PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 6 · NR 4
1979 (243-346)

PWN—WARSZAWA

http://rcin.org.pl

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01 - 813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 562 + 98 egz. Ark. wyd. 8,5. Ark. druk. 6.75 + 1/8 wkl. Papier druk. sat. III kl., 80 g, 70 × 100 cm. Oddano do składania 14 VIII 1979 r. Podpisano do druku w grudniu 1979 r. Druk ukończono w grudniu 1979 r. Zam. 1003/79 — Cena zł 20.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 4, 1979 (243 - 247)

PROFESOR WILHELM BERNHARD (1920-1978)

Maria KWIATKOWSKA i Maria J. OLSZEWSKA

Instytut Fizjologii i Cytologii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Przedstawiono wkład prof. Bernharda do poznania biologii komórki oraz wyjątki z jego wykładu „Spiritualité et néant dans la science" dotyczące problemów etycznych w środowisku naukowym.

Summary. Prof. Bernhard's contribution to cell biology and the exctracts from his lecture „Spiritualité et néant dans la science" concerning ethical problems in scientific environment have been presented.

Twórczość naukowa Wilhelma Bernharda jest w Polsce znana biologom komórki, a w szczególności patofizjologom komórki zajmującym się problematyką onkologiczną. Sylwetkę przedwcześnie zmarłego uczonego przypomniał szerokiemu gronu prof. Mieczysław Chorąży („Polityka", nr 3 (1142) z 20 stycznia 1979 r.). Prof. Bernhard był wielkim przyjacielem Polski: chętnie przyjmował Polaków do kierowanego przez siebie Laboratorium Mikroskopii Elektronowej w Instytucie Badań nad Rakiem w Villejuif pod Paryżem; równie chętnie odwiedzał Polskę, dzieląc się swymi najnowszymi odkryciami.

Prof. Bernhard był pionierem mikroskopii elektronowej, wnosił bowiem na każdym etapie rozwoju tej techniki rozwiązania metodyczne o podstawowym znaczeniu, a w ślad za tym — odkrycia o nieprzemijającej wartości dla poznania biologii komórki. Jako jeden z pierwszych uzyskał ultracienkie skrawki na skonstruowanym przez siebie ultramikrotomie (1949 r.). Wprowadził metodę zatapiania tkanek w rozpuszczalnym w wodzie metakrylanie glikolu, a następnie — metodę ultracienkich skrawków mrożonych, co umożliwiło rozwój cytochemii ultrastrukturalnej. Zasługą Jego zespołu było udoskonalenie techniki auto-

http://rcin.org.pl

radiografii wysokorozdzielczej oraz opracowanie metody znakowania receptorów błonowych przy użyciu kompleksu konkawalina-peroksydaza. Dzięki Jego metodzie zróżnicowanego barwienia rybo- i dezoksyrybonukleoprotein w jądrze komórkowym (powszechnie znanej jako metoda UA-EDTA Bernharda — 1969 r.), możliwa stała się identyfikacja odkrytych przez Niego fibryli perichromatynowych oraz ziaren perichromatynowych. Był jednym z pierwszych badaczy, którym biologia komórki zawdzięcza wyróżnienie w jąderku składnika fibrylarnego i składnika granularnego oraz trafną interpretację wzajemnej relacji tych składników. Wymienione badania były przeprowadzone na komórkach prawidłowych i nowotworowych.

Druga grupa osiągnięć naukowych prof. Bernharda i Jego zespołu dotyczyła wirusów onkogennych u zwierząt. Zostały opisane wirusy erytroblastozy i mieloblastozy u ptaków, cząstki wirusowe raka sutka u myszy, których klasyfikacja na cząstki A, B i C jest obecnie powszechnie przyjmowana.

Prof. Bernhard, mimo wytężonej pracy badawczej, którą przedkładał nad wszelkie inne formy działalności, poświęcał wiele czasu organizacji badań ultrastrukturalnych: był przewodniczącym Francuskiego Towarzystwa Mikroskopii Elektronowej i sekretarzem generalnym Międzynarodowej Federacji Towarzystw Mikroskopii Elektronowej. Szczególnie zależało Mu na zachowaniu interdyscyplinarnego charakteru mikroskopii elektronowej, tj. na współpracy fizyków i biologów. Dał temu wyraz w referacie zamykającym IX Międzynarodowy Kongres Mikroskopii Elektronowej w Toronto w 1978 r., opublikowanym w „Biologie Cellulaire" (1978).

Twórczość naukowa i działalność organizacyjna prof. Wilhelma Bernharda są dobrze znane szerokiemu gronu specjalistów. Nie wszyscy zdają sobie zapewne sprawę z Jego głęboko humanistycznej postawy, z wielu Jego poglądów na temat procesu poznawania świata, stosunków międzyludzkich w obszarze badań naukowych, relacji badacz—społeczeństwo. Tym zagadnieniom poświęcony miał być Jego odczyt „Spiritualité et néant dans la science", który zamierzał wygłosić w Buenos Aires w październiku 1978 r. Tekst odczytu został opublikowany w specjalnym numerze „Biologie Cellulaire" (1978). Z wielu rozważań i poglądów prof. Bernharda przytoczymy jedynie kilka fragmentów, mających charakter uniwersalny i skłaniających do refleksji przedstawicieli kilku pokoleń pracowników nauki.

»*Podstawową szansą* młodego człowieka, który chce podążać za swym przemożnym powołaniem do nauki (nawet gdyby miał zostać za to ukarany, jak to jest pisane wszystkim, którzy ośmielają się kosztować owoców z drzewa wiedzy), jest *mistrz* — bogaty w doświadczenie,

http://rcin.org.pl

u szczytu swej dojrzałości. Wydawało się to samo przez się zrozumiałe i od starożytności było uważane za istotne i zasadnicze we wszystkich dziedzinach wiedzy. Dotyczyło to zarówno rzemieślnika, jak i filozofa, murarza i budowniczego katedr. Przekaz ten dokonywał się od malarza do malarza, od muzyka do muzyka, od badacza do badacza. Zasadnicze znaczenie miało *przeżycie przykładu* mistrza, a w mniejszym stopniu — to, co on napisał lub mówił i z pewnością nie to, czego można się obecnie nauczyć dzięki maszynie elektronowej stosowanej w nowoczesnym nauczaniu. Można by cytować wiele słynnych przykładów stosunków mistrz—uczeń, które często decydowały o kształtowaniu i rozkwicie największych. Najbardziej zdumiewający i najdłuższy łańcuch osobistego przekazu znany jest nam ze starożytności: Sokrates, Platon, Arystoteles, Aleksander Wielki. Tutaj kwintesencja hellenizmu była przekazywana bezpośrednio — słowem, gestem i milczeniem. Ale przypomnijmy sobie również sztuki czasów nowożytnych: to, co otrzymał Bach od Buxtehudego, Mozart od Haydna, Brahms od Schumanna. W zakresie nauki — oto kilka przypadkowo wybranych przykładów: uznanie Keplera dla Tycho-Brahé, Faradaya dla Davy'ego, Virchowa dla J. V. Müllera, Piotra i Marii Curie dla Becquerela, uwielbienie uczniów Pasteura dla ich nauczyciela, poczucie wdzięczności Heisenberga wobec Sommerfielda i Nielsa Bohra. Były to również czasy, kiedy nowe odkrycia wisiały w powietrzu i w których wszyscy otrzymali wiele od wszystkich. Można zacytować Maxa Borna, Diraca, Hahna, Lise Meitner i szkołę Rutheforda, która była legendą dla pokoleń młodych fizyków. To, co nasze pokolenie uważało jeszcze za wyjątkowy przywilej — poszukiwanie mistrzów surowych i prawdziwych — wydaje się być od dziesiątka lat zupełnie omijane. W pewnych przypadkach relacje międzyludzkie pomiędzy mistrzem a uczniem zostały nawet całkowicie unicestwione, jak gdyby przez akt szaleństwa. Aby wytłumaczyć tę absurdalną postawę, można przytoczyć przyczyny pozornie uzasadnione: nadmierna liczba studentów, którzy tłoczą się setkami w przeładowanych audytoriach i którzy w ciągu swoich studiów nie mogą mieć nigdy bezpośrednich kontaktów ze swymi profesorami. Ponadto, pojawiła się również czysto materialna motywacja podejmowania studiów uniwersyteckich, bez wewnętrznych przesłanek ideowych i etycznych. Ale wydaje się, że główny powód tej klęski jest związany z głębokim kryzysem cywilizacji zachodniej, z dewaluacją tych wszystkich wartości, które jeszcze wczoraj wydawały się nam nietykalne i całkowicie pewne. Wszystkie przejawy życia są spolaryzowane w sposób abstrakcyjny i manichejski: *starzy — młodzi, bogaci — biedni, dobrzy — źli...* Jakże więc dziwić się, że takie deformacje ideowe niweczą wzajemne zaufanie? Jak w tej napiętej atmosferze *najhojniejszy* z mistrzów mógłby jeszcze da-

http://rcin.org.pl

wać, a najbardziej *chłonny* z uczniów — mógłby uczyć się z entuzjazmem i dumą? Jeśli ponadto egzaminy i doktorat, które dawały każdemu studentowi możliwość zmierzenia własnych sił, przedstawia się obecnie jako szczeble awansu, wszelkie nauczanie może wydać się beznadziejne. Na szczęście znamy profesorów, którzy nigdy nie abdykowali i którzy przetrwali wszelkie burze...

Badania naukowe jako przygoda i radość: ten, kto nie jest zdolny do odczuwania jednej i drugiej od chwili rozpoczęcia swego terminowania w nauce do osiągnięcia mistrzostwa — powinien odejść od nauki na zawsze. Ta zasada odgrywała dużą rolę w przeszłości, ale obecnie jest mniej przestrzegana. Woli się często przeciętnego konformistę od umysłów niezależnych i oryginalnych. Przeciętność rozpowszechnia się i przemawia w imieniu „większości i demokracji". Ten, kto odmawia udziału w tej grze, staje się podejrzany. *Prawo do odmienności* — drażni. Egalitaryzm jakobinów posługiwał się pojęciem „sprawiedliwości", aby osłonić niezdolnych, obawiających się pracy o szczególnych wymaganiach. Diametralnie przeciwstawny w stosunku do tej sytuacji, znanej nam w Europie, jest system amerykańskich „grantów", który hojnie subwencjonuje badania ukierunkowane i zaprogramowane. Ich bezwzględna dewiza „publish or perish" rozpętała bezlitosną walkę między naukowcami. Walka ta, niezwykle agresywna, prowadzona jest za pomocą wszelkich wymyślnych środków, niekiedy nawet nieuczciwych. Wszyscy znamy przykłady szargania ideałów naukowych, przykłady świadczące o nietolerancji i rozkładzie stosunków w łonie wspólnoty naukowej, której członkowie nie cofają się nawet przed czynami wulgarnymi. Wydaje się, że naiwny astronom amator był bliższy prawdziwego ducha badawczego niż taki uczestnik ostatniego sympozjum Cold Spring Harbor, który posłużył się nawet własnymi pięściami, ale wobec którego wykazano wiele pobłażliwości, ponieważ był pierwszym, który określił taki to a taki ciężar cząsteczkowy lub taką to a taką sekwencję nukleotydów... Musimy poważnie zastanowić się, czy wpadliśmy w jakąś *pułapkę* — w sposób niezawiniony lub z własnej winy. Logiczne następstwo wydarzeń jest jasne *a posteriori:* współczesne badania naukowe wymagają narzędzi coraz bardziej złożonych, odczynników coraz droższych, współpracowników technicznych coraz liczniejszych. Kosztują więc nieskończenie więcej niż dawniej. Jedynie państwo lub wielki przemysł mogą im przyjść z pomocą, ale subwencjonowanie następuje w myśl zasady ogólnej: tylko ściśle określone programy — ponieważ ci, którzy płacą — obywatel lub akcjonariusz — chcą widzieć wyniki możliwie najszybciej...

Nauka taka, jaką wymarzyliśmy i taka, jaką mieliśmy przywilej przeżywać w ciągu lat, jest czymś zupełnie innym. Narodziła się ona

http://rcin.org.pl

z pasji poznawania tajemnic wszechświata. Jest ona bardzo wąską bramą otwartą na cuda istnienia. Oby ci, którzy chcą ją uprawiać, mogli być ożywieni tym samym duchem, jaki ogarniał pierwszych żeglarzy i geografów wyruszających na odkrycie nowych kontynentów albo dookoła świata. Oby mogli oni przypomnieć sobie Aleksandra Humboldta na Orénoque i Darwina na Beagle albo pierwszych wielkich astronomów próbujących zrozumieć prawa rozgwieżdżonego nieba. Ten sam podziw należy się tym, którzy odsłonili prawa mikrokosmosu, świata cząsteczek i atomów. Oby mogli oni wybrać precyzyjnie *najbardziej niedostępne, największe* — jako przestrogę, aby się nigdy nie przeceniali i aby mogli mądrze wymknąć się tym przebiegłym i hałaśliwym. Oby mogli oni być również zawsze świadomi oddania, odwagi, samozaparcia i poświęcenia tych uczonych, którzy świecą przykładem. Będą mogli w ten sposób sami uczestniczyć w tym procesie samorozpoznania, który pojawił się zaledwie wczoraj w tworzeniu życia, szukającym swojej drogi już od trzech miliardów lat. Poczują oni bratnią więź z tymi badaczami znanymi i nieznanymi, którzy ich poprzedzali, którzy mieli tę samą pasję, którzy tryumfowali albo doznawali ciężkich zawodów. Szacunek nasz powinien kierować się nie tylko ku tym, którzy *znaleźli*, ale jednakowo ku tym, którzy szlachetnie i namiętnie *szukali*...«

Tekst referatu poprzedzony jest cytatem z Franciszka Rabelais (1532): „Wiedza bez świadomości jest jedynie ruiną duszy" oraz z T. S. Elliota (Four Quartets — 1970): „Jedyną wiedzą, jaką możemy mieć nadzieję osiągnąć, jest pokora i nieskończona skromność".

Sądzimy, że przytoczone fragmenty rozważań prof. Bernharda stanowią niezbędne uzupełnienie Jego osobowości badacza i myśliciela.

LITERATURA

[1] BERNHARD W., Towards new frontiers in electron microscopy, Biologie Cellulaire, **33**: IX - XXV, 1978.
[2] BERNHARD W., Spiritualité et néant dans la science, Biologie Cellulaire, **33**: XXVII - XXXVI, 1978.
[3] FAVARD P., Wilhelm Bernhard 1920 - 1978, Biologie Cellulaire, **33**: I - VIII, 1978.

Adres autorów: ul. Banacha 12/16, 90 - 237 Łódź.

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 4, 1979 (249 - 266)

POWSTAWANIE ŻÓŁTKA W OOGENEZIE BEZKRĘGOWCÓW

YOLK FORMATION DURING OOGENESIS IN INVERTEBRATES

Szczepan BILIŃSKI

Zakład Zoologii Systematycznej i Zoogeografii, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie. Ultrastrukturalne badania nad oogenezą różnych grup zwierząt wykazały, że witelogeneza (tj. proces formowania żółtka) odbywa się albo na drodze syntezy własnej oocytu (tzw. autosynteza), albo też przez mikropinocytotyczne wchłanianie gotowych substancji zapasowych. W pierwszym przypadku żółtko może pojawiać się bez widocznego kontaktu z organellami („wolno w cytoplazmie") lub też, co jest o wiele częstsze, w procesie tym biorą udział rozmaite struktury komórkowe, np. ziarnista siateczka śródplazmatyczna, diktiosomy, mitochondria. W przeciwieństwie do autosyntezy, mikropinocytoza przebiega podobnie u wszystkich badanych gatunków. Substancje witelogeniczne pochłaniane na drodze mikropinocytozy prawie zawsze produkowane są poza jajnikiem, np. w ciele tłuszczowym lub w trzustkowątrobie, a tylko w nielicznych przypadkach powstają one w otaczających oocyt komórkach folikularnych. U bardzo wielu gatunków żółtko powstaje w wyniku współdziałania obu wymienionych rodzajów witelogenezy (autosyntezy i mikropinocytozy); mówimy wtedy o tzw. mieszanym typie witelogenezy. W artykule opisano również te szczególne przypadki oogenezy, w których witelogeneza w ogóle nie zachodzi, a materiały zapasowe konieczne do rozwoju zarodkowego zdobywane są w inny sposób.

Summary. Ultrastructural studies of oogenesis in various groups of animals have shown that vitellogenesis, i. e. the process of yolk formation, takes place either through synthesis in the oocyte itself (the so-called autosynthesis) or by micropinocytotic uptake of ready-made reserve foodstuffs synthesized elsewhere. In the first instance, the yolk may arise without visible contact with any of the cell organelles ("free in the cytoplasm") or, much more commonly, the process involves the participation of such organelles as the rough endoplasmic reticulum, dictyosomes and mitochondria. In contrast to autosynthesis, micropinocytosis shows a uniform pattern in all species examined so far. The vitellogenic substances absorbed by way of micropinocytosis are nearly always produced outside the ovary, for example in the fat body or hepato-pancreas, and only sporadically in the follicle cells surrounding the oocyte. In many species yolk formation results

http://rcin.org.pl

from a combination of the two types of vitellogenesis described above (autosynthesis and micropinocytosis); in such cases we speak of the so-called mixed type of vitellogenesis. The article also includes those particular cases of oogenesis where vitellogenesis does not occur at all and reserve food materials indispensable to embryonic development are obtained in a different manner.

Witelogeneza jest jednym z charakterystycznych procesów, jakie zachodzą w rozwijającym się oocycie. Dzięki niej w ooplazmie gromadzone są kule (płytki) żółtka stanowiące podstawowy materiał zapasowy, zużywany w czasie rozwoju embrionalnego. Dość liczne w ostatnich latach badania ultrastrukturalne i autoradiograficzne pozwoliły stwierdzić, że żółtko może być wytwarzane albo na drodze syntezy substancji witelogenicznych wewnątrz oocytu (autosynteza), albo przez mikropinocytotyczne wchłanianie gotowych związków produkowanych poza oocytem, albo wreszcie w efekcie współdziałania obu wymienionych procesów.

TYPY WITELOGENEZY

AUTOSYNTEZA

W przeciwieństwie do mikropinocytozy, która przebiega w ogólnych zarysach bardzo podobnie u wszystkich badanych gatunków, autosynteza nie jest procesem jednolitym. Obecnie wiadomo, że żółtko autosyntetyczne (endogenne) może powstawać:

1. bez widocznego powiązania z organellami „wolno w cytoplazmie",
2. wewnątrz elementów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej,
3. w mitochondriach oraz z pęcherzyków diktiosomalnych [4].

Powstawanie żółtka bez widocznego kontaktu z organellami opisano dotychczas zaledwie u paru zwierząt, przy czym tylko u niezmogowca *Priapulus* (*Priapulida*) proces ten został dobrze udokumentowany [76]. W cytoplazmie oocytów tego gatunku pojawiają się nieregularne skupienia gęstego materiału, otoczone wieńcem pęcherzyków ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Stopniowo ilość tego materiału rośnie, a równocześnie zostaje on ograniczony cytoplazmatyczną błoną pozbawioną rybosomów. W wyniku tych procesów powstają typowe kule żółtka wypełnione materiałem ziarnistym i otoczone kompletną błoną.

Powstawanie żółtka wewnątrz elementów siateczki śródplazmatycznej jest charakterystyczne dla skorupiaków wyższych [6, 30, 35, 44, 55, 57] i kikutnic [49, 50]. W oocytach tych zwierząt występuje dobrze rozwinięty skomplikowany system siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, w której pojawiają się duże ilości specyficznego kształtu elektronowo gęstych ziaren (ryc. 3), tzw. „disc shaped bodies" [6]. Prekursory

http://rcin.org.pl

ziaren syntetyzowane są prawdopodobnie w kontakcie z rybosomami występującymi na powierzchni siateczki śródplazmatycznej [6]. W niektórych miejscach systemu siateczki śródplazmatycznej ziarna skupiają się i ulegają równocześnie transformacji w materiał granularny (ryc. 3). W ten sposób powstają pierwsze drobne kule żółtka, które powiększają się dzięki przyłączaniu coraz to nowych „disc shaped bodies". Ostatnio, bardzo podobny sposób powstawania żółtka opisano również u pstrąga tęczowego *Salmo gairdneri* [7].

Omawiany typ autosyntezy, w nieco odmiennej postaci, stwierdzono u wypławka *Prostheceraeus floridanus* [20], wioślarki *Daphnia* [55] i trzech gatunków owadów bezskrzydłych: *Tetrodontophora bielanensis* [9], *Campodea* [12] i *Petrobius maritimus* [22]. W tych przypadkach prekursory żółtka, pojawiające się w świetle cystern siateczki śródplazmatycznej, mają postać skupień gęstego materiału ziarnistego (ryc. 1, 5), w którym czasem występują konkrecje mineralne [22].

Formowanie żółtka w mitochondriach najdokładniej przebadano u płazów [56, 68]. Według Massovera [68] proces ten obejmuje następujące etapy: 1. powiększenie niektórych obszarów macierzy mitochondrialnej, 2. rozdęcie grzebieni w tych obszarach, 3. akumulację materiału ziarnisto-włóknistego wewnątrz grzebieni, 4. krystalizację tego materiału, 5. powiększenie się kryształu do rozmiarów całego mitochondrium, 6. wydostanie się kryształu (lub kryształów) z mitochondrium, które równocześnie powraca do swego stanu wyjściowego. Wśród bezkręgowców gromadzenie żółtka wewnątrz grzebieni mitochondrialnych stwierdzono ostatnio u wija *Hanseniella nivea* [13].

Bezpośredni udział mitochondriów w formowaniu kul żółtka sugerowany był też u ślimaka *Planorbis* [38] i kosarza *Leiobunum* [80]. Trzeba jednak zaznaczyć, że w świetle nowszych badań nad oogenezą mięczaków [46, 51] i pajęczaków [77, 78] wyniki te wydają się wątpliwe i są kwestionowane [51].

Udział diktiosomów w witelogenezie stwierdzono u wielu gatunków z rozmaitych grup systematycznych, od jamochłonów [54] do strunowców włącznie [53]. W większości opisanych przypadków białkowe prekursory żółtka syntetyzowane są przez ziarnistą siateczkę śródplazmatyczną, a tylko wyjątkowo w procesie tym biorą udział wolne polirybosomy [10, 53, 77]. Białka witelogeniczne z szorstkiej siateczki śródplazmatycznej przedostają się następnie do diktiosomów, gdzie ulegają zagęszczeniu. W obrębie tych ostatnich organelli syntetyzowana jest też polisacharydowa komponenta żółtka. Gotowe substancje żółtkowe opuszczają diktiosom wewnątrz pęcherzyków odrywających się od brzegów cystern diktiosomalnych (ryc. 1, 4, 5). Pęcherzyki te łączą się ze sobą dając początek kulom żółtka. W opisanym procesie mogą być

http://rcin.org.pl

TABELA

Udział mikropinocytozy i różnych typów autosyntezy w formowaniu żółtka u bezkręgowców

Gatunek (rodzaj)	Literatura	Mikropinocytoza	Autosynteza			
			wolno w cytoplazmie	w elem. siateczki	w mitochondriach	z pęcherzyków diktiosomalnych
1	2	3	4	5	6	7
Coelenterata						
Hydrozoa	[54]					++
Plathelminthes						
Prostheceraeus floridanus	[20]			++		
Annelida						
Enchytraeus albidus	[31]	+				+
Diopatra cuprea	[3]					++
Nicolea zostericola	[33]					++
Priapulida						
Priapulus	[76]		++			
Crustacea						
Cambarus	[6]			++		
Homarus	[55, 57]			++		
Panulirus	[55]			++		
Daphnia	[55]			++		
Libinia emarginata	[44]	+		+		
Cancer pagurus	[35]	+		+		
Eriocheir sinensis	[30]	+		+		
Orchestia gammarella	[91,92]	+		+		
Porcellio scaber	[11]	+		+		
Pantopoda						
Pycnogonum littorale	[49]	+		+		
Endeis laevis	[50]	+		+		
Chelicerata						
Limulus polyphemus	[32]	+				+
Heptathela kimurai	[77]	+				+
Plexippus paykulli	[78]	++				
Myriapoda						
Lithobius forficatus	[43]	++				
Hanseniella nivea	[13]	+			+	
Insecta						
Protura						
Acerentomon gallicum	[10]					++
Collembola						
Tetrodontophora bielanensis	[9]	+		+		+

http://rcin.org.pl

c.d. tab.

1	2	3	4	5	6	7
Diplura						
Campodea	[12]	+		+		+
Thysanura						
Petrobius maritimus	[22]	+		+		+
Lepisma	[25]	++				
Pterygota						
Sympetrum	[69]	++				
Gryllus	[69]	++				
Periplaneta americana	[1]	++				
Leucophaea maderae	[82]	++				
Gromphadorhina brauneri	[67]	++				
Bothrogonia japonica	[71]	++				
Rhodnius prolixus	[45]	++				
Panorpa communis	[79]	++				
Drosophila melanogaster	[41]	++				
Aedes aegypti	[81]	++				
Parastenopsyche sauteri	[70]	++				
Hyalophora cecropia	[84]	++				
Ophion luteus	[59]	++				
Nasonia vitripennis	[60]	++				
Tardigrada						
Macrobiotus richtersii	[90]	+		+		+
Mollusca						
Mopalia	[2]					
Chaetopleura	[2]					++
Anodonta	[8]					++
Ilyanassa obsoleta	[88]					++
Physa acuta	[89]					++
Biomphalaria glabrata	[51]					++
Alloteuthis subulata	[19]					++
Echinodermata						
Thyone briareus	[52]					++
Tunicata						
Ciona intestinalis	[53]					++

zaangażowane zarówno diktiosomy pojedyncze, bezładnie rozrzucone w ooplazmie [9, 33, 89] (ryc. 1), jak i skupione w zespoły [12, 32, 77]. Czasami w skład zespołu oprócz diktiosomów wchodzi też siateczka śródplazmatyczna [12, 77] (ryc. 5).

MIKROPINOCYTOZA

W tym przypadku żółtko powstaje przez zlewanie się pęcherzyków mikropinocytotycznych zawierających substancje witelogeniczne (ryc. 2).

http://rcin.org.pl

Synteza tych substancji zachodzi najczęściej poza jajnikiem, np. w ciele tłuszczowym owadów lub w trzustkowątrobie skorupiaków, a tylko wyjątkowo w nabłonku folikularnym [5, 83]. Niezależnie od miejsca syntezy materiał żółtkowy uwalniany jest do hemolimfy, następnie przenika przez błonę podstawną otaczającą jajnik [84] i poprzez przestrzenie między komórkami folikularnymi osiąga powierzchnię oocytu. Udział mikropinocytozy w witelogenezie opisano początkowo tylko u owadów [1, 36, 58, 81]. W następnych latach proces ten został stwierdzony u bardzo wielu gatunków z rozmaitych grup systematycznych (patrz tabela). U niektórych zwierząt mikropinocytoza dostarcza całego materiału żółtkowego (owady uskrzydlone, niektóre wije i pajęczaki) (tabela), podczas gdy u innych współdziała z procesami autosyntezy, które zachodzą w ooplazmie („mieszany typ witelogenezy").

PRZEGLĄD SYSTEMATYCZNY

W tej części opisano przebieg witelogenezy w rozmaitych grupach bezkręgowców (tabela). Powstawania żółtka nie należy jednak rozpatrywać w oderwaniu od podłoża na jakim proces ten zachodzi; tam gdzie było to możliwe, przedstawiono zatem budowę jajnika i rolę komórek towarzyszących oocytowi.

JAMOCHŁONY (*COELENTERATA*)

W grupie tej zarówno plemniki, jak i jaja powstają z komórek interstycjalnych, które tworzą skupienia w mezoglei odpowiadające gonadom wyższych bezkręgowców. Jedyne, jak do tej pory, badania nad witelogenezą jamochłonów [54] wykazały, że u hydromeduz żółtko powstaje w wyniku współdziałania ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i diktiosomów (czwarty typ autosyntezy).

Bardzo interesujący jest przebieg oogenezy stułbiopławów *Hydra* [87] i *Tubularia* [17]. U zwierząt tych, powstałe z komórek interstycjalnych oogonie leżą w grupach. W obrębie każdej grupy jedno oogonium przekształca się w prooocyt, który na drodze fagocytozy pochłania pozostałe komórki. Następnie kilka sąsiadujących oocytów łączy się ze sobą tworząc w ten sposób tzw. oocyt wielojądrowy, w którym tylko jedno jądro pozostaje aktywne, reszta natomiast ulega stopniowej degeneracji. Efektem tych procesów jest nagromadzenie dużych ilości materiałów zapasowych w komórce jajowej, co w znacznym stopniu wspomaga witelogenezę. Niestety sam proces powstawania elementów morfotycznych żółtka u *Hydra* i *Tubularia* nie został opisany.

http://rcin.org.pl

ROBAKI PŁASKIE (*PLATHELMINTHES*)

W oocytach większości zaliczanych tu gatunków żółtko w ogóle nie powstaje [42, 75], a materiały zapasowe, konieczne do rozwoju embrionalnego, gromadzone są w specjalnych komórkach żółtkowych w obrębie gruczołów zwanych witelariami [73, 85, 86].

Klasyczny proces witelogenezy u robaków płaskich opisano jedynie u wypławka *Prostheceraeus floridanus* [20]. U gatunku tego nie występują ani witelaria, ani dobrze wykształcone jajniki. W tej sytuacji oocyty rozwijają się samodzielnie, a żółtko powstaje wyłącznie na drodze autosyntezy, przy czym w procesie tym zaangażowana jest jedynie ziarnista siateczka śródplazmatyczna.

PIERŚCIENICE (*ANNELIDA*)

U większości badanych do tej pory pierścienic młode oocyty uwalniane są z jajników do jamy ciała, gdzie odbywa się ich dalszy rozwój. W celomie oocyty tworzą zespoły, które otoczone są zwykle komórkami nabłonkowymi [33, 39]. Oocyty każdego zespołu połączone są ze sobą mostkami cytoplazmatycznymi, co dowodzi, że są one względem siebie siostrzane. U niektórych gatunków tylko jedna komórka syncytialnego zespołu staje się oocytem, podczas gdy reszta spełnia rolę komórek odżywczych [3, 34, 40, 46]. Główną funkcją tych komórek jest produkcja rybosomalnego RNA, który następnie przez mostki cytoplazmatyczne transportowany jest do oocytu [3, 46]. Udział komórek odżywczych w witelogenezie opisano jak dotąd jedynie u *Ophryotrocha labronica* [34]. U pozostałych badanych gatunków pierścienic żółtko powstaje na drodze syntezy własnej oocytu [33, 46] lub też w efekcie współdziałania autosyntezy i mikropinocytozy [31]. W procesach autosyntetycznych zaangażowana jest ziarnista siateczka śródplazmatyczna i diktiosomy [31, 33, 46].

GRUBORYJKOWE (*PRIAPULIDA*)

Powstawanie żółtka u *Priapulus* opisano w przeglądzie typów witelogenezy.

STAWONOGI (*ARTHROPODA*)

SKORUPIAKI (*CRUSTACEA*)

Jajniki skorupiaków pokryte są grubą błoną podstawową oraz nabłonkiem, który może wnikać między oocyty tworząc tzw. zrąb jajnika [6]. Oocyty rozwijają się niesynchronicznie i otoczone są warstwą komórek folikularnych. Przebieg witelogenezy w tej grupie zwierząt

http://rcin.org.pl

badany był już wielokrotnie, przy czym większość dotychczasowych badań dotyczyła dziesięcionogów (*Decapoda*) [6, 30, 35, 44, 55, 57]. Początkowo uważano, że całe żółtko skorupiaków wytwarzane jest przez ziarnistą siateczkę śródplazmatyczną [6, 55] (proces ten został już wcześniej szczegółowo opisany). Dopiero przeprowadzone w ostatnich latach badania ultrastrukturalne [11, 30, 35, 91], szczególnie z użyciem peroksydazy chrzanowej [92], wskazują, że również i w tej grupie część materiałów zapasowych pochodzi z mikropinocytozy (ryc. 3). Do tej pory natomiast nie udało się wyjaśnić roli, jaką w witelogenezie skorupiaków odgrywają diktiosomy. U wszystkich badanych gatunków organelle te występują w cytoplazmie oocytów licznie, jednak tylko w niektórych przypadkach uzyskano dowody na ich udział w formowaniu żółtka [35, 44]. Nowe światło na to zagadnienie rzucają badania nad oogenezą kraba wełnistoszczypcego *Eriocheir sinensis* [30] i stonogi *Porcellio scaber* [11]. U gatunków tych cysterna siateczki śródplazmatycznej otaczająca diktiosom od strony formowania wypełniona jest gotowymi już ziarnami (disc shaped bodies), co według Dhainaut i Leersnyder [30] wyklucza udział aparatu Golgiego w witelogenezie.

KIKUTNICE (*PANTOPODA*)

W tej grupie zwierząt jajnik jest nieparzysty i ma kształt litery U [49, 50]. Leży on po grzbietowej stronie jelita i posiada liczne uchyłki wnikające do odnóży lokomocyjnych. Poszczególne oocyty otoczone są osłoną włóknistą, natomiast nie stwierdzono nabłonka folikularnego. W witelogenezie kikutnic, podobnie jak u skorupiaków, bierze udział ziarnista siateczka śródplazmatyczna i mikropinocytoza [49, 50].

SZCZĘKOCZUŁKOWCE (*CHELICERATA*)

Żeńskie gonady szczękoczułkowców są bardzo różnorodne zarówno pod względem kształtu, jak i budowy. U wielu gatunków są one parzyste i workowate [77, 78], równie często jednak łączą się ze sobą i przyjmują kształt podkowy lub litery U. Ponadto, w niektórych przypadkach jajniki zbudowane są z licznych rozgałęziających się cewek [32]. U wszystkich *Chelicerata* młode oocyty (najczęściej w okresie prewitelogenezy) wypychane są na zewnątrz gonady i sterczą do jamy ciała na specjalnych stylikach [32, 77, 78]. Komórki folikularne nie występują w ogóle [32] lub też otaczają tylko niewielkie oocyty znajdujące się jeszcze w obrębie jajnika [77]. W tej sytuacji oocyty w czasie formowania żółtka otoczone są jedynie błoną podstawną, która pokrywa również cały jajnik. Witelogeneza szczękoczułkowców znana jest bardzo słabo. Pierwsze badania w mikroskopie świetlnym wydawały się

http://rcin.org.pl

wskazywać, że w procesie formowania żółtka u tych zwierząt bierze udział tzw. jądro żółtkowe (ciało Balbianiego). Obecnie jednak wiadomo, że struktura ta związana jest z syntezą lipidów [78], natomiast żółtko powstaje podobnie jak u innych stawonogów, tzn. albo w wyniku mikropinocytozy [78], albo na drodze współdziałania tego procesu z autosyntezą [32, 77]. Jak to już wcześniej wspomniano, żółtko autosyntetyczne w tej grupie zwierząt produkowane jest przez specyficzne kompleksy diktiosomów i siateczki śródplazmatycznej [32, 77].

WIJE (*MYRIAPODA*)

DROBNONOGI (*SYMPHYLA*)

Jajniki drobnonogów są parzyste i workowate. Pokrywa je błona podstawna, ponad którą znajduje się osłona nabłonkowa. Wnętrze gonady wypełnione jest oocytami, które otoczone są jednowarstwowym nabłonkiem folikularnym [13]. Podstawowym źródłem żółtka drobnonogów jest mikropinocytoza, pozostała niewielka część gromadzona jest wewnątrz grzebieni mitochondrialnych [13].

PARECZNIKI (*CHILOPODA*)

W tej grupie zwierząt całe żółtko powstaje na drodze mikropinocytozy [43].

OWADY (*INSECTA*)

Parzyste jajniki owadów składają się najczęściej z licznych cewek zwanych owariolami; tylko niektóre owady bezskrzydłe (*Apterygota*): pierwogonki (*Protura*), skoczogonki (*Collembola*) i widłogonki (*Diplura*) mają gonady proste, workowate [4, 9, 10, 12, 66]. Od zewnątrz jajniki otoczone są jedno- lub wielowarstwową błoną podstawną i osłoną nabłonkową. Ze względu na miejsce syntezy rybosomalnego RNA i ukształtowanie tkanek odżywczych, dokonano podziału żeńskich gonad owadów na dwa podstawowe typy: panoistyczny i meroistyczny.

W jajniku panoistycznym, który stwierdzono u pierwogonków (*Protura*) [10] i szczeciogonków (*Thysanura*) [22], wśród *Apterygota* oraz u prymitywnych owadów uskrzydlonych (*Pterygota*), komórki odżywcze nie występują, a oocyty otoczone są jedynie nabłonkiem folikularnym. W tej sytuacji cały rRNA produkowany jest przez jądra oocytów. Odmienna sytuacja panuje w jajniku meroistycznym, gdzie rybosomalny kwas rybonukleinowy dostarczany jest przez komórki odżywcze, podczas gdy jądra oocytów są nieaktywne i prawie w ogóle nie biorą udziału w syntezie tego związku. Lokalizacja komórek odżyw-

http://rcin.org.pl

czych stała się podstawą do wyróżnienia jajników telotroficznych i politroficznych. W jajniku telotroficznym, który jest charakterystyczny dla pluskwiaków równo- i różnoskrzydłych (*Homoptera* i *Heteroptera*) [45, 71], chrząszczy (*Coleoptera*) [16, 21, 74] i niektórych wielkoskrzydłych (*Megaloptera*) [72], komórki odżywcze leżą na szczytach owariol tworząc komory odżywcze. Oocyty otoczone są nabłonkiem folikularnym i kontaktują się z komorą odżywczą za pomocą długich wypustek cytoplazmatycznych, tzw. sznurów odżywczych. W jajniku politroficznym każdy oocyt posiada grupę komórek odżywczych tworząc wraz z nimi komorę jajową, która jest otoczona nabłonkiem folikularnym. Jak wykazały szczegółowe badania [23, 62], oocyt i komórki odżywcze jednej komory powstają przez synchroniczne i niekompletne podziały tzw. cystoblastu. W zależności od liczby podziałów, ilość komórek odżywczych jest więc różna i wynosi: u wojsiłki *Panorpa* 3 [79], u muchówek *Drosophila* [62] i *Glossina* [47] — 15, a u błonkówki *Habrobracon junglandis* [23] — 31. Jajnik politroficzny, poza owadami uskrzydlonymi, opisano też u skoczogonków (*Collembola*) i widłogonków (*Diplura*). W tym jednak przypadku gonady wykazują wiele cech prymitywnych, jak np. workowaty kształt, słabe wykształcenie nabłonka folikularnego, a także brak osłony nabłonkowej [4, 9, 12, 66].

Po przedstawieniu budowy jajnika owadów należy zastanowić się, jaką rolę w oogenezie spełniają komórki towarzyszące oocytowi i jaki jest ich udział w procesie witelogenezy.

K o m ó r k i o d ż y w c z e. Niewątpliwie ich główną rolą jest produkcja rybosomalnego RNA na potrzeby oocytu. W niektórych jednak przypadkach mogą one syntetyzować i przekazywać do oocytu lipidy w formie kropli [47] lub nawet drobne ilości żółtka [12].

K o m ó r k i f o l i k u l a r n e. Podstawową ich funkcją jest synteza prekursorów osłon jajowych, na co uzyskano wiele przekonywających dowodów [14, 16, 26, 37]. Część badaczy przypisuje jednak tym komórkom udział w syntezie substancji żółtkowych, które następnie miałyby być transportowane do oocytu na drodze mikropinocytozy [5, 48].

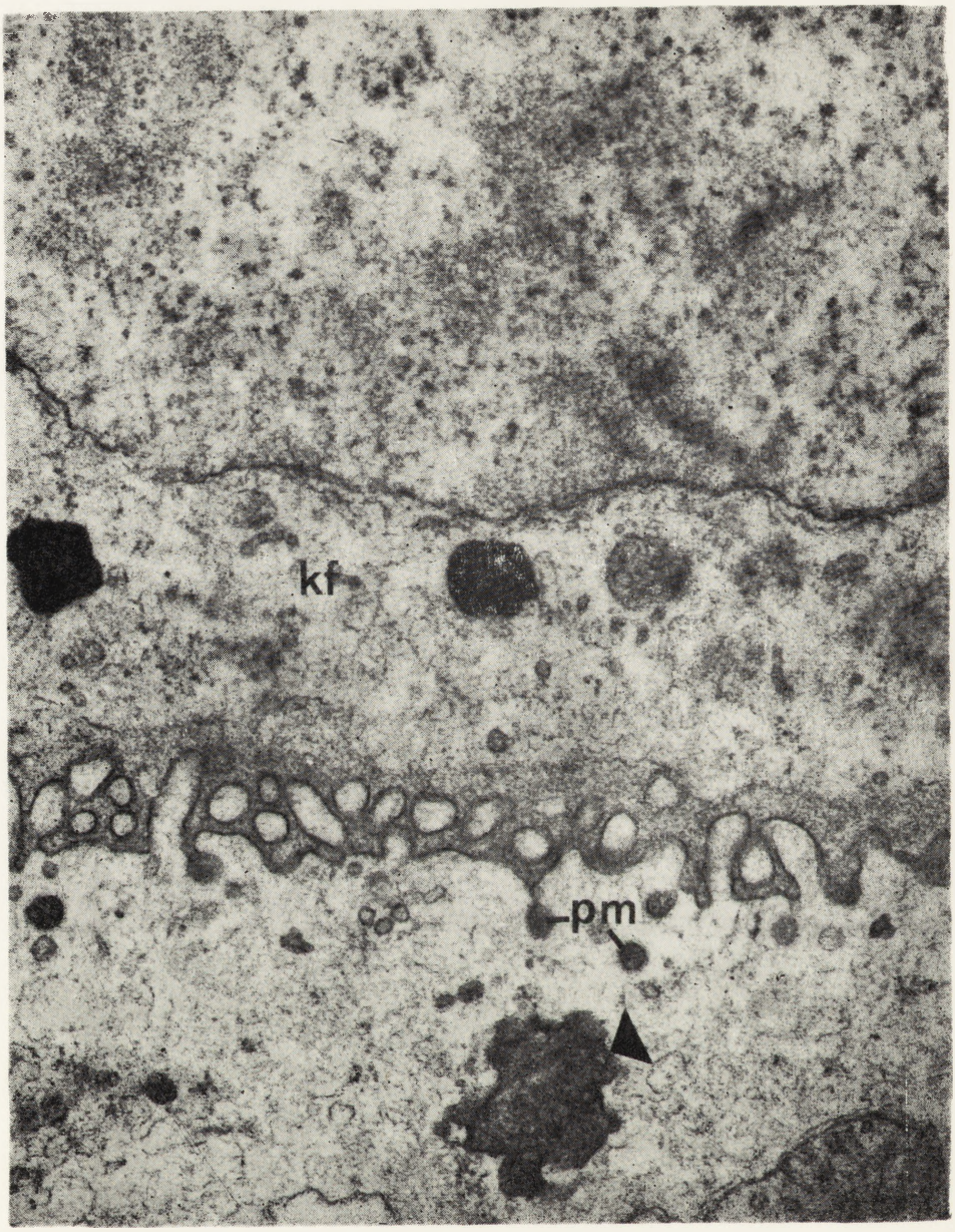
Witelogeneza owadów, zarówno bezskrzydłych, jak i uskrzydlonych, poznana została stosunkowo dobrze. Szczególnie interesująco przedstawia się ten proces u *Apterygota*, gdzie opisano całą gamę różnych sposobów gromadzenia żółtka. U pierwogonków (*Protura*) całe żółtko powstaje w wyniku autosyntezy [10], w której zaangażowane są diktiosomy i specyficzne ciała lamelarne (ryc. 4), przy czym te ostatnie, według Klaga [63], pochodzą z mitochondriów. U skoczogonków (*Collembola*) [9] i widłogonków (*Diplura*) [12] w witelogenezie bierze udział zarówno autosynteza, jak i mikropinocytoza (ryc. 5). W procesach autosynte-

http://rcin.org.pl

Ryc. 1. Fragment cytoplazmy oocytu *Tetrodontophora bielanensis* (*Collembola*) w czasie witelogenezy. × 46 000

W procesach autosyntetycznych u tego gatunku biorą udział diktiosomy (d) oraz elementy ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (strzałki). Widoczne są również wytworzone już kule żółtka (z) i krople lipidów (li)

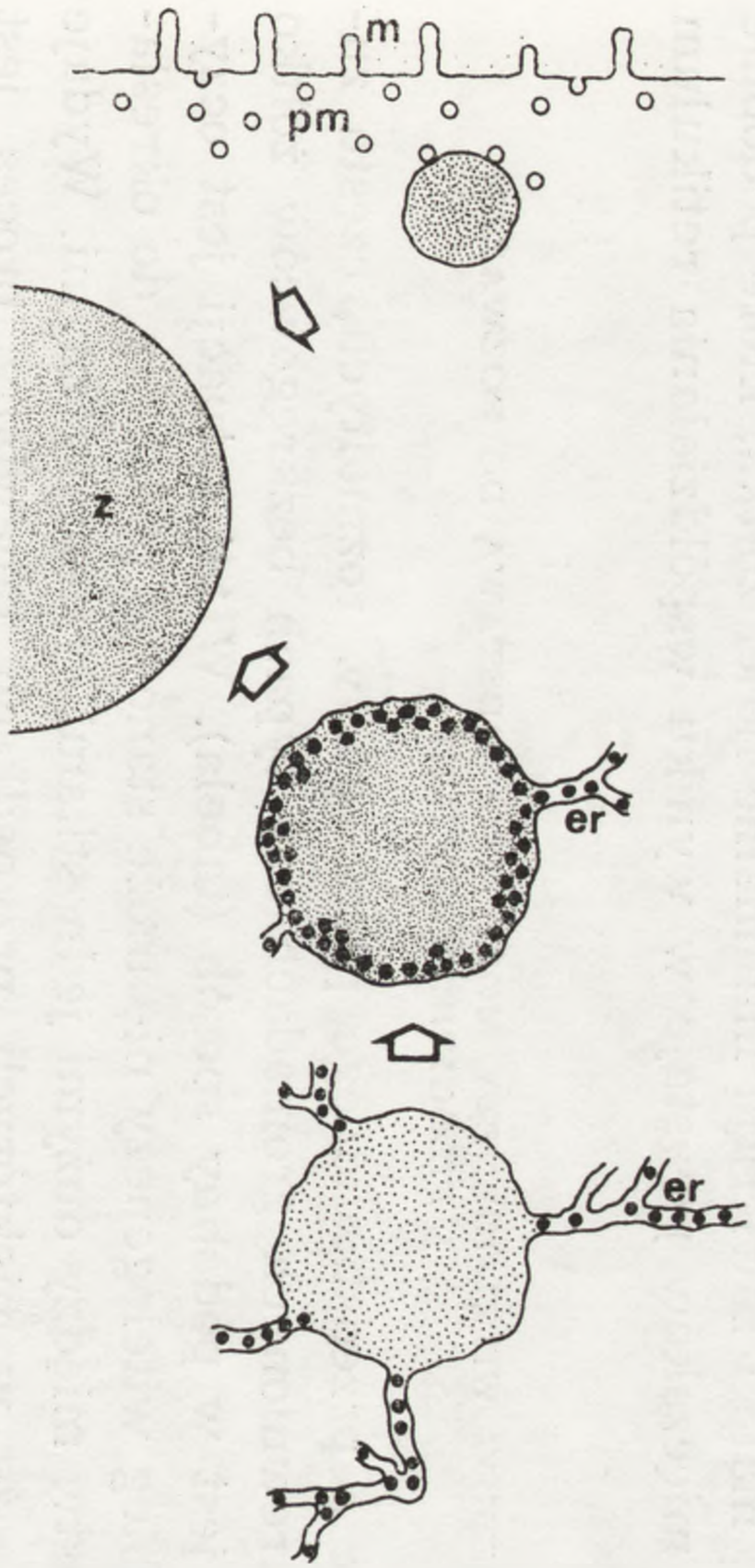
http://rcin.org.pl



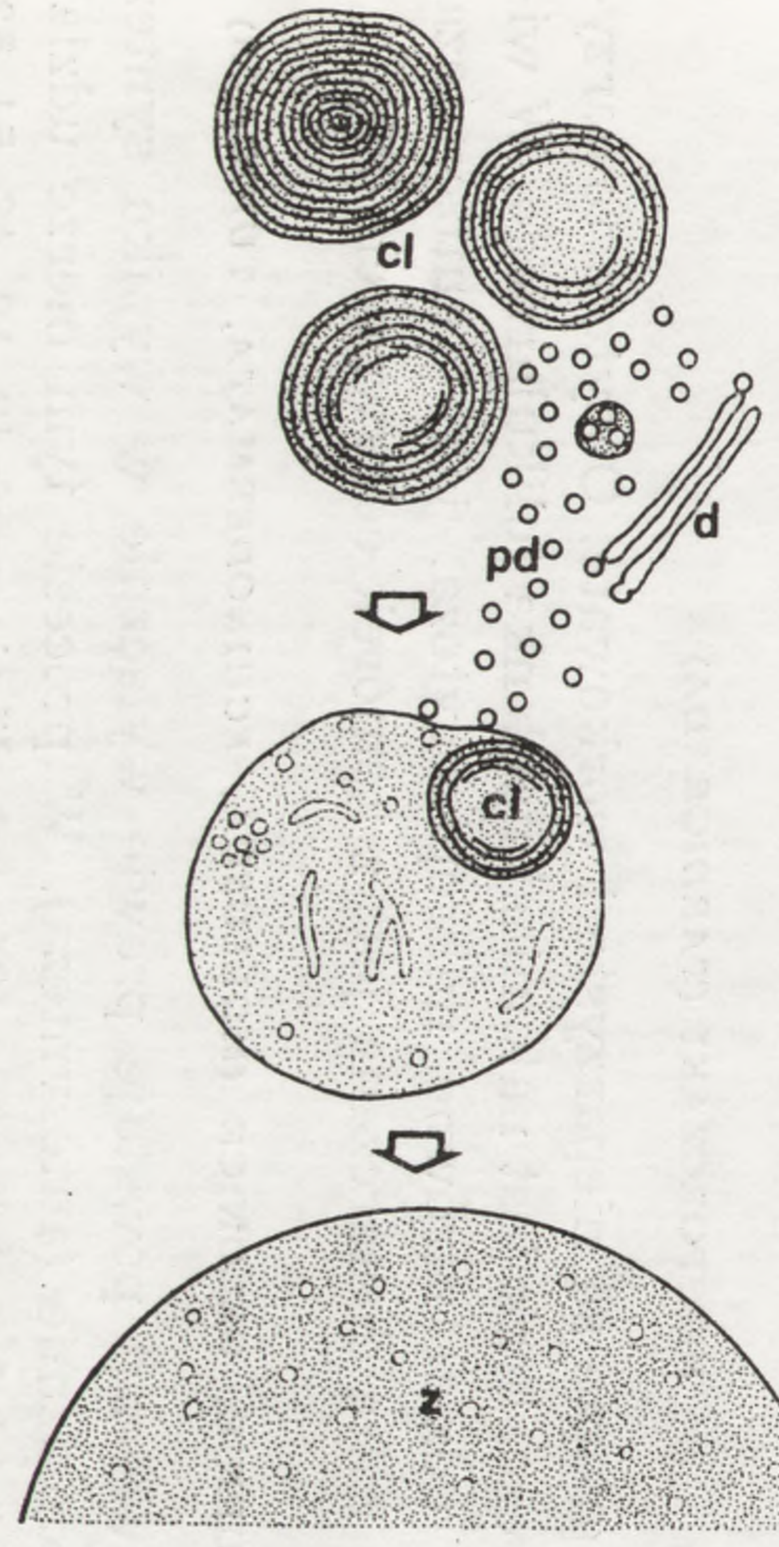
Ryc. 2. Cytoplazma powierzchniowa oocytu widłogonki *Campodea* sp. (*Diplura*) × 34 000

Widoczny też fragment komórki folikularnej (kf). Oocyt pokryty jest mikrokosmkami, między którymi powstają liczne pęcherzyki mikropinocytotyczne (pm). Pęcherzyki te łącząc się ze sobą dają początek niewielkim kulom żółtka (strzałka)

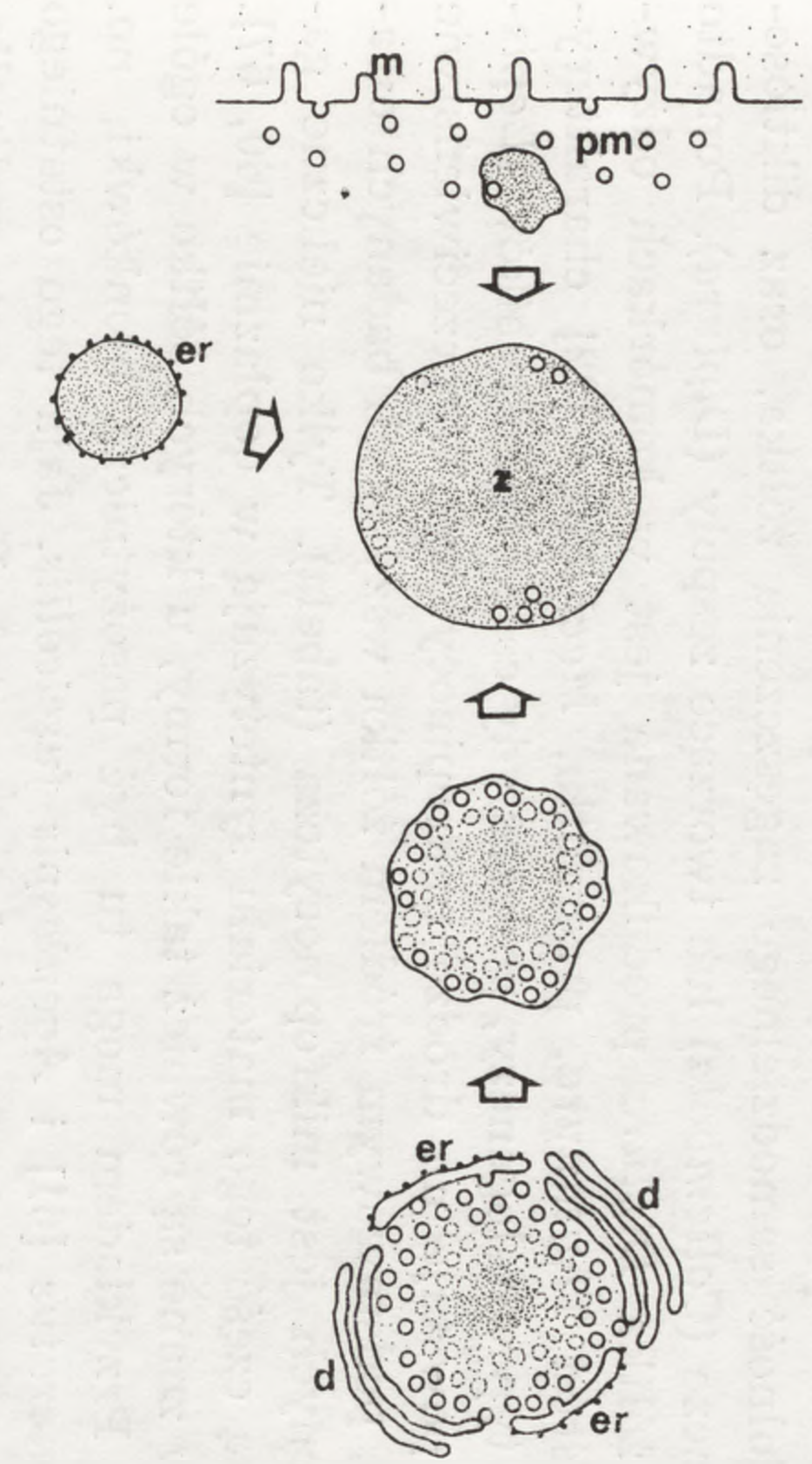
http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Schemat powstawania żółtka stonogi *Porcellio scaber* (*Isopoda*)
Przykład współdziałania mikropinocytozy i siateczki śródplazmatycznej (er), m — mikrokosmki, pm — pęcherzyki mikropinocytotyczne, z — uformowana kula żółtka



Ryc. 4. Schemat powstawania żółtka pierwogonka *Acerentomon gallicum* (*Protura*)
Przykład wyłącznej autosyntezy. cl — ciała lamelarne, d — diktiosom, pd — pęcherzyki diktiosomalne, z — uformowana kula żółtka



Ryc. 5. Schemat powstawania żółtka widłogonki *Campodea* sp. (*Diplura*)
Przykład współdziałania mikropinocytozy, diktiosomów (d) i ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (er), m — mikrokosmki, pm — pęcherzyki mikropinocytotyczne, z — uformowana kula żółtka

http://rcin.org.pl

tycznych współdziałają elementy ziarnistej siateczki śródplazmatycznej, posiadające zdolność samodzielnego zagęszczenia żółtka, oraz diktiosomy — pojedyncze (*Collembola*) lub tworzące zespoły (*Diplura*). Ponadto drobna część żółtka *Diplura* produkowana jest w komórkach odżywczych [12]. Wśród *Thysanura*, przerzutki, *Machilidae* [22] charakteryzuje mieszany typ witelogenezy, podczas gdy całe żółtko rybików (*Lepismatidae*) [25] powstaje na drodze mikropinocytozy. W przeciwieństwie do *Apterygota*, podstawowym źródłem żółtka wszystkich badanych owadów uskrzydlonych jest mikropinocytoza (tabela). Tylko nieliczne gatunki niewielką część tego materiału syntetyzują w ooplazmie [60, 67]. Wśród owadów znane są również takie formy, u których żółtko w ogóle nie powstaje. Przykładem mogą tu być pasożytnicze błonkówki, np. *Apantales glomeratus* [61] i *Ageniaspis fuscicollis*. Jaja tego ostatniego gatunku składane są do jamy ciała larwy motyla *Yponeumata malinella*. W czasie rozwoju zarodki *A. fuscicollis* pobierają substancje odżywcze z hemolimfy żywiciela [65], dzięki czemu własne materiały zapasowe są zbyteczne.

NIESPORCZAKI (*TARDIGRADA*)

Jajniki w tej grupie są nieparzyste i workowate. Oocytom towarzyszą komórki odżywcze, brak jest natomiast nabłonka folikularnego. W witelogenezie bierze udział zarówno mikropinocytoza, jak i autosynteza, a dodatkowo część żółta dostarczana jest z komórek odżywczych [90].

MIĘCZAKI, SZKARŁUPNIE, OSŁONICE (*MOLLUSCA, ECHINODERMATA, TUNICATA*)

Żółtko tych zwierząt powstaje prawie wyłącznie w wyniku syntez zachodzących w ooplazmie (autosynteza). W procesie tym bierze udział ziarnista siateczka śródplazmatyczna [24] lub diktiosomy [2, 19, 46, 51–53, 88, 89]. Ciekawy przypadek witelogenezy opisano w oocytach ślimaka *Viviparus contectus* [18]. Gatunek ten jest żyworodny i ze względu na to jego oocyty są małe i zawierają minimalne ilości żółtka, które podobnie jak u innych mięczaków powstaje w wyniku współdziałania retikulum i diktiosomów.

CZY PRZEBIEG WITELOGENEZY MOŻE BYĆ PODSTAWĄ DO ROZWAŻAŃ FILOGENETYCZNYCH?

Jak widać z przedstawionego przeglądu, w rozmaitych, często zupełnie niespokrewnionych gromadach czy typach bezkręgowców żółtko produkowane jest w podobny sposób (tabela). W tej sytuacji jest oczywiste, że przebieg witelogenezy nie może stanowić podstawy do określania pokrewieństw między dużymi jednostkami systematycznymi. Wydaje się natomiast, że w niektórych przypadkach omawiany proces jest

http://rcin.org.pl

dobrym punktem wyjścia do rozważań nad filogenezą grup o niższej randze, jak np. rzędy czy rodziny. Szczególnie dobrze pogląd ten potwierdzają badania nad oogenezą skorupiaków wyższych. Okazało się bowiem, że na sposób formowania żółtka w tej grupie nie wpływa środowisko; i tak zarówno u gatunków morskich [30, 91, 92], słodkowodnych [6], jak i ściśle lądowych [11] w witelogenezie współdziała mikropinocytoza oraz silnie rozwinięty system siateczki śródplazmatycznej. Należy przy tym podkreślić, że we wszystkich opisanych przypadkach [6, 11, 30, 35, 44, 55, 57, 91, 92] prekursory żółtka pojawiające się w świetle siateczki śródplazmatycznej mają postać elektronowo gęstych ziaren.

W ostatnich latach przebieg witelogenezy stał się podstawą rozważań nad filogenezą owadów bezskrzydłych [12]. Jak już wspomniano, u *Apterygota,* w przeciwieństwie do innych grup bezkręgowców (tabela), opisano rozmaite typy powstawania żółtka, od wyłącznej autosyntezy do wyłącznej mikropinocytozy. Tak duże zróżnicowanie witelogenezy w obrębie niewielkiej przecież jednostki systematycznej wydaje się wskazywać, że owady bezskrzydłe są grupą sztuczną, polifiletyczną. Najprawdopodobniej tylko dwa rzędy (spośród czterech tu zaliczanych) *Collembola* i *Diplura* są ze sobą spokrewnione. Świadczy o tym nie tylko bardzo podobny przebieg witelogenezy, ale również zbliżona budowa gonady żeńskiej. Trzeci zaliczany tu rząd, *Thysanura,* jest chyba bliżej spokrewniony z *Pterygota* niż z pozostałymi *Apterygota.* Również i w tym przypadku wskazuje na to sposób formowania żółtka i budowa jajników, które u szczeciogonków, podobnie jak u owadów uskrzydlonych, składają się z licznych dobrze wykształconych owarioli. Z kolei *Protura* najprawdopodobniej reprezentują izolowany szczep nie związany z żadną grupą owadów bezskrzydłych. O dużej odrębności *Protura* świadczą zarówno wyniki badań nad witelogenezą [10], jak i inne dotyczące ultrastruktury jelita [15, 28, 29], kutikuli [64] oraz plemników [27].

Na zakończenie należy zaznaczyć, że aktualny stan wiedzy o witelogenezie bezkręgowców jest niepełny. Do tej pory bardzo mało lub nic nie wiemy o powstawaniu żółtka w oocytach takich zwierząt, jak gąbki, robaki obłe, skorupiaki niższe, pajęczaki itd. O niskim stanie naszej wiedzy może świadczyć również fakt, że nawet w oogenezie owadów, która badana jest ostatnio bardzo intensywnie, wciąż jeszcze istnieje wiele niejasności i znaków zapytania.

LITERATURA

[1] ANDERSON E., Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana,* J. Cell Biol., **20**: 131–155, 1964.
[2] — Oocyte-follicle cell differentiation in two species of *Amphineurans* (*Mo-*

http://rcin.org.pl

lusca), *Mopalia mucosa* and *Chaetopleura apiculata*, J. Morphol., **129**: 89–125, 1969.

[3] ANDERSON E., HUEBNER E., Development of the oocyte and its accessory cells of the polychaete, *Diopatra cuprea* (Bosc), J. Morphol., **126**: 163–197, 1968.

[4] BARETH C., L'ovogenèse chez un Arthropode du sol: *Campodea* (C.) *remyi* (*Diploures*). Structure et évolution de l'ovaire, C. R. Acad. Sc. Paris, **275**: 1887–1890, 1972.

[5] BAST R. E., TELFER W. H., Follicle cell protein synthesis and its contribution to the yolk of the *Cecropia* moth oocyte, Dev. Biol., **52**: 83–97, 1976.

[6] BEAMS H. W., KESSEL R. G., Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk, J. Cell Biol., **18**: 621–649, 1963.

[7] — Oocyte structure and early vitellogenesis in the trout, *Salmo gairdneri*, Amer. J. Anat. **136**: 105–122, 1973.

[8] BEAMS H. W., SEKHON S. S., Electron microscope studies on the freshwater mussel (*Anodonta*), with special reference to the stalk and mechanism of yolk deposition, J. Morphol., **119**: 477–502, 1966.

[9] BILIŃSKI S., Ultrastructural studies on the vitellogenesis of *Tetrodontophora bielanensis* (Waga) (*Collembola*), Cell Tiss. Res., **168**: 399–410, 1976.

[10] — Oogenesis in *Acerentomon gallicum Jonescu* (*Protura*). Previtellogenic and *vitellogenic stages*, Cell Tiss. Res., **179**: 401–412, 1977.

[11] — Ultrastructural study of the yolk formation in *Porcellio scaber* Latr. (*Isopoda*), Cytobios (w druku).

[12] — Oogenesis in *Campodea* sp. (*Diplura*). The ultrastructure of egg chamber during vitellogenesis (w druku).

[13] — Ultrastructural studies on oogenesis in *Symphyla*. Previtellogenic and vitellogenic stages (w druku).

[14] BILIŃSKI S., KLAG J., The oogenesis in *Acerentomon gallicum* Jonescu (*Protura*). An ultrastructural analysis of chorion formation, Acta Biol. Crac. Ser. Zool., **20**: 101–106, 1977.

[15] — The ultrastructure of midgut cells in *Acerentomon gallicum* Jonescu (*Protura*), Folia Biol. (w druku).

[16] BILIŃSKI S., PETRYSZAK B., The ultrastructure and function of follicle cells in *Foucartia squamulata* (Herbst) (*Curculionidae*), Cell Tiss. Res., **189**: 347–353, 1978.

[17] BOELSTERLI U., Notes on oogenesis in *Tubularia crocea* Agassiz (*Athecata, Hydrozoa*), Pubbl. Staz. Zool. Napoli 39 Suppl.: 53–66, 1975.

[18] BOTTKE W., Zur Ultrastruktur des Ovars von *Viviparus contectus* (Millet, 1813) (*Gastropoda, Prosobranchia*), II. Die Oocyten, Z. Zellforsch., **138**: 239–259, 1973.

[19] — The fine structure of the ovarian follicle of *Alloteuthis subulata* Lam. (*Mollusca, Cephalopoda*), Cell Tiss. Res., **150**: 463–479, 1974.

[20] BOYER B. C., Ultrastructural studies of differentiation in the oocyte of the polyclad turbellarian, *Prostheceraeus floridanus*, J. Morphol., **136**: 273–296, 1972.

[21] BÜNING J., Development of telotrophic-meroistic ovarioles of polyphage beetles with special reference to the formation of nutritive cords, J. Morphol., **156**: 237–256, 1978.

[22] CANTACUZÈNE A., MARTOJA R., Origine des enclaves vitellines de l'oocyte

http://rcin.org.pl

d'un Insecte *Thysanoure, Petrobius maritimus*, C. R. Acad Sci. Paris, **274**: 1723–1726, 1972.

[23] CASSIDY J. D., KING R. C., Ovarian development in *Habrobracon juglandis* (Ashmed) (*Hymenoptera: Braconidae*). I. The origin and differentiation of the oocyte-nurse cell complex, Biol. Bull., **143**: 483–505, 1972.

[24] COGGESHALL R. E., A cytologic analysis of the bag cell control of egg laying in *Aplysia*, J. Morphol., **132**: 461–486, 1970.

[25] CONE M., SCALZI H., An ultrastructural study of oogenesis in the silverfish, *Lepisma* sp. (*Thysanura*), J. Cell Biol., **35** (2): 163A, 1967.

[26] CUMMINGS M. R., Formation of the vitelline membrane and chorion in developing oocytes of *Ephestia kühniella*, Z. Zellforsch., **127**: 175–188, 1972.

[27] DALLAI R., Spermatozoa and phylogenesis. A few data on *Insecta Apterygota*, Pedobiologia, **14**: 148–156, 1974.

[28] — Fine structure of the pyloric region and *Malpighian papillae* of *Protura* (*Insecta Apterygota*), J. Morphol., **150**: 727–762, 1976.

[29] — Comparative analysis of the hindgut in two species of *Protura* (*Insecta Apterygota*), J. Morphol., **151**: 165–186, 1977.

[30] DHAINAUT A., De LEERSNYDER M., Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire du crabe *Eriocheir sinensis*. I. Ovogenèse naturelle, Arch. Biol. (Bruxelles), **87**: 261–282, 1976.

[31] DUMONT J. N., Oogenesis in the annelid *Enchytraeus albidus* with special reference to the origin and cytochemistry of yolk, J. Morphol., **129**: 317–343, 1969.

[32] DUMONT J. N., ANDERSON E., Vitellogenesis in the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, J. Microscopie, **6**: 791–806, 1967.

[33] ECKELBARGER K. J., A light and electron microscope investigation of gametogenesis in *Nicolea zostericola* (*Polychaeta*: *Terebellidae*), Mar. Biol., **30**: 353–370, 1975.

[34] EMANUELSSON H., Electronmicroscopical observations on yolk and yolk formation in *Ophryotrocha labronica* La Greca and Baci, Z. Zellforsch., **95**: 19–36, 1969.

[35] EURENIUS L., An electron microscope study on the developing oocytes of the crab *Cancer pagurus* L. with special reference to yolk formation (*Crustacea*), Z. Morph. Tiere, **75**: 243–254, 1973.

[36] FAVARD-SÉRÉNO C., Phénomène de pinocytose au cours de la vitellogénèse protéique chez le Grillon (Orthoptère), J. Microscopie, **3**: 323–338, 1964.

[37] — Cycles sécrétoires successifs au cours de l'élaboration des enveloppes de l'ovocyte chez le Grillon (Insecte, Orthoptère). Rôle de l'appareil de Golgi, J. Microscopie, **11**: 401–424, 1971.

[38] FAVARD P., CARASSO N., Origine et ultrastructure des plaquettes vitellines de la Planorbe, Arch. Anat. Micr. Morph. Exp., **47**: 211–234, 1958.

[39] FISCHER A., The structure of symplasmic early oocytes and their enveloping sheath cells in the polychaete, *Platynereis dumerilii*, Cell Tiss. Res., **160**: 327–343, 1975.

[40] FISCHER A., WEIGELT K. R., Strukturelle Beziehungen zwischen jungen Oocyten und somatischen Zellen bei den Anneliden *Platynereis* und *Piscicola*, Verh. dtsch. Zool. Ges., **67**: 319–323, 1975.

[41] GIORGI F., JACOB J., Recent findings on oogenesis of *Drosophila melanogaster*. II. Further evidence on the origin of yolk platelets, J. Embryol. Exp. Morphol., **38**: 125–138, 1977.

http://rcin.org.pl

[42] HALTON D. W., STRANOCK S. D., HARDCASTLE A., Fine structural observations on oocyte development in monogeneans, Parasitology, **73**: 13–23, 1976.
[43] HERBAUT C., Nature et origine des réserves vitellines dans l'ovocyte de *Lithobius forficatus* L. (*Myriapode Chilopode*), Z. Zellforsch., **130**: 18–27, 1972.
[44] HINSCH G. H., CONE M. V., Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab *Libinia emarginata,* J. Cell Biol., **40**: 336–342, 1969.
[45] HUEBNER E., ANDERSON E., A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus.* II. Oocyte differentiation, J. Morphol., **137**: 385–416, 1972.
[46] — Comparative spiralian oogenesis — structural aspects: an overview, Amer. Zool., **16**: 315–343, 1976.
[47] HUEBNER E., TOBE S. S., DAVEY K. G., Structural and functional dynamics of oogenesis in *Glossina austeni*: general features, previtellogenesis and nurse cells, Tissue Cell, **7**: 297–317, 1975.
[48] — Structural and functional dynamics of oogenesis in *Glossina austeni:* vitellogenesis with special reference to the follicular epithelium, Tissue Cell, **7**: 535–558, 1975.
[49] JARVIS J. H., KING P. E., Reproduction and development in the pycnogonid *Pycnogonum littorale,* Mar. Biol., **13**: 146–154, 1972.
[50] — Egg development and the reproductive cycle in the pycnogonid *Endeis laevis,* Mar. Biol., **33**: 331–339, 1975.
[51] JONG-BRINK M., de WIT A., KRAAL G., BOER H. H., A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata,* Cell Tiss. Res., **171**: 195–219, 1976.
[52] KESSEL R. G., Some observations on the ultrastructure of the oocyte of *Thyone briareus* with special reference to the relationship of the Golgi complex and endoplasmic reticulum in the formation of yolk, J. Ultrastruct. Res., **16**: 305–319, 1966.
[53] — Electron microscope studies on the origin and maturation of yolk in oocytes of the tunicate, *Ciona intestinalis,* Z. Zellforsch., **71**: 525–544, 1966.
[54] — Electron microscope studies on developing oocytes of a coelenterate medusa with special reference to vitellogenesis, J. Morphol., **126**: 211–248, 1968.
[55] — Mechanism of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocytes, Z. Zellforsch., **89**: 17–38, 1968.
[56] — Cytodifferentiation in *Rana pipiens oocyte.* II. Intramitochondrial yolk, Z. Zellforsch., **112**: 313–332, 1971.
[57] KESSEL R. G., BEAMS H. W., Electron microscope studies on developing oocytes of the lobster, *Homarus,* with special reference to the method of yolk formation, J. Cell Biol., **19** (2): 87A, 1963.
[58] — Micropinocytosis and yolk formation in the oocytes of the small milkweed bug, Exper. Cell Res., **30**: 440–443, 1963.
[59] KING P. E., FORDY M. R., The formation of "accessory nuclei" in developing oocytes of the parasitoid hymenopterans *Ophion luteus* (L.) and *Apantales glomeratus* (L.), Z. Zellforsch., **109**: 158–170, 1970.
[60] KING P. E., RAFAI J., RICHARDS J. G., Formation of protein yolk in the eggs of a parasitoid hymenopteran, *Nasonia vitripennis* (Walker) (*Pteromalidae: Hym*), Z. Zellforsch., **123**: 330–336, 1972.
[61] KING P. E., RATCLIFFE N. A., FORDY M. R., Oogenesis in a braconid *Apantales glomeratus* (L.) possessing an hydropic type of egg, Z. Zellforsch., **119**: 43–57, 1971.

http://rcin.org.pl

[62] KING R. C., Ovarian development in *Drosophila melanogaster*, *Academic* Press, New York, 1970.
[63] KLAG J., Oogenesis in *Acerentomon gallicum* Jonescu (*Protura*). An ultrastructural analysis of the early previtellogenic stages, Cell Tiss. Res., **189**: 365–374, 1978.
[64] KLAG J., BILIŃSKI S., The ultrastructure of thorax cuticle of *Acerentomon gallicum* Jonescu (*Protura*), Acta Biol. Crac. ser. Zool., **20**: 11–16, 1977.
[65] KOŚCIELSKI B., KOŚCIELSKA M. K., SZROEDER J., Ultrastructure of the polygerm of *Ageniaspis fuscicollis* Dalm. (*Chalcidoidea*, *Hymenoptera*), Zoomorphologie, **89**: 279–288, 1978.
[66] KRZYSZTOFOWICZ A., Histochemical and autoradiographic analysis of *RNA* synthesis in trophic cells of the female gonad in *Tetrodontophora bielanensis* (Waga) (*Collembola*), Acta Biol. Crac. ser. Zool., **14**: 299–305, 1971.
[67] KSIĄŻKIEWICZ-ILIJEWA M., Ultrastructural study of the oocytes of *Gromphadorhina brauneri* (Shelf.) (*Blattodea*) with special reference to yolk formation, Acta Biol. Crac. ser. Zool., **20**: 237–244, 1977.
[68] MASSOVER W. H., Intramitochondrial yolk-crystals of frog oocytes. I. Formation of yolk-crystal inclusions by mitochondria during bullfrog oogenesis. J. Cell Biol., **48**: 266–280, 1971.
[69] MATSUZAKI M., Electron microscopic studies on the oogenesis of dragonfly and cricket with special reference to the panoistic ovaries, Dev. Growth Differ. **13**: 379–398, 1971.
[70] — Oogenesis in adult net-spinning caddisfly: *Parastenopsyche sauteri* (*Trichoptera, Stenopsychidae*), as revealed by electron microscopic observation, Sci. Rep. Fukushima Univ., **22**: 27–40, 1972.
[71] — Ultrastructural changes in developing oocytes, nurse cells, and follicular cells during oogenesis in the telotrophic ovarioles of *Bothrogonia japonica* Ishihara (*Homoptera, Tettigellidae*), Kontyû, **43**: 75–90, 1975.
[72] MATSUZAKI M., ANDO H., Ovarian structures of the adult alderfly, *Sialis mitsuhashii* Okamoto (*Megaloptera*: *Sialidae*), Int. J. Insect Morphol. Embryol., **6**: 17–29, 1977.
[73] MOKHTAR-MAAMOURI F., ŚWIDERSKI Z., Vitellogénèse chez *Echemeibothrium beauchampi* Euzet, 1959 (*Cestoda*: *Tetraphyllidea, Phyllobothriidae*), Z. Parasitenk., **50**: 293–302, 1976.
[74] NARDON P., Contribution à l'étude de la constitution et de l'évolution cytochimique du globule vitellin et discussion sur le rôle des cellules folliculeuses, Ann. Zool. Ecol. anim., **3**: 401–409, 1971.
[75] NEWTON D. W., The accessory cell and yolk halo of the oocyte of the freshwater turbellarian *Hydrolimax grisea* (*Platyhelminthes*; *Plagiostomidae*), Biol. Bull., **147**: 618–629, 1974.
[76] NØRREVANG A., Electron microscopic morphology of oogenesis, Int. Rev. Cytol., **23**: 114–187, 1968.
[77] OSAKI H., Electron microscope studies on the oocyte differentiation and vitellogenesis in the liphistiid spider, *Heptathela kimurai*, Annot. Zool. Japon., **44**: 185–209, 1971.
[78] — Electron microscope studies on developing oocytes of the spider, *Plexippus paykulli*, Annot. Zool. Japon., **45**: 187–200, 1972.
[79] RAMAMURTY P. S., Growth and differentiation of the follicle epithelium

http://rcin.org.pl

in relation to vitellogenesis in *Panorpa communis* L. (*Mecoptera, Insecta*), La Cellule, **68**: 79–94, 1970.

[80] REGER J. F., A study on the origin and fine structure of yolk granules in oocytes of the arachnid, *Leiobunum* sp. (*Phalangid; Harvestman*), J. Submicr. Cytol., **2**: 1–12, 1970.

[81] ROTH T. F., PORTER K. R., Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L., J. Cell Biol., **20**: 313–332, 1964.

[82] SCHEURER R., Haemolymph proteins and yolk formation in the cockroach, *Leucophaea maderae*, J. Insect Physiol., **15**: 1637–1682, 1969.

[83] SELMAN K., ARNOLD J. M., An ultrastructural and cytochemical analysis of oogenesis in the squid, *Loligo pealei*, J. Morphol., **152**: 381–400, 1977.

[84] STAY B., Protein uptake in the oocytes of the *Cecropia moth*, J. Cell Biol., **26**: 49–62, 1965.

[85] ŚWIDERSKI Z., MACKIEWICZ J. S., Electron microscope study of vitellogenesis in *Glaridacris catostomi* (*Cestoidea*: *Caryophyllidea*), Int. J. Parasitol., **6**: 61–73, 1976.

[86] SWIDERSKI Z., MOKHTAR F., Etude de la vitellogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (*Cestoda*: *Pseudophyllidea*), Z. Parasitenk., **43**: 135-149, 1974.

[87] TARDENT P., Gametogenesis in the genus *Hydra*, Amer. Zool., **14**: 447–456, 1974.

[88] TAYLOR G. T., ANDERSON E., Cytochemical and fine structural analysis of oogenesis in the gastropod *Ilyanassa obsoleta*, J. Morphol., **129**: 211–248, 1969.

[89] TERAKODO K., Origin of yolk granules and their development in the snail, *Physa acuta*, J. Electron Microsc., **23**: 99–106, 1974.

[90] WĘGLARSKA B., Electron microscope study of previtellogenesis and vitellogenesis in *Macrobiotus richtersii* J. Murr. (*Eutardigrada*), Zesz. Nauk. UJ, Zool. (w druku).

[91] ZERBIB C., Contribution à l'étude ultrastructurale de l'ovocyte chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarella* Pallas, C. R. Acad. Sc. Paris, **277**: 1209–1212, 1973.

[92] — Endocytose ovocytaire chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Démonstration par la peroxydase, C. R. Acad. Sc. Paris, **284**: 757–760, 1977.

Otrzymano: 10 kwietnia 1979.
Przyjęto: 10 maja 1979.

Adres autora: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 4, 1979 (267 - 282)

PROTEINAZY KOMÓREK DROŻDŻOWYCH I ICH INHIBITORY

PROTEINASES OF YEAST CELLS AND THEIR INHIBITORS

Krzysztof WOROWSKI

Zakład Chemii Analitycznej Instytutu Biochemii
i Analityki Medycznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Drożdże piekarskie wytwarzają enzymy proteolityczne o różnej specyficzności substratowej i różnych optimach pH. W komórkach drożdży syntetyzowane są również inhibitory tych enzymów. Proteinazy zlokalizowane są w wakuolach komórek drożdżowych, natomiast inhibitory występują we frakcji cytozolowej. Rola biologiczna proteinaz drożdżowych polega na dokonywaniu całkowitej i ograniczonej proteolizy białek. Szybkość tych procesów zależy w znacznym stopniu od dostępności i stężenia inhibitorów.

Summary. Baker's yeast produces proteolytic enzymes of differing substrate specyficity and different pH optima. In the yeast cell the inhibitors of these are also synthesized. The proteinases are localized in the yeast cell vacuoles, whereas the inhibitors occur in the cytosole fraction. The biological role of yeast proteinases consists in the complete and limited proteolysis of proteins. The speed of these processes depends to a large extent on the availability and concentration of the inhibitors.

Początek badań nad proteinazami wytwarzanymi przez drożdże piekarskie (*Saccharomyces cerevisiae*) datuje się od 1917 r. [11]. Natomiast pierwsze doniesienia dotyczące inhibitorów proteinaz drożdżowych pochodzą z lat sześćdziesiątych [49].

Zarówno proteinazy drożdżowe, jak i ich inhibitory są białkami, które wyizolowano w jednorodnej postaci, poznano ich właściwości fizykochemiczne, centra aktywne, specyficzność działania i stałe kinetyczne zachodzących z ich udziałem reakcji, a badania nad ich strukturą chemiczną są daleko zaawansowane.

Zainteresowania proteinazami i inhibitorami wytwarzanymi w komórkach drożdży piekarskich wynikają z możliwości prowadzenia badań

http://rcin.org.pl

modelowych nad znaczeniem biologicznym i mechanizmami regulacji proteolizy wewnątrzkomórkowej.

PROTEINAZY DROŻDŻOWE

Komórki drożdży wytwarzają szereg proteinaz różniących się specyficznością substratową i optimami pH [21, 29, 60]. Do proteinaz drożdżowych należy proteinaza A (EC 3.4.23.8) i proteinaza B (EC 3.4.22.9) oraz karboksypeptydazy i aminopetydazy. Spośród karboksypeptydaz występujących w drożdżach należy wymienić karboksypeptydazę Y (EC 3.4. 12.1), która jest opisywana w literaturze również jako proteinaza C, oraz karboksypeptydazę S. Aminopeptydazy drożdżowe stanowi natomiast aminopeptydaza I (EC 3.4.11.1) i aminopeptydaza II. W pełnym homogenacie komórek drożdżowych proteinazy ujawniają tylko część swej aktywności proteolitycznej, gdyż są blokowane przez inhibitory [47, 50]. Kompleksy enzymów z inhibitorami są trwałe w pH = 7,0. Uwalnianie proteinaz od inhibitorów następuje w pH = 5,0 [43, 45, 60].

Przegląd metod izolowania i oczyszczania proteinaz drożdżowych znajduje się w tabeli 1.

P r o t e i n a z a A jest endoproteinazą. Ciężar cząsteczkowy tego enzymu wynosi 42000 [35]. Punkt izoelektryczny proteinazy A znajduje

TABELA 1

Przegląd metod izolowania i oczyszczania proteinaz drożdżowych

Proteinaza	Metody frakcjonowania i oczyszczania	Oczyszczenie (X)	Literatura
proteinaza A	aktywacja ekstraktu z drożdży w pH = 5,0, frakcjonowanie siarczanem amonu, chromatografia na DEAE-Sephadexie A-50, chromatografia powinowactwa	260	[35]
proteinaza B	aktywacja ekstraktu z drożdży w pH = 5,0, frakcjonowanie przez zakwaszenie, chromatografia na QAE-Sephadexie A-25, SP-Sephadexie C-50 i chromatografia powinowactwa, sączenie na Sephadexie G-100	1900	[61]
kroteinaza C (karbopsypeptydaza Y)	aktywacja ekstraktu z drożdży w pH = 5,0, frakcjonowanie siarczanem amonu, chromatografia na DEAE-celulozie i na DEAE-Sephadexie A-50	450	[27]
aminopeptydaza I	frakcjonowanie siarczanem amonu, chromatografia na Sephadexie G-150, DEAE-celulozie i Sepharozie 6B	922	[54]

http://rcin.org.pl

się w pH = 3,5–4,0. Enzym ten nie traci aktywności w temperaturze 45° C w pH = 5,0 w ciągu 30 minut. Jest natomiast nietrwały w pH zasadowym nawet w temperaturze laboratoryjnej. Proteinaza A degraduje kazeinę i zdenaturowaną hemoglobinę w pH = 2–3 [29]. Ze względu na hamowanie aktywności proteinazy A przez ester metylowy dwuazoacetylo-D, L-norleucyny (DAN) i przez pepstatynę wnosi się, że posiada ona karboksylowe centrum aktywne [44].

P r o t e i n a z a B jest również endoproteinazą. Posiada ona masę cząsteczkową 31000 [61]. Ustalono skład aminokwasowy tego enzymu i określono aminokwasy tworzące jego centrum aktywne, które stanowi seryna i cysteina [21]. Aktywność proteinazy B jest hamowana przez dwuizopropylofluorofosforan, p-chlorortęciobenzoesan, a także przez chymostatynę i antypainę [44]. Proteinaza B wykrzepia mleko w pH = 6,2, kazeinę hydrolizuje najintensywniej w pH = 9,0, a estry etylowe acetylotyrozyny i benzoiloargininy rozkłada w pH = 8,0. Aktywność proteinazy B oznacza się najczęściej przy użyciu azokolu jako substratu [60].

P r o t e i n a z a C (karboksypeptydaza Y) posiada masę cząsteczkową 61000. Enzym ten zawiera 2,7% glukozaminy i 14,1% mannozy [12, 19]. Drożdże hodowane w obecności tunikamycyny syntetyzują proteinazę C o masie cząsteczkowej 51000, nie zawierającą składników węglowodanowych [19]. Ustalono skład aminokwasowy proteinazy C i stwierdzono, że enzym ten zawiera 11 reszt cysteiny, z których jedna jest wolna. N-końcową sekwencję aminokwasów stanowi Lys-Ile-Lys-Asp-Pro-Lys-Ile-Leu-Gly-Ile-Asp-Pro [41], a w C-końcowym fragmencie cząsteczki znajduje się sekwencja złożona z -Asp-Ser-Tyr-Leu [27]. W centrum aktywnym tego enzymu znajduje się seryna, histydyna i cysteina [22–25]. Centrum aktywne proteinazy C nie zawiera kationu metalu. Po znakowaniu proteinazy C za pomocą ^{32}P-dwuizopropylofluorofosforanu i degradacji pepsyną wyizolowano fragment peptydowy zbudowany z 15 aminokwasów zawierający serynę centrum aktywnego. Sekwencja aminokwasów tego fragmentu jest następująca: -His-Ile-Ala-Gly-Glu-Ser-Tyr-Ala-His-Gly-Tyr-Ile-Pro-Val-Phe- [28]. Proteinaza C jest enzymem o szerokiej specyficzności. Odszczepia ona C-końcowe aminokwasy aromatyczne, obojętne, kwaśne i zasadowe, jak również C-końcową resztę proliny [27, 41]. Hydrolizuje ona także N-acetylowane peptydy, estry aminokwasów i amidy [23].

Innym enzymem komórek drożdżowych odszczepiającym aminokwasy C-końcowe jest karboksypeptydaza S [67, 68]. Karboksypeptydaza S jest metaloenzymem inaktywowanym przez związki chelatujące.

A m i n o p e p t y d a z a I jest glikoproteidem zawierającym 12% cukrów [54]. Charakteryzuje się dużą stabilnością nawet w znacznych

http://rcin.org.pl

rozcieńczeniach. Masa cząsteczkowa tego enzymu wynosi 600000, a jego punkt izoelektryczny znajduje się w pH = 4,7. Cząsteczka aminopeptydazy I zbudowana jest z 12 podjednostek. Aminopeptydaza I jest metaloenzymem zawierającym kation Zn^{+2}, w związku z tym jest inaktywowana związkami chelatującymi. Jony chlorkowe i bromkowe aktywują ten enzym poprzez wywołanie dodatniego efektu allosterycznego [54]. Aminopeptydaza I odszczepia N-końcowe aminokwasy od peptydów i białek. Hydrolizuje także leucynoamid i leucyno-p-nitroanilid [54].

Aminopeptydaza II, jest również metaloenzymem [16, 26]. Masa cząsteczkowa aminopeptydazy II wynosi 34000. Enzym ten różni się od aminopeptydazy I również specyficznością działania.

Skład aminokwasowy proteinazy B, proteinazy C i aminopeptydazy I podano w tabeli 2.

TABELA 2

Skład aminokwasowy proteinaz drożdżowych

Aminokwas	Proteinaza B [61]	Karboksypeptydaza Y (proteinaza C) [27]	Aminopeptydaza I* [54]
Asx	29,5	65	45
Thr	17,9	18	23
Ser	21,9	30	29
Glx	14,2	41	36
Pro	8,6	25	21
Gly	8,8	34	38
Ala	26,6	25	28
Cys	0,9	11	4
Val	11,0	30	25
Met	2,0	7	5
Ile	8,6	20	21
Leu	17,4	37	39
Tyr	7,1	24	15
Phe	7,2	27	22
Lys	15,0	19	27
His	5,6	9	11
Arg	5,6	9	15
Trp	1,7	11	2
suma aminokwasów	209—210	442	406

* Skład aminokwasowy jednej podjednostki.

Przegląd właściwości proteinaz drożdżowych przedstawiono w tabeli 3.

http://rcin.org.pl

TABELA 3

Charakterystyka proteinaz drożdżowych [35]

Proteinaza	Centrum aktywne	Masa cząsteczkowa	Specyficzny nhibitor	Lokalizacja wewnątrzkomórkowa
proteinaza A	karboksylowe	42000	I_2^A, I_3^A	wakuole
proteinaza B	serynowe	31000	I_1^B, I_2^B	
karboksypeptydaza Y (proteinaza C)	serynowe	61000	I^C	
aminopeptydaza I	metaloenzym (Zn^{+2})	600000	?	

INHIBITORY PROTEINAZ KOMÓREK DROŻDŻY

Drożdże piekarskie syntetyzują inhibitory hamujące aktywność proteinaz występujących w tych komórkach. Opisano inhibitory proteinazy drożdżowej A, B i C. Inhibitory te charakteryzuje znaczna heterogenność molekularna. Przegląd metod izolowania i oczyszczania inhibitorów proteinaz drożdżowych podany jest w tabeli 4.

W ekstrakcie z drożdży wykazano trzy inhibitory proteinazy A, które oznaczono symbolami I_1^A, I_2^A i I_3^A [62]. Inhibitory I_2^A i I_3^A wyizolowano w postaci homogennej i podano ich charakterystykę fizykochemiczną [57]. Punkt izoelektryczny inhibitora I_2^A leży w pH = 5,7, a inhibitora I_3^A —

TABELA 4

Przegląd metod izolowania i oczyszczania inhibitorów wytwarzanych przez komórki drożdży

Inhibitor	Metody frakcjonowania i oczyszczania	Oczyszczanie (X)	Literatura
Inhibitory proteinazy A	frakcjonowanie w podwyższonej temperaturze, kwasem trójchlorooctowym i etanolem, chromatografia na SP-Sephadexie C-25 i QAE-Sephadexie A-25, elektroforeza preparatywna w żelu poliakrylamidowym	I_2^A — 52 I_3^A — 98	[62]
Inhibitory proteinazy B	frakcjonowanie w podwyższonej temperaturze, kwasem trójchlorooctowym i etanolem, chromatografia na DEAE-Sephadexie A-50, Sephadexie G-75, QAE-Sephadexie A-25 i SP-Sephadexie C-25	I_1^B — 151 I_2^B — 78	[4]
Inhibitor proteinazy C (karboksypeptydazy Y)	frakcjonowanie protaminą, acetonem i przez zakwaszenie, chromatografia na DEAE-Sephadexie A-50, hydroksyapatycie i Sephadexie G-75	I^C — 890	[51]

http://rcin.org.pl

w pH = 6,3. Inhibitory proteinazy A są białkami o masie cząsteczkowej 23000, zbudowanymi z czterech podjednostek o masie 6000 każda. Kompleks proteinazy A z inhibitorem I^A posiada masę cząsteczkową 48000 [62]. Ponieważ masa cząsteczkowa proteinazy A wynosi 42000, wnosi się, że tworzenie kompleksu enzymu z inhibitorem powoduje rozbicie struktury podjednostkowej, w wyniku czego enzym ten łączy się tylko z jedną podjednostką I^A.

Inhibitory proteinazy B są również heterogenne i występują w dwóch formach molekularnych oznaczonych I_1^B i I_2^B. Są one białkami o masach cząsteczkowych 9000–10000 [4]. N-końcowym aminokwasem obu inhibitorów jest treonina. Punkt izoelektryczny inhibitora I_1^B znajduje się w pH = 8,0, a inhibitora I^B — w pH = 7,0. Znaczne różnice wartości pH punktów izoelektrycznych spowodowane są różnicami stosunku aminokwasów kwaśnych do ich amidów. Inhibitor I_1 zawiera więcej amidów aminokwasów kwaśnych niż I_2^B [4, 7]. Potraktowanie inhibitora I_1^B kwasem powoduje odszczepienie grup amidowych i obniżenie pH punktu izoelektrycznego. Obniżenie pH punktu izoelektrycznego inhibitora I_2^B z 7,0 do 6,6 uzyskano również po nitrowaniu tyrozyny wchodzącej w skład tego inhibitora za pomocą czteronitrometanu [7]. Nitrowanie obniża ponadto stałą wiązania inhibitora I_2^B z proteinazą B z $3{,}9\times10^9$ M^{-1} dla inhibitora natywnego do $3{,}2\times10^8$ M^{-1} dla inhibitora zmodyfikowanego. Efekt ten umożliwił zastosowanie zmodyfikowanego inhibitora I_2^B związanego ze stałym nośnikiem do izolowania proteinazy B metodą chromatografii powinowactwa. Inhibitor nie zmodyfikowany, ze względu na wysoką siłę wiązania uniemożliwiającą elucję z kolumny, nie nadaje się do tego celu. Rozdysocjonowanie kompleksu enzymu z natywnym inhibitorem, połączone jednak z denaturacją enzymu, można osiągnąć dopiero przez 10-minutową inkubację w temperaturze 100° C lub 1-godzinną inkubację w pH = 10,0 w temperaturze 25° C [46].

Inhibitor proteinazy C nie wykazuje heterogenności molekularnej. Masa cząsteczkowa tego inhibitora wynosi 25000 [51]. W odróżnieniu od inhibitorów I^A i I^B jest on wrażliwy na podwyższoną temperaturę i zakwaszenie [51]. Punkt izoelektryczny inhibitora proteinazy C znajduje się w pH = 6,6.

Skład aminokwasowy drożdżowych inhibitorów proteinaz podany jest w tabeli 5. Interesującym faktem jest brak argininy, cysteiny i tryptofanu w strukturze tych inhibitorów. Ponadto inhibitor I_3^A nie zawiera proliny, a inhibitory I_1^B i I_2^B nie zawierają metioniny [35]. Na podkreślenie zasługują bardzo małe różnice w składzie aminokwasowym inhibitorów I_1^B i I_2^B. Wszystkie inhibitory zawierają duże ilości aminokwasów polarnych, takich jak lizyna, kwas asparaginowy i kwas glutaminowy oraz ich amidy.

http://rcin.org.pl

TABELA 5

Skład aminokwasowy drożdżowych inhibitorów proteinaz

Aminokwas	Liczba reszt aminokwasowych w cząsteczce inhibitora		
	I_3^A [35]	I_1^B [30]	I_2^B [35]
Asx	10	12	12
Thr	3	6	5
Ser	6	3	2
Glx	13	7	7
Pro	0	2	2
Gly	5	3	3
Ala	5	2	2
Val	2	10	8
Ile	1	6	5
Leu	2	5	6
Tyr	2	1	1
Phe	2	3	3
Lys	13	12	11
His	2	6	6
Arg	0	0	0
Met	2	0	0
Cys	0	0	0
Trp	0	0	0
suma aminokwasów	68	78	73

TABELA 6

Charakterystyka drożdżowych inhibitorów proteinaz [33, 36]

Inhibitor	Punkt izoelektryczny	Aminokwas N-końcowy	Masa cząsteczkowa	Stabilność	Lokalizacja
I_2^A	5,7	?	23000	termo- i kwasostabilny	cytozol
I_3^A	6,3	?	(4 × 6000)		
I_1^B	8,0	Thr	9000 – 10000		
I_2^B	7,0	Thr			
I^C	6,6	?	27000	termo- i kwasolabilny	

Szczegółowa charakterystyka inhibitorów proteinaz drożdżowych podana jest w tabeli 6.

Inhibitory drożdżowe charakteryzują się wysoką specyficznością działania antyproteolitycznego (tabela 7). Inhibitor I_2^A i I_3^A hamuje aktywność proteinazy A, lecz nie hamuje aktywności proteinazy B i C oraz pepsyny. Inhibitor I_1^B i I_2^B hamuje aktywność proteinazy B, ale nie działa

http://rcin.org.pl

TABELA 7

Wzajemne oddziaływania inhibitorów i proteinaz drożdżowych [30, 36]

Inhibitor	Proteinaza inhibowana			Proteinaza inaktywująca		
	A	B	C	A	B	C
I^A	+	−	−	−	+	−
I^B	−	+	−	+	−	−
I^C	−	−	+	+	+	−

+ − efekt inhibicyjny lub inaktywacja.

na proteinazę A i C oraz trypsynę. Natomiast inhibitor I^C hamuje aktywność proteinazy C, lecz pozostaje bez wpływu na aktywność proteinazy A i B oraz karboksypeptydazy A i B syntetyzowanej przez trzustkę [30]. Również inaktywacja inhibitorów drożdżowych jest procesem specyficznym. Inhibitor proteinazy A jest inaktywowany przez proteinazę B. Inhibitor proteinazy B jest inaktywowany przez proteinazę A. Natomiast inhibitor proteinazy C jest inaktywowany przez proteinazę A i proteinazę B [36, 51].

BIOLOGICZNE FUNKCJE PROTEINAZ DROŻDŻOWYCH I ICH INHIBITORÓW

Zadaniem biologicznym proteinaz drożdżowych jest wewnątrzkomórkowa degradacja białek, w tym także białek enzymatycznych. Ze względu na liczbę rozszczepianych wiązań peptydowych wyróżnia się proteolizę całkowitą i ograniczoną.

Proteoliza całkowita jest procesem niespecyficznym, odbywa się ona w wakuolach i dokonywana jest przez szereg enzymów proteolitycznych uzupełniających się nawzajem w działaniu na białka. Celem tego procesu jest likwidacja białek zużytych lub zbędnych i dostarczenie materiału aminokwasowego do syntezy nowych białek. Proces ten może zachodzić dzięki oddzieleniu przestrzennemu proteinaz od inhibitorów (tabela 8). Rozfrakcjonowanie homogenatu komórek drożdżowych za pomocą

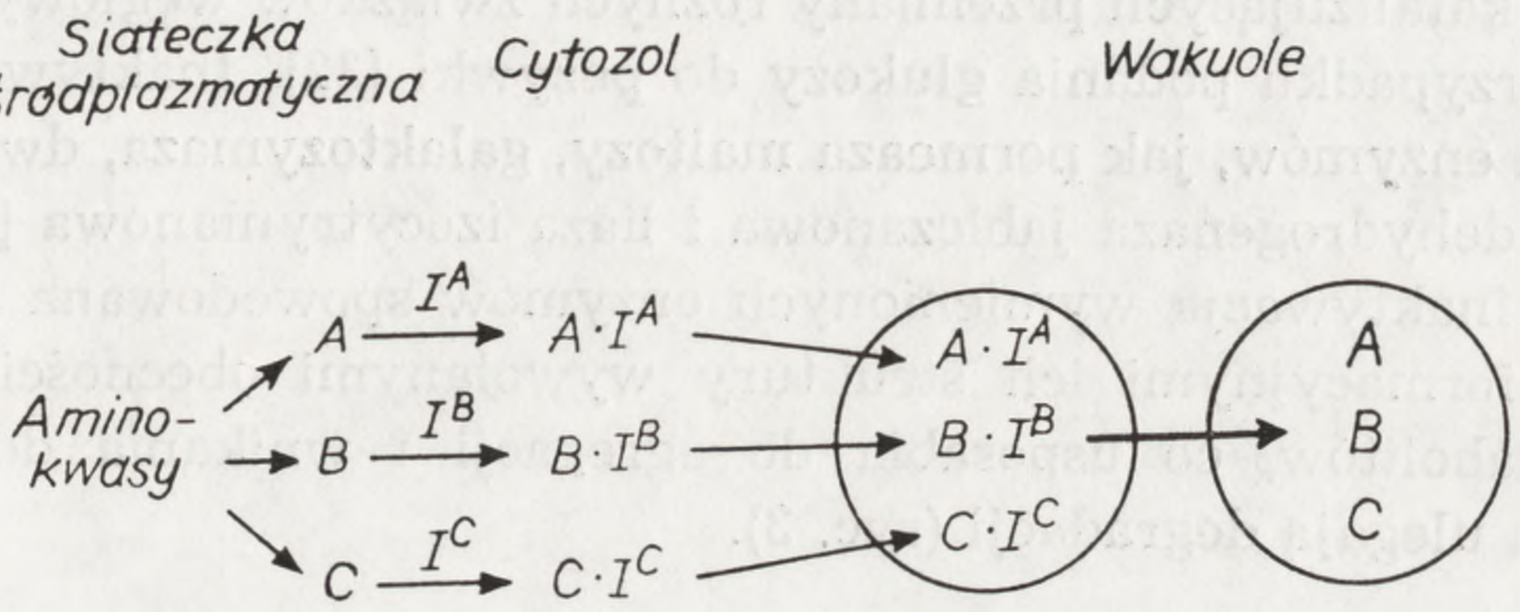
TABELA 8

Rozmieszczenie proteinaz i ich inhibitorów w podfrakcjach komórek drożdżowych [47]

Podfrakcja	Proteinazy, inhibitory (j/g białka)					
	A	I^A	B	I^B	C	AP
całe komórki	1880	3120	280	7200	1280	700
frakcja wakuoli	36400	0	12600	0	19000	3380
frakcja rozpuszczalna (cytozol)	0	4020	0	8900	—	—

http://rcin.org.pl

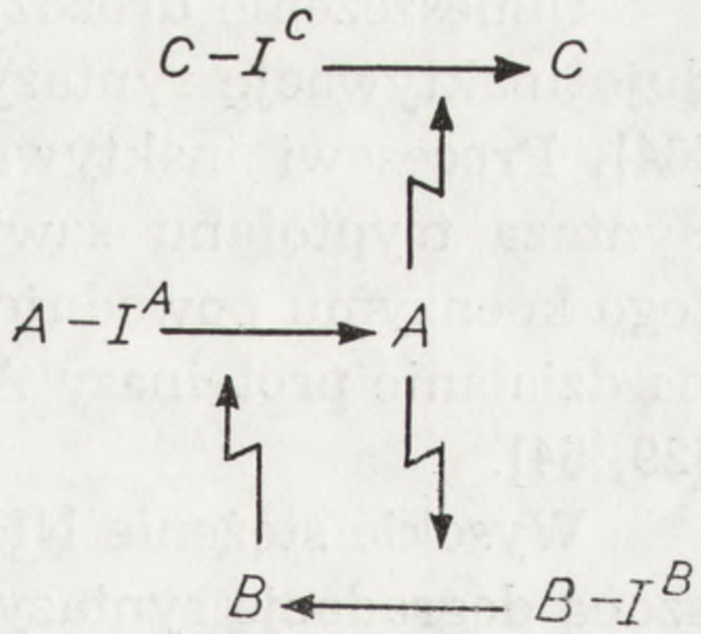
wirowania przy 40000 *g* w ciągu 20 minut według Indige [37] pozwoliło stwierdzić, że proteinazy zlokalizowane są we frakcji wakuoli, a ich inhibitory — we frakcji cytozolowej [4, 14, 18, 50, 53]. Spostrzeżenie to potwierdzono techniką immunoprecypitacji inhibitorów. Na okres trans-



Ryc. 1. Transport proteinaz drożdżowych z siateczki śródplazmatycznej do wakuoli [36]

A, B, C — proteinaza A, B i C; I^A, I^B, I^C — specyficzne inhibitory tych enzymów

portu z miejsca syntezy, jakim jest siateczka śródplazmatyczna, do wakuoli, proteinazy są najprawdopodobniej wiązane z występującymi w cytoplazmie inhibitorami (ryc. 1). Dzięki temu nie mogą degradować i inaktywować białek enzymatycznych cytoplazmy. Przedostające się do wakuoli proteinazy w postaci nieaktywnych kompleksów z inhibitorami są aktywowane autokatalitycznie według schematu przedstawionego na ryc. 2. Inicjatorami aktywacji są śladowe ilości aktywnej proteinazy A lub B, które są w stanie uruchomić cały system proteolityczny komórki drożdżowej. Uczynnienie proteinaz polega na inaktywacji inhibitorów [2, 20, 26].



Ryc. 2. Autokatalityczna aktywacja proteinaz drożdżowych [62]

Objaśnienia jak pod ryc. 1

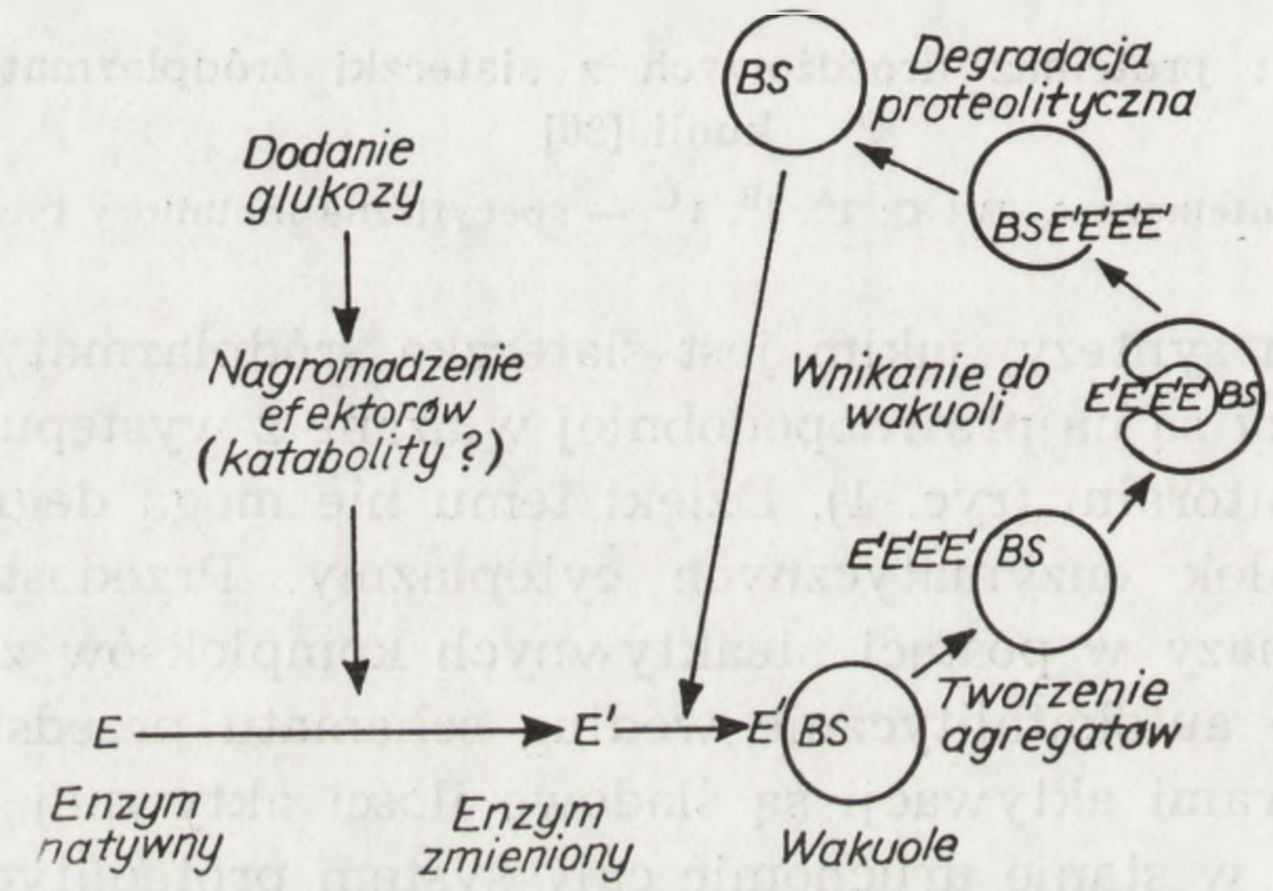
Tempo proteolizy wewnątrzwakuolarnej zależy od składu pożywki, warunków w jakich prowadzona jest hodowla i fazy wzrostu komórek drożdżowych [1, 3, 5, 6, 16, 31, 48]

W okresie pączkowania komórek drożdżowych aktywność proteinaz

http://rcin.org.pl

wzrasta 10–25-krotnie, a około 30% białek ulega degradacji, dzięki czemu rozmnażająca się komórka uzyskuje materiał do syntezy białek [40].

Enzymy proteolityczne drożdży dokonują inaktywacji enzymów zbędnych w określonych warunkach hodowli. Dotyczy to m. in. inaktywacji enzymów katalizujących przemiany różnych związków węglowych w glukozę, w przypadku podania glukozy do pożywki [32]. Inaktywacja dotyczy takich enzymów, jak permeaza maltozy, galaktozymaza, dwufosfataza fruktozy, dehydrogenaza jabłczanowa i liaza izocytrynianowa [36]. Przyspieszona inaktywacja wymienionych enzymów spowodowana jest zmianami konformacyjnymi ich struktury wywołanymi obecnością glukozy i jej metabolitów, co usposabia do agregacji i wnikania do wakuoli, w których ulegają degradacji (ryc. 3).



Ryc. 3. Stymulacja przez efektory zmian cząsteczek enzymów usposabniających do wnikania do wakuoli i proteolizy [33]

E — enzymy natywne; E' — enzymy zmienione; BS — miejsce wiążące enzymy zmienione

Umieszczenie drożdży w podłożu bez składników odżywczych powoduje inaktywację syntazy tryptofanu, której dokonuje proteinaza A i B [64]. Procesowi inaktywacji zapobiegają inhibitory tych enzymów [13]. Syntaza tryptofanu zawiera jako koenzym fosforan pirydoksalu. Brak tego koenzymu powoduje 9-krotny wzrost podatności syntazy tryptofanu na działanie proteinazy A i 3-krotny wzrost — na działanie proteinazy B [29, 64].

Wysokie stężenie NH_3 lub glutaminy w pożywce powoduje przyspieszoną degradację syntazy glutaminianowej [31].

Proteoliza ograniczona polega na rozszczepieniu jedynie jednego lub nielicznych wiązań peptydowych w cząsteczce i jest dokonywana przez enzymy proteolityczne o wysokiej specyficzności. Proces ten odbywa się lokalnie w różnych strukturach komórkowych, a jego celem jest najczęściej aktywacja lub unieczynnienie enzymów [34].

http://rcin.org.pl

W tabeli 9 przedstawiono wyniki działania proteinazy A, B i C na enzymy zawarte w surowym ekstrakcie drożdżowym. Spektrum działania poszczególnych proteinaz na enzymy ekstraktu drożdżowego różni się znacznie. Niektóre proteinazy nie działają na określony enzym, inne zaś powodują obniżenie lub zwiększenie jego aktywności.

TABELA 9

Aktywacja (+) i inaktywacja (−) enzymów surowego ekstraktu drożdżowego przez proteinazę A, B i C [38]

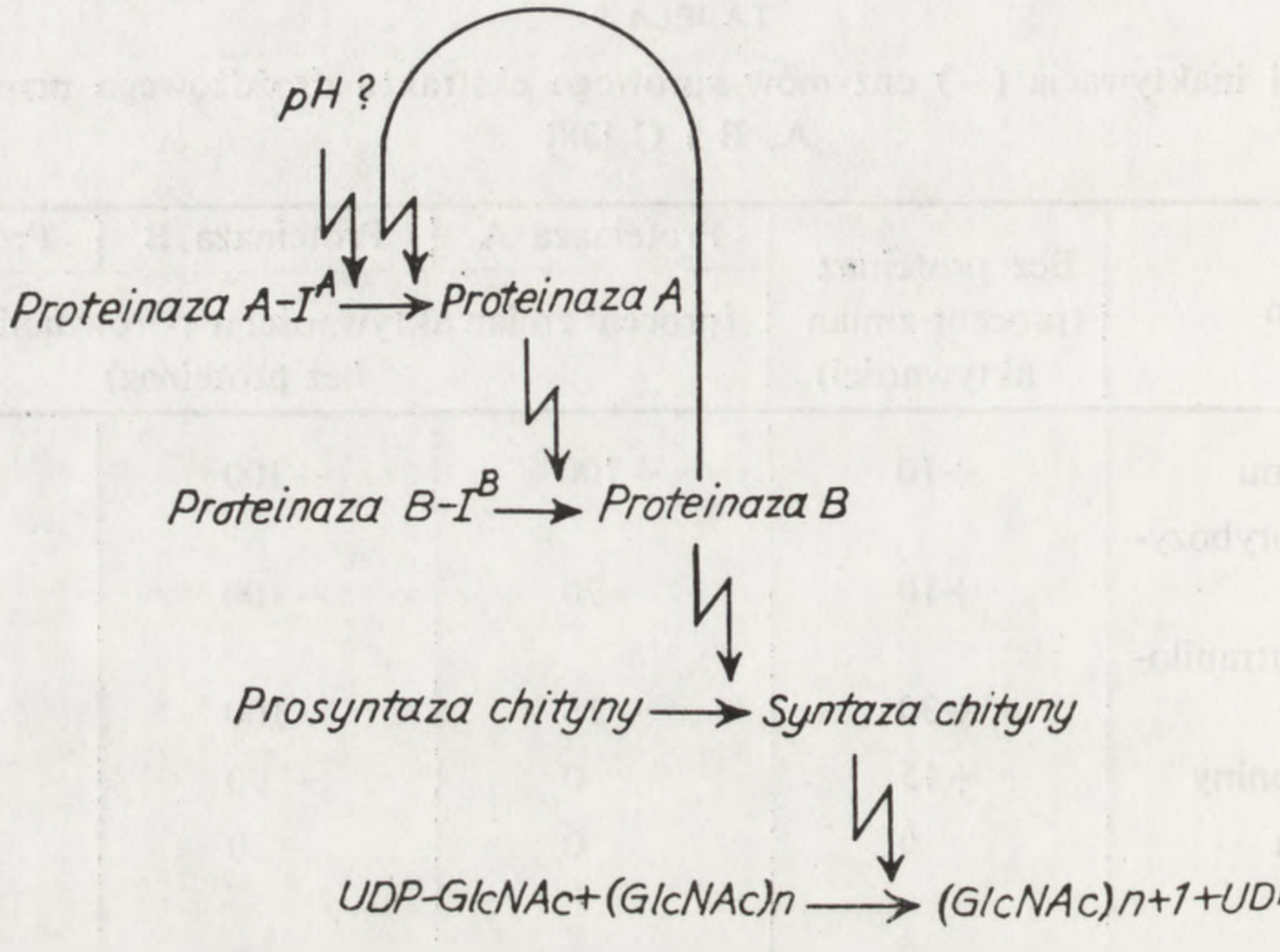
Enzym	Bez proteinaz (procent zmian aktywności)	Proteinaza A	Proteinaza B	Proteinaza C
		(procent zmian aktywności w porównaniu do układu bez proteinaz)		
syntaza tryptofanu	+10	−100	−100	0
transferaza fosforybozylowa	+10	−70	−100	−50
syntaza kwasu antranilowego	+30	−15	−100	0
dehydrataza treoniny	+15	0	−90	0
aminotransferaza asparaginianowa	0	0	−20	0
dehydrogenaza jabłczanowa	0	−10	−20	−10
dwufosfataza fruktozy	−5	0	−80	−10
dehydrogenaza alkoholowa	−20	0	+30	0
fosfofruktokinaza	−15	+50	−70	−10
dehydrogenaza glukozo-6-fosforanu	+ 5	0	−60	−20
heksokinaza	+ 5	0	−20	0
dekarboksylaza pirogronianu	−15	0	−80	0
dehydrogenaza glutaminianowa NAD-zależna	+40	−30	−100	0
dehydrogenaza glutaminianowa NADP-zależna	− 5	0	0	0

W drodze ograniczonej proteolizy dokonywanej przez proteinazę B następuje aktywacja prosyntazy chityny (ryc. 4). Uczynniony enzym dokonuje syntezy chityny, co umożliwia utworzenie przegrody między komórką macierzystą i potomną [8, 9, 17]. Inhibitor proteinazy B hamuje proces aktywacji prosyntazy chityny i tym samym spełnia rolę regulacyjną w syntezie chityny [10, 65].

http://rcin.org.pl

UWAGI KOŃCOWE

Opracowanie technik izolowania i oczyszczania proteinaz drożdżowych i ich inhibitorów oraz otrzymywania podfrakcji komórkowych umożliwiło zrekonstruowanie w układach izolowanych procesów zachodzących w komórce drożdżowej i poznanie mechanizmów ich regulacji.



Ryc. 4. Kaskadowy system aktywacji prosyntazy chityny [30]

Wynikiem tych badań jest wykazanie, że znaczenie proteinaz wykracza poza rolę trawienną i przywracanie komórce aminokwasów pochodzących z degradacji zużytych białek. Niemniej ważna rola proteinaz dotyczy aktywacji, modyfikacji i inaktywacji w drodze ograniczonej proteolizy enzymów należących do różnych klas, przez co wywierają one istotny wpływ na różne szlaki metaboliczne komórki drożdżowej. Stwierdzono ponadto, że szybkość proteolizy wewnątrzkomórkowej zależy nie tylko od bezwzględnej aktywności proteinaz, ale także od dostępności substratu i stanu fizykochemicznego jego cząsteczki, decydującego o podatności na działanie proteinaz, oraz od zawartości i dostępności inhibitorów.

Ze względu na znaczne zaawansowanie, wyniki badań nad proteolizą wewnątrzkomórkową prowadzone na komórkach drożdży można przyjąć za modelowe.

Istnieje wiele danych wskazujących na identyczną jak w komórkach drożdży rolę proteolizy i podobne mechanizmy jej regulacji w komórkach innych drobnoustrojów [42, 55, 59, 70], roślin [15, 52, 58, 66] i zwierząt [39, 56, 63, 69].

http://rcin.org.pl

LITERATURA

[1] BAKALKIN G. Ya., KALNOV S. L., ZUBATOV A. S., LUZIKOV V. N., Degradation of total cell protein at different stages of *Saccharomyces cerevisie* yeast growth, FEBS Letters, **63**: 218–221, 1976.
[2] BARTH R., WOLF D. H., HOLZER H., Studies on the carboxypeptidase Y-inhibitor complex of yeast, Biochim. Biophys. Acta, **527**: 63–69, 1978.
[3] BETZ H., Levels and turnover the proteinase B inhibitors in yeast, Biochim. Biophys. Acta, **404**: 142–151, 1975.
[4] BETZ H., HINZE H., HOLZER H., Isolation and properties of two inhibitors of proteinase B from yeast, J. Biol. Chem., **249**: 4515–4521, 1974.
[5] BETZ H., WEISER U., Protein degradation and proteinases during yeast sporulation, Eur. J. Biochem., **62**: 65–76, 1976.
[6] BEZBORDOW A. M., Biosintez mikroorganizmami ingibitorow fiermentow biełkowoj prirody (obzor), Prikl. Biochim. Mikrobiol., **14**: 5–10, 1978.
[7] BUNNING P., HOLZER H., Natural occurrence and chemical modification of proteinase B inhibitors from yeast, J. Biol. Chem., **252**: 5316–5323, 1977.
[8] CABIB E., FARKAS V., The control of morphogenesis: an enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**: 2052–2056, 1971.
[9] CABIB E., KELLER F. A., Chitin and yeast budding, J. Biol. Chem., **246**: 167–173, 1971.
[10] CABIB E., ULANE R., Chitin synthetase activating factor from yeast, a protease, Biochem. Biophys. Res. Commun., **50**: 186–191, 1973.
[11] DERNBY K. G., Studien über die proteolytischen enzyme der hefe und ihre beziehung zu der autolyse, Biochem. Z., **81**: 107–208, 1917.
[12] DOI E., HAYASHI R., HATA T., Purification of yeast proteinases. Part II. Purification and some properties of yeast proteinase C, Arg. Biol. Chem., **31**: 160–169, 1967.
[13] FERGUSON A. R., KATSUNUMA T., BETZ H., HOLZER H., Purification and properties of an inhibitor of the tryptophan-synthase-inactivating enzymes in yeast, Eur. J. Biochem., **32**: 444–450, 1973.
[14] FREY J., ROHM K. H., Peptidase of yeast: subcellular localization and behaviour during the growth cycle, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **358**: 1202–1203, 1977.
[15] GAHAN P. B., Lysosomes, [w] Plant cell organelles, ed. J. T. Pridham, Academic Press Inc., London, 228–237, 1968.
[16] HANSEN R. J., SWITZER R. L., HINZE H., HOLZER H., Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast, Biochim. Biophys. Acta, **496**: 103–114, 1977.
[17] HASILIK A., HOLZER H., Participation of the tryptophan synthase inactivating system from yeast in the activation of chitin synthase, Biochem. Biophys. Res. Commun., **53**: 552–559, 1973.
[18] HASILIK A., MULLER H., HOLZER H., Compartmentation of the tryptophan synthase proteolyzing system in *Saccharomyces cerevisiae*, Eur. J. Biochem., **48**: 111–117, 1974.
[19] HASILIK A., TANNER W., Carbohydrate moiety of carboxypeptidase Y and perturbation of its biosynthesis, Eur. J. Biochem., **91**: 567–575, 1978.
[20] — Biosynthesis of the vascular yeast glycoprotein carboxypeptidase Y. Conversion of precursor into the enzyme, Eur. J. Biochem., **85**, 599–608, 1978.

http://rcin.org.pl

[21] HATA T., HAYASHI R., DOI E., MINAMI Y., AIBARA S., Yeast proteinase, Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today, 279–282, 1972.
[22] HAYASHI R., BAI Y., HATA T., Inhibition of carboxypeptidase Y by chloromethyl ketone derivatives of benzyloxycarbonyl-L-phenylanine, J. Biochem., **76**: 1355–1357, 1974.
[23] — Kinetic studies of carboxypeptidase Y. I. Kinetic parameters for the hydrolysis of synthetic substrates, J. Biochem., **77**: 69–79, 1975.
[24] — Further confirmation of carboxypeptidase Y as a metal-free enzyme having a reactive serine residue, J. Biochem., **77**: 1313–1318, 1975.
[25] — Evidence for an essential histidine in carboxypeptidase Y. Reaction with the chloromethyl ketone derivative of benzyloxycarbonyl-L-phenylanine, J. Biol. Chem., **250**: 5221–5226, 1975.
[26] HAYASHI R., MASUDA T., MIYAMOTO I., HATA T., Proteolytic enzymes in yeast, Proc. First Internat. Congress of IAMS, Tokyo, University of Tokyo Press, 1975, 194–198.
[27] HAYASHI R., MOORE S., STEIN W. H., Carboxypeptidase from yeast, J. Biol. Chem., **248**: 2296–2302, 1973.
[28] — Serine at the active center of yeast carboxypeptidase, J. Biol., Chem., **248**: 8366–8369, 1973.
[29] HOLZER H., Possible mechanizm for a selective control of proteinase action, Adv. Enzyme Regul., **12**: 1–10, 1974.
[30] — Chemistry and biology of macromolecular inhibitors from yeast acting on proteinases A and B, and carboxypeptidase Y, Adv. Enzyme Regul., **13**: 125–134, 1975.
[31] — Regulatory role of proteinases and proteinases inhibitors in yeast, [w] Proceedings of the 9th FEBS Meeting „Mechanism of action and regulation of enzymes", ed. T. Keleti, Akademiai Kiado, Budapest 1975, 181–193.
[32] — Catabolite inactivation in yeast, Trends Biochem. Sci., **1**: 178–181, 1976.
[33] — Characteristics and functions of proteinases and proteinase inhibitors in yeast, [w] Metabolic Interconversion of Enzymes 1975, ed. S. Shaltiel, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1976, 168–174.
[34] — Characterization and function of intracelular proteinases and proteinase inhibitors from yeast, Acta Biol. Med. Germ., **36**: 1523–1524, 1977.
[35] HOLZER H., BUNNING P., MEUSSDOERFFER F., Characteristics and function of proteinase A and its inhibitor in yeast, [w] Acid Proteases, ed. J. Tang, Plenum Publishing Corporation, New York 1977, 271–289.
[36] HOLZER H., SAHEKI T., Mechanism and regulation of proteolytic processes in yeast, Tokaï J. Exp. Clin. Med., **1**: 115–125, 1976.
[37] INDIGE K. J., The isolation and properties of the yeast cell vacuole, J. Gen. Microbiol., **51**: 441–446, 1968.
[38] JUSIĆ M., HINZE H., HOLZER H., Inactivation of yeast enzymes by proteinase A and B and carboxypeptidase Y from yeast, Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem., **357**: 735–740, 1976.
[39] KATUNUMA N., Regulation of intracellular enzymes levels by limited proteolysis, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **72**: 83–104, 1975.
[40] KLAR A., HALVORSON H. O., Proteinase activities of *Saccharomyces cerevisiae* during sporulation, J. Bacteriol., **124**: 863–869, 1975.
[41] KUHN R. W., WALSH K. A., NEURATH H., Isolation and partial characterization of an acid carboxypeptidase from yeast, Biochemistry, **13**: 3871–3877, 1974.

http://rcin.org.pl

[42] LAMPKIN S. L., COLE K. W., VITTO A., GAERTNER F. H., The protease problem in *Neurospora*, Arch. Biochem. Biophys., **177**: 561–565, 1976.
[43] LENNEY J. F., A study of two yeast proteinases, J. Biol. Chem., **221**: 919–930, 1956.
[44] — Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B, and C, J. Bacteriol., **122**: 1265–1273, 1975.
[45] LENNEY J. F., DALBEC J. M., Purification and properties of two proteinases from *Saccharomyces cerevisiae*, Arch. Biochem. Biophys., **120**: 42–48, 1967.
[46] — Yeast proteinase B: identification of the inactive from as an enzyme-inhibitor complex, Arch. Biochem. Biophys., **129**: 407–409, 1969.
[47] LENNEY J. F., MATILE Ph., WIEMKEN A., SCHELLENBERG M., MEYER J., Activities and cellular localization of yeast proteases and their inhibitors, Biochem. Biophys. Res. Commun., **60**: 1378–1383, 1974.
[48] LUZIKOV V. N., MAKHLIS T. A., GALKIN A. V., A probable role of cell proteinases in the biogenesis of mitochondria in yeast, FEBS Letters, **69**: 108–110, 1976.
[49] MANNEY T. R., Regulation of factors that influence the in vitro stability of tryptophan synthetase from yeast, J. Bacteriol., **96**: 403–408, 1968.
[50] MATERN H., BETZ H., HOLZER H., Compartmentation of inhibitors of proteinases A and B and carboxypeptidase Y in yeast, Biochem. Biophys. Res. Commun., **60**: 1051–1057, 1974.
[51] MATERN H., HOFFMANN M., HOLZER H., Isolation and characterization of the carboxypeptidase Y inhibitor from yeast (proteinase inhibitor), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**: 4874–4878, 1974.
[52] MATILE Ph., Plant lysosomes, [w] Lysosomes in Biology and Pathology, ed. J. T. Dingle, H. B. Fell, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, **1**: 406–430, 1969.
[53] MATILE Ph., WIEMKEN A., The vacuole as the lysosome of the yeast cell, Arch. Mikrobiol., **56**: 148–155, 1967.
[54] METZ G., ROHM K. H., Yeast carboxypeptidase I, chemical composition and catalytic properties, Biochim. Biophys. Acta, **429**: 933–949, 1976.
[55] MILLET J., Characterization of a protein inhibitor of intracellular protease from *Bacillus subtilis*, FEBS Letters, **74**: 59–61, 1977.
[56] NEURATH H., WALSH K. A., Role of proteolytic enzymes in biological regulation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**: 3825–3832, 1976.
[57] NUNEZ de CASTRO I., HOLZER H., Studies on the proteinase-A inhibitor I_3^A from yeast, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**: 727–734, 1976.
[58] RYAN C. A., Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants, Ann. Rev. Plant. Physiol., **24**: 173–196, 1973.
[59] RYDER N. S., PEBERDY J. F., Chitin synthase in *Aspergillus nidulans*: properties and proteolytic activation, J. Gen. Microbiol., **90**: 69–76, 1977.
[60] SAHEKI T., HOLZER H., Proteolytic activities in yeast, Biochim. Biophys. Acta, **384**: 203–214, 1975.
[61] SANDA Y., FUJISHIRO K., TANAKA H., KATUNUMA N., Isolation and characterization of yeast protease B, Biochem. Biophys. Res. Commun., **86**: 815–821, 1979.
[62] SAHEKI T., MATSUDA Y., HOLZER H., Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast, Eur. J. Biochem., **47**: 325–352, 1974.

http://rcin.org.pl

[63] SCHIMKE R. T., DOYLE D., Control of enzyme levels in animal tissues, Ann. Rev. Biochem., **39**: 929–976, 1970.
[64] SCHOTT E. H., HOLZER H., Purification and some properties of tryptophan synthase inactivase II from yeast, Eur. J. Biochem. **42**: 61–66, 1974.
[65] ULANE R. E., CABIB E., The activating system of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and properties of an inhibitor of the activating factor, J. Biol. Chem., **249**: 3418–3422, 1974.
[66] WARDROP A. B., Occurrence of structures with lysosome-like function in plant cells, Nature, **218**: 978–980, 1968.
[67] WOLF D. H., EHMANN C., Carboxypeptidase S from yeast: regulation of its activity during vegetative growth and differentiation, FEBS Letters, **91**: 59–62, 1978.
[68] WOLF D. H., WEISER U., Studies on a carboxypeptidase Y mutant of yeast and evidence for a second carboxypeptidase activity, Eur. J. Biochem., **73**: 553–556, 1977.
[69] WOROWSKI K., Proteoliza komórkowa i mechanizmy jej regulacji, Post. Biol. Kom., **4**: 243–278, 1977.
[70] YU P. H., KULA M. R., TSAI H., Isolation of specific protease inhibitors from *Neurospora crassa*, Can. J. Biochem., **54**: 699–703, 1976.

Otrzymano: 15 kwietnia 1979.
Przyjęto: 15 maja 1979.

Adres autora: ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 4, 1979 (283 - 306)

PLAZMOLEMA KOMÓRKI ROŚLINNEJ

II. FIZJOLOGICZNA FUNKCJA PLAZMOLEMY

THE PLASMALEMMA OF THE PLANT CELL

II. PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF PLASMALEMMA

Marek POLAŃSKI

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej, UJ

Streszczenie. Plazmolema jako błona stanowiąca zewnętrzną granicę protoplastu spełnia wielorakie i różnorodne funkcje o podstawowym znaczeniu dla życia komórki. Dzięki specyficznej przepuszczalności plazmolemy stwarza ona i utrzymuje odpowiedni skład wewnętrznego środowiska komórki, częściowo przy wykorzystaniu energii metabolicznej. Chwilowe zmiany we własnościach przepuszczalności prowadzą do powstania tzw. potencjałów czynnościowych będących wyrazem procesu pobudzenia komórki. Plazmolema pełni funkcje receptorowe zarówno dla działania hormonów, jak i dla działania światła, błona ta pełni również funkcję sensoryczną w stosunku do ciśnienia turgorowego. Wreszcie plazmolema odgrywa ważną funkcję w syntezie i regulacji tworzenia ściany komórkowej.

Summary. The plasmalemma is a membrane forming the outer boundary of protoplast, therefore plays very important role for the cell life. Owing to its specific permeability, plasmalemma is able to form and maintain suitable composition of the internal cell enviroment, in part by applying its metabolic energy. Transient changes of its permeability properties give rise to the so called action potentials; these potentials appear as a result of various processes of cell excitation. Plasmalemma is a receptor of hormonal and light activity, it seems also to have the sensoric function with respect to turgor pressure. At least this membrane plays an important role of cell wall formation.

WSTĘP

W pierwszej części artykułu [59] przedstawiono informacje dotyczące metod izolacji plazmolemy, jej składu i struktury. Celem niniejszego przeglądu jest omówienie podstawowych funkcji jakie spełnia ta błona.

http://rcin.org.pl

Plazmolema jest zewnętrzną błoną cytoplazmatyczną otaczającą każdy żywy protoplast. Jej podstawowym zadaniem jest utrzymanie odpowiedniego składu środowiska wewnętrznego komórki i niedopuszczenie do swobodnej dyfuzji substancji i ich rozproszeniu się w otoczeniu. Ponieważ jednak komórka jest układem termodynamicznie otwartym, wymieniającym z otoczeniem materię i energię, plazmolema nie może być błoną całkowicie nieprzepuszczalną. Jej selektywna przepuszczalność oraz mechanizmy regulujące transport wody, elektrolitów, metabolitów i substancji strukturalnych oraz gazów są podstawowym atrybutem każdego żywego układu. Obok kontroli przepuszczalności substancji plazmolema odgrywa szereg ważnych funkcji. Jest ona zaangażowana w procesy pobudliwości komórki, gdyż pobudzenie wiąże się z okresową zmianą przepuszczalności; ze względu na bliski kontakt ze ścianą komórkową, plazmolema odgrywa ważną rolę przy wzroście i budowaniu tego zewnętrznego szkieletu komórkowego, wreszcie ostatnio przypisuje się plazmolemie funkcje fotorecepcyjne z uwagi na lokalizację niektórych fizjologicznie czynnych barwników w tej strukturze.

TRANSPORT SUBSTANCJI PRZEZ PLAZMOLEMĘ

Błona plazmatyczna stanowi dla substancji bardzo specyficzną przegrodę, tzn. wykazującą wybitną selektywność. Najlepiej świadczy o tym fakt, że współczynniki przepuszczalności dla różnych związków różnią się między sobą o 8 rzędów wielkości (1 : 100 000 000). Wybiórcze własności plazmolemy mogą być tak specyficzne, że pozwalają na rozróżnienie stereoizomerów tego samego związku, który w zależności od swej konfiguracji przestrzennej jest łatwo lub trudno pobierany. Cechą plazmolemy, podobnie jak innych błon biologicznych, jest również uprzywilejowanie określonego kierunku transportu, podczas gdy ruch w kierunku przeciwnym może być utrudniony [56]. Cechy te, ważne dla utrzymania i kontroli wewnętrznego środowiska komórki, wiążą się z różnymi mechanizmami zjawisk transportu. Najogólniej mechanizmy te można podzielić na trzy kategorie: transport bierny, aktywny oraz egzo- i endocytozę.

Transport bierny jest dyfuzją przez błonę biologiczną. Kierunek transportu zdeterminowany jest w tym przypadku różnicą potencjałów elektrochemicznych danej substancji (j) po obu stronach błony. Potencjał elektrochemiczny μ_j określony jest równaniem (w przypadku roztworów rozcieńczonych i utrzymywanych w stałej temperaturze):

$$\mu_j = \mu_j^x + RT \ln a_j + \bar{V}_j \cdot P - z_j \cdot \psi \cdot F, \qquad (1)$$

http://rcin.org.pl

gdzie μ_j^x oznacza potencjał standardowy (stała), a_j — aktywność chemiczną substancji, tj. jej stężenie pomnożone przez współczynnik aktywności, $\bar{V}_j$ — objętość molową substancji, P — ciśnienie, z_j — wartościowość jonu z uwzględnieniem jej znaku, ψ — potencjał elektryczny roztworu w mV, F — stałą Faradaya.

Natomiast o szybkości transportu decydują nie tylko wielkość różnicy potencjału elektrochemicznego, ale i własności błony w stosunku do danej substancji charakteryzowane np. współczynnikiem przepuszczalności lub współczynnikiem odbicia [56].

W zależności od rodzaju rozpatrywanej substancji różne elementy równania potencjału elektrochemicznego nabierają podstawowego znaczenia. I tak dla wody, której transport odbywa się wyłącznie w sposób bierny, znika ostatni człon równania (z_j dla wody można przyjąć jako zero), zatem o ruchu wody decyduje tylko aktywność wody i ciśnienie hydrostatyczne. W fizjologii komórki roślinnej czynniki determinujące ruch wody zwykło się określać jako potencjał wodny ψ_{H_2O}, zwany dawniej siłą ssącą lub deficytem ciśnienia dyfuzyjnego,

$$\psi_{H_2O} = \frac{\mu_w - \mu_w^x}{\bar{V}_w} = P - \pi \qquad (2)$$

gdzie P oznacza ciśnienie hydrostatyczne, π — ciśnienie osmotyczne, μ_w^x — potencjał standardowy wody, μ_w — potencjał elektrochemiczny wody, $\bar{V}_w$ — objętość molową wody.

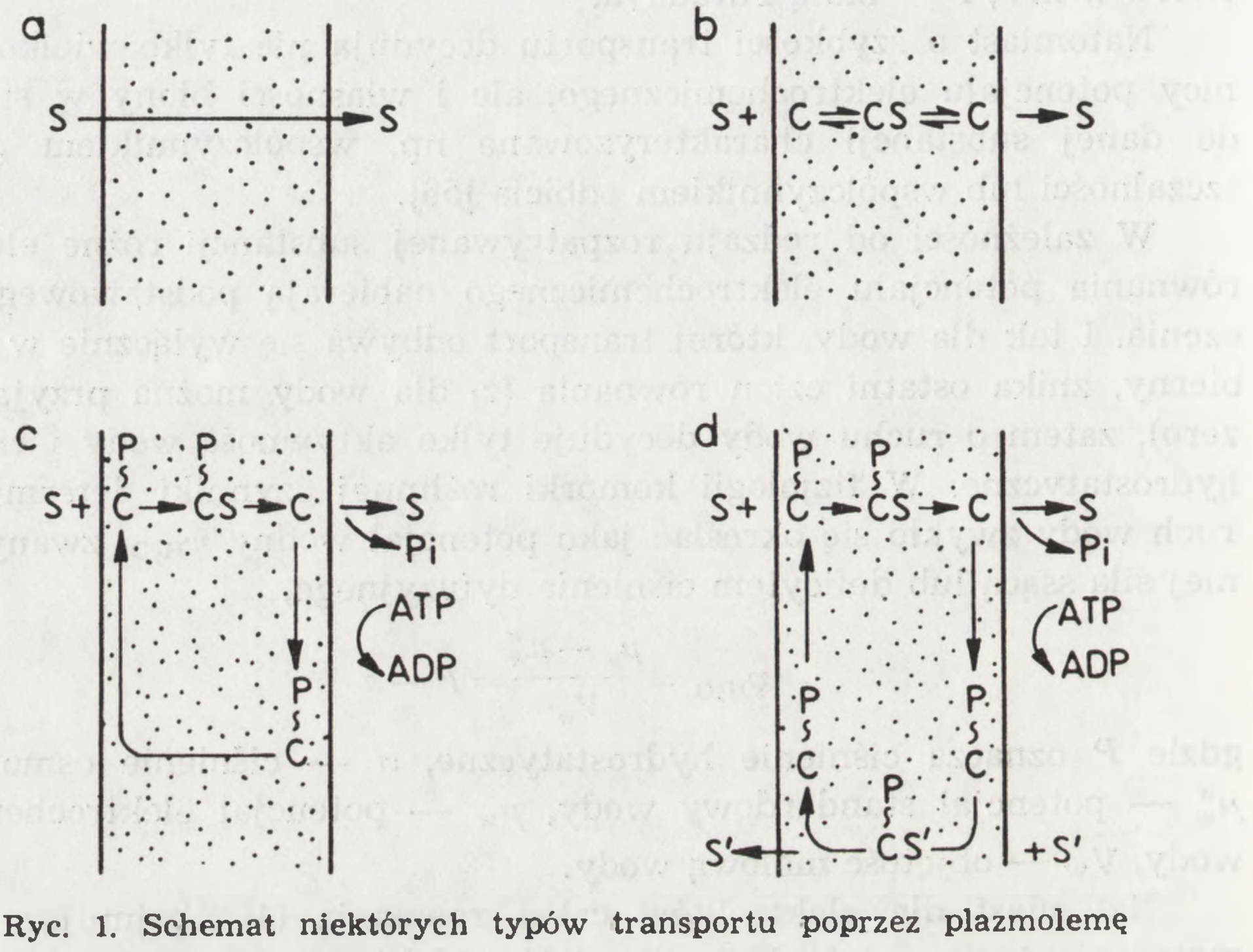
Natomiast dla elektrolitów człon równania (1) obejmujący parametry elektryczne (różnica potencjałów elektrycznych po obu stronach błony) i wartościowość jonu nabierają zasadniczego znaczenia, podczas gdy różnice ciśnień odgrywają zupełnie podrzędną rolę [56]. Wreszcie dla substancji organicznych nie posiadających ładunku elektrycznego podstawowe znaczenie mają różnice w aktywności (w uproszczeniu różnice stężenia) danej substancji po obu stronach błony.

Podstawową cechą transportu biernego jest, obok zdeterminowania jego kierunku różnicą w potencjale elektrochemicznym, fakt, że transport ten odbywa się bez nakładu energii ze strony komórki.

Istnieją dwa typy transportu biernego: prosty i ułatwiony. Pierwszy można traktować jako zwykłą dyfuzję przez błonę, której szybkość jest wprost proporcjonalna do różnicy stężeń (ściślej do różnicy potencjałów elektrochemicznych), danej substancji po obu stronach błony. W licznych przypadkach stwierdza się jednak, że szybkość przenikania danej substancji przez błonę nie jest wprost proporcjonalna do różnic jej potencjału elektrochemicznego, ale wykazuje zależność hiperboliczną wskazującą na wysycenie procesu (podobnie jak szybkość reakcji enzymatycznej w stosunku do stężenia substratu — krzywa Michaelisa Men-

http://rcin.org.pl

tena). Nasuwa to przypuszczenie, że w błonie istnieją centra (nośniki — translokazy) zaangażowane w przenoszenie substancji (ryc. 1). Transportowana substancja łączy się z określonym nośnikiem, podobnie jak substrat z enzymem, i rozłącza się z nim po drugiej stronie błony. Trans-



Ryc. 1. Schemat niektórych typów transportu poprzez plazmolemę

transport: *a* — bierny, *b* — ułatwiony, *c* — aktywny, *d* — aktywny powiązany z antyportem S, S' — substrat, C — nośnik zlokalizowany w błonie, P — aktywny fosforan, Pi — fosforan nieorganiczny

port ułatwiony przy wykorzystaniu nośnika przebiega szybciej niż transport prosty, jest jednak dalej transportem biernym, ponieważ nie wykorzystuje energii metabolicznej komórki i prowadzi w zasadzie do równowagi termodynamicznej (wyrównania potencjałów elektrochemicznych substancji po obu stronach błony) [56].

W przeciwieństwie do transportu biernego, transport aktywny może przyczyniać się do powiększania różnicy potencjałów elektrochemicznych. Jest to więc proces endoergiczny, wymaga nakładu energii i jest sterowany przemianą materii komórki dostarczającą tej energii. W licznych przypadkach stwierdzono, że pobieranie np. jonów jest uzależnione od natężenia oddychania, a zablokowanie tego ostatniego procesu działaniem np. inhibitorów powoduje nie tylko zmianę tempa przepływu jonów, ale nawet zmianę jego kierunku i ustalenie się nowego stanu równowagi [56]. Wykorzystanie energii w procesach transportu związane jest z hydrolizą ATP przez specyficzne ATPazy zlokalizowane

http://rcin.org.pl

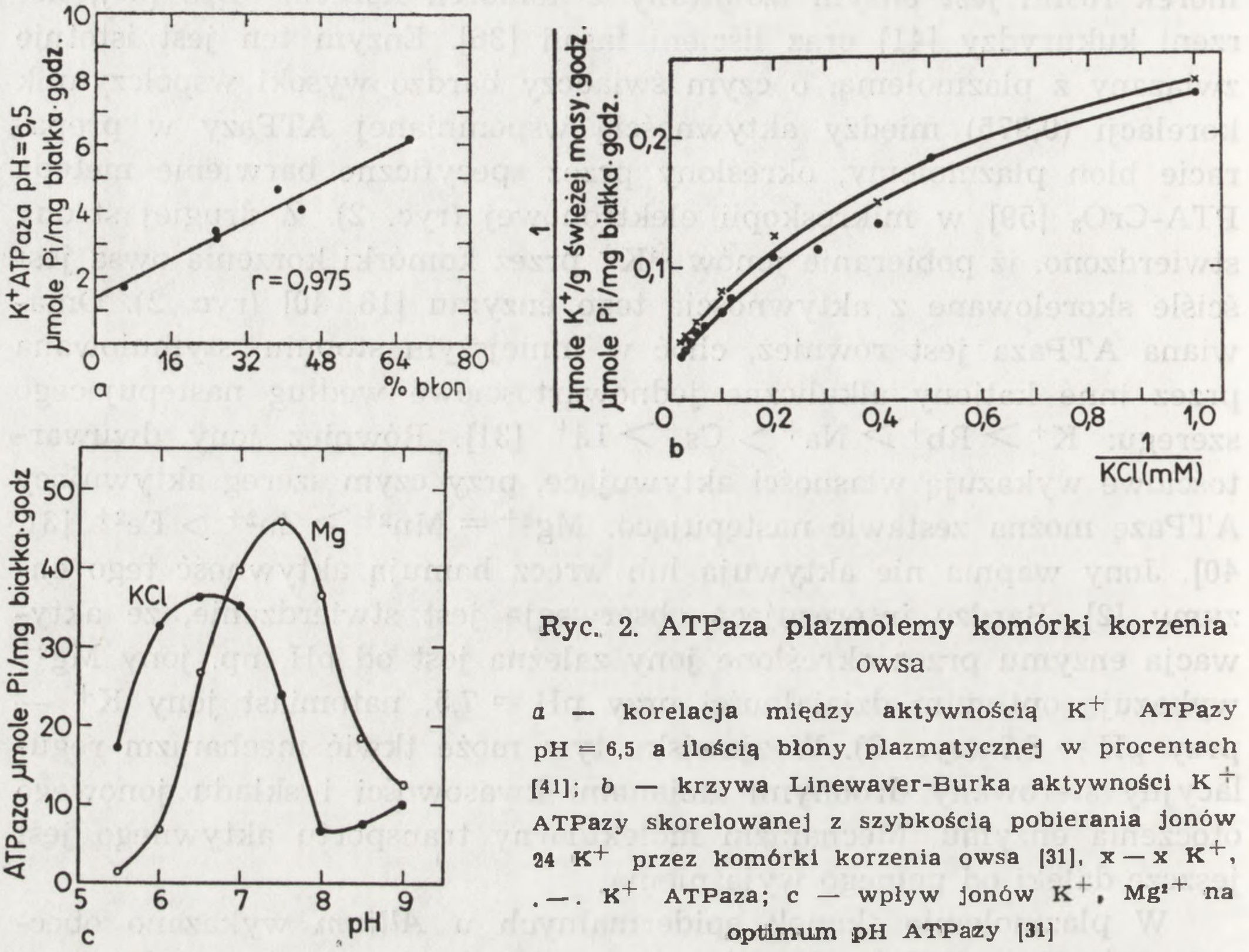
w błonach, jak to schematycznie przedstawia ryc. 1, gdzie nośnik C jest aktywowany przez ATP i tylko w formie aktywnej może transportować substancję. Jedną z najlepiej poznanych ATPaz plazmolemy komórek roślin jest enzym izolowany z komórek korzeni owsa [30], korzeni kukurydzy [41] oraz liścieni fasoli [36]. Enzym ten jest istotnie związany z plazmolemą, o czym świadczy bardzo wysoki współczynnik korelacji (0,975) między aktywnością wspomnianej ATPazy w preparacie błon plazmolemy, określony przez specyficzne barwienie metodą PTA-CrO_3 [59] w mikroskopii elektronowej (ryc. 2). Z drugiej strony stwierdzono, iż pobieranie jonów $^{24}K^+$ przez komórki korzenia owsa jest ściśle skorelowane z aktywnością tego enzymu [18, 40] (ryc. 2). Omawiana ATPaza jest również, choć w mniejszym stopniu, stymulowana przez inne kationy alkaliczne jednowartościowe według następującego szeregu: $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ [31]. Również jony dwuwartościowe wykazują własności aktywujące, przy czym szereg aktywujący ATPazę można zestawić następująco: $Mg^{2+} = Mn^{2+} > Zn^{2+} > Fe^{2+}$ [31, 40]. Jony wapnia nie aktywują lub wręcz hamują aktywność tego enzymu [2]. Bardzo interesującą obserwacją jest stwierdzenie, że aktywacja enzymu przez określone jony zależna jest od pH, np. jony Mg^{2+} wykazują optimum działalności przy pH = 7,5, natomiast jony K^+ — przy pH = 6,5 (ryc. 2). W zjawisku tym może tkwić mechanizm regulacyjny sterowany drobnymi zmianami kwasowości i składu jonowego otoczenia enzymu. Mechanizm molekularny transportu aktywnego jest jeszcze daleki od pełnego wyjaśnienia.

W plazmolemie tkanek epidermalnych u *Allium* wykazano obecność K^+, Na^+ ATPazy hamowanej (ouabainą) strofantyną G [8]. Ten rzadki przypadek występowania enzymu specyficznego dla błony komórki zwierzęcej [23] jest na razie jedynym, gdyż wcześniejsze próby zlokalizowania aktywności tego enzymu w błonie plazmatycznej korzeni owsa nie dały pozytywnych wyników [17]. Prace cytochemiczne wskazują na obecność w tkance epidermalnej korzeni kukurydzy ATPazy hamowanej przez oligomycynę, charakterystycznej dla błon mitochondrialnych [44]. Można zatem sądzić, że w tkance epidermalnej korzeni istnieje mechanizm regulujący w tym przypadku transport jonów fosforanowych, ponieważ oligomycyna aktywnie hamuje pobieranie tych jonów przez korzeń oraz obniża aktywność ATPazy. Wszystkie te spostrzeżenia mogą świadczyć o bardzo złożonej roli regulacyjnej błony plazmatycznej w transporcie aktywnym realizowanym przez aktywność zlokalizowanych w niej ATPaz.

Transport aktywny, prowadzący do zwiększenia różnic w potencjale elektrochemicznym po obu stronach błony, można przyrównać do pompy napędzanej energią ATP. W komórkach zwierzęcych podstawową

http://rcin.org.pl

rolę w kontrolowaniu składu jonowego przypisuje się pompie sodowej [66], natomiast wydaje się, że w komórkach roślinnych dodatkowo ważne funkcje spełnia pompa protonowa.



Ryc. 2. ATPaza plazmolemy komórki korzenia owsa

a — korelacja między aktywnością K^+ ATPazy pH = 6,5 a ilością błony plazmatycznej w procentach [41]; *b* — krzywa Linewaver-Burka aktywności K^+ ATPazy skorelowanej z szybkością pobierania jonów 24 K^+ przez komórki korzenia owsa [31], x — x K^+, .—. K^+ ATPaza; c — wpływ jonów K^+, Mg^{2+} na optimum pH ATPazy [31]

Często aktywnemu transportowi towarzyszy ściśle z nim związane, ale nieaktywne przenoszenie innych substancji. Przy przenoszeniu np. jonów, aktywnemu transportowi kationu może towarzyszyć nieaktywny transport w tę samą stronę anionu (symport) lub w przeciwną stronę innego kationu (antyport) (ryc. 1d). Jest to zjawisko umożliwiające zachowanie równowagi ładunków elektrycznych. Procesy symportu i antyportu dotyczyć mogą nie tylko elektrolitów, np. u niektórych bakterii, glonów i grzybów stwierdzono sprzężone z pobieraniem glukozy wydzielanie protonów [69] (tabela 1). W tym typie transportu przejściu przez błonę jednej cząsteczki cukru towarzyszy przemieszczenie w przeciwną stronę jednego protonu [37], a przesunięcie jednego protonu związane jest z hydrolizą jednej cząsteczki ATP [14]. Zjawiska te mogą prowadzić do zakwaszenia środowiska, w którym znajdują się komórki pobierające cukier.

Ostatni rodzaj transportu przez błony — proces endo- i egzocytozy — jest zjawiskiem o bardziej ograniczonym znaczeniu, a nawet

http://rcin.org.pl

TABELA 1

Stosunek stechiometryczny wymiany proton/cukier [38, 67, 68, 69]

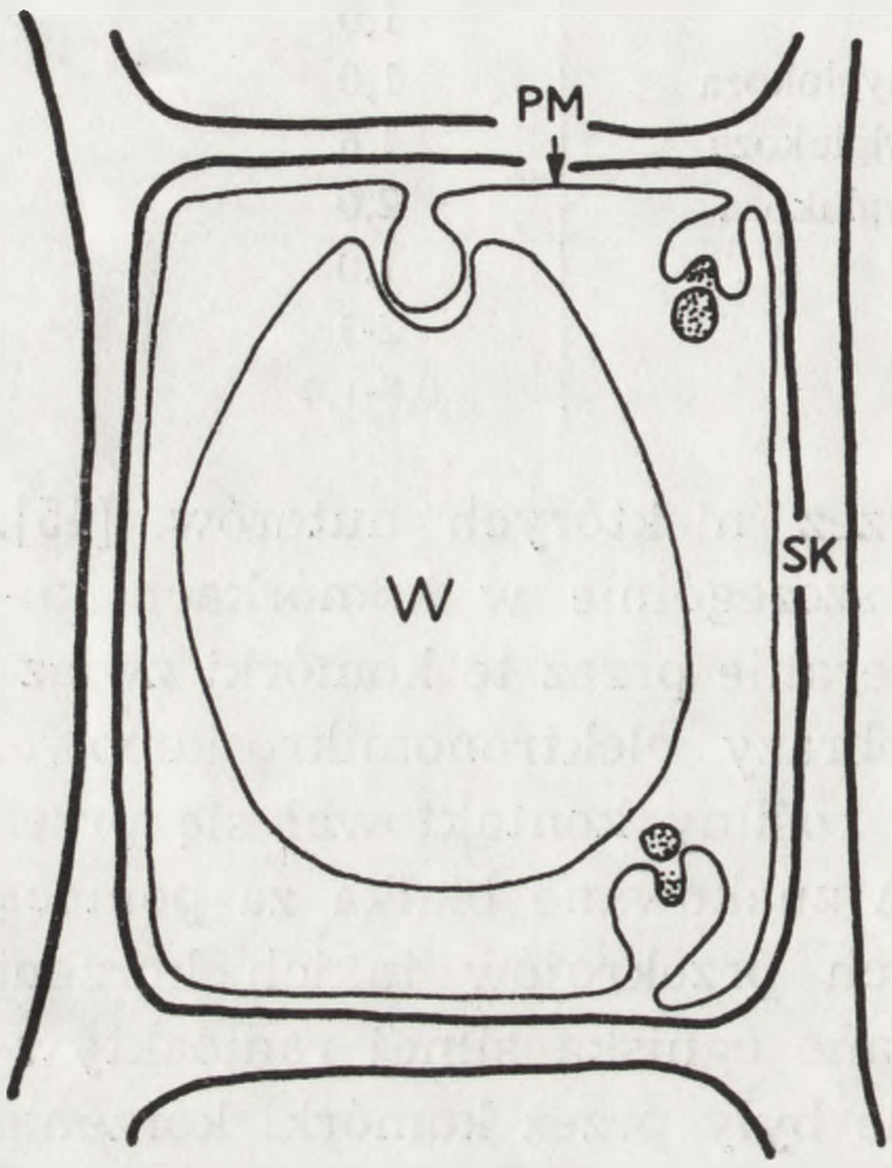
Organizm	Cukier	H^+/cukier
Chlorella vulgaris	glukoza	1,0
	6-dezoksyglukoza	1,0
	3-0-metylglukoza	1,6
	1-deoksyglukoza	2,0
E. coli	laktoza	1,0
Saccharomyces carlsbergensis	maltoza	2-3
Neurospora crassa	glukoza	0,8-1,4

obecność endocytozy jest negowana przez niektórych autorów [45]. O występowaniu tego typu transportu, szczególnie w komórkach korzeni, dowodzą dwa rodzaje danych: pobieranie przez te komórki związków głównie typu makrocząsteczek i obrazy elektronomikroskopowe. Wielokrotnie wykazano, że jeżeli korzeń rośliny kontaktował się przez krótki czas z środowiskiem zawierającym znakowane białka za pomocą ^{125}I, ^{3}H lub ^{14}C, to na radioautogramach przekrojów takich korzeni stwierdza się w komórkach skoncentrowane ogniska silnej radioaktywności [15, 34, 70]. Gdyby białka pobierane były przez komórki korzenia po wcześniejszym rozłożeniu na aminokwasy, należałoby się spodziewać obrazu rozsianej radioaktywności. Dane te wskazują, że przynajmniej część drobin białka dostaje się do komórki w stanie nierozłożonym, a to możliwe jest tylko na drodze endocytozy. Pobieranie białek w całości jest procesem wymagającym nakładu energii metabolicznej i może być hamowane działaniem inhibitorów typu 2,4-dwunitrofenolu, KCN lub strofantyny [52]. Z drugiej strony, liczne obrazy elektronomikroskopowe wykazują, iż plazmolema tworzy wpuklenia do wnętrza komórki, które zdają się obrazować poszczególne stadia tworzenia wodniczek endocytotycznych [43, 55] (ryc. 3).

Dodatkowym argumentem przemawiającym za możliwością endocytozy w komórkach roślinnych jest stwierdzone ponad wszelką wątpliwość pobieranie przez izolowane protoplasty markerów ferrytyny, cząstek wirusa mozaiki tytoniowej, lub ziaren lateksu [10, 50]. Pobieranie drogą endocytozy substancji przez nie uszkodzone komórki, np. korzenia, jest z natury rzeczy ograniczone zdolnością tych substancji do penetrowania poprzez ścianę komórkową. Prawdopodobnie endocytoza jest zjawiskiem ograniczonym również z tego powodu, że podczas tego procesu pobrana zostaje do komórki pewna porcja substancji środowiska zewnętrznego (w tym także jonów) w sposób nieselektywny, a jej szersze działanie ograniczałoby działalność mechanizmów regulujących stan jonowy wnętrza komórki. Natomiast egzocytoza, jako pro-

http://rcin.org.pl

ces pozwalający na wydzielanie na zewnątrz protoplastu enzymów czy makrocząsteczek budujących ściany komórkowe, jest normalnym i powszechnym zjawiskiem w transporcie.



Ryc. 3. Schemat typów inwaginacji plazmolemy w komórkach korzenia ryżu [55]
PM — plazmolema, W — wakuola, SK — ściana komórkowa, widoczna inwaginacja w kierunku wakuoli i cytoplazmy

ZJAWISKA ELEKTRYCZNE ZWIĄZANE Z PLAZMOLEMĄ

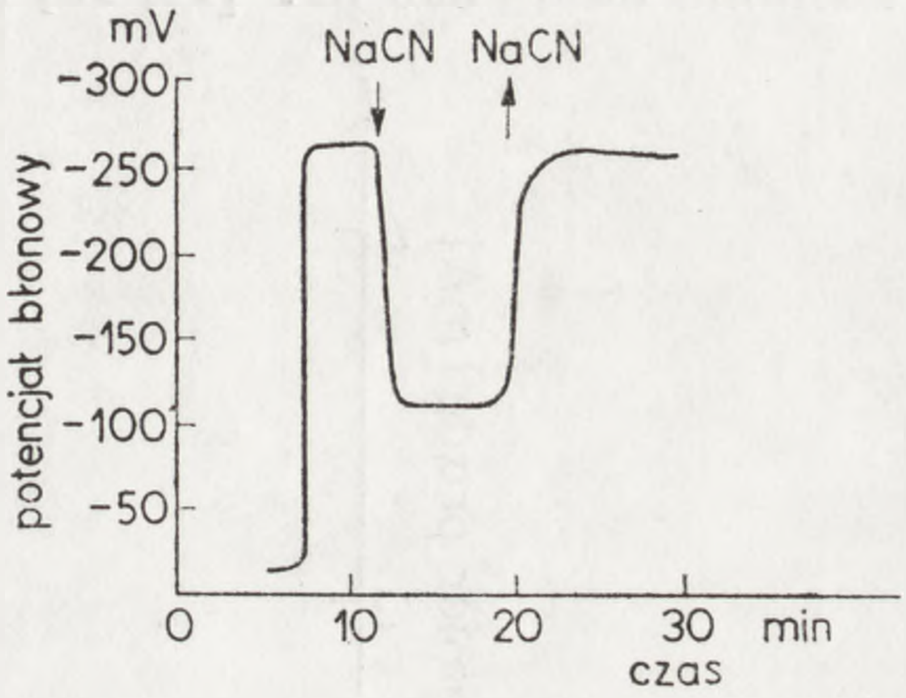
Dzięki zastosowaniu nie polaryzujących się mikroelektrod, stało się możliwe dokonanie pomiarów różnicy potencjałów elektrycznych między otoczeniem a wnętrzem komórki. Klasycznymi obiektami do tego typu stały się komórki glonów o dużych wymiarach (*Chara, Nitella, Vallonia*).

W komórkach *Nitella* nawet pod małym powiększeniem mikroskopowym możliwa jest kontrola położenia końca mikroelektrody (w cytoplazmie lub wakuoli), co pozwala na dokonanie pomiarów między cytoplazmą a środowiskiem lub między wakuolą a środowiskiem. W komórkach roślin wyższych, o cienkiej warstwie cytoplazmy, większość pomiarów dotyczy relacji środowisko–wodniczek. Wprowadzona ostatnio metoda odwirowywania cytoplazmy [42, 80] pozwala także dla małych komórek uzyskać dane o różnicy potencjałów między cytoplazmą a otoczeniem komórki (ryc. 4).

Dość obszerny materiał eksperymentalny pozwala na stwierdzenie, iż zawsze wnętrze komórki roślinnej posiada ładunek ujemny w stosunku do otoczenia. Przegrodą odgrywającą rolę izolatora są błony cytoplazmatyczne, stąd różnicę potencjałów między cytoplazmą a środo-

http://rcin.org.pl

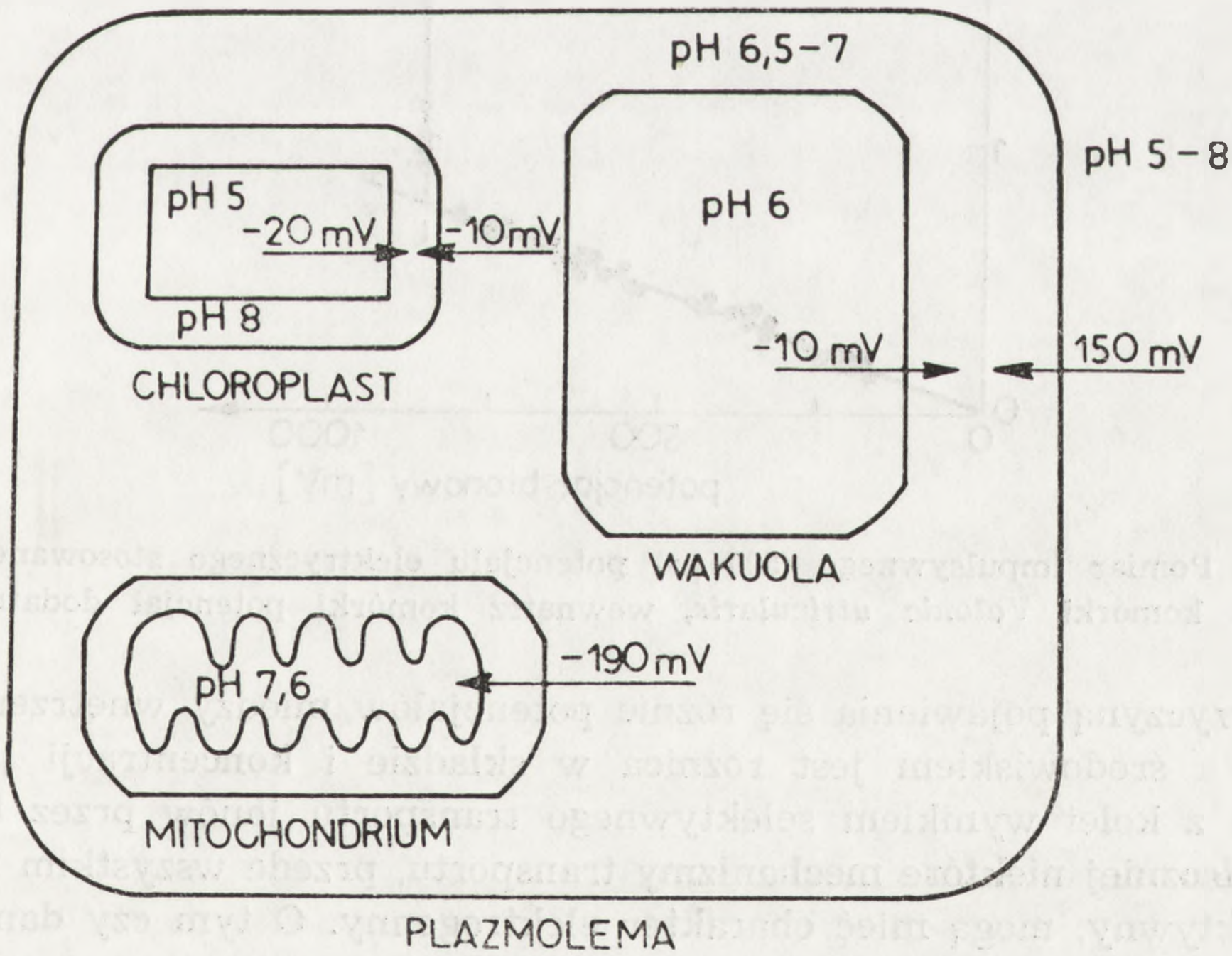
wiskiem określa się jako potencjał błonowy plazmolemy. W zależności od obiektu potencjał ten waha się najczęściej w granicach 80–250 mV. Potencjały innych błon ograniczających wewnętrzne przestrzenie komórki są z reguły znacznie niższe [61] (ryc. 5).



Ryc. 4. Rejestracja potencjału spoczynkowego plazmolemy w komórkach liścia *Mnium cuspidatum* [19]

Odwracalna zmiana potencjału w odwirowanych komórkach ($1{,}6 \times 10^3$ *g* przez 30 min) wywołana przez 0,1n molowy NaCN

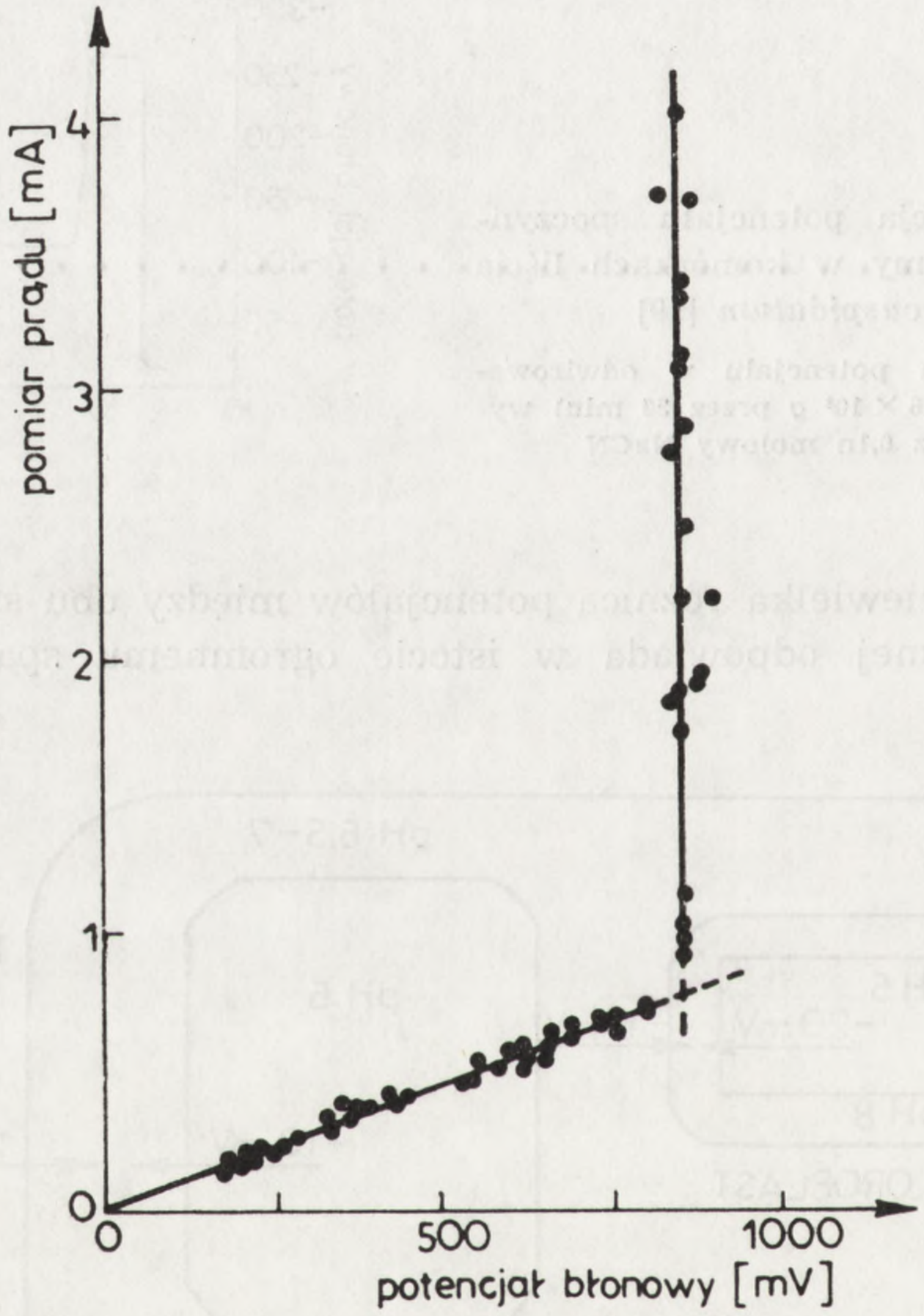
Pozornie niewielka różnica potencjałów między obu stronami błony cytoplazmatycznej odpowiada w istocie ogromnemu spadkowi poten-



Ryc. 5. Ważniejsze przestrzenie komórki roślinnej przegrodzone błonami, strzałki skierowane w stronę ujemnego potencjału [61]

http://rcin.org.pl

cjału elektrycznego, o ile uwzględnimy bardzo małą grubość błony. Przykładowo, potencjał 200 mV w błonie grubości 100 Å odpowiada spadkowi potencjału 200 000 V cm^{-1}. Struktura plazmolemy, a w szczególności udział lipidów w jej budowie, pozwala jednak na utrzymanie większej różnicy potencjałów. Potencjał przebicia, tj. różnica ładunków, przy której plazmolema traci własności izolatora, wynosi np. dla *Vallonia* około 850 mV [11, 12] (ryc. 6).



Ryc. 6. Pomiar impulsywnego (500 μs) potencjału elektrycznego stosowanego do wnętrza komórki *Valonia utricularis*, wewnątrz komórki potencjał dodatni [11]

Przyczyną pojawienia się różnic potencjałów między wnętrzem komórki a środowiskiem jest różnica w składzie i koncentracji jonów, będąca z kolei wynikiem selektywnego transportu jonów przez błony. Najwidoczniej niektóre mechanizmy transportu, przede wszystkim transport aktywny, mogą mieć charakter elektrogenny. O tym czy dany jon znajduje się w stanie równowagi elektrochemicznej, czy też czynnie jest pompowany i w którym kierunku można wnosić znając potencjał

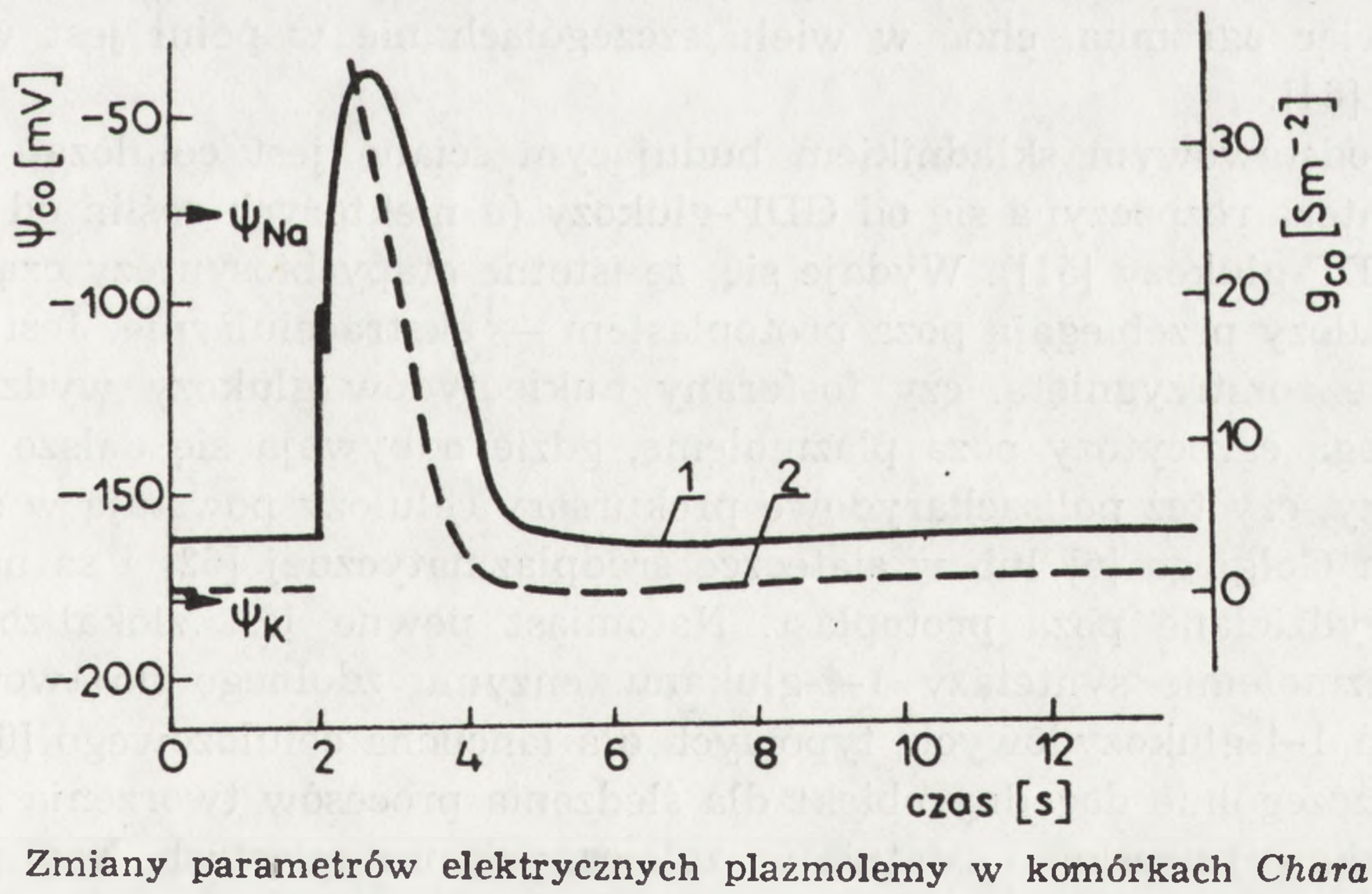
http://rcin.org.pl

błonowy oraz różnice w koncentracji danego jonu po obu stronach membrany. Stan równowagi odpowiada sytuacji, w której potencjały elektrochemiczne danego jonu są równe po stronie zewnętrznej (a) i wewnętrznej (b). Z relacji tej można wyprowadzić równanie Nernsta określające wielkość potencjału elektrycznego ψ w stanie równowagi:

$$\psi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_a}{c_b}, \tag{3}$$

gdzie R — stała gazowa, T — temperatura w skali Kelvina, z — wartościowość jonu, F — stała Faradaya, c_a — stężenie jonu po stronie zewnętrznej i c_b — wewnętrznej.

Według danych Gaffey i Mullinsa [21] w komórkach *Chara globularia* określono potencjał membranowy równy −181 mV. Równocześnie znając stężenia kilku jonów wewnątrz i na zewnątrz komórki obliczono potencjał Nernsta, który wynosił dla jonów sodu $V_{Na^+} = -155$ mV, dla jonów potasu $V_{K^+} = -184$ mV, dla jonów chloru $V_{Cl^-} = +202$ mV. Z porównania tych danych widać, że najbliżej stanu równowagi są jony potasu (jest to regułą w komórkach roślinnych), nieco odbiegają od tego stanu jony Na^+, dla których należy przyjąć działanie aktywnego mechanizmu wypompowującego je na zewnątrz komórki, wreszcie najbardziej odbiegają od stanu równowagi jony Cl^-, najwidoczniej silnie pobierane aktywnie do wnętrza.



Ryc. 7. Zmiany parametrów elektrycznych plazmolemy w komórkach *Chara coralliana* pobudzonej impulsem elektrycznym o czasie trwania 100 ms [32]

1 — potencjał czynnościowy, *2* — przewodnictwo błony plazmatycznej (g_{co}), ψ_{co} — potencjał elektryczny błony plazmatycznej, ψ_{Na}, ψ_K — równoważny potencjał elektryczny dla jonów Na^+, K^+

http://rcin.org.pl

Opisany potencjał plazmolemy nosi nazwę potencjału spoczynkowego. Podrażnienie komórki bodźcem ponadprogowym, elektrycznym czy mechanicznym wprowadza komórkę w stan pobudzenia objawiający się zmianami potencjału błonowego, nazywanymi potencjałem czynnościowym. Pojawienie się potencjału czynnościowego interpretowane jest jako wynik zmian przepuszczalności plazmolemy. Chwilowy wzrost przepuszczalności prowadzi do ruchu jonów najbardziej odbiegających od stanu równowagi (wypływ jonów Cl^-), w nieco mniejszym stopniu następuje wpływanie do komórki jonów Na^+, jednakże zmieniający się na skutek ucieczki jonów Cl^- potencjał membranowy powoduje, że nie będące już w równowadze jony K^+ zaczynają również opuszczać komórkę. W czasie kilku sekund własności plazmolemy powracają do stanu wyjściowego, a działalność aktywnych mechanizmów transportu powoduje powrót poprzedniego stanu w składzie jonowym i w wielkości potencjału błonowego [32] (ryc. 7).

ROLA PLAZMOLEMY W BUDOWIE I DEGRADACJI ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

Ściana komórkowa zarówno pierwotna, jak i wtórna jest wysoce zorganizowaną strukturą złożoną z makrocząsteczek i zlokalizowaną poza granicami protoplastu. Rola plazmolemy zarówno w transporcie materiałów budulcowych ściany, jak i w jej organizacji strukturalnej jest więc ogromna, choć w wielu szczegółach nie w pełni jest wyjaśniona [64].

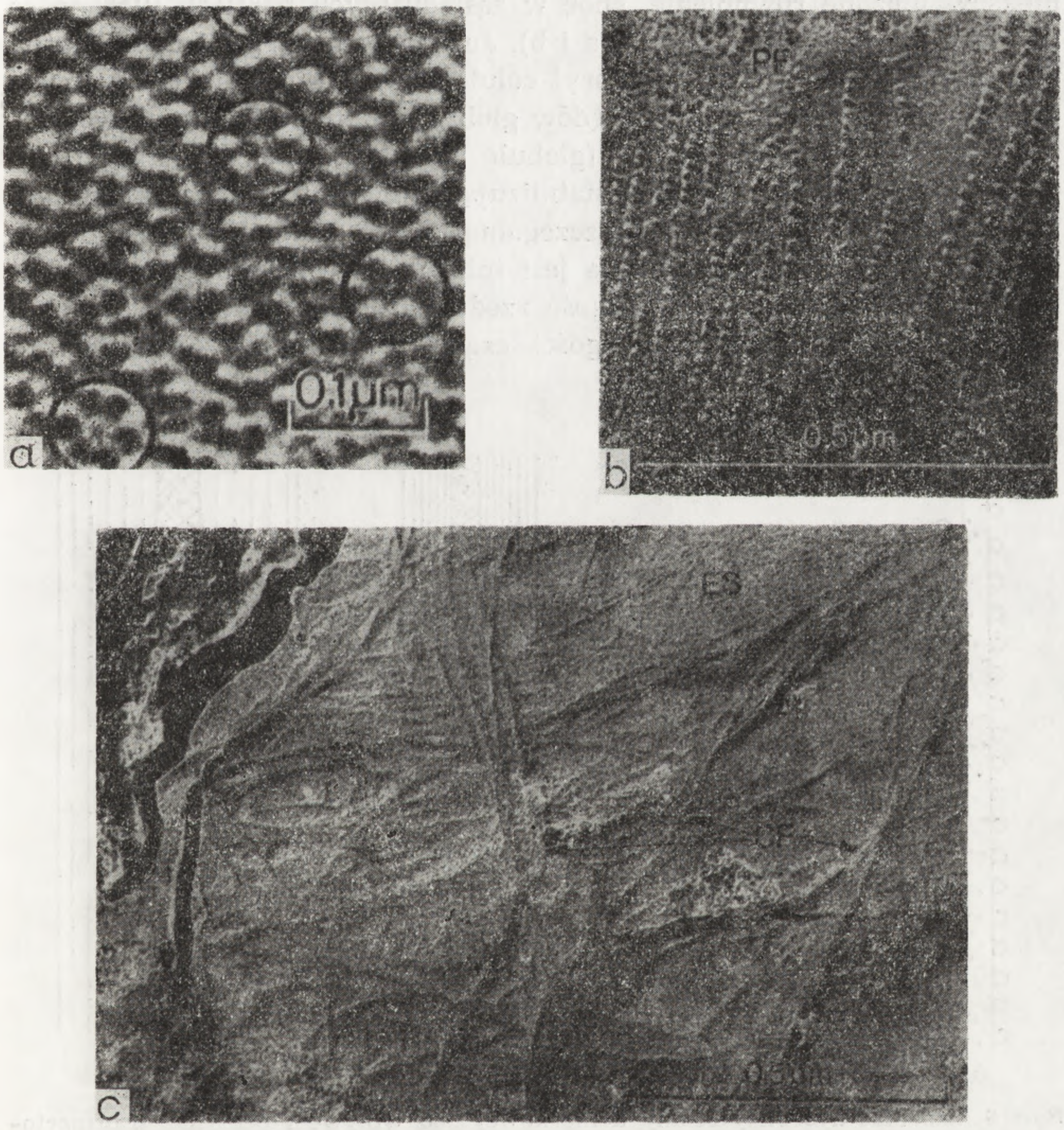
Podstawowym składnikiem budującym ścianę jest celuloza, której biosynteza rozpoczyna się od GDP-glukozy (u niektórych roślin od CDP- lub ADP-glukozy [51]). Wydaje się, że istotne etapy biosyntezy cząsteczki celulozy przebiegają poza protoplastem — ekstracelularnie. Jest sprawą nie rozstrzygniętą, czy fosforany nukleotydów glukozy wydzielane są drogą egzocytozy poza plazmolemę, gdzie odbywają się dalsze etapy syntezy, czy też polisacharydowe prekursory celulozy powstają w strukturach Golgiego [6] lub w siateczce śródplazmatycznej [62] i są następnie wydzielane poza protoplast. Natomiast pewne jest zlokalizowanie w plazmolemie syntetazy 1-4-glukanu, enzymu zdolnego do tworzenia wiązań 1-4-glukozydowych, typowych dla łańcucha celulozowego [63, 71].

Szczególnie dogodny obiekt dla śledzenia procesów tworzenia ściany komórkowej uzyskano ostatnio w izolowanych protoplastach. Nagi protoplast uzyskany drogą trawienia enzymatycznego ściany, pozostawiony w pożywce nie zawierającej enzymów litycznych, jest zdolny w ciągu kilku dni do odbudowy ściany komórkowej, przy czym poszczególne etapy tego procesu można śledzić metodami mikroskopii elektronowej,

http://rcin.org.pl

stosując kriorytownictwo powierzchniowe (freeze fracturing) oraz wgłębne (deep etching) [7, 20, 62], lub biochemicznymi [13].

Interesujące są szczególnie aspekty strukturalne procesu regeneracji, które rozpatrzymy na przykładzie protoplastów *Skimmia japonica* [62]. W błonie plazmatycznej świeżo wyizolowanych protoplastów stwierdzić można występowanie globularnych kompleksów białkowych (porównaj [59]) rozsianych mniej więcej równomiernie po całej po-

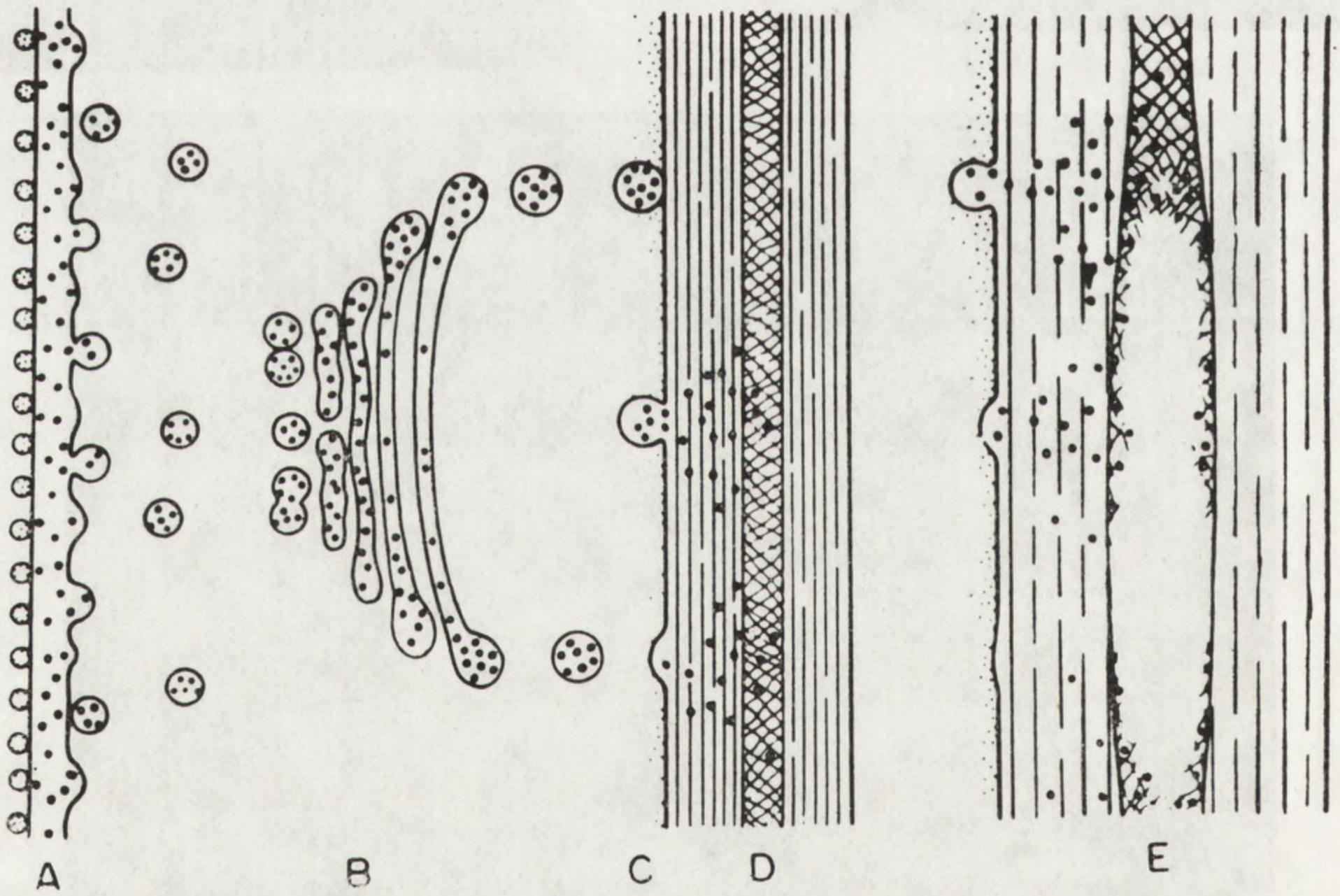


Ryc. 8. Odtwarzanie ściany komórkowej przez plazmolemę protoplastu otrzymanego z liścia *Skimmia japonica*, inkubowanego przez 72 godz. w medium zawierającym kinetypy i auksyny [62]

a — część powierzchni plazmolemy z heksagonalnym ułożeniem cząstek, *b* — układ cząstek w rzędach po 24-28 cząstek, *c* — zewnętrzna strona protoplastu (ES), widoczne fibryle celulozowe (CF)

http://rcin.org.pl

wierzchni komórki. Już po 4–6 godz. trwania regeneracji ściany komórkowej dają się zauważyć pierwsze symptomy reorganizacji tych kompleksów polegające na ich zagęszczeniu w nieregularnych polach. Po 24–48 godz. liczba globuli zwiększa się i dają się wyróżnić dwa rodzaje ich ułożenia. W niektórych polach układ ich staje się gęstszy, przy czym uwidacznia się tendencja do tworzenia heksagonalnych układów, w innych przy luźniejszym układzie tworzą się regularne rzędy kompleksów ułożone równolegle, choć w sąsiadujących partiach ułożone są pod różnym kątem [62] (ryc. 8 a i b). Już po 24 godz. stwierdzić można utworzenie pierwszych mikrofibryl celulozowych, których kierunek jest zgodny z kierunkiem układu rzędów globul w danym obszarze (ryc. 8c). O ile pierwszy rodzaj struktur (globule w układzie heksagonalnym) interpretowany jest jako szkielet stabilizujący kanały transportu substancji przez błonę [58, 62], o tyle na szczególną uwagę zasługują rzędy globul, gdyż w ich układzie zakodowana jest informacja o kierunku nowo tworzonej fibryli celulozowej. Długość rzędu złożonego z 12 do 30 globul jest mała w stosunku do długości cząsteczki celulozy. Struktura ta



Ryc. 9. Schemat hydrolizy ściany komórkowej pod wpływem pektynaz transportowanych przez plazmolemę drogą egzocytozy [1]

A — pęcherzyki zawierające nieczynną lub utajoną formę enzymów hydrolitycznych uwalniane są z szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, *B* — rozpłaszczają się w okolicy pęcherzyków diktiosomalnych, *C* — „dojrzała" forma diktiosomów tworzy pęcherzyki, które ulegają fuzji z plazmolemą, *D* — pęcherzyki przedostają się do ściany komórkowej, *E* — następuje hydroliza ściany

http://rcin.org.pl

funkcjonuje zatem nie tyle jako matryca, raczej jako „starter" syntezy wystarczający jednak dla nadania kierunku tworzonej mikrofibryli. Istnieją sugestie, że kierunek rzędów globul zgodny jest z kierunkiem przebiegu mikrotubul cytoplazmatycznych. Rzędy globul są zatem morfologicznym wyrazem systemu przenoszenia informacji strukturalnej z wnętrza komórki poza protoplast.

Drogą egzocytozy transportowane są na zewnątrz inne elementy strukturalne ściany, przede wszystkim białka (ekstensyny), a także białka enzymatyczne biorące udział w degradacji, np. blaszki środkowej [1] (ryc. 9).

Niektóre fakty skłaniają do twierdzeń, że błona plazmatyczna może zawierać enzymy hydrolityczne typu celulaz, które występują w tkankach liścieni kiełkujących nasion [36]. Istnieją sugestie odnośnie do udziału plazmolemy w uaktywnianiu glukanazy [22], świadczące o roli regulacyjnej tej błony dotyczącej enzymów hydrolizujących ścianę komórkową.

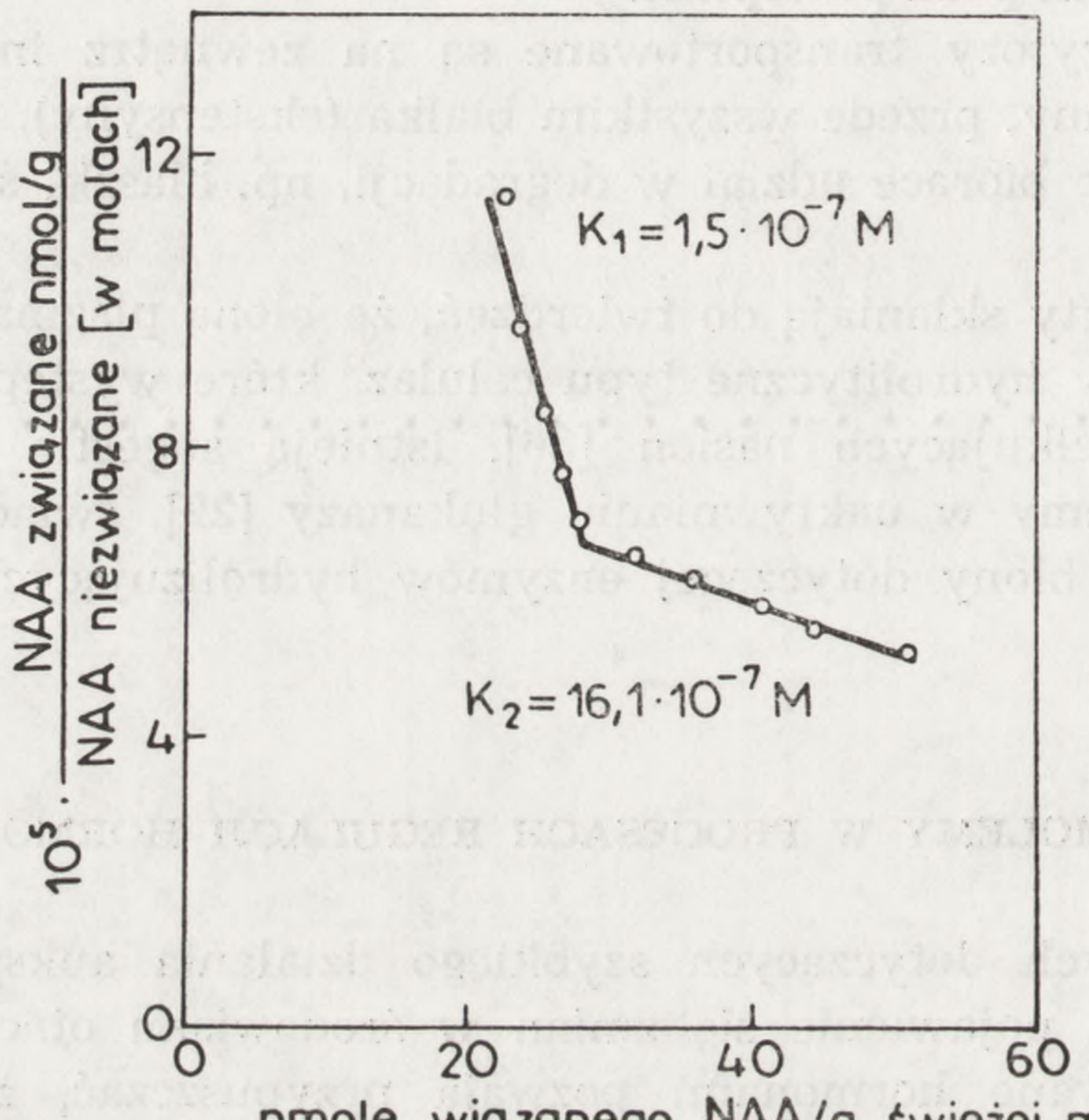
ROLA PLAZMOLEMY W PROCESACH REGULACJI HORMONALNEJ

Szereg danych dotyczących szybkiego działania auksyn na elongację komórek i pojawienie się zmian w środowisku otaczającym komórki potraktowane hormonami pozwala przypuszczać, że pierwotne miejsce działania auksyn znajduje się przy powierzchni komórki prawdopodobnie w plazmolemie. Sugestie bezpośredniego oddziaływania regulatorów wzrostu z błonami znalazły doświadczalną podstawę w fakcie, że preparat błon zdolny jest do wiązania zarówno inhibitora transportu auksyn N-1-naftylamidu kwasu ftalowego [39], jak i auksyn: kwasu 1-naftyloctowego i 3-indolilooctowego [29]. Studia nad kinetyką wiązania wykazały, że w surowej frakcji błon istnieją co najmniej dwa miejsca wiązania wykazujące wysokie, choć różne powinowactwo do auksyn [4, 5] (ryc. 10). Stałe dysocjacji określono odpowiednio: $16{,}1 \cdot 10^{-7}$ i $1{,}5 \cdot 10^{-7}$ M [4]. Później udało się stwierdzić, że pierwszy typ wiązania zlokalizowany jest w plazmolemie i odznacza się wysoką selektywnością wiązania przyłączając tylko aktywne auksyny, natomiast drugi — zlokalizowany w innych błonach — jest mniej aktywny i mniej selektywny, wiążąc także nieaktywne analogi auksyn [5]. Badania Williamsona i wsp. [72] pozwoliły na uszeregowanie różnego typu błon pod względem ilości związanych auksyn; plazmolema/tonoplast $>$ diktiosomy $\gg$ siateczka śródplazmatyczna $\gg$ mitochondria.

Oddziaływanie auksyn z plazmolemą prowadzi do powstania w tej błonie swoistych zmian strukturalnych. Morrè [53] wykazał, że grubość

http://rcin.org.pl

plazmolemy zmienia się po potraktowaniu i μM roztworem kwasu indolilooctowego 10–15% w stosunku do próby kontrolnej. Wprowadzenie do błony znacznika fluorescencyjnego N-fenylo-1-naftylaminy i następnie potraktowanie auksyną powoduje przedłużenie czasu fluorescencji oraz wzrost stopnia polaryzacji fluorescencji [27]. Dane te pozwalają

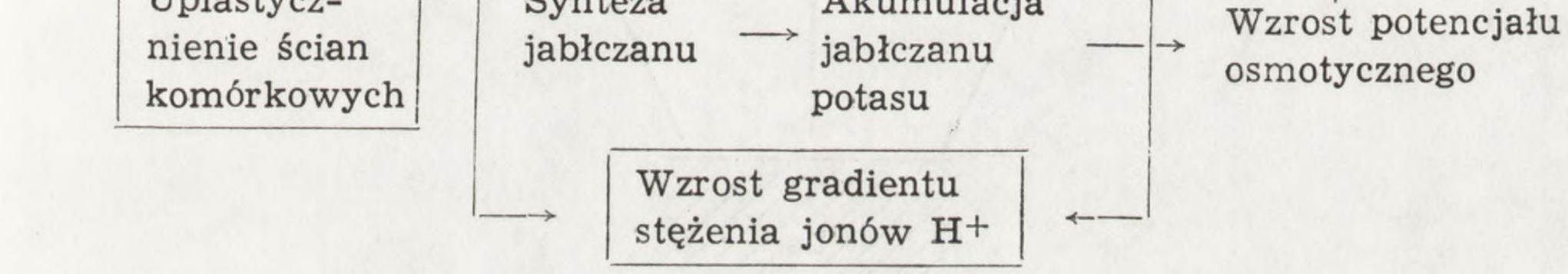


Ryc. 10. Analiza Scatcharda kinetyki wiązania ^{14}C kwasu 1-naftyloctowego (NAA) [4]

wnosić, że auksyny wywołują wzrost stopnia uporządkowania lipidowych komponentów błony, powodują wzrost lepkości lipidów i stabilizację ukierunkowania węglowodorowych łańcuchów lipidowych, co wpływa na zwiększenie orientacji znacznika fluorescencyjnego w błonie. Oddziaływanie auksyn z plazmolemą nie ogranicza się do wywołania zmian w strukturze fazy lipidowej błony. Prawdopodobnie znacznie ważniejszy jest regulacyjny wpływ auksyn na transport jonowy. Auksyny aktywują czynne pobieranie jonów K^+ oraz wydzielanie protonów, co prowadzi do hyperpolaryzacji elektrycznej błony i do zakwaszania obszaru zewnętrznego błony [48, 54]. Szczególnie przydatną w badaniach tego typu okazała się fuzikocyna — toksyna produkowana przez niektóre grzyby będąca dwuterpenowym glukozydem [3], którą można traktować jako regulator wzrostu typu auksyn wykazujący jednak znacznie większą aktywność niż naturalny kwas indolilooctowy. Dla fuzikocyny wykazano bezpośredni wpływ na ATPazę błonową zależną

http://rcin.org.pl

od jonów K^+ [47]. Istnieją przypuszczenia, że zakwaszanie zewnętrznego otoczenia plazmolemy wywołane działaniem zarówno naturalnych auksyn, jak i fuzikocyny jest czynnikiem zwiększającym rozciągliwość ścian komórkowych [48, 60]. Schematyczny model działania hormonów na system wymiany K^+/H^+ w plazmolemie i wiążące się z tym skutki fizjologiczne przedstawia ryc. 11.



Ryc. 11. Model działania aktywatorów i inhibitorów hormonalnych na system transportu K^+/H^+ i związane z tym działaniem skutki fizjologiczne [48]

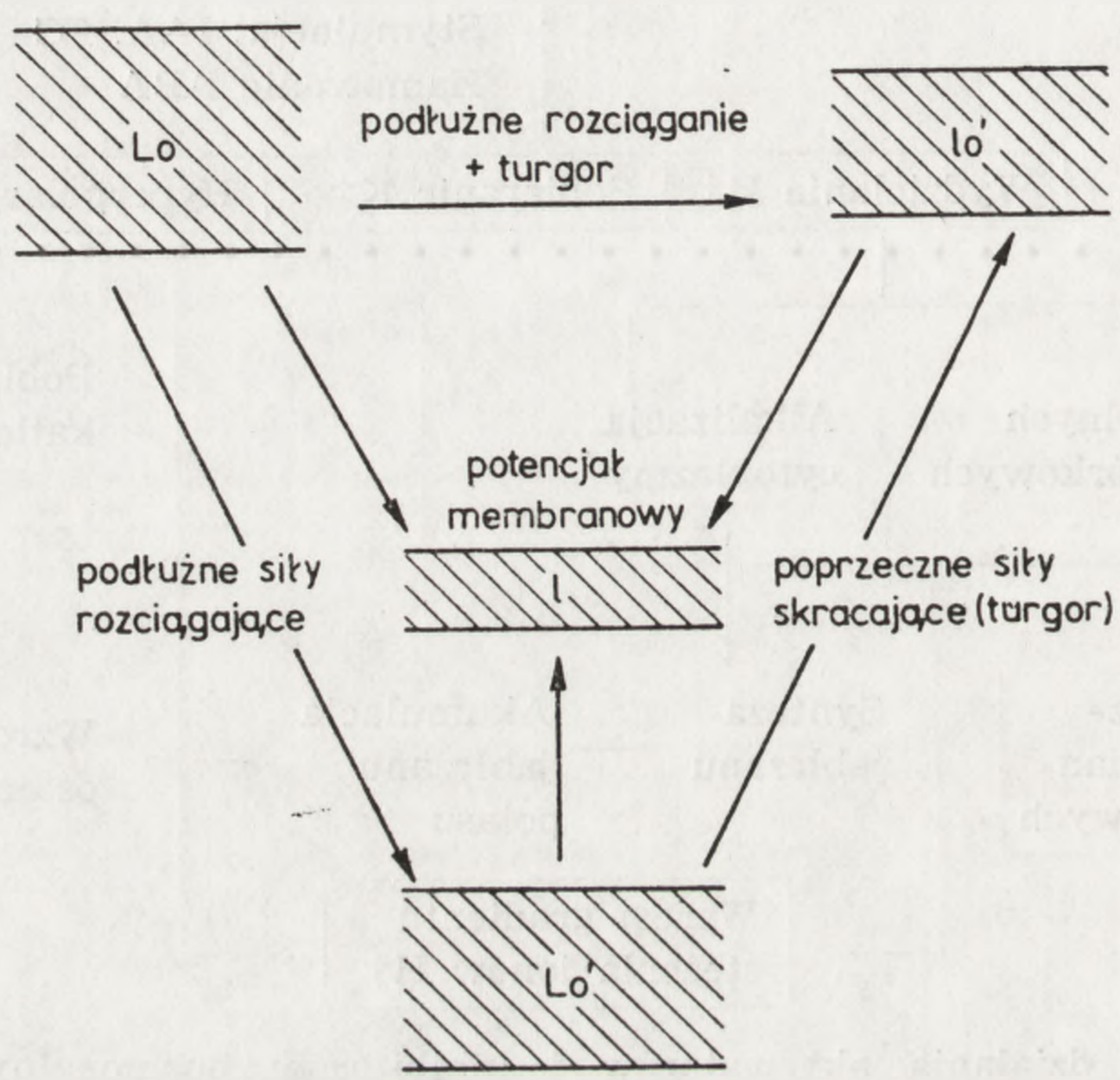
W niektórych wypadkach wpływ auksyn na metabolizm komórki zachodzi przy poważnym udziale plazmolemy. Działanie np. auksyn na wzrost aktywności jądrowej polimerazy RNA tłumaczy się w ten sposób, że auksyna wiążąc się z plazmolemą powoduje uwalnianie z tej błony hipotetycznego czynnika F, który przechodząc do przestrzeni jądrowej aktywuje działające tu polimerazy [9, 24].

ROLA PLAZMOLEMY W REGULACJI CIŚNIENIA TURGOROWEGO

Plazmolema jako struktura stanowiąca zewnętrzną granicę protoplastu i miejsce zlokalizowania mechanizmów transportu jonowego odgrywa zasadniczą rolę w regulacji osmotycznej komórki. Nasuwa się jednak pytanie, czy samo istnienie ciśnienia turgorowego, a więc i sił przyciskających błonę plazmatyczną do sztywnych ścian komórkowych,

http://rcin.org.pl

nie powoduje w plazmolemie zmian, które mogą bezpośrednio regulować turgor. Wiele danych sugeruje, że tak jest istotnie i że plazmolema pełni funkcję sensoryczną w stosunku do panującego aktualnie turgoru. Koncepcje te, rozwinięte w ostatnich latach przez Zimmermanna i wsp. [11, 12, 76, 77], opierają się na następujących argumentach. Błona plazmatyczna jest strukturą elastyczną i jej grubość może ulegać zmianie pod wpływem zarówno sił mechanicznych, jak i pola elektrycznego (ryc. 12). Jeżeli wyjściową grubość błony, która nie jest



Ryc. 12. Schemat zmian grubości plazmolemy pod wpływem sił mechanicznych rozciągających, ściskających (turgoru) oraz sił elektrycznych związanych z potencjałem błonowym — opis w tekście [11]

poddana żadnym napięciom, nazwiemy przez Lo, to grubość ta ulega zmniejszeniu pod wpływem wzdłużnych sił rozciągających (np. podczas wzrostu objętości komórki) do Lo', a szczególnie pod wpływem sił poprzecznych ściskających (będących np. wynikiem ciśnienia turgorowego) do lo'. Jeżeli dodatkowo istnieje potencjał membranowy, to siły elektryczne powodują dalsze zmiany grubości błony (l). Dowody na istnienie takich zmian strukturalnych w plazmolemie wynikają zarówno z rozważań teoretycznych nad własnościami mechanicznymi błony, która ma określony i mierzalny moduł elastyczności [11, 12], jak i z faktów doświadczalnych. Do tych ostatnich zaliczyć należy stwierdzenie, że potencjał przebicia zmniejsza się wraz ze wzrostem turgoru [11, 12], że zmiana turgoru wpływa na zmianę oporu elektrycznego plazmolemy [75] oraz że zmiana turgoru wywołuje zmiany potencjału spoczyn-

http://rcin.org.pl

kowego [76]. Ostatnio wykazano nawet, że nagłe zmiany ciśnienia turgorowego i to zarówno zwiększenie, jak i zmniejszenie mogą być przyczyną powstania potencjału czynnościowego [76].

Z drugiej strony, reakcja komórki na szok osmotyczny jest z reguły dwufazowa. Komórki pozbawione ściany, np. wolne protoplasty po przeniesieniu do hipo- lub hipertonicznego środowiska, reagują w przedziale sekundowym gwałtownym zmniejszeniem lub zwiększeniem objętości, po czym w czasie minut lub godzin wracają do poprzednio zajmowanej objętości. W komórkach otoczonych ścianą zmiany objętości są znikome, natomiast szok osmotyczny objawia się gwałtowną zmianą turgoru, który po dłuższym czasie powraca do stanu mniej więcej początkowego [77]. O ile powolne procesy są wynikiem osmoregulacji metabolicznej, o tyle szereg autorów widzi przyczynę zmian o szybkim charakterze nie tylko w osmotycznym transporcie wody, ale także w oddziaływaniu zmiany turgoru na własności plazmolemy. Można przypuszczać, iż zmiany strukturalne zachodzące w błonie prowadzą do zmian konformacyjnych enzymów, „zakrywania" lub „odkrywania" miejsc transportu jonów, co w drastyczny sposób zmienia warunki przepuszczalności błony.

PLAZMOLEMA A ZJAWISKA FOTORECEPCJI

Aktywność i lokalizacja dwóch najważniejszych systemów recepcyjnych komórki roślinnej, tj. systemu fitochromowego i flawinowego, wydaje się być związana z błonami. Dane o lokalizacji tych systemów można czerpać z dwóch kategorii eksperymentów: bezpośrednich analiz biochemicznych frakcji izolowanych błon i specyficznych reakcji na naświetlanie punktowe lub naświetlanie światłem liniowo spolaryzowanym. Już w 1967 r. Hendricks i Borthwich [28] wysunęli hipotezę, w myśl której działanie fitochromu w procesach rozwojowych i morfogenetycznych związane jest z modulowaniem przez fitochrom własności błony cytoplazmatycznej. Istnieje szereg danych eksperymentalnych wskazujących na to, że fitochrom, a szczególnie forma aktywna P_{FR} może być związana z błonami i modyfikować aktywność niektórych enzymów [57]. Natomiast w świetle danych analitycznych nie jest zagadnieniem ostatecznie rozstrzygniętym, czy fitochrom wiąże się z plazmolemą czy innymi błonami komórkowymi. Wcześniejsze prace [46, 73] sugerowały lokalizację fitochromu w plazmolemie. Z bardziej krytycznych ostatnich badań [74], w których poddano analizie nie tylko frakcję błon wzbogaconą w plazmolemę, ale cały profil gradientu rozdziału błon, wynika jednak, że fitochrom nie jest specyficznie zlokalizowany w plazmolemie.

http://rcin.org.pl

Natomiast szereg danych dotyczących reakcji komórki na światło spolaryzowane popiera tezę o umiejscowieniu fitochromu w plazmolemie. Ułożenie chromatoforów niektórych glonów *Mougeotia* i *Mesotenium* sterowane jest przez system fitochromowy, przy czym efekty wywołane światłem spolaryzowanym wskazują na ukierunkowanie cząsteczek fitochromu. Wektor absorpcji formy P_R ustawiony jest w płaszczyźnie plazmolemy i zorientowany jest helikoidalnie pod kątem 45° do osi komórki, natomiast wektor absorpcji formy P_{FR} ustawiony jest prostopadle do płaszczyzny plazmolemy [25, 26]. Również kierunek kiełkowania zarodników mchów, np. *Funaria* [33], lub kierunek wzrostu komórek przedroślowych niektórych paproci, np. *Driopteris* [16], naświetlanych światłem liniowo spolaryzowanym sugeruje ukierunkowanie fotoreceptora fitochromowego w plazmolemie. Sugestia ta jest natury pośredniej, ponieważ zakłada, że plazmolema jest jedyną dostatecznie stabilnie ukierunkowaną strukturą komórki, aby mogła zapewnić regularne ułożenie cząsteczek fotoreceptora.

Absorpcję światła w systemie flawinowym reguluje m. in. uzależnione od światła położenie chloroplastów w komórkach większości roślin. I w tym przypadku specyficzna odpowiedź komórki na światło liniowo spolaryzowane [49, 78, 79, 81] wykazuje, że fotoreceptor zlokalizowany jest blisko zewnętrznych granic protoplastu i ściśle ukierunkowany, co może dowodzić jego lokalizacji w plazmolemie. Również dotychczasowe dane analityczne wykazują na obecność flawin, a także cytochromu b, który wraz z układem flawinowym może tworzyć specyficzny łańcuch transportu elektronów we frakcji plazmolemy [35, 65].

Składam serdeczne podziękowanie profesorowi drowi Janowi Zurzyckiemu za cenne uwagi dotyczące niniejszego przeglądu.

LITERATURA

[1] ADDICOTT F. T., WIATR S. M., Hormonal controls of abscission: biochemical and ultrastructural aspects, [w] Plant Growth Regulation, red. P. E. Pilet, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1977, 249–257.

[2] BALKE N. E., SZE H., LEONARD R. T., HODGES T. K., Cation sensitivity of plasma membrane ATPase of oat roots, [w] Membrane Transport in Plants, red. U. Zimmermann, J. Dainty, Berlin, Heidelberg New York, Springer 1974.

[3] BALLIO A., BRUFANI M., CASINOVI C. G., CERRINI S., FEDELI W., PELLICCIARI R., SANTURBANO B., VACIAGO A., The structure of fusicoccin A., Experientia, **24**: 631–635, 1968.

[4] BATT S., WILKINS M. B., VENIS M. A., Auxin binding to corn coleoptile membranes: kinetics and specificity, Planta, **130**: 7–13, 1976.

http://rcin.org.pl

[5] BATT S., VENIS M. A., Separation and localization of two classes of auxin binding sites in corn coleoptile membranes, Planta, **130**: 15–21, 1976.
[6] BROWN R. M., FRANKE Jr. KLEINIG W. W., FALK H., SITTE P., Scale formation in chrysophycean algae. I. Cellulosic and noncellulosic wall components made by the Golgi apparatus, J. Cell Biol., **45**: 246–271, 1970.
[7] BURGESS J., FLEMING E. N., Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts, J. Cell Sci., **14**: 439–449, 1974.
[8] CASSAGNE C., LESSIRE R., CARDE J. P., Plasmalemma enriched fraction from leek (*Allium porrum* L.) epidermal cells, Plant Sci. Lett., **7**: 127–135, 1976.
[9] CLARC J. E., MORRÉ D. J., CHERRY J. H., YUNGHANS W. N., Enhancement of RNA polymerase activity by non-protein components from plasma membranes of soybean hypocotyls, Plant Sci. Lett., **7**: 233–238, 1976.
[10] COCKING E. C., Ferritin and tobacco mosaic virus uptake; and nuclear cytoplasmic relationship in isolated tomato fruit protoplast, Proc. Biochem. Soc., **28**: 1967.
[11] COSTER H. G. L., STEUDLE E., ZIMMERMANN U., Turgor pressure sensing in plant cell membranes, Plant Physiol., **58**: 636–643, 1976.
[12] COSTER H. G. L., ZIMMERMANN U., Transduction of turgor pressure by cell membrane compression, Z. Naturforsch., **31c**: 461–463, 1976.
[13] COUTTS R. H. A., GROUT B. W. W., Early stages in cell wall regeneration of tobacco mesophyll protoplasts an electrophoretic study, Plant Sci. Lett., **4**: 103–107, 1975.
[14] DECKER M., TANNER W., Respiratory increase and active hexose uptake of *Chlorella vulgaris*, Biochim. Biophys. Acta, **266**: 661–669, 1972.
[15] DREW M. C., SEEAR J., McLAREN A. D., Entry of basic macromolecules into barley roots, Amer. J. Bot., **57**: 837–843, 1970.
[16] ETZOLD H., Der Polarotropismus und Phototropismus der Chloronemen von *Dryoptreis filix max* (L) Schott, Planta, **64**: 254–280, 1965.
[17] FISHER J., HODGES T. K., Monovalent ion stimulated adenosine triphosphatase from oat roots, Plant Physiol., **44**: 385–395, 1969.
[18] FISHER J., HANSEN D., HODGES T. K., Corelation between ions fluxes and ion-stimulated adenosine triphosphatase activity of plant roots, Plant Physiol., **46**: 812–814, 1970.
[19] FISCHER E., LÜTTGE U., HIGINBOTHAM M., Effect of cyanide on plasmalemma potential of *Mnium*, Plant Physiol., **58**: 240–241, 1976.
[20] FOWKE L. C., BECH-HANSEN C. W., GAMBORG O. L., Electron microscopic observations of cell regeneration from cultured protoplasts of *Ammi visnaga*, Protoplasma, **79**: 235–248, 1974.
[21] GAFFEY C. T., MULLINS L. J., Ion fluxes during the action potential in *Chara*, J. Physiol., **144**: 505–524, 1958.
[22] GOLDBERG R., On possible connections between auxin induced growth and cell wall glucanase activities, Plant Sci. Lett., **8**: 233–242, 1977.
[23] GOODMAN S. L., WHEELER K. P., Ouabain binding to phospholipid-dependent adenosine triphosphatase, Biochem. J., **169**: 313–320, 1978.
[24] HARDIN J. W., CHERRY J. H., MORRÉ D. J., LEMBI C. A., Enhancement of RNA polymerase activity by a factor released from plasma membrane. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**: 3146–3150, 1972.

http://rcin.org.pl

[25] HAUPT W., Die Orientierung der Phytochrom-Moleküle in der Mougeotiazelle: Ein neues Modell zur Darstellung der experimentallen Befunde, Z. Pflanzenphysiol., 58: 331–346, 1968.
[26] — Localization of phytochrome within the cell, [w] Phytochrome, red. K. Mitrakos, W. Shropshire, Academic Press 1972, 553–569.
[27] HELGERSON S. L., CRAMER W. A., MORRÉ D. J., Evidence for an increase in microviscosity of plasma membranes from soybean hypocotyls induced by the plant hormone indole 3 acetic acid, Plant Physiol., 58: 548–551, 1976.
[28] HENDRICKS S. B., BORTHWICK H. A., The function of phytochrome in regulation of plant growth, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58: 2125–2130, 1967.
[29] HERTEL R., THOMSON K., RUSSO V. E. A., In vitro auxsin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles, Planta, 107: 325–340, 1972.
[30] HODGES T. K., LEONARD R. T., BRACKER C. E., KEENAN T. W., Purification of an ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots; Association with plasma membranes, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69: 3307–3311, 1972.
[31] HODGES T. K., ATPases associated with membranes of plant cells [w] Encyclopedia of Plant Physiology Transport in Plants II, red. U. Lüttge, M. G., Pitman, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 260–283.
[32] HOPE A. B., WALKER N. A., The physiology of giant algal cells, Cambridge CUP, 1975.
[33] JAFFE M. J., Phytochrome-mediated bioelectical potentiale in the mong bean seedlings, Science, 162: 1016–1017, 1968.
[34] JENSEN W. A., McLAREN A. D., Uptake of proteins by plant cells: The possible occurrence of pinocytosis in plants, Exp. Cell Res., 19: 414–417, 1960.
[35] JESAITIS A. J., HENERS P. R., HERTEL R., BRIGGS W. R., Characterization of a membrane fraction containing a *b*-type cytochrome, Plant Physiol., 59: 941–947, 1977.
[36] KOEHLER D. E., LEONARD R. T., Van Der WOUDE W. J., LINKINS A. E., LEWIS L. N., Association of latent cellulase activity with plasma membrane from kidney bean abscission zones, Plant Physiol., 58: 324–330, 1976.
[37] KOMOR E., TANNER W., Characterization of the active hexose transport system of *Chlorella vulgaris*, Biochim. Biophys. Acta, 241: 170–179, 1971.
[38] — The hexose-proton cotransport system of *Chlorella* pH. Specificity stoichiometry and energetics of sugar-induced proton uptake, Europ. J. Biochem., 44: 219–233, 1974.
[39] LEMBI C. A., MORRÉ D. J., THOMSON K. St., HERTEL R., N-1Naptylphthalamic-acid-binding activity of plasma membrane-rich fraction from maize coleoptiles, Planta, 99: 37–45, 1971.
[40] LEONARD R. T. HANSEN D., HOGES T. K., Membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots, Plant Physiol., 51: 749–754, 1973.
[41] LEONARD R. T., Van Der WOUDE W. J., Isolation of plasma membranes from corn roots by sucrose density gradient centrifugation an anomalous effect of ficoll, Plant Physiol., 57: 105–114, 1976.
[42] LÜTTGE U., ZIRKE G., Attemps to measure plasmalemma and tonoplast electropotentials in small cells of *Mnium* using centrifugation techniques, J. Membr. Biol., 18: 305–314, 1974.
[43] MAHLBERG P. G., TURNER F. R., WALKINSHAW C., VENKETESWARAN S., Ultrastructural studies plasma membrane releated secondary vacuoles in cultured cells, J. Membr. Biol., 61: 730–738, 1974.
[44] MALONE C. P., BURKE J. J., HANSON J. B., Histochemical evidence for

http://rcin.org.pl

the occurrence of oligomycin-sensitive plasmalemma ATPase in corn roots, Plant Physiol., **60**: 916–922, 1977.

[45] MATILE Ph., The lytic compartment of plant cells, [w] Cell Biology Monographs 1, Springer Verlag, Vien 1975.

[46] MARMÈ D., BOISARD J., BRIGGS W. R., Binding properties in vitro of phytochrome to membrane fraction, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**: 3861–3865, 1973.

[47] MARRÈ E., LADO P., RASI-CALDOGNO F., COLOMBO R., De MICHELIS M. J., Evidence for the coupling of proton extrusion to K^+ uptake in pea internode segments treated with fusicoccin or auxin, Plant Sci. Lett., **3**: 365–379, 1974.

[48] MARRÈ E., Membrane activities as regulating factors for plant cell functions, Biol. Cellulaire, **32**: 19–24, 1978.

[49] MAYER F., Lichtorientierte Chloroplasten-Verlagerungen bei *Selaginella martensii*, Z. Bot., **52**: 346–381, 1964.

[50] MAYO M. A., COCKING E. C., Pinocytotic uptake of polystyrene latex particles by isolated tomato fruit protoplasts, Protoplasma, **68**: 223–230, 1969.

[51] METZNER H., Biochemie der Pflanzen, F. Enke Verlag, Stuttgart 1973.

[52] MORI S., YUMOTO S., The mechanism of protein uptake in plant cells: Possible involvement of phagocytosis, J. Cell. Biol., **20**: 2, 1976.

[53] MORRÈ D. J., BRACKER C. E., Ultrastructural alteration of plant plasma membranes induced by auxin and calcium ions, Plant Physiol., **58**: 544–547, 1976.

[54] MORRÈ D. J., CHERRY J. H., Auxin hormone — plasma membrane interactions, [w] Plant Growth Regulation, red. P. E. Pilet, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1977, 35–43.

[55] NISHIZAWA N., MORI S., Invagination of plasmalemma: Its role in the absorption of macromolecules in rice roots, Plant Cell Physiol., **18**: 767–782, 1977.

[56] NOBEL P. S., Plant Cell Physiology a Physicochemical Approach, W. H. Freeman and Company, San Francisco 1970, 1–111.

[57] PENEL C., GREPPIN H., BOISARD J., In vitro photomodulation of a peroxidase activity through membrane-bound phytochrome, Plant Sci. Lett., **6**: 117–121, 1976.

[58] PERACCHIA C., Excitable membrane ultrastructure. I. Freeze fracture of crayfish axons. J. Cell Biol., **61**: 107–122, 1974.

[59] POLAŃSKI M., Plazmolema komórki roślinnej. I. Morfologia, izolacja i struktura, Post. Biol. Kom., **6**: 31–49, 1979.

[60] RAYLE D. L., CLELAND R., Control of plant cell enlargement by hydrogen ions, [w] Current Topics in Developmental Biology, red. A. A. Moscona, A. Monroy, Acad. Press, New York 1977, 187–211.

[61] RAVEN J. A., SMITH F. A., Characteristics, functions and regulation of active proton extrusion, [w] Regulation of Cell Membrane Activities in Plants, red. E. Marrè, O. Ciferri, 1977, 25–40.

[62] ROBENEK H., PEVELING E., Ultrastructure of cell wall regeneration of isolated protoplast of *Skimmia japonica* thunb, Planta, **136**: 135–145, 1977.

[63] ROBINSON D. G., PRESTON R. D., Polysaccharide synthesis in Mung bean roots an x-ray investigation, Biochim. Biophys. Acta., **273**: 336–345, 1972.

[64] ROLAND J. C., The relationship between the plasmalemma and the plant cell wall, Int. Rev. Cytol., **36**: 45–92, 1973.

http://rcin.org.pl

[65] SCHMIDT W., THOMSON K., BUTLER W. L., Cytochrome b in plasma enriched fractions from several photoresposive organisms, Photochem. Photobiol., **26**: 407–411, 1977.
[66] SCHULTZ S. G., CURRAN P. F., Coupled transport of sodium and organic solutes, Physiol. Revs., **50**: 637–718, 1970.
[67] SEASTON A., INKSON C., EDDY A. A., The absorption of protons with specific amino acids and carbohydrates by yeast, Biochem. J., **134**: 1031–1043, 1973.
[68] SLAYMAN C. L., SLAYMAN C. W., Depolarization of the plasma membrane of *Neurospora* during active transport of glucose: evidence for a proton-dependent cotransport system, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**: 1935–1939, 1974.
[69] TANER W., KOMOR E., FENZL F., DECKER M., Sugar-proton cotransport system [w] Regulation of Cell Membrane Activities in Plants, red. E. Marrè, O. Ciferri, Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1977, 79–90.
[70] ULRICH J. M., McLAREN A. D., The absorption and translocation of ^{14}C-labeled proteins in young tomato plants, Amer. J. Bot., **52**: 120–125, 1965.
[71] Van Der WOUDE W. J., LEMBI C. A., MORRÈ D. J., ORDIN J., KINDINGER J., ORDIN L., β-glucan synthetase of plasma membrane and Golgy apparatus from onion stem, Plant Physiol., **54**: 333–340, 1974.
[72] WILLIAMSON F. A., MORRÈ D. J., HESS K., Auxin binding activities of subcellular fractions from soybean hypocotyls, Cytobiologie, **16**: 63–71, 1977.
[73] YU R., Distribution of phytochrome in subcellular fractions from maize coleoptiles following glutaraldehyde treatment, Austr. J. Plant Physiol., **2**: 273–279, 1975.
[74] YU R., CARTER J., OSAWA T., Separation of particulate phytochrome and plasma membranes of maize coleoptiles by density gradient centrifigation, J. Exp. Bot., **27**: 294–302, 1976.
[75] ZIMMERMANN U., STEUDLE E., The pressure dependence of the hydraulic conductivity, the membrane resistance and membrane potential during turgor pressure regulation in *Valonia utricularis*, J. Membr. Biol., **16**: 331–352, 1974.
[76] ZIMMERMANN U., BECKERS F., Generation of action potentials in *Chara coraliana* by turgor pressure changes Planta, **138**: 173–179, 1978.
[77] ZIMMERMANN U., Physics of turgor and osmoregulation, Ann. Rev. Plant Physiol., **29**: 121–148, 1978.
[78] ZURZYCKI J., Properties and localization of the photoreceptor active in displacements of chloroplasts in *Funaria hygrometrica*. I. Action spectrum, Acta Soc. Bot. Polon., **36**: 133–142, 1967.
[79] — Properties and localization of the photoreceptor active in displacements of chloroplasts in *Funaria hygrometrica*. II. Studies with polarized light, Acta Soc. Bot. Polon., **36**: 143–152, 1967.
[80] — Changes of the transmembrane potential of leaf cell of *Funaria hygrometrica* under influence of light, Acta Soc. Bot. Polon., **37**: 519–531, 1968.
[81] ZURZYCKI J., LELĄTKO Z., Action dichroizm in the chloroplasts rearrangements in various plant species, Acta Soc. Bot. Polon., **38**: 493–506, 1969.

Otrzymano: 6 maja 1979.
Przyjęto: 30 czerwca 1979.

Adres autora: ul. Grodzka 53, 31-001 Kraków.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 4, 1979 (307 - 320)

SEGREGACJA RDZENI NUKLEOSOMÓW W CZASIE REPLIKACJI DNA

SEGREGATION OF NUCLEOSOME CORES DURING DNA REPLICATION

Halina KONONOWICZ

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii UŁ

Streszczenie. Problem segregacji histonów w czasie replikacji DNA budzi wiele kontrowersji. Przedmiotem badań głównie biochemicznych są zagadnienia rozmieszczenia nowo zsyntetyzowanych histonów w trakcie replikacji DNA, rozdziału i ewentualnych przemieszczeń histonów syntetyzowanych w poprzednim cyklu komórkowym pomiędzy potomne cząsteczki DNA oraz istnienie puli wolnych histonów i ich udziału w strukturze chromatyny. Przedstawiono 3 podstawowe modele segregacji histonów w trakcie replikacji DNA: konserwatywny, semikonserwatywny i przypadkowy. W świetle ostatnich badań najmniej wątpliwości budzi zdaniem autorki model nieprzypadkowej segregacji nukleosomów.

Summary. The problem of histone segregation during DNA synthesis is controversical. The current research, which is mainly biochemical, puts the question of deposition of histones synthesized de novo in the course of DNA replication, their distribution, and the possible translocation of histones synthesized during the preceding cell cycle among the daughter DNA strands, as well as the existence of the pool of free histones, and their role in the maintenance of chromatin structure. Three basic models of histone segregation during DNA synthesis have been presented: conservative, semiconservative, and random. In the light of recent studies, the author pronounces her opinion that at present, the non-random nucleosome segregation seems to be most probable.

Podwojenie chromosomów u eukariota jest wysoce złożonym procesem obejmującym nie tylko replikację materiału genetycznego (DNA), ale także równoczesną syntezę histonów oraz łączenie DNA i białek histonowych w dezoksyrybonukleoproteinowe kompleksy chromatyny.

Badania ostatnich lat przyniosły wiele danych, które zmieniły pogląd na strukturę i organizację chromatyny. W skład fibryli chromatynowej wchodzą powtarzalne jednostki — nukleosomy, których rdzeń

http://rcin.org.pl

zawiera po dwie cząsteczki czterech rodzajów histonów (H2A, H2B, H3 i H4) tworzących oktamer. Każdy taki rdzeń jest połączony z DNA o długości 140 par zasad. Sąsiadujące ze sobą nukleosomy łączy międzynukleosomowy DNA zawierający 40 par zasad. Te międzynukleosomowe odcinki DNA związane są jedynie z histonem H1. Chromatyna ma więc strukturę „koralików na sznurku".

Przebieg replikacji DNA i syntezy białek histonowych w czasie fazy S są obecnie stosunkowo dobrze poznane, natomiast proces łączenia się nowo zsyntetyzowanego DNA z histonami budzi wiele kontrowersji. Problem ten stał się przedmiotem licznych badań po przyjęciu koncepcji nukleosomowej budowy fibryli chromatynowych.

CZY HISTONY ISTNIEJĄ W CZASIE REPLIKACJI?

Postęp w zrozumieniu struktury chromatyny umożliwił nowe spojrzenie na proces replikacji i tranksrypcji. Powstało pytanie, czy w momencie kiedy polimeraza (DNA lub RNA) łączy się z DNA nukleosomów histony oddysocjowują od DNA, czy też pozostają związane z nim w ciągu całego procesu replikacji. Jeżeli nukleosomy pozostawałyby zasocjowane z DNA, musi istnieć mechanizm, który umożliwiłby proces replikacji na podstawie wzorca DNA połączonego z białkami [29].

Hancock [12] w badaniach prowadzonych na komórkach myszy P 815, które znakowane były ^{14}C-lizyną i ^{3}H-tymidyną, wykazał, że histony po inkorporacji do nowo utworzonej chromatyny zachowywane są przez co najmniej osiem pokoleń.

Dane wykazujące obecność nukleosomów w nowo zreplikowanym DNA pozwalają sądzić [29], że ich składnik białkowy pozostaje związany z DNA podczas replikacji. Seale [28] uważa, że musiałyby być one w jakiś sposób zmienione przez replikujący kompleks. Autor ten bierze również pod uwagę inne możliwości: nukleosomy znajdujące się w obszarze rozdzielających się nici DNA mogłyby bądź pozostawać w jednej nici, bądź mogłyby chwilowo być odłączane, a ponowne połączenie ich z DNA następowałoby po zakończeniu replikacji. Dalsze badania tego autora [29] prowadzone na jądrach komórek HeLa wykazały, że nowo zreplikowany DNA był dwukrotnie bardziej wrażliwy na trawienie nukleazą *Micrococcus* niż DNA chromatyny po fazie S. Analiza produktów pośrednich trawienia enzymatycznego doprowadziła do wniosku, że nowo zreplikowany DNA odporny na nukleazę wchodził w skład nukleosomu. Jednak ten nowy DNA wykazywał odstępy między nukleosomami podobne, ale nie identyczne z tymi, jakie występują w macierzystej chromatynie. Ponadto autor sugeruje, że nukleosom związany

http://rcin.org.pl

z nowo zreplikowanym DNA wykazuje różnice w samej strukturze swego rdzenia. Sugestie te zostały oparte na stwierdzeniu, że produkty pośrednie trawienia nukleazami chromatyny trypsynowanej były podobne do produktów pośrednich otrzymanych w wyniku trawienia chromatyny nowo zreplikowanej. Ponieważ trawienie trypsyną, selektywnie degraduje krańce NH_2-terminalne nukleosomalnych histonów, autor przypuszcza, że konformacyjne zmiany zachodzące podczas replikacji mogą wynikać z rozluźnienia kompleksu DNA-białko poprzez neutralizację NH_2-terminalnych krańców cząsteczek histonów, podczas gdy kompleks globularny rdzeń-DNA pozostawałby nienaruszony. Neutralizacja ładunków mogłaby zachodzić w drodze takich procesów, jak acetylacja lub metylacja. To rozluźnienie więzi między DNA i histonami powodowałoby dostępność DNA dla enzymów bez usuwania czy uszkadzania rdzenia nukleosomu. Seale zakłada, że takie zmiany byłyby łatwo odwracalne. Badania produktów trawienia enzymatycznego [35] potwierdziły te przypuszczenia i wykazały, że aktywne geny są związane z histonami w podjednostki o konformacji zmienionej w porównaniu z genami nieaktywnymi.

Fakt, że histonowe oktamery pozostają zasocjowane z DNA in vivo przez szereg pokoleń [17] pozwala przypuszczać, że rozpad nukleosomu nie jest warunkiem niezbędnym w procesie replikacji DNA. Felsenfeld [5] nie wyklucza jednak odłączania nukleosomów i ponownego połączenia się ich z DNA.

KONTROLA SYNTEZY HISTONÓW

Synteza histonów zachodzi w fazie S cyklu komórkowego i ustaje wraz z zakończeniem replikacji DNA. Proces synchronizacji syntezy DNA i histonów w czasie cyklu komórkowego zachodzi w obu kierunkach, tzn. zahamowanie syntezy DNA hamuje syntezę histonów, a zablokowanie syntezy histonów zwalnia o połowę szybkość syntezy DNA [3, 13, 33]. Badania synchronicznie dzielących się komórek merystemów korzeniowych cebuli [8] wykazały, że synteza histonów jest konieczna dla zainicjowania fazy S. Powtarzalność sekwencji DNA kodujących histony umożliwia syntezę dużej ilości histonów w krótkim czasie.

Wiele dowodów wskazywało na istnienie powiązania między syntezą histonowego mRNA a replikacją DNA. Histonowy mRNA był wykrywany w cytoplazmie komórek podczas replikacji DNA [2]. Przy zahamowaniu syntezy DNA histonowy mRNA akumuluje się jako wolny mRNA w cytoplazmie i ulega szybkiemu rozpadowi [1, 2, 7, 21]. Sugerowano, że ten rodzaj mRNA jest syntetyzowany podczas pierwszych

http://rcin.org.pl

godzin po rozpoczęciu fazy S i jest stabilny tylko podczas tej fazy cyklu, a następnie ulega szybkiemu rozpadowi.

Melli i wsp. [18] badali syntezę histonowego mRNA w komórkach HeLa w różnych fazach cyklu komórkowego. Badania te wykazały, że sekwencje histonowego mRNA są produkowane przez cały cykl komórkowy w jądrze, natomiast w cytoplazmie mogą być wykrywane tylko w czasie trwania fazy S. Wykazany brak powiązania między syntezą histonowego mRNA i replikacją DNA sugeruje, że proces regulacji determinujący obecność lub brak tego mRNA nie zachodzi na poziomie transkrypcji. Jest prawdopodobne, że specyficzna i regulowana degradacja histonowego mRNA ma miejsce w cytoplazmie w czasie, kiedy nie zachodzi synteza DNA [21]. Obserwowany wzrost koncentracji histonów w cytoplazmie po zablokowaniu syntezy DNA może stanowić pierwszy sygnał w mechanizmie warunkującym równoczesność syntezy histonów i DNA [21].

PRZEMIESZCZANIE HISTONÓW W CZASIE FAZY S

Histony po zsyntetyzowaniu w cytoplazmie komórek w fazie S przenoszone są do jądra z dużą szybkością [19, 23]. Badania prowadzone w celu wyjaśnienia dalszych losów jakim podlegają histony po wniknięciu do jądra wykazały, że w czasie 3–30 min większość nowo zsyntetyzowanych histonów jest zasocjowana z DNA w nukleosomach [4, 12, 16, 30].

Istnieje jednak szereg sprzecznych poglądów dotyczących miejsca tej asocjacji. Wiele danych przemawia za tym, że nowo zsyntetyzowane histony w czasie 3–30 min po syntezie są kompleksowane z DNA nie podlegającym aktualnie replikacji [12, 16, 27], jednocześnie nowo zreplikowany DNA jest całkowicie [8] lub częściowo połączony z histonami [14]. Dane te skłoniły do wysunięcia hipotezy, w myśl której nowo zsyntetyzowany DNA łączy się z histonami syntetyzowanymi w poprzednim cyklu komórkowym [12, 16, 27]. Wielu autorów sugerowało również istnienie puli histonów, które mogły być deponowane w jądrze poza chromatyną. Dla sprawdzenia istnienia takiej puli białek, Searle i Simpson [30] przeprowadzili badania z zastosowaniem cykloheksimidu. Inkorporacja pulsowo podawanych aminokwasów wykazała, że specyficzna aktywność histonów w jądrze wzrasta do 60 min po zahamowaniu syntezy białek, co autorzy uznali za dowód wspierający ich hipotezę. Jednak wykazanie obecności „nagiego" DNA w obecności cykloheksimidu stanowiło poważny argument podważający występowanie puli wolnych histonów. Badania prowadzone na komórkach zainfekowanych wi-

http://rcin.org.pl

rusem SV40 wykazały, że DNA syntetyzowany w tych warunkach nie jest zasocjowany z białkami [9]. Podobnie, ostatnie badania z zastosowaniem techniki mikroskopii elektronowej [22] sugerują, że replikacja DNA w obecności cykloheksimidu prowadzi do powstania długich nici pozbawionych nukleosomów, tj. wolnego DNA. Na podstawie tych danych nasuwa się przypuszczenie, że pula białek histonowych — jeżeli istnieje — musi być niezmiernie mała.

Fakt łączenia się nowo zsyntetyzowanego DNA z histonami pochodzącymi z poprzedniego cyklu komórkowego sugeruje konieczność przemieszczania białek chromatynowych podczas replikacji DNA. Seale [27] proponuje dwa możliwe mechanizmy zapewniające przemieszczanie się białek. Jeden z tych mechanizmów polegałby na przesuwaniu się białek histonowych wzdłuż cząsteczki DNA wraz z postępującym procesem replikacji. W wyniku funkcjonowania takiego mechanizmu musiałyby powstawać odcinki nagiego DNA za widełkami replikacyjnymi. Jednak liczne badania [4, 26, 30] wykazały brak odcinków nagiego DNA w replikującej chromatynie. Inny mechanizm mógłby polegać nie na przesuwaniu się histonów podczas replikacji DNA, ale na ich odłączaniu się od DNA i ponownym przyłączaniu do zreplikowanego, nagiego DNA [22]. Badania Jacksona i wsp. [16] sugerują, że nowo zsyntetyzowane histony nie są deponowane w określonych strefach w pobliżu widełek replikacyjnych, lecz są przypadkowo rozmieszczane na DNA. Umieszczenie nowych histonów w sąsiedztwie widełek replikacyjnych musiałoby powodować zmiany w gęstości frakcji chromatynowych, co nie było obserwowane. Pomimo że migrujące z cytoplazmy (tj. nowo zsyntetyzowane) histony nie wiążą się z nowo zsyntetyzowanym DNA, łączy się on bardzo szybko z białkami. Fakt ten wymienieni autorzy tłumaczą wiązaniem niezwykle dużej ilości białek niehistonowych z DNA.

Późniejsze badania, prowadzone przez Hancocka [12] na jądrach komórek myszy P 815 z zastosowaniem metody podwójnego znakowania nowych nukleosomów ^{3}H-argininą (histony) i ^{125}I-jododezoksyurydyną (DNA) oraz trawienia nukleazą *Micrococcus* dla uwolnienia nukleosomów, dostarczyły podobnych informacji. Wykazano bowiem, że nowy DNA i nowe histony były już po 3 min od ich syntezy zespolone w strukturach nukleosomowych oraz że nowo zsyntetyzowane histony w czasie 3–30 min są związane głównie z niereplikującym DNA. Hancock przypuszcza, że nowo utworzony DNA jest dopełniany histonami, które migrują z innych obszarów chromatyny. Ze względu na duże powinowactwo nukleosomów do DNA, liniowa migracja wydaje się autorowi bardziej prawdopodobna niż wspomniany proces odłączania i ponownego przyłączania histonów.

http://rcin.org.pl

Liniowa migracja multimerów białkowych wzdłuż DNA nie jest zjawiskiem niezwykłym, jest bowiem dobrze znana w wypadku polimerazy RNA. Natomiast interesującym aspektem migracji histonów z odległych regionów chromatyny jest możliwość powodowania przez ten proces zmian konformacyjnych w tych regionach [9]. Hancock [12] sugeruje, że taka liniowa migracja może mieć duże znaczenie i powinna być brana pod uwagę przy rozważaniu regulacji transkrypcji.

Natomiast odmienne dane przedstawili Riley i Weintraub [22], którzy wykazali, że przemieszczanie się histonów nie zachodzi w badanym przez nich okresie, tj. w ciągu 18 godz. Przeciwko procesowi przemieszczania się histonów przemawia także fakt występowania wolnego DNA w komórkach traktowanych cykloheksimidem.

ROZMIESZCZENIE HISTONÓW NA NOWYM DNA

Badania dotyczące sposobu i miejsca tworzenia nowych nukleosomów, a także segregacji już istniejących, dostarczyły wielu sprzecznych informacji. Trudności w rozstrzygnięciu tego problemu są w dużym stopniu natury metodycznej. Sposób odróżnienia wcześniej występujących histonów od nowo zsyntetyzowanej chromatyny na podstawie metody znakowania DNA jododezoksyurydyną polega na niewielkich różnicach w gęstości tych dwóch frakcji nukleoproteinowych [11]. Rozdział dwóch pasm DNA z zachowaniem histonów znajdujących się w chromatynie natywnej jest praktycznie niemożliwy ze względu na konieczność stosowania wysokiego pH, które powoduje denaturację DNA i dysocjację kompleksu DNA-histon. Tsanev i Russev [24] opracowali metodę alkalicznej denaturacji chromatyny, która pozwala na rozdzielenie dwóch nici DNA z utratą jedynie histonów H2B. Badania prowadzone na podstawie tej metody wykazały, [32] że po replikacji DNA „stare" histony pozostają związane z macierzystą nicią DNA. Takie nieprzypadkowe rozmieszczenie histonów postulowano już wcześniej (cyt. za [6]) i określano je mianem segregacji. Eksperymenty te nie dostarczały jednak żadnych informacji, czy histony pozostają związane z tą samą nicią DNA w kolejnych cyklach komórkowych. Autoradiograficzne metody zastosowane przez Prescotta i Bendera [20] do badania pulsowo znakowanych białek w komórkach chomika chińskiego wykazały, że w następnym cyklu komórkowym znakowanie jest nierównomiernie rozmieszczone nad chromatydami. Jednak w badaniach tych nie odróżniano histonów od białek niehistonowych, co nie pozwala na jednoznaczną interpretację wyników.

Jackson i wsp. [16] badali losy radioaktywnie znakowanych białek oraz ciężkiego DNA (DNA-jododezoksyurydyna) dla wielu pokoleń ko-

http://rcin.org.pl

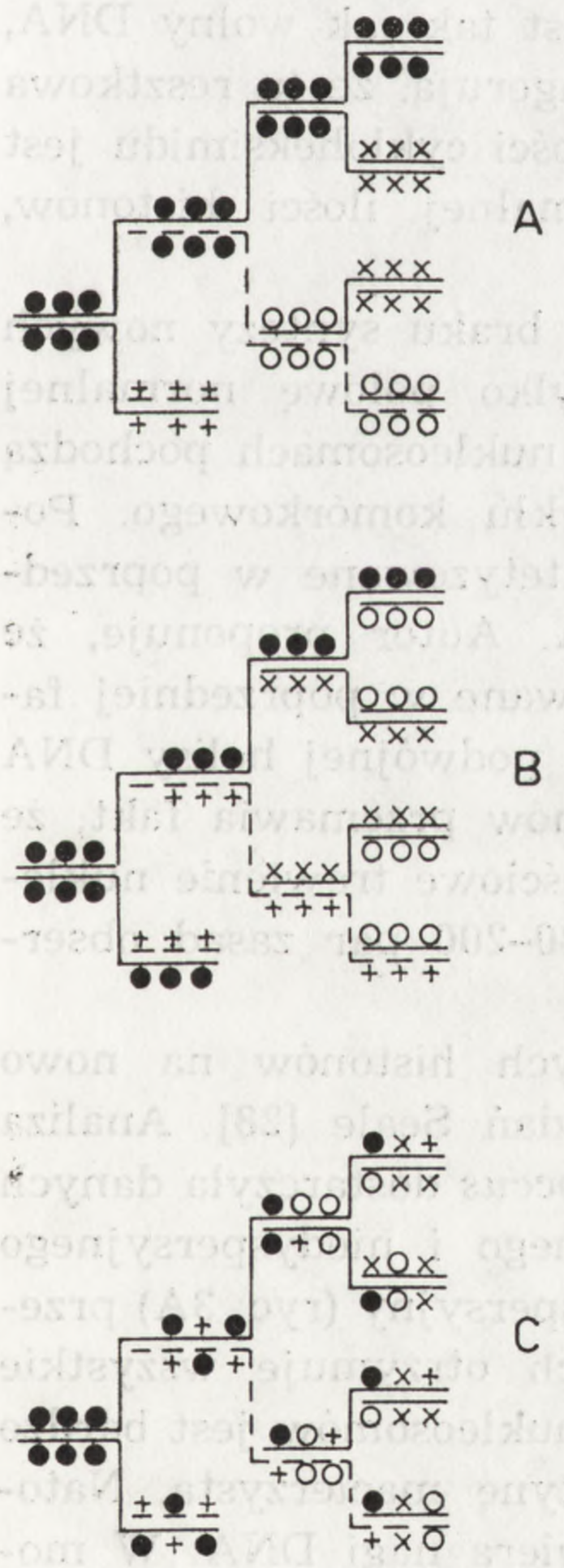
mórek w hodowlach in vitro. Autorzy ci zaproponowali trzy modele, według których może następować rozmieszczenie histonów:

1. Konserwatywny: wszystkie histony cząsteczki macierzystej DNA są połączone tylko z jedną potomną cząsteczką DNA (ryc. 1A).

2. Semikonserwatywny: histony są stale związane z tą samą nicią w cząsteczce DNA, wobec czego są stale przenoszone wraz z nią do cząsteczek potomnych (ryc. 1B).

3. Całkowicie przypadkowe rozmieszczenie histonów istniejących wcześniej i nowo syntetyzowanych (ryc. 1C).

Konserwatywny i semikonserwatywny sposób depozycji histonów może być podzielony na szereg różnych form. W modelu konserwatywnym nowo zsyntetyzowane histony mogą być związane z tą potomną cząsteczką DNA, która zawiera starszą nić. Innym sposobem konserwatywnej depozycji jest powiązanie nowo syntetyzowanych histonów z cząsteczką DNA zawierającą starszą macierzystą nić. W ramach semikonserwatywnego modelu proponowano pięć różnych możliwości w zależności od tego czy nowe histony wiążą się z wcześniej występującą, czy z nowo zsyntetyzowaną nicią DNA oraz czy histony mogą zmieniać pasmo w czasie replikacji (ryc. 1B).



Jackson i wsp. [15] uważają, że sposób rozmieszczania histonów jest całkowicie przypadkowy. Byłoby więc możliwe, że histony rozpoznają cząsteczki DNA raczej jako całość niż jako poszczególne nici polidezoksynukleotydowe. Późniejsze badania tych autorów [16] potwierdziły sugestie przypadkowego rozmieszczenia histonów w chromatynie.

Chromatyna zawierająca nowo utworzony DNA różni się od normalnej, całkowitej chromantyny [15, 16, 26, 27, 32]. Różnice te dotyczą gęstości, zawartości białek i enzymów, a także wrażliwości na trawienie nukleazami. Uważa się, że wyniki tego rodzaju badań wskazują na

Ryc. 1. Modele rozmieszczenia histonów w czasie replikacji DNA [16]

A — model konserwatywny, *B* — model semikonserwatywny, *C* — model przypadkowy

● — histony syntetyzowane w pierwszym cyklu komórkowym, + — histony syntetyzowane w drugim cyklu komórkowym, O — histony syntetyzowane w trzecim cyklu komórkowym, × — histony syntetyzowane w czwartym cyklu komórkowym

http://rcin.org.pl

mniej gęste upakowanie nukleosomów w nowo zsyntetyzowanym DNA niż w chromatynie całkowicie dopełnionej białkami [14]. W komórkach chomika chińskigo nowo utworzony DNA [31] wykazuje stałą sedymentacji 4S i jest związany z odcinkami odpornymi na nukleazy. Proces dojrzewania nowo replikowanej chromatyny do konfiguracji wykazującej taką samą wrażliwość na nukleazę, jak chromatyna niereplikująca, zachodzi w czasie 2–15 min, natomiast włączanie nowo zreplikowanego DNA do nukleosomów trwa jedynie kilka sekund. Autorzy sugerują, że związanie nowo zreplikowanego DNA z nukleosomami zachodzi już wówczas, kiedy ten DNA występuje w formie produktów pośrednich o ciężarze molekularnym 4S.

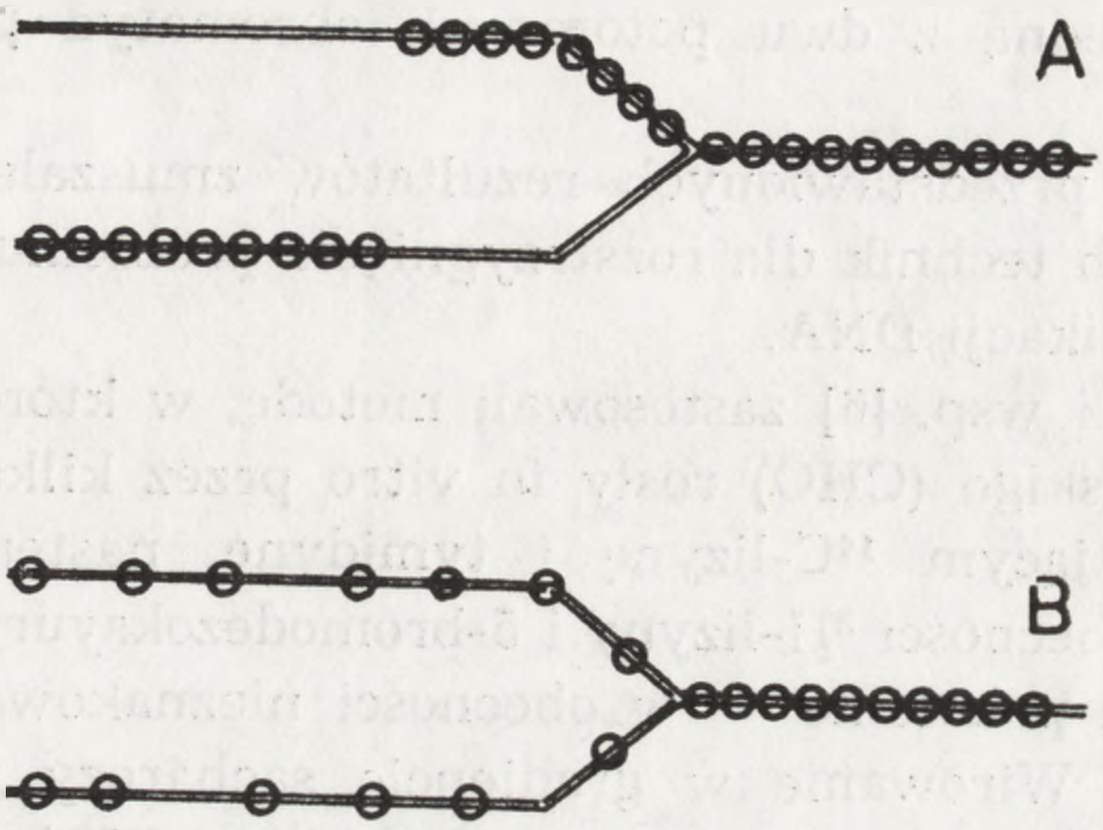
Badania nowo utworzonej chromatyny prowadzone były również na komórkach traktowanych cykloheksimidem [30]. Wykazano dwukrotnie wyższą wrażliwość na trawienie nukleazą (ze *Staphylococcus* i DN-azą I) chromatyny syntetyzowanej w obecności cykloheksimidu niż chromatyny kontrolnej. Dane te wskazują, że w wyniku działania cykloheksimidu połowa chromatyny trawiona jest tak jak wolny DNA, a połowa jak normalna chromatyna. Autorzy sugerują, że ta resztkowa odporność chromatyny syntetyzowanej w obecności cykloheksimidu jest uwarunkowana obecnością tylko połowy normalnej ilości histonów, z którymi DNA łączy się tworząc nukleosomy.

Podobnie Weintraub [34] wykazał, że przy braku syntezy nowych histonów nowo zreplikowany DNA tworzy tylko połowę normalnej ilości nukleosomów, przy czym histony w tych nukleosomach pochodzą z macierzystej chromatyny z poprzedniego cyklu komórkowego. Powstało pytanie, w jaki sposób nukleosomy syntetyzowane w poprzednim cyklu rozmieszczone są na nowym DNA. Autor proponuje, że w obecności cykloheksimidu histony zsyntetyzowane w poprzedniej fazie S są „kooperatywnie" rozmieszczone wzdłuż podwójnej helisy DNA (ryc. 2A). Za takim rozmieszczeniem nukleosomów przemawia fakt, że znakowane fragmenty DNA, uzyskane przez częściowe trawienie nukleazą *Staphylococcus*, stanowiły wielokrotność 180–200 par zasad obserwowanych zwykle w normalnej chromatynie.

Sposób rozmieszczenia wcześniej istniejących histonów na nowo replikowanym DNA był także przedmiotem badań Seale [28]. Analiza kinetyki trawienia chromatyny nukleazą *Micrococcus* dostarczyła danych pozwalających na przedyskutowanie dyspersyjnego i niedyspersyjnego modelu rozdziału histonów (ryc. 3). Model niedyspersyjny (ryc. 3A) przewiduje, że jedno ramię widełek replikacyjnych otrzymuje wszystkie rodzicielskie histony. Gęstość upakowania tych nukleosomów jest bardzo zbliżona do gęstości charakteryzującej chromatynę macierzystą. Natomiast drugie ramię widełek replikacyjnych zawiera nagi DNA. W mo-

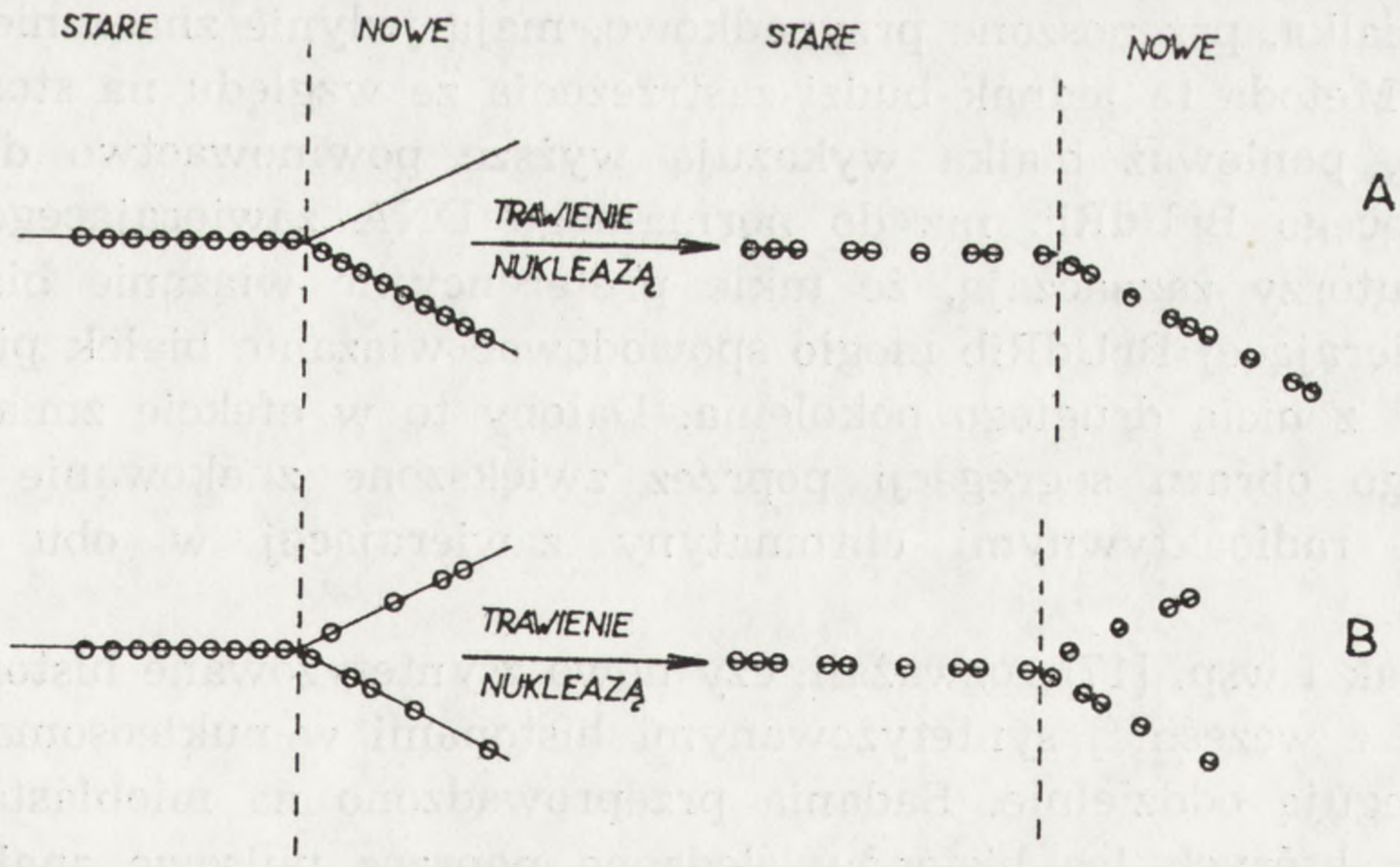
http://rcin.org.pl

delu dyspersyjnym nukleosomy są równomiernie podzielone między obie nowo zreplikowane cząsteczki DNA, w wyniku czego odstępy między nukleosomami są dwa razy większe niż w chromatynie macierzystej



Ryc. 2. Sposób rozmieszczenia histonów w czasie replikacji DNA [34]
A — kooperatywny, *B* — przypadkowy

(ryc. 3B). Kinetyka degradacji enzymatycznej nie wykazała jednak, aby istniały rozległe regiony wolnego DNA lub aby inne fragmenty zawierały gęsto upakowane nukleosomy. Istnienie takich regionów przejawiałoby się dwufazową krzywą trawienia, a zjawisko takie nie było obserwowane. Ponadto szybkość enzymatycznej degradacji chromatyny pulsowo znakowanej ^{3}H-tymidyną w obecności cykloheksimidu przekraczała szybkość charakterystyczną dla macierzystej chromatyny, była



Ryc. 3. Sposób rozmieszczenia histonów w czasie replikacji DNA [28]
A — niedyspersyjny, *B* — dyspersyjny
stare — histony syntetyzowane w poprzednim cyklu komórkowym, nowe — histony syntetyzowane w aktualnym cyklu komórkowym

http://rcin.org.pl

jednak znacznie mniejsza od szybkości spodziewanej w przypadku dyspersyjnego rozdziału nukleosomów. Na podstawie uzyskanych wyników Seale [28] proponuje konserwatywny lub niedyspersyjny sposób rozmieszczenia nukleosomów. Zgodnie z tym modelem białka histonowe są zasocjowane z jedną z dwu potomnych chromatyd podczas replikacji (ryc. 3A).

Sprzeczność przedstawionych rezultatów zmuszała do wprowadzania ciągle nowych technik dla rozstrzygnięcia problemu segregacji histonów podczas replikacji DNA.

Freedlander i wsp. [6] zastosowali metodę, w której komórki jajnika chomika chińskigo (CHO) rosły in vitro przez kilka pokoleń w środowisku zawierającym ^{14}C-lizynę i tymidynę, następnie przez jedno pokolenie — w obecności ^{3}H-lizyny i 5-bromodezoksyurydyny (BrUdRib), a przez następne pokolenie — w obecności nieznakowanych aminokwasów i BrUdRib. Wirowanie w gradiencie sacharozy pozwoliło na oddzielenie chromatyny zawierającej podstawiony DNA (DNA—BrUdRib) w jednej nici do chromatyny zawierającej BrUdRib w obu niciach. Metoda ta umożliwiła badanie zarówno syntezy białek, jak i syntezy DNA w kolejnych pokoleniach komórek. Wykazano, że podczas replikacji 5-22% białek chromatynowych pozostaje związana z nicią DNA syntetyzowaną w tym samym pokoleniu, natomiast pozostałe białka były przypadkowo przenoszone do chromatyny potomnej. Dane te wskazują na nieprzypadkowy sposób rozdziału jedynie pewnej części (5-22%) białek chromatynowych. Być może, ta nieznaczna ilość histonów jest właśnie odpowiedzialna za kontrolę ekspresji genowej, natomiast pozostałe białka, przenoszone przypadkowo, mają jedynie znaczenie strukturalne. Metoda ta jednak budzi zastrzeżenia ze względu na stosowanie BrUdRib, ponieważ białka wykazują wyższe powinowactwo do DNA zawierającego BrUdRib niż do normalnego DNA zawierającego tymidynę. Autorzy zaznaczają, że takie preferencyjne wiązanie białek do nici zawierającej BrUdRib mogło spowodować wiązanie białek pierwszej generacji z nicią drugiego pokolenia. Dałoby to w efekcie zmianę rzeczywistego obrazu segregacji poprzez zwiększone znakowanie aminokwasami radioaktywnymi chromatyny zawierającej w obu niciach BrUdRib.

Leffak i wsp. [17] rozważali, czy nowo zsyntetyzowane histony mieszają się z wcześniej syntetyzowanymi histonami w nukleosomach, czy też segregują oddzielnie. Badania przeprowadzono na mioblastach kurzych, w których los histonów śledzono poprzez pulsowe znakowanie ^{3}H-lizyną oraz aminokwasami ^{14}C i ^{15}N. Nukleosomy izolowano i histony poddawano chemicznemu wiązaniu wewnątrz każdego nukleosomu. Nowo zsyntetyzowane histony stanowiły jedynie jedną siódmą całkowitych

http://rcin.org.pl

histonów, jednak wszystkie w wyniku wirowania znajdowały się w paśmie „ciężkim" (^{14}C i ^{15}N). Eksperymenty te wykluczyły więc możliwość, że zespalanie nowych histonów w oktamery odbywa się poprzez przypadkowe mieszanie się „starych" i „nowych" histonów w każdej fazie S cyklu komórkowego. Nowe oktamery histonowe zawierały jedynie nowe histony. Dane te wskazują na konserwatywny sposób łączenia się histonów w oktamer. Takie nukleosomy pozostawały nienaruszone przez 3–4 pokolenia.

Modyfikacje tych eksperymentów doprowadziły do stwierdzenia, że nowo utworzone nukleosomy mają tendencję do lokalizacji obok siebie wzdłuż fibryli chromatynowej, co potwierdza model nieprzypadkowego rozmieszczenia nukleosomów.

Najnowsze badania dostarczyły dowodów przemawiających także za nieprzypadkowym sposobem segregacji nukleosomów w czasie replikacji [22, 25]. Badania prowadzone z zastosowaniem techniki mikroskopii elektronowej [22] wykazały, że (zgodnie z wcześniej otrzymanymi wynikami) replikacja w obecności cykloheksimidu prowadzi do powstania długich nici DNA pozbawionych nukleosomów — określanego przez autorów jako wolny DNA. Długość obserwowanych nici dochodziła do tysięcy par zasad. Należy jednak zaznaczyć, że nie przeprowadzono badań, które mogłyby wykazać, że ten DNA jest pozbawiony białek. Nie jest też wiadomo, czy białka te nie zostały utracone podczas procedury izolacji chromatyny.

Duże znaczenie w rozwiązaniu problemu segregacji histonów może mieć możliwość obserwacji w mikroskopie elektronowym struktur chromatynowych o trójdzielnej konfiguracji [22]. Charakterystyczne jest, że dwa ramiona tych trójdzielnych struktur zawierały twory typu nukleosomów, a jedno ramię ich nie posiadało. Jest bardzo prawdopodobne, że obserwowane struktury stanowią widełki replikacyjne DNA. Występowanie widełek replikacyjnych z dwoma ramionami zawierającymi nukleosomy i jednym pozbawionym tych struktur sugeruje, że nukleosomy segregują w sposób konserwatywny. Ponadto, autorzy przypuszczają, że rodzicielskie histony wybierają nić syntetyzowaną w kierunku 5′→3′. Jednak dla uzasadnienia tego przypuszczenia potrzebne są dokładne badania biochemiczne.

Pogłębione badania nad omawianym problemem przedstawili w ostatniej swojej pracy Russev i Tsanev [25]. Opracowany przez tych autorów układ eksperymentalny dostarczył wyników pozbawionych — jak się wydaje — nieścisłości interpretacyjnych. Komórki raka Erlicha znakowane były in vivo przez dwa cykle komórkowe trzema różnymi metodami: 1. DNA znakowano podczas pierwszego cyklu ^{14}C-tymidyną i podczas drugiego cyklu BrUdRib i ^{3}H-tymidyną; 2. białka znakowano

http://rcin.org.pl

podczas pierwszego cyklu ^{14}C-waliną, a DNA w drugim cyklu — BrUdRib i ^{3}H-tymidyną; 3. zarówno białka, jak i DNA były znakowane podczas tego samego cyklu z ^{14}C-waliną, BrUdRib i ^{3}H-tymidyną. DNA izolowano ze znakowanych komórek. Zastosowano ponadto metodę chemicznego wiązania białek do DNA, co powodowało wiązanie 10–15% histonów. Chemicznie wiązane nukleohistony poddawano denaturacji alkalicznej i wykazano, że nowo zsyntetyzowane histony były związane z nowo zsyntetyzowanymi nićmi DNA, podczas gdy stare histony pozostawały związane z macierzystą nicią DNA. Na podstawie tych danych autorzy sugerują semikonserwatywny sposób segregacji histonów w replikującej chromatynie. Wyniki te są jednak uzasadnione jedynie dla chemicznie związanych histonów (w ilości 10–15%). Powstało pytanie, czy reakcja wiązania histonów nie dotyczy wybranych frakcji chromatyny. Jednak na podstawie wcześniejszych prace, wykazujących przypadkowość metylacji wzdłuż łańcucha DNA, autorzy uważają taką możliwość za mało prawdopodobną.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu literatury, intensywnie prowadzone badania nad problemem segregacji histonów w replikującej chromatynie przyniosły wiele sprzecznych informacji. Ta różnorodność rezultatów mogła być spowodowana błędami wynikłymi z niedoskonałości stosowanych metod — jak niekontrolowana wymiana białek podczas procedury izolacji chromatyny, a także możliwości wiązania białek niehistonowych. Ponadto w wypadku znakowania DNA nie można wykluczyć występowania wymian siostrzanych chromatyd, co wpływałoby na przypadkowość wyniku. Pewne zastrzeżenia budzą dane uzyskane przy zastosowaniu BrUdRib, ponieważ — jak wspomniano — białka wykazują większe powinowactwo do DNA zawierającego BrUdRib niż do normalnego DNA zawierającego tymidynę.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że pomimo rozbieżności danych, większość autorów wskazuje na nieprzypadkowy sposób rozmieszczenia histonów na widełkach replikacyjnych. Na nieprzypadkowość rozmieszczenia histonów w replikującej chromatynie wskazuje także fakt, że replikacja zachodzi bez odłączania oktamerów histonowych od DNA. Wydaje się, że obecnie więcej danych eksperymentalnych przemawia za modelem konserwatywnym niż za semikonserwatywnym; natomiast model dyspersyjny raczej nie odpowiada rzeczywistości.

LITERATURA

[1] BORUN T. W., GABRIELLI F., AJIRO K., ZWEIDLER A., BAGLIONI C., Further evidence of transcriptional and translational control of histone messenger RNA during the HeLa S3 cycle, Cell, 4: 59–67, 1975.

http://rcin.org.pl

[2] BUTLER W. B., MUELLER G. C., Control of histone synthesis in HeLa cells, Biochem. Biophys. Acta, **294**: 481–496, 1973.
[3] ELGIN S. C. R., WEINTRAUB H., Chromosomal proteins and chromatin structure, Ann. Rev. Biochem., **44**: 725–774, 1975.
[4] FAKAN S., TURNER S. N., PAGANO J. S., HANCOCK R., Sites of replication of chromosomal DNA in a *Eucaryotic* cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**: 2300–2305, 1972.
[5] FELSENFELD G., Chromatin, Nature, **271**: 115–122, 1978.
[6] FREEDLANDER E. F., TAICHMAN L., SMITHIES O., Nonrandom distribution of chromosomal proteins during cell replication, Biochemistry, **16**: 1802–1808, 1977.
[7] GALLWITZ D., Kinetics of inactivations of histone mRNA in the cytoplasm after inhibition of DNA replication in synchronised HeLa cells, Nature, **257**: 247–249, 1975.
[8] GARCIA-HUNDERGO G., GONZALES-FERNANDEZ A.; LOPEZ-GAEZ J. E., DNA replication in the presence of protein synthesis inhibitors in higher plant cells, Exp. Cell. Res., **104**: 1–6, 1976.
[9] GERMOUND J. E., HIRT B., OUDET P., GROSS-BELLARD M., CHAMBON P., Folding of DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**: 1843–1947, 1975.
[10] HANCOCK R., Conservation of histones in chromatin during growth and mitosis in vitro, J. Mol. Biol., **40**: 457–466, 1969.
[11] — Separation by equilibrium centrifugation in CsCl of density-labelled and normal deoxyribonucleoprotein from chromatin, J. Mol. Biol., **48**: 357–360, 1970.
[12] — Assembly of new nucleosomal histones and new DNA into chromatin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**: 2130–2134, 1978.
[13] HAND R., DNA replication in mammalian cells, J. Cell. Biol. **67**: 761–763, 1975.
[14] HILDEBRAND C. E., WALTERS R. A., Rapid assembly of newly synthesized DNA into chromatin subunit prior to joining of small DNA replication intermediates, Biochem. Biophys. Ress. Commun., **73**: 157–163, 1976.
[15] JACKSON V., GRANNER D. K., CHALKLEY, A. R., Deposition of histones onto replicating chromosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**: 4440–4444, 1975.
[16] — Deposition of histone onto the replicating chromosome: Newly synthesized histone is not found near the replication fork, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**: 2266–2269, 1976.
[17] LEFFAK M., GRAINGER R., WEINTRAUB H., Conservative assembly and segregation of nucleosomal histones, Cell, **12**: 837–845, 1977.
[18] MELLI M., SPINELLI G., ARNOLD E., Synthesis of histone messenger RNA of HeLa cells during the cell cycle, Cell, **12**: 167–174, 1977.
[19] OLIVER D., GRANNER D., CHALKLEY R., Identification of a distinction between cytoplasmic and subsequent histone deposition within the nucleus, Biochemistry, **13**: 746–749, 1974.
[20] PRESCOTT D. M., BENDER M. A., Autoradiographic study of chromatid distribution of labelled DNA in two types of mammalian cells in vitro, Exp. Cell. Res., **29**: 430–442, 1963.
[21] REVEL M., GRONER Y., Post-transcriptional and translational controls of gene expression in *Eukaryotes*, Ann. Rev. Biochem., **47**: 1079–1126, 1978.
[22] RILEY D., WEINTRAUB H., Conservative segregation of parental histones during replication in the presence of cycloheximide, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**: 328–332, 1979.

http://rcin.org.pl

[23] RUIZ-CARILLO A., WANGH L. J., ALLFREY W. G., Processing of newly synthesized histone molecules, Science, **190**: 117–128, 1975.
[24] RUSSEV G., VENKOV C., TSANEV R., Stepwise dissociation of histones from rat-liver chromatin in alkaline solution, Eur. J. Biochem., **43**: 253–256, 1974.
[25] RUSSEV G., TSANEV R., Nonrandom segregation of histones during chromatin replication, Eur. J. Biochem., **93**: 123–128, 1979.
[26] SEALE R. L., Assembly of DNA and protein during replication in HeLa cells, Nature, **255**: 247–249, 1975.
[27] — Temporal relationship of chromatin protein synthesis, DNA synthesis, and assembly of deoxyribonucleprotein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**: 2270–2274, 1976.
[28] — Studies on the mode of segregation of histone nu bodies during replication in HeLa cells, Cell, **9**: 423–429, 1976.
[29] — Nucleosomes associated with newly replicated DNA have an altered conformation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**: 2717–2721, 1978.
[30] SEARLE R. L., SIMPSON R. T., Effect of cycloheximide on chromatin biosynthesis, J. Mol. Biol. **94**: 479–501, 1975.
[31] SHEININ R., HUMBERT J., Some aspects of eukaryotic DNA replication, Ann. Rev. Biochem., **47**: 2777–2816, 1978.
[32] TSANEV R., RUSSEV G., Distribution of newly synthesized histones during DNA replication, Eur. J. Biochem., **43**: 257–263, 1974.
[33] WEINTRAUB H., HOLTZER H., Fine control of DNA synthesis in developing chick-red blood cells, J. Mol. Biol., **66**: 13–35, 1972.
[34] WEINTRAUB H., Cooperative alingment of nu bodies during chrosome replication in the presence of cycloheximide, Cell, **9**: 419–422, 1976.
[35] WEINTRAUB H., GROUDINE M., Chromosomal subunit in active genes an altered conformation, Science, **193**: 848–856, 1976.

Otrzymano: 15 czerwca 1979.
Przyjęto: 30 czerwca 1979.

Adres autorki: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 6, NR 4, 1979 (321 - 342)

BIAŁKA KERATYNOWE

THE KERATINS

Małgorzata ROCHALSKA

Instytut Badań Jądrowych, Warszawa

Streszczenie. W artykule przedstawiono ogólne zagadnienia dotyczące budowy i biosyntezy białek keratynowych oraz regulacji procesu keratynizacji.

Summary. Problems concerning structure and biosynthesis of keratins as well as its regulation are presented.

Wykaz stosowanych skrótów

SCMK — sulfokarboksymetylokerateiny
$SCMKB_1$ — sulfokarboksymetylokerateiny bogate w reszty aminokwasów siarkowych, zawierające reszty lizyny i argininy w cząsteczce
$SCMKB_2$ — sulfokarboksymetylokerateiny bogate w reszty aminokwasów siarkowych, pozbawione reszt lizyny i argininy w cząsteczce
SCMKA — sulfokarboksymetylokerateiny o niskiej zawartości reszt aminokwasów siarkowych w cząsteczce
EGF — czynnik wzrostowy naskórka
PGE_1, PF_2 — prostoglandyny
c-AMP — cykliczny 3'5'-adenozynomonofosforan
ACTH — hormon kortykotropowy
LTH — prolaktyna
TSH — hormon tyreotropowy
LH — hormon stymulujący komórki interstycjalne
FSH — hormon stymulujący pęcherzyki Graafa

Keratyny są białkami tworzącymi substancję rogową tkanek zwierzęcych. Jednoznaczna definicja tej grupy białek nie została dotąd osta-

http://rcin.org.pl

tecznie sformułowana. W skład keratyn wchodzą formy niedojrzałe zwane prekeratynami. W trakcie ekstrakcji keratyn z tkanek, zależnie od stosowanej metodyki, otrzymuje się dwie różne formy białka zwane kerateinami i keratozami. Keratyny powstają w procesie zwanym keratynizacją. Proces ten może być regulowany na poziomie biosyntezy białka lub na poziomie różnicowania się komórek. Łańcuchy białka keratyn występują w dwóch formach różniących się strukturą II-rzędową. Białka te posiadają również strukturę morfologiczną, której podstawową jednostką jest włókno.

WSTĘP

DEFINICJA KERATYN

Zainteresowanie keratynami datuje się od połowy XIX w. Ustalenie definicji tej grupy białek napotyka na trudności. Ogólnie przyjęta jest definicja sformułowana przez Mercera [65]: „Keratyny są to białka nierozpuszczalne w roztworach soli, kwasów i zasad, roztworach buforowych i rozpuszczalnikach organicznych, oporne na trawienie enzymatyczne, utrzymujące swą strukturę mostkami dwusiarczkowymi pomiędzy łańcuchami polipeptydowymi". Określenie to, dotyczące całej grupy białek tworzących substancję rogową tkanek rogowaciejących ssaków, tj. włosów, kopyt, rogów, paznokci i naskórka, oraz ptaków, tj. piór i naskórka, opiera się w części na cechach niespecyficznych dla omawianej grupy białek [61, 67]. Mostki dwusiarczkowe występują również w innych białkach, nie należących do keratyn, podobnie jak oporność na trawienie enzymatyczne nie jest cechą wyłącznie białek keratynowych. W czasie przeszło 100-letniej historii badań keratyn sformułowano wiele innych definicji dotyczących tej grupy białek [7, 20, 81, 102]. Są one jednak w większości fragmentaryczne i oparte na niejednoznacznych kryteriach.

Ze względu na zawartość siarki można keratynę podzielić na „keratynę twardą" o wysokiej zawartości siarki oraz „keratynę miękką" o niższej zawartości tego pierwiastka. Keratyna twarda występuje we włosach, rogu i paznokciach, natomiast keratyna miękka tworzy warstwę rogową naskórka. Keratyny występują w dwóch formach różniących się strukturą II-rzędową. W naskórku, włosach, rogach i paznokciach występują keratyny o strukturze typu helisy-α, natomiast keratyny typu β-struktury znajdują się w piórach ptasich.

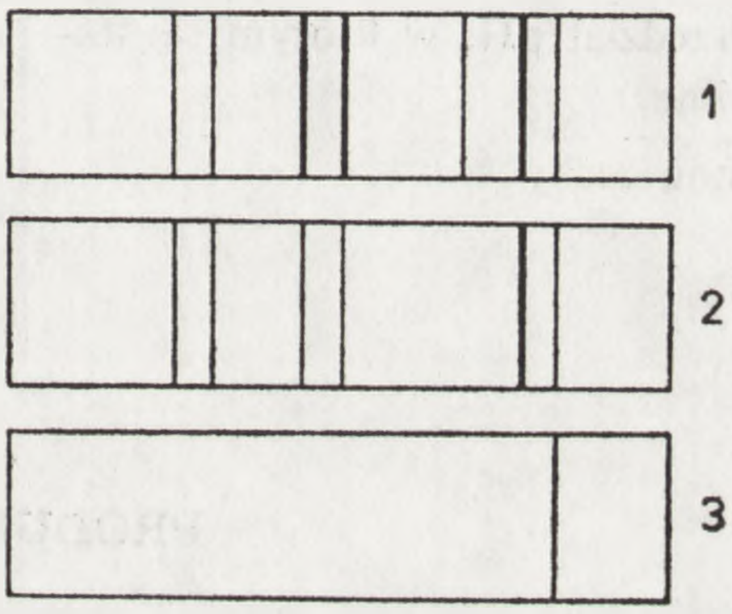
Przedstawione w definicji cechy białek keratynowych tłumaczą trudności napotykane w trakcie badań tych białek. Rozpoczynają się one już w początkowym etapie badań, czyli izolowania białek z tkanek

http://rcin.org.pl

rogowaciejących. Pewne „młodociane formy" tych białek dają się wyodrębnić metodą prostej ekstrakcji. Nazwano je prekeratynami [62].

CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK PREKERATYNOWYCH

Prekeratyny są to białka występujące w cytoplazmie komórek różnicujących się. Zawierają one grupy sulfhydrylowe, ale nie mają jeszcze mostków dwusiarczkowych w cząsteczce. Dlatego pod względem rozpuszczalności są bardziej zbliżone do białek globularnych niż „dojrzałe" keratyny. Białka te można izolować z tkanek poprzez ekstrakcję buforem cytrynianowym lub roztworami mocznika [15, 40]. Roztwór wyjściowy zawiera kilka substancji białkowych. Białka balastowe można oddzielić obniżając pH ekstraktu wyjściowego. Roztwór o pH = 4,5 zawiera jednorodną chromatograficznie frakcję prekeratyn.



Ryc. 1. Elektroforetyczny obraz poszczególnych etapów otrzymywania białek prekeratynowych epidermy. Schemat według Matoltsy [62]

***1* — ekstrakt wyjściowy z roztworu o pH = 7, 2 — ekstrakt z roztworu o pH =,6,3, 3 — ekstrakt z roztworu o pH = 4,5**

Rycina 1 przedstawia obrazy elektroforetycznego rozdziału białek w poszczególnych etapach wydzielania prekeratyn. Stosując odpowiednie techniki elektroforetyczne można rozdzielić prekeratyny na kilka pasm białkowych różniących się masą cząsteczkową i zawartością niektórych aminokwasów, zwłaszcza lizyny i argininy [3, 4].

Tabela 1 przedstawia cechy charakterystyczne prekeratyn. Są to białka trwałe w dość szerokim przedziale pH. Stabilność ich w 5M roztworze mocznika w całym przedziale pH świadczy, że wiązania wodorowe nie biorą udziału w utrzymaniu struktury przestrzennej cząsteczki. Zawartość węglowodanów i lipidów w cząsteczkach prekeratyn może świadczyć, że są one gliko-lipoproteidami albo o procesach adsorpcji tych związków na cząsteczkach białek prekeratynowych. Cząsteczki prekeratyn zawierają mniejszą ilość reszt aminokwasów siarkowych i proliny niż keratyny [62, 63, 66, 86]. Crounse [18] wykazał duże podobieństwo składu aminokwasowego cząsteczek prekeratyn pochodzących z różnych struktur rogowaciejących. Najbardziej istotną różnicą jest zawartość cysteiny (czterokrotnie wyższa w prekeratynach włosa) i glicyny (czterokrotnie wyższa w prekeratynach wyizolowanych z warstwy rogowej naskórka).

http://rcin.org.pl

TABELA 1

Charakterystyczne własności prekeratyn naskórka i mieszków włosowych, według Matoltsy [62, 63] oraz Crounse [19]

	Prekeratyny naskórka [62]	Prekeratyny włosa [19, 63]
Sposób wyodrębniania	ekstrakcja buforem cytrynianowym o pH = 2,6 lub 6M mocznikiem	ekstrakcja 8M mocznikiem o pH = 7
Masa cząsteczkowa	60000-70000	około 100000
Zawartość lipidów (% suchej masy)	2,9	—
Zawartość węglowodanów (% suchej masy)	poniżej 0,1	—
Struktura drugorzędowa	helisa-α (40% α-helisy)	helisa-α
Przedział pH, w którym są stabilne	2—12	w roztworze mocznika w całym zakresie pH
Inne cechy		bogate w reszty glicyny (30 moli na 100 moli aminokwasów) i seryny (20 moli na 100 moli aminokwasów)

PRODUKTY DEGRADACJI KERATYN

Omówione w poprzednim rozdziale prekeratyny są stosunkowo łatwym do wyodrębnienia materiałem doświadczalnym. Głównym obiektem zainteresowania badaczy są jednak rozpuszczalne białka otrzymane z dojrzałych keratyn w wyniku rozszczepienia wiązań dwusiarczkowych poprzez utlenienie lub redukcję. Utleniając mostki dwusiarczkowe cystyny do reszt kwasu cysteinowego otrzymuje się białka zwane keratozami. Redukując je do reszt cysteiny otrzymuje się kerateiny, które po karboksymetylacji powstałych grup sulfhydrylowych, w celu zapobieżenia możliwym reakcjom wtórnym, przekształcają się w S-karboksymetylokerateiny (SCMK) [16]. W przypadku zastosowania tej samej tkanki wyjściowej zarówno keratozy, jak i kerateiny stanowią dwie formy tego samego białka i należy oczekiwać daleko idącego podobieństwa w ich właściwościach fizycznych i chemicznych.

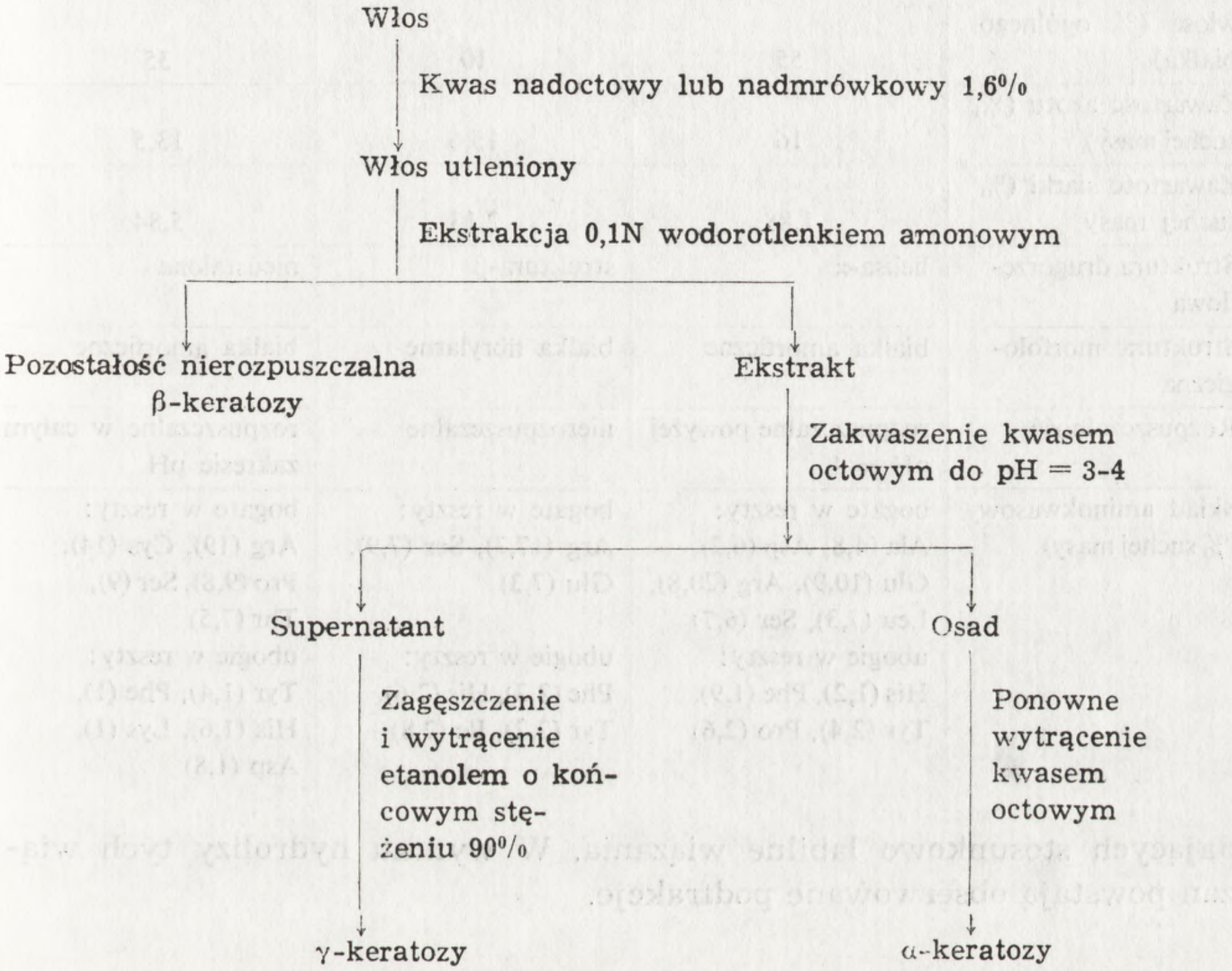
KERATOZY

Kwasy nadoctowy lub nadmrówkowy działają specyficznie na mostki dwusiarczkowe i w rezultacie tworzenia cząsteczek kwasu cysteinowego powodują rozdzielenie łańcuchów polipeptydowych. Uzyskane w ten sposób rozpuszczalne białka można wyekstrahować roztworami

http://rcin.org.pl

mocznika, amoniaku lub roztworami buforowymi [99]. Ze względu na różnice rozpuszczalności wyróżnia się α-, β- i γ-keratozy [16].

Rycina 2 przedstawia schemat otrzymywania i rozdzielania keratoz włosa. Charakterystykę otrzymanych tą drogą keratoz przedstawia tabela 2.



Ryc. 2. Otrzymywanie i rozdzielanie α-, β- i γ-keratoz włosa według Crewthera i wsp. [16]

Skład aminokwasowy poszczególnych keratoz zależy od użytego związku utleniającego [15, 45]. Stosowanie kwasu nadmrówkowego daje białka o niższej zawartości kwasu glutaminowego i leucyny, a wyższej zawartości cysteiny, glicyny, fenyloalaniny i tyrozyny w porównaniu z białkami uzyskanymi w wyniku działania kwasu nadoctowego [19].

Najlepiej zbadaną grupą keratoz są α-keratozy [66, 79, 97]. Wiadomo że mają one różnorodny skład aminokwasów N-końcowych [69, 70], że chromatografia kolumnowa pozwala rozdzielić je na 6 podfrakcji różniących się składem aminokwasowym [13, 14] oraz że grupy N-końcowe natywnego białka są prawdopodobnie acetylowane. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że α-keratozy są mieszaniną białek posia-

http://rcin.org.pl

TABELA 2

Charakterystyczne własności keratoz włosa, według Cornfielda i wsp. [15]

	α-keratozy	β-keratozy	γ-keratozy
Masa cząsteczkowa	40000—80000		10000—30000
Zawartość w białkach włosa (% ogólnego białka)	55	10	35
Zawartość azotu (% suchej masy)	16	15,6	13,5
Zawartość siarki (% suchej masy	1,88	2,13	5,84
Struktura drugorzędowa	helisa-α	struktura-β	nieustalona
Struktura morfologiczna	białka amorficzne	białka fibrylarne	białka amorficzne
Rozpuszczalność	rozpuszczalne powyżej pH = 4	nierozpuszczalne	rozpuszczalne w całym zakresie pH
Skład aminokwasowy (% suchej masy)	bogate w reszty: Ala (4,8, Asp (6,2), Glu (10,9), Arg (20,8), Leu (7,3), Ser (6,7) ubogie w reszty: His (1,2), Phe (1,9), Tyr (2,4), Pro (2,6)	bogate w reszty: Arg (17,7), Ser (7,9), Glu (7,3) ubogie w reszty: Phe (2,3), His (2,6), Tyr (2,2), Ile (2,8)	bogate w reszty: Arg (19), Cys (14), Pro (9,8), Ser (9), Thr (7,5) ubogie w reszty: Tyr (1,4), Phe (1), His (1,6), Lys (1), Asp (1,8)

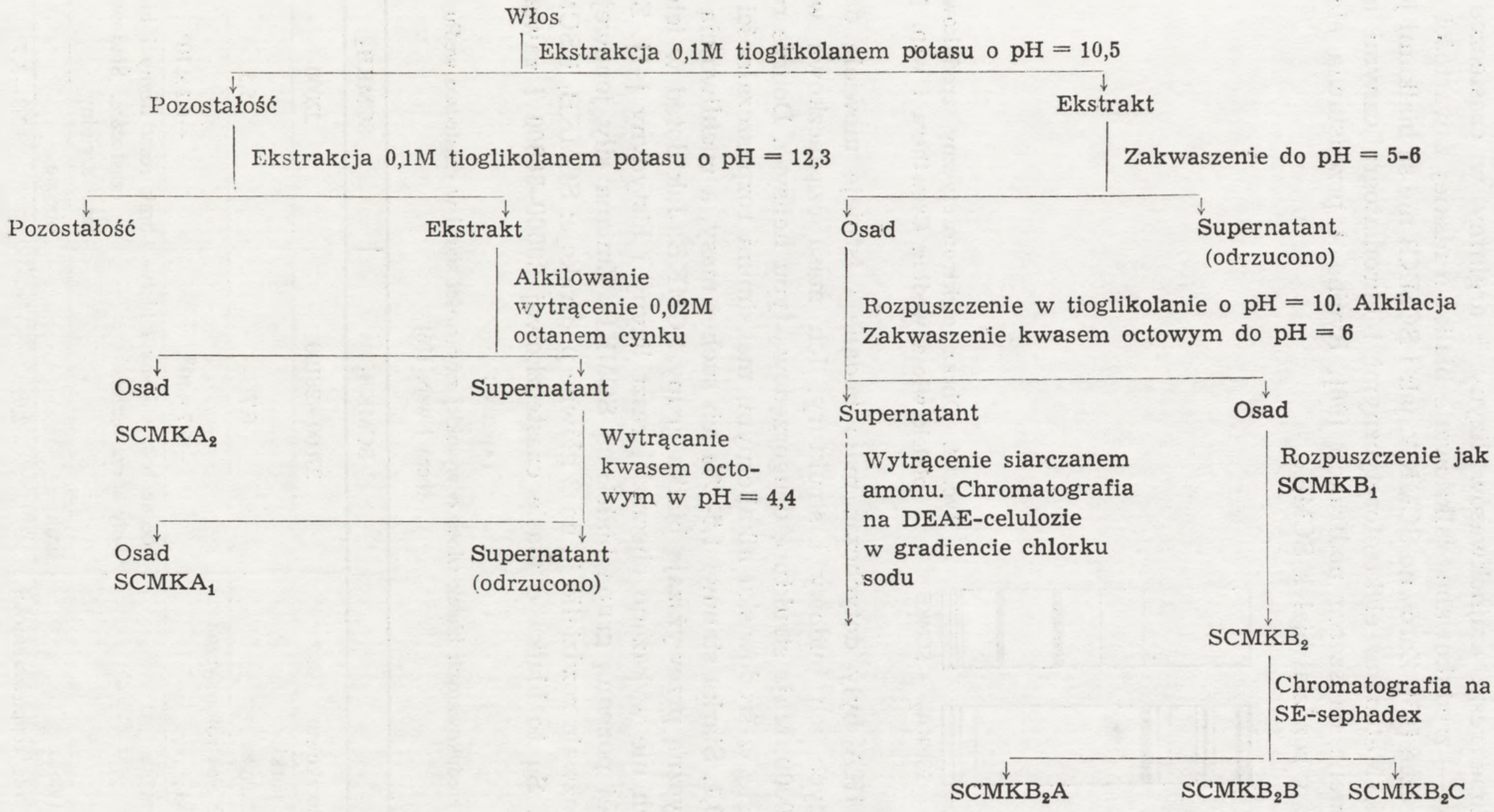
dających stosunkowo labilne wiązania. W wyniku hydrolizy tych wiązań powstają obserwowane podfrakcje.

KERATEINY

Są to rozpuszczalne frakcje białkowe powstałe w wyniku redukcji mostków dwusiarczkowych do grup sulfhydrylowych cysteiny, co powoduje rozszczepienie cząsteczki białka do pojedynczych łańcuchów polipeptydowych. Jako związków redukujących używa się związków tiolowych, jak tioglikolan potasu lub merkaptoetanol. Ponieważ powstałe grupy sulfhydrylowe są bardzo reaktywne, w celu zapobieżenia niepożądanym reakcjom wtórnym blokuje się je poprzez karboksymetylację za pomocą jodooctanu, jodoacetamidu lub jodoetanolu [39, 40, 41].

Rycina 3 przedstawia schemat redukcji i frakcjonowania białek włosa. Stosując różne sposoby ekstrakcji i wytrącania białka uzyskuje się rozdział białek włosa na $SCMKB_1$ — czyli zredukowane, zalkilowane białka bogate w siarkę, zawierające w cząsteczce reszty lizyny i argininy, $SCMKB_2$ — zredukowane, zalkilowane, bogate w siarkę białka

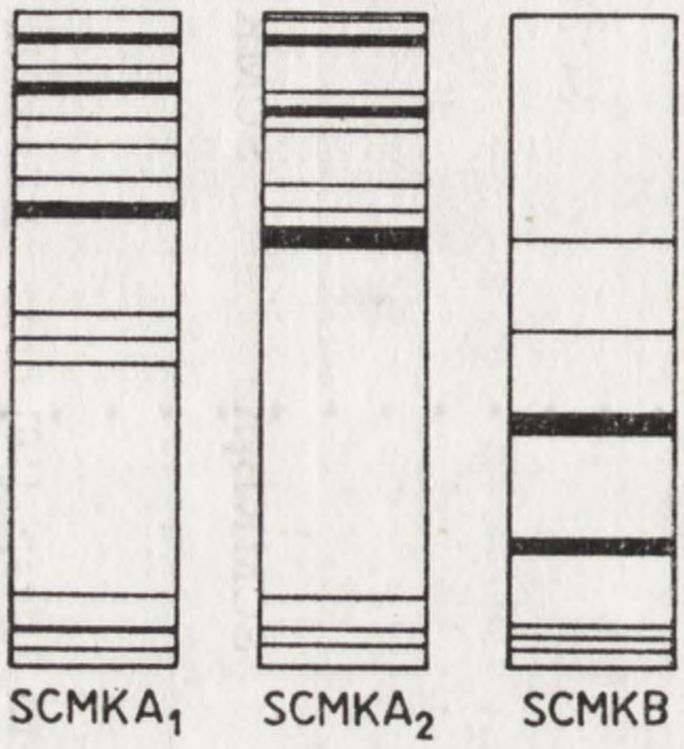
http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Redukcja i frakcjonowanie białek włosa według Crewthera i wsp. [16] oraz Ellemana [26]

http://rcin.org.pl

pozbawione reszt aminokwasów lizyny i argininy w cząsteczce oraz SCMKA — zredukowane, zalkilowane białka o niskiej zawartości siarki w cząsteczce [40]. Zarówno SCMKA, jak i SCMKB nie są białkami jednorodnymi. Metodami elektroforetycznymi i chromatograficznymi można je rozdzielić na szereg podfrakcji [98]. Rycina 4 przedstawia elektroforetyczny rozdział białek SCMK.



Ryc. 4. Obraz elektroforetyczny zredukowanych białek włosa według Crewthera i wsp. [16]

SCMKA były dotychczas mało badane i istnieje niewiele danych dotyczących ich budowy i struktury. Ich masa cząsteczkowa wynosi 30000–50000. Mają strukturę drugorzędową typu helisy-α. Dobrze rozpuszczają się w środowisku alkalicznym, maksimum rozpuszczalności przy pH = 10,1. Siarka stanowi 1,5–2% ich suchej masy, a ruchliwością elektroforetyczną przewyższają białka grupy SCMKB. Jak dotąd w ich cząsteczkach nie wykazano obecności reszt lizyny i histydyny [41]. Znacznie lepiej poznaną grupą białek są SCMKB. Zmiana siły jonowej roztworu pozwala rozdzielić je na 2 główne podfrakcje: $SCMKB_1$ i $SCMKB_2$ (ryc. 3). Są to białka o masie cząsteczkowej 20000–30000 i zawartości

TABELA 3

Własności zredukowanych białek włosa o wysokiej zawartości siarki w cząsteczce według Crewthera i wsp. [16]

	$SCMKB_1$	$SCMKB_2$
Masa cząsteczkowa	27000—28100	22000
Zawartość siarki (% suchej masy)	6,7	5,3
Ruchliwość elektroforetyczna (cm^2/V sek)	$-6{,}7\times10^5$	$-6{,}1\times10^5$
Charakterystyka	obecne reszty lizyny i histydyny w cząsteczce	brak reszt lizyny i histydyny w cząsteczce. Śladowe ilości reszt argininy
Reszty acetylowe	brak	obecne
Minimalne pH rozpuszczalności	2,9	2,3—3,3

http://rcin.org.pl

siarki około 6% suchej masy [43, 98]. Porównanie własności białek $SCMKB_1$ i $SCMKB_2$ przedstawia tabela 3. Białka te nie są jednorodne. Zastosowanie metody sączenia na sitach molekularnych pozwala rozdzielić białko podgrupy $SCMKB_2$ na trzy podfrakcje: $SCMKB_2A$, $SCMKB_2B$ i $SCMKB_2C$ [26–28, 56]. Tabela 4 przedstawia charakterystykę trzech podfrakcji białkowych $SCMKB_2$. Różnią się one masą cząsteczkową oraz składem aminokwasowym. $SCMKB_2A$ posiada dwukrotnie

TABELA 4

Własności podfrakcji białka $SCMKB_2$, według Ellemana [27] i Lindleya [56]

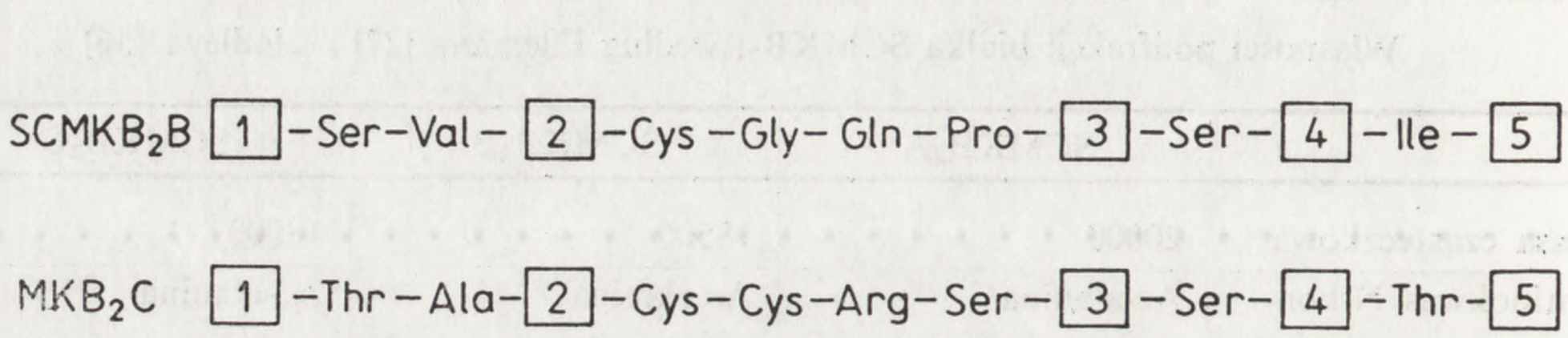
	$SCMKB_2A$	$SCMKB_2B$	$SCMKB_2C$
Masa cząsteczkowa	20000	18500	18000
Aminokwas N-końcowy	Ac-alanina	Ac-alanina	Ac-alanina
Aminokwas C-końcowy	glutamina	glutamina	glutamina
Sekwencja aminokwasów	ustalona	ustalona	ustalona
Skład aminokwasowy	bogate w reszty: Cys, Thr, Glu, Pro, Gli ubogie w reszty: Phe, Asp, Tyr brak reszt lizyny w cząsteczce	bogate w reszty: Cys, Ser, Pro, Thr, Gli ubogie w reszty: Asp, Phe, Tyr, Leu brak reszt lizyny w cząsteczce	bogate w reszty: Cys, Ser, Thr, Pro, Glu, Gli ubogie w reszty: Asp, Phe, Try, Leu brak reszt lizyny w cząsteczce
Inne cechy		reszty argininy występują jedynie w centrum cząsteczki, skład aminokwasowy ubogi	mała różnorodność reszt aminokwasowych

większą ilość reszt fenyloalaniny w cząsteczce niż pozostałe białka [93]. $SCMKB_2B$ odznacza się daleko idącą homologią cząsteczki. N-końcowe fragmenty połówek cząsteczki są identyczne co do 50 reszt aminokwasowych. $SCMKB_2C$ odznacza się najbardziej urozmaiconym składem aminokwasowym. Większość reszt aminokwasów dwukarboksylowych, dwuaminowych i glicyny grupuje się w centralnej części jego łańcucha złożonej z 15 reszt aminokwasowych, natomiast reszty aminokwasów siarkowych rozmieszczone są w peryferyjnych częściach łańcucha polipeptydowego. Większość mostków dwusiarczkowych rozmieszczona jest jednakowo w cząsteczkach wszystkich trzech białek, co sugeruje duże podobieństwo ich struktury III-rzędowej [94].

Rycina 5 przedstawia sekwencję reszt aminokwasowych poszczególnych białek wchodzących w skład $SCMKB_2$ [56]. Jak widać posia-

http://rcin.org.pl

dają one identyczną sekwencję aminokwasów N- i C-końcowych fragmentów cząsteczki, a różnice dotyczą 8 reszt aminokwasów. Badacze zajmujący się porównaniem budowy białek grupy $SCMKB_2$ i α-keratoz wykazali daleko idące podobieństwo składu aminokwasowego, obrazu rozdziału elektroforetycznego i składu produktów trawienia enzymatycznego tych białek.



Ryc. 5. Sekwencja aminokwasów białek tworzących podjednostkę $SCMKB_2$ białek włosa według Ellemana [26]

Peptydy: *1* — AcAla-Cys-Cys-Ser-Thr-Ser-Phe-Cys-Gly-Phe-Pro-Ile-Cys-Ser; *2* — -Gly-Thr-Cys-Gly-Ser-Ser; *3* — -Thr-Cys-; *4* — -Gln-Thr-Ser-Cys-Cys-Gln-Pro-Thr-Ser-Ile-Gln-Thr-Ser-Cys-Cys-Gln-Pro-; *5* — -Ser-Ile-Gln-Thr-Ser-Cys-Cys-Gln-Pro-Thr-Ser-Ile-Gln-Thr-Ser-Cys-Cys-Gln-Pro-Thr-Cys-Leu-Gln-Thr-Ser-Gly-Cys-Gln

BIOSYNTEZA PREKERATYN I PROCES KERATYNIZACJI

BIOSYNTEZA BIAŁEK PREKERATYNOWYCH

Biosynteza białek prekeratynowych najintensywniej przebiega w komórkach warstwy podstawowej naskórka i komórkach dolnej części mieszka włosowego. Rycina 8 przedstawia schematycznie budowę naskórka. We wszystkich tych komórkach znaleziono aktywne amino-acylo-tRNA syntetazy oraz duże ilości kwasu rybonukleinowego [33, 83]. W komórkach keratynizujących występują w dużej ilości rybosomy związane z błonami retikulum [50, 73, 102]. Wszystkie dane wskazują, że omawiane warstwy komórek są miejscem syntezy prekursorów keratyny. Badania autoradiograficzne potwierdziły te przypuszczenia [31, 35]. Włączanie znakowanych trytem lub ^{14}C aminokwasów do białek naskórka i mieszków włosowych osiąga maksimum po 10 min od chwili podania znakowanego izotopem związku. Równomierne rozmieszczenie izotopów pomiędzy białkami naskórka wskazuje na równomierną syntezę tych związków. Dodatek do układu związków wysokoenergetycznych nie wywiera istotnego wpływu na przebieg syntezy. Podobnie jak syntezę RNA i białka również syntezę DNA wykryto w warstwie podstawowej naskórka [1, 5]. Komórki tej warstwy zawierają wszystkie enzymy i substraty potrzebne do syntezy kwasu dezoksyrybonukleinowego.

http://rcin.org.pl

Przy przechodzeniu do warstwy rogowej naskórka kwasy nukleinowe komórki ulegają destrukcji.

W białkach włosa wykryto obecność cytruliny [80]. Aminokwas ten we wszystkich znanych tkankach występuje jedynie w stanie wolnym. Nie wyjaśniono czy cytrulina oznaczana w keratynach powstaje w przemianach metabolicznych, czy też jej obecność jest wynikiem kodowania genetycznego. Druga możliwość wydaje się jednak mało prawdopodobna [81].

Rola miedzi w tworzeniu keratyny

Zawartość siarki w keratynie jest różna i waha się w granicach od 2–3% w naskórku do 18% we włosach. Poziom jej zależy w szczególności od zawartości miedzi w diecie zwierzęcia. Zwierzęta hodowane na diecie pozbawionej miedzi wykazują zwiększony przyrost włosów, przy jednoczesnym obniżeniu w nich zawartości siarki, zmianie składu aminokwasowego i obrazu elektroforetycznego białek włosa o niskiej zawartości siarki w cząsteczce. Również bogate w siarkę białka syntetyzowane są nieprawidłowo [44]. Sugeruje się, że miedź bierze udział w tworzeniu mostków dwusiarczkowych z grup sulfhydrylowych przy tworzeniu twardej keratyny. W przypadku diety pozbawionej miedzi przejście od miękkiej do twardej keratyny trwa około 3 dni, natomiast w warunkach normalnego żywienia 6–8 godzin.

Wpływ diety na syntezę białek keratynowych

Na twory rogowe organizmu wpływa zawartość w pożywieniu aminokwasów siarkowych [77], a przede wszystkim cysteiny, jednego z głównych substratów syntezy białek keratynowych. 35% aktywności podanej owcom ^{35}S-cysteiny odnajdywane jest w wełnie. Wynika z tego, że cysteina może wpływać na biosyntezę keratyn na drodze stymulacji substratowej. Wzrost zawartości siarki w pożywieniu wpływa przede wszystkim na syntezę białek o wysokiej zawartości siarki, a jej niedobór sprzyja powstawaniu nieprawidłowych formacji włosowych. Downes sądzi, że w tkankach keratynizujących istnieje stała pula cysteiny, natomiast wzrost włosa jest ograniczany zmianą ilości siarki dopływającej z pożywieniem. Nie jest wykluczone, że np. w mieszkach włosowych może zachodzić synteza cysteiny z wykorzystaniem innych dostępnych związków siarki, np. siarczanów [90].

Do normalnego przebiegu syntezy białek keratynowych konieczne są również jony cynku, żelaza, kobaltu oraz biotyna, ryboflawina i kwas pantotenowy [23, 52]. Niedobór tych substancji powoduje syntezę nieprawidłowych białek oraz hamuje wzrost włosa.

http://rcin.org.pl

POWSTAWANIE WIĄZAŃ MIĘDZYŁAŃCUCHOWYCH I AGREGACJA KERATYN

Agregacja łańcuchów i tworzenie wyższych jednostek morfologicznych keratyny

Keratynizacja jest specyficzną formą różnicowania się komórek. Cytomorficzne i fizjologiczne zmiany zachodzące w komórkach metabolicznie aktywnych prowadzą do powstawania nierozpuszczalnego zrogowaciałego materiału, a tym samym komórki stają się metabolicznie nieaktywne. Istotą rogowacenia jest utlenianie grup sulfhydrylowych aminokwasów siarkowych, powstawanie mostków dwusiarczkowych między łańcuchami polipeptydowymi. Nie wykryto dotąd enzymu katalizującego syntezę mostków dwusiarczkowych, ale wysoka (40 ppm. suchej masy) zawartość miedzi w komórkach włosa, w strefie keratynizacji wskazuje na możliwość nieenzymatycznej katalizy, zwłaszcza, że całkowicie skeratynizowana część włosa zawiera 6-krotnie mniej tego metalu. Być może w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych bierze również udział cysteilodesulfataza, enzym charakterystyczny dla warstwy ziarnistej naskórka [38]. Cytologicznie proces keratynizacji rozpoczyna się w warstwie podstawowej naskórka, gdzie następuje synteza białek prekursorowych keratyny. W warstwie kolczystej wytwarza się w przestrzeniach międzykomórkowych warstwa kontaktowa, bogata w polisacharydy. Następnie wewnętrzna warstwa błon różnicujących się komórek pokrywa się pojedynczą warstwą filamentów białkowych. Poprzez dalszą agregację tworzą się fibryle, dobrze wykształcone w warstwie ziarnistej naskórka. Jednocześnie w warstwie tej ulegają rozpadowi i zanikają organelle komórkowe. W dalszym procesie struktury włókniste agregują dalej, tworząc w warstwie rogowej dojrzałą „keratynę" [7, 95]. Wyróżnia się 3 typy keratynizacji: charakterystyczny dla komórek pochewki włosa, włosa i naskórka [64, 79].

Morfologiczne uporządkowanie keratyn w tkankach

Podstawową jednostką morfologicznej budowy keratyny jest włókno. Badania przeprowadzone przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazały, że włókno składa się z 11 fibryli. Każda fibryla składa się z 11 filamentów, które z kolei zbudowane są z protofilamentów.

Protofilamenty (włókienka o średnicy 20 Å) spojone wewnątrzfibrylarną substancją podstawową, czyli amorficznym, nieprzejrzystym elektronowo materiałem białkowym, tworzą filamenty [30]. Obecność filamentów wykazano w wielu keratynizujących i prekeratynizujących tkankach [30, 67]. Mają one wygląd długich nici o średnicy 50 Å. Jedynie w keratynie piór ptasich średnica ich jest mniejsza. Spojone międzyfibrylarną substancją podstawową tworzą fibryle włókienka biał-

http://rcin.org.pl

kowe o średnicy 75 Å. Pęczki fibryli nie zawierające już substancji podstawowej tworzą włókno. Upakowanie fibryli jest różne dla różnych typów komórek [84]. Niewiele wiadomo dotychczas o strukturze substancji podstawowej. Nieliczni badacze zajmujący się tym tematem podają przeciwstawne dane dotyczące jej budowy [24]. Obecnie istnieją trzy poglądy na zależność pomiędzy mikrofibrylami a substancją podstawową (matrix):

1. Układ mikrofibryli utrzymują mostki dwusiarczkowe. Cały ten system „tkwi" w substancji podstawowej nie łącząc się z nią.

2. Mikrofibryle i substancja podstawowa są tworami autonomicznymi, powiązanymi jednakże mostkami dwusiarczkowymi.

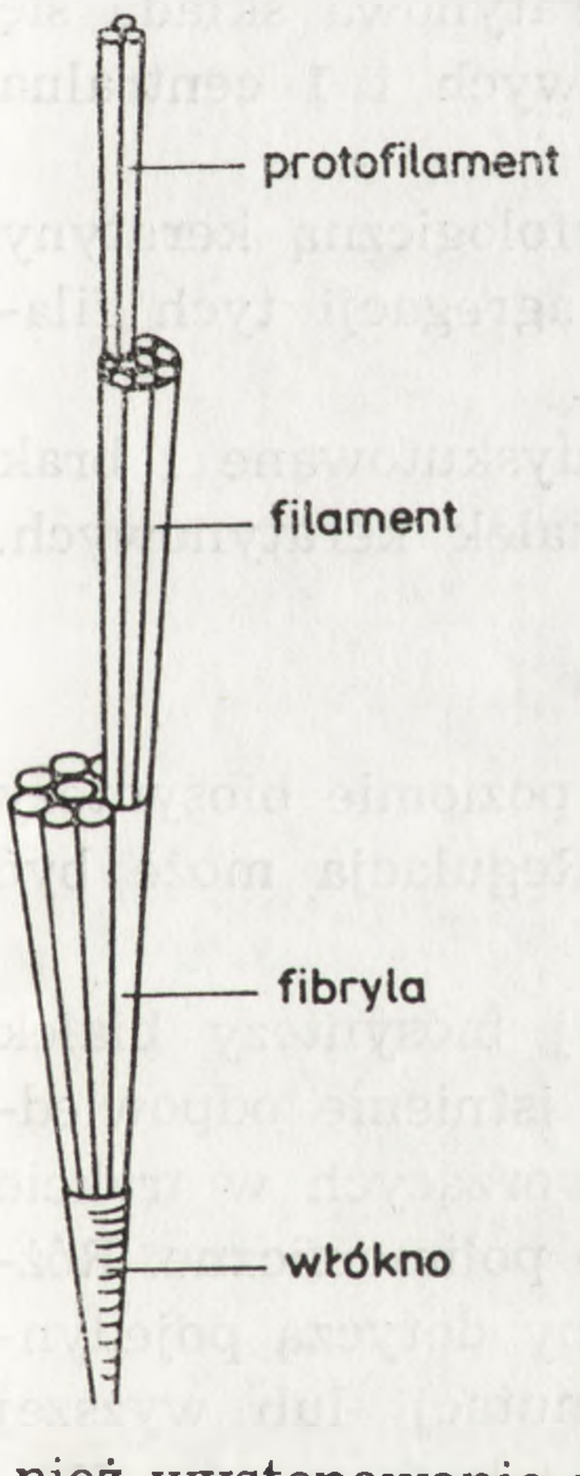
3. Mikrofibryle i substancja podstawowa reprezentują „amorficzne" i „krystaliczne" regiony łańcucha polipeptydowego.

Rycina 6 przedstawia schemat morfologicznej struktury keratyny. Znanych jest obecnie kilka modeli struktury morfologicznej keratyny:

1. Model Cricka za podstawową jednostkę keratyny przyjmuje α-helisę zbudowaną z 3 łańcuchów polipeptydowych [17]. Ten typ struktury stwierdzony został zarówno dla keratyny włosa, jak i naskórka [91].

2. Lee [55] uważa, że podstawowa jednostka strukturalna zbudowana jest z 2 łańcuchów białkowych typu A i jednego łańcucha typu B (ta podstawowa jednostka może tworzyć dimery i tetramery). Przypomina to strukturalną budowę kolagenu i fibrynogenu [58].

3. Fraser [32] postuluje strukturę typu α-helisy utworzoną z 9 mikrofibryli obwodowych i 2 centralnych (układ charakterystyczny dla „paracortex" włosa). Możliwe jest również występowanie układów 9 mikrofibryli obwodowych bez centralnych (w „ortocortex" korowej części włosa), 9 mikrofibryli obwodowych + 1 centralna i 9 mikrofibryli obwodowych + 3 centralne. W „ortocortex" helisy mikrofibryli ułożone są szeregowo, a w „paracortex" — heksagonalnie, dzięki temu włókno włosa uzyskuje dwułomność. Stosunek ilościowy fibryli do substancji podstawowej wynosi 4:1 w „ortocortex" i 1:1 w „paracortex" [54].



Ryc. 6. Struktura morfologiczna keratyny, schemat według Rotha [85] — uproszczony

http://rcin.org.pl

W odróżnieniu od dotychczas omawianych keratyn o strukturze drugorzędowej typu α-helisy, keratyny piór ptasich są białkami o drugorzędowej strukturze. Chemicznie keratyna typu β-struktury różni się od białek typu α-helisy niższą zawartością cysteiny a wyższą zawartością seryny i proliny [47, 87]. Białka pochodzące z różnych części pióra różnią się pomiędzy sobą zawartością niektórych aminokwasów, np. cysteiny, alaniny, glicyny, tyrozyny i proliny [46]. Podobnie jak dla białek o strukturze drugorzędowej typu α-helisy, również dla białek o budowie β-struktury starano się ustalić model morfologicznej struktury trzeciorzędowej.

1. Schorr i Krimm [88, 89] postulują model spirali o okresie powtarzalności 189 Å (co odpowiada 64 resztom aminokwasowym) i średnicy 15,7 Å. Uważają oni, że regularne rozmieszczenie reszt proliny w łańcuchu polipeptydowym umożliwia powstawanie regularnej struktury.

2. Ramachandran [74] postuluje, że fibryla keratynowa składa się z 3 łańcuchów polipeptydowych. 6 fibryli obwodowych i 1 centralna tworzą włókno.

3. Inni badacze za podstawową jednostkę morfologiczną keratyny przyjmują filament o średnicy 40 Å. W wyniku agregacji tych filamentów powstają wyższe jednostki strukturalne [84].

Wszystkie przytoczone tu modele są obecnie dyskutowane i brak jak dotąd jednoznacznego poglądu na strukturę białek keratynowych.

REGULACJA PROCESU KERATYNIZACJI

Proces keratynizacji może być regulowany na poziomie biosyntezy białka i na poziomie różnicowania się komórek. Regulacja może być wynikiem:

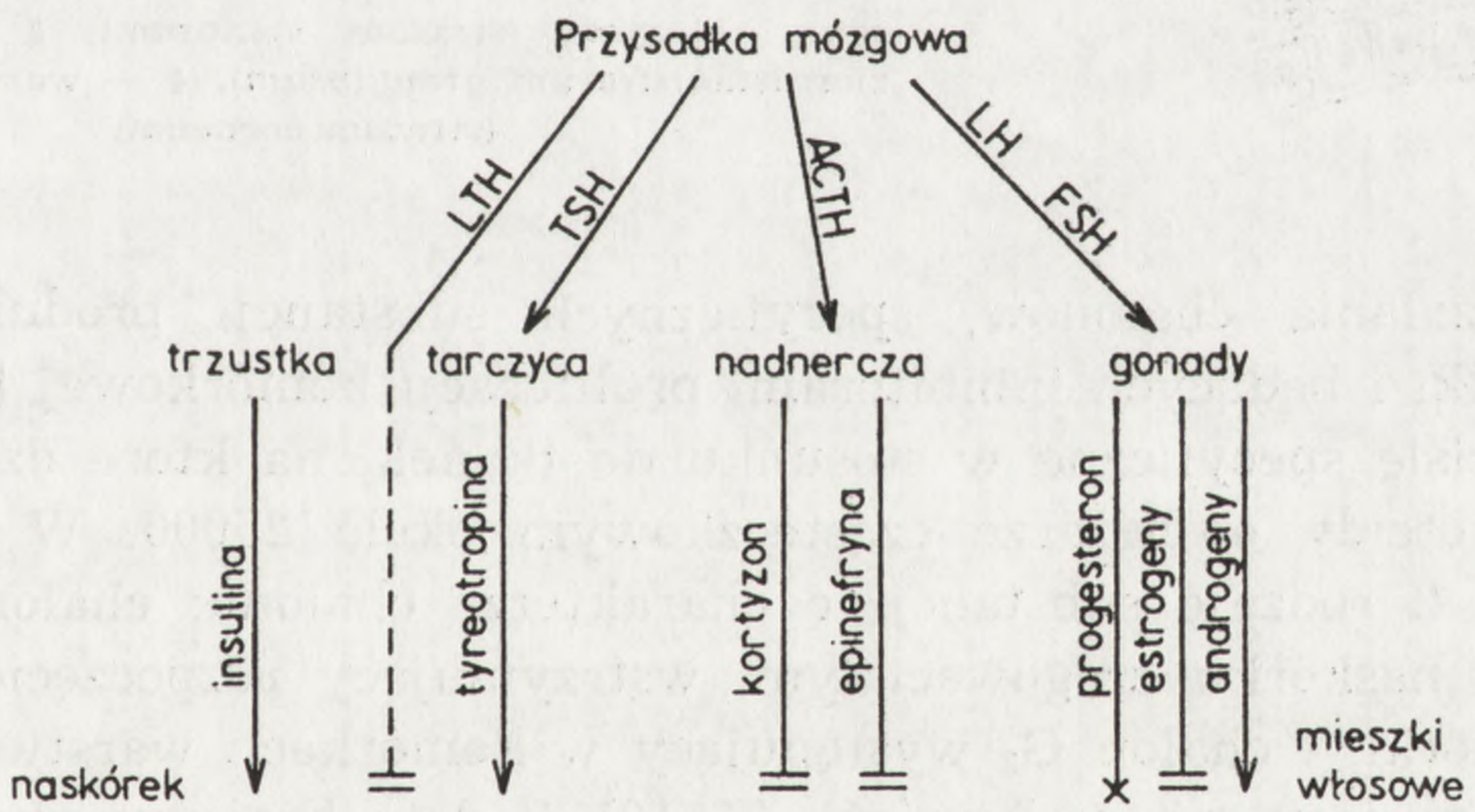
1. Zmian w informacji genetycznej dotyczącej biosyntezy białek keratynowych [42]. Badania Swarta [92] wykazały istnienie odpowiednich genów strukturalnych białek keratynowych tworzących w trakcie preparatyki $SCMKB_2$. Są one kodowane przez allele polimorficzne. Różnice w sekwencji aminokwasów w obrębie tej grupy dotyczą pojedynczych aminokwasów i są wynikiem akumulacji mutacji lub wyższej mutagenności w odpowiednim odcinku DNA genów prekursorów [71]. Kodony odpowiadające kwasowi glutaminowemu i cysteinie mogą poprzez pojedynczą zmianę nukleotydu stać się tripletami nonsensowymi, stanowiąc sygnał zakończenia biosyntezy łańcucha polipeptydowego. Postuluje się, że wszystkie bogate w siarkę białka włosa są pochodnymi jednego białka prekursorowego i powstały poprzez mutacje punktowe prowadzące poprzez zmianę 6 aminokwasów do utworzenia całej grupy

http://rcin.org.pl

polipeptydów. Powtarzanie się jednakowych sekwencji aminokwasowych w białkach włosa tłumaczone jest częściową duplikacją genów w ewolucyjnym rozwoju tej grupy białek. Zmienność i mutagenność w ich kodonach dotyczy prawdopodobnie regionów cząsteczki nie odgrywających kluczowej roli w ich funkcji.

Istnieje możliwość regulacji funkcji białek keratynowych przez zmiany struktury cząsteczek będące wynikiem genetycznie uwarunkowanych zmian sekwencji aminokwasów [59]. Podstawę dla rozważania takiej możliwości stanowi stwierdzenie działania mRNA poprzez selektywne blokowanie i uwalnianie określonych regionów zmutowanych genów.

2. Działania hormonów. Hormony tarczycy oraz hormony płciowe męskie stymulują wzrost włosów i innych utworów rogowych [29, 48], natomiast hormony płciowe żeńskie, ACTH i kortyzon działają hamująco. Wpływają one na mitozę komórek naskórka i mieszków włosowych, a działanie ich uwidacznia się brakiem syntezy białek fibrylarnych [25, 29]. Wpływ hormonów na tkanki keratynizujące obrazuje ryc. 7.



Ryc. 7. Schemat wpływu hormonów na tkanki keratynizujące, według Fergusona i wsp. [29]

——→ — wpływ dodatni (zwiększenie przyrostu włosa lub intensyfikacja keratynizacji), ——|——— — wpływ ujemny (inbibicja procesu keratynizacji), ——x—— — brak efektu, - - - - - - — efekt nieznany

3. Działania czynnika wzrostowego naskórka (EGF). Czynnik wzrostowy naskórka (EGF) występujący np. w surowicy krwi i śliniankach jest białkiem niespecyficznym gatunkowo [11]. Jest on białkiem drobnocząsteczkowym, o masie 6045. Tworzy kompleks z esterazą argininową, enzymem współdziałającym w procesie uwalniania EGF z białka pre-

http://rcin.org.pl

kursorowego [12, 48, 78]. Zawiera duże ilości reszt lizyny, alaniny i fenyloalaniny w cząsteczce. Działanie EGF przebiega drogą uaktywnienia syntezy RNA i białek w komórkach tkanek rogowaciejących [2].

4. Działania prostoglandyn. Prostoglandyny syntetyzowane są w naskórku. Nie wykazano ich specyficzności tkankowej. Prostoglandyny PGE_1 i PF_2 przyspieszają proliferację komórek naskórka, natomiast PE_2 hamuje proliferację a przyspiesza różnicowanie komórek tej tkanki. Prostoglandyny działają poprzez stymulację lub hamowanie syntezy c-AMP i być może poprzez działanie na cyklazę adenylową [60].

Ryc. 8. Schemat budowy naskórka według Zaruby [102] — uproszczony

1 — warstwa podstawowa (stratum basale), *2* — warstwa kolczysta (stratum spinosum), *3* — warstwa ziarnista (*stratum granulosum*), *4* — warstwa rogowa (stratum corneum)

5. Działania chalonów, specyficznych substancji produkowanych przez tkanki i będących inhibitorami proliferacji komórkowej [53]. Chalony są ściśle specyficzne w stosunku do tkanek, na które działają. Są to glikoproteidy o ciężarze cząsteczkowym około 25000. W naskórku występują 2 rodzaje substancji o charakterze chalonu: chalon G_1 występuje w naskórku zrogowaciałym, wstrzymujący rozpoczęcie syntezy DNA komórki, i chalon G_2 występujący w komórkach warstwy podstawowej, hamujący mitozę komórek [6, 10]. Z dotychczas uzyskanych danych wynika, że chalony są międzykomórkowymi przekaźnikami informacji o sprzężeniu zwrotnym pomiędzy dojrzałymi a rozmnażającymi się komórkami naskórka. Nie znany jest jednak mechanizm ich przemieszczania się do komórek poszczególnych warstw naskórka.

6. Działania substancji toksycznych pochodzących z destrukcji komórek rogowaciejących [75]. Substancje powstałe w trakcie cytolizy komórek naskórka stymulują rogowacenie komórek.

7. Temperatury, która zwiększa liczbę podziałów komórkowych w naskórku. Szczególnie wrażliwe na ten czynnik są komórki w fazie G_2 cyklu komórkowego [37].

http://rcin.org.pl

INNE PROCESY FIZJOLOGICZNE TOWARZYSZĄCE PROCESOM KERATYNIZACJI

Oprócz syntezy białek w komórkach tkanek keratynizujących przebiega wiele innych procesów metabolicznych. W młodych warstwach naskórka przebiega intensywny katabolizm glukozy drogą glikolityczną lub poprzez reakcje cyklu pentozowego [34, 38]. Związki wysokoenergetyczne, powstałe w czasie tych procesów, służą do syntezy lipidów i białek. Część glukozy służy jako substrat syntezy glikogenu i mukopolisacharydów [22, 49]. Poziom glikogenu w komórkach tkanek keratynizujących jest niski. Wyższe stężenia tego związku notowane są tylko w okresie wzrostu i różnicowania, a także przy uszkodzeniach, np. mechanicznych tkanek [1, 100]. Rola glikogenu w procesie keratynizacji nie została dotychczas wyjaśniona. Postuluje się, że dostarcza on energii dla mitozy komórek mieszków włosowych i naskórka [9, 57]. Niski poziom glikogenu w komórkach jest cechą charakterystyczną homeostazy naskórka.

W związku z następującym w procesie keratynizacji rozpadem organelli komórkowych, fosfolipidy wchodzące w skład ich błon zostają uwolnione. Następnie fosfolipidy ulegają hydrolizie, a uwolnione kwasy tłuszczowe estryfikują cholesterol. W wyniku tego warstwa rogowa naskórka posiada nie tylko wyższy od innych warstw poziom zestryfikowanego cholesterolu, ale zawartość w tej warstwie naskórka wolnego cholesterolu jest bardzo niska [21, 76]. Lipidy podtrzymują również strukturę błony komórkowej, która w procesie keratynizacji nie ulega destrukcji, a przeciwnie — zostaje wzmocniona do grubości około 100 Å [102].

W tkankach keratynizujących występują liczne enzymy specyficzne dla naskórka [72]. Są to wysokoaktywne fosfatazy dostarczające prawdopodobnie energii dla syntezy wiązań peptydowych [51], niespecyficzne esterazy oraz β-glukuronidaza uwalniana z lisozomów w procesie keratynizacji, kwaśna fosfataza, której aktywność uwarunkowana jest obecnością w warstwie ziarnistej naskórka jonów magnezu [30]. Spośród enzymów przemiany glikolitycznej w naskórku stwierdzono obecność fosforylazy [96], fosfoglukomutazy [101], heksokinazy [22], glikozo-6-fosfatazy, aldolazy [8], enolazy i dehydrogenazy mleczanowej. W mieszkach włosowych stwierdzono przebieg reakcji cyklu kwasów trójkarboksylowych [82], natomiast w naskórku cykl ten jest zakłócony poprzez brak syntezy niektórych enzymów [21]. Większa ilość syntetyzowanego kwasu cytrynowego i α-ketoglutarowego niż pozostałych metabolitów cyklu może sugerować występowanie zmian, być może uwarunkowanych genetycznie, w dalszych enzymach cyklu, poczynając od dehydrogenazy α-ketoglutaranowej.

http://rcin.org.pl

LITERATURA

[1] ADACHI K., Metabolism of glycogen in the skin and effect of X-ray J. Invest. Dermat., **37**: 381–395, 1961.

[2] BADEN H. P., SVIOKLA S., The effect of chalone in epidermal DNA synthesis, Exp. Cell. Res., **50**: 644–645, 1968.

[3] BADEN H. P., GOLDSMITH L. A., The structural protein of epidermis, J. Invest. Dermat., **59**: 67–74, 1972.

[4] BADEN H. P., GOLDSMITH L. A., FLEMMING B., The polipeptyde composition of epidermal prekeratin, Biochem. Biophys. Acta, **317**: 303–310, 1973.

[5] BERNSTEIN I. A., LAWRENCE Ph. D., SIBRACK A., Chemical dynamics in epidermal differentiation, J. Invest. Dermat., **59**: 67–72, 1972.

[6] BERTSCH S., CSONTOS K., SCHWEITZER J., MARKS R., Effect of mechanical stimulation on cell proliferation in mouse epidermis and on growth regulation by endogenous factor, Cell. Tiss. Kinet., **9**: 445–457, 1976.

[7] BLOCK J. R., BOLLING D., Amino acids composition of proteins and foods, Thomas, Springfield, Illinois, 1950.

[8] BRAUN-FALCO O., Über die Fahigkeit der menschlichen Haut zur Polysacharid Synthese ein Betrag zur Histochemie der Phosphorylase, Arch. Klin. Exp. Dermat., **202**: 163–170, 1956.

[9] BULLOUGH W. S., The energy relations of mitotic activity, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., **27**: 133–168, 1952.

[10] BULLOUGH W. S., LAWRENCE E. B., IVERSEN O. H., ELGJO K., The Vertebrate epidermis chalone, Nature, **214**: 578–580, 1967.

[11] CARPENTER G., LEMBACH K. J., MORRISON M. M., COHEN S., Characterisation of the binding of ^{125}J-labelled epidermal growth factor to human fibroblasts, J. Biol. Chem., **250**: 4297–4303, 1975.

[12] COHEN S., Epidermal growth factor, J. Invest. Dermat., **59**: 13–16, 1972.

[13] CORNFIELD M. C., The fractionation of α-keratose, Biochem. J., **84**: 602–605, 1962.

[14] — A new fraction from oxidized wool, Biochem. J., **86**: 125–130, 1963.

[15] CORNFIELD M. C., ROBSON A., SKINNER B., The amino acids composition of three fraction from oxidized wool, Biochem. J., **68**: 349–356, 1958.

[16] CREWTHER W. G., FRASER R. B., LENNOX F. G., LINDLEY H., The chemistry of keratins, Adv. Prot. Chem., **20**: 191, 1965.

[17] CRICK F. H. C., Is α-keratin a coiled coil, Nature, **170**: 882–883, 1952.

[18] CROUNSE R. G., An approach to a common keratin sub-units, Biology of Skin and Hair Growth, Sydney 1965, p. 291.

[19] — Epidermal keratin and epidermal prekeratin, Nature, **211**: 1301–1304, 1966.

[20] — Epidermal keratin, A-revaluation, Nature, **200**: 539–542, 1963.

[21] CRUICKSHANK G. N. D., Isocytric dehydrogenase activity of human epidermis, J. Invest. Dermat., **30**: 33–37, 1958.

[22] CRUICKSHANK G. N. D., TROTTER M. D., COOPER J. R., Studies on carbohydrate metabolism of skin. Biochem. J., **66**: 285–289, 1957.

[23] DAY H. G., Effect of zinc difficiency in the mouse, Federation Proc., **1**: 188–189, 1942.

[24] DOBB M. G., Fine structure of keratin, Nature, **202**: 804–805, 1964.

[25] EBLING F. J., JOHNSON E., The action of hormones on spontaneous hair growth cycle in rat, Brit. J. Endocrinol., **29**: 193–201, 1964.

http://rcin.org.pl

[26] ELLEMAN T. C., The amino acids sequence of protein SCMK-B2A, Biochem. J., **130**: 833–840, 1972.
[27] — The amino acids sequence of protein SCMK-B2C from high sulphur fraction of wool keratin, Biochem. J., **128**: 1229–1238, 1972.
[28] ELLEMAN T. C., DOPHEIDE T. A., The sequence of SCMK-B2B a high sulphur protein from wool keratin, J. Biol. Chem., **247**: 3900–3909, 1972.
[29] FERGUSON K. A., WALLACE A. C., LINDNER H. R., Hormonal regulation of wool growth, Biology of Skin and Hair Growth, Sydney 1965, p. 655.
[30] FILSHIE B. K., ROGERS G. E., The fine structure of keratin, J. Mol. Biol., **3**: 784–786, 1961.
[31] FLEISCHER S., VIDAUER G., HAUROWITZ F., The rate of incorporation S^{35}-amino acids into hair protein, J. Biol. Chem., **234**: 2717–2718, 1959.
[32] FRASER R. D. B., MCRAE T. P., Helical models of feather keratin structure, Nature, **195**: 1167–1168, 1962.
[33] FREEBERG H. M., Pathways and controls of epithelial protein synthesis, J. Inv. Dermat., **59**: 56–62, 1972.
[34] FREINKEL R. K., Metabolism of glucose C^{-14} by human skin in vitro J. Invest. Dermat., **34**: 37–42, 1960.
[35] FUKUYAMA K., Synthesis of keratohyalin, J. Invest. Dermat., **49**: 595–603, 1967.
[36] GAREN A., Sence and nonsence in the genetic code, Science, **160**: 149–150, 1968.
[37] GELFANT S., Temperature induced cell proliferation in mouse ear epiderims in vivo, Exptl. Cell Res., **90**: 458–461, 1975.
[38] GIESEMER R. D., GOULD E., A method of study of the intermediate carbohydrate metabolism of epidermis, J. Invest. Dermat., **22**: 299–302, 1958.
[39] GILLESPIE M. J., The isolation and properties of some soluble proteins from wool, Aust. J. Biol. Sci., **13**: 81–92, 1960.
[40] — The isolation and properties of some soluble proteins from wool, Aust. J. Biol. Sci., **16**: 241–252, 1963.
[41] — The isolation and properties of some soluble proteins from wool, Aust. J. Biol. Sci., **16**: 252–259, 1963.
[42] — The high sulphur proteins of normal and aberrant keratins, Biology of Skin and Hair Growth, Sydney 1965, p. 337.
[43] GILLESPIE M. J., LENNOX F. G., Keratin derivates extracted from wool with alkaline thioglicolate solution, Aust. J. Biol. Sci., **8**: 97–114, 1955.
[44] GILLESPIE M. J., REIS P. J., SCHINCKEL G. P., Some effects of sulphur containing amino acids on the growth and composition of wool, Aust. J. Biol. Sci., **16**: 218–226, 1963.
[45] GILLESPIE M. J., SIMMONDS D. H., Amino acids composition of a sulphur rich protein from wool, Biochem. Biophys. Acta, **39**: 538–539, 1960.
[46] HARRAP B. S., WOODS E. F., Soluble derivates of feather keratin, Biochem. J., **92**: 8–18, 1964.
[47] — Soluble derivates of feather keratin Biochem. J., **92**: 19–27, 1964.
[48] HECHTER O., HALKERSON I. D. K., Effects of steroid hormones on gene regulation and cell metabolism, Ann. Rev. Physiol., **27**: 133–162, 1965.
[49] JACOBSON B., DAVIDSON E., Biosynthesis of uronic acid by skin enzymes, J. Biol. Chem., **237**: 635–637, 1962.
[50] JARRET A., SPEAKMAN R. D., Histochemistry of skin, Psoriasis, 1964.
[51] JARRET A., RILEY P. A., Esterase activity in dendritic cells, Brit. J. Dermat., **75**: 79–81, 1955.
[52] KEENER H. H., PERCIVAL G. P., ELLIS G. M., BEESON K. G., A study

http://rcin.org.pl

of the function of cobalt in the nutrition of sheep, J. Animal Sci., 9: 404–413, 1950.
[53] KJELL ELGJO M. D., Chalone inhibition of cellular proliferation, J. Invest. Dermat., 59: 81–84, 1972.
[54] LEACH S. J., Fibrous keratin, Aust. J. Biol. Sci., 13: 547–566, 1960.
[55] LEE L. D., BADEN H. P., Organisation of the peptide chains in mammalian keratin, Nature, 264: 377–378, 1976.
[56] LINDLEY H., ELLEMAN T. C., The preparation and properties of a group of proteins from the high sulphur fraction of wool, Biochem. J., 128: 859–869, 1972.
[57] LOWENTHAL L. M., MONTAGNA W., Effects of caloric restriction on skin and hair growth in mice, J. Invest. Dermat., 24: 249–258, 1955.
[58] LOTAY S. S., SPEAKMAN P. T., Three-chain merokeratin from wool may be a fragment of the microfibril component macromolecules, Nature, 265: 274–276, 1977.
[59] MCLATHLAN A. D., Repeating sequences and gene duplikation in proteins, J. Mol. Biol., 64: 417–437, 1972.
[60] MARKS F., Epidermal growth control mechanism, hyperplasia and tumor promotion in skin, Cancer Res., 36: 2636–2643, 1976.
[61] MATOLTSY A. G., What is keratin, Advances in Biology of Skin and Hair Growth, Vol. IX, 19–20, 1964.
[62] — Prekeratin, Nature, 201: 1130–1132, 1964.
[63] — Soluble prekeratin, Biology of Skin and Hair Growth, Sydney 1965, p. 656.
[64] — The chemistry of keratinisation, Biology of Hair Growth, Acad. Press 1958, p. 135.
[65] MERCER E. M., The use of word keratin, Advances in Biology of Skin and Hair Growth, Vol. IX, 556–557, 1964.
[66] — Some experiments on the orientation and hardending of keratin in hair, Biochem. Biophys. Acta 3: 161–168, 1949.
[67] MERCER E. M., MUNGER B. L., ROGERS G. E., ROTH S. J., A suggested nomenclature for fine-structural components of keratin and keratin-like products of cells, Nature, 201: 367–369, 1964.
[68] O'DONNELL I. J., THOMPSON E. O. P., Studies on oxidized wool, Aust. J. Biol. Sci., 12: 303–310, 1959.
[69] — Studies on oxidized wool, Aust. J. Biol. Sci., 15: 624–628, 1962.
[70] O'DONNELL I. J., THOMPSON E. O. P., INGLIS A. S., N-acetyl groups in wool and extracted wool proteins, Aust. J. Biol. Sci., 15: 718–729, 1962.
[71] PARRIS D., SWART L. S., Studies on the high sulphur protein of reduced mohair, Biochem. J., 145: 459–467, 1975.
[72] PLAGEMANN G. W., GREGORY K. F., WROBLEWSKI F., The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase, J. Biol. Chem., 235: 2282–2287, 1960.
[73] PRIESTLEY G. C., SPEAKMAN P. T., Intra cellular site of epidermal keratin synthesis, Nature, 209: 1336–1337, 1966.
[74] RAMACHANDRAN G. N., SASISEKHARAN V., Cylindrical lattice structure of collagen, Arch. Biochem. Biophys., 63: 255–258, 1956.
[75] RAWLES M. E., Tissue interaction in the morphogenesis of feather, Biology of Skin and Hair Growth, Sydney 1965, p. 105.

http://rcin.org.pl

[76] REINERSTON R., WHEATLEY V. P., Studies on the chemical composition of human epidermal lipids, J. Invest. Dermat., 32: 49–59, 1959.
[77] REIS P. J., Some effects of suphur containing amino acids on the growth and composition of wool, Aust. J. Biol. Sci., 16: 218–231, 1963.
[78] RHEINWALD J. G., GREEN H., Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, Nature, 265: 421–424, 1977.
[79] ROGERS G. E., Newer finding on the enzymes and proteins of hair follicles, Ann. N. Y., Acad. Sci., 83: 408–412, 1959.
[80] — Content of cytruline and other amino acids in a protein of hair follicles, Nature, 182: 186–189, 1958.
[81] — Isolation and properties of inner sheath cells of hair follicles, Exptl. Cell. Res., 33: 264–268, 1964.
[82] — Amino acids metabolism in the wool roots, Nature, 183: 992–997, 1959.
[83] ROGERS G. E., CLARCE R. M., An approach to the investigation of protein biosynthesis in hair follicles, Biology of Skin and Hair Growth, Sydney 1965, p. 345.
[84] ROGERS G. E., FILSHIE B. K., FRASER R. D. B., MC RAE T. P., X-ray diffraction and electron-microscope observation on soluble derivates of feather keratin, Biochem. J., 92: 19–38, 1964.
[85] ROTH J. S., Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin, Philadelfia 1967.
[86] RUDALL K. M., The protein of mammalian epidermis, Adv. Prot. Chem., 7: 253–290, 1952.
[87] SCHROEDER W. A., KAY L. M., MUNGER N., BALOG J., The chromatographic separation and identification of some peptides in partial hydrolysates of white turkey feather calamus, J. Ann. Chem. Soc., 79: 2769–2775, 1957.
[88] SCHORR R., KRIMM S., Studies on structure of feather keratin, Biophys. J., 1: 467–487, 1961.
[89] — Studies on structure of feather keratin Biophys. J., 1: 489–515, 1961.
[90] SMUTS D. B., MITCHELL H. H., HAMILTON T. S., The relation between dietary cysteine and the growth and cystine content of hair in the rat, J. Biol. Chem., 95: 283–295, 1932.
[91] SWART L. S., Homology in amino acids sequence of the high sulphur proteins from wool, Nature New Biology, 243: 27–39, 1973.
[92] SWART L. S., HAYLETT T., Studies on high sulphur proteins of reduced merino wool. Amino acids sequence of protein SCMKB-IIIA3, Biochem. J., 133: 641–648, 1973.
[93] — Studies on high sulphur proteins of reduced merino wool, Biochem. J., 123: 201–210, 1971.
[94] SUN T. T., GREEN H., Cultured epithelial cells of cornea, conjunctive and skin. Absence of marked intrisic divergence of their differential states, Nature, 269: 489–492, 1977.
[95] TAKEUCHI T., KURIAKI H., Histochemical detection of phosphorylase in animal tissue, J. Histochem. Cytochem., 3: 153–160, 1955.
[96] THOMPSON E. O. P., O'DONNELL I. J., Studies on reduced wool, Aust. J. Biol. Sci., 15: 552–559, 1962.
[97] — Studies on reduced wool, Aust. J. Biol. Sci., 17: 277–282, 1964.
[98] WARD W. H., LUNDGREN H. P., The formation, composition of the keratins, Adv. in Prot. Chem., Vol. IX, 243–290, 1954.

http://rcin.org.pl

[99] WEISS L. W., ZELIKSON A. S., Embriology of epidermis, Acta Dermatovener., **55**: 431–442, 1975.
[100] WOHNLICH H., Nachweis von Amylase, α-Glucosidase und Phosphorylasen in menschlichen Schweiss, Z. Physiol. Chem., **308**: 197–203, 1957.
[101] ZARUBA F., Problemy keratynizace, Ceska dermatologia, **46**: 209–216, 1971.
[102] — Problemy keratynizace, Ceska Dermatologia, **46**: 216–223, 1971.

Otrzymano: 25 marca 1979.
Przyjęto: 14 lipca 1979.

Adres autorki: ul. Dorodna 16, 03-194 Warszawa.

http://rcin.org.pl

MIANOWNICTWO DOTYCZĄCE HODOWLI KOMÓREK I TKANEK IN VITRO

W sprawie propozycji „Mianownictwa", ogłoszonej w „Postępach Biologii Komórki" (t. 6, nr 1, 53 - 56, 1979), nadeszły dwa listy z uwagami, za które dziękujemy. Okazuje się, że podobna propozycja mianownictwa ukazała się w II wydaniu książki prof. dra Z. Larskiego „Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt" (PWRiL, Warszawa 1977), o czym Komisja Hodowli Komórek i Tkanek ani Redakcja nie wiedziały. Ponieważ materiały wyjściowe dla obu propozycji były te same, stąd duża zbieżność obu opracowań. W opracowaniu prof. dra Z. Larskiego są dodatkowo zamieszczone terminy w języku niemieckim i rosyjskim. List nadesłany przez prof. dra B. Kubickiego i dra S. Malepszego (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Warszawa) zawiera propozycję zastąpienia terminu „hodowla" terminem „kultura". Propozycja wydaje się logicznie uzasadniona, ale trudna do przyjęcia wobec niemal wyłącznego stosowania terminu „hodowla" w polskim piśmiennictwie biologicznym i lekarskim. Pewne obiekcje wzbudzają niektóre terminy genetyczne występujące w mianownictwie. Obiekcje te wynikają z faktu, że w oryginale angielskim definicje niezbyt ściśle odpowiadają terminowi, np. termin „haploid" definiowany jest nie jako organizm z haploidalną liczbą chromosomów, lecz jako podstawowa jednostka ploidalności. Próba przetłumaczenia tego terminu jako „haploidalność" jest uważana za niesłuszną, gdyż ten termin też niezbyt ściśle odpowiada definicji. Po szeregu konsultacji uznaliśmy, że lepiej odda intencję autorów terminologii i będzie bardziej odpowiadać definicji, jeśli za odpowiednik polski określeń „haploid, diploid, tetraploid, polyploid,

http://rcin.org.pl

heteroploid i euploid" przyjmie się odpowiednio „liczba haploidalna, liczba diploidalna" itd., a nie jak proponowaliśmy poprzednio „haploidalność, diploidalność" itd.

Komisja Hodowli Komórek i Tkanek Komitetu Patofizjologii Komórki PAN i Redakcja „Postępów Biologii Komórki" proponuje:

1. uzupełnienie „Mianownictwa" o termin

Ustalona linia komórkowa (established cell line) — linia komórkowa wykazująca nieograniczoną zdolność do pasażowania. Kryteria czasu hodowli albo liczby pasaży, po których linia zostaje uznana za ustaloną, są arbitralne i mogą się zmieniać w miarę postępu techniki hodowli.

2. przyjęcie wersji „Mianownictwa", opublikowanej w tomie 6, 1979, „Postępów Biologii Komórki", wraz ze wspomnianymi uzupełnieniami, za obowiązujące.

http://rcin.org.pl

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe, omawiające najnowsze osiągnięcia w dziedzinie biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem histologicznym, anatomicznym i embriologicznym.

Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

Prace należy przesyłać w dwu egzemplarzach — zarówno tekst, jak i załączniki. Objętość tekstu (bez rysunków wraz z objaśnieniami) nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie, z podwójną interlinią, marginesem około 4 cm po lewej stronie oraz ponumerowany. W tekście nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem.

Na pierwszej stronie, przed tekstem, należy podać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, pod nim imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów oraz nazwę zakładu naukowego, w którym autorzy pracują, następnie krótkie streszczenie (ok. 1/2 strony) — również w języku polskim i angielskim. Za streszczeniem, z pozostawieniem około 5 cm odstępu, następuje tekst główny. W tekście nie należy zamieszczać żadnych tabel, rysunków, fotografii ani schematów. Dla ustalenia ich lokalizacji należy pozostawić wolny wiersz w żądanym miejscu i odpowiednio zaznaczyć ołówkiem na marginesie: tab. 1, ryc. 1 itp.

Tekst podzielony na rozdziały jest bardziej przejrzysty. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Za tekstem należy dołączyć spis literatury. Powinna być ona ułożona w porządku alfabetycznym. Powoływanie się na cytowaną literaturę następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach prostokątnych, np. [5].

Przykłady cytowania literatury:

[1] Sachsenmajer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, Exptl. Cell Res., **73**: 41–48, 1972.

[2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [w] Histone and Nucleohistones, red. D. M. P. Philips, Plenum Press, London, New York 1977, 60–64.

Tabele należy dołączyć na oddzielnych kartkach — każda powinna być podpisana. Rysunki, schematy, fotografie należy dołączyć w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Fotografie powinny być na błyszczącym papierze, kontrastowe. Podpisy pod ryciny powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Przy załącznikach powinno być podane ich pochodzenie.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów.

Autor na życzenie Redakcji obowiązany jest dokonać korekty autorskiej, którą powinien zwrócić w ciągu 3 dni. Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi Autor.

Artykuły honorowane są według ustalonych stawek, autorzy otrzymują 25 nadbitek bezpłatnie.

http://rcin.org.pl

INSTRUCTION FOR AUTHORS

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI (Advances in Cell Biology) publishes review articles discussing the latest achievements in the field of cell biology, which so far have not appeared elsewhere. The authors are responsible for the exactness of the information supplied. The papers appearing in POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI may not be published without consent of the editorial board in any other periodical.

Papers should be sent in two copies, both the text and the annexes. The text (without figures and captions) should not exceed 20 pages. The typescript (one-sided) should be double-spaced with a margin of about 4 cm on the left side. The pages should be numbered. No underscoring by typewriter or in ink may be done in the text.

The first page bears the title and underneath the first names (in full) and family names of the authors and the names of the institutions where they work, followed by a short (ca. 1/2 page) summary. The proper text should follow with a 5 cm interval between. Tables, figures, photographs or diagrams should not be included in the text. For indicating where they are to be placed a line may be left out and mention made on the margin in pencil (e.g. table 1, fig. 1 etc.).

The text is better legible when divided into chapters. After the titles of chapters no full stops are put. The text should be followed by references arranged in alphabetical order according to the quoted authors. Reference in the text is made by inserting the corresponding number in square brackets (e.g. [5]).

Examples of literature quotation:

[1] Sachsenmajer W., Remy U., Plattner R., Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*, Exptl. Cell Res., **73**: 41–48, 1972.

[2] Hnilica L. S., McClure M. E., Speltzberg T. C., Histone biosynthesis and the cell cycle, [in] Histone and Nucleohistones, ed. D. M. P. Philips, Plenum Press, London, New York 1977, 60–64.

Tables should be attached on separate pages — each with a heading. Figures, diagrams and photographs should be included in a form suitable for reproduction or redrawing. Photographs should be well contrasted, on hard paper. The legend to figures should be typed on a separate page. If figures are included, taken from papers of other authors, their origin should be quoted.

The editor is authorised to introduce some abbreviations in the text without affecting the subject.

On request of the editor the author is under the obligation of proof-reading the text and returning it within 3 days. The expenses due to changes introduced into the text during proof-reading will be charged to the author.

Authors fees are paid according to the established rates and the author receives 25 reprints free of charge.

Copies of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI may be ordered by writing to ORWN PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

http://rcin.org.pl

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 80.— półrocznie zł 40.—

Prenumeratę **na kraj** przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch" oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada, na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch", w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki **za granicę** przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch", Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

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

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 00 - 068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 10001, POLAND.

Payments are to be sent to the account of Ars Polona-Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00 - 067 Warszawa, POLAND.

http://rcin.org.pl

Cena zł 20,—

SPIS TREŚCI

M. KWIATKOWSKA i M. J. OLSZEWSKA, Profesor Wilhelm Bernhard (1920-1978) 243
S. BILIŃSKI, Powstawanie żółtka w oogenezie bezkręgowców 249
K. WOROWSKI, Proteinazy komórek drożdżowych i ich inhibitory 267
M. POLAŃSKI, Plazmolema komórki roślinnej. II. Fizjologiczna funkcja plazmolemy 283
H. KONONOWICZ, Segregacja rdzeni nukleosomów w czasie replikacji DNA 307
M. ROCHALSKA, Białka keratynowe 321

Indeks 36970

http://rcin.org.pl