{c1k} , natomiast nie zmienia ruchliwości G_{c1k} i G_{c2k} , co sugeruje, że obserwowane różnice mają charakter posttranslacyjny (19).

Poza szeroko rozpowszechnionymi allelami G_{c1} i G_{c2} , poznano szereg innych alleli genu G_c występujących w takich grupach populacyjnych jak: Japończycy, Eskimosi, Indianie amerykańscy i Indianie pochodzenia australijskiego (15). Prace *Contansa* z 1979 r. (20, 21) opisują 30 różnych alleli współdominujących pojedynczego, autosomalnego *locus*. Biorąc pod uwagę bogactwo odmian genetycznych produktu genu G_c , nasuwa się pytanie, czy wśród osobników o różnych fenotypach białka wiążącego witaminę D, zachodzą różnice w zdolności wiązania witaminy D i jej metabolitów. Odpowiedź można znaleźć w pracy *Kawakami* i wsp. (17), którzy wskazują, że zarówno powszechne odmiany genetyczne białka G_c , jak i rzadsze odmiany, występujące we krwi ludzi zamieszkujących Nową Gwineę i we krwi Indian Cippewa, mają podobne właściwości wiązania witaminy D₃ i jej metabolitów. We wszystkich opisywanych przypadkach białko G_c wykazywało największe powinowactwo do 25 OHD₃, zaś mniejsze do witaminy D₃ i 1,25 (OH)₂D₃.

Ciekawych wyników dostarczyły badania ludzkiej populacji pod kątem częstości występowania w nich alleli G_{c1} i G_{c2} . Zaobserwowano, że oba te allele są obecne we wszystkich ludzkiej populacjach, z tym, że allel G_{c1} występuje częściej w porównaniu z allelem G_{c2} . Częstość allelu G_{c2} w różnych populacjach mieści się w granicach 5—40% (15). Zwrócono też uwagę, że allel G_{c2} jest bardziej powszechny w populacjach ludzkich zamieszkujących w północnych szerokościach geograficznych (15). *Mourant* i wsp. (22) sporządzili mapę świata, na której zaznaczyli częstość występowania allelu G_{c2} w populacjach ludzkich i porównali to z intensywnością nasłonecznienia. Poza pewnymi wyjątkami tereny o silnym nasłonecznieniu pokrywały się z niską częstością allelu G_{c2} w populacjach i odwrotnie. Próbowano doszukać się w tej zbieżności wyniku naturalnej selekcji. Białko będące produktem allelu G_{c2} powinno zgodnie z tym wykazywać większe powinowactwo do 25 OHD₃, aniżeli białko będące produktem allelu G_{c1} , gdyż mniejsze nasłonecznienie to jednocześnie mniejsza ilość syntetyzowanego w organizmie 25 OHD₃. Jednakże na podstawie wyników *Kawakami* i wsp. (17) nie wydaje się, żeby jakościowe lub ilościowe różnice w wiązaniu witaminy D₃ i jej metabolitów, odpowiedzialne były za selekcję w *locus* G_c i za utrzymanie się polimorfizmu tego systemu.

III. Struktura i właściwości fizyko-chemiczne białka wiążącego witaminę D w surowicy

Białko wiążące witaminę D (DBP) wyizolowano i scharakteryzowano pod względem fizyko-chemicznym w trzech laboratoriach (23, 24, 25). Jak wykazała elektroforeza w żelu agarozowym (24), DBP jest alfa-globuliną. Białko to zbudowane jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, do którego przyłączone są grupy kwasu sjałowego, (węglowodany) wrażliwego na neuraminidazę (15, 18).

Oczyszczone DBP ma masę cząsteczkową rzędu 51 000-58 000, z czego grupy węglowodanowe stanowią 3-4%.

Współczynnik sedymentacji DBP wynosi 3,4-4,2 S (15, 23, 25, 26). Punkt izoelektryczny apobiałka ma wartość 5, a po związaniu z 25 OHD₃ przesuwa się w kierunku anody o 0,1 jednostki pH (19).

Ustalono, że DBP krąży we krwi głównie w formie apo w stężeniu $6-9 \times 10^{-8}$ M (15, 27). Jedna cząsteczka DBP wiąże jedną cząsteczkę 25 OHD₃. Taki sam stosunek 1mol:1mol obserwuje się w wypadku witaminy D₃, 24,25 (OH)₂D₃ i 1,25 (OH)₂D₃ (Tab. 1). Białko wiążące witaminę D (DBP) wykazuje największe powinowactwo do 25 OHD₃, niemal identyczne do 24,25 (OH)₂D₃ i mniejsze do 1,25 (OH)₂D₃ i witaminy D₃.

Tabela 1

Ogólna charakterystyka DBP

Ruchliwość elektroforetyczna	-globulina
Struktura chemiczna	pojedynczy łańcuch polipeptydowy + + 3-4% węglowodanów (kwas sjałowy)
Masa cząsteczkowa	51 000—58 000
Współczynnik sedymentacji	3,4S—4,2S
Punkt izoelektryczny	± 5
Stężenie w surowicy	$6-9 \times 10^{-6}$ M
Wiązanie z ligandem	1 mol:1 mol

Miernikiem powinowactwa do ligandów są stałe asocjacji wyliczone przez K a w a k a m i i wsp. (17): $K_A = 1-2 \times 10^8 M^{-1}$ dla 25 OHD₃ i 24,25 (OH)₂D₃, $K_A = 1 \times 10^7 M^{-1}$ dla 1,25 (OH)₂D₃ i $K_A = 3-4 \times 10^5 M^{-1}$ dla witaminy D₃ (Tab. 2).

Fakt wysokiego stopnia powinowactwa DBP do metabolitów witaminy D₃ został wykorzystany w diagnostyce metabolizmu witaminy D, jako podstawa metody radiokompetycyjnej. Znalazło to zastosowanie w bada-

Tabela 2

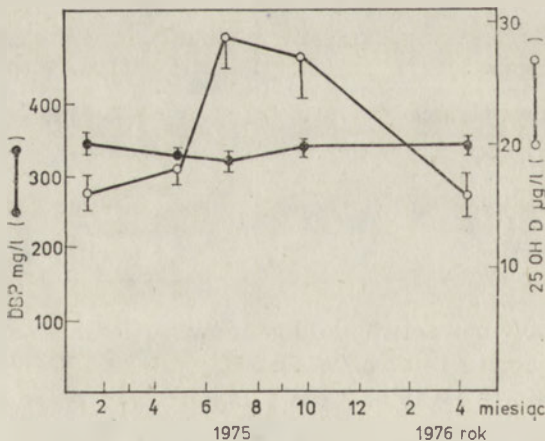
Powinowactwo DBP do ligandów

Rodzaj ligandu	Stała asocjacji K_A
25 OHD ₃ , 24,25(OH) ₂ D ₃	$1-2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
1,25(OH) ₂ D ₃	$1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
Witamina D ₃	$3-4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

niach klinicznych przy oznaczaniu poziomów 25 OHD₃ i 24,25(OH)₂D₃ w surowicy krwi ludzkiej.

Synteza DBP ma miejsce w wątrobie. Białko wykrywalne jest we krwi płodu między 10-tym a 13-tym tygodniem życia płodowego (15). Poziom DBP we krwi kobiet jest taki sam lub nieznacznie wyższy w porównaniu do poziomu we krwi mężczyzn. U kobiet ciężarnych i po podaniu estrogenów poziom DBP znacznie wzrasta (28). Natomiast niższy poziom tego białka obserwuje się we krwi noworodków. Dopiero we krwi kilkuletnich dzieci poziom DBP osiąga wartość porównywalną do tej, jaka występuje u dorosłych (15, 28).

Interesującą jest obserwacja, że niedobór witaminy D nie zmienia w sposób istotny stężenia DBP we krwi (26). Także zmiany w poziomie 25 OHD₃ nie pokrywają się ze zmianami w stężeniu DBP we krwi. Stwierdzono to badając sezonowe wzrosty poziomu 25 OHD₃ we krwi dzieci w okresie letnim kiedy na skutek zwiększonego naświetlania promieniami ultra-



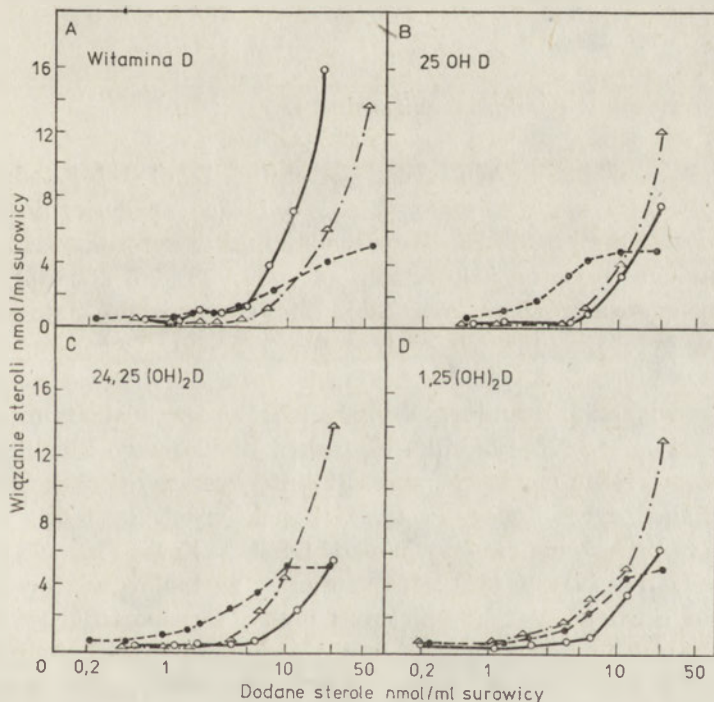
Ryc. 2. Poziomy DBP (czarne kółka) i 25 OHD₃ (białe kółka) w surowicy dzieci, mierzone w okresie kolejnych 16-tu miesięcy (wg. 28). Przebadano grupę 16-tu dzieci opóźnionych we wzroście.

wioletowymi występują istotne różnice w poziomach 25 OHD (28). Stężenie DBP we krwi w tych przypadkach nie zmieniło się pozostając na stałym poziomie. Ilustruje to ryc. 2. Podobnie u pacjentów poddawanych hemodializie i leczonych wysokimi dawkami witaminy D nie zaobserwowano korelacji pomiędzy poziomami DBP i 25 OHD₃ we krwi (28).

Liczne, równoczesne pomiary stężenia 25 OHD₃ i DBP w surowicy osobników zdrowych i w różnych stanach chorobowych, skłaniają do konkluzji, że nie ma współzależności ilościowej między poziomami obu tych związków (28).

IV. Wiązanie witaminy D i jej metabolitów przez inne białka

Zagadnienie wiązania metabolitów witaminy D rozszerzono o badania w różnych grupach systematycznych zwierząt. Ujawniono, że w przypadku ryb chrzęstnoszkieletowych i płazów witaminę D transportują po związaniu tylko lipoproteiny zaś w przypadku ryb kostnoszkieletowych, gadów i ssaków lipoproteiny prawdopodobnie transportują witaminę D z przewodu pokarmowego przez limfę do krwi, gdzie jest ona przechwy-



Ryc. 3. Powinowactwo witaminy D i jej metabolitów do białek ludzkiej surowicy (wg. 31). Do surowicy ludzkiej dodawano radioaktywne metabolity witaminy D, po czym mierzono radioaktywność w 3-ch frakcjach białkowych: DBP — czarne kółka; lipoproteiny — białe kółka; albumina — trójkąty.

tywana przez DBP (26, 29). Edelstein (30) wykazał, że u ptaków może występować więcej takich białkowych systemów transportujących, a ponadto witamina D i 25 OHD mogą być transportowane przez różne białka.

Biorąc pod uwagę wysoką specyficzną DBP w stosunku do witaminy D i jej metabolitów, postanowiono pytanie czy związki te mogą być wiązane i transportowane także przez inne białka surowicy. Badania powinowactwa witaminy D i jej metabolitów do białek surowicy, prowadzone *in vitro* (30, 31, 32, 33) ujawniły, że w warunkach fizjologicznych witamina D₃ wiązała się w 60% z DBP, w 40% z lipoproteinami i < 0,1% z albuminą. 25 OHD₃ i 24,25 (OH)₂D₃ wiązały się w 98% z DBP, w 2% z lipoproteinami, < 0,1% z albuminą, natomiast 1,25 (OH)₂D₃ w 62% z DBP, w 15% z lipoproteinami i w 23% z albuminą. Pojemność wiązania DBP była podobna dla wymienionych wyżej 4-ch steroli i wynosiła około 5 nmol/ml surowicy. Wraz ze wzrostem ilości dodawanych metabolitów witaminy D (ponad stan wysycenia DBP) obserwowano dalsze ich wiązanie się z lipoproteinami i albuminami, przy czym witamina D₃ miała większe powinowactwo do lipoprotein, a jej metabolity — 25 OHD₃, 24,25 (OH)₂D₃ i 1,25 (OH)₂D₃ do albuminy. Ilustruje to ryc. 3 zaczerpnięta z pracy Silver i Fainaru (31).

V. Białko cytosolowe wiążące witaminę D

Niezależnie od białka wiążącego witaminę D o stałej sedymentacji 3,4-4,2S (DBP), wykryto również białko wiążące specyficznie 25 OHD₃, o stałej sedymentacji 5-6S. Białko to występuje w cytosolu tkanek jądro-nych człowieka, szczura i kurczaka (27, 34, 35, 36, 37, 38), a także w cytosolu erytrocytów ptaków (35). Nie stwierdzono natomiast jego obecności w cytosolu ludzkich erytrocytów (35, 39). Zwrócono uwagę na podobieństwo białka 5-6S do DBP z krwi, wyrażające się jednakową specyficznością wiązania ligandów. Wykazano również ściśle immunologiczne podobieństwo DBP i składnika ekstraktu tkankowego ludzkiego jądra, płuca, wątroby, jelita cienkiego, serca (27, 37) oraz nerki (39). Stała sedymentacji białka cytosolowego z tych tkanek wynosiła 5-6S. Białko to reagowało z przeciwciałem przeciwko DBP z krwi (36, 37). Zaslugą Van Baelena i wsp. (39) było ustalenie, że białko wiążące 25 OHD₃ z cytosolu nerkowego jest kompleksem białka transportującego 25 OHD₃ (DBP) i składnika cytosolowego o stałej sedymentacji 4S. Sam składnik cytosolowy 4S nie ujawniał zdolności wiązania steroli. Stwierdzono, że jest to białko, gdyż po inkubacji cytosolu z trypsyną znikła zdolność kompleksująca z DBP. Metodą filtrowania na żelu ustalono ciężar cząsteczkowy tego białka, wynoszący w przypadku erytrocytów ptasich 39 000 (35). Zbadano również stopień powinowactwa cytosolowego biał-

ka 4S do DBP. Kompleks ten charakteryzuje się wysokim powinowactwem, wyrażonym przez stałą asocjacji $K_A = 1,8 \times 10^7 M^{-1}$. Wysycenie DBP przez ligandy sterolowe nie miało wpływu na wartość K_A , jak również na pojemność wiązania składnika cytosolowego (35).

Ponieważ masa cząsteczkowa całego kompleksu, oznaczona metodą filtrowania na żelu (27) ma wartość 98 000, a komponentów 58 000 i 39 000, stosunek cząsteczkowy między tymi komponentami wynosi 1:1.

Kompleksowy charakter cytosolowego białka wiążącego 25 OHD₃ o stałej sedymentacji 5-6S, potwierdziła jego dysocjacja po ogrzaniu cytosolu do 60°C. W tych warunkach zaobserwowano uwalnianie białka charakterystycznego dla krwi, o stałej sedymentacji 3,4-4,2S. Składnik cytosolowy wrażliwy na ogrzewanie ulegał najprawdopodobniej denaturacji cieplnej (39).

W wielu laboratoriach (35, 37, 39) badano powstawanie kompleksu 5-6S *in vitro*. Surowicę znakowaną 25 OH[³H]D₃, inkubowano z cytosolem jelita szczura (36, 37) lub cytosolem ludzkich mięśni szkieletowych (35). Jak ustalono, dodana w postaci znakowanego 25 OHD₃ radioaktywność, występowała we frakcji o stałej sedymentacji 5-6S, charakterystycznej dla cytosolowego białka wiążącego (35, 37, 39). Stwierdzono również, że łączenie DBP z krwi ze składnikiem cytosolowym 4S, jest procesem wysycalnym. Wraz ze wzrostem ilości dodawanego cytosolu, zwiększała się ilość kompleksu 5-6S (39). Na uwagę zasługuje fakt, że kompleks powstawał także podczas inkubacji cytosolu tkanek szczura i ludzkiej surowicy, co przemawia za brakiem specyficzności gatunkowej.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe dane nasuwa się pytanie, czy białko cytosolowe 5-6S wiążące 25 OHD₃ ma znaczenie fizjologiczne, czy też jest artefaktem powstałym podczas preparowania cytosolu, wynikającym z zanieczyszczenia surowicą. Potwierdzenia нефизjologicznego powstawania kompleksu można znaleźć w pracach Kream i Van Baalen (37, 39). W izolowanych komórkach jelitowych przemywanych buforem autorzy ci nie obserwowali obecności cytosolowego białka 5-6S. Natomiast kiedy komórki homogenizowano z dodatkiem surowicy lub do otrzymanego cytosolu dodawano surowicę, białko pojawiało się (37). Podobnie, w cytosolu pochodzącym z komórek hodowli tkankowej nerek szczura, nerek ludzkich i fibroblastów skóry ludzkiej, nie znaleziono kompleksu 5-6S, natomiast występowało białko kompleksujące 4S (39). Jednakże sam fakt, że białko wiążące kompleks 5-6S nie pojawia się w kulturach komórkowych bez surowicy, nie jest jeszcze argumentem przeciwko jego występowaniu *in vivo*, zważywszy, że w opisanych warunkach może zachodzić uwarunkowana fizjologicznie konieczność wnikania białka wiążącego witaminę D z krwi (DBP) do komórki.

Za występowaniem białka 5-6S *in vivo* przemawia fakt, że kompleks powstaje w fizjologicznym pH 7,4 i 9,0 (27), natomiast do swej dysocjacji

wymaga tak nienaturalnych warunków jak: ogrzewanie w 60°C, wysokie stężenie soli, czynniki denaturujące, 1% SDS (27). Obecność obu białek wiążących 25 OHD₃, o współczynnikach sedymentacji 5-6S i 3,4-4,2S w płynie fizjologicznym, jakim jest mleko, potwierdza również koncepcję występowania kompleksu *in vivo* (34, 39).

Na podstawie tych spostrzeżeń Hollis (34) sugeruje, że białko wiążące witaminę D₃ (DBP), przechodząc przez system gruczołów mlecznych, kompleksuje ze składnikiem cytosolowym 4S i daje w efekcie białko 5-6S. W swojej ostatniej pracy (40) Hollis potwierdził ściśle immunologiczne podobieństwo białka wiążącego witaminę D wykrytego w mleku do białka DBP pochodzącego z krwi. Stwierdził on jednocześnie, że ilość DBP w serwatce mleka zależy od etapu laktacji. Wyższy poziom (18 µg/l) obserwuje się we wczesnym okresie, zaś niższy (3 µg/l) po 3-ch tygodniach. W procesie sekrecyjnym 25 OHD₃ przechodzi jego zdanem (40) przez system gruczołu mlecznego jako frakcja ściśle związana z DBP, a następnie jest uwalniane do warstwy lipidowej mleka.

Zagadnieniem wymagającym ciągle zbadania i wyjaśniania jest rola drugiego składnika kompleksu — białka cytosolowego o stałej sedymentacji 4S. Białko to mogłoby ułatwiać wejście do komórki, magazynowanie lub transport wewnątrzkomórkowy metabolitów witaminy D związanych we krwi z DBP. Istnieje też możliwość, że pełni ono wszystkie te trzy funkcje (35). Nie wykluczone również, że białko kompleksujące 4S przyczynia się do dimeryzacji DBP z krwi, co w przypadku innych hormonów sterydowych ma znaczenie w interakcji z chromatyną komórki.

VI. Biologiczna rola białka wiążącego witaminę D

Pomimo zaawansowanych prac nad DBP, ciągle brakuje jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jaka jest właściwie rola tego białka, jak również w jakim celu wiąże ono witaminę D i jej metabolity. Sprawa wyjaśniłaby się, gdyby natrafiono na przypadek mutacji zmieniającej centrum aktywne białka aż do utraty zdolności wiązania przez to białko metabolitów witaminy D. Jednakże, jak dotąd nie spotkano osobnika, u którego białko DBP nie wiązałoby metabolitów witaminy D (15). Nie zaobserwowano też, aby przyczyną bezpośrednią lub pośrednią którejś ze znanych w medycynie chorób, był znamienne zmieniony poziom DBP. Wyjątek stanowi marskość wątroby, gdzie niższy od normalnego poziom DBP, wynika prawdopodobnie z zaburzenia jego syntezy mającej miejsce właśnie w wątrobie, będąc skutkiem a nie przyczyną choroby. W tabeli 3 zamieszczono podane przez Bouillon (28) poziomy DBP we krwi osobników zdrowych i pacjentów z zaburzeniami gospodarki wapniowo-fosforanowej. Ponieważ DBP nie ma cechy, którą można by bezpośrednio odnieść do jego funkcji, badacze tego problemu skupili swoją uwagę nad

niewspółmiernością między molarną zdolnością wiązania witaminy D, a endogennym poziomem jej metabolitów. Jak ustalono, w warunkach fizjologicznych DBP jest wysyczone przez te związki najwyżej w 5⁰/. Stan wysycenia pojawia się przy wyższych ilościach metabolitów witaminy D. W związku z tym białko to, mogłoby pełnić rolę ochronną przeciwko zatruciu witaminą D (15, 26), wynikającym z przedawkowania u dzieci lub nadmierną jej syntezą w skórze. Jak podaje Bouillon (26) toksyczny poziom wolnego 25 OHD może być efektem nawet jednorazowego naświetlania słonecznego.

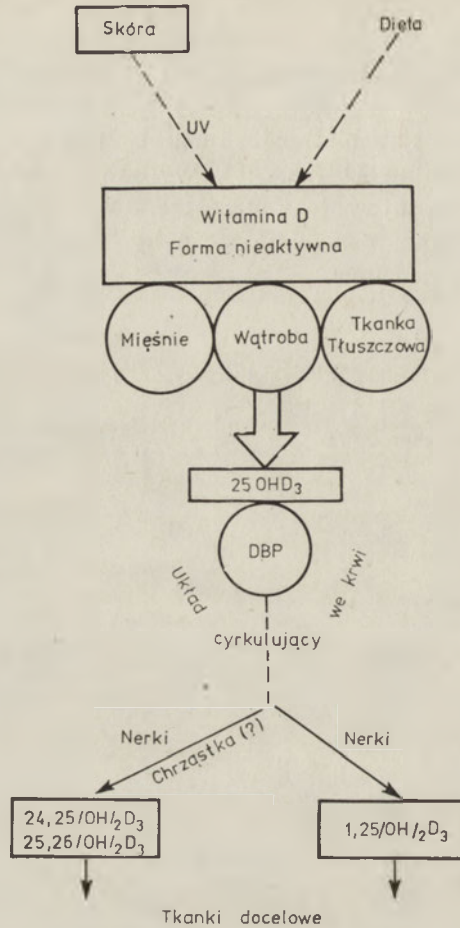
Tabela 3

Poziomy DBP (mg/l) w surowicy ludzkiej w przypadku różnych chorób (wg 28)

Jednostka chorobowa	Stężenie DBP w surowicy ludzkiej mg/l
Osobnicy zdrowi	340 ± 61
Krzywica (Osteomalacja)	329 ± 34
Pierwotna osteoporoza	351 ± 40
Pierwotna nadczynność przytarczyc	354 ± 27
Program przewlekłych dializ	346 ± 44
Nadczynność tarczycy	323 ± 23
Akromegalia	404 ± 44
Niedobór hormonu wzrostu	348 ± 44
Marskość wątroby	273 ± 67

Za rolą ochronną DBP przeciwko zatruciu witaminą D przemawia też obserwacja, że białko to może działać jako inhibitor nerkowej 1-hydroksylazy 25 OHD₃ (41). Jak ustalono, oczyszczony inhibitor ma współczynnik sedymentacji 4S i masę cząsteczkową 52 000 (tak jak DBP). Stwierdzono również, że przeciwciała specyficzne w stosunku do inhibitora 1-hydroksylazy 25-hydroksycholekalciferolu precypitują z DBP (41).

Daiger (15) i Bouillon (26) postulują, że oprócz roli ochronnej przeciwko zatruciu witaminą D, DBP mogłoby też pełnić funkcję magazynującą ten związek. Wynika to z tego, że witamina D dostarczona jest okresowo, zarówno w pokarmie, jak i po nasłonecznieniu, wobec czego potrzebny jest system zapewniający stałą podaż i uzupełnienie w przypadku jej niedoboru (Ryc. 4). Daiger (15) w swoich rozważaniach próbuje połączyć funkcję ochronną i magazynującą białka DBP=G_c, wysuwając hipotezę, że jedno z białek G_c mogłoby być bardziej efektywne w zabezpieczeniu przed hyperkalcemią wynikającą z przedawkowania witaminą D, a drugie w zabezpieczeniu przed krzywicą, będącą efektem



Ryc. 4. Schemat metabolizmu witaminy D uwzględniający przestrzenne rozmieszczenie kolejnych etapów przemiany w organizmie.

niedoboru witaminy D. Byłoby to jednocześnie uzasadnienie polimorfizmu genetycznego białka DBP=G_c. Atrakcyjne te hipotezy czekają nadal na wiarygodne wyjaśnienie i udokumentowanie.

Praca finansowana przez Politechnikę Wrocławską w ramach tematu nr R.1.9.03.06 (04.01).

Zaakceptowano do druku 27.07.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Holick M. F., Clark M. B., (1978), *Federation Proc.*, **37**, 2567—2574.
2. DeLuca H. F., (1979), *J. Steroid Biochem.*, **11**, 35—52.
3. Norman A. W., (1980), *Vitamin D* Ed. A. W. Norman, Marcel Dekker Inc. 197—250.

4. Jones G., Schnoes H., Levan L., DeLuca H. F., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **202**, 450—457.
5. Weckler W. R., Norman A. W., (1980), *J. Steroid Biochem.*, **13**, 977—978.
6. Bhattacharya M. H., DeLuca H. F., (1979), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2969—2973.
7. Yoon P. S., DeLuca H. F.; (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 529—541.
8. Garabedian M., Holick M. F., DeLuca H. F., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1673—1676.
9. Pike J. W., Haussler M. R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5485—5489.
10. Mellon W. S., DeLuca H. F., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4081—4086.
11. Stumpf W. E., Sar M., Narbaitz R., Reid F., DeLuca H. F., Tanaka Y., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 1149—1153.
12. Simpson R. U., DeLuca H. F., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5822—5826.
13. Hughes M. R., Haussier M. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1065—1073.
14. Gelbard H. A., Stern P. H., V'Prichard D. C., (1980), *Science*, **209**, 1247—1249.
15. Daiger S. P., (1979), *Vitamin D. Basic Research and its Clinical Application*, red. Norman A. W., Schaefer K., Herrath D., Grigoleit H. G., Coburn J. W., DeLuca H. F., Mawer E. B., Suda T., 129—135, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
16. Hirschfeld J., (1959), *Acta Path. Micro. Scand.*, **47**, 160—163.
17. Kawakami M., Imwari M., Goodman D., (1979), *Biochem. J.*, **179**, 413—423.
18. Svasti J., Kurosky A., Bennett A., Surarit R., Bowman B. H., (1979), w *Vitamin D. Basic Research and its Clinical Application*, red. Norman A. W., Schaefer K., Herrath D., Grigoleit H. G., Coburn J. W., DeLuca H. F., Mawer E. B., Suda T., 149—152, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
19. Svasti J., Bowman B., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4188—4194.
20. Contans J., Cleve H., (1979), *Hum. Genet.*, **48**, 143—149.
21. Contans J., Viau M., Moatti J. P., Clavere J. L., (1979), w *Vitamin D. Basic Research and its Clinical Application*, red. Norman A. W., Schaefer K., Herrath D., Grigoleit H. G., Coburn J. W., DeLuca H. F., Mawer E. B., Suda T., 153—156, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
22. Mourant E. E., Tills D., Domaniewska-Sobczak K., (1976), *Hum. Genet.*, **33**, 307—314.
23. Haddad J., Walgate J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4803—4809.
24. Bouillon R., Van Baelen H., Rombants W., De Moor P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **66**, 285—291.
25. Imwari M., Kida K., Goodman D. S., (1976), *J. Clin. Invest.*, **58**, 514—523.
26. Bouillon R., Van Baelen H., (1979), w *Vitamin D. Basic Research and its Clinical Application*, red. Norman A. W., Schaefer K., Herrath D., Grigoleit H. G., Coburn J. W., DeLuca H. F., Mawer E. B., Suda T., 137—143, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
27. Cooke N. E., Walgate J., Haddad J. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5958—5964.

28. Bouillon R., Van Baelen H., De Moor P., (1977), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **45**, 225—231.
29. Ridders H., DeLuca H. F., (1967), *Amer. J. Physiol.*, **213**, 380—386.
30. Edelstein S., Lawson D. E. M., Kodicek E., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 417—426.
31. Silver J., Fainaru M., (1979), w *Vitamin D. Basic Research and its Clinical Application*, red. Norman A. W., Schaefer K., Herrath D., Grigoleit H. G., Coburn J. W., DeLuca H. F., Mawer E. B., Suda T., 145—148, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
32. Smith J. E., Goodman W. S., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 2159—2167.
33. Silver J., Fainaru M., (1979), *Eur. J. Clin. Invest.*, **9**, 433—438.
34. Hollis B. W., Draper H. H., (1979), *Comp. Biochem. Physiol.*, **64B**, 41—46.
35. Cooke N. E., Walgate J., Haddad G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5965—5971.
36. Cloix J. F., Bachelet M., Ulmann A., Funck-Brentano J. L., (1978), **83**, 1456—1463.
37. Kream B. E., DeLuca H. F., Moriarity D. M., Kendrick N. C., Ghazarian J. G., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 318—323.
38. Brumbaugh P. F., Haussler M. R., (1975), *Life Sci.*, **16**, 353—362.
39. Van Baelen H., Bouillon R., De Moor P., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2515—2518.
40. Hollis B. W., Roos B. A., Draper H. H., Lambert P. W., (1981), *J. Nutr.*, **111**, 1240—1248.
41. Ghazarian J. G., Kream B., Botham K. M., Nickelss M. W., DeLuca H. F., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**, 212—220.

Słownictwo związków grupy witaminy D wymienionych w artykule

dotychczasowa potoczna nazwa zwyczajowa	skrótowy nazw stosowane w artykule	nowa zalecana nazwa zwyczajowa
cholekalcyferol	witamina D ₃ nadaj dozwołony	kalcy-ol lub cholekalcyferol
ergokalcyferol	witamina D ₂ nadaj dozwołony	erkalcy-ol lub ergokalcyferol
25-hydroksycholekalcyferol	25-OH D ₃ nie wskazany	kalcydiol
24(R),25-dihydroksycholekalcyferol	24,25(OH) ₂ D ₃ nie wskazany	(24R)-hydroksykalcydiol
1,25-dihydroksycholekalcyferol	1,25(OH) ₂ D ₃ nie wskazany	kalcytriol
25,26-dihydroksycholekalcyferol	25,26(OH) ₂ D ₃ nie wskazany	26-hydroksykalcydiol

PAWEŁ T. SZYMAŃSKI *)

Receptory adrenergiczne

Adrenergic receptors

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Klasyfikacja i lokalizacja receptorów adrenergicznych
 - II-1. Receptory adrenergiczne α
 - II-2. Receptory adrenergiczne β
- III. Budowa receptorów adrenergicznych
 - III-1. Receptory adrenergiczne α
 - III-2. Receptory adrenergiczne β
- IV. Mechanizm działania receptorów adrenergicznych
 - IV-1. Interakcja receptorów adrenergicznych β z katecholaminami
 - IV-2. Miejsca wiążące nukleotydy w receptorach adrenergicznych β
 - IV-3. Rola lipidów i płynności błon w syntezie cAMP
 - IV-4. Interakcja receptorów adrenergicznych z α ligandami
 - IV-5. Komórkowy poziom cyklicznych nukleotydów a α stymulacja
 - IV-6. Metabolizm fosfatydyloinozytolu stymulowany poprzez receptory adrenergiczne α
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Classification and localization of adrenergic receptors
 - II-1. α adrenergic receptors
 - II-2. β adrenergic receptors
- III. Chemical structure of adrenergic receptors
 - III-1. α adrenergic receptors
 - III-2. β adrenergic receptors
- IV. Mechanisms of actions of adrenergic receptors
 - IV-1. Interactions of β adrenergic receptors with catecholamines
 - IV-2. Binding sites of guanyle nucleotides in β adrenergic receptors
 - IV-3. Influence of lipids and membrane fluidity on the cAMP synthesis
 - IV-4. Interactions of adrenergic receptors with α ligands
 - IV-5. α stimulation and cell level of cyclic nucleotides
 - IV-6. Fosfatidylinositol metabolism stimulated by α adrenergic receptors
- V. Final remarks

*) Mgr, Zakład Biochemii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 79, 01-813 Warszawa.

Stosowane skróty: DHE-dwuhydroergokryptyna, EGTA-etylenoglikolo-bis(2-ami-noetylo)N,N'-czterooctan, Gpp(NH)p-guanozyloimidotrójfosforan, 125 IHYP-monojodo-hydroksybenzylpindolol, WB 4101-(2,6-dwumetoksyfenoksyetylo)-aminometylo-1,4-benzodioksan.

I. Wstęp

Aminy katecholowe uznaje się od dawna za istotne regulatory wielu komórkowych procesów biochemicznych. Syntetyzowane z tyrozyny są magazynowane a następnie wydzielane przez chromochłonne komórki rdzenia nadnerczy oraz uwalniane z zakończeń nerwowych neuronów mózgu oraz układu autonomicznego. Uwolnione do szczeliny synaptycznej aminy katecholowe oddziałują z receptorami adrenergicznymi, wyspecjalizowanymi fragmentami błon pre- i postsynaptycznych. Powoduje to oprócz neurotransmisji aktywację szeregu charakterystycznych dla określonych tkanek i narządów reakcji metabolicznych. Przykładami są: regulacja przemiany węglowodanów, lipoliza, obwodowy metabolizm hormonów tarczycy, sekrecja amylazy i insuliny a także reakcje związane z procesami skurczów mięśni oraz wiele innych. Reakcje tkanek i narządów zależą od rodzaju docierających do nich katecholamin, ich stężenia a także od właściwości czy klasy oddziałujących z nimi receptorów adrenergicznych. Ponadto odpowiedzi komórkowych receptorów adrenergicznych zależą nie tylko od specyfiki określonego narządu lecz również od różnic gatunkowych (1), wieku organizmu (2), temperatury środowiska (3-6), stopnia kolaryzacji błony komórkowej, składu jonowego i pH płynów ustrojowych (7), obecności szeregu metabolitów (8, 9), a także hormonów. Znaczna część amin katecholowych pobierana jest zwrotnie przez zakończenia nerwowe układu współczulnego na przykład w sercu, śledzionie, płucach i komórkach chromochłonnych. Część zaś wydzielonych z pęcherzyków ziarnistych zakończeń nerwowych amin katecholowych, ulega inaktywacji. Zachodzi ona pod wpływem O-metylotransferazy S-adenozylometionina: katechol (EC 2.1.1.6) oraz dezaminującej oksydoreduktazy monoamina: tlen, (EC 1.4.3.4).

W pracy zebrano dane dotyczące klasyfikacji i lokalizacji receptorów adrenergicznych, ich budowy i mechanizmów działania.

II. Klasyfikacja i lokalizacja receptorów adrenergicznych

Obecność w komórkach receptorów adrenergicznych specyficznie wiążących aminy katecholowe zasugerował po raz pierwszy Dale (10). Wykazał on, co potwierdziły inne późniejsze badania, że ergotamina, alkaloid sporyszu, znosiła wywoływany działaniem adrenaliny skurcz naczyń, nie hamowała zaś rozkurczu mięśni gładkich oskrzeli, oraz stymulowanych przez adrenalinę fizjologicznych następstw pobudzenia mięśnia sercowego. Podobne działanie jak ergotamina, wykazały haloalkiloaminy, głównie fenoksybenzamina. Późniejsze obserwacje sugerowały dwojaki, często przeciwstawny charakter odpowiedzi fizjologicznych narządów na

szereg amin katecholowych, których efekty wybiórczo hamowały niektóre leki. Obserwacje te pozwoliły A h l q u i s t o w i (11), wyróżnić dwa typy receptorów adrenergicznych, które nazwał receptorami α i β . Klasyfikację tę stosuje się do dziś bez zasadniczych zmian. Nagromadzające się zaś z czasem fakty stały się powodem wyróżnienia podklas receptorów. Obecnie rozróżnia się receptory adrenergiczne α_1 , α_2 oraz β_1 i β_2 .

II-1. Receptory adrenergiczne α

Receptory adrenergiczne α występują głównie w mięśniach gładkich, ale znaleziono je także w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych, mózgu oraz w innych narządach. Receptory te oddziałują zarówno z endogennymi aminami: adrenaliną i noradrenaliną jak i egzogennymi: fenylefryną i izoproterenolem. Związki będące typowymi substancjami agonistycznymi dla receptorów adrenergicznych tej klasy uszeregowano według malejącej zdolności wywoływania takich efektów fizjologicznych jak: skurcz naczyń, skurcz mięśni macicy, wyciągnięcie trzeciej powieki, skurcz źrenicy i spadek napięcia mięśni jelit. Oprócz agonistów, z receptorami adrenergicznymi oddziałują także związki zwane antagonistami, które powodują częściowe lub nawet całkowite zahamowanie fizjologicznych efektów wskazujących na pobudzenie receptorów przez agonistów. W większości przypadków związki antagonistyczne charakteryzuje podobna do typowych agonistów struktura a często i zbliżone powinowactwo do receptorów. Do typowych antagonistów tej grupy receptorów należą: alkaloidy sporyszu, fentolamina, fenoksybenzamina i wiele innych. Typowe substancje o działaniu agonistycznym i antagonistycznym receptorów adrenergicznych α zebrano w tabeli 1.

W celu dalszego usystematyzowania wiedzy o receptorach adrenergicznych α , L a n g e r (12) i S t a r k e (13) wyróżnili wśród białek błonowych tej grupy dwie podklasy: α_1 i α_2 . Podziału tego dokonano na podstawie różnic w występowaniu tych receptorów w błonach komórek wrażliwych na aminy katecholowe, ich powinowactwa do ligandów receptorów α a także fizjologicznych reakcji wywołanych przez oddziałujące z nimi farmakologiczne czynne substancje.

Receptory adrenergiczne α związane z zewnętrznymi powierzchniami pozaneuronalnych błon komórek docelowych nazwano α_1 . Pośredniczą one w typowych dla określonych tkanek i narządów reakcjach metabolicznych. Receptory α_1 wiążą znacznie silniej fenoksybenzaminę i prazosynę aniżeli johimbineę. Natomiast stałe powinowactwa receptorów adrenergicznych α_1 i α_2 do fentolaminy czy alkaloidów sporyszu są zbliżone. Wskazuje to na brak specyficzności działania tych dwu antagonistycznych substancji.

Receptory adrenergiczne α_2 , określane niekiedy jako autoreceptory,

Sposób działania	Nazwa zwyczajowa	Wzór strukturalny
AGONIŚCI	Adrenalina	<chem>CCNCC(O)c1ccc(O)cc1</chem>
	Klonidyna	<chem>C1CCN(C1)N2C(=O)N(C2)c3ccc(Cl)c(Cl)c3</chem>
	Fenylefryna	<chem>CCNCC(O)c1ccc(O)cc1</chem>
	Izoproterenol	<chem>CC(C)NCC(O)c1ccc(O)cc1</chem>
	Metoksamina	<chem>CN(C)C(O)c1ccc(O)cc1</chem>
	Noradrenalina	<chem>CCNCC(O)c1ccc(O)cc1</chem>
ANTAGONIŚCI	Azapetyna	<chem>C=CCN(Cc1ccccc1)c2ccccc2</chem>
	Dibozan	<chem>C1CCN(C1)CC2=CC=CC=C2O2</chem>
	Dwuhydroergo-kryptyna	<chem>CC12CC3=C(C=C1)N(C)C(=O)N3C2</chem>
	Ergotamina	<chem>C12CC3=C(C=C1)N(C)C(=O)N3C2</chem>
	Fenoxibenzamina	<chem>CC(C)N(Cc1ccccc1)CCOc2ccccc2</chem>
	Fentolamina	<chem>C1CCN(C1)CN(C2=CC=C(C=C2)N3C=CC=C(C=C3)C)C4=CC=C(C=C4)C</chem>
	WB 4101	<chem>COC1=CC=C(C=C1)OCCNCC2=CC=CC=C2O2</chem>
	Johimbina	<chem>CC(=O)O[C@H]1CC[C@@H]2[C@@H](C1)N3C=CC=C(C=C3)N2</chem>

Tab. 1. Niektóre aktywatory i inhibitory receptorów adrenergicznych α .

występują w presynaptycznych błonach nerwów sympatycznych. Regulują one wydzielanie neuromediatorów do szczeliny synaptycznej. Wykazano, że niektóre związki o działaniu agonistycznym hamują wydzielanie noradrenaliny z zakończeń nerwowych układu autonomicznego. Substancje, które charakteryzują się natomiast jedynie wysokim powinowactwem do receptorów adrenergicznych α_2 , powodowały wzrost wydzielania tego neuromediatora do przestrzeni synaptycznej. Receptory α_2 oddziałując z licznymi ligandami, wykazują szczególnie wysokie powinowactwo do johimbiny, niskie zaś do prazosyny i fenoksybenzamin. Wprowadzona klasyfikacja wydaje się być bardzo użyteczna. Tym niemniej receptory niektórych wyspecjalizowanych pozaneuronalnych błon plazmatycznych w odpowiedzi na działanie ligandów przypominały typowe receptory presynaptyczne (14, 15). Przykładami farmakologicznie czynnych receptorów adrenergicznych α_2 w błonach pozaneuronalnych są receptory płytek krwi człowieka (16), komórek wielu linii hodowlanych *in vitro* (17), i receptory skóry indyka (18). Dane te świadczą o bardzo szerokim i różnicowanym występowaniu receptorów adrenergicznych α_2 .

II-2. Receptory adrenergiczne β

Receptory adrenergiczne β występują głównie w mózgu, sercu, mięśniach gładkich oraz licznych narządach, których metabolizm regulowany jest przez adrenalinę. W sercu pobudzenie ich wywołuje dodatnie reakcje ino-, tono-, chromo-, batmo-, i dromotropowe. Pośredniczą one ponadto w rozkurczu naczyń, spadku napięcia mięśni gładkich oskrzeli, jelit i macicy. Z receptorami β oddziałują te same związki agonistyczne co z receptorami α . Ich podatność na aktywację przez katecholaminy maleje jednak w odwrotnej, w stosunku do receptorów adrenergicznych α , kolejności i przedstawia się następująco: izoproterenol, adrenalina, noradrenalina, fenylefryna. Antagonistami tej klasy receptorów są: propranolol, dwuchlozoproterenol, alprenolol oraz wiele innych. Typowe przykłady substancji agonistycznych i antagonistycznych receptorów adrenergicznych β przedstawia tabela 2.

W stosunku do receptorów adrenergicznych β , o których występowaniu i wrażliwości na działanie licznych ligandów pojawiało się szereg często sprzecznych informacji, proponowano wiele różnych klasyfikacji. Opierano je zazwyczaj na stopniu wrażliwości receptorów określonego narządu wobec kilku zaledwie agonistów oraz znacznej liczby antagonistów. Najmniej kontrowersyjne i zarazem najtrwalsze okazało się wyróżnienie dwóch klas receptorów β_1 i β_2 (19). Receptory β_1 obecne są głównie w sercu i jelitach. Powinowactwo ich do endo- i egzogennych agonistów maleje w następującej kolejności: izoproterenol > adrenalina \approx noradrenalina. Receptory adrenergiczne β_2 występują przede wszy-

Sposób działania	Nazwa zwyczajowa	Wzór strukturalny
AGONIŚCI	Adrenalina	<chem>CC(N)C(O)c1ccc(O)cc1</chem>
	Fenylefryna	<chem>CCN(CC)C(O)c1ccccc1O</chem>
	Hydroxybenzol-izoproterenol	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>
	Izoproterenol	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(O)cc1</chem>
	Noradrenalina	<chem>CC(N)C(O)c1ccc(O)cc1</chem>
	Orcyprenalina	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>
	Protoktylol	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(O)c(O)c1</chem> <chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>
	Salbutamol	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(O)c(CO)c1</chem>
	Soternol	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(O)c(NC(=O)C)c1</chem>
ANTAGONIŚCI	Alprenolol	<chem>CC(C)N(C)C(O)C(O)Cc1ccc(C=C)cc1</chem>
	Dwuchloroizoproterenol	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(Cl)c(Cl)c1</chem>
	Dwuhydroalprenolol	<chem>CC(C)N(C)C(O)C(O)Cc1ccccc1</chem>
	Hydroxybenzylpindolol	<chem>CC(C)N(C)C(O)Cc1ccc(O)c1</chem> <chem>CC(C)N(C)C(O)Cc1ccc(O)c1</chem>
	Pindolol	<chem>CC(C)N(C)C(O)Cc1ccc2c(c1)cnc2</chem>
	Praktolol	<chem>CC(C)N(C)C(O)Cc1ccc(NC(=O)C)cc1</chem>
	Propranolol	<chem>CC(C)N(C)C(O)Cc1ccc2ccccc2c1</chem>
	Satolol	<chem>CC(C)N(C)C(O)c1ccc(S(=O)(=O)N)cc1</chem>

Tab. 2. Niektóre aktywatory i inhibitory receptorów adrenergicznych β .

stkim w oskrzelach, macicy i naczyniach krwionośnych. Wrażliwość ich w stosunku do niektórych agonistów kształtuje się następująco: izoproterenol > adrenalina > noradrenalina. Trzeba zaznaczyć przy tym, że występowanie receptorów adrenergicznych typu β nie ogranicza się jedynie do tkanek normalnie unerwionych, gdyż występują one np. w komórkach barwnikowych żaby i jaszczurki *Anolis* a także w lipocytach, erytrocytach, płytkach krwi oraz komórkach pęcherza moczowego kręgowców.

III. Budowa receptorów

Receptory adrenergiczne związane są z błonami komórkowymi, a w niektórych tkankach również z retikulum endoplazmatycznym (mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy). Ich obecność uwarunkowana jest genetycznie. Charakterystykę receptorów, w celu określenia ich budowy, prowadzono zarówno przy niezmienionej strukturze błonowej jak i po solubilizacji błon różnymi detergentami. W badaniach tych wykorzystywano zdolności specyficznego wiązania przez receptory α i β zarówno agonistów jak i antagonistów.

III-1. Receptory adrenergiczne α

Opierając się na metodach izolowania błonowych receptorów wiążących acetylocholinę (20, 21) wyodrębniono ze śledziony bydłowej hydrofobowy lipoproteid, wykazujący cechy receptora typu α (22). Wyekstrahowany mieszaniną chloroformu z metanolem (2:1) i następnie oczyszczony na żelu Sephadex LH-20, kompleks lipoproteidowy (22), wiązał (^3H) noradrenalinę przy niskich jej stężeniach ($1 \times 10^{-8}\text{M}$). Kinetyka wiązania hormon-receptor wskazywała na wysoką specyficzność tej reakcji. Stałe dysocjacji tego kompleksu sugerowały obecność miejsc wiążących o różnych właściwościach. Charakteryzowały się one różnym powinowactwem receptora α do znakowanej aminy biogennej. W skład kompleksu wiążącego wchodziły takie lipidy jak: fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloinozytol i fosfatydyloseryna. Nie stwierdzono natomiast obecności fosfatydylocholiny i sfingomielin. Stosunek fosfolipidów do białek w preparatach upłynnionych błon plazmatycznych wykazujących cechy receptorów adrenergicznych α wynosił 6:25.

III-2. Receptory adrenergiczne β

Wyizolowanie receptorów β w ich aktywnych formach stało się możliwe dzięki zastosowaniu współczesnych metod chromatograficznych i różnych sposobów solubilizacji błon. Solubilizując błony plazmatyczne po-

chodzące z komór serc psów, dezoksychohanem lub lubrolem PX wyodrębniono metodą chromatografii powinowactwa na żelu agarozowym sprzężonym z noradrenaliną białka wiążące znakowaną noradrenalinę (23). Kinetyka wiązania się [^3H] noradrenaliny z oczyszczonym na żelu białkiem wskazywała na obecność w nim miejsc wiążących o różnych właściwościach. Stwierdzono, że znakowany ligand wiązał się nie tylko z białkami o masie cząsteczkowej 40 000, ale przyłączał się także do białek o czterokrotnie wyższym ciężarze. Mogłoby to wynikać z agregacji podczyszczonego na żelu receptora. Wydaje się jednak możliwe, że białka o masie cząsteczkowej 40 000 stanowią wolny receptor, podczas gdy te o wyższym ciężarze cząsteczkowym reprezentować mogą receptor niedostatecznie oddzielony od towarzyszących mu struktur błonowych. Stosując podobną metodykę wykazano, że elektroforetycznie jednorodne białko, o stałej sedymentacji 9S specyficznie wiązało ^{125}I HYP. Charakteryzowało się ono masą cząsteczkową 58 000 (24). Ponadto niska wartość punktu izoelektrycznego (5,8) tego preparatu wskazywała na przewagę w nim aminokwasów kwaśnych. Trzeba jednak zaznaczyć, że porównanie ruchliwości elektroforetycznej receptorowych białek wyizolowanych różnymi metodami z serc psów (23), z erytrocytów żab (24) oraz indyków (25) świadczy o znacznych różnicach ciężarów cząsteczkowych białek błonowych tej grupy, pomimo że wykazują one zbliżone parametry kinetyczne.

Liczne wcześniejsze hipotezy sugerowały, że receptory oprócz przyłączania różnych ligandów wykazują równocześnie aktywność enzymatyczną, przejawem której jest synteza cAMP.

Jednakże stosując frakcjonowanie metodą chromatografii powinowactwa solubilizowanym digitoniną cieni erytrocytów wykazano, że białka receptorowe *sensu stricto* nie wykazują aktywności cykazy adenylowej (26). Potwierdzeniem odrębności strukturalnej i funkcjonalnej receptora i cykazy adenylowej były także wyniki badań nad kinetyką oddziaływania znakowanych ligandów z błonami plazmatycznymi komórek mutantów pozbawionych aktywności enzymatycznej (27). Równocześnie wykazano, że w obce struktury błonowe wbudować można jedynie białka specyficznie wiążące adrenergiczne ligandy (28—30). Ponadto wyodrębnione z błon plazmatycznych preparaty białek receptorowych nie łączyły się z nukleotydami guanylowymi. Tym niemniej sugerowano, co nie zostało jednak bezpośrednio potwierdzone, że białka wiążące liczne β adrenergiczne ligandy są również miejscem wiązania GTP (31, 32).

Co więcej, zarówno oczyszczone receptory jak też receptory związane z błoną, wrażliwe są na odczynniki redukujące wiązania dwusiarczkowe (23, 26, 33). Wskazuje to, że receptorami mogą być nawet pojedyncze łańcuchy polipeptydowe. Kinetyka wiązania [^3H] dwuhydroalprenololu wskazuje, że redukcja mostków dwusiarczkowych dwutiotreiolem obniża liczbę miejsc receptorowych, nie wywierając równocześnie wpływu na

zmianę powinowactwa białka wiążącego wobec adrenergicznego antagonisty (33). Redukcja mostków dwusiarczkowych ma charakter reakcji dwucząsteczkowej i jest ponadto odwracalna. Fakt, że ligandy o cechach zarówno substancji o działaniu agonistycznym jak i antagonistycznym zapobiegają inaktywacyjnemu działaniu dwutiotreitolu, wskazuje na możliwość konformacyjnych zmian w cząsteczce receptora podczas łączenia się z nim neurohormonu. Dane te sugerują ponadto, że mostki dwusiarczkowe występują w pobliżu miejsc receptorowych neurohormonów, a nie w centrum aktywnym receptora.

Fizjologiczne obserwacje wykazały, że obniżenie temperatury izolowanych serc żab i szczurów (34), powoduje wzrost powinowactwa receptorów adrenergicznych wobec typowych ligandów α_1 . W identycznych eksperymentalnych warunkach typowe związki antagonistyczne w znacznie mniejszym stopniu obniżały inotropowe efekty wywoływane adrenaliną i noradrenaliną w izolowanych sercach. Równocześnie farmakologiczne obserwacje sugerowały, że receptory adrenergiczne α i β są odmiennym konformacyjnie stanem tej samej struktury błonowej (35, 36), i mogą podlegać ponadto wewnątrzreceptorowej konwersji. Świadczyłby o tym fakt, że patologicznie skrajnie różne ilości krążących we krwi hormonów tarczycy są przyczyną częściowego odwrócenia proporcji pomiędzy ilością receptorów α i β , przy prawie niezmienionej ogólnej puli receptorów (37).

Nie udało się do tej pory scharakteryzować budowy chemicznej receptorów typu β , a w szczególności struktury centrum aktywnego wiążącego neurohormon. Podczas oczyszczania preparatów białek receptorowych techniką chromatografii powinowactwa stwierdzono, że wzrost hydrofobowości ramion ligandów sprzężonego z agarozą jest przyczyną obniżonego odzysku białek receptorowych z żelu (26). Oprócz słabych oddziaływań elektrostatycznych zaangażowanych w wiązanie neurohormonu z receptorem, prawdopodobnie niepoślednią rolę w tym procesie odgrywają oddziaływania niepolarne. Być może te ostatnie siły są wynikiem obecności lipidów w cząsteczce receptora β . Dodatkowo, dane te pozwalają przypuszczać, że receptory β podobnie jak wyizolowane ze śledziony (22) lipoproteidy o cechach receptorów α stanowią chemicznie podobne cząsteczki. Tym niemniej, zarówno badania Shorra i wsp. (24), jak i adsorpcja (na kolumnach ze zmodyfikowaną Sepharose) kompleksów receptor-białko wiążące guanylowe nukleotydy pochodzące z solubilizowanych błon erytrocytów żabich (38) sugerują, że białka wiążące aminy katecholowe są glikoproteidami.

IV. Mechanizm działania receptorów adrenergicznych

Efekty biochemiczne będące następstwem stymulacji adrenergicznej są rezultatem łączenia się odpowiednich amin katecholowych z receptorami i powstania złożonego kompleksu.

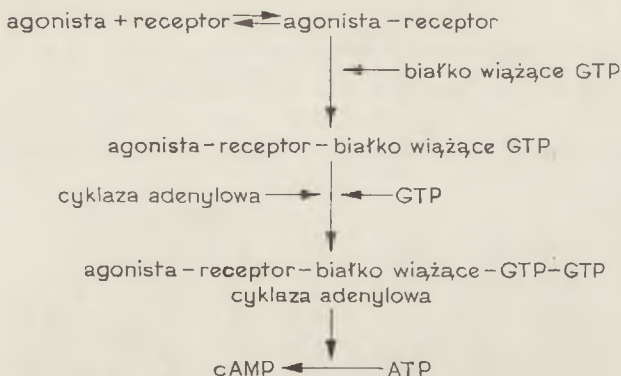
Siła z jaką określone ligandy wywołują charakterystyczne dla siebie reakcje komórkowe zależy od liczby receptorów oraz ich powinowactwa do badanych ligandów. Zarówno pobudzenie receptorów zachodzące na skutek przyłączenia się do nich agonistów, jak i ich inhibicja będąca rezultatem wysycenia błonowych białek antagonistami są reakcjami odwracalnymi. Równocześnie jednak, tylko w wyniku pobudzenia receptorów przez związki działające agonistycznie obserwowane są wyraźne zmiany w aktywności szeregu enzymatycznych białek błonowych. Rezultatem tego, jak to ma miejsce w przypadku typowych receptorów metabotropowych, do których zalicza się receptory adrenergiczne β , jest synteza cAMP, drugiego mediatora informacji przekazywanych komórce za pośrednictwem amin katecholowych. Ten drugi mediator przemieszczając się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej uczestniczy w aktywacji szeregu reakcji enzymatycznych regulujących tempo przemian procesów biochemicznych.

Pobudzenie receptorów adrenergicznych prowadzić może także do aktywacji innych procesów wewnątrzbłonowych. Wynikiem ich, jak ma to miejsce w przypadku receptorów jonotropowych, do których należą receptory adrenergiczne α , są reakcje prowadzące do powstania zmian w błonowych kanałach jonowych, za pośrednictwem których przemieszczeniu ulegają liczne jony. Końcowym efektem pobudzenia receptorów jonotropowych są zmiany polaryzacji błony komórkowej. Tym niemniej obecnie coraz więcej jest danych wskazujących, że receptory adrenergiczne α stanowią typowe receptory metabotropowe.

IV-1. Interakcja receptorów adrenergicznych β z katecholaminami

Proces przyłączania się neurohormonu do receptora adrenergicznego β , prowadzący do powstania kompleksu hormon-receptor, ma początkowo charakter odwracalny (Ryc. 1). Z czasem jednak kompleks ten ulega konwersji do formy dysocjującej powoli. Nie jest jasne czy powstanie tej formy receptora jest wynikiem oddziaływań z nim cykazy adenylowej sprzężonej z GTP (39), czy jak sugerowali inni autorzy (40, 41), zachodzi niezależnie od asocjacji guanylowych nukleotydów z niekataliczną podjednostką enzymu. Interakcji hormonu z receptorem towarzyszą zmiany konformacji receptorowego lipoproteidu do stanu nazwanego przez Wei i wsp. (42) konformacją agonisty. Asocjacja ta zapoczątkowuje cykl przemian wewnątrzbłonowych, w wyniku których powstaje i uwalnia się cAMP, pełniący rolę wewnątrzkomórkowego mediatora.

Powstaniu kompleksu hormon-receptor towarzyszy wyraźny wzrost rozmiarów białka receptorowego. Wzrost ciężaru cząsteczkowego receptora nie jest wynikiem oddziaływania kompleksu hormon-receptor z cyklazą adenylową. Oba bowiem białka o różnych właściwościach rozdzie-



Ryc. 1. Schemat aktywacji cyklazy adenylowej i syntezy cAMP.

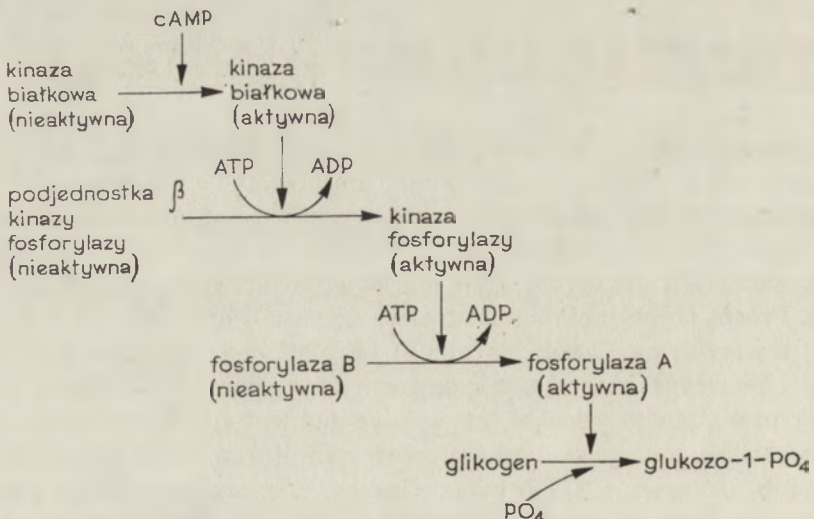
lono w odrębnych frakcjach (26, 43—45). Jest on natomiast wynikiem asocjacji kompleksu hormon-receptor z białkami wiążącymi nukleotydy guanylowe (46). W następnym etapie pobudzenia komórki, powstaje nowy kompleks złożony z hormonu, receptora, białka wiążącego nukleotydy oraz cyklazy adenylowej (47). Kompleks ten charakteryzuje wysokie powinowactwo do GTP oraz niewielka aktywność cyklazy adenylowej, gdy brak jest GTP lub syntetycznych, nie podlegających hydrolizie jego analogów. Aktywacja cyklazy adenylowej pod wpływem amin katecholowych, *in vivo* (48—50), zachodzi jedynie w obecności GTP po interakcji tego nukleotydu z białkami, które je wiążą. Następstwem tego procesu jest powstanie nowej, aktywnej enzymatycznie struktury błonowej, uwalniającej do światła komórki cAMP. Przemieszczając się w cytoplazmie komórki cAMP wiąże się ze specyficznymi kinazami w wyniku czego następuje ich aktywacja. Kinazy te uczestnicząc w fosforylacji enzymatycznych białek, regulują intensywność procesów zależnych od cAMP. Jako jeden z pierwszych poznany został wpływ kinaz zależnych od cAMP na metabolizm glikogenu (Ryc. 2).

Białka wiążące guanylowe nukleotydy są zdaniem Citri i wsp. (51) „ruchomym pomostem” przenoszącym informacje z pobudzonego przez neurohormon receptora na cyklazę adenylową (38, 51). Regulatorowy zaś charakter GTP przejawia się tym, że po przyłączeniu się nukleotydu do białek wiążących obniża się wyraźnie powinowactwo agonistów do receptorów. Proces pobudzenia komórki trwa do chwili hydrolizy GTP do GDP, której towarzyszy odłączenie wolnego hormonu i unieczynnienie receptora (52—54). Hydroliza ta jest wynikiem aktywności GTP-azowej przejawianej przez białka wiążące guanylowe nukleotydy (53). Wprowadzenie do środowiska toksyn cholery, które są inhibitorami GTP-azowej aktywności lub zastąpienie GTP przez Gpp(NH)p powoduje chroniczny stan pobudzenia cyklazy adenylowej (53, 55—57). Zdaniem Williamsa i Lefkowitza (39), proces inaktywacji receptora zachodzi najpraw-

dopodobniej poprzez etap, w którym receptor wykazuje niskie powinowactwo do guanylowych nukleotydów. Tym niemniej jednak jak wykazał Casseli Selinger (58) aktywacja cykazy adenyłowej zachodziła również przy wysokim wysyceniu miejsc wiążących guanyłowe nukleotydy przez GDP, nie powodując jednocześnie transfosforylacji GDP do GTP.

Aktywacja cykazy adenyłowej błon plazmatycznych erytrocytów in dyka wykazuje pewien okres opóźnienia (53). Jest to zapewne rezultatem etapu limitującego ponowną zdolność indukcji syntezy cAMP. Sugerowano, że tym etapem jest dysocjacja GDP z miejsc wiążących nukleotydy (59). Proces ten powodując odsłonięcie miejsc wiążących nukleotydy umożliwia przyłączanie się do nich GTP. Za takim mechanizmem przemawiała wzajemna zależność pomiędzy szybkością dysocjacji GDP, indukowaną przez katecholaminy, a ponowną reaktywacją cykazy adenyłowej (58). Stwierdzono ponadto, że stopień aktywacji cykazy adenyłowej pod wpływem izoproterenolu i Gpp(NH)p, mierzony w jednokowych przedziałach czasowych, jest odwrotnie proporcjonalny do liczby zajmowanych miejsc wiążących GTP przez Gpp(NH)p (60).

Oddziaływanie antagonistów z receptorami mające również cechy reakcji o wysokim stopniu specyficzności, wyraźnie różni się od procesów, w wyniku których powstaje kompleks receptor-agonista. Różnice te dotyczą zapewne odmiennej konformacji jaką przyjmuje receptor połączony z substancjami działającymi antagonistycznie. Przemawia za tym brak zmian w wielkości kompleksu neurohormon-receptor, gdyż nie łączy się on z białkami wiążącymi guanyłowe nukleotydy (61). Konsekwencją powstania takiej konformacji jest brak zdolności oddziaływania kompleksu



Ryc. 2. Regulacja glikogenolizy przez cAMP.

antagonista-receptor z cyklazą adenylową i syntezy cAMP. Powstały kompleks wykazując niskie powinowactwo do regulatorowych nukleotydów guanylowych, przypomina wczesne stadium pobudzonego przez agonistę receptora (39). Wykazano bowiem, że GTP jak również syntetyczne jego analogi, nie zwiększają dysocjacji antagonistów z miejsc receptorowych.

IV-2. Miejsca wiążące guanylowe nukleotydy w receptorach adrenergicznych β

Charakterystyka wyizolowanych fragmentów błon plazmatycznych o cechach receptorów β oraz analiza mechanizmów pobudzenia cyklazy adenylowej przez aminy katecholowe wskazywały, że guanylowe nukleotydy łączą się z niekataliczną podjednostką enzymu syntetyzującego cAMP (39—62). Wykazano ponadto, że wysokie stężenie GTP (powyżej 100 μM) powodowało 5-10 krotny spadek powinowactwa agonistów do receptorów β (42—44, 63, 64). Stukrotnie zaś niższe stężenie tego regulatora podwyższało o 50% syntezę cAMP. Wskazuje to na zróżnicowane właściwości miejsc wiążących guanylowe nukleotydy (65). Jedne z nich wykazują niskie, drugie z kolei wysokie powinowactwo do GTP (31). Przyłączenie się więc GTP, do specyficznych miejsc wiążących determinuje siłę z jaką receptor przekazuje komórce dochodzące do niego sygnały. Badania Coopera i wsp. (66) pozwalają przypuszczać, że zarówno proces aktywacji enzymu jak i obniżenie powinowactwa receptorów do agonistów pod wpływem GTP zachodzą niezależnie, oddziałując ponadto poprzez odmienne szlaki i mechanizmy. Świadczą o tym dane wykazujące, że zmiana aktywności jednego z szlaków nie wywiera wpływu na aktywność regulacyjną drugiego. Badania tych autorów oraz wyniki przedstawione przez Yamamurę i wsp. (67), potwierdzają powyższą hipotezę. Wykazują one, że nadtrawienie trypsyną błon plazmatycznych bogatych w receptory β powoduje zahamowanie inhibitorowej funkcji GTP. Nie ulega przy tym zmianie stymulacyjny charakter miejsc nukleotydowych w stosunku do aktywności adenylo-cyklazowej. Ponadto wydaje się, że te przeciwstawne procesy mogą być regulowane przez różne białkowe struktury.

Pomimo prawdopodobieństwa występowania w błonach dwóch rodzajów miejsc wiążących guanylowe nukleotydy, rozważania Levitzkiego (68) oparte o allosteryczny model regulacji enzymów, zaproponowany przez Monoda, Wymana i Changeux (69), sugerują obecność tylko jednego rodzaju miejsc akceptorowych dla regulatorowych nukleotydów guanylowych. Wydaje się bowiem, że GTP w danych warunkach doświadczalnych indukować może tylko jedną z dwóch charakterystycznych dla tego nukleotydu odpowiedzi. Wykazano, że guanylowe nukleotydy aktywując cyklazę adenylową jednocześnie wywierają bardzo znikomy wpływ na wielkość stałych powinowactwa receptorów β do sub-

stancji o działaniu agonistycznym (70). W niektórych układach doświadczalnych nie stwierdzono takiego wpływu (71). Komputerowe modele aktywacji cyklazy adenylowej przez katecholaminy wskazywały również, że guanylowe nukleotydy indukując cyklazę nie muszą oddziaływać z miejscami regulującymi powinowactwo receptorów do agonistów.

IV-3. Rola lipidów i płynności błon w syntezie cAMP

W procesach pobudzenia receptorów przez aminy katecholowe badanych *in vitro*, znaczną rolę odgrywa płynność i ruchliwość błon. Obniżenie płynności błon poprzez traktowanie ich naładowaną dodatnio ferrytyną znacznie obniża syntezę cAMP stymulowaną przez adrenalinę (72). Podobnie, zahamowanie swobodnej dyfuzji płynnych elementów kompleksu receptorowego spowodowane obniżeniem temperatury środowiska inkubacyjnego do 5°C zapobiega sprzężeniu się kompleksu receptor-agonista z cyklazą adenylową.

W procesie aktywacji cyklazy adenylowej znaczną rolę odgrywają obecne w błonach lipidy (73—77). Solubilizacja błon przy użyciu detergentów takich jak: lubrol PX, digitonina (73—76), lub nadtrawienie błon fosfolipazami (76—78), znosi wrażliwość cyklazy adenylowej w stosunku do aktywujących ją hormonów. Dodatek zaś egzogennych lipidów do zmodyfikowanych detergentami błon plazmatycznych przywraca częściowo pierwotną wrażliwość cyklazy adenylowej na hormony. Wydaje się, że endogenne lipidy działają przynajmniej dwukrotnie podczas syntezy cAMP. Z badań Freycheta (79) wynika, że wpływają one na wiązanie (³H) adrenaliny z białkami błon plazmatycznych wątroby. Lefkowitz (78) wykazał natomiast, że w mięśniu sercowym błonowe lipidy uczestniczą w przekazywaniu informacji z pobudzanego przez aminy katecholowe receptora na cyklazę adenylową.

IV-4. Interakcja receptorów adrenergicznych z α ligandami

Wyniki pochodzące z różnych laboratoriów a podsumowane przez U'Pricharda i wsp. (80) wskazują na współzawodnictwo substancji działających agonistycznie i antagonistycznie o miejsca na powierzchniach błon plazmatycznych wykazujących cechy typowych receptorów α (80—82). Wykazano, że związki agonistyczne charakteryzują się znacznie wyższym powinowactwem do receptorowych miejsc wysyconych przez noradrenalinę niż do struktur połączonych z antagonistami. Z kolei substancje antagonistyczne w znacznie większym stopniu przy niższych nawet niż podawane w nadmiarze związki o działaniu agonistycznym, wypierały z receptorów preparat WB 4101. Równocześnie, stałe powinowactwa czynnych

farmakologicznie ligandów do miejsc receptorowych wysyconych słabym antagonistą [^3H]DHE wykazywały wartości pośrednie pomiędzy danymi uzyskiwanymi z badań nad interakcją agonista-agonista czy antagonist-antagonista z receptorami (80). Wyniki te, oraz podobne obserwacje dotyczące receptorów opiatowych czy dopaminergicznych (83), sugerują prawdopodobieństwo dwóch różnych stanów pobudzenia receptorów α . Podobnie jak w przypadku receptorów β , jeden z nich określony został mianem stanu agonisty, drugi z nich natomiast stanem antagonisty (80, 82). Rola nukleotydów guanylowych w regulacji wrażliwości receptorów β , a zwłaszcza zmian ich powinowactwa wobec aktywujących je agonistów jest procesem powszechnie znanym i nie budzącym wątpliwości. Sugerowano zatem, że procesy regulacji aktywności receptorów α podlegają także wpływowi GTP. Jak stwierdzono bowiem, efektami oddziaływania Gpp(NH)p z błonami plazmatycznymi mózgu, była wyraźna redukcja powinowactwa receptorów adrenergicznych α do [^3H] adrenaliny i [^3H] noradrenaliny (84—87). Nie stwierdzono także, po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej GTP, spadku powinowactwa receptorów do [^3H]WB 4101 i [^3H]DHE najprawdopodobniej dlatego, że [^3H]DHE asocjowała także z innymi miejscami wiążącymi na powierzchni błon plazmatycznych, o niezidentyfikowanej bliżej roli fizjologicznej (88). Miejsca zaś, które wysycone są aminami katecholowymi i w związku z tym na pewno uczestniczą w transformacji sygnału przekazywanego z receptora na błonowy układ enzymatyczny, uwalniają do cytoplazmy pobudzonych komórek drugi mediator, podlegają regulatorowym wpływom GTP. Równocześnie wykazano, że receptory błon plazmatycznych ludzkich płytek krwi i macic króliczych, zidentyfikowane jako α_2 , cechuje zdolność występowania w dwóch różnych stanach pobudzenia w obecności agonistów (89). Stany te charakteryzują się niejednakowym powinowactwem receptora do aktywujących go amin katecholowych. Tak więc, stan receptora wykazującego wysokie powinowactwo do agonistów określono symbolem α_{2H} , stan zaś przejawiający niższą wrażliwość na ich działanie oznaczony został jako α_{2L} . Wyniki powyższych badań pozwalają ponadto sugerować możliwość wewnątrzreceptorowej konwersji tych zróżnicowanych pod względem powinowactwa do amin katecholowych receptorów α_2 . Konwersja taka zachodzi jednak jedynie w obecności nukleotydów guanylowych (89, 90). Analiza matematyczna krzywych wypierania [^3H]DHE z miejsc wiążących przez różne farmakologicznie czynne α ligandy wykazała, że receptory α_1 nie podlegają regulatorowym wpływom GTP. Na podstawie danych dotyczących występowania receptorów α w różnych narządach, przy jednoczesnym braku informacji o roli fizjologicznej jaką mogłyby pełnić tak sklasyfikowane receptory $\alpha_{1,2H,2L}$, sugeruje się możliwość przynajmniej trzech stanów konformacyjnych przyjmowanych przez te struktury błonowe. Są to mianowicie wzajemnie przekształcające się

stany α_{2H} i α_{2L} oraz stan α_1 . Receptory znajdujące się w tym ostatnim stanie charakteryzują się szczególnie wysokim powinowactwem do [3H] prazosyny i [3H] fenoksybenzaminy.

IV-5. Komórkowy poziom cyklicznych nukleotydów a α stymulacja

Hipoteza Sutherlanda, o roli cAMP jako drugiego mediatora reakcji angażujących receptory adrenergiczne β , zainicjowała poszukiwania podobnego czynnika uwalnianego w procesach aktywacji receptorów α . Zna ne wcześniej fizjologiczne następstwa pobudzenia receptorów α próbo wano początkowo wytłumaczyć, przeciwnym do reakcji wywołanych aktywacją receptorów β , wpływem agonistów na cyklazę adenylową. Jed nakże, lata 70-te dostarczyły wielu często sprzecznych informacji na te mat wpływu α stymulacji na poziom cyklicznych nukleotydów. W bada niach prowadzonych na skrawkach kory mózgowej (91) i obszarach lim bicznych przedmózgowia (92) wykazano, że typowe stymulatory α adre nergiczne: klonidyna i oksymetazolina nie wywierały wpływu na pod stawowy poziom cAMP. Jednocześnie zaś, były one przyczyną wyraźnego spadku syntezy cAMP, aktywowanej przez typowe α stymulatory: meto ksyaminę i noradrenalinę. Podobny spadek syntezy cAMP obserwowano pod wpływem α agonistów w płytkach krwi, lipocytach, wysepkach Langerhansa i melanoforach (93). Zdaniem Jack obsa i wsp. (94, 95) obniżony poziom tego nukleotydu wynikał głównie z agregacji płytek pod wpływem katecholamin. Liczne badania (96, 97) wykazywały przy tym, że jedynie adrenalina, noradrenalina i α metyloepinefryna obniżają syn tezę cAMP, sprzyjając jednocześnie agregacji płytek. Inne zaś, stosowa ne przez wielu badaczy ligandy, hamowały jedynie wiązanie [3H]DHE z receptorem, nie wywierając wpływu na aktywność cyklazy adenylo wej (98—101). Inny mechanizm tłumaczący spadek syntezy cAMP pod wpływem adrenaliny w preparatach błon plazmatycznych izolowanych z ludzkich płytek krwi proponowali Aktories i Jack obs (102). Wykazali oni, że aktywacja receptorów α przez tego agonistę powoduje wzrost szybkości hydrolizy GTP do GDP. Stymulacja aktywności GTP-azo wej, pod wpływem adrenaliny prowadziłyby więc do dysocjacji kompleksu białko wiążące nukleotydy-cyklaza adenylowa. Konsekwencją tego procesu byłoby obniżenie katalitycznej aktywności cyklazy adenylowej i spadek poziomowi cAMP.

Z obserwacji prowadzonych na komórkach kory mózgowej izolowa nych ze zwierząt różnych gatunków wynikało natomiast, że wzrost syntezy cAMP pod wpływem amin katecholowych jest częściowo ograniczony przez antagonistów receptorów α (103). Równocześnie w hepatocytach trak towanych EGTA wyraźnie rosła, pod wpływem amin katecholowych, ak tywność cyklazy adenylowej (104). Komórki nie poddane zaś działaniu

związków chelatujących jony Ca^{2+} reagowały obniżoną syntezą cAMP na stymulację adrenergiczną α (105—107).

Trudności w interpretacji rozbieżnych wyników, jakie uzyskiwano w doświadczeniach prowadzonych w niejednakowych warunkach, nad wpływem α agonistów na aktywność cykazy adenylowej wielu tkanek i narządów przyczyniły się do poszukiwań zależności pomiędzy aktywacją receptorów α a komórkowym poziomem cGMP. Uzyskane wyniki są także kontrowersyjne. Wielu autorów wykazało, że pobudzenie receptorów α w mięśniach gładkich ślinianek, mózdzku i szyszynki zapoczątkowuje syntezę tego nukleotydu (108—111). Badania te sugerowały ponadto, że wzrost aktywności cykazy guanylowej nie jest jednak bezpośrednią konsekwencją łączenia się α agonistów z receptorami. Inne dane (112) sugerowały prosty związek pomiędzy syntezą cGMP a aktywacją receptorów α . Na bardziej złożony przebieg interakcji katecholamin z receptorami α wskazują badania H e m s a i wsp. (113). Autorzy ci stwierdzili, że nitrozoaminy, hydroksyloaminy i azotany zwielokrotniają wewnątrzkomórkowy poziom cGMP. Efektu takiego, nie stwierdzono natomiast podczas pobudzenia receptorów α przez katecholaminy. Tak więc mimo zaobserwowania pewnych zależności pomiędzy pobudzeniem receptorów α a syntezą cGMP rola tego nukleotydu w reakcjach stymulacji tych receptorów daleka jest od wyjaśnienia. Jedną z ważnych obserwacji poczynionych w czasie badań nad zależnością zachodzącą pomiędzy aktywacją cykazy guanylowej a interakcją α agonistów z receptorami było stwierdzenie wewnątrzkomórkowego wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} . Wkrótce jednak wykazano, że zmiany w poziomie Ca^{2+} w cytosolu zależą od całego szeregu złożonych procesów, zachodzących w komórce w czasie stymulacji α adrenergicznej. Zmiany stężeń jonów Ca^{2+} w komórce zależą od wpływu α agonistów na aktywność innych enzymów zawieszonych w płynnej strukturze błony.

IV-6. Metabolizm fosfatydyloinozytolu stymulowany poprzez receptory adrenergiczne α

Przez analogię do cAMP drugiego przekaźnika receptorów β , sugeruje się, że stymulacja α adrenergiczna prowadzi do aktywacji szeregu enzymów błonowych, innych jednak niż cyklaza adenylowa czy guanylowa i uwolnienia do cytoplazmy pobudzonych komórek mediatora zdolnego regulować niektóre procesy biochemiczne. Wiele danych wskazuje, że w wyniku przyłączenia się neurotransmitera do receptora α następują zmiany metabolizmu fosfatydyloinozytolu (114—116). Stwierdzono przy tym, że bezpośrednią konsekwencją pobudzenia receptora (117) jest rozkład tego fosfolipidu. Włączanie zaś ^{32}P do fosfatydyloinozytolu jest natomiast reakcją wtórną, której przebieg wydaje się zależeć od 1,2-dwu-

acyloglicerolu, powstałego z rozpadu fosfatydyloinozytolu (117). O ile degradacja fosfatydyloinozytolu jest bezpośrednim następstwem aktywacji receptorów α , to jak wykazał Mitchell (115), drugim mediatorem dla tych receptorów wydaje się być 1,2-cykliczny fosforan mioinozytolu, uwolniony wraz z 1,2-dwuacyloglicerolem podczas degradacji fosfatydyloinozytolu, co przedstawia Ryc. 3.



Ryc. 3. Metabolizm fosfatydyloinozytolu pod wpływem pobudzenia receptora adrenergicznego α .

Metabolizm fosfatydyloinozytolu wiąże się ściśle ze zmianami metabolizmu wapniowego komórki (114, 116). Wykazano bowiem, że α stymulacja podwyższa poziom Ca^{2+} w cytosolu (125—129). Wzrost ten może być rezultatem uwalniania wapnia nagromadzonego w mitochondriach i retikulum endoplazmatycznym (126, 128—132). Uwolnione do cytosolu jony wapnia mogą pochodzić także z przestrzeni zewnątrzkomórkowych albo wewnętrznych powierzchni błon plazmatycznych (133—135). Mechanizmy uruchamiania rezerw wapniowych nie są jasne. Być może w błonach komórek, do których wapń transportowany jest z zewnątrz występują kanały, którymi jest on doprowadzany. Przypominałoby to procesy kontrolowane przez muskarynowe receptory cholinergiczne (136—139). Ponieważ jednak transport ten jest głównie procesem wewnątrzkomórkowym wydaje się więc zatem, że w procesie przekazywania sygnału z pobudzonego receptora do miejsc, z których następuje wyrzut wapnia pośredniczy jakiś niezidentyfikowany czynnik. Tym przekaźnikiem wydaje się być metabolit błonowej degradacji fosfatydyloinozytolu. Wykazano bowiem, że metabolizm tego fosfolipidu poprzedza wzrost poziomu jonów wapnia w cytosolu (114, 117—119, 123).

Pomimo, że właściwości drugiego przekaźnika w przypadku receptorów α są niejasne, wiele wyników wskazuje, że czynnikiem wywierającym istotny, ale nie bezpośredni wpływ na przebieg niektórych szlaków biochemicznych są jony wapnia. Pojawiając się w cytosolu eukariotycznych komórek w wysokich, sięgających 10^{-6} — 10^{-5} M stężeniach (140), łączą się one następnie z kalcyproteinami, niskocząsteczkowymi kwaśnymi biał-

syjne są dane odnoszące się do receptorów adrenergicznych α . Dotyczy to zarówno ich budowy a zwłaszcza sposobów w jaki przekazują one komórce docierające do niej bodźce. W dalszym ciągu nie został też określony i scharakteryzowany drugi przekaźnik informacji przekazywanych receptorom za pośrednictwem amin katecholowych. Obecnie coraz więcej badaczy skłonnych jest jednak przypisać tę funkcję 1,2-cyklicznemu fosforanowi mioinozytolu. Tym niemniej hipoteza ta nie została poparta jeszcze przekonywującymi dowodami eksperymentalnymi.

Dziękuję Panu Prof. dr hab. J. Naumanowi i Pani dr G. Adler za cenne uwagi i sugestie podczas przygotowywania niniejszego tekstu.

Praca finansowana przez PAN w ramach problemu węzłowego W.10.4.03.1.9.

Zaakceptowano do druku 24.09.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Bolton T. B., Bowman W. C., (1969), *Eur. J. Pharmacol.*, 5, 121—132.
2. Fleish J. H., Maling H. M., Brodie B. B., (1970), *Circul. Res.*, 26, 151—162.
3. Broadley K. J., (1972), *Brit. J. Pharmacol.*, 45, 123—125.
4. Buckley G. A., Jordan C. C., (1970), *Brit. J. Pharmacol.*, 38, 394—398.
5. Salimi M., Kermani R. Z., Djahasour B., Goldshan S., (1970), *Pharmacology*, 4, 341—346.
6. Wagner J., Reinhardt D., Schumann H. J., (1972), *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 197, 290—300.
7. Baisset A., Montastruc P., Trau M. A., (1970), *C. R. Soc. Biol.*, 164, 460—468.
8. Kunos G., Szentiavanyi M., (1970), 24th Ann. Conf. Hung. Physiol. Soc., K. Lissak, Budapest Abstr, str. 100.
9. Szentiavanyi M., Kunos G., Juhasz-Nagy A., (1970), *Am. J. Physiol.*, 218, 869—875.
10. Dale H. A., (1906), *J. Physiol. (London)*, 34, 163—206.
11. Ahlquist R. P., (1948), *Am. J. Physiol.*, 153, 586—600.
12. Langer S. Z., (1974), *Biochem. Pharmacol.*, 23, 1793—1800.
13. Starke K., (1977), *Rev. Biochem. Pharmacol.*, 77, 1—124.
14. Wood C. L., Arnett C. D., Clark W. R., Tsai B. S., Lefkowitz R. J., (1979), *Biochem. Pharmacol.*, 28, 1277—1282.
15. Berthelson S., Pettinger W. A., (1977), *Life Sci.*, 21, 595—606.
16. Hoffman B. B., Delean A. L., Wood C. J., Schocken D. D., Lefkowitz R. J., (1979), *Life Sci.*, 24, 1739—1746.
17. Pettinger W., (1977), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 201, 622—626.
18. Sabol S. L., Nirenberg M., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 1913—1920.
19. Lands A. M., Arnold A., McAuliff J. P., Luduena F. P., Brown T. C., (1967), *Nature*, 214, 597—598.

20. La Torre J. L., Lunt G. S., De Robertis E., (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 716—720.
21. Lunt G. S., Stefani E., De Robertis E., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1545—1553.
22. Fiszer de Plazas S., De Robertis E., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, **266**, 246—254.
23. Lefkowitz R. J., Haber E., O'Hara D., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2828—2832.
24. Shorr R. G. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5820—5826.
25. Atlas D., Levitzki A., (1978), *Nature*, **272**, 370—371.
26. Vauquelin G., Geynett P., Hanoune J., Strosberg D., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **98**, 543—556.
27. Shear M., Insel P. A., Melmon K. L., Coffine P., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7572—7576.
28. Schramm M., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1174—1178.
29. Orly J., Schramm M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1174—1178.
30. Eimesl S., Neufeld G., Korner M., Schramm M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 760—764.
31. Lad P. M., Welton A. F., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5942—5946.
32. Welton A. F., Lad P. M., Newby A. C., Yamamura H., Nicosia S., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5947—5950.
33. Vauquelin G., Bottari S., Kanarek D., Strosberg A. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4462—4469.
34. Kunos G., Szentivanyi M., (1968), *Nature*, **217**, 1077—1078.
35. Nickerson M., Kunos G., (1977), *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, **36**, 2580—2583.
36. Kunos G., (1978), *Ann. Rev. Pharmacol. Tox.*, **18**, 291—311.
37. Cardialdi T., Marinetti G. V., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 984—991.
38. Stadel J. M., Shorr R. G. L., Limbird L. E., Lefkowitz R. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8718—8723.
39. Williams L. T., Lefkowitz R. J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7207—7215.
40. Salomon Y., Lin M. C., Londos C., Rendell M., Rodbell M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4239—4245.
41. Schramm M., Rodbell M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2232—2237.
42. Wei J. W., Sulakhe P. V., (1980), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 186—196.
43. Limbird L. E., Gill D. M., Stadel J. M., Hickey A. R., Lefkowitz R. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1854—1861.
44. Maguire M. E., Ross E. M., Gillman A. G., (1977), *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **8**, 1—83.
45. Limbird L. E., Gill D. M., Lefkowitz R. J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 775—779.
46. Limbird L. E., Hickey A. R., Lefkowitz R. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2677—2683.
47. Pfeuffer T., Helmreich E. J. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 867—876.

48. Ross E. M., Howlett A. C., Ferguson K. M., Gillman A. G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6401—6412.
49. Pfeuffer T., (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 85—89.
50. Nerr E. J., Echeverria D., Knox S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9782—9789.
51. Citri Y., Schramm M., (1980), *Nature*, **278**, 297—300.
52. Cassel D., Lefkowitz R. J., Selinger Z., (1977), *J. Cycl. Nucl. Res.*, **3**, 393—406.
53. Cassel D., Selinger Z., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3307—3311.
54. Cassel D., Selinger Z., (1976), *Biochem. Biophys. Acta*, **452**, 538—551.
55. Cassel D., Pfeuffer T. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2669—2673.
56. Helmreich E. J. M., Zenner M. P., Pfeuffer T., Cori C. F., (1976), w *Current Topics in Cellular Regulation*, red. Horecker B. L., Stadman E. R., Academic Press, New York, 41—87.
57. Levitzki A., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1154—1159.
58. Cassel D., Selinger Z., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4155—4159.
59. Blume A. J., Foster C. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3309—3404.
60. Swillens S., Juvent M., Dument J. E., (1979), *FEBS Lett.*, **108**, 365—368.
61. Nielson F. B., Lad P. M., Preston M. S., Kempner E., Schlegel W., Rodbell M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 722—726.
62. Ross E. M., Maguire M. E., Sturgill T. W., Biltonen R. L., Gillman A. G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5761—5775.
63. Lefkowitz R. J., Mullikin D., Caron M. G., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4686—4692.
64. Grefrath S. P., Smith P. B., Appel S. H., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 328—337.
65. Wei J. W., Narayana N., Sulakhe P. V., (1979), *Int. J. Biochem.*, **10**, 109—116.
66. Cooper D. M. F., Schlegel W., Lin M. C., Rodbell M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8927—8931.
67. Yamamura H., Lad P. N., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7964—7966.
68. Levitzki A., (1980), *Biochem. Biophys. Acta*, **628**, 419—425.
69. Monod J., Wyman J., Changeux J. P., (1965), *J. Mol. Biol.*, **12**, 88—118.
70. Lefkowitz R. J., oraz Harmatz A. T., Levitzki A., cytowane za Levitzki A., (1980), *Biochem. Biophys. Acta*, **628**, 419—424.
71. Weiland G. A., Minneman K. P., Molinoff P. B., (1979), *Nature*, **281**, 114—117.
72. Atlas D., Volsky D. J., Levitzki A., (1980), *Biochem. Biophys. Acta*, **597**, 64—69.
73. Levey G. S., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 108—113.
74. Levey G. S., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7405—7410.
75. Levey G. S., Klein J., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 1578—1582.
76. Pohl S. L., Krans H. M. J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4447—4454.

77. Rethy A., Tomasi V., Trevisani A., Barnabei O., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, **290**, 58—69.
78. Lefkowitz R. J., (1975), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **7**, 27—37.
79. Freychet P., Roth J., Neville D. M. Jr., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1833—1837.
80. U'Prichard D. C., Greenberg D. A., Snyder S. H., (1977), *Mol. Pharmacol.*, **13**, 454—473.
81. Greenberg D. A., U'Prichard D. C., Snyder S. H., (1976), *Life Sci.*, **191**, 69—76.
82. U'Prichard D. C., Snyder S. H., (1979), *Life Sci.*, **24**, 73—88.
83. Pert C. B., Snyder S. J., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **10**, 868—879.
84. U'Prichard D. C., Snyder S. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3444—3452.
85. Maguire M. E., Van Arsdale P. M., Gilman A. G., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **12**, 335—339.
86. Lin M. C., Nicosia S., Lad P. M., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2790—2792.
87. Lefkowitz R. J., Mullikin D., Caron M. G., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4686—4692.
88. El-Rafei M. F., Blackmore P. F., Exton J. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4375—4386.
89. Hoffman B. B., Mullikin-Kilpatrick D., Lefkowitz R. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4645—4652.
90. Tsai B. S., Lefkowitz R. J., (1979), *Mol. Pharmacol.*, **16**, 61—68.
91. Skolnick P., Daly J. W., (1975), *Mol. Pharmacol.*, **11**, 545—551.
92. Vetulani J., Leith N. J., Stawarz R. J., Sulser F., (1977), *Experientia*, **33**, 1490—1491.
93. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W., (1967), *Ann. New York Acad. Sci. USA*, **139**, 703—723.
94. Jackobs K. H., Saur W., Schultz G., (1976), *J. Cycl. Nucl. Res.*, **2**, 381—392.
95. Jackobs K. H., Saur W., Schultz G., (1978), *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **302**, 285—291.
96. Jackobs K. H., (1978), *Nature*, **274**, 819—820.
97. Lasch D., Jackobs K. H., (1979), *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **306**, 119—125.
98. Jackobs K. H., Rauschek R., (1978), *Klin. Wochenschr.*, **56**, 139—145.
99. Kafka M. S., Tallman J. F., Smith C. C., (1977), *Life Sci.*, **21**, 1429—1437.
100. Newman K. D., Williams L. T., Bishopric N. H., Lefkowitz R. J., (1978), *J. Clin. Invest.*, **61**, 395—402.
101. Scrutton M. C., Grant J. A., (1979), *Nature*, **280**, 700—702.
102. Aktories K., Jackobs K. H., (1981), *FEBS Lett.*, **130**, 234—238.
103. Schwabe C. A., Daly J. W., (1977), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **202**, 134—143.
104. Chan T. M., Exton J. H., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8645—8651.
105. Cherrington A. D., Assimacopoulos F. D., Harper S. C., Corbin J. D., Park C. R., Axton J. U., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5209—5218.
106. Hutson N. J., Brumley F. T., Assimacopoulos F. D., Harper S. C., Exton S. C., Exton J. H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5200—5208.
107. Scherline P., Lynch A., Glinsmann W. H., (1972), *Endocrinology*, **91**, 680—690.

108. Butcher T. R., Rudich L., Emler C., Nemerovski M., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **12**, 862—870.
109. Ferrendelli J. A., Kinscherf D. A., Chang M. M., (1975), *Brain Res.*, **84**, 63—73.
110. O'Dea R. F., Zatz M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3398—3402.
111. Schultz G., Schultz K., Hardman J. G., (1975), *Metabolism*, **24**, 429—437.
112. Pointer R. H., Butcher F. R., Fain J. N., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2987—2992.
113. Hems D. A., Davies C. J., Siddle K., (1978), *FEBS Lett.*, **87**, 196—198.
114. Jones L. M., Mitchell R. H., (1978), *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 673—688.
115. Mitchell R. H., (1975), *Biochem. Biophys. Acta*, **415**, 81—147.
116. Mitchell R. H., (1979), *TIBS.*, **4**, 128—131.
117. Billah M. M., Mitchell R. H., (1978), *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 1033—1035.
118. Jones L. M., Mitchell R. H., (1975), *Biochem. J.*, **148**, 479—485.
119. Mitchell R. H., Jones L. M., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 47—52.
120. Abdel-Latif A. A., Owen M. P., Matheny J. K., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 461—469.
121. Hauser G., Shein H. M., Eichberg J., (1974), *Nature*, **252**, 482—483.
122. Kirk C. J., Verrinder T. R., Hems D. A., (1977), *FEBS Lett.*, **83**, 267—271.
123. Orom Y., Lowe M., Selinger Z., (1975), *Mol. Pharmacol.*, **11**, 79—86.
124. Stein J. M., Hales C. N., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 531—541.
125. Adelstein R. S., Chacko S., Baryłko B., Scordilis S. P., Conti M. A., (1976), w *Contractile Systems in Non-Muscle Tissues*, red. Perry S. V., Margreth A. M., Adelstein R. S., Amsterdam, North Holland, 153—163.
126. Hurwitz L., Suria A., (1971), *Ann. Rev. Pharmacol.*, **11**, 303—326.
127. Perry S. V., (1976), w *Contractile Systems in Non-Muscle Tissues* red. Perry S. V., Margreth A. M., Adelstein R. S., Amsterdam, North Holland, 141—151.
128. Somlyo A. P., Somlyo A. V., (1968), *Pharmacol. Rev.*, **20**, 197—272.
129. Triggle D. J., (1972), *Ann. Rev. Pharmacol.*, **12**, 185—196.
130. Blackmore D. F., Dehaye J. P., Exton J. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6945—6950.
131. Devine C. E., Somlyo A. V., Somlyo A. P., (1972), *J. Cell. Biol.*, **52**, 690—718.
132. Somlyo A. P., Devine C. E., Somlyo A. V., North S. R., (1971), *J. Cell Biol.*, **51**, 722—741.
133. Debbas G., Hoffman L., Landon E. J., Hurwitz L., (1975), *Anat. Rec.*, **182**, 447—472.
134. Somlyo A. V., Somlyo A. P., (1971), *Science*, **174**, 955—958.
135. Somlyo A. P., Somlyo A. V., Devine C. E., Peteras P. D., Hall T. A., (1974), *J. Cell Biol.*, **61**, 723—724.
136. Putney J. W. Jr., (1976), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **198**, 375—384.
137. Putney J. W. Jr., (1977), *J. Physiol.*, (London), **268**, 139—149.
138. Putney J. W. Jr., (1979), *Pharmacol. Rev.*, **30**, 209—245.

139. Putney J. W. Jr., Van de Walle C. M., Leslie B. A., (1978), *Am. J. Physiol.*, **235**, 188—198.
140. Kretsinger R. H., (1979), *Adv. Cycle Nucl. Res.*, **11**, 1—26.
141. Grabarek Z., Kuźnicki J., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 209—225.
142. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 265—291.

RECENZJA

Biosynthese niedermolekularer Naturstoffe **Red Prof. Horst Robert Schütte**

VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1982, 176 stron, cena 30 M
Seria Bausteine der modernen Physiologie.

Ogromna ilość związków niskocząsteczkowych, produkowanych przez organizmy żywe od dawna budziła zainteresowanie chemików, fizyków, biochemików pragnących poznać mechanizmy biosyntezy tych związków. Dynamiczny rozwój metod biochemicznych sprzyjał rozwojowi i poznaniu wielu dziedzin biochemii, w tym również biosyntezy wielu niskocząsteczkowych związków wytwarzanych w różnych cyklach metabolicznych przez organizmy żywe.

Jednakże różnorodność tych związków i co za tym idzie różnorodność mechanizmów ich biosyntezy sprawiła, że zarówno w podręcznikach biochemicznych jak i chemii organicznej zagadnienie biosyntezy związków niskocząsteczkowych produkowanych przez organizmy żywe omawiane jest pobieżnie lub zupełnie pomijane. Książka prof. Schütte uzupełnia wspomniane wyżej braki podręczników akademickich chemii organicznej i biochemii. Prof. Schütte w bardzo zwięzły sposób, (lecz uwzględniając najnowsze osiągnięcia) omawia najważniejsze problemy związane z biosyntezą niektórych związków niskocząsteczkowych, jak aminokwasy, niektóre peptydy, pochodne kwasu nikotynowego, porfiryny, puryny i pirymidyny wraz z ich pochodnymi, pochodne fenyletyloaminy, kwasy tłuszczowe i alkaloidy.

Jak to podaje we wstępie sam autor, książka przeznaczona dla studentów ma na celu pogłębienie wiadomości z zakresu chemii organicznej, zdobytych w początkowym okresie studiów. Niemniej cytowane są w niej oryginalne prace doświadczalne i monograficzne opracowania z 1981 roku. A więc z zaledwie kilku miesięcznym opóźnieniem książka przynosi wiadomości z opracowań monograficznych i prac doświadczalnych w formie zwartego tematycznie podręcznika akademickiego. Dlatego właśnie książka prof. Schütte wykracza poza podręcznik akademicki i może być przydatna również pracownikom naukowym zajmującym się pokrewnymi dziedzinami, wprowadzając znakomicie w dość złożone problemy biosyntezy związków niskocząsteczkowych produkowanych przez organizmy żywe.

I. Kąkol

SPIS TREŚCI

J. Duszyński — Regulacja funkcjonowania szlaku metabolicznego	3
J. Duszyński — Regulacja oddychania mitochondrialnego	17
A. Kozik — Chromatograficzne i elektroforetyczne metody wyznaczania parametrów oddziaływania białko — ligand	33
L. Bielecka, R. S. Lorenc — Białko wiążące witaminę D	53
P. T. Szymański — Receptory adrenergiczne	67
I. Kąkol — Recenzja	93

March 1983

ARTICLES IN POLISH

Volume 29
Number 1

J. Duszyński — Control of Flux through the Metabolic Pathway (Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa)	3
J. Duszyński — Regulation of Mitochondrial Respiration (Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa)	17
A. Kozik — Chromatographic and Electrophoretic Methods for Determination of the Parameters of Protein—Ligand Interactions (Department of Animal Biochemistry, Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) :	33
L. Bielecka, R. S. Lorenc — Vitamin D Binding Protein (Department of Biochemistry and Experimental Medicine, Child's Health Center, Warszawa-Międzyłesie)	53
P. T. Szymański — Adrenergic Receptors (Medical Center of Postgraduate Education, Warszawa)	67
Book Review	93

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) nazwiskiem 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 linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

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

J. Duszyński — Regulacja funkcjonowania szlaku metabolicznego	3
J. Duszyński — Regulacja oddychania mitochondrialnego	17
A. Kozik — Chromatograficzne i elektroforetyczne metody wyznaczania parametrów oddziaływania białko—ligand	33
L. Bielecka, R. S. Lorenc — Białko wiążące witaminę D	53
P. T. Szymański — Receptory adrenergiczne	67
I. Kąkol — Recenzja	93