

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 15-NR4

1988 (413-512)

PWN WARSZAWA—WROCŁAW

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Maciej KAWALEC – sekretarz

Rada Redakcyjna

Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA,
Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca,
Aleksandra PRZEŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe – Oddział Wrocławski

Nakład 538+92 egz. Ark. wyd. 7,5. Ark. druk. 6,25+0,25 wkł. roczna. Papier druk. sat. kl. III, 80g, 70×100 cm. Oddano do składania 19 VIII 1988 r. Podpisano do druku w styczniu 1989 r. Druk ukończono w styczniu 1989 r. Zam. 3481/88. Cena 160 zł

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

<http://rcin.org.pl>

EKSPRESJA I BUDOWA GENU U EUCARYOTA*

GENE STRUCTURE AND EXPRESSION

Stanisław SZALA

Zakład Biologii Nowotworów, Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie,
Oddział w Gliwicach

Streszczenie. Omówiono strukturę i ekspresję genów u Eucaryota. Zwrócono szczególną uwagę na mechanizmy składania mRNA oraz inicjację transkrypcji.

Summary. Structure and expression of eukaryotic genes are reviewed. Especially, the recent results concerning the splicing of mRNA and initiation of transcription are described.

„To ogromnie trudno zmusić jedno słowo,
żeby tyle znaczyło — powiedziała Alicja
popadając w zadumę”.

L. Carroll, „O tym, co Alicja
odkryła po drugiej stronie lustra”

W biologii termin gen występuje w kilku znaczeniach [26, 41, 54, 67]. Początkowo definiowano go jako podstawową jednostkę zróżnicowania fenotypowego, związaną z jedną niepodzielną, pierwotną funkcją metaboliczną czy rozwojową. Następnie gen rozumiano jako podstawową jednostkę dziedziczności, niepodzielną ani przy rekombinacji, ani przy strukturalnej zmianie chromosomu. W ostatnich latach za gen uważa się specyficzny liniowy układ nukleotydów w DNA (lub RNA). Gen jest jednostką funkcjonalną, określającą dzięki zawartej w niej informacji genetycznej kolejność aminokwasów w określonym polipeptydzie albo kolejność nukleotydów w cząsteczkach RNA.

Znaczenie wielu terminów w nauce ustala się najczęściej przeprowadzając

* Referat wygłoszony na XVII Konferencji Szkoleniowej z zakresu biologii komórki, zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików oraz Redakcję Postępów Biologii Komórki (Warszawa, 14 listopada 1987 r.).

tw. operację testującą. Innymi słowy: definicja opisuje czynności, których wykonanie pozwala stwierdzić, czy jakiś przedmiot podpada pod definiowane pojęcie.

W definicji pierwszej operacją testującą jest sprawdzenie, czy jakaś cecha (np. kolor kwiatów lub kształt nasion) dziedziczy się zgodnie z prawami Mendla. W drugiej definicji operacją testującą są testy rekombinacyjne, a w trzeciej test komplementacyjny cis-trans. W dwu ostatnich testach metoda identyfikacji genu polega na uzyskaniu jego form zmutowanych i analizie efektów fenotypowych. Postępowanie takie umożliwi wyznaczenie funkcji badanego genu.

Definicje operacyjne są definicjami cząstkowymi (niepełnymi). Cząstkowy charakter definicji powodowany jest prawie zawsze brakiem dostatecznej wiedzy o danym przedmiocie. W wyniku rozwoju nauki wiele określeń cząstkowych zostaje zastępowanych określeniami nowymi. Każda nowo wprowadzona definicja tworzy pojęcie o zakresie szerszym niż zakres pojęcia tworzonego przez definicję poprzednią.

Wprowadzenie operacji testujących, opartych na nowych technikach badawczych, prowadzi do ujawnienia coraz to innych cech badanego przedmiotu. Nowe metody badawcze typu klonowania fragmentów DNA czy oznaczania ich sekwencji umożliwiają identyfikację specyficznego liniowego układu nukleotydów w DNA, odpowiedzialnego za syntezę określonego polipeptydu.

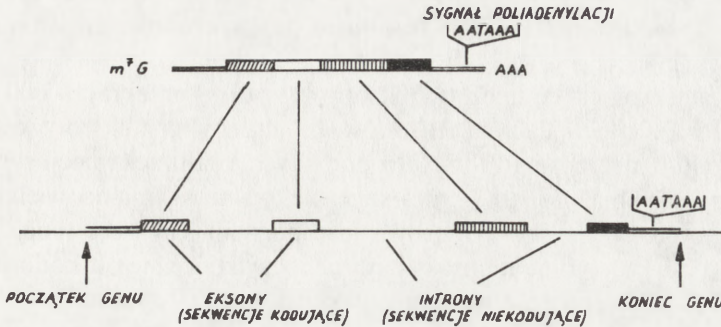
Przez gen — jednostkę funkcji — będzie się obecnie uważało taką sekwencję DNA, która zostanie wyznaczona przez sekwencje nukleotydowe obecne w mRNA (RNA wyznaczającym kolejność aminokwasów w kodowanym polipeptydzie) lub w RNA typu rRNA, tRNA itd. [14, 20, 26]. Zidentyfikowane w odpowiednim fragmencie DNA sekwencje nukleotydowe mRNA pozwalają wyznaczyć sekwencje kodujące aminokwasy (eksony), sekwencje niekodujące (introny) oraz początek i koniec jednostki transkrypcji (ryc. 1).

Użycie nowego sposobu identyfikacji genów ujawni wiele nowych i raczej nieoczekiwanych cech. Okaże się bowiem, że geny zachodzą na siebie [49], mogą się przemieszczać [26, 66], być składane w coraz to większe jednostki [30, 65], występować w obrębie innych genów [19, 20] itd. Warta wspomnieć o pseudogenach — genach defektywnych nie ulegających transkrypcji [68]. Przypuszcza się, że powstają one w wyniku tzw. retrotranskrypcji. Transkrypt pierwotny (pre-mRNA) lub mRNA służy jako matryca do syntezy komplementarnego DNA (cDNA), który w postaci jedno- lub dwuniciowej zostaje następnie wbudowany do genomu [57]. W większości przypadków pseudogeny pozbawione są intronów i, co oczywiste, nie mają sekwencji regulujących typu promotorów.

W tej krótkiej pracy, będącej uzupełnieniem podstawowych artykułów w polskim piśmiennictwie [27, 28, 34], zwrócę uwagę na kilka nowych danych dotyczących struktury i ekspresji genów eukariotycznych kodujących białka,

a zwłaszcza na mechanizm składania mRNA i inicjacji transkrypcji. Ze względu na szeroki zakres poruszanej problematyki ograniczę się wyłącznie do zacytowania jedynie podstawowego piśmiennictwa w tym zakresie.

RELACJA MIĘDZY SEKWENCJAMI mRNA I DNA



Ryc. 1. Relacja między sekwencjami mRNA i DNA. W większości przypadków początek i koniec genu wyznaczają sekwencje końców 5' i 3' mRNA. Sekwencje kodujące aminokwasy w mRNA pozwalają wyznaczyć eksony. m^7G – metylowany koniec 5' transkryptu, AAA – poliadenylowany koniec 3' transkryptu

Zdecydowana większość genów eukariotycznych, poza np. genami histonów, genami szoku cieplnego czy niektórymi interferonów, zawiera w obrębie swoich sekwencji kodujących regiony, które nie biorą udziału w kodowaniu aminokwasów. W polskim piśmiennictwie [27, 28, 34] geny takie nazywane są genami mozaikowymi, genami w kawałkach lub genami nieciągłymi. Określenia te mają charakter chwiejny. Mimo wielu sekwencji niekodujących (intronów) gen zachowuje swoją integralną całość widoczną chociażby w procesach transkrypcji.

Obecność intronów (w niektórych genach liczba ich przekracza 30) powoduje, że najdłuższe geny liczą 200–300 tys. nukleotydów. Jeden z największych, jak dotąd, oznaczonych genów to gen kodujący tyreoglobulinę wielkości 300 tys. nukleotydów [4].

Gen (a być może zespół genów), którego defekty prowadzą do choroby zwanej dystrofią mięśni Duchenne'a, ma wielkość nawet 1000–2000 tys. nukleotydów [16]. Największe zidentyfikowane introny to: liczący 64 tys. nukleotydów intron w genie tyreoglobuliny [4] czy mierzący 200 tys. nukleotydów intron w onkogenie c-abl [10].

W intronach wielu genów znajduje się wiele sekwencji powtarzających się, mających charakter retrotranspozonów, tzn. sekwencji wbudowanych do genomu w wyniku retrotranskrypcji [5, 57]. Przypuszcza się, że w wyniku

rekombinacji między sekwencjami powtarzającymi się w intronach może dochodzić do rozległych delecji obejmujących również sekwencje kodujące [40]. W genie receptora białka transportującego cholesterol, tzw. lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), rekombinacja zachodzi między powtarzającymi się sekwencjami Alu. Jedna z sekwencji Alu znajduje się w intronie, a druga, o odwróconej polarności względem pierwszej, w eksonie zawierającym region mRNA, który nie ulega translacji [40]. Delecja prowadzi do powstania defektywnego receptora LDL i w rezultacie do hypercholesterolemii i zmian miażdżycowych.

Wielkość sekwencji kodujących (eksonów) rzadko przekracza 600 nukleotydów. Jeden z najmniejszych eksonów to liczący 6 nukleotydów ekson troponiny mięśnia sercowego [15]. Na podstawie analiz sekwencji symulowanych komputerowo Senapathy [60] sugeruje, że maksymalna wielkość sekwencji mających przypadkową, losową fazę odczytu, czyli sekwencji kodujących statystycznie dowolne aminokwasy rozpoczynające się od kodonu inicjującego (ATG) i kończące się jednym z trzech kodonów terminujących (TAG, TAA, TGA), wynosi około 600 nukleotydów (200 kodonów). Powstanie genów, liczących zatem więcej niż 200 kodonów, może zachodzić poprzez „sumowanie” fazy odczytu wielu krótkich oddzielonych od siebie sekwencji kodujących aminokwasy (tzn. minigenów), sekwencji, z których tylko pierwsza będzie miała kodon inicjujący, a ostatnia kodon terminujący. Warto tu wspomnieć również koncepcję Hickey'a i Benkela [33] o powstawaniu intronów w wyniku retrotranskrypcji, a także koncepcje Naory i wsp. [48] oraz Ohno [50] odnośnie roli eksonów w ewolucji.

Spostrzeżenia Senapathy'ego [60] wydają się więc potwierdzać wcześniejsze uwagi Gilberta [29, 30] o związku między eksonami a tzw. domenami (funkcjonalnymi lub strukturalnymi fragmentami białek). Wiele danych wskazuje, że eksony mogą kodować poszczególne domeny białek. Doskonałym przykładem są lekkie i ciężkie łańcuchy immunoglobulin, których poszczególne domeny są kodowane przez odrębne eksony [71]. Domeny wiążące NAD lub ATP w takich enzymach jak kinaza pirogronianowa, dehydrogenaza alkoholowa, kinaza fosfoglicerynianowa czy dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego są kodowane przez podobne eksony. Pozostałe domeny w tych enzymach są natomiast kodowane przez różne eksony [22].

W wielu przypadkach obserwuje się kombinacyjne składanie wielu różnych grup eksonów w większe całości, np. gen receptora lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) składa się m.in. z eksonów kodujących prekursor nabłonkowego czynnika wzrostowego (EGF) i eksonów komplementu C9 [65].

W procesie transformacji nowotworowej obserwuje się często powstawanie genów fuzyjnych, składających się z eksonów różnych genów [11, 13, 45, 51]. Na przykład onkogen *trk* (zidentyfikowany w raku okrężnicy) składa się z fragmentów kinazy tyrozyny i tropomiozyny [45].

Składanie eksonów w różnych kombinacjach (ang. exon-shuffling) może prowadzić do powstawania białek o nowym rozmieszczeniu domen i równocześnie odmiennych często funkcjach [29].

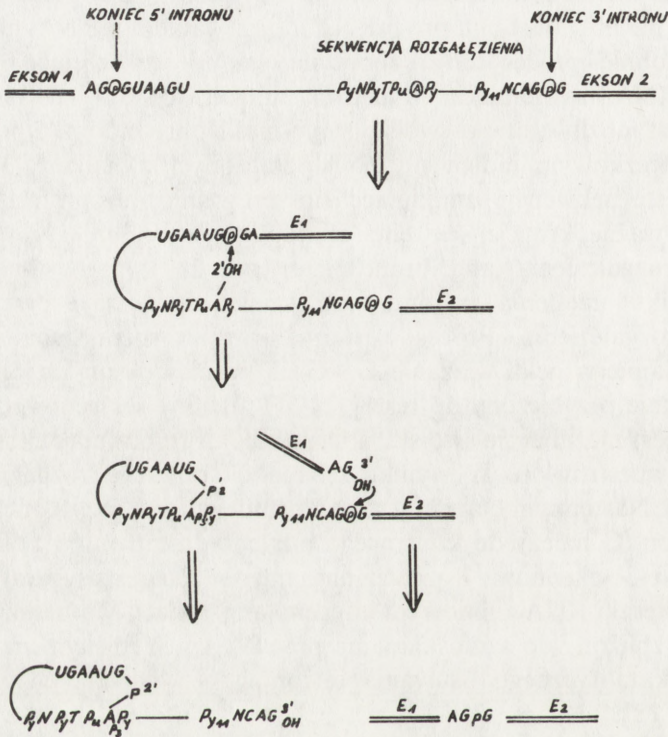
Transkrypcja genu, którego sekwencje kodujące są poprzedzielane intronami, prowadzi do syntezy transkryptu pierwotnego, tzw. pre-mRNA zawierającego sekwencje eksonów i intronów [14, 21]. Proces usuwania intronów i łączenia we właściwej kolejności eksonów nazywany jest w polskiej literaturze składaniem mRNA (obróbką pre-mRNA, dojrzewaniem mRNA, ang. splicing). Prawdopodobnie proces ten rozpoczyna się od utworzenia przestrzennej struktury RNA, zawierającej wypętlony intron [3, 61]. Powstanie takiej struktury jest możliwe dzięki swoistym rybonukleoproteidom (typu snRNP, tj. drobnocząsteczkowym, jądrowym RNA połączonych z białkami) rozpoczynającym swoiste sekwencje znajdujące się na granicy ekson-intron oraz co niezmiernie ważne, krótkiej sekwencji znajdującej się w obrębie intronu zwanej sekwencją rozgałęzienia (ang. branch site) (ryc. 2).

W wyniku upętlenia intronu jego koniec 5' zostaje przybliżony do sekwencji rozgałęzienia. Proces usuwania intronu rozpoczyna się od jego końca 5'. Najpierw pęka wiązanie G–G na granicy ekson–intron. Koniec 5' intronu zostaje przyłączony do reszty 2' OH adeniny sekwencji rozgałęzienia. Reakcja ta jest niezmiernie swoista, a wiązanie, które powstaje, jest wiązaniem 2'–5' fosfodwuestrowym. W wyniku tej reakcji powstaje rozgałęziony RNA [25] (ryc. 3). Następnym etapem jest rozerwanie wiązań przy końcu 3' intronu typu G-ekson (G należy do końcowego nukleotydu intronu) i połączenie obu końców 5' i 3' eksonów. Rozgałęziony intron zostaje usuwany w postaci kolistej cząsteczki RNA z liniowym końcem (ang. lariat). Mechanizm składania mRNA jest zbliżony do samoskładania pre-rRNA w Tetrahymena i przebiega drogą autokatalitycznego usuwania intronów bez udziału enzymatycznych białek [17, 18].

Większość reakcji wycinania intronu i łączenia końców 5' i 3' eksonów w pre-mRNA zachodzi w obrębie złożonego kompleksu (ang. spliceosome) różnego typu drobnocząsteczkowych, jądrowych RNA (snRNA) i połączonych z nimi białek. Przypuszcza się, że różne typy snRNP (drobnocząsteczkowych, jądrowych rybonukleoproteidów) rozpoznają końce 5' i 3' intronu, a także sekwencję rozgałęzienia. Tzw. słaby kompleks z U1snRNP, który powstaje w miejsce 5', prawdopodobnie chroni koniec 5' intronu przed RNA-azą T_1 , ale nie przed RNA-azą H. Równie słaby kompleks powstaje w miejscu 3' intronu z snRNP, prawdopodobnie typu U5snRNP. W obecności ATP, w miejscu rozgałęzienia tworzy się mocny kompleks z U2snRNP. Mocny również kompleks tworzy się w miejscu 5' intronu. Obserwuje się również przyłączenie do kompleksu U4/U6 snRNP.

Precyzyjne usuwanie intronu sugeruje ważną rolę sekwencji nukleotydo-

wych w miejscu połączeń intron-ekson. Na przykład mutacje nukleotydów AG sekwencji końca 3' intronu $P_{y_{11}}$ NCAG znoszą całkowicie reakcje składania mRNA. Mutacje te wpływają zatem nie tylko na reakcję przy końcu 3', ale także na końcu 5' intronu, co potwierdza przypuszczenie, że utworzenie mocnego, stabilnego kompleksu 5' jest uzależnione od uprzedniego utworzenia kompleksu przy końcu 3'.



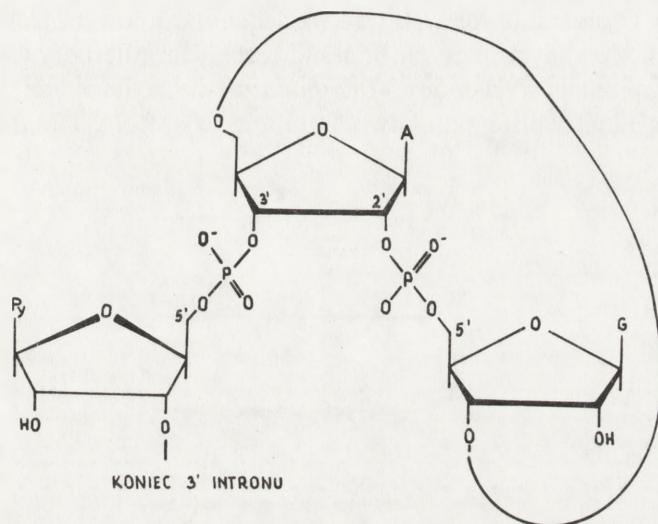
Ryc. 2. Schemat usuwania intronu i łączenia eksonów (wg [61]). Na rycinie zaznaczono typowe sekwencje występujące na granicy ekson-intron oraz intron-ekson. Zaznaczono również sekwencję rozgałęzienia występującą w intronie. P_y – nukleotydy pirymidynowe, N – dowolny nukleotyd, p – reszta fosforanowa. Eksony zaznaczono podwójnymi liniami, intron – pojedynczą. W kółkach znajduje się adenina biorąca udział w reakcji powstawania „rozgałęzionego” RNA oraz reszty fosforanowe

Wiele analiz wskazuje więc, że składanie mRNA zależy od rodzajów i typów sekwencji w miejscu 5' i 3' intronu, od sekwencji rozgałęzienia, od długości i rodzajów sekwencji sąsiadujących z intronem oraz od długości samego intronu (minimalną wielkość oszacowano na około 80 nukleotydów).

Proces usuwania intronów i łączenia we właściwej kolejności eksonów

przebiega w obrębie tej samej cząsteczki prekursora mRNA. Reakcje tego typu nazywane są często reakcjami cis [3, 17, 18, 61].

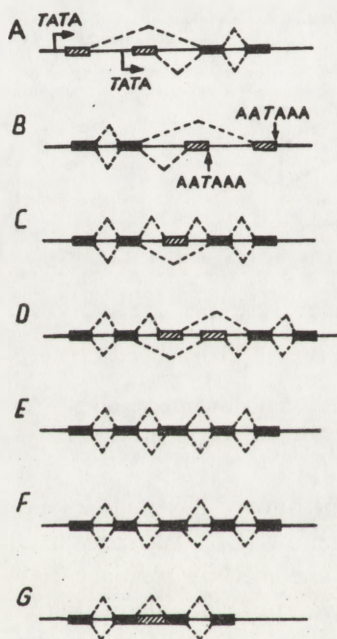
U *Trypanosoma* proces wycinania i łączenia eksonów może przebiegać między różnymi cząsteczkami RNA. Reakcje te nazywane są reakcjami trans [62]. Proces taki zaobserwowano również u nicienia *Caenorhabditis elegans*, gdzie pewna krótka sekwencja zostaje przyłączona do różnych mRNA (jako tzw. sekwencja liderowa).



Ryc. 3. Schemat wiązania 2'-5' fosfodwustrowego i 3'-5' fosfodwustrowego w „rozgałęzionym” RNA. A – adenina, G – guanina, Py – dowolna pirymidyna

Proces usuwania intronów i łączenia eksonów może odgrywać pewną rolę w regulacji ekspresji genów [21]. W różnych typach komórek z tego samego genu mogą być składane mRNA różniące się liczbą i kolejnością eksonów. Składanie takie nazywa się składaniem alternatywnym [15] (zob. ryc. 4). W najprostszych przypadkach proces ten oparty jest na wyborze jednego z dwóch promotorów [7, 58]. mRNA różni się wtedy długością, a różnica dotyczy końców 5', np. izoformy lekkiego łańcucha miozyny [6]. Proces alternatywnego składania mRNA oparty być może na wyborze jednego z dwóch miejsc poliadenylacji. Wówczas mRNA różni się końcami 3'. Przykładem jest choćby składanie mRNA dla kalcitoniny i polipeptydu zbliżonego do kalcitoniny (ang. calcitonine gene-related protein, CGRP) [12]. Bardziej złożony proces polega na kombinacyjnym wyborze eksonów [35, 38, 74] i obserwowany jest np. w formowaniu mRNA dla dwóch izoform tropomiozyny. Jedna z tych form występuje w fibroblastach, a druga w komórkach mięśniowych [42]. W przypadku kombinacyjnego wyboru

eksonów tropomiozyny obserwuje się wiele wariantów mRNA różniących się składem i liczbą eksonów [15]. Jeśli n oznacza liczbę eksonów biorących udział w kombinacyjnym składaniu, to liczba różnych mRNA, otrzymanych z jednego genu, wynosi 2^n . Na ogół jednak alternatywne składanie mRNA ma charakter mieszany: różne warianty mRNA β -tropomiozyny powstają w wyniku kombinacyjnego wyboru tylko paru eksonów (ryc. 4C), inne eksony łączą się ze sobą w sposób naprzemienny (ryc. 4E), a dodatkowo obserwuje się wybór miejsc poliadenylacji (ryc. 4B). Alternatywny sposób składania mRNA odgrywa ważną rolę w tworzeniu swoistych pod względem tkankowym izoform mRNA i oczywiście kodowanych przezeń białek. Mechanizm alternatywnego składania nie jest jednak wyjaśniony. Przypuszcza się jedynie, że ważną rolę odgrywają w nim swoiste tkankowo kombinacje snRNA i białek.



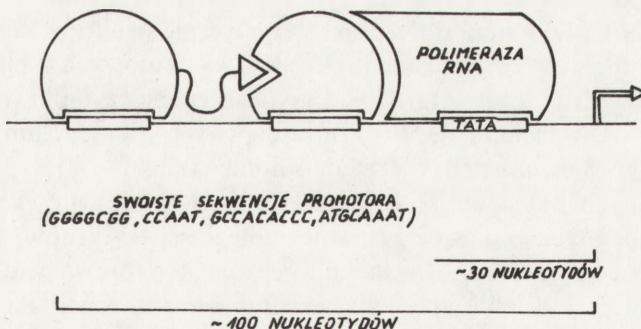
Ryc. 4. Modele alternatywnego składania mRNA. Stałe eksony zaznaczono czarnymi prostokątami, a eksony „zmiennie” za pomocą prostokątów zakreskowanych. TATA — miejsca promotorowe, AATAAA -- sygnały poliadenylacji

Doniesiono o dość specyficznym układzie dwóch zachodzących na siebie genów [2, 32, 69]. Geny te, w przeciwieństwie do genów zachodzących na siebie, zlokalizowanych w tej samej nici [49], znajdują się na dwóch niciach: na tzw. nici sensownej i nici komplementarnej, antysensownej. Oba geny, oczywiście, są transkrybowane w dwu różnych kierunkach. U szczura jeden koduje hormon GnRH (ang. gonadotropin-releasing hormone) i jest aktywny

transkrypcyjnie w komórkach centralnego układu nerwowego. Drugi, zwany umownie SH, jest aktywny w komórkach mięśnia sercowego i koduje białko o nieznannej funkcji. Sekwencje eksonów obu genów wydają się pokrywać ze sobą [2].

*

Wiele danych wskazuje, że transkrypcja genów eukariotycznych jest inicjowana przez polimerazę RNA II (B) w regionie DNA poprzedzającym geny, zwanym promotorem. Miejsce terminacji transkrypcji, w przybliżeniu, wyznacza rejon poliadenylacji zawierający sekwencję AATAAA [52]. W wielu genach, poniżej sekwencji AATAA, znajduje się sekwencja YGTGTTY (Y oznacza nukleotyd pirymidynowy), która – jak się przypuszcza – odgrywa pewną rolę w terminacji transkrypcji [52]. Analizy sekwencyjne i odpowiednio dobrane testy mutacyjne [36, 46] wskazują, że sekwencje promotorowe liczą około 100 nukleotydów i zawierają kilka charakterystycznych sekwencji długości 8–12 nukleotydów rozpoznawanych przez różne białka [23, 44]. W odległości około 30 nukleotydów od pierwszego nukleotydu, od którego rozpoczyna się transkrypcja, znajdują się sekwencje TATA rozpoznawane przez polimerazę RNA. Powyżej sekwencji TATA znajduje się kilka innych sekwencji (GGGCGG, CCAAT, GCCACACCC, ATGAAAT), które w różnych promotorach mogą występować w różnych kombinacjach. Sekwencje te prawdopodobnie mogą wiązać jedno lub więcej białek zwanych czynnikami transkrypcji. Przypuszcza się, że czynniki transkrypcji umożliwiają „usadowienie” polimerazy RNA w obrębie sekwencji promotorowych [64] (ryc. 5).



Ryc. 5. Model wiązania czynników transkrypcyjnych z promotorem. Białka wiążące się z sekwencjami swoistymi tworzą struktury przestrzenne ułatwiające rozpoznanie przez polimerazę RNA sekwencji TATA. Strzałka oznacza kierunek transkrypcji

Niektóre z tych białek (zwanych przez Dynana i Tjiana [23] białkami Sp1) mogą oddziaływać tylko z promotorami niektórych genów, np. genów wirusa SV40, wirusa opryszczki, (*herpes simplex*) lub reduktazy dwuhydrofolanowej myszy, ponieważ promotory te zawierają sekwencje

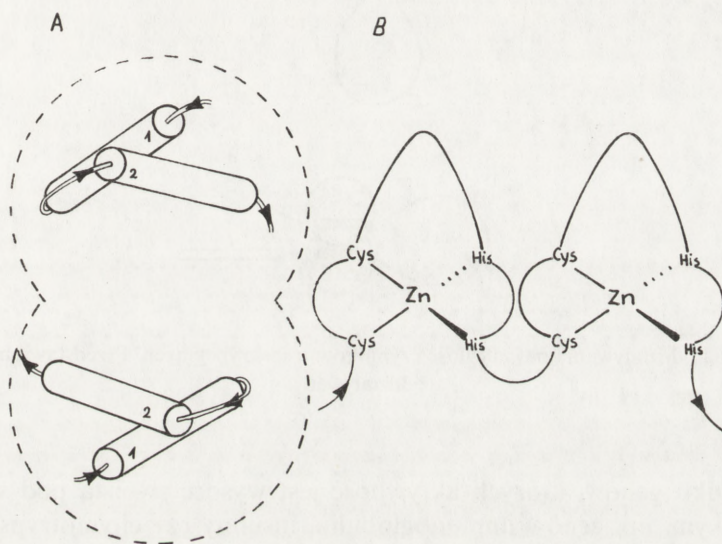


które wiążą swoiście białka Sp1. Rozkład i ilość sekwencji wiążących białka Sp1 w tych promotorach nie wydaje się jednak wskazywać na jakąś swoistą regularność. W promotorach genów szoku cieplnego występuje sekwencja typu C..GAA..TTC..G (kropki oznaczają dowolne nukleotydy), rozpoznawana przez swoiste białka zwane HSTF (ang. heat-shock transcription factor) [23]. Również i te białka wiążąc się z promotorem umożliwiają właściwe usadowienie polimerazy. Jak się zdaje, niezależnie od rodzaju promotorów i typów białek wiążących się z nimi, białka o charakterze czynników transkrypcyjnych tworzą w obrębie sekwencji promotorowych dość skomplikowane struktury przestrzenne, umożliwiające rozpoznanie przez polimerazę RNA sekwencji TATA (ryc. 5). Białka te mają kilka charakterystycznych domen: domenę bogatą w reszty cysteinowe, umożliwiającą rozpoznanie sekwencji DNA (ryc. 6), domenę związaną z aktywnością transkrypcyjną, a w przypadkach genów regulowanych hormonalnie, również domeny wiążące hormony sterydowe. W tym ostatnim wypadku czynniki transkrypcyjne są receptorami hormonów sterydowych [44].

Warto zwrócić uwagę na pewną osobliwość struktury czynników transkrypcyjnych. Uważano dotąd, że białka o charakterze regulacyjnym mają z reguły budowę dimeryczną oraz fragmenty helikalne pooddzielane fragmentami niehelikalnymi. Białka te wiążą się z DNA właśnie za pośrednictwem fragmentów helikalnych (ryc. 6A). Czynniki transkrypcyjne (jak dotąd, najlepiej zbadanym pod względem strukturalnym jest TF IIIA, czynnik transkrypcyjny genów 5S RNA [47]) mają dość charakterystyczną strukturę kilku powtarzających się domen złożonych z aminokwasów cysteinowych i histydynowych, wiążących jony Zn^{2+} (ryc. 6B) [8, 9]. Przypuszczalnie czynniki transkrypcyjne wiążą się z sekwencjami DNA końcami swych domen lub za pomocą aminokwasów mieszczących się między domenami [8, 9].

Wiele danych wskazuje, że oprócz sekwencji promotorowych, w obrębie genów (w ich intronach) bądź w różnej odległości od genów, i to zarówno powyżej końca 5', jak 3' genu, występują sekwencje, które wiążąc się ze swoimi białkami wywierają wielki wpływ na wydajność transkrypcji. Są to sekwencje modulujące (wzmacniające) procesy transkrypcji (ang. enhancer) [37, 39, 70, 72]. Sekwencje te pod względem swoich własności przypominają sekwencje promotorowe (np. w wielu genach mogą je zastępować) i sądzi się, że różnią się od promotorów jedynie tym, że mogą wpływać na transkrypcję niezależnie od

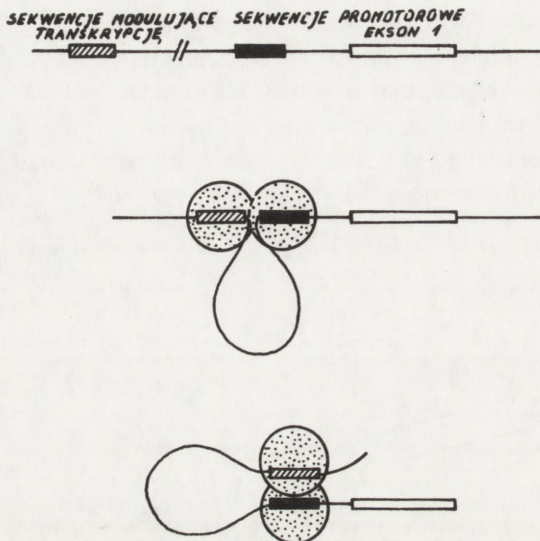
orientacji w stosunku do genu, jak i odległości od niego (odległości od genu mogą być nawet rzędu wielu tysięcy nukleotydów) [44]. Przymuszczenie tzw. oddziaływanie na odległość polega na utworzeniu złożonego kompleksu między białkami z sekwencjami promotorowymi i białkami związanymi z sekwencjami wzmacniającymi [53, 55, 59]. Sekwencje DNA oddzielające sekwencje promotorowe od sekwencji wzmacniających zostają wówczas wypchnięte z kompleksu białkowego w postaci pętli (ryc. 7). W sąsiedztwie niektórych genów występują również sekwencje wiążące białka blokujące transkrypcję. Sekwencje te nazywane są sekwencjami wyciszającymi transkrypcję (ang. silencer) [13a]. Jak się zdaje, znoszą one działanie sekwencji modulujących (wzmacniających).



Ryc. 6. (A) Model dimerycznego białka zawierającego fragmenty helikalne (oznaczone na rysunku za pomocą cylindrów). Białko takie wiąże się z DNA za pomocą swych fragmentów helikalnych. Fragment pierwszy wiąże się wzdłuż helisy DNA, fragment drugi dopasowuje się do dużego rowka DNA. (B) Schemat struktury powtarzających się domen czynnika transkrypcyjnego TFIIIA. Czynniki transkrypcyjne posiadające strukturę zbliżoną do TFIIIA wiążą się z sekwencjami DNA prawdopodobnie końcami swych domen lub za pośrednictwem aminokwasów znajdujących się między domenami (wg [8])

Wiele danych wskazuje, że sekwencje wzmacniające transkrypcję genów, których aktywność jest indukowana różnymi czynnikami, np. szokiem cieplnym, metalami, czynnikami wzrostu czy hormonami sterydowymi, są miejscem wiązania swoistych białek. Przymuszcza się, że niektóre odpowiednio zmodyfikowane w wyniku indukcji białka stają się aktywatorami transkrypcji (regulacja pozytywna) [44]. W przypadku indukcji niektórych genów, np.

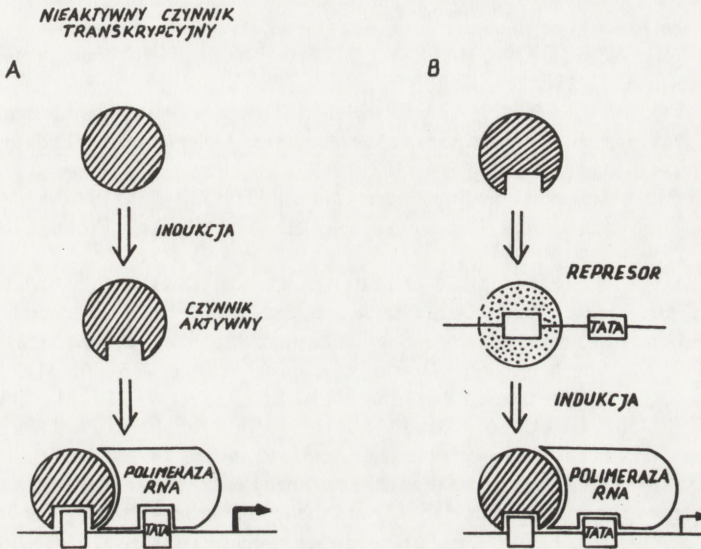
β -interferonu, wydaje się, że aktywatory transkrypcji mogą wypierać swoisty represor blokujący transkrypcję z sekwencji wzmacniających (regulacja negatywna) (ryc. 8).



Ryc. 7. Model oddziaływania na odległość czynników transkrypcyjnych. Przedstawiono dwa typy oddziaływań

W wypadku genów, których aktywność jest wysoce swoista pod względem komórkowym, np. genów immunoglobulin, insuliny czy chymotrypsyny, sekwencje wzmacniające tych genów są miejscem wiązania białek determinujących tkankowo swoistą transkrypcję [44]. Bardzo często przeniesienie genów w sąsiedztwo swoistych pod względem tkankowych sekwencji wzmacniających powoduje ich transkrypcyjną aktywację. Aktywację onkogenu c-myc pod wpływem sekwencji wzmacniających genów immunoglobulinowych obserwuje się w różnego typu chłoniakach [1, 11]. Aktywacja u myszy transgenicznego genu transformacyjnego dużego antygeny T wirusa SV40 pod wpływem sekwencji wzmacniających genu insuliny II szczura prowadzi do transformacji nowotworowej i powstania insulinomatów, nowotworów wywodzących się z komórek wysepek Langerhansa [31]. U myszy transgenicznych zaobserwowano również wysoce swoistą pod względem tkankowym aktywację genu transformującego dużego antygeny T wirusa SV40, przyłączonego do sekwencji regulujących genu krystaliny, prowadzącą do powstania nowotworów soczewek [43].

Wydaje się, że badania mechanizmów regulacji ekspresji genów eukariotycznych wkroczyły w nową fazę. Przedmiotem badań nie są liniowe struktury w postaci sekwencji DNA, ale oddziaływania typu białko–DNA, prowadzące do powstania skomplikowanych struktur przestrzennych [24]. Struktury te, złożone z wielu białek, określają topologię sekwencji promotorowych rozpo-



Ryc. 8. Modele aktywacji indukcyjnych promotorów sekwencji wzmacniających (wg [44]). (A) W wyniku indukcji czynnik transkrypcyjny ulega modyfikacji i przyłącza się do swoistych sekwencji promotora (sekwencji wzmacniających). Prowadzi to do związania polimerazy RNA i transkrypcji genu (strzałka oznacza kierunek transkrypcji). (B) Czynniki transkrypcyjne – w wyniku indukcji – może również wypierać represor blokujący transkrypcję

znawanych przez polimerazę RNA, biorą udział zarówno w formowaniu kompleksu inicjującego transkrypcję, jak i w samej transkrypcji [73]. Przedmiotem badań stają się więc konformacyjne przekształcenia białek i związane z nimi sekwencje DNA. Liniowy gen zaczyna się więc stawać coraz to bardziej strukturą przestrzenną.

LITERATURA

- [1] ADAMS J. M., HARRIS A. W., PINKERT C. A., CORCORON L. M., ALEXANDER W. S., CORY S., PALMITER R. D., BRINSTER R. L., The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancer induces lymphoid malignancy in transgenic mice, *Nature*, **318**: 533–538, 1985.

- [2] ADELMAN J. P., BOND C. T., DOUGLASS J., HERBERT E., Two Mammalian Genes Transcribed from Opposite Strands of the Same DNA Locus, *Science*, **235**: 1514–1517, 1987.
- [3] AEBI M., WEISSMANN C., Precision and orderliness in splicing, *Trends in Genetics*, **3**: 102–107, 1987.
- [4] BAAS F., VAN OMMEN G.-J., BIKKER H., ARNBERG A. C., DE VIJLDER Z. J. J. M., The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb, *Nucl. Acid. Res.*, **14**: 5171–5186, 1986.
- [5] BALTIMORE D., Retroviruses and Retrotransposons: The role of Reverse Transcription in Shaping the Eukaryotic Genome, *Cell*, **40**: 481–482, 1985.
- [6] BARTON P. J. R., BUCKINGHAM M. E., The myosin alkali light chain proteins and their genes, *Biochem. J.*, **231**: 249–261, 1985.
- [7] BENYATI C., SPOEREL N., HAYMERLE H., ASHBURNER M., The Messenger RNA for Alcohol Dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* Differs in Its 5' End in Differential Developmental Stages, *Cell*, **33**: 125–133, 1983.
- [8] BERG J. M., More metal-binding fingers, *Nature*, **319**: 264–265, 1986.
- [9] – Potential Metal-Binding Domains in Nucleic Acid Binding Proteins, *Science*, **232**: 485–487, 1986.
- [10] BERNARDS A., RUBIN C. M., WESTBROOK C. A., PASKIND M., BALTIMORE D., The First Intron in the Human *c-abl* Gene Is at Least 200 Kilobases Long and Is a Target for Translocations in Chronic Myelogenous Leukaemia, *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 3231–3236, 1987.
- [11] BISHOP J. M., The Molecular Genetics of Cancer, *Science*, **235**: 305–311, 1987.
- [12] BOVENBERG R. A. L., VAN DER MEERENDONK W. P. M., BAAS P. D., STEENBERGH P. H., LIPS C. J. M., JANSZ H. S., Model for alternative RNA processing in human calcitonin gene expression, *Nucleic Acids. Research*, **14**: 8785–8803, 1986.
- [13] BOVI P. D., BASILICO C., Isolation of rearranged human transforming gene following transfection of Kaposi Sarcoma DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5660–5664, 1987.
- [13a] BRAND A. H., BREEDEN L., ABRAHAM J., STERNGLANZ R., NASMYTH K., Characterization of a “Silencer” in Yeast: A DNA Sequence with Properties Opposite to Those of a Transcriptional Enhancer, *Cell*, **41**: 41–48.
- [14] BREATHNACH R., CHAMBON P., Organization and Expression of Eucaryotic Split Genes Coding for Proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**: 349–383, 1981.
- [15] BREITBART R. E., ANDREADIS A., NADAL-GINARD B., Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 467–495, 1987.
- [16] BURMEISTER M., LENHRACH H., Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene, *Nature* **324**: 582–585, 1986.
- [17] CECH T. R., The Generality of Self-Splicing RNA: Relationship to Nuclear mRNA Splicing, *Cell*, **44**: 207–210, 1986.
- [18] – The Chemistry of Self-Splicing RNA and RNA Enzymes, *Science*, **236**: 1532–1539, 1987.
- [19] CHEN C., MALONE T., BECKENDORF S. K., DAVIS R. L., At least two genes reside within a large intron of the *dunce* gene of *Drosophila*, *Nature*, **325**: 721–724, 1987.
- [20] DANCHIN A., SLONIMSKI P. P., Split genes, *Endeavour*, **9**: 18–27, 1985.
- [21] DARNELL J. E., Variety in the level of gene control in eukaryotic cells, *Nature*, **297**: 365–371, 1982.
- [22] DARNELL J. E., DOOLITTLE W. F., Speculations on the early course of evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 1271–1275, 1986.
- [23] DYNAN W. S., and TJIAN R., Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence – specific DNA – binding proteins, *Nature*, **316**: 774–778, 1985.
- [24] ECHOLS M., Multiple DNA – Protein Interactions Governing High – Precision DNA Transactions, *Science*, **233**: 1050–1056, 1986.
- [25] EDMONDS M., Branched RNA, *Bioessays*, **6**: 212–216, 1987.

- [26] FALK R., The gene in search of an identify, *Hum. Genet.*, **68**: 195–204, 1984.
- [27] FILIPOWICZ W., Geny podzielone i składanie RNA, *Kosmos*, **34**: 41–66, 1985.
- [28] FRONK J., Geny mozaikowe – struktura, ekspresja, ewolucja, *Post. Biochem.*, **28**: 3–24, 1982.
- [29] GILBERT W., Genes – in – Pieces Revisited, *Science*, **228**: 823–824, 1985.
- [30] GILBERT W., MARCHIONNI M., McKNIGHT G., On the Antiquity of Introns, *Cell*, **46**: 151–154, 1986.
- [31] HANAH D., Heritable formation of pancreatic B-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes, *Nature*, **315**: 115–122, 1985.
- [32] HENIKOFF S., KEENE M. A., FECHTEL K., FRISTROM J. W., Gene within a Gene: Nested *Drosophila* Genes Encode Unrelated Proteins on Opposite DNA Strands, *Cell*, **44**: 32–42, 1986.
- [33] HICKEY D. A., BENKEL B., Introns as Relict Retrotransposons: Implications for the Evolutionary Origin of Eucaryotic mRNA Splicing Mechanism, *J. Theor. Biol.*, **121**: 283–291, 1986.
- [34] HUBNER H., DZWONKOWSKA A., OSIECKA R., Postępy w poznaniu struktury materiału genetycznego u Eukaryota. II Struktura genów, *Post. Biologii Komórki*, **9**: 149–176, 1982.
- [35] INDIK Z., YEH H., ORNSTEIN-GOLDSTEIN N., SHEPPARD P., ANDERSON N., ROSENBLOOM J. C., PELTONEN L., ROSENBLOOM J., Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5680–5684, 1987.
- [36] KELLY J. H., DARLINGTON G. J., Hybrid Genes: Molecular Approaches to Tissue – Specific Gene Regulation, *Ann. Rev. Genet.*, **19**: 273–296, 1985.
- [37] KHOURY G., GRUSS P., Enhancer Elements, *Cell*, **33**: 313–314, 1983.
- [38] KING C. R., PIATIGORSKY J., Alternative RNA Splicing of the Murine α A – Crystallin Gene: Protein – Coding Information within an Intron, *Cell*, **32**: 707–712, 1983.
- [39] LANG J. C., SPANDIDOS D. A., The Structure and Function of Eucaryotic Enhancer Elements and Their Role in Oncogenesis, *Anticancer Research*, **6**: 437–450, 1986.
- [40] LERMAN M. A., SCHNEIDER W. J., SUDHOF T. C., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., RUSSELL D. W., Mutation in LDL Receptor: Alu-Alu Recombination Deletes Exons Encoding Transmembrane and Cytoplasmic Domains, *Science*, **227**: 140–146, 1985.
- [41] LEWIN B., *Gene Expression*, Vol. 2, Willey and Sons, New York, Chichester Birsbane, Toronto 1980, 479–487.
- [42] MACLEOD A. R., Genetic Origin of Diversity of Human Cytoskeletal Tropomyosin, *Bioessays*, **6**: 208–212, 1987.
- [43] MAHON K. A., CHEPELINSKY A. B., KHILLON J. S., OVERBEEK P., PIATIGORSKY J., WESTPHAL H., Oncogenesis of the Lens in Transgenic Mice, *Science*, **235**: 1622–1628, 1987.
- [44] MANIATIS T., GOODBOURN, FISCHER J. A., Regulation of Inducible and Tissue-Specific Gene Expression, *Science*, **236**: 1237–1245, 1987.
- [45] MARTIN-ZANCA D., HUGHES S. H., BARBACID M., A human oncogene formed by the fusion truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences, *Nature*, **319**: 743–748, 1986.
- [46] McKNIGHT S. L., KINGSBURY R., Transcriptional Control Signals of a Eucaryotic Protein – Coding Gene, *Science*, **217**: 316–324, 1982.
- [47] MILLER J., McLACHLAN A. D., KLUG A., Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus* oocytes, *EMBO J.*, **4**: 1609–1614, 1985.
- [48] NAORA H., MIYAHARA K., CURNOW R. N., Origin of noncoding DNA sequences: Molecular fossils of genome evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6195–6199, 1987.
- [49] NORMARK S., BERGSTROM S., EDLUND T., GRUNDSTROM T., JAURIN B.,

- LINDBERG F. P., OLSSON O., Overlapping Genes, *Ann. Rev. Genet.*, **17**: 499–525, 1983.
- [50] OHNO S., Early genes that were oligomeric repeats generated a number of diverged domains on their own, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6486–6490, 1987.
- [51] PARK M., DEAN M., COOPER C. S., SCHMIDT M., O'BRIEN S. J., BLAIR D. G., VANDE WOUDE G. F., Mechanism of met Oncogene Activation, *Cell*, **45**: 895–904, 1986.
- [52] PLATT T., Transcription Termination and the Regulation of Gene Expression, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**: 339–372, 1986.
- [53] PTASHNE M., Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance, *Nature*, **322**: 697–701, 1986.
- [54] RIEGER R., MICHAELIS A., GREEN M. M., Słownik terminów genetycznych, PWRiL, Warszawa 1974, 184–186.
- [55] ROBERTSON M., Specificity and flexibility, *Nature*, **327**: 464–466, 1987.
- [56] ROGERS B. L., SAUNDERS G. E., Transcriptional Enhancers Play a Major Role in Gene Expression, *Bioessays*, **4**: 62–65, 1986.
- [57] ROGERS J. H., The Origin and Evolution of Retroposons, *Int. Res. Cytology*, **93**: 187–273, 1985.
- [58] SCHIBLER U., HAGENBUCKLE O., WELLAUER P. K., PITTET A. C., Two Promoters of Different Strengths Control the Transcription of the Mouse Alpha – Amylase Gene Amy – 1^a in the Parotid Gland and the Liver, *Cell*, **33**: 501–508, 1983.
- [59] SCHLEIF R., Why should DNA loop, *Nature*, **327**: 365–370, 1987.
- [60] SENAPATHY P., Origin of eukaryotic introns: A hypothesis, based on codon distribution statistics in genes, and its implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 2133–2137, 1986.
- [61] SHARP P. A., Splicing of Messenger RNA Precursors, *Science*, **235**: 766–771, 1987.
- [62] SHARP P. A., Trans Splicing: Variation on a Familiar Theme?, *Cell*, **55**: 147–148, 1987.
- [63] SPENCER C. A., GIETZ R. D., HODGETTS R. B., Overlapping transcription units in the dopa decarboxylase region of *Drosophila*, *Nature*, **322**: 279–281, 1986.
- [64] STRUHL K., Promoters, Activator Proteins and the Mechanism of Transcriptional Initiation in Yeast, *Cell*, **49**: 295–297, 1987.
- [65] SUDHOF T. C., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., RUSSEL D. W., The LDL Receptor Gene: A Mosaic of Exons Shared with Different Proteins, *Science*, **228**: 815–822, 1985.
- [66] SYVANEN M., The evolutionary implications of mobile genetic elements, *Ann. Rev. Genet.*, **18**: 271–293, 1984.
- [67] URBANEK A., Rewolucja naukowa w biologii, Wiedza Powszechna, Warszawa 1973, 146–150.
- [68] VANIN E. F., Processed pseudogenes: characteristics and evolution, *Ann. Rev. Genet.*, **19**: 253–272, 1985.
- [69] WILLIAMS T., FRIED M., A mouse locus at which transcription from both DNA strands produces mRNAs complementary at their 3' ends, *Nature*, **322**: 275–279, 1986.
- [70] VOSS S. D., SCHLOKAT U., GRUSS P., The role of enhancers in the regulation of cell-type-specific transcriptional control, *Trends in Biochem. Science*, **11**: 287–289, 1986.
- [71] YANCOPOULOS G. D., ALT I. W., Regulation of the Assembly and Expression of Variable-Region Genes, *Ann. Rev. Immunol.*, **4**: 339–369, 1986.
- [72] YANIV M., Regulation of Eukaryotic Gene Expression by Transactivating Proteins and Cis Acting DNA Elements, *Biol. Cell.*, **50**: 203–216, 194.
- [73] YANIV M., CEREGHINI S., Structure of Transcriptional Active Chromatin, *Crit. Rev. Biochem.*, **21**: 1–26, 1986.

- [74] ZARDI L., CARNEMOLLA B., SIRI A., PETERSON T. E., PAOLELLA G., SEBASTIO G., BARALLE F. E., Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon, *EMBO J.*, **6**: 2337-2342, 1987.

Adres autora: Wybrzeże Armii Czerwonej 15, 44-100 Gliwice.

Otrzymano: 11 stycznia 1988.

Przyjęto: 14 marca 1988.

- * SPRZĘT MEDYCZNY I LABORATORYJNY
- * MATERIAŁY DIAGNOSTYCZNE I ODCZYNNIKI LABORATORYJNE
- * PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE I POLIKLONALNE
- * KSIĄŻKI

Uprzejmie informujemy, że ALAB Spółka z o.o. (02-055 Warszawa, ul. Filtrowa 67D m. 105/106, tel. 25-56-87), zajmująca się promocją oraz wytwarzaniem sprzętu medycznego, laboratoryjnego oraz materiałów do diagnostyki, oferuje możliwość zakupienia **za złotówki** powyższych materiałów z **II obszaru płatniczego**.

Służymy również radą w rozwiązywaniu Państwa problemów związanych z zakupem materiałów diagnostycznych, a w szczególności przeciwciał monoklonalnych (na życzenie klienta istnieje możliwość przeszkolenia w zakresie używania tych przeciwciał).

ZAPEWNIAMY KRÓTKIE TERMINY DOSTAW!!!

WODÓR – METABOLIZM I PERSPEKTYWY FOTOBIOLOGICZNEGO WYTWARZANIA*

HYDROGEN – METABOLISM AND PERSPECTIVES OF PHOTOBIOLOGICAL PRODUCTION

Wacław HENDRICH

Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego

Streszczenie: Omówiono właściwości i mechanizm działania trzech enzymów, uczestniczących we współzależnych procesach wiązania azotu i metabolizmu wodoru: nitrogenazy, hydrogenazy pochłaniającej i hydrogenazy odwracalnej. Przedyskutowano możliwości wykorzystania immobilizowanych chloroplastów i hydrogenazy lub nieorganicznego katalizatora, platyny, do fotobiologicznego wytwarzania wodoru.

Summary: The properties as well as action mechanism of three enzymes: nitrogenase, uptake hydrogenase and reversible hydrogenase have been presented. These enzymes participate in correlated processes of nitrogen fixation and hydrogen metabolism. The perspectives of utilization of immobilized chloroplasts and hydrogenase or inorganic catalyst, platinum, for photobiological production of hydrogen have been discussed.

Wykaz stosowanych skrótów

ADP – adenozyndifosforan

ATP – adenozyntrifosforan

FAD, FADH₂ – dinukleotyd flawinowoadeninowy (forma utleniona i zredukowana)

NAD⁺, NADH – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (forma utleniona i zredukowana)

NADP⁺, NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma utleniona i zredukowana)

Q_B – plastochinon, wtórny akceptor fotosystemu II.

* Praca wykonana w ramach realizacji Problemu CPB-P 02.11.

WSTĘP

Metabolizm wodoru i wiązanie azotu przez bakterie i glony są procesami współzależnymi. Już w latach 30 stwierdzono, że wodór hamuje selektywnie wiązanie azotu w brodawkach koniczyny [76, 77]. Aktywność hydrogenazową wykryto w zdolnych do wiązania azotu bakteroidach z brodawek *Pisum sativum* [59] oraz w *Azotobacter vinelandii*; w tym ostatnim przypadku aktywność hydrogenazowa rośnie szczególnie wyraźnie, gdy wzrost bakterii jest uzależniony od N_2 [46]. Bezpośrednim dowodem na współzależność wiązania azotu i metabolizmu wodoru było stwierdzenie, że bezkomórkowe preparaty nitrogenazy z *Azotobacter* katalizują reakcję wiązania N_2 z równoczesnym wydzielaniem wodoru kosztem ATP i odpowiedniego reduktora [18, 19].

Proces wiązania azotu uznaje się za drugi, po fotosyntezie, najważniejszy proces biologiczny. O znaczeniu tego procesu w biologii i w gospodarce człowieka mogą świadczyć następujące liczby: ocenia się, że bakterie i glony wiążą rocznie $170-270 \cdot 10^6$ t azotu [70]. Równocześnie roczną produkcję nawozów azotowych oceniało się w 1974 r. na $30 \cdot 10^6$ t, przy czym wyprodukowanie 1 kg nawozu azotowego wymagało energii 1,5 kg oleju opałowego [20]. Warto również zaznaczyć, że biologicznemu wiązaniu azotu towarzyszyło (szacunkowo w 1980 r.) wydzielenie $2,1-4,4 \cdot 10^6$ t wodoru [24].

Z tego krótkiego przeglądu danych wynika, że przy omawianiu mechanizmów biologicznego wytwarzania wodoru nieodzowne jest rozpatrzenie niektórych aspektów mechanizmu wiązania azotu. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie zależności między tymi procesami oraz perspektyw wykorzystania fragmentów struktur naturalnych do fotochemicznej produkcji wodoru w układach sztucznych. Intencją autora było również uzupełnienie danych, zawartych w pracy [39].

ENZYMY KATALIZUJĄCE WIĄZANIE AZOTU I METABOLIZM WODORU

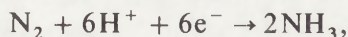
Procesy wiązania azotu i metabolizmu wodoru są katalizowane głównie trzema enzymami: nitrogenazą, hydrogenazą pochłaniającą (uptake hydrogenase) i hydrogenazą odwracalną. Na uwagę zasługuje fakt, że według autorów pracy [48] rozróżnienie hydrogenaz pochłaniającej i odwracalnej ma sens tylko w warunkach *in vivo*. Po wyizolowaniu, w warunkach *in vitro* wszystkie hydrogenazy są odwracalne; w obecności odpowiednich mediatorów mogą pochłaniać lub wydzielać H_2 .

Nitrogenazy nie stwierdzono w żadnych eukariotach, natomiast występuje w niektórych gatunkach różnych rodzajów prokariotów, m. in. w bakteriach (zarówno tlenowcach, fakultatywnych i bezwzględnych beztlenowcach), bakte-

riach fotosyntetyzujących, bakteriach żyjących w symbiozie z roślinami i zwierzętami oraz w sinicach [14]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że nitrogenazy izolowane z różnych źródeł mają podobne właściwości fizykochemiczne i katalityczne [78].

Nitrogenazy są zbudowane z dwóch części: składnika I (dinitrogenaza, molibdenoferredoksyna) oraz składnika II (reduktaza dinitrogenazy). Składnik I jest białkiem o masie cząsteczkowej 180–270 kDa, zbudowanym z czterech podjednostek ($\alpha_2\beta_2$). Zawiera 18–36 atomów Fe, 1–2 gatony Mo oraz labilną siarkę (nieco mniej niż Fe). Metodą spektroskopii absorpcyjnej promieni X stwierdzono występowanie ligandów typu Mo–S i Mo–Fe. Ugrupowanie dwóch atomów Mo i 12–16 atomów Fe tworzy prawdopodobnie centrum aktywne enzymu. Pozostałe atomy Fe i S tworzą ugrupowania typu 4Fe–4S, nie związane resztami cysteinowymi z nośnikiem białkowym [25]. Reduktaza dinitrogenazy jest białkiem o masie cząsteczkowej 55–65 kDa, zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek. W centrum aktywnym zawiera 4 atomy Fe w formie jednego ugrupowania typu 4Fe–4S. Obydwa białka są kwaśne. W ich składzie aminokwasowym występuje dużo kwasu glutaminowego i asparaginowego.

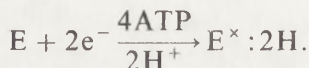
Mechanizm działania dwóch składników nitrogenazy jest następujący: składnik II przyjmuje elektrony od odpowiedniego donora (stwierdzono, że w heterocystach *Anabaena variabilis* głównym źródłem elektronów dla nitrogenazy jest oksydacyjny cykl pentozo-fosforanowy: uwalniane w cyklu elektrony są przenoszone do składnika II nitrogenazy za pośrednictwem NADPIH, oksydoreduktazy NADPH: ferredoksyna i ferredoksyny, która jest bezpośrednim donorem [15]; w warunkach нефизjologicznych donorem elektronów dla nitrogenazy może być hydrosiarczyn), następnie wiąże MgATP, co powoduje zmianę konformacyjną białka i obniżenie potencjału redoks od –280 do ok. –400 mV. W tym stanie składnik II tworzy kompleks ze składnikiem I. Przeniesieniu elektronu od składnika II do I towarzyszy hydroliza 2 MgATP do 2 MgADP. Zredukowany składnik I jest zdolny do redukcji wielu substratów [14]. Biologicznie najważniejszym substratem jest azot cząsteczkowy. Produktem redukcji jest NH_3 . Reakcja jest energetycznie bardzo kosztowna, gdyż przeniesieniu 6 elektronów,



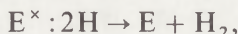
towarzyszy hydroliza 12 cząsteczek ATP.

Innymi substratami dla nitrogenazy są: N_3^- , N_2O , HCN, C_2H_2 (redukcję acetyleny w obecności ATP i hydrosiarczynu wykorzystano jako standardową metodę oznaczania aktywności nitrogenazy) oraz H^+ . Redukcja H^+ do H_2 towarzyszy zawsze wiązaniu azotu przez nitrogenazę: w optymalnych warunkach stężenia ATP i przy wysokich ciśnieniach parcyjnych N_2 ok. 25% strumienia elektronów, przepływającego przez nitrogenazę, zużywa się na

redukcją H^+ [37]. W atmosferze pozbawionej N_2 i środowisku nie zawierającym akceptorów elektronów jedyną reakcją katalizowaną przez nitrogenazę jest redukcja H^+ . Procesowi temu, odkrytemu przez Gesta i Kamena [34], przypisuje się następujący mechanizm:



W środowisku nie zawierającym azotu aktywny kompleks enzymu $E^* : 2H$ rozpada się, wydzielając wodór,



natomiast w obecności azotu przebiega reakcja



dzięki której wiązaniu azotu towarzyszy wydzielanie wodoru.

Nitrogenaza jest enzymem bardzo wrażliwym na działanie tlenu. Szczególnie wrażliwy jest składnik II, który nawet w obecności niskich ciśnień parcjalnych tlenu ulega szybkiej i nieodwracalnej dezaktywacji.

Drugą grupą enzymów, odgrywających istotną rolę w metabolizmie wodoru, są hydrogenazy. Jak wspomniano już, podział hydrogenaz na pochłaniające i odwracalne ma sens tylko w warunkach *in vivo*. Z przytoczonych niżej danych wynika, że kryterium podziału nie mogą być: lokalizacja, masa cząsteczkowa oraz skład centrum aktywnego. Jedynym umownym kryterium podziału może być szybkość wydzielania wodoru w obecności odpowiedniego donora (zredukowanego metylowiologenu).

Hydrogenazy pochłaniające, katalizujące w warunkach *in vivo* reakcje utleniania H_2 , występują głównie w bakteriach azotowych (np. w różnych szczepach *Azotobacter* [74] i *Rhizobium* [4], bakteriach purpurowych (np. w *Rhodospseudomonas* [23], niektórych bakteriach chemotroficznych, utleniających H_2 [67, 68] oraz w sinicach [40]. Natomiast hydrogenazy odwracalne są bardziej specyficzne dla organizmów anaerobowych. Występują często razem z hydrogenazami pochłaniającymi w bakteriach fotosyntezujących i fermentacyjnych oraz w wielu sinicach, zarówno tworzących heterocysty (niektóre szczepy *Anabaena*, *Nostoc* i *Mastigocladus* [45, 73]), jak i tworzących tylko komórki wegetatywne (niektóre szczepy *Spirulina* [51] i *Oscillatoria* [8, 43].

Hydrogenazy pochłaniające są integralnymi białkami błonowymi. W sinicach są zlokalizowane zawsze w heterocystach (spośród organizmów nie tworzących heterocyst aktywność hydrogenazy pochłaniającej stwierdzono tylko w *Anacystis nidulans* [56, 57]). Z heterocystowej frakcji sinic można ją uwolnić działaniem detergentów lub ultradźwiękami.

W odróżnieniu od hydrogenaz pochłaniających, odwracalne hydrogenazy mogą być zlokalizowane w różnych przestrzeniach komórki, zarówno

w cytoplazmie, w przestrzeni peryplazmatycznej, jak i, jako białko integralne, w błonie wewnątrzkomórkowej. W jednym organizmie może występować kilka hydrogenaz. Tak np. w *Desulfovibrio baculatus* wykryto 3 hydrogenazy: jedna jest integralnym białkiem błonowym, dwie pozostałe są rozpuszczalne i występują w przestrzeni peryplazmatycznej i w cytoplazmie [72]. Dwie hydrogenazy (jedną bardziej hydrofobową i prawdopodobnie wbudowaną w błonę, i drugą, rozpuszczalną, zlokalizowaną w cytozolu) wykryto w *Methanobacterium formicicum* [7].

Izolowane i oczyszczone enzymy mają masy cząsteczkowe zawarte w szerokim przedziale 900–50 kDa (tab. 1). Niskocząsteczkowe hydrogenazy o $M < 60$ kDa mają strukturę monomeryczną, niezależnie od tego, czy in vivo miały właściwości hydrogenazy pochłaniającej, czy odwracalnej. Na przykład hydrogenaza pochłaniająca izolowana z heterocyst *Anabaena* ma masę cząsteczkową 56 kDa [40], z bakteroidów *Rhizobium japonicum* – 63 kDa [4], a hydrogenaza odwracalna z *Spirulina maxima* – 56 kDa [51]. Wszystkie te hydrogenazy są monomerami, natomiast hydrogenazy o większych masach cząsteczkowych mają strukturę podjednostkową, przy czym podjednostki mają masy cząsteczkowe w granicach 20–70 kDa (tab. 1).

W centrum aktywnym hydrogenaz zawsze występują ugrupowania typu $2\text{Fe}-2\text{S}$, $3\text{Fe}-x\text{S}$ lub $4\text{Fe}-4\text{S}$, zawierające niehemowe żelazo i labilną siarkę. Liczba atomów Fe waha się w granicach 4–12. Prócz tego w centrum aktywnym hydrogenaz występuje często Ni, a czasem Se w stosunku molowym Ni:Se = 1:1 oraz pochodne flawiny. Skład centrum aktywnego hydrogenaz, wyizolowanych z różnych bakterii, podano w tab. 1.

Wyniki badań widm EPR, jako funkcji potencjału redoks medium, prowadzą do wniosku, że zarówno ugrupowania typu Fe–S, jak i Ni uczestniczą bezpośrednio w aktywowaniu cząsteczki H_2 , przy czym Ni prawdopodobnie zmienia swoją wartościowość [2, 12, 47, 71].

W odróżnieniu od hydrogenaz zawierających w centrum aktywnym tylko ugrupowanie typu Fe–S, hydrogenazy zawierające Ni są po wyizolowaniu nieaktywne.

Odwracalną inaktywację przypisuje się działaniu tlenu, który powoduje przejście centrum w stan utlenowany lub zmienia konformację części białkowej. Proces aktywowania jest dwufazowy: w pierwszym, wolnym stadium, zachodzącym pod wpływem H_2 (w ciągu kilku godzin), CO, układu oksydaza glukozy + glukoza, lub tetrahemowego cytochromu c_3 centrum uwalnia się od O_2 lub przyjmuje prawidłową konformację. Ta „gotowa” forma enzymu przechodzi pod działaniem czynników redukujących (H_2 , hydrosiarczyn) w drugim, szybkim stadium w formę aktywną [12].

Opisane tu trzy formy hydrogenazy (nieaktywna, gotowa i aktywna) różnią się sygnałami EPR [12].

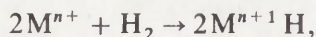
Rozpatrywano dwa różne mechanizmy działania hydrogenazy: homo-

TABELA 1
Lokalizacja, masa cząsteczkowa, struktura podjednostkowa i skład centrum aktywnego hydrogenaz izolowanych z różnych źródeł
(opracowano na podstawie [31, 71, 72])

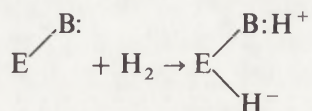
Źródło hydrogenazy	Lokalizacja	Masa cząsteczkowa [kDa]*	Struktura podjednostkowa		Skład centrum aktywnego			
			liczba podjedn.	masa podjedn. [kDa]	Fe-S	Ni	Se	inne
<i>Methanobacterium G 2R</i>	cytoplazma (?)	900		38,5; 50; 80	2x(4Fe-4S)	0,5	0	flawina
	cytoplazma	800		50-70; 120-140 ~200				
<i>Methanosarcina barkeri</i> DSM 800		185		40; 64	nx(Fe-S)	+	0	FAD
					(3Fe-xS) (4Fe-4S)	+	0	
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (H)					2x(2Fe-2S)	1-2		2 FMN
					2x(4Fe-4S)			
<i>Chromatium vinosum</i>			2	54; 27	2x(4Fe-4S)	1	1	
			2	49; 26	2x(4Fe-4S)	1	1	
			2	62; 27	2x(4Fe-4S)	1	1	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>								
<i>Desulfotribrio baculatus</i> DSM 1743	cytoplazma	81						
	peryplazma	75						
	błona wewnątrzkomórkowa	89						
<i>Desulfotribrio gigas</i> NCIB 9332	peryplazma	89	2		(3Fe-3S) 2x(4Fe-4S)	1	0	
<i>Desulfotribrio vulgaris</i> Hildenborough	peryplazma	49	1		3(4Fe-4S)	0	0	
	cytoplazma	82	2		(3Fe-3S) 2x(4Fe-4S) (?)	1	0	

* masy cząsteczkowe oznaczone elektroforetycznie w żelu z SDS

lityczny i heterolityczny. W pierwszym z nich aktywowanie H_2 następuje na dwóch równocennych centrach według schematu:



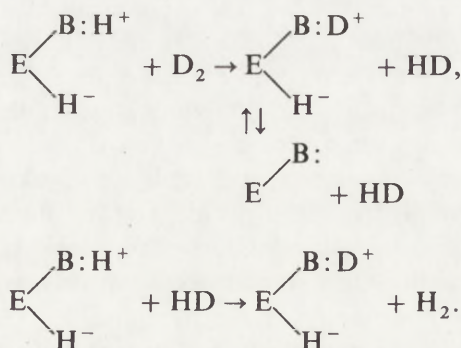
natomiast w drugim pod wpływem enzymu H_2 rozpada się na proton i jon wodorkowy, przyłączając się do dwóch nierównocennych centrów, z których jedno jest miejscem akceptorowym H^+ , a drugie – jonu H^- :



(E oznacza enzym, B – miejsce akceptorowe protonu).

Termodynamicznie korzystniejszy jest rozpad heterolityczny ($\Delta G^\circ = 155 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) od homolitycznego ($\Delta G^\circ = 418 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) [72], toteż przyjmuje się, że aktywowanie H_2 przez hydrogenazy zachodzi według mechanizmu heterolitycznego. Według tego mechanizmu teoretycznie tylko jeden z wiązanych wodorów może swobodnie wymieniać się z protonami medium. W rzeczywistości wymianie ulegają obydwa jony, a szybkość wymiany zależy od pK_a miejsca wiązania protonu oraz od ligandów miejsca wiązania jonu H^- .

Pomiary szybkości wymiany związanych jonów wodoru wykorzystano do charakteryzowania hydrogenaz. Badania kinetyki reakcji wymiany izotopów, odkrytej w 1978 r. [44], a szczególnie jej początkowych stadiów, można było prowadzić dopiero po rozwinięciu odpowiedniej techniki spektroskopii masowej [10]. Gdy w fazie gazowej znajduje się izotop D_2 , jego pochłanianiu przez roztwór hydrogenazy towarzyszy wydzielanie HD i H_2 według następujących reakcji



Stosunek szybkości reakcji wydzielania $H_2:HD$ (często wyrażany również w postaci $H_2:(H_2 + HD)$) oraz zależność tego stosunku szybkości od pH jest charakterystyczny dla hydrogenaz izolowanych z różnych organizmów.

Drugą charakterystyczną właściwością różnych hydrogenaz jest szybkość wydzielania i pochłaniania wodoru (wyrażona w $\mu\text{molach } H_2 \cdot \text{mg biał}$

$\text{ka}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) oraz zależność tych aktywności od pH. Analiza wyników takich pomiarów przedstawionych w tab. 2 prowadzi do następujących wniosków:

1. Dla niektórych enzymów (np. hydrogenazy pochłaniającej, izolowanej z bakteroidów brodawek soi [6], z *Azotobacter vinelandii*, hydrogenazy peryplazmatycznej z *Desulfovibrio vulgaris* oraz hydrogenazy cytoplazmatycznej z *Desulfovibrio baculatus* [32]) szybkość wydzielania H_2 (z udziałem donora – zredukowanego metylowiologenu) i szybkość wymiany $\text{H}^+ - \text{D}$ osiągają maksymalną wartość w tym samym pH. Należy przypuszczać, że najwolniejszym stadium reakcji katalizowanej przez te enzymy jest tworzenie wiązania $\text{H}-\text{H}$ lub uwalnianie produktu. Natomiast dla hydrogenazy peryplazmatycznej z *Desulfovibrio gigas* stwierdzono wspólne optimum pH dla wymiany $\text{H}^+ - \text{D}$ i pochłaniania H_2 , najwolniejszym stadium procesu jest więc prawdopodobnie aktywowanie H_2 .

2. Stosunek szybkości wydzielania H_2 do HD w reakcji wymiany $\text{D}_2 - \text{H}^+$ w optymalnych warunkach pH przyjmuje dla niektórych hydrogenaz wartości większe od 1, dla pozostałych zaś mniejsze od 1. Do pierwszej grupy należą m.in. hydrogenazy izolowane z *Desulfovibrio salexigenes* i *D. baculatus*, a do drugiej – hydrogenazy z *D. gigas* i *D. multispirans* [71]. Na uwagę zasługuje fakt, że hydrogenazy pierwszej grupy zawierają w centrum aktywnym Ni i Se w stosunku molowym 1 : 1, podczas gdy enzymy drugiej grupy nie zawierają Se (tab. 1). Według autorów pracy [71] różnice stosunku szybkości wydzielania $\text{H}_2 : \text{HD}$ można przypisać mechanizmowi heterolitycznemu (stosunek szybkości większy od 1) i homolitycznemu (stosunek szybkości mniejszy od 1), lub, co bardziej prawdopodobne, specyficznemu wpływowi ligandów (Ni–Fe lub Ni–Se) na zróżnicowanie właściwości dwóch centrów aktywnych enzymu.

W warunkach *in vivo* donorem elektronów dla hydrogenaz pochłaniających jest H_2 , a akceptorami – związki o potencjałach redoks większych od 0 V (plastochinon, cytochrom b_{559} , deazaflawina – koenzym F_{420}). Natomiast hydrogenazy odwracalne są zdolne do przenoszenia elektronów między związkami o niższych potencjałach redoks (zredukowana ferredoksyna, NADH, FADH_2 , cytochrom c_{549}) a wodorem [40].

Wyizolowane, oczyszczone enzymy różnią się szybkościami wydzielania i pochłaniania wodoru. Hydrogenaza pochłaniająca z *Rhizobium japonicum* jest zdolna do redukcji błękitu metylenowego, żelazicyjanku, 2,6-dwuchlorofenolindofenolu, cytochromu c i benzochinonu, ale tylko z bardzo małą szybkością metylowiologenu, ferredoksyny, NAD^+ , NADP^+ i FAD [40]. Również reakcja odwrotnego przeniesienia elektronu, od zredukowanego metylowiologenu do H^+ , przebiega z bardzo małą szybkością, dlatego reakcję tę stosuje się do rozróżnienia hydrogenaz pochłaniających i odwracalnych. Dla tych ostatnich wydajnym donorem elektronów, prócz metylowiologenu, jest również benzylowiologen [40]. O pewnej specyficzności działania hydrogenaz odwracalnych mogą świadczyć następujące fakty: hydrogenazy typu FeNiSe są aktywniejsze w wydzielaniu wodoru, natomiast hydrogenazy typu Fe i FeNi są

znacznie aktywniejsze w procesie pochłaniania wodoru (tab. 2). Zaobserwowano również pewną specyficzność substratową: przykładem mogą być dwie hydrogenazy z *Methanobacterium formicicum*, z których jedna, prawdopodobnie błonowa, jest zdolna do redukcji koenzymu F_{420} i metylowiologenu, a druga, rozpuszczalna, redukuje tylko metylowiologen [7].

Hydrogenazy różnią się wrażliwością na działanie inhibitorów i podwyższonej temperatury. W warunkach *in vivo* hydrogenazy pochłaniające są hamowane częściowo przez NO_3^- , a silnie przez NH_4^+ . Tlen pod niskimi ciśnieniami parcjalnymi powoduje odwracalną inhibicję enzymu [5, 45]; wyższe stężenia tlenu powodują nieodwracalną dezaktywację. Tak np. w *Anacystis nidulans* zależne od światła pochłanianie wodoru jest hamowane odwracalnie przez 1% O_2 , a 30 min inkubacja w atmosferze powietrza dezaktywuje hydrogenazę w *A. nidulans* nieodwracalnie [56].

Charakterystyczne różnice wykazują hydrogenazy izolowane z różnych szczepów *Desulfovibrio*: wszystkie trzy typy hydrogenaz zawierające w centrum aktywnym prócz siarki albo tylko Fe, albo Fe i Ni, lub wreszcie Fe, Ni i Se są bardzo wrażliwe na działanie NO^- ; hydrogenazy typu Fe i FeNiSe są również bardzo wrażliwe na działanie CO i NO_2^- , natomiast hydrogenazy typu FeNi są słabo hamowane przez CO i niewrażliwe na działanie NO_2^- [11].

Hydrogenazy odwracalne są odporniejsze na działanie powietrza od hydrogenaz pochłaniających. Szczególnie dużą odpornością cechują się enzymy, izolowane z *Oscillatoria* i *Anabaena*; można je przechowywać w atmosferze powietrza, w stanie zamrożonym przez kilka miesięcy bez znacznej straty aktywności [40]. Hydrogenaza z *Methanosarcina barkeri* zachowuje aktywność po 8 dniach przechowywania w atmosferze powietrza, w temperaturze $4^\circ C$. Podobną odporność wykazują hydrogenazy izolowane z niektórych szczepów *Desulfovibrio* [31], natomiast enzymy izolowane z *Mastigocladus* i *Spirulina* tracą w tych warunkach ok. 75% aktywności.

Zaobserwowano również znaczne różnice odporności hydrogenaz na działanie podwyższonej temperatury. Hydrogenazy pochłaniające są termolabilne (po 12 min inkubacji w temperaturze $70^\circ C$ tracą 50% aktywności). Wśród hydrogenaz odwracalnych szczególną termostabilnością odznacza się hydrogenaza z *Desulfovibrio gigas*; po 2 godz., inkubacji w $65^\circ C$ zachowuje 97% aktywności, a w temperaturze $80^\circ C$ – 47% aktywności [31].

FUNKCJA HYDROGENAZ *IN VIVO*

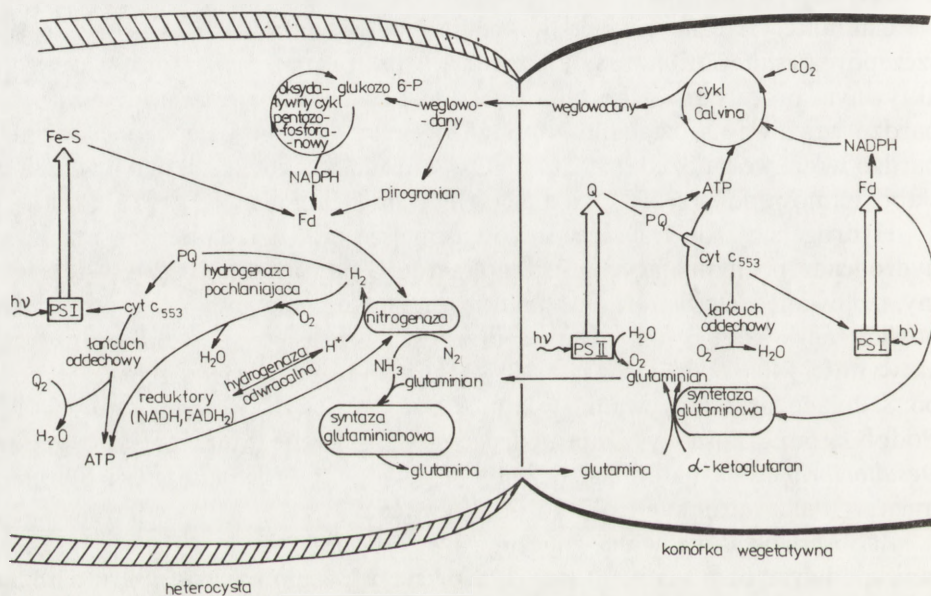
O biologicznej roli metabolizmu H_2 i funkcji hydrogenaz można wnioskować na podstawie właściwości enzymów uczestniczących w metabolizmie wodoru oraz na podstawie szlaków metabolicznych, w których hydrogenazy mogą być donorami lub akceptorami elektronów.

Szlaki metabolizmu wodoru są dobrze zbadane w heterocystach (ryc.).

W porównaniu z normalnymi, wegetatywnymi komórkami glonów, heterocysty wykazują następujące szczególne cechy:

mają grubsze ściany, tworzące częściową barierę dyfuzyjną dla tlenu; o przenikaniu tlenu do wnętrza heterocyst może świadczyć bardzo wydajny układ oddechowy [41], zakończony oksydazą cytochromową a/a_3 , przekazującą elektrony na tlen [53];

nie zawierają zespołu fotosystemu II [1] lub zespół ten jest mało aktywny; mają czynny zespół fotosystemu I, zawierający po stronie donorowej pułkę plastochinonu, plastocyjaninę, kompleks cytochromu b_6/f oraz cytochrom c_{553} [1, 38, 42, 43, 69], a po stronie akceptorowej przekaźniki elektronów łącznie z rozpuszczalną ferredoksyną i reduktazą ferredoksyna: $NADP^+$ [21].



Ryc. 1. Szlaki metaboliczne w komórkach wegetatywnych i heterocystach, związane z metabolizmem wodoru; Fd – ferredoksyna, FeS – pierwotny akceptor PSI z centrum aktywnym Fe-S, PSI – fotosystem, I, PSII – fotosystem II, PQ – plastochinon, Q – akceptor PSII (opracowane na podstawie [40])

W niektórych sinicach stwierdzono występowanie trzech różnych ferredoksyn: dwie z nich (FdI i FdII) są zlokalizowane w heterocystach, trzecia – w komórkach wegetatywnych. Badania ferredoksyn z *Anabaena variabilis* dowiodły, że FdI różni się od dwóch pozostałych właściwościami fizykochemicznymi (skład aminokwasowy, masa cząsteczkowa, punkt izoelektryczny, potencjał redoks) [16]. Stwierdzono również, że tylko FdI może pełnić funkcję nośnika elektronów do nitrogenazy [17];

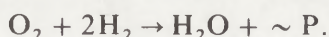
nie są zdolne do wiązania CO_2 i nie zawierają enzymów cyklu Calvina [22, 79];

zawierają aktywną nitrogenazę, hydrogenazę pochłaniającą oraz hydrogenazę odwracalną.

Hydrogenaza pochłaniająca może w tych warunkach uczestniczyć co najmniej w dwóch procesach:

1. Jest zdolna do przekazywania elektronów od H_2 do nitrogenazy. Proces ten przebiega tylko na świetle, z udziałem fotosystemu I i ferredoksyny jako donora elektronów dla nitrogenazy [13, 41]. Elektrony uwalniane z H_2 przez hydrogenazę są włączane do łańcucha transportu elektronów w sąsiedztwie puli plastochinonu, dlatego przeniesieniu elektronów towarzyszy synteza ATP, wykorzystująca gradient protonów tworzony przez co najmniej dwa miejsca sprzężenia: jedno jest związane z redukcją i powrotnym utlenieniem plastochinonu, gdzie dzięki pętli Q stosunek przeniesionych protonów do elektronów jest równy 2:1 [43]; drugie miejsce sprzężenia jest związane z utlenieniem cytochromu c_{553} przez oksydazę cytochromową ze stosunkiem przeniesionych protonów do elektronów $\text{H}^+ : \text{e}^- = 1:1$ [58, 59]. Możliwe, że trzecie miejsce sprzężenia jest związane z utlenieniem NAD/P/H przez odpowiednią dehydrogenazę [40].

2. Jest zdolna do katalizowania reakcji tleno-wodorowej:



Reakcja ta przebiega nie tylko w sinicach, ale jest ważnym elementem metabolizmu wodoru w bakteriach. Tlen nie reaguje bezpośrednio z hydrogenazą, w przeniesieniu elektronów uczestniczy kilka pośredników, dzięki czemu część energii uwalnianej przy utlenianiu H_2 jest magazynowana w formie wiązań ATP. Pierwotnym akceptorem elektronu od zredukowanej hydrogenazy pochłaniającej w bakteroidach *Rhizobium japonicum* jest prawdopodobnie cytochrom b_{559} [28]. W transporcie elektronowym uczestniczą też składniki łańcucha oddechowego; ubichinon, cytochromy b i c oraz oksydaza cytochromowa [29].

Funkcja hydrogenazy pochłaniającej przynosi bakteroidom i sinicom następujące korzyści w warunkach *in vivo*:

a. obniża wewnątrzkomórkowy poziom O_2 , chroniąc nitrogenazę przed dezaktywacją;

b. wiąże uwalniany przez nitrogenazę wodór, zapobiegając konkurencyjnemu hamowaniu wiązania N_2 przez H_2 ;

c. umożliwia wykorzystanie energii uwalnianej przy utlenianiu H_2 do syntezy ATP, niezbędnego do wiązania N_2 przez nitrogenazę.

W świetle nowych badań [3] korzyści te ograniczają się jednak głównie do wykorzystania energii uwalnianej przy utlenianiu H_2 do syntezy ATP. Porównawcze doświadczenia, przeprowadzone na szczepach *Anabaena variabilis*

dowodły, że obecność lub brak hydrogenazy pochłaniającej nie mają wpływu na aktywność nitrogenazy, która musi być chroniona innymi mechanizmami przed dezaktywującym działaniem O_2 i hamującym działaniem H_2 . Natomiast fizjologiczna rola hydrogenazy odwracalnej jest obecnie tylko przedmiotem domysłów.

Skłonność hydrogenaz odwracalnych do wytwarzania lub pochłaniania H_2 w warunkach fizjologicznych można oceniać na podstawie szybkości odpowiednich reakcji i ich zależności od pH oraz na podstawie wartości K_m . Hydrogenazę odwracalną z *Clostridium pasteurianum* cechuje wysoka wartość K_m dla wodoru (równa $380 \mu M$ [30]). Można przypuszczać, że w warunkach in vivo hydrogenaza ta katalizuje reakcję redukcji H^+ kosztem reduktorów, uwalniając w ten sposób organizm od nadmiaru redukujących produktów fermentacji. Dla wielu hydrogenaz odwracalnych wartość K_m jest jednak znacznie niższa (od $2,3 \mu M$ [40] do $7 \mu M$ [50]), co pozwala sądzić, że katalizują one reakcję utleniania H_2 . Proces jest korzystny dla organizmów, np. sinic, rozwijających się w warunkach anaerobowych, zwykle przy ograniczonym dostępie światła. Energia promieniowania jest wtedy wykorzystywana głównie do syntezy ATP, sprzężonej z cyklicznym transportem elektronów wokół fotosystemu I, a czynników redukujących, potrzebnych do procesów metabolicznych, dostarcza reakcja utleniania H_2 , katalizowana hydrogenazą odwracalną.

Podobną funkcję pochłaniania wodoru należałoby przypisać większości hydrogenaz odwracalnych na podstawie danych kinetycznych, zawartych w tab. 2: w warunkach pH fizjologicznego pochłanianie H_2 przebiega znacznie szybciej niż jego wydzielanie. Ostateczny efekt aktywności hydrogenazy odwracalnej zależy jednak od organizmu i warunków jego rozwoju. W bakteriach aerobowych (np. *Azotobacter*, *Azospirillum*) wodór egzogeny lub wydzielany dzięki aktywności nitrogenazy jest utleniany przez hydrogenazę, służąc jako donor elektronów (i źródło ATP) do wiązania azotu. Natomiast w bakteriach, takich jak *Clostridium* lub *Klebsiella*, rozwijających się w warunkach ściśle anaerobowych, oraz gdy jedynym akceptorem elektronów są protony, hydrogenazy powodują wydzielanie H_2 , uwalniając komórki od nadmiaru czynników redukujących [49].

Przeprowadzono dokładne badania metabolizmu wodoru w bakteriach siarkowych *Desulfovibrio* i właściwości hydrogenaz, występujących w tych mikroorganizmach [9, 12, 31, 32, 48, 49, 71, 72]. Metabolizm wodoru jest różny w różnych szczepach tych bakterii, zależy też od warunków rozwoju. W normalnych warunkach fizjologicznych aktywność hydrogenaz w szczepach *Desulfovibrio* przejawia się głównie w tendencji do pochłaniania wodoru, jednak w szczególnych warunkach głodu azotowego lub siarczanowego zaobserwowano odwrotny proces uwalniania wodoru [49].

W *Desulfovibrio gigas* występują dwie odwracalne hydrogenazy, zlokalizo-

TABELA 2
Aktywności hydrogenaz izolowanych z różnych szczepów *Desulfovibrio* (opracowano na podstawie [32, 48])

Źródło hydrogenazy	Wydzielanie H ₂		Pochłanianie H ₂		akt. wł.	Wymiana H ⁺ -D ₂	
	akt. wł.*	optimum pH	akt. wł.	optimum pH		optimum pH	H ₂ /(HD+H ₂)
<i>D. vulgaris</i> Hildenborough	4800	5,6-6,0	50000	8,4	2700	4,5-5,0	~0,3
<i>D. gigas</i>	440	4,0-4,5	1500	8,0	267	7,5-8,0	~0,3
<i>D. baculatus</i> 9974	466	4,0	120	7,5	350	3,0(HD)	~0,6(pH 9-4,5)
<i>D. salexigens</i> British Guiana	1830	4,5-5,0	1300	7,5-8,0	900	5,0(H ₂) 3,5(HD)	0,2(pH 3,0) ~0,6(pH 7,6-5)
<i>D. multispirans</i>	790		590			5,0(H ₂)	0,4(pH 3,5)

* aktywność właściwa w μmolach H₂ (wydzielanego lub pochłanianego) lub w μmolach (HD+H₂) wydzielanego na 1 min i na 1 mg białka. Dla wydzielenia H₂, donor – zredukowany metylowiologen. Dla pochłaniania wodoru: akceptor – utleniony benzylowiologen.

wane w różnych częściach komórki (tab. 1). Związkiem pośredniczącym w przeniesieniu elektronów między hydrogenazą peryplazmatyczną a utleniaczami jest specjalny cytochrom c_3 , dzięki któremu uwalniana przy utlenianiu H_2 energia jest wykorzystywana w fosforylacji oksydatywnej [9], natomiast hydrogenaza cytoplazmatyczna ma tendencję do redukowania jonów H^+ do wodoru kosztem endogennych reduktorów. Funkcję utleniacza mogą pełnić jony siarczanowe. W ten sposób redukcji siarczanów do siarczynów towarzyszy cykliczna redukcja i utlenianie jonów H^+ między zewnętrzną i wewnętrzną stroną błony plazmatycznej [32].

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA FRAGMENTÓW UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH DO FOTOCHEMICZNEGO WYTWARZANIA WODORU

Podstawowym warunkiem praktycznego wykorzystania układów biologicznych do wytwarzania wodoru jest zastosowanie prostego, łatwo dostępnego substratu. Spośród omówionych już tu donorów elektronów wymagania te spełnia woda. Zdolność fotoutleniania wody ma jednak tylko fotosystem II występujący w sinicach i chloroplastach roślin wyższych. Badania prowadzone na glonie *Sinechococcus* wykazały, że źródłem wydzielanego wodoru przy słabym oświetleniu jest zarówno woda, jak i endogenne, organiczne donory, natomiast w warunkach nasycenia światłem jedynym źródłem wydzielanego wodoru jest woda [64]. Woda jest również głównym źródłem wodoru wydzielanego przez *Chlorella fusca* [52].

W sinicach fotosystem II jest zlokalizowany w komórkach wegetatywnych, a enzymy uczestniczące w metabolizmie wodoru – w heterocystach. Metabolizm wodoru w heterocystach jest bardzo złożony, uczestniczą w nim wszystkie trzy enzymy, hydrogenaza pochłaniająca, hydrogenaza odwracalna i nitrogenaza, która w warunkach *in vivo* jest głównym enzymem wytwarzającym wodór (ryc. 1). Wylimitowanie konkurencyjnego działania hydrogenazy pochłaniającej względem dwóch pozostałych enzymów, duża wrażliwość nitrogenazy na tlen i stabilizowanie całego układu są trudnościami ograniczającymi możliwości wykorzystania sinic do wytwarzania wodoru. Mimo tych trudności zagadnienie fotobiologicznego wytwarzania wodoru przy użyciu sinic w warunkach naturalnych jest tak atrakcyjne, że trwają poszukiwania szczepów najlepiej nadających się do tego celu. Między innymi obiecujące wyniki dały badania wytwarzania wodoru przez glony *Oscillatoria* sp Miami BG 7 w warunkach oświetlenia światłem słonecznym [60], oraz wpływu składu wody morskiej (zawartość soli, kwasowość, zawartość metali śladowych) na ten proces [61].

Inne problemy stwarzają próby wykorzystania układu złożonego z chloroplastów i hydrogenazy lub innego katalizatora. Izolowane chloroplasty starzeją

się. Stwierdzono, że chloroplasty izolowane z liści grochu według [54] i inkubowane w ciemności w temperaturze 2°C tracą aktywność fotosystemu I (po 30 godz. w pH 7,5 – 50%), fotosystemu II (po 20 godz. w pH 7,5 – 60%, po 30 godz. – 100%), oraz wykazują istotne zmiany składu polipeptydowego (po 30 godz. inkubacji w pH 7,5 znacznie obniża się zawartość białek układu wydzielającego tlen o masach 34, 24 i 17 kDa, prawie całkowicie znika frakcja białka 32 kDa, wiążącego akceptor Q_B (J. Kieleczawa, dane niepublikowane)). Zmiany te są jeszcze szybsze w alkalicznym pH 9,2. Procesy te można przypisać działaniu endogennych proteaz [27, 65] oraz lipaz hydrolizujących lipidy i zmieniających otoczenie kompleksów uczestniczących w transporcie elektronowym. Procesy starzenia można częściowo zahamować działaniem czynników sieciujących [55]: działając aldehydem glutarowym w optymalnych warunkach można otrzymać chloroplasty o aktywności wyjściowej o 75% niższej od kontroli, ale utrzymującej się w ciemności przez 24 dni, tj. co najmniej 6 razy dłużej od próby kontrolnej.

Lepsze wyniki uzyskano wbudowując chloroplasty w film z alkoholu poliwinylowego. Chloroplasty stabilizowane w filmie z niskospolimeryzowanego alkoholu poliwinylowego zachowują prawie pełną aktywność przez długi czas (co najmniej 5 tygodni [55]). W filmie z wysokospolimeryzowanego alkoholu aktywność wyjściowa jest o ok. 75% niższa od kontroli.

Zagadnieniom immobilizacji układów biologicznych (przy zachowaniu możliwie dobrej aktywności) poświęca się obecnie dużo uwagi. Różne metody immobilizacji układów chloroplastowych i glonowych podali w pracach przeglądowych Rao i Hall [62, 63]. Odpowiednio dobrane metody immobilizacji pozwalają uzyskać interesujące wyniki dla układów nie zawierających fotosystemu II, a więc wydzielających wodór kosztem innego, poza wodą, donora elektronów. Tak np. opracowano reaktor [33], w którym immobilizowane komórki *Rhodospirillum rubrum* zachowywały zdolność do fotowytwarzania wodoru kosztem substratu, mleczanu lub glutaranu przez ok. 3000 godz. Stosunkowo znaczną szybkość wytwarzania wodoru (18–34 $\mu\text{l H}_2/\text{mg}$ suchej masy/godz.) otrzymano dla komórek immobilizowanych na perełkach z agaru. Komórki immobilizowane na alginianie wapnia wykazywały dwukrotnie niższą aktywność.

W odróżnieniu od bakterii nie zawierających fotosystemu II, immobilizowanie alginianem wapnia układu chloroplasty – ferredoksyna – hydrogenaza nie dało zadawalających wyników [80]. Przyczyną małej stabilności takiego układu są m.in. wspomniane już tu procesy inaktywacji hydrogenazy oraz autoutlenianie ferredoksyny, dlatego podejmowane są próby zastąpienia tych dwóch białek innymi, bardziej stabilnymi związkami. Już w 1980 r. stwierdzono, że hydrogenazę można zastąpić koloidalną platyną [35]. Przekazywanie elektronów od ferredoksyny (lub sztucznego przenośnika elektronów – metylowiologenu) do platyny jest jednak mało wydajne: tylko

10–20% strumienia elektronów przepływającego przez ferredoksynę zużywa się na wydzielanie wodoru, reszta jest kierowana z powrotem do łańcucha transportu elektronów [66]. Przyczyną tego jest prawdopodobnie elektrostatyczne oddziaływanie między ujemnie naładowanym fragmentem kompleksu fotosystemu I a dodatnio naładowanym zredukowanym przenośnikiem elektronów (metylowiologen w formie zredukowanej ma wypadkowy ładunek dodatni). Dzięki temu elektrostatycznemu oddziaływaniu zredukowana forma przenośnika elektronów nie dyfunduje w kierunku katalizatora Pt, lecz gromadzi się w podwójnej warstwie, przylegającej do powierzchni kompleksu fotosystemu I, zwiększając prawdopodobieństwo skierowania elektronów do cyklicznego transportu. Celem uniknięcia tego niekorzystnego zjawiska w miejsce ferredoksyny lub metylowiologenu zastosowano przenośniki elektronów, które w stanie zredukowanym mają wypadkowy ładunek ujemny [26]. Fotostacjonarne stężenie zredukowanej formy przenośników tego typu jest znacznie wyższe od stężenia zredukowanej formy metylowiologenu, przy ich udziale otrzymano też wyższe wydajności wytwarzania wodoru. Spośród badanych związków najlepsze wyniki uzyskano dla dikarboksyl-1,1'-cobalticinium. W warunkach fotostacjonarnych stosunek formy utlenionej do zredukowanej odpowiada potencjałowi redoks (obliczonemu z równania Nernsta) równemu – 724 mV. Związek ten, zastosowany jako mediator między chloroplastami a koloidalną platyną umożliwia wydajne fotowytwarzanie wodoru z optymalną szybkością rzędu $60 \mu\text{moli H}_2 \cdot \text{mg chlorofilu}^{-1} \cdot \text{godz}^{-1}$.

Próbę całkowitego wyeliminowania przenośnika elektronów między fotosystemem I i katalizatorem, platyną, podjął Greenbaum [36]. Autor ten badał fotowytwarzanie wodoru przez układ złożony tylko z błon tylakoidowych i platyny, osadzonych na bibule filtracyjnej. Stwierdził, że aktywny układ powstaje przez osadzenie na powierzchni tylakoidów platyny z zobojętnionego roztworu $\text{Pt}(\text{Cl})_6^{2-}$. Wytrącenie platyny z roztworu $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ prowadziło do układu niezdolnego do wytwarzania wodoru. Przyczyną było prawdopodobnie odpychanie elektrostatyczne lub przeszkody steryczne, uniemożliwiające utworzenie kontaktu przenoszącego elektrony między donorową częścią fotosystemu I i platyną. Natomiast osadzenie platyny z roztworu $\text{Pt}(\text{Cl})_6^{2-}$ prowadziło, dzięki specyficznemu powinowactwu chemicznemu lub jonowymianiu, do otrzymania stabilnego i dość wydajnego układu, który jeszcze po 3 dniach periodycznego oświetlenia (światło : ciemność = 2 godz. : 2 godz) zachowywał 10–20% aktywności początkowej.

LITERATURA

- [1] ALBERTE R. S., TEL-ORT E., PACKER L., THORNBUR J. P., Functional organization of the photosynthetic apparatus in heterocysts of nitrogen-fixing cyanobacteria, *Nature*, **284**: 481–483, 1980.

- [2] ALBRACHT S. P. J., GRAF E. G., THAUER R. K., The EPR properties of nickel in hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, FEBS Lett., **140**: 311–313, 1982.
- [3] ALMON H., BÖGER P., Energetics of hydrogen recycling in nitrogenfixing cyanobacteria, Progr. Photosynth. Res., ed. J. Biggens. Wyd. M. Nijhoff Publ., II. 12. 637–640, 1987.
- [4] ARP D. J., BURRIS R. H., Purification and properties of the particulate hydrogenase from the bacteroids of soybean root nodules, Biochim. Biophys. Acta, **570**: 221–230, 1979.
- [5] – Kinetic mechanism of the hydrogen-oxidizing hydrogenase from soybean nodule bacteroids, Biochemistry, **20**: 2234–2240, 1981.
- [6] – Isotope exchange and discrimination by the H₂-oxidizing hydrogenase from soybean root nodules, Biochim. Biophys. Acta, **700**: 7–15, 1982.
- [7] BARON S. F., BROWN D. P., FERRY J. G., Location of the hydrogenases of *Methanobacterium formicicum* after subcellular fractionation of cell extract, J. Bacteriol., **169**: 3823–3825, 1987.
- [8] BELKIN S., PADAN E., Hydrogen metabolism in the facultative anoxygenic cyanobacteria (blue-green algae) *Oscillatoria limnetica* and *Aphanothece halophytica*, FEBS Lett., **94**: 291–294, 1978.
- [9] BERLIER Y. M., FAUQUE G., LESPINAT P. A., le GALL J., Activation, reduction and proton-deuterium exchange reaction of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* in relation with the role of cytochrome c₃, FEBS Lett., **140**: 185–188, 1982.
- [10] BERLIER Y., DIMON B., FAUQUE G., LESPINAT P. A., w: Gas Enzymology, eds. H. Degn, R. P. Cox, H. Toftlund. Wyd. Reidel Publ. Co., 17–35, 1985.
- [11] BERLIER Y., FAUQUE G. D., le GALL J., CHOI E. S., PECK H. D., Jr., LESPINAT P. A., Inhibition studies of three classes of *Desulfovibrio* hydrogenase: application to the further characterization of the multiple hydrogenases found in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, Biochem. Biophys. Res. Commun., **146**: 147–153, 1987.
- [12] BERLIER Y. M., FAUQUE G. D., le GALL J., LESPINAT P. A., PECK H. D., Jr., The activation of the periplasmic (NiFe) hydrogenase of *Desulfovibrio gigas* by carbon monoxide, FEBS Lett., **221**: 241–244, 1987.
- [13] BOTHE H., TENNIGKEIT J., EISBRENNER G., The utilization of molecular hydrogen by the blue-green alga *Anabaena cylindrica*, Arch. Microbiol., **114**: 43–49, 1977.
- [14] BOTHE H., YATES M. G., CANNON F. C., Physiology, biochemistry and genetics of dinitrogen fixation, [w:] Encyclopedia of plant physiology, New Series Vol. 15A. Inorganic plant nutrition, eds. A. Läuchli, R. L. Bielecki, Springer Verlag, Berlin 1983, 241–285.
- [15] BÖHME H., Regulation of electron flow to nitrogenase in a cell-free system from heterocysts of *Anabaena variabilis*, Biochim. Biophys. Acta, **891**: 121–128, 1987.
- [16] BÖHME H., SCHRAUTEMEIER B., Comparative characterization of ferredoxins from heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis*, Biochim. Biophys. Acta, **891**: 1–7, 1987.
- [17] – Electron donation to nitrogenase in a cell-free system from heterocysts of *Anabaena variabilis*, Biochim. Biophys. Acta, **891**: 115–120, 1987.
- [18] BULEN W. A., BURNS R. C., LeCOMTE J. R., Nitrogen fixation: hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **53**: 5332–5339, 1965.
- [19] BULEN W. A., LeCOMTE J. R., The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP dependent H₂ evolution and ATP hydrolysis, Proc. Natl. Acad. Sci USA, **56**: 979–986, 1966.
- [20] BURNS R. C., HARDY R. W. F., Nitrogen fixation in bacteria and higher plants, Springer Verlag, Berlin 1975, 1–189.
- [21] CAMMACK R., LUIJK L. J., MAGUIRE J. J., FRY I. V., PACKER L., EPR spectra of

- photosystem I and other iron proteins components in intact cells of cyanobacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **548**: 267–275, 1979.
- [22] CODD G. A., OKABE K., STEWART W. D. P., Cellular compartmentation of photosynthetic and photorespiratory enzymes in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*, *Arch. Microbiol.*, **124**: 149–154, 1980.
- [23] COLBEAU A., VIGNAIS P. M., The membrane-bound hydrogenase of *Rhodospseudomonas capsulata*. Stability and catalytic properties, *Biochim. Biophys. Acta*, **662**: 271–284, 1981.
- [24] CONRAD R., SEILER W., Contribution of hydrogen production by biological nitrogen fixation to the global hydrogen budget, *J. Geophys. Res.*, **85**: 5493–5498, 1980.
- [25] CRAMER S. P., GILLUM W. O., HODGSON K. O., MORTENSON L. E., STEIFEL E. I., CHISNELL J. R., BRILL W. J., SHAH V. K., The molybdenum site of nitrogenase 2. A comparative study of MoFe proteins and the iron-molybdenum cofactor by X-ray absorption spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**: 3814–3819, 1978.
- [26] CUENDET P., GRÄTZEL M., New photosystem I electron acceptors: Improvement of hydrogen photoreduction by chloroplasts, *Photochem. Photobiol.*, **36**: 203–210, 1982.
- [27] DAHLMELM H., FICKER K., Untersuchungen zur subzellulären lokalisation proteolytischer Enzyme in *Pisum sativum* L. II. Proteolytische Aktivität in Chloroplasten, *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **177**: 167–175, 1982.
- [28] EISBRENNER G., HICKOK R. E., EVANS H. J., Cytochrome patterns in *Rhizobium japonicum* cells grown under chemolithotrophic conditions, *Arch. Microbiol.*, **132**: 230–235, 1982.
- [29] EISBRENNER G., EVANS H. J., Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **34**: 105–136, 1983.
- [30] ERBES D. L., BURRIS R. H., The kinetics of methyl viologen oxidation and reduction by the hydrogenase from *Clostridium pasteurianum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **525**: 45–54, 1978.
- [31] FAUQUE G., TEIXEIRA M., MOURA I., LESPINAT P. A., der VARTANIAN D. V., PECK H. D., Jr., le GALL J., MOURA J. G., Purification, characterization and redox properties of hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* (DSM 800), *Eur. J. Biochem.*, **142**: 21–28, 1984.
- [32] FAUQUE G. D., BERLIER Y. M., CZECHOWSKI M. H., DIMON B., LESPINAT P. A., le GALL J., A proton-deuterium exchange study of three types of *Desulfovibrio* hydrogenases, *J. Ind. Microbiol.*, **2**: 15–23, 1987.
- [33] FELTEN von P., ZÜRRER H., BACHOFEN R., Production of molecular hydrogen with immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 15–20, 1985.
- [34] GEST H., KAMEN M. D., Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Science*, **109**: 560, 1949.
- [35] GISBY P. E., HALL D. O., Biophotolytic H₂ production using alginateimmobilized chloroplasts, enzymes and synthetic catalysts, *Nature*, **287**: 251–253, 1980.
- [36] GREENBAUM E., Platinized chloroplasts: A novel photocatalytic material, *Science*, **230**: 1373–1375, 1980.
- [37] HAGEMAN R. V., BURRIS R. H., Electron allocation to alternative substrates of *Azotobacter* nitrogenase is controlled by the electron flux through dinitrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **591**: 63–75, 1980.
- [38] HAWKESFORD M. J., HOUCHINS J. P., HIND G., Reconstitution of photosynthetic electron transfer in cyanobacterial heterocyst membranes, *FEBS Lett.*, **159**: 262–266, 1983.
- [39] HENDRICH W., Fotobiologiczne wytwarzanie wodoru, *Post. Biol. Kom.*, **8**: 163–182, 1981.
- [40] HOUCHINS J. P., The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **768**: 227–255, 1984.
- [41] HOUCHINS J. P., HIND G., Pyridine nucleotides and H₂ as electron donors to the respiratory and photosynthetic electron transfer chains and to nitrogenase in *Anabaena* heterocysts, *Biochim. Biophys. Acta*, **682**: 86–96, 1982.

- [42] HOUCHINS J. P., HIND G., Flash spectroscopic characterization of photosynthetic electron transport in isolated heterocysts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**: 272–282, 1983.
- [43] – Kinetic evidence for involvement of two cytochrome b-563 hemes in photosynthetic electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **725**: 138–145, 1983.
- [44] KRASNA A. J., Oxygen-stable hydrogenase and assay, *Meth. Enzymol.*, **53**: 296–314, 1979.
- [45] LAMBERT G. R., SMITH G. D., Hydrogen metabolism by filamentous cyanobacteria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**: 36–50, 1980.
- [46] LEE S. B., WILSON P. W., Hydrogenase and nitrogen fixation by *Azotobacter*, *J. Biol. Chem.*, **151**: 377–385, 1943.
- [47] le GALL J., LJUNGDAHL P. O., MOURA I., PECK H. D., XAVIER A. V., The presence of redox-sensitive nickel in the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**: 610–616, 1982.
- [48] LESPINAT P. A., BERLIER Y., FAUQUE G., CZECHOWSKI M., DIMON B., le GALL J., The pH dependence of proton-deuterium exchange, hydrogen production and uptake catalysed by hydrogenases from sulfate-reducing bacteria, *Biochimie*, **68**: 55–61, 1986.
- [49] LESPINAT P. A., BERLIER Y. M., FAUQUE G. D., TOCI R., DENARIAZ G., le GALL J., The relationship between hydrogen metabolism, sulfate reduction and nitrogen fixation in sulfate reducers, *J. Ind. Microbiol.*, **1**: 383–388, 1987.
- [50] LISSOLO T., PULVIN S., THOMAS D., Reactivation of the hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* by hydrogen, *J. Biol. Chem.*, **259**: 11725–11729, 1984.
- [51] LLAMA M. J., SERRA J. L., RAO K. K., HALL D. O., Isolation and characterisation of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*, *FEBS Lett.*, **98**: 342–346, 1979.
- [52] MAHRO B., GRIMME L. H., H₂-photoproduction of green algae: water serves as the main source of electrons, *Adv. Photosynth., Res.*, ed. C. Sybesma, M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hague, II. 8 1984, 769–772.
- [53] MATTHIJS H. C. P., LUDERUS E. M. E., SCHOLTS M. J. C., KRAAYENHOF R., Energy metabolism in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Oxidative phosphorylation and respirativity pathway, *Biochim. Biophys. Acta*, **766**: 38–44, 1984.
- [54] NAKATANI H. Y., BARBER J., An improved method for isolating chloroplasts retaining their outer membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **461**: 510–512, 1977.
- [55] PAPAGEORGIOU G. C., Stabilization of chloroplasts and subchloroplast particles, *Meth. Enzymol.*, **69**: 613–625, 1980.
- [56] PESCHEK G. A., Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H₂ – dependent photoreduction and related reactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **548**: 187–202, 1979.
- [57] – Aerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction, *Biochim. Biophys. Acta*, **548**: 203–215, 1979.
- [58] – Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in cyanobacterium *Anacystis nidulans*, *J. Bacteriol.*, **153**: 539–542, 1983.
- [59] PHELPS A. S., WILSON P. W., Occurrence of hydrogenase in nitrogen fixing organisms, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **47**: 473–476, 1941.
- [60] PHILIPS E. J., MITSUI A., Development of hydrogen production activity in the marine blue-green alga *Oscillatoria* sp. Miami BG 7 under natural sunlight conditions. *Adv. Photosynth. Res.*, ed. C. Sybesma, M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hague, II. 8 1984, 801–804.
- [61] RAMACHANDRAN S., MITSUI A., Effect of seawater quality on biomass and hydrogen photoproduction by marine blue-green alga *Oscillatoria* sp. (Miami BG7), *Adv. Photosynth. Res.*, ed. C. Sybesma, M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hague, II. 8 1984, 805–808.
- [62] RAO K. K., HALL D. O., Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems, *Trends Biotechnol.*, **2**: 124–129, 1984.
- [63] RAO K. K., HALL D. O., CUENDET P., GRÄTZEL M., Photoproduction of hydrogen

- from water using immobilized biological and synthetic catalysts. *Adv. Photosynth. Res.*, ed. C. Sybesma, M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hague, II. 8 1984, 777-779.
- [64] REDDY K. J., MITSUI A., Simultaneous production of hydrogen and oxygen as affected by light intensity in unicellular aerobic nitrogen fixing blue-green alga *Synechococcus* sp. Miami BG043511, *Adv. Photosynth. Res.*, ed. C. Sybesma, M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hague, II. 8 1984, 785-788.
- [65] ROBINSON C., ELLIS R. J., Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides, *Eur. J. Biochem.*, **142**, 337-342, 1984.
- [66] ROSEN M. M., KRASNA A. I., Limiting reactions in hydrogen photoproduction by chloroplasts and hydrogenase, *Photochem. Photobiol.*, **31**: 259-265, 1980.
- [67] SCHINK B., SCHLEGEL H. G., The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **567**: 315-324, 1979.
- [68] SCHNEIDER K., SCHLEGEL H. G., Localization and stability of hydrogenases from aerobic hydrogen bacteria, *Arch. Microbiol.*, **112**: 229-238, 1977.
- [69] SCHRAUTEMEIER B., BÖHME H., BÖGER P., In vitro studies on pathway and regulation of electron transport to nitrogenase with a cell-free extract from heterocysts of *Anabaena variabilis*, *Arch. Microbiol.*, **137**: 14-20, 1984.
- [70] SÖDERLUND R., SWENSSON B. R., The global nitrogen cycle. W: Nitrogen, phosphorus and sulfur – global cycles. *Scope Rep. 7. Ecol. Bull Stockholm*; eds. B. H. Swenson, R. Soderlund, **22**: 23-74, 1976.
- [71] TEIXEIRA M., MOURA I., FAUQUE G., CZECHOWSKI M., BERLIER Y., LESPINAT P. A., le GALL J., XAVIER A. V., MOURA J. J. G., Redox properties and activity studies on a nickel-containing hydrogenase isolated from a halophilic sulfate reducer *Desulfovibrio salexigens*, *Biochemie*, **68**: 75-84, 1986.
- [72] TEIXEIRA M., FAUQUE G., MOURA I., LESPINAT P. A., BERLIER Y., PRICKRIL B., PECK H. D., Jr., XAVIER A. V., le GALL J., MOURA J. J. G., Nickel-(iron-sulfur)-selenium-containing hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743). *Eur. J. Biochem.* **167**: 47-58, 1987.
- [73] TEL-OR E., LUIJK L. W., PACKER L., Hydrogenase in N₂-fixing cyanobacteria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**: 186-194, 1978.
- [74] van der WERF A. A., YATES M. G. [w:] Hydrogenases – their catalytic activity, structure and function, eds. H. G. Schlegel, K. Schneider. *Wyd. E. Goltze, K. G. Göttingen* 1978, 307-326, (cyt. wg [49]).
- [75] WIKSTRÖM M., KRAB K., Proton-pumping cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **549**: 177-222, 1979.
- [76] WILSON P. W., UMBREIT W. W., Mechanism of symbiotic nitrogen fixation. III. Hydrogen as a specific inhibitor, *Arch. Microbiol.*, **8**: 440-457, 1937.
- [77] WILSON P. W., UMBREIT W. W., LEE S. B., Mechanism of symbiotic nitrogen fixation. IV. Specific inhibition by hydrogen. *Biochem. J.*, **32**: 2084-2095, 1938.
- [78] WINTER H. C., BURRIS R. H., Nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**: 409-426, 1976.
- [79] WOLK C. P., Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.*, **96**: 2138-2143, 1968.
- [80] WOODWARD J., GREENBAUM E., An immobilized chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system for the simultaneous photoproduction of hydrogen and oxygen. *Biotechnology and Bioengineering Symp. No 13*, J. Wiley and Sons, Inc., 1984, 271-276.

Adres autora: Tamka 2, 50-137 Wrocław.

Otrzymano: 12 września 1987 r.

Przyjęto: 22 kwietnia 1988 r.

ODWROTNA KRZYŻOWA WRAŻLIWOŚĆ DWÓCH PODLINII BIAŁACZKI MYSIEJ L5178Y NA PROMIENIOWANIA X i UVC

INVERSE CROSS-SENSITIVITY OF TWO SUBLINES OF MURINE LYMPHOMA L5178Y TO X AND UVC RADIATIONS

Irena SZUMIEL

Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia,
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

Streszczenie. Omówiono wyniki badań, stanowiące podstawę do sformułowania hipotezy roboczej, wyjaśniającej odwrotną krzyżową wrażliwość podlinii L5178Y (LY)-R i -S na promieniowania X i UVC. Naprawa uszkodzeń DNA w komórkach LY-S uzależniona jest od ADP-rybozylacji zarówno po ekspozycji na promieniowanie X, jak i UVC. W podlinii LY-R obserwuje się upośledzenie naprawy z wycięciem po uszkodzeniu DNA promieniowaniem UVC, natomiast w podlinii LY-S – spowolnione łączenie pęknięć podwójnych nici DNA. Defekty naprawy znajdują odbicie na poziomie komórkowym i subkomórkowym (chromosomu). Odmienne wrażliwości i inne cechy odpowiedzi komórkowej na promieniowania X i UVC można wyjaśnić, zakładając różnicę w organizacji chromatyny komórek LY-R i LY-S. Następstwem tej różnicy byłby defekt funkcji endonukleazy UV w podlinii LY-R oraz niska podstawowa aktywność ligazy I w podlinii LY-S. Wynika stąd nadwrażliwość komórek LY-R na promieniowanie UVC oraz uzależnienie naprawy DNA w komórkach LY-S od ADP-rybozylacji, wobec konieczności aktywowania ligazy II.

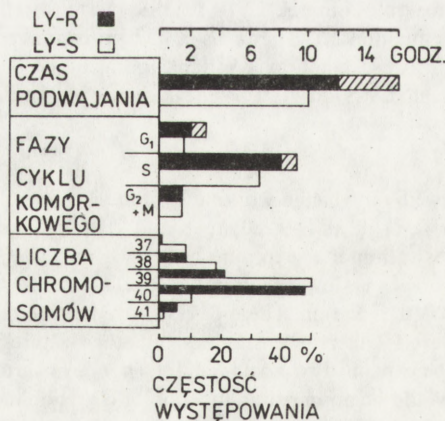
Summary. Results are reviewed, on which a working hypothesis is based, that explains the inverse cross-sensitivity of L5178Y (LY) -R and -S cells to X and UVC radiations. DNA repair in LY-S cells depends on ADP-ribosylation after exposure both to X and UVC radiations. In these cells rejoining of double strand breaks is slower than in LY-R cells, whereas excision repair is impaired in LY-R cells exposed to UVC radiation. These defects in repair are reflected at the cellular and subcellular (chromosome) levels. Different sensitivities and other features of the cellular response to X or UVC radiations can be explained by assuming a difference in chromatin organization of LY sublines. Its consequence would be an impaired function of UV endonuclease in LY-R cells and a low basal activity of ligase I in LY-S cells. Hence, extreme sensitivity of LY-R cells to UVC radiation and dependence of DNA repair in LY-S cells on ADP-ribosylation because of the necessity to activate ligase II.

1. WSTĘP

Komórki L5178Y (LY) pochodzą z indukowanego w 1951 r. metylocholan-trem u myszy DBA/2 guza grasicy; przez następne lata były one utrzymywane in vivo przez wszczepianie dootrzewnowe, a od 1958 r. także w hodowli zawieszinowej w pożywce Fischera [17]. W 1961 r. zauważono zmianę promieniowrażliwości komórek LY po kilkumiesięcznym wzroście in vitro [2] i wyodrębniono podlinię wrażliwszą na promieniowanie X od linii macierzystej. Zostaną opisane właściwości odwrotnej krzyżowej wrażliwości na promieniowania X i UVC (nadfioletowe, 254 nm), które odnoszą się do tych właśnie 2 podlinii: macierzystej, LY-R, stabilnej in vivo, wrażliwej na promieniowanie UVC, odpornej na promieniowanie X oraz pochodzącej od niej LY-S, stabilnej in vitro, przeszczepialnej z bardzo niską wydajnością, odpornej na promieniowanie UVC, wrażliwej zaś na promieniowanie X. Historię obu podlinii, jej pokrewieństwa z innymi podliniami L5178Y oraz opis przejścia LY-R → LY-S następującego po dłuższej hodowli komórek LY-R w zawieszinie podano w [5].

W ciągu ponad 20 lat badań podlinii LY-R i LY-S w Instytucie Badań Jądrowych, a następnie w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie scharakteryzowano ich właściwości, odpowiedź komórkową na promieniowania X i UVC oraz wrażliwość na liczne czynniki uszkodzające DNA i inne. Zestawienie tych cech przedstawiono na ryc. 1 i w tab. 1. Są one uzupełnione danymi otrzymanymi w USA, gdzie obie podlinie badano w Narodowym Biurze Przyrzędów i Ochrony Radiologicznej (Rockville), oraz uniwersytetach Texas (Houston) i Case Western (Cleveland).

Na ryc. 1 przedstawiono m.in. różnice długości trwania faz cyklu



Ryc. 1. Porównanie cyklu komórkowego in vitro i rozkładu liczby chromosomów w komórkach LY-R i LY-S (wg [5] i [36])

TABELA 1
Wrażliwość komórek LY na czynniki uszkadzające

Czynnik uszkadzający, warunki traktowania	Miara wrażliwości, jednostka	LY-R	LY-S	R/S	Odsylacz
UVA, zbuforowana sól fizjologiczna	$D_{37}^{(1)}$ [kJ/m^2]	260	660	0,39	[20]
UVC, pożywka Fischera, sól fizjologiczna	$D_0^{(2)}$ [J/m^2]	3,2	9,0	0,35	[36]
Ledakrin ⁽³⁾ 3h, 37°C	D_0 [$\mu\text{g/ml}$]	2,1	13,9	0,15	[38]
cis-PAD ⁽⁴⁾ 1h, 37°C		2,5	5,8	0,43	[36]
Hydroksymocznik 10^{-4} M, 5h, 37°C	ułamek przeżywalności	0,53	0,81	0,65	[1]
A23187 ⁽⁵⁾ 5 $\mu\text{g/ml}$, 5h, 37°C	ułamek przeżywalności	0,41	0,84	0,49	[43]
Ogrzewanie 43°C, 30 min	WLK ⁽⁶⁾ po 30h	0,15	0,40	0,37	[6]
Kolchicyna 1 $\mu\text{g/ml}$, 48h, 37°C	WLK po 48h	0,006	0,02	0,3	[12]
Oziębienie w pożywce z 92% D_2O , 0°C, 290 min	WLK po 5 dniach	0,02	0,60	0,03	[24]
H_2O_2 2h, 37°C	D_0 [μM]	9,5	22,6	0,42	[10]
KCN 1 mM, 3h, 37°C	Odsetek komórek martwych w 1h po traktowaniu	5	5	1	[11]
Erytromycyna 100 $\mu\text{g/ml}$, 48h 37°C	WLK po 48h	0,5	0,5	1	[12]
Adriamycyna 2 $\mu\text{g/ml}$, 48h, 37°C		0,018	0,018	1	[12]
Mizonidazol ⁽⁷⁾ 15mM, 3h, 37°C	ułamek przeżywalności	1	1	1	[30]
Etanol 2% 48h, 37°C	WLK po 48h	0,1	0,08	1,25	[12]
Nowobiocyna 70 μM , 37°C	WLK po 10 dniach	0,030	0,018	1,67	[26]
Triton X-100, 10 $\mu\text{g/ml}$, 48h, 37°C	WLK po 48h	1	0,5	2	[12]
Trifluoperazyna 10,4 μM , 37°C	WLK po 10 dniach	0,050	0,0028	17,9	[26]
Neutrony 6,5 MeV, 20°C	D_0 , Gy ⁽⁸⁾	0,42	0,42	1	[49]
X, 37°C		0,9–1,1	0,5	ok. 2	[43]
Gamma, 20°C		1,18	0,55	2	[47]
Iperyt azotowy	D_0 [$\mu\text{g/ml}$]	0,030	0,015	2	[18]
Dimetylomyleran, dawka jednorazowa 37°C		4,25	2,06	2,06	
EMS ⁽⁹⁾ 1h, 37°C	D_0 [mM]	17,9	14,4	1,24	[16]
MNU ⁽¹⁰⁾ 1h, 37°C		0,88	0,23	3,83	

(1) D_0 , średnia dawka letalna (odwrotność nachylenia liniowej części krzywej przeżywalności)

(2) D_{37} , dawka odpowiadająca 37% przeżywalności

(3) ledakrin, 1-nitro-9/3-dimetyloaminopropylamino/-akrydyna

(4) cis-PAD, cis-dichlorobis/cyklopentylamino/-platyna (II)

(5) A23187, jonofor kationów dwuwartościowych (głównie Ca^{2+} i Mg^{2+})

(6) WLK, względna liczba komórek

(7) mizonidazol, 1-/2-nitro-1-imidazolilo/-3-metoksy-2-propanol

(8) Gy, dawka pochłonięta promieniowania jonizującego [J/kg]

(9) EMS, etylometanosulfonian

(10) MNU, N-metylo-N-nitrozomocznik

komórkowego; jest on stały w komórkach LY-S, natomiast ulega skróceniu w komórkach LY-R w miarę upływu czasu od przeniesienia z myszy do hodowli zawieszinowej. Dlatego też podano po 2 wartości w przypadku podlinii LY-R. Modalna liczba chromosomów różni się o 1, jednakże kariotypy obu podlinii znacznie odbiegają od kariotypu myszy DBA/2 [33]; zwłaszcza w podlinii LY-S obserwuje się bardzo liczne przemieszczenia międzychromosomowe, brak niektórych chromosomów oraz 7 chromosomów markerowych. Kariotyp komórek LY-R jest bliższy szczepu dzikiego.

Powtarzalnie obserwowanemu w różnych pracowniach przekształceniu LY-R → LY-S towarzyszyć może zmiana modalnej liczby chromosomów [5]; kariotypu metodą barwienia prążkowego w czasie przekształcenia nie badano, jednak można sądzić, że przemieszczenia materiału genetycznego są wynikiem warunków *in vitro* i stwarzają takie zmiany w rozmieszczeniu przestrzennym grup genów, które pociągają za sobą zmianę ich aktywności transkrypcyjnej. Następstwem tego są m.in. bardzo liczne różnice w odpowiedzi komórek na czynniki uszkodzające, co ilustruje tab. 1. Wśród danych zebranych w tej tabeli zwraca uwagę krzyżowa wrażliwość komórek LY-R na promieniowanie UVC, H₂O₂ oraz leki przeciwnowotworowe: cis-PAD i ledakrin. Obie podlinie są jednakowo wrażliwe na niektóre leki nie uszkodzające DNA oraz na neutrony prędkie (6,5 MeV). Natomiast podlinia LY-S jest krzyżowo wrażliwa na promieniowania X i gamma oraz czynniki alkilujące.

Odwrotnej krzyżowej wrażliwości komórkowej na promieniowania X i UVC, mierzonej przeżywalnością, towarzyszy niższa mutagenesa w komórkach LY-S niż w komórkach LY-R niezależnie od rodzaju czynnika mutagenego i badanego locus [15, 16] (tab. 2). Cechy te powodują, że para podlinii

TABELA 2
Mutagenesa w komórkach LY (wg [16])

Czynnik mutagenny	Locus	Częstość mutacji po dawce D_{37}	
		LY-R	LY-S
UVC	ATP-aza Na ⁺ /K ⁺	9,4	8,5
	HGPRT	335	3
X	HGPRT	18	5
EMS	ATR-aza Na ⁺ /K ⁺	22	3,6
	HGPRT	235	3,8
MNU	ATR-aza Na ⁺ /K ⁺	42	10,5
	HGPRT	375	3,5

D_{37} – dawka obniżająca przeżywalność traktowanej populacji komórkowej do 37%

EMS – etylometanosulfonian

MNU – metylnitrozomocznik

ATP-aza Na⁺/K⁺ – adenylozotryfosfataza zależna od jonów Na⁺ i K⁺

HGPRT – fosforybozylotransferaza hipoksantyna: guanina

LY-R i LY-S stanowi dogodny materiał do badania zależności między uszkodzeniami DNA, ich naprawą, mutagenezą i przeżywalnością.

W niniejszym opracowaniu podsumowano wiadomości o podłożu cząsteczkowym i komórkowym wrażliwości na promieniowania X i UVC w obu podliniach LY oraz podjęto próbę wyjaśnienia obserwowanych różnic.

2. ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWA NA NAPROMIENIENIE PROMIENIOWANIEM X

Najważniejsze cechy odpowiedzi komórek LY-R i LY-S na promieniowanie X zestawiono w tab. 3. W zestawieniu tym widoczna jest korelacja między wrażliwością komórkową, efektem dawki podzielonej, czasem trwania opóźnienia mitotycznego (zahamowanie przechodzenia z fazy G2 do M w populacji napromienionych komórek) i szybkością naprawy uszkodzeń.

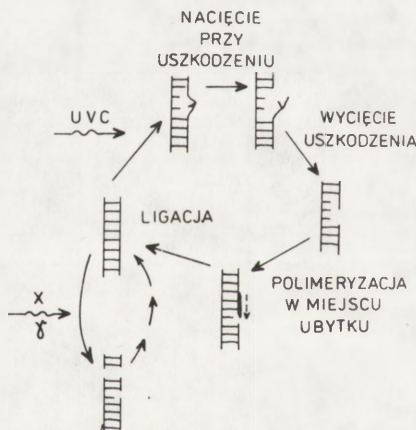
Komórki LY-R, oporniejsze od komórek LY-S, lepiej przeżywają napromienienie dawką podzieloną niż jednorazową, opóźnienie mitotyczne trwa u nich krócej, podobnie jak naprawa uszkodzeń DNA. Różnicę w szybkości naprawy obserwowano metodą sedymentacji w alkalicznym gradiencie sa-

TABELA 3
Cechy odpowiedzi komórek LY na promieniowanie X

Cecha	LY-R	LY-S	Odsyłacz
Wrażliwość	niska	wysoka	
Średnia dawka letalna *	0,9–1,1 Gy	0,5 Gy	[43]
Liczba z ekstrapolacji	1,5	1,0	
Współczynnik wzmożenia tlenowego	2,7	2,7	[37]
Działanie dawki podzielonej	oszczędzające	uczulające	[8]
Działanie niskiej mocy dawki			
D_0 przy 0,88 Gy/min	26,5	5,1	[7]
D_0 przy 0,00037 Gy/min			
Opóźnienie mitotyczne	4 h/Gy	10 h/Gy	[36]
Zahamowanie syntezy DNA: w warunkach utleniania w głębokiej hipoksji	niewielkie nie występuje	znaczne nie występuje	[37]
Procent komórek z aberracjami chromatydowymi, 18 h po 1 Gy X	22	41	[41]
Czas połączenia 50% pęknięć: 2 lub 10 Gy (gamma) rozwijanie w pH 12,1	5 min	4 min	[23]
100 Gy(X) sedymentacja w zasado- wym gradiencie sacharozowym	13 min	40 min	[27]
30 Gy(X) wymywanie w pH 9,6	16 min	60 min	[51]
Uczulenie przez kofeinę	nie	tak	[46]

charozowym po dużej dawce promieniowania (100 Gy) [27] oraz – po niższych dawkach – metodą wymywania z sączków w pH 9,6 [51]. Nie wykrywano różnicy między badanymi podliniami, stosując rozwijanie nici DNA [22] lub wymywanie z sączków [52] w pH zasadowym. Rozbieżności te wynikają ze swoistości i czułości wymienionych metod. Z punktu widzenia procesów prowadzących do śmierci popromiennej istotna jest różnica w łączeniu pęknięć podwójnych nici DNA (mierzona wymywaniem z sączków w pH 9,6). Nie naprawione pęknięcia podwójne powodują powstanie aberracji chromatydowych widocznych w komórkach mitotycznych od kilkunastu do kilkudziesięciu godzin po napromienieniu [9, 41]. Jedna lub obie komórki potomne, pochodzące od komórki z uszkodzonym chromosomem, są niezdolne do dalszych podziałów ze względu na utratę części materiału genetycznego; jeśli utrata obejmuje mały obszar genomu poza genami czynnymi transkrypcyjnie, to komórka może przeżyć. Jak podano w tab. 3, w populacjach wrażliwszych na promieniowanie X komórek LY-S obserwuje się wyższą częstość aberracji chromatydowych niż w oporniejszych LY-R.

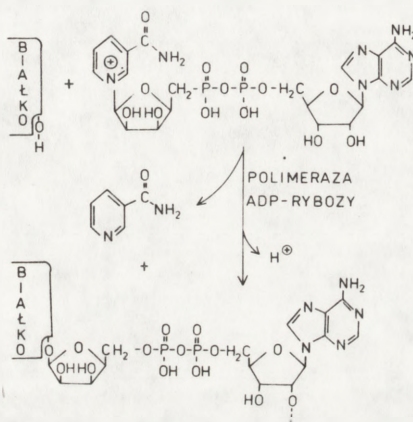
Naprawa uszkodzeń DNA jest procesem wieloetapowym, zależącym m.in. od rodzaju uszkodzenia. Ryc. 2 pokazuje uproszczony schemat naprawy, z podkreśleniem etapów wspólnych dla niektórych dróg naprawy. Czynniki



Ryc. 2. Uproszczony schemat naprawy DNA po uszkodzeniach wywołanych promieniowaniem X (lub gamma) i UVC. Częsteczka DNA przedstawiona jako drabinka, w której szczeblami są pary zasad połączone mostkami wodorowymi. Naprawa pęknięć nici może zająć jednoetapowo, jeśli dostępne są grupy 3'OH i 5'PO₄, lub w kilku etapach prowadzących do rekonstrukcji odcinka w taki sposób, aby grupy te były dostępne. Naprawa odcinka z uszkodzoną zasadą lub dimerem pirymidynowym może zająć z nacięciem nici i wycięciem uszkodzonego nukleotydu (jak na schemacie) lub odcięciem zasady, nacięciem nici DNA, degradacją fragmentu nici i jego odtworzeniem według matrycy, którą jest przeciwną nici DNA. Ligacja (przyłączenie) nowego odcinka jest ostatnim etapem naprawy wszystkich typów uszkodzeń przedstawionych na schemacie

uszkadzające DNA wprowadzają przerwy w niciach polinukleotydowych bezpośrednio (promieniowanie jonizujące, wolne rodniki), lub powstają one w wyniku enzymatycznych nacięć, poprzedzających usunięcie uszkodzonego odcinka.

Nacięcie nici DNA aktywuje enzym polimerazę adenylozynydofosforibozylową ((ADPR)_nP). Enzym ten, wykorzystując NAD⁺ jako substrat, przenosi reszty ADPR na białka chromatyny (ryc. 3); sam także może podlegać automodyfi-



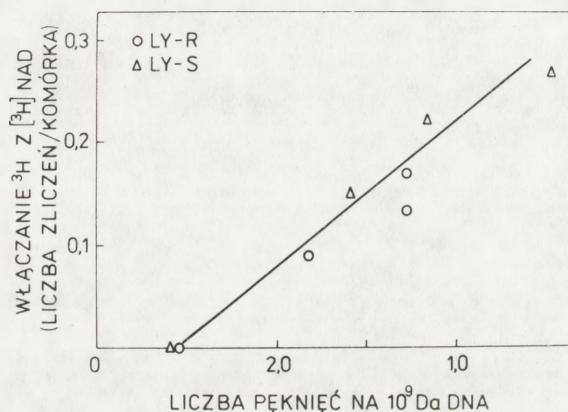
Ryc. 3. Przeniesienie reszty ADP-rybozy na białko akceptorowe przez polimerazę poli(ADP-rybozy). Substratem jest cząsteczka NAD⁺

kacji. Związek ADP-rybozylacji z naprawą DNA wydaje się niewątpliwy, chociaż proponowane są różne mechanizmy udziału (ADPR)_nP w przywracaniu uszkodzonemu DNA ciągłości i prawidłowej sekwencji nukleotydowej [4, 14, 21, 31, 35].

Wskutek aktywacji (ADPR)_nP w komórkach z uszkodzonym DNA obserwuje się wzrost szybkości obrotu (ADPR)_n i związany z nim spadek zawartości NAD⁺; zahamowanie (ADPR)_nP analogami strukturalnymi amidu kwasu nikotynowego (np. benzamidem (Bz), 3-aminobenzamidem, 3-metoksybenzamidem) na ogół powoduje w uszkodzonych komórkach zaburzenia w łączeniu pęknięć nici DNA, wzrost częstości aberracji chromosomowych i spadek przeżywalności. Wydawało się celowe sprawdzenie, jaki jest związek naprawy DNA z czynnością (ADPR)_nP w komórkach LY-R i LY-S.

Obie podlinie zawierają aktywną (ADPR)_nP, w podobny sposób aktywowaną przez nacięcia nici DNA. Ryc. 4 przedstawia zależność między włączeniem [³H] NAD do komórek poddanych permeabilizacji a liczbą pęknięć nici DNA mierzonych metodą rozwijania w pH zasadowym [45]. Tworzenie pęknięć jest w tym przypadku następstwem aktywacji endogennych nukleaz, towarzy-

szącym permeabilizacji, tzn. szokiem hipotonicznym w 0° C. W komórkach LY powoduje to tak silną aktywację $(ADPR)_nP$, że uniemożliwia pomiar aktywności enzymu po wprowadzeniu dodatkowego czynnika uszkadzającego [45]. Po napromienieniu promieniowaniem gamma w środowisku ubogim w amid kwasu nikotynowego obserwuje się natomiast różnicę w zawartości NAD^+ (rys. 5a). Spada ona w komórkach LY-S do niższego poziomu niż w LY-R. Może to być wynikiem zarówno mniejszego stopnia aktywacji $(ADPR)_nP$ w komórkach LY-R, jak i większej zdolności do resyntezy NAD^+ w porównaniu z komórkami LY-S.



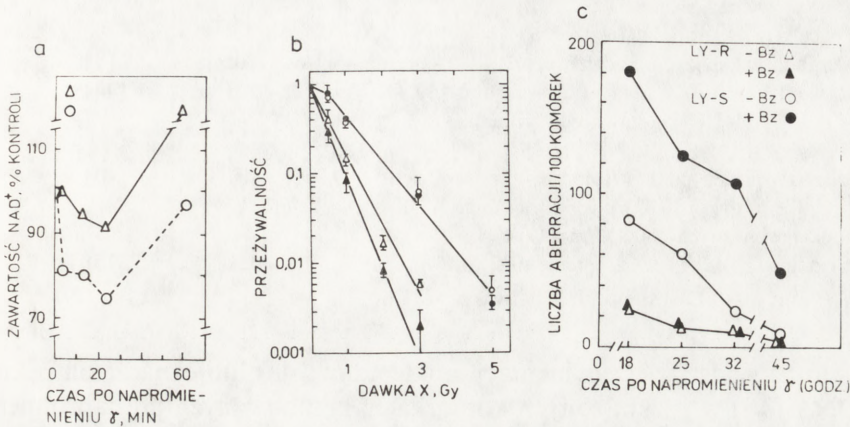
Ryc. 4. Zależność między aktywnością polimerazy poli(ADP-rybozy) mierzoną włączeniem 3H z $[^3H] NAD^+$ do permeabilizowanych (uprzepuszczalnych) komórek a liczbą pęknięć nici DNA. Pęknięcia powstają w warunkach szoku hipotonicznego w 0°C, zapewne w wyniku aktywacji nukleaz (wg [45], zmodyfikowane)

Hamowanie $(ADPR)_nP$ za pomocą 2 mM Bz uczuła na promieniowanie X tylko podlinię LY-S (rys. 5b), zwiększając jednocześnie odsetek komórek z aberracjami (rys. 5c). Naprawa DNA jest w obu podliniach spowolniona w ciągu pierwszych 20 min po napromienieniu i inkubacji w pożywce z dodatkiem Bz, jednakże działanie Bz jest znacznie silniejsze w komórkach LY-S niż LY-R [22, 41, 42].

Wyniki te można zinterpretować, biorąc pod uwagę proponowany przez Shalla [35] oraz Jamesa i Lehmana [21] mechanizm udziału $(ADPR)_nP$ w naprawie DNA. Zgodnie z tą propozycją, ADP-rybozylacja niezbędna jest do zaktywowania ligazy II, enzymu występującego w postaci latentnej w komórkach nie uszkodzonych. Ligaza I, niezbędna m.in. w replikacji półzachowawczej DNA, bierze udział w ostatnim etapie procesu naprawy z wycięciem (ryc. 2), jednakże w przypadku bardzo licznych uszkodzeń aktywowana jest ligaza II.

Można także przyjąć [31, 35, 42], że aktywacja następuje wtedy, gdy ligaza I

z jakiegoś powodu wykazuje niższą aktywność. Włączenie wówczas do procesu naprawy ligazy II następuje w znacznie większym stopniu i/lub przy niższym poziomie uszkodzeń. Tak właśnie może być w przypadku komórek LY-S, w których proces naprawy DNA po napromienieniu promieniowaniem jonizującym wydaje się silniej uzależniony od ADP-rybozylacji niż w komór-



Ryc. 5. Porównanie niektórych cech odpowiedzi komórek LY-R i LY-S na promieniowanie X lub gamma: a) zawartość NAD⁺ po napromienieniu gamma (5 Gy) i inkubacji w zbuforowanym roztworze soli z 5% surowicą bydlęcą; b) przeżywalność komórek LY napromienionych i traktowanych (▲, ●) lub nie traktowanych (Δ, ○) 2 mM benzamidem; c) całkowita liczba aberracji chromatydowych (100 komórek w populacjach komórek napromienionych (1 Gy X) i traktowanych (▲, ●) lub nie traktowanych (Δ, ○) 2 mM benzamidem; (a) i (c) zmodyfikowane wg [41]; (b) — wg [22]

kach LY-R. Dodatkowym argumentem przemawiającym za niską aktywnością ligazy I w komórkach LY-S jest uderzająca korelacja między promienioopornością i aktywnością ligazy, opisana przez Sauciera i Lavalá [34]. Ponieważ założenie to dotyczy enzymu czynnego w naprawie zarówno uszkodzeń wywołanych przez promieniowanie jonizujące, jak i nadfioletowe, należało więc zbadać związek między ADP-rybozylacją a odpowiedzią komórkową na ten ostatni typ promieniowania.

3. ODPOWIEŹ KOMÓRKOWA NA NAPROMIENIENIE PROMIENIOWANIEM NADFIOLETOWYM

Najważniejsze cechy odpowiedzi komórek LY-R i LY-S na promieniowanie UVC zestawiono w tab. 4. Podobnie jak w przypadku promieniowania X, widoczna jest zależność między wrażliwością na promieniowanie UVC a działaniem ekspozycji podzielonej i zdolnością naprawczą. Tę ostatnią

TABELA 4
Cechy odpowiedzi komórek LY na promieniowanie UVC

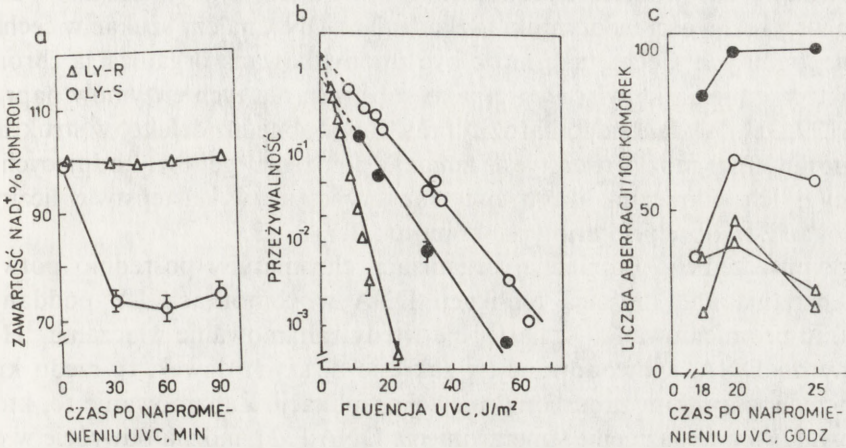
Cecha	LY-R	LY-S	Odsyłacz
Wrażliwość	wysoka	niska	
średnia ekspozycja letalna w pożywce Fischera	2,8 J/m ²	9,0 J/m ²	[44]
liczba z ekstrapolacji	1,3	1,8	
Działanie ekspozycji podzielonej	uczulające	oszczędzające	[8]
Procent komórek z aberracjami chroma- tydowymi 20h po równotoksycznej ekspozycji na UVC	30 [10J/m ²]	26 [30J/m ²]	[44]
Liczba pęknięć po 2 h inkubacji w po- żywce z araC 10 ⁻⁴ M w komórkach eksponowanych na 85J/m ² UVC	0,5/10 ⁹ [Da]	1,7/10 ⁹ Da	[40]
Uczulenie na UVC przez kofeinę 0,75 mM araC, 1-β-D-arabinozofuranosylocytozyna	nie	tak	[39,50]

oceniano na podstawie sedymentacji nukleoidów [48] lub oznaczania pęknięć nici DNA [40] w uszkodzonych komórkach, inkubowanych po napromienieniu w pożywce z araC. W komórkach zdolnych do naprawy z wycięciem swoista endonukleaza nacina nić w sąsiedztwie uszkodzenia (głównie typu dimeru pirymidynowego); wskutek hamowania polimerazycji przez araC nacięcie takie pozostaje nie naprawione i można je oznaczyć [40, 48]. Także badania sedymentacji DNA znakowanego bromodeoksyurydyną i poddanego fotolizie potwierdzają defekt endonukleazy w komórkach LY-R, eksponowanych na promieniowanie UVC [19]. Taki efekt naprawy występuje m.in. w nadwrażliwych na światło komórkach u ludzi cierpiących na xeroderma pigmentosum (XP) [28]. Ekspozycja równotoksyczna, tj. dająca zbliżoną przeżywalność powoduje uszkodzenie chromosomów w zbliżonym procencie populacji. Zestawione wyniki składają się zatem na dość spójny obraz mechanizmu wrażliwości komórek LY-R i LY-S na promieniowanie UVC.

Ponieważ (ADPR)_nP jest aktywowana przez obecność pęknięć nici DNA, można więc było w komórkach LY-R, podobnie jak w XP, przewidywać brak wpływu promieniowania UVC na zawartość NAD⁺, jak również jednakową przeżywalność i częstość aberracji chromatydowych w obecności i nieobecności benzamidu. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń potwierdziły te przewidywania (rys. 6a-c). Natomiast zdolne do naprawy z wycięciem komórki LY-S zawierały po napromienieniu UVC przejściowo mniej NAD⁺ (rys. 6a); były też uczulane traktowaniem ciągłym za pomocą 2 mM Bz zarówno na poziomie komórki (rys. 6b), jak i chromosomu (rys. 6c).

Przedstawione w poprzednim podrozdziale wyjaśnienie roli ADP-rybozylacji w naprawie uszkodzeń wywoływanych przez promieniowanie jonizujące nie jest sprzeczne z obserwacjami dotyczącymi odpowiedzi komórek LY na

promieniowanie UVC. W komórkach LY-R, wobec braku naprawy z wycięciem nukleotydu [19, 40, 44], hamowanie tego procesu nie ma znaczenia dla przeżywalności. Znajduje to odbicie w rozmiarach uszkodzeń chromosomów. W komórkach LY-S uczynione poprzednio założenie o konieczności aktywacji ligazy II znajduje zastosowanie także w przypadku naprawy uszkodzeń wywołanych przez promieniowanie UVC. Zgodnie z przedstawionym schema-



Ryc. 6. Porównanie niektórych cech odpowiedzi komórek LY-R i LY-S na promieniowanie UVC: a) zawartość NAD⁺ po ekspozycji na 15 J/m² i inkubacji w zbuforowanym roztworze soli z 5% surowicą bydlęcą; b) przeżywalność komórek LY napromienionych i traktowanych (▲, ●) lub nie traktowanych (△, ○) 2 mM benzamidem; c) całkowita liczba aberracji chromatydowych/100 komórek w populacjach komórek napromienionych (LY-R: 10 J/m²; LY-S: 30 J/m²) i traktowanych (▲, ●) lub nie traktowanych (△, ○) 2 mM benzamidem; w b) i c) — ekspozycja komórek w pożywce Fischera; zmodyfikowane według [44]

tem naprawy uszkodzeń DNA (rys. 2), ligacja jest ostatnim etapem wszystkich szlaków naprawy, wspólnym dla naprawy uszkodzeń powodowanych przez promieniowania X i UVC. Zahamowanie ADP-rybozylacji w komórkach LY-S, poddanych działaniu promieniowania UVC, będzie zatem niekorzystne dla procesu naprawy DNA i przejawia się obniżoną przeżywalnością oraz podwyższoną częstością uszkodzeń chromosomów (rys. 6b, c). Taka interpretacja wyników doświadczeń tłumaczy także, dlaczego następuje uczulanie komórek LY-S na promieniowanie UVC przez traktowanie 2 mM Bz w przeciwieństwie do innych przebadanych linii komórek zwierzęcych [21].

4. UWAGI KOŃCOWE

Krzyżowa wrażliwość na promieniowania X i UVC jest często cechą bakterii [3], natomiast krańcowo promieniowrażliwe komórki ssaków, np. pochodzące od ludzi chorych na ataxia telangiectasia, wykazują normalną

wrażliwość na promieniowanie UVC [28]. Także w komórkach XP nadwrażliwość na UVC występuje wraz z normalną promieniowrażliwością [28]. Natomiast odwrotna krzyżowa drażliwość, taka jak opisana w przypadku 2 podlinii LY, jest — jak dotychczas — wyjątkiem.

Biorąc pod uwagę powtarzalne przekształcanie się podlinii LY-R w LY-S *in vitro* [5] i brak przewagi selekcyjnej ewentualnych spontanicznych mutantów ze zmienioną aktywnością endonukleazy UV i ligazy I, wyjaśnienia podłoża różnic we drażliwości na czynniki uszkadzające DNA należy szukać w cechach bardziej ogólnych. Cechą taką może być zmodyfikowana organizacja chromatyny, która zmienia jej właściwości jako substratu dla tych enzymów naprawczych [29, 31]. Wydaje się to bardziej prawdopodobne niż defekty w strukturze enzymów. Inną możliwością jest zmiana położenia genów kodujących te enzymy i ich odmienna aktywność transkrypcyjna w następstwie licznych translokacji w obrębie kariotypu komórek LY-R [33].

Przypuszczenie o odmiennej organizacji chromatyny pośrednio potwierdzają badania nad inicjacją replikacji DNA w komórkach LY poddanych działaniu promieniowania X; następuje wtedy zahamowanie włączania ³H-tymidyny do DNA, spowodowane (w zakresie niższych dawek, tj. rzędu kilku Gy) przede wszystkim zaburzoną inicjacją replikacji. Zahamowanie to, któremu towarzyszy rozluźnienie superzwinięcia DNA [32], można odwrócić w obu podliniach za pomocą supermidyny [46], natomiast innymi czynnikami (A23187, kofeina, Bz) tylko w podlinii LY-S [43, 46]. Również zahamowanie syntezy DNA przez 15 min oraz ogrzanie w 43°C można odwrócić działaniem kofeiny tylko w komórkach LY-S [25].

W związku z tą obserwacją wydaje się istotne, że także nowobiocyna, inhibitor topoizomerazy II, hamuje inicjację, i że hamowanie to można znieść przez traktowanie kofeiną (dyskusja w [25]). Prace wskazujące na możliwy udział topoizomerazy II w naprawie pęknięć podwójnych nici DNA omawiał niedawno Collins [13]. Nie jest zatem wykluczone, że topoizomeraza II w odmienny sposób kształtuje chromatynę w komórkach LY-R i LY-S, przyczyniając się jednocześnie do sprawniejszej naprawy pęknięć podwójnych w podlinii bardziej promienioopornej.

Poszukiwania różnic w organizacji chromatyny podlinii LY trwają. Na podstawie częstości spontanicznych wymian chromatyd siostrzanych można sądzić, że replikony komórek LY-S są średnio około 3 razy mniejsze niż komórek LY-R [44], natomiast obszary superzwinięcia są zbliżone pod względem rozmiaru i udziału procentowego [47].

Takie wyjaśnienie podłoża odwrotnej krzyżowej drażliwości podlinii LY na promieniowania X i UVC należy traktować jako hipotezę roboczą, wyznaczającą kierunek dalszych badań. Jest nim określenie charakteru różnic w budowie chromatyny i ich związku ze zróżnicowaną drażliwością na czynniki uszkadzające DNA.

LITERATURA

- [1] AFANASJEV G. G., SZUMIEL I., WALICKA M., NIEPOKOJCZYCKA E., BEER J. Z., PIELEWINA I., Reakcja pokojaścischa kletok L5178Y-S i L5178Y-R, različajuścischa po radiočuvstviteľnosti na oblućenije i vozdejstvije oksimočeviny, *Radiobiologija*, **22**: 81–85, 1981.
- [2] ALEXANDER P., MIKULSKI Z. B., Mouse lymphoma cells with different radiosensitivities, *Nature*, **192**: 572–573, 1961.
- [3] ALPER T., *Cellular Radiobiology*, Cambridge University Press London 1979, str. 52.
- [4] ALTHAUS F. R., RICHTER C., ADP-ribosylation of proteins: enzymology and biological significance, Springer Verlag, Berlin 1987.
- [5] BEER J. Z., BUDZICKA E., NIEPOKOJCZYCKA E., ROSIEK O., SZUMIEL I., WALICKA M., Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during in vitro growth of L5178Y murine lymphoma cells. *Cancer Res.*, **43**: 4736–4742, 1983.
- [6] BEER J. Z., KAPISZEWSKA M., Effects of hyperthermia and radiation in two L5178Y cell lines with different efficiencies of DNA repair, *Natl. Cancer Inst. Monographs*, **61**: 115–117, 1981.
- [7] BEER J. Z., MENCL J., HORNG M. F., GREGG E. C., EVANS H. H., Effects of low dose rate (0.003–0.025 Gy/h) chronic X-irradiation on radioresistant and radiosensitive L5178Y mouse lymphoma cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, **48**: 609–619, 1985.
- [8] BEER J. Z., SZUMIEL I., WALICKA M., Cross-sensitivities to UV-light and X-rays of two strains of murine lymphoma L5178Y cells in vitro, *Studia biophys.*, **36/37**: 175–182, 1973.
- [9] BOCIAN E., BOUŻYK E., ZIEMBA-ŻÓŁTOWSKA B., ROSIEK O., Chromosomal aberrations induced by X-rays in two mouse lymphoma (L5178Y) sublines of different sensitivity, *Int. J. Radiat. Biol.*, **42**: 347–351, 1982.
- [10] BOUŻYK E., ROSIEK O., dane nieopublikowane.
- [11] BUDZICKA E., NIEPOKOJCZYCKA E., SZUMIEL I., Action of misonidasole on L5178Y-R and L5178Y-S cells. I. Comparison with antimycin A and potassium cyanide under aerobic conditions, *Neoplasma*, **28**: 423–433, 1981.
- [12] BUDZICKA E., NIEPOKOJCZYCKA E., SZUMIEL I., ŻERNIK-KOBAC M., Radiosensitivity and sensitivity to drugs of colchicine-resistant variations of L5178Y lymphoma cells, *Nukleonika*, **30**: 1–16, 1985.
- [13] COLLINS A., Cellular responses to ionizing radiation: effects of interrupting DNA repair with chemical agents. *Int. J. Radiat. Biol.*, **51**: 971–983, 1987.
- [14] CLEAVER J. E., MORGAN W. F., Poly (ADP-ribose) synthesis is involved in the toxic effects of alkylating agents but does not regulate DNA repair. *Mutat. Res.*, **150**: 69–76, 1985.
- [15] EVANS H. H., HORNG M. F., MENCL J., GLAZIER K. G., BEER J. Z., The influence of dose rate on the lethal and mutagenic effects of ionizing radiation in two strains of L5178Y cells differing in radiation sensitivity, *Int. J. Radiat. Biol.*, **47**: 553–562, 1985.
- [16] EVANS H. H., HORNG M. F., BEER J. Z., Lethal and mutagenic effects of radiation and alkylating agents on two strains of mouse L5178Y cells, *Mutat. Res.*, **161**: 91–97, 1986.
- [17] FISCHER G. A., Studies of the culture of leukemic cells in vitro, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**: 673–680, 1958.
- [18] GOLDENBERG G. J., ALEXANDER P., The effect of nitrogen mustard and dimethyl myleran on murine leukemia cell lines of different radiosensitivity in vitro, *Cancer Res.*, **25**: 1401–1409, 1965.
- [19] HAGAN M. P., DODGEN D. P., BEER J. Z., Impaired repair of UVC-induced DNA damage in L5178Y-R cells: sedimentation studies with the use of 5'-bromodeoxyuridine photolysis. *Photochem. Photobiol.*, **47**: 815–821, 1988.

- [20] HITCHINS V. M., BEER J. Z., STRICKLAND A. G., OLVEY K. M., Lethal and mutagenic effects of UVA radiation in six strains of L5178Y mouse lymphoma cells, Seminar on human exposure to ultraviolet radiation: risks and regulations, Amsterdam 1987.
- [21] JAMES M. R., LEHMANN A. R., Role of poly (adenosine diphosphate ribose) in deoxyribonucleic acid repair in human fibroblasts, *Biochemistry*, **21**: 4007-4014, 1982.
- [22] JOHANSON K. J., SUNDELL-BERGMAN S., SZUMIEL I., WŁODEK D., Effects of irradiation and inhibition of adenosine diphosphate ribosyl transferase in radiation sensitive and resistant mouse lymphoma (L5178Y) cells, *Acta Radiol. Oncol.*, **24**: 451-457, 1985.
- [23] JOHANSON K. J., WŁODEK D., SZUMIEL I., DNA repair and replication in radiation-sensitive and -resistant mouse lymphoma cells γ -irradiated under aerobic and hypoxic conditions, *Int. J. Radiat. Biol.*, **41**: 261-270, 1982.
- [24] JOHANSON K. J., WŁODEK D., SZUMIEL I., Effect of ionizing radiation and low temperature on L5178Y-R and L5178Y-S cells: DNA synthesis and distribution in the cell cycle, *Nukleonika*, **32**: 87-105, 1987.
- [25] KAPISZEWSKA M., SZUMIEL I., WŁODEK D., Heat-induced inhibition of DNA synthesis in L5178Y-S cells is reversed by caffeine, *Exptl. Cell Res.*, **160**: 236-239, 1985.
- [26] KLECZKOWSKA H., SCHELL J., SZUMIEL I., WŁODEK D., Additive effects of trifluoperazine or novobiocin and UVC radiation in L5178Y cells. *Nukleonika*, **31**: 119-135, 1986.
- [27] KÖRNER I., WALICKA M., MALZ W., BEER J. Z., DNA repair in two L5178Y cell lines with different X-ray sensitivities, *Studia biophys.*, **61**: 141-149, 1977.
- [28] LEHMANN A. R., Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and ataxia telangiectasia: disorders relating DNA repair to carcinogenesis. *Cancer Surveys*, **1**: 93-118, 1982.
- [29] MORTELMANS K., FRIEDBERG E. C., SLOR H., THOMAS G., CLEAVER J. E., Defective thymine dimer excision by cell-free extracts of xeroderma pigmentosum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 2757-2761, 1976.
- [30] NIEPOKOJCZYCKA E., SZUMIEL I., WALICKA M., Action of misonidazole on L5178Y-R and L5178Y-S cells. II. Cytotoxicity and radiosensitization under hypoxic conditions, *Neoplasma*, **28**: 435-440, 1981.
- [31] OHASHI Y., UEDA K., KAWAICHI M., HAYAISHI O., Activation of DNA ligase by poly (ADP-ribose) in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**: 3604-3607, 1983.
- [32] PAINTER R. B., Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **49**: 771-781, 1986.
- [33] ROSIEK O., dane nieopublikowane.
- [34] SAUCIER J. M., LAVAL F., DNA ligase activity in crude extracts of fibroblasts and lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**: 657-662, 1983.
- [35] SHALL S., ADP-ribose in DNA-repair: a new component of excision repair. *Adv. Radiat. Biol.*, **11**: 1-69, 1984.
- [36] SZUMIEL I., Response of two strains of L5178Y cells to cis-dichlorobis(cyclopentylamine)-platinum (II). I. Cross-sensitivity to cis-PAD and UV light, *Chem. Biol. Interactions*, **24**: 51-72, 1979.
- [37] SZUMIEL I., BUDZICKA E., NIEPOKOJCZYCKA E., WŁODEK D., BEER J. Z., The response of L5178Y-R and L5178Y-S cells to X-rays under oxic and hypoxic conditions, *Radiat. Res.*, **87**: 592-601, 1981.
- [38] SZUMIEL I., WALICKA M., Cytotoxicity and the effect of combined treatment with X-rays of an anticancer 1-nitro-9-aminoacridine derivative in L5178Y-R and L5178Y-S cells, *Neoplasma*, **27**: 697-702, 1980.
- [39] SZUMIEL I., WŁODEK D., Effect of caffeine on DNA synthesis in L5178Y cells treated with an antitumor platinum complex or UV-light, *Nukleonika*, **23**: 865-871, 1978.
- [40] SZUMIEL I., WŁODEK D., JOHANSON K. J., Impaired repair of UVC-induced DNA

damage in L5178Y-R cells: alkaline unwinding studies with the use of l- β -D-arabinofuranosyl cytosine. *Photochem. Photobiol.*, **48**: 201–204, 1988.

- [41] – Differential effect of benzamide on the frequency of chromatid aberrations and NAD⁺ content in X-irradiated L5178Y-R and L5178Y-S cells. *Acta Radiol., Oncol.*, w druku.
- [42] – Differential effect of benzamide on repair deficient and proficient strains of L5178Y lymphoblasts exposed to UVC or X radiations, *Proc. 8th Symposium on ADP-ribosylation*, Fort Worth 1987, w druku.
- [43] SZUMIEL I., WŁODEK D., LUSTYIK G., Ion content and the response of L5178Y-R and L5178Y-S cells to X-rays and ionophore A23187, *Radiat. Environ. Biophys.*, **23**: 255–267, 1984.
- [44] SZUMIEL I., WŁODEK D., JOHANSON K. J., NIEPOKOJCZYCKA E., Differential effect of benzamide on the response of L5178Y-R and L5178Y-S cells to UVC irradiation, *J. Photochem. Photobiol.*, złożone do druku.
- [45] SZUMIEL I., WŁODEK D., JOHANSON K. J., SUNDELL-BERGMAN S., ADP-ribosylation and post-irradiation cellular recovery in two strains of L5178Y cells, *Br. J. Cancer (Suppl. VI)*, **49**: 33–38, 1984.
- [46] SZUMIEL I., WŁODEK D., ŻERNIK M., SZABO G., Contribution of ADP-ribosylation to cellular recovery of L5178Y-R and L5178Y-S lymphoblasts, *Proceedings of the IAEA-WHO International Symposium on the Biological Effects of Low-level Radiation*, Wenecja, IAEA, Wiedeń, 1983, 427–434.
- [47] WALICKA M., dane niepublikowane.
- [48] WALICKA M., GODLEWSKA E., KLECZKOWSKA H., Effect of UVC and araC on L5178Y-R and L5178Y-S cells. Nucleoid sedimentation, *Acta Biochim. Polon.*, **34**: 345–355, 1987.
- [49] WALICKA M., KÖRNER I. J., MALZ W., Survival and DNA single strand break rejoining in L5178Y-R and L5178Y-S cells after neutron irradiation. *Studia biophys.*, **76**: 49–50, 1979.
- [50] WALICKA M., KÖRNER I., MALZ W., BEER J. Z., The effect of caffeine on post-replication repair and survival in two L5178Y cell lines with different sensitivities to UV irradiation. *Mutat. Res.*, **52**: 265–272, 1978.
- [51] WŁODEK D., HITTELMAN W. N., The repair of double strand DNA breaks correlations with radiosensitivity of L5178Y-S and L5178Y-R cells. *Radiat. Res.*, **112**: 146–155, 1987.
- [52] WŁODEK D., dane niepublikowane.

Adres autorki: ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa.

Nadeszło: 8 kwietnia 1988.

Przyjęto: 2 maja 1988.

TROMBOMODULINA – KOFAKTOR ŚRÓDBŁONKOWY BIAŁKA C, JEJ WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE I ROLA W PROCESIE HEMOSTAZY

THROMBOMODULIN – ENDOTHELIAL COFACTOR OF PROTEIN C,
ITS BIOCHEMICAL PROPERTIES AND ROLE IN HEMOSTASIS

Anna DMOSZYŃSKA-GIANNOPOULOU

Klinika Hematologii, Instytut Chorób Wewnętrznych AM, Lublin

Streszczenie. System aktywacji białka C jest uważany za naturalny mechanizm kontrolujący krzepnięcie krwi. Kluczową rolę w aktywacji białka C odgrywa jego śródbłonkowy kofaktor – trombomodulina. Trombomodulina tworzy kompleks z trombiną, zmieniając dramatycznie jej właściwości enzymu prokoagulacyjnego na właściwości antykoagulacyjne. Główną czynnością kompleksu trombina–trombomodulina jest aktywacja białka C–wybiórczego inhibitora aktywnych czynników V i VIII. Kompleks ten hamuje równocześnie wszystkie czynności prokoagulacyjne trombiny, takie jak: zdolność do rozczepiania fibrynogenu, agregację krwinek płytkowych, aktywację czynników V i XIII oraz aktywność samej trombiny, neutralizując ją w obecności AT III. Układ białko C – trombomodulina jest oprócz układu AT III – heparyna głównym systemem zabezpieczającym organizm przed wewnątrznaczyniowym wykrzepianiem. Znajomość mechanizmu działania tego układu pozwala lepiej zrozumieć proces krzepnięcia krwi.

Summary. The protein C activation system may be considered a natural mechanism for the control of blood coagulation. Thrombomodulin its endothelial cofactor acts in this system to alter the physiologic function of thrombin by neutralizing the procoagulant functions of thrombin and initiating an anticoagulant response through the activation of protein C. The second anticoagulant effect of thrombomodulin depends on polysaccharide chain covalently bound to a polypeptide chain and appears as a rapid antitrombin activity. Thrombomodulin – protein C system offers new experimental approaches to understanding the control of complex process of blood coagulation.

W warunkach fizjologicznych aktywacji krzepnięcia osoczonego zapobiegają różne, na poszczególnych etapach, mechanizmy unieczynnijające aktywne białka krzepnięcia. Jednym z głównych układów antykoagulacyjnych jest układ trombomodulina – białko C [8]. Białko C różni się od innych inhibitorów proteaz tym, że do wykazania swej czynności antykoagulacyjnej

musi być aktywowane. Proces aktywacji białka C jest złożony i wymaga obecności kofaktorów zlokalizowanych na powierzchni śródbłonna [6, 17, 43].

W 1976 r. Stenflo [40] opisał strukturę zwierzęcego białka C, które jest witaminowo-K-zależną glikoproteiną o c.c.z. ok. 62000 i składa się z łańcucha ciężkiego o c.c.z. 41000 i lekkiego o c.c.z. 21000, połączonych pojedynczym mostkiem dwusiarczkowym. Ludzkie białko C zostało wyizolowane przez Kisiela [29] i wykazuje podobną strukturę do białka zwierzęcego. Jego stężenie we krwi wynosi 4 $\mu\text{g/ml}$. Trombina jest jedynym fizjologicznym aktywatorem białka C, którego aktywacja dokonuje się przez odszczepienie małego peptydu (12 reszt) z końcowej części aminokwasowej łańcucha ciężkiego [18]. Zarówno zymogen, jak i aktywny enzym zachowują budowę dwułańcuchową. W obu łańcuchach białka C stwierdza się obecność reszt karboksylowych kwasu γ -glutaminowego, które uważane są za miejsca wiążące wapń, umożliwiające wiązanie z błonami powierzchniowymi [41]. Oba łańcuchy mogą więc wykazywać interakcję z białkami powierzchniowymi [14, 17]. Antykoagulacyjne właściwości białka C wyrażają się inaktywacją aktywnych czynników osoczowych V i VIII [13, 22, 31, 42] oraz wzmaganiem fibrynolizy przez hamowanie inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu [2, 9, 23]. Dokładniej białko C i jego czynności opisano w pracy [14].

W 1981 r. Esmon i Owen z Uniwersytetu w Oklahomie [15] wykryli zlokalizowany na powierzchni śródbłonna naczyniowego kofaktor dla trombinozależnej aktywacji białka C. Kofaktor ten został nazwany przez odkrywców trombomoduliną. Trombomodulina wykazuje wysokie powinowactwo do trombiny, tworząc z nią stechiometryczny kompleks. Rezultatem utworzenia tego kompleksu jest przynajmniej 1000-krotne przyspieszenie aktywacji białka C [17].

Trombomodulina była pierwotnie wyizolowana z płuc królika [15], a następnie Salem i wsp. [39] dokonali oczyszczenia tego białka z ludzkiego łożyska. Proces otrzymywania trombomoduliny polega na sporządzaniu detergentowych wyciągów tkanki płucnej lub łożyska i następowym oczyszczeniu przez sączenie w żelach molekularnych (DEAE – Sepharose lub Phenyl – Sepharose). Końcowy etap oczyszczania to chromatografia wysokiego powinowactwa przy użyciu trombiny unieruchomionej na Bio-Gelu 1,5 M lub agarozie. Uzyskane tą techniką preparaty wykazują bardzo wysoką aktywność specyficzną, wynoszącą od 800 do 1500 j.m./mg.

Trombomodulina jest jednołańcuchowym białkiem o c.c.z. od 68000 do 88000 (zwierzęce mają niższy ciężar). Jest to białko bardzo kwaśne (pH 4,2), co sugeruje, że może być połączona z heparynopodobnymi polisacharydami. Za taką możliwością przemawia jej duża wrażliwość na heparynazę [10] oraz zdolność do przyspieszania inaktywacji trombiny przez antytrombinę III (AT III) [7]. Trombomodulina jest białkiem niezwykle opornym na denaturację przez: gotowanie, dodanie 1% roztworu siarczanu dodecyłu czy inkubowanie z

6M guanidyną [21, 39]. Aktywność jej można zneutralizować przez trawienie pepsyną lub β -merkaptopuryną [3, 4]. Wskazuje to, że aktywność biologiczna jest związana z drugorzędową strukturą tego białka.

Maruyama i wsp. [32, 33] stosując poliklonalne przeciwciała przeciwko ludzkiej trombomodulinie wykryli jej obecność w śródbłonku naczyń tętniczych, żylnych, limfatycznych oraz syncytiotrofoblastie łożyskowym. Lokalizacja ta potwierdza jej czynność kofaktora aktywacji białka C, które jako jeden z głównych antykoagulantów podtrzymuje płynność krwi. Również jej obecność w naczyniach limfatycznych jest ważna z punktu widzenia fizjologii. Wiadomo bowiem, że chłonka zawiera czynniki krzepnięcia, a zatem obecność trombomoduliny może zapewniać płynność chłonki [6]. Również syncytiotrofoblast łożyskowy, będąc eksponowany na dosyć wolny przepływ krwi, mógłby być miejscem aktywacji krzepnięcia, ale obecność trombomoduliny w zatokach krążenia macicznego przeciwdziała takiej możliwości [32]. Można również wysunąć przypuszczenie, że trombomodulina odgrywa rolę w zaburzeniach czynności łożyska prowadzących do nawracających poronień, aczkolwiek – z uwagi na złożone podłoże genetyczne tych zaburzeń – jest to jedynie sugestia.

De Bault i Esmonowie [11, 12] za pomocą techniki immunofluorescencji określili umiejscowienie i wysycenie trombomoduliną różnych tkanek i narządów, stwierdzając ją w śródbłonku naczyń dużych i małych wszystkich tkanek i narządów z wyjątkiem mięśni gładkich i komórek tkanki łącznej. Mięszsz narządów wewnętrznych, pozbawiony naczyń, nie wykazywał obecności trombomoduliny. W związku z tym autorzy ci postulują, aby uznać trombomodulinę markerem identyfikującym komórki śródbłonka. Uważają oni m.in., że komórki łożyska, które zawierają dwa charakterystyczne dla śródbłonka antygeny: czynnik von Willebranda i trombomodulinę, są komórkami endotelialnymi mimo ich znanej czynności endokrynej. Problem dystrybucji trombomoduliny był również przedmiotem badań Ishii i wsp. z Uniwersytetu w Waszyngtonie [26], którzy potwierdzili jej wszechobecność w śródbłonku naczyniowym. Nie stwierdzili jednak obecności trombomoduliny w śródbłonku naczyń mózgowych (z wyjątkiem tętnicy szyjnej i podstawnej). Brak trombomoduliny w naczyniach mózgowych tłumaczą oni odmienną czynnością tego śródbłonka, wyrażającą się m.in. różną zawartością enzymów, jonów Na^+ i K^+ od pozostałej części wyściółki naczyniowej. Autorzy ci sugerują, że brak trombomoduliny może zabezpieczać ustrój przed krwotokami wewnątrzczaszkowymi.

W 1985 r. Ishii i Majerus [25] stosując chromatografię wysokiego powinowactwa z użyciem przeciwciał poliklonalnych przeciwko ludzkiej trombomodulinie, unieruchomionych w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarczanu dodecyłu, wyizolowali z osocza i moczu ludzkiego rozpuszczalne postaci trombomoduliny. Cząsteczki rozpuszczalnej trombomoduliny są mniejsze niż

komórkowej (c.c.z. 54000 i 63000). Autorzy ci określili stężenie trombomoduliny w osoczu i w moczu, które wynosi odpowiednio 292 ± 60 i 102 ± 38 ng/ml. Obecność rozpuszczalnych postaci można wyjaśnić, dwojako:

1) wytwarzaniem przez odrębne komórki sekrecyjne i wydzielaniem do krwi;

2) proteolizą z błony komórki śródbłonkowej.

Za tą drugą koncepcją przemawia obserwacja, iż podobne peptydy można uzyskać przez traktowanie elastazą łożyskowej trombomoduliny. Obliczono, że człowiek ma $6 \cdot 10^{13}$ komórek endotelialnych i że zawartość trombomoduliny wynosi ok. 40000 cząsteczek na 1 komórkę, a zatem całkowita zawartość trombomoduliny wynosiłaby ok. 300 mg, a zawartość postaci krążącej 0,8 mg ($0,3 \mu\text{g/ml} \times 2600 \text{ ml osocza}$). Jest to oczywiście obliczenie przybliżone, gdyż są trudności w pomiarze frakcji rozpuszczalnej z uwagi na obecność inhibitorów.

Wielu badaczy usiłowało zidentyfikować region trombiny, który odpowiada za wiązanie trombomoduliny. W 1986 r. Hofsteenge i wsp. [24] badając wpływ trombomoduliny na kinetykę interakcji trombiny z jej substratami i inhibitorami wykazali, że enzymatyczne właściwości kompleksu trombina-trombomodulina są zbliżone do proteolitycznie zdegradowanych form trombiny (β i γ). Formy te uzyskuje się przez autodegradację lub trypsynolizę, a ich aktywność amidolityczna i kinetyka inaktywacji jest zbliżona do natywnej α -trombiny. W odróżnieniu jednak od postaci natywnej postaci zdegradowane nie rozczepiają fibrynogenu i wykazują niskie powinowactwo do hirudyny. Te podobieństwa enzymatyczne wskazują, że region β lub γ trombiny może być miejscem wiązania trombomoduliny. Ci sami autorzy wykazali również, że trombina w kompleksie z trombomoduliną jest 8 razy szybciej inaktywowana przez AT III niż wolna trombina.

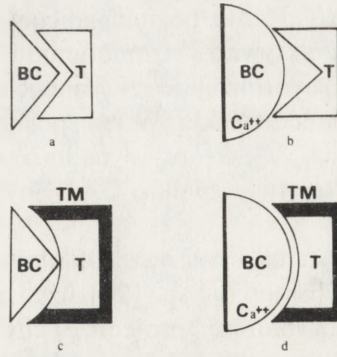
Najlepiej poznaną czynnością kompleksu trombina-trombomodulina jest aktywacja białka C. Okazało się jednak, że trombomodulina nie jest wyłącznym kofaktorem białka C. W 1983 r. Salem i wsp. [38] stwierdzili że lekki łańcuch czynnika Va (aktywowanego przez trombinę) jest w stanie przyspieszać aktywację białka C przez trombinę. Efekt ten jest mniejszy niż w obecności trombomoduliny. Istnieją jednak pewne różnice tych dróg aktywacji białka C. Aktywacja przez łańcuchy lekkie czynnika Va zachodzi jedynie w obecności reszt karboksylowych kwasu γ -glutamylowego (GLA-domain), a jak wiadomo reszty te są miejscem wiązania jonów wapnia. Okazało się jednak, że do rozpoznania regionu białka C, zawierającego reszty GLA przez łańcuchy lekkie czynnika Va, obecność jonów wapnia nie jest konieczna. Związanie reszt GLA jonami wapnia blokuje aktywację białka C przez łańcuchy lekkie Va [35]. Równocześnie wiadomo, że jony Ca^{++} są niezbędne do aktywacji białka C przez kompleks trombina-trombomodulina. Te wyraźne różnice w aktywacji białka C rodzą pytanie, czy te dwa systemy mogą działać synergistycznie. Salem i wsp. [37] usiłują wyjaśnić te sprzeczności i postulują następujący

mechanizm aktywacji białka C. Niski poziom łańcuchów lekkich lub nieaktywny czynnik V stymulują aktywność trombomoduliny i w konsekwencji białka C. Aktywne białko C hydrolizuje ciężki łańcuch czynnika V, pozostawiając niejako z tyłu wolny łańcuch lekki. W ten sposób dochodzi do wzrostu zawartości łańcuchów lekkich V_a , które w nadmiarze hamują aktywność trombomoduliny, a w następstwie białka C. Byłby to więc mechanizm sprzężenia zwrotnego.

W celu dokładniejszego ustalenia roli reszt GLA w ujawnianiu aktywności antykoagulacyjnej białka C Esmon i wsp. [20] użyli następującego modelu doświadczalnego. Stosując wybiórczą proteolizę chymotrypsyną łańcucha lekkiego białka C, pozbawili go reszt GLA. Uzyskane w ten sposób białko nazwali GD-PC (GLA domainless protein C). GD-PC jest idealnym substratem do badania roli reszt GLA w aktywacji białka C. GD-PC może być aktywowane przez trombinę i wykazuje pełną aktywność proteazową, lecz nie wykazuje aktywności antykoagulacyjnej. Wydawać by się mogło, że do aktywacji pozbawionej reszt GLA cząsteczki białka C obecność jonów wapnia nie będzie konieczna (brak miejsc wiążących Ca^{++}), ale okazało się, iż obecność Ca^{++} jest niezbędna, gdyż GD-PC wykazuje taką samą kinetykę aktywacji jak pełne białko C. Jediną różnicą jest to, że maksymalna aktywacja GD-PC zachodzi przy stężeniu $50 \mu M Ca^{++}$, a pełnej proteiny C przy $250 \mu M Ca^{++}$. Dane te wskazują, że istnieje drugie GLA-niezależne miejsce wiążące Ca^{++} na cząsteczce białka C. Jony Ca^{++} są więc niezbędne do aktywacji białka C przez kompleks trombina-trombomodulina, ale w przypadku braku trombomoduliny jony te hamują aktywację białka C. Amphlett i wsp. [1] donieśli o hamującym wpływie jonów metali (Mn^{++} , Sr^{++} i Mg^{++}) na aktywację białka C przez kompleks trombina-trombomodulina. Właściwości hamujące jonów metali korelują ze zdolnością tych jonów do zastępowania jonów Ca^{++} w kompleksie białko C- Ca^{++} . Według tych autorów efekt hamujący jonów metali polega na zastąpieniu miejsc wiążących jony Ca^{++} w cząsteczce białka C. Opierając się na tych spostrzeżeniach Johnson i wsp. [28] zaproponowali model aktywacji białka C, który wyjaśnia udział jonów Ca^{++} (ryc. 1).

Białko C łatwo łączy się z receptorem trombinowym, jeśli brak jonów Ca^{++} (a), dostępność Ca^{++} prowadzi do zmian konformacyjnych cząsteczki białka C (b) oraz białko C nie może dostosować się do miejsca aktywnego kompleksu trombina-trombomodulina (c) do chwili, gdy miejsca wiążące jony metali nie zostaną zastąpione jonami Ca^{++} .

Kolejne właściwości trombomoduliny to jej działanie antytrombinowe poprzez wzmacnianie działania antytrombiny III (AT III) [7]. Ta jej właściwość wskazuje na zawartość w jej cząsteczce struktur heparynopodobnych. Aby przekonać się, czy tak jest istotnie, wykonano doświadczenia z użyciem związków o działaniu antyheparynowym: polibrenem, siarczanem protaminy i izolowanym z płytek krwi białkiem o działaniu neutralizującym heparynę (PF 4).

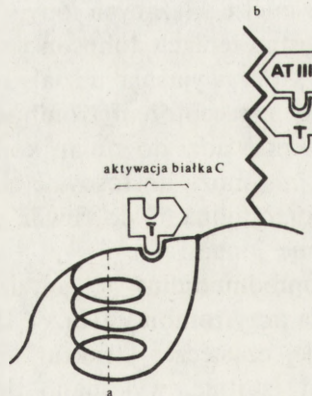


Ryc. 1. Aktywacja białka C (BC) przez kompleks trombina (T) – trombomodulina (TM) w obecności jonów Ca^{++} wg Johnsona i wsp. [28]

Każdy z tych związków dodany do układu trombina – trombomodulina w obecności AT III hamuje całkowicie zdolność tej ostatniej do unieczynniania kompleksu trombina – trombomodulina. A zatem złączony z cząsteczką trombomoduliny pojedynczy łańcuch wielocukrowy (siarczanu heparanu?) mógłby być miejscem wiązania trombiny i odpowiadać ze jej interakcją z AT III [5].

Siarczany heparanu stanowią heterogenną rodzinę proteoglikanów z różnymi nośnikami białkowymi i trombomodulina może być jednym z nich. Oczywiście nie wyklucza to istnienia trombomoduliny, której brak łańcucha heparynowego. Znany już np. receptor transferyny występuje w niektórych komórkach jako proteoglikan (np. w fibroblastach), a w innych komórkach bez łańcucha polisacharydowego (ct. za [4]). W świetle przytoczonych danych model strukturalny cząsteczki trombomoduliny przedstawia ryc. 2.

Wiązanie trombiny do łańcucha wielocukrowego może odbywać się zarówno w obecności, jak i nieobecności AT III. Przy braku AT III efektem



Ryc. 2. Hipotetyczna struktura trombomoduliny: a – łańcuch polisacharydowy, T – trombina. ATIII – antytrombina III

związania trombomoduliny z łańcuchem wielocukrowym trombomoduliny będzie hamowanie zdolności trombiny do rozczepiania fibrynogenu [27]. Przyłączenie AT III do tego samego łańcucha bardzo przyspiesza inaktywację trombiny [5].

Można przypuszczać, że skoro trombomodulina zmienia właściwości katalityczne trombiny, to poza wymienionymi już właściwościami kompleks trombina-trombomodulina powinien hamować aktywację krwinek płytkowych wywołaną trombiną. Esmon i wsp. [19] donieśli, że trombina w kompleksie z trombomoduliną nie wywołuje agregacji ani reakcji uwolnienia krwinek płytkowych oraz nie jest w stanie związać się z powierzchnią krwinki płytkowej. Jeśli natomiast trombina jest związana z receptorem płytkowym, to w obecności trombomoduliny traci powinowactwo do powierzchni błony płytkowej i rozmieszcza się na trombomodulinie, hamując jednocześnie aktywację płytek. Hamowaniu podlegają tylko czynności zależne od trombiny, gdyż np. agregacja płytek wywołana ADP czy kolagenem przebiega prawidłowo.

Jeszcze jedną właściwość trombomoduliny opisali Polgar i wsp. [36] wykazując, że hamuje ona konwersję XIII czynnika krzepnięcia (cz. stabilizującego włóknik) w aktywną transglutaminazę (XIIIa). Przejście czynnika XIII w enzymatycznie czynną postać XIIIa odbywa się przy współdziałaniu trombiny. W tabeli zestawiono właściwości biologiczne trombiny w porównaniu z kompleksem trombina-trombomodulina.

Bardzo ciekawe wyniki przedstawili Marayama i wsp. [34]. Autorzy ci wykazali, że ekspozycja komórek śródbłonna na trombinę powoduje związanie

TABELA

Porównanie czynności trombiny i kompleksu trombina-trombomodulina

Czynność	Trombina	Trombina + trombomodulina
Aktywacja białka C Czynnik V	wolna aktywacja	bardzo szybka inaktywacja i hamowanie aktywacji
Czynnik VIII	aktywacja	hamowanie aktywacji (słabe)
Agregacja płytek i reakcja uwolnienia	wzmózona	zahamowana
Transformacja cz. XIII Antytrombina III	wzmózona inaktywacja	zahamowana wzmózenie inaktywacji
Jony Ca^{++}	hamują aktywację białka C	wzmagają aktywację białka C
Fibronogen Tkankowy aktywator plazminogenu	rozczepianie inaktywuje	brak rozczepiania aktywuje przez hamowanie inhibitora tkankowego akty- watora plazminogenu

jej z obecną na powierzchni komórek śródbłonka trombomoduliną z następową endocytozą tego kompleksu. Trombina już wewnątrzkomórkowo ulega dalszej degradacji do różnej wielkości peptydów, a trombomodulina wraca na powierzchnię komórki. Endocytoza kompleksu trombina-trombomodulina następuje po uprzedniej aktywacji białka C przez ten kompleks. Ten udział trombomoduliny w klirensie trombiny może być bardzo istotny w regulowaniu aktywacji białka C.

Reasumując, interakcja trombiny z trombomoduliną dramatycznie zmienia właściwości trombiny, przekształcając enzym o właściwościach prokoagulacyjnych w enzym antykoagulacyjny. Główna czynność antykoagulacyjna kompleksu polega na aktywowaniu białka C, wybiórczego inhibitora aktywnych czynników osoczowych V i VIII. Ponadto kompleks ten hamuje rozczepianie fibrynogenu [27] i aktywację czynnika V przez trombinę [16], aktywację krwinek płytkowych [19] i przekształcanie czynnika XIII w XIIIa [36]. Oddzielną czynnością antykoagulacyjną związaną z obecnością w cząsteczce trombomoduliny łańcucha polisacharydowego jest przyspieszenie inaktywacji trombiny przez AT III [30].

Są wątpliwości odnośnie mechanizmu działania trombomoduliny samej i w kompleksie z trombiną, ale można mieć nadzieję, że nowe możliwości badawcze, jakie stworzyło wykrycie postaci rozpuszczalnych [25] oraz metody jej oznaczania *in vivo* przyczynią się do wyjaśnienia udziału tego białka w złożonym procesie hemostazy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AMPHLETT G. W., KISIEL W., CASTELLINO F. J., Interaction of calcium with bovine plasma protein C, *Biochemistry*, **20**: 2156-2161, 1981.
- [2] BERTINA R. M., van HINSBERGH V. W. M., EMEIS S. J., van WIJNGAARDON A., Inhibition of tissue-type plasminogen activator inhibitor activity by activated protein C, *Circulation*, **70**: 34 (abstract), 1984.
- [3] BOFFA M. C., BOURIN M. C., DMOSZYŃSKA A., MACHOVICH R., Bovine proteine C cofactor activity separated from other thrombomodulin effects *Circulation*, **70**: II-53 (abstract), 1984.
- [4] BOURIN M. C., BJORK J., BOFFA M. C., LINDAHL U., Effect of the rabbit thrombomodulin on the inhibition of thrombin by antithrombin in presence of exogenous heparine: role of the acidic domain of thrombomodulin, XIth Congress Thrombosis and Haemostasis, Brussels 7-14 July 1987.
- [5] —, Is thrombomodulin a heparan sulphate proteoglycan? *Biochem. J.*, w druku.
- [6] BRIET E., ENGESSER L., BROMMER E. J. P., Regulation of the blood coagulation and thrombosis, *Haemostasis*, **15**: 228-232, 1985.
- [7] BUSCH C. P., OWEN W., Identification *in vitro* of an endothelial cell surface cofactor for antithrombin III, *J. Clin. Invest.*, **63**: 726-729, 1982.
- [8] CLOUSE L. H., COMP P. C., The regulation of hemostasis. The protein C system, *N. Eng. J. Med.*, **314**: 1298-1301, 1986.

- [9] COMP P. C., ESMON C. T., Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs, *J. Clin. Invest.*, **68**: 1221–1228, 1981.
- [10] COMP P. C., Heparin-protein C interaction, *Nouv. Rev. Franc. Hemat.*, **26**: 239–242, 1984.
- [11] deBAULT L. E., ESMON N. L., OLSON J. R., ESMON C. T., Distribution of the thrombomodulin antigen in the rabbit vasculature, *Lab. Invest.*, **54**: 172–178, 1986.
- [12] de BAULT L. E., ESMON N. L., SMITH G. P., ESMON C. T., Localization of thrombomodulin antigen in rabbit endothelial cells in culture, *Lab. Invest.*, **54**: 179–187, 1986.
- [13] de FOUW N. J., HAVERKATE F., BERTINA R. M., KOOPMAN J., van WIJNGAARDEN A., van HINSBERGH V. W. M., Human activated protein C accelerates blood clot lysis in vitro, *Tromb. Haemost.*, **54**: 107–109, 1985.
- [14] DMOSZYŃSKA-GIANOPOULOU A., RUPNIEWSKA Z. M., Białko C-wybiórczy inhibitor krzepnięcia krwi, *Pol. Arch., Med. Wewn.*, **71**: 313–316, 1984.
- [15] ESMON C. T., OWEN W. G., Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2249–2252, 1981.
- [16] ESMON C. T., ESMON N. L., HARRIS K. W., Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin catalyzed fibrin formation and factor V activation, *J. Biol. Chem.*, **267**: 7944–7948, 1982.
- [17] ESMON C. T., ESMON N. L., SAUGSTAD J., OWEN W. G., Activation of protein C by a complex between thrombin and endothelial cell surface protein, [w:] *Pathobiology of the endothelial cell*, Academic Press, New York 1982, 121–136.
- [18] ESMON C. T., Protein C: biochemistry, physiology and clinical implications, *Blood*, **62**: 1155–1158, 1983.
- [19] ESMON N. L., CARROLL R. G., ESMON C. T., Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets, *J. Biol. Chem.*, **258**: 12238–12242, 1983.
- [20] ESMON N. L., de BAULT L. E., ESMON C. T., Proteolytic formation and properties of γ -carboxyglutamic acid domainless protein C, *J. Biol. Chem.*, **258**: 5548–5553, 1983.
- [21] ESMON C. T., The role of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation, *Blood and Vessel*, **15**: 607–615, 1984.
- [22] GUINTO E. R., ESMON C. T., Loss of prothrombin and factor Xa interactions upon inactivation of factor Va by activated protein C, *J. Biol. Chem.*, **259**: 13986–13990, 1984.
- [23] HINGBERGH V. W. M., BERTINA R. M., van WIJGAARDEN A., TILBURG N. H., EMEIS J., HAVERKATE F., Activated protein C decreases plasminogen-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium, *Blood*, **65**: 444–448, 1985.
- [24] HOFSTEENGE J., TAGUCHI H., STONE S. R., Effect of thrombomodulin on the interaction of thrombin with substrates and inhibitors, *Biochem. J.*, **237**: 243–251, 1986.
- [25] ISHII H., MAJERUS P. W., Thrombomodulin is present in human plasma and urine, *J. Clin. Invest.*, **76**: 2178–2181, 1985.
- [26] ISHII H., SALEM H. H., BELL E. C., LAPOSATA E. A., MAJERUS P. W., Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein is absent from the human brain, *Blood*, **76**: 362–365, 1986.
- [27] JAKUBOWSKI H. V., KLINE M. D., OWEN W., The effect of bovine thrombomodulin on specificity of bovine thrombin, *J. Biol. Chem.*, **261**: 3876–3882, 1986.
- [28] JOHNSON A. E., ESMON N. L., LAUE T. M., ESMON C. T., Structural changes required for activation of protein C are induced by Ca^{++} binding to a high affinity site that does not contain γ -carboxyglutamic acid., *J. Biol. Chem.*, **258**: 5554–5560, 1983.
- [29] KISIEL W., Human plasma protein C: isolation, characterization and mechanism of activation by α -thrombin, *J. Clin. Invest.*, **769**: 761–769, 1979.
- [30] MACHOVICH R., BOURIN M. C., BAMPLED J., BARBIER D., BOFFA M. C., Effect of thrombomodulin on thrombin activity, *Thromb. Haemost.*, **50**: 351–359, 1983.
- [31] MARLAR R. A., KLEISS A. J., GRIFFIN J. H., Mechanism of activation of human

- activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme, *Blood*, **59**: 1067-1070, 1982.
- [32] MARUYAMA J., BELL C. E., MAJERUS P. W., Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, lymphatics and on syncytiotrophoblast of human placenta, *J. Cell. Biol.*, **101**, 363-371, 1985.
- [33] MARUYAMA J., SALEM H. H., ISHII H., MAJERUS P. W., Human thrombomodulin is not an efficient inhibitor of the procoagulant activity of thrombin, *J. Clin. Invest.*, **75**: 987-991, 1985.
- [34] MARUYAMA J., MAJERUS P. W., The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A 549 lung cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **260**: 15432-15438, 1985.
- [35] NIXON R. R., COMP P. C., ESMON C. T., Role of GLA-domain in activated protein C, *Fed. Proc.*, **42**: 1993-1994, 1983.
- [36] POLGAR J., LERANT J., MUSZBEK L., MACHOVICH R., Thrombomodulin inhibits the activation of factor XIII by thrombin, *Thromb. Res.*, **43**: 585-590, 1986.
- [37] SALEM H. H., BROZE G. G., MILETICH J. P., MAJERUS P. W., Human coagulation factor Va is a cofactor for the activation of protein C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 1584-1588, 1983.
- [38] —, The light chain of factor Va contains the activity of factor Va that accelerates protein C activation by thrombin, *J. Biol. Chem.*, **258**: 8531-8534, 1983.
- [39] SALEM H. H., MARUYAMA J., ISHII H., MAJERUS P. W., Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta, *J. Biol. Chem.*, **259**: 12246-12251, 1984.
- [40] STENFLO J., A new vitamin K-dependent protein: purification from bovine plasma and preliminary characterization, *J. Biol. Chem.*, **251**: 335-363, 1976.
- [41] STENFLO J., FERLUND P., Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C, *J. Biol. Chem.*, **257**: 12180-12190, 1982.
- [42] SUZUKI K., STENFLO J., DAHLBACK B., TEODORSSON B., Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C, *J. Biol. Chem.*, **258**: 1914-1920, 1983.
- [43] WALKER F. J., Protein S in the regulation of activated protein C, *Sem. Thromb. Hemost.*, **10**: 131-138, 1984.

Adres autorki: ul. Jaczewskiego 8, Lublin 20-950.

Otrzymano: 13 lutego 1988 r.

Przyjęto: 13 maja 1988 r.

CHARAKTERYSTYKA ROŚLINNEGO SYSTEMU CHOLINERGICZNEGO. ACETYLOCHOLINA*

CHARACTERIZATION OF PLANT CHOLINERGIC SYSTEM. ACETYLCHOLINE

Andrzej TRETYN i Małgorzata TRETYN

Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii, Zakład Botaniki Ogólnej

Streszczenie. Stosując różne metody oczyszczania i ilościowego oznaczania, acetylocholiny wykryto w kilkudziesięciu gatunkach roślin niższych i wyższych. Obecność acetylocholiny stwierdzono we wszystkich organach roślin okrytonasiennych. Miejscami o najwyższym poziomie tej substancji są młode, rosnące części roślin. Synteza acetylocholiny u roślin zachodzi przypuszczalnie na terenie cystern endoplazmatycznego retikulum pod kontrolą systemu fitochromowego. Podobnie jak u zwierząt, w syntezie acetylocholiny u roślin uczestniczy acetylotransferaza cholinowa, natomiast jej rozkład przeprowadza acetylocholinoesteraza.

Summary. Acetylcholine was detected in tissues of several tens species of lower and higher plants. The presence of acetylcholine has been proved in all organs of angiosperms. The highest level of this substance has been found in the young growing organs of plants. The synthesis of acetylcholine in plants takes place presumably in cysternae of the endoplasmic reticulum under the control of phytochrome system. Like in animals, acetylcholine is synthesized via choline acetyltransferase, while its decomposition is catalyzed by acetylcholinesterase.

Wykaz stosowanych skrótów

- ACh — acetylocholina
AChE — acetylocholinoesteraza
ATCh — acetylotransferaza cholinowa
FR — światło dalekiej czerwieni (720 nm)
R — światło czerwone (660 nm)

* Praca powstała w trakcie badań prowadzonych w ramach RP.II.12.15.

łańcucha węglowego powoduje, że cząsteczki ACh mają właściwości detergentu [14]. Obie te właściwości ujawniają się w układach biologicznych jedynie przy wysokich stężeniach ACh [14].

2. EKSTRAKCJA, OCZYSZCZANIE I OZNACZANIE ACh

W początkowym okresie badań nad ACh u roślin substancja ta interesowała jedynie farmakologów. Wprowadzili oni wiele metod ekstrakcji ACh z tkanek roślinnych oraz metod jej oczyszczania i ilościowego oznaczania.

2.1. EKSTRAKCJA ACh

Najprostszy sposób ekstrakcji ACh polega na zalaniu roztartych tkanek wodą. Po odwirowaniu homogenatu obecność ACh w supernatancie oznaczyć można przy użyciu dowolnego biotestu [8, 28]. Do ekstrakcji omawianej substancji z materiału roślinnego stosuje się płyn Ringera [33, 34, 43, 61], metanol [2, 8, 20, 73, 74], mieszaninę 80% etanolu i 2% kwasu octowego, [21], etanol [73] oraz aceton [62]. Najczęściej ACh izoluje się z materiału roślinnego przy użyciu roztworów kwasów: nadchlorowego [22, 53, 68], solnego [62], mrówkowego [29] oraz mieszaniny kwasu mrówkowego z acetonem [29, 30, 71] lub acetonitrylem [40].

Bardzo trudno przeprowadza się izolację ACh, gdy dysponuje się małymi próbkami materiału biologicznego. W tym wypadku stosuje się różnego typu związki chemiczne wytrącające ACh z roztworu. Do tego celu używa się kwasu chlorozłotowego [12], kwasu fosforowolframowego [49], roztworu amonowej soli Reinecka [21, 22, 49, 53, 71] lub roztworu $J_2 + KJ$ [16] oraz czterofenyloboranu sodowego [29]. Ostatnią z wymienionych metod zastosowano do izolacji ACh z siewek *Vigna sesquipedalis* [29]. W wyniku reakcji ACh z czterofenyloboranem sodowym powstaje nierozpuszczalny w wodzie kompleks, który dobrze rozpuszcza się w niektórych rozpuszczalnikach organicznych [15]. ACh regeneruje się z fazy organicznej, dodając do niej odpowiednią ilość 0,4 M kwasu solnego, który powoduje przejście ACh do małej objętości fazy wodnej.

Do wytrącania ACh z roztworów wodnych najczęściej używa się amonowej soli Reinecka. Nasycony roztwór tej soli, dodany do supernatantu zawierającego ACh, powoduje powstanie nierozpuszczalnego w wodzie kompleksu. Kompleks ten rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, np. acetonitrylu, natomiast ACh regeneruje się przy użyciu żywic jonowymiennych [19, 21] bądź skuteczniej za pomocą roztworu p-toluenosulfonianu srebrnego [38].

Omówione metody izolacji ACh są stosowane w materiale zwierzęcym, a ostatnio znalazły również zastosowanie w materiale roślinnym [29, 53, 71]. Tretyn i wsp. [71] przebadali, która z przedstawionych technik daje najlepsze wyniki w przypadku tkanek roślinnych. Stosując metodę chromatografii gazowej oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H -NMR) wykazali, że najczystsze ekstrakty otrzymuje się w wyniku izolacji ACh z materiału roślinnego przy użyciu acetonitrylu, a następnie jej wytrącaniu roztworem $\text{J}_2 + \text{KJ}$. Największy odzysk badanej substancji otrzymano stosując mieszaniny kwasu mrówkowego i acetonu jako roztworu ekstrakcyjnego, z wytrąceniem ACh z tego roztworu solą Reinecka [71].

2.2. OCZYSZCZANIE ACh

Wyekstrahowaną ACh poddaje się dalszemu oczyszczaniu i identyfikacji. Procesy te na materiale zwierzęcym prowadzi się stosując jedną z 4 metod chromatograficznych. Wygodną jest elektroforeza bibułowa [24]. Przy jej użyciu łatwo rozdziela się mieszaninę różnych estrów cholinowych [44]. Równie dobre wyniki przy oczyszczaniu ACh ekstrahowanej z tkanek zwierzęcych daje chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa [58]. Wydajną metodę izolacji i oczyszczania ACh jest chromatografia jonowymienna. Rozcieńczone roztwory ACh, podobnie jak i innych amin, izoluje się i zatęża na żywicach kationitowych, zawierających wolne grupy karboksylowe [58].

Z przedstawionych metod jedynie chromatografia bibułowa znalazła zastosowanie w oczyszczaniu ACh izolowanej z roślin. Najczęściej do tego celu stosowano bibułę Whatman nr 1 [8, 33, 73] lub Whatman nr 3 MM [29, 30]. Chromatogramy rozwijano przy użyciu eluentów składających się z mieszaniny kwasów, alkoholi i wody. Najczęściej stosowano eluenty o następującym składzie: butanol:etanol:kwas octowy:woda w stosunku objętościowym 8:2:1:3 [20, 62, 74], butanol:kwas octowy:woda (4:1:1) [29, 30, 62] lub propanol:alkohol benzyłowy:woda (5:2:2) [33]. Chromatogramy wywołane za pomocą kwasu fosfomolibdenowego, chlorku cynowego [8], hydroksylaminianu żelaza (III), w parach jodu [58] oraz przy użyciu odczynnika dwupikryloaminowego [29, 74].

2.3. OZNACZANIE ACh

2.3.1. Metody spektrofotometryczne

Wyizolowaną z materiału biologicznego ACh można szybko w prosty sposób oznaczyć ilościowo przy użyciu metody opartej na reakcji ACh z hydroksylaminą. Reakcję tę przeprowadza się w pH 12–14, a w jej wyniku

uzyskuje się cholinę oraz acetylohydroksylaminian. W kolejnym etapie mieszaninę reakcyjną doprowadza się do pH 1–2 i wprowadza się chlorek żelazowy. Trzy cząsteczki acetylohydroksylaminianu łączą się z jonem żelazowym dając kompleks absorbujący światło przy 540 nm [26].

Metoda ta jedynie sporadycznie stosowana jest do oznaczania ACh w ekstraktach roślinnych [49, 60]. Charakteryzuje się ona dużą specyficznością, lecz stosunkowo małą czułością. Próg czułości wynosi 0,01 μM ACh w próbce [58]. Czułość tej metody można podwyższyć po zastosowaniu polarograficznego zamiast kolorymetrycznego oznaczania kompleksu acetylohydroksylaminianu żelaza (III) [52]. Hydroksylaminową metodę oznaczania ACh można stosować po odbiałczeniu ekstraktów.

2.3.2. Biotesty

Jak dotąd, do ilościowego oznaczania ACh w materiale roślinnym najczęściej stosowano biotesty. W metodach tych wykorzystuje się wrażliwość fragmentów różnych organów lub całych organizmów zwierzęcych na działanie ACh. Z reguły bada się wpływ tego związku na:

- 1) kontrakcję mięśni szkieletowych lub mięśnia sercowego,
- 2) skurcz różnych fragmentów przewodu pokarmowego,
- 3) obniżanie ciśnienia tętniczego krwi.

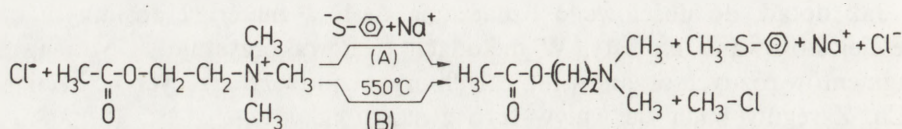
Do ilościowego oznaczania ACh u roślin najczęściej stosowano mięsień prosty brzucha żaby [30, 33, 43, 48], serce żaby [20], lub mięczaka *Mercenaria mercenaria* [33, 34, 61]. Często obecność ACh w ekstraktach roślinnych stwierdzano badając ich wpływ na ciśnienie tętnicze anestezjowanego kota [2, 8, 28, 62, 73], psa [2, 62] lub szczura [8, 74]. W sporadycznych przypadkach badania prowadzono stosując różne biotesty [8, 28]. Devasankaraiah i wsp. [8] oznaczali np. ACh w ekstraktach z nasion *Carum copticum*, stosując jednocześnie izolowane żołądki, dwunastnice, jelito czcze, jelito kręte i okrężnice szczura, a także jelito kręte świnki morskiej i dwunastnicę królika.

Poza ACh również inne farmakologicznie czynne substancje występujące w organizmach roślinnych, np. histamina [2], wpływają na czułość stosowanych biotestów. Istnieje więc konieczność przeprowadzania dodatkowych doświadczeń w celu potwierdzenia, że substancją aktywną w bioteście jest właśnie ACh. Najczęściej stosuje się tzw. eserynicację preparatu tkankowego [30, 33, 43]. Umieszczenie go w roztworze eseryny – inhibitora AChE – powoduje kilkakrotny wzrost jego wrażliwości na działanie ACh [33]. Działająca antagonistycznie w stosunku do ACh atropina wywołuje natomiast spadek wrażliwości biotestu [33]. Inaktywację acetylocholinopodobnej aktywności ekstraktu uzyskuje się traktując go AChE [33, 43] bądź roztworem silnej zasady [28, 30].

2.3.3. Chromatografia gazowa

Omówione już tu biotesty stosowano powszechnie do oznaczania ACh u zwierząt i roślin, gdyż żadna inna metoda nie mogła dorównać ich czułości. Dopiero opracowana przez Jenden i wsp. [37] metoda chromatograficznego oznaczania ACh osiągnęła czułość zbliżoną do biotestu. Przewaga metody chromatograficznej nad biotestem polega na możliwości równoległego oznaczania kilku estrów cholinowych oraz niewrażliwości metody chromatograficznej na inne farmakologicznie czynne związki występujące w roślinach.

Chromatograficzne oznaczanie czwartorzędowych amin, do których zaliczana jest ACh, wymaga uprzedniego przeprowadzenia ich w lotne pochodne. Lotne pochodne ACh można uzyskać poprzez jej pirolizę lub na drodze N-demetylacji (ryc. 2).



Ryc. 2. Dwa sposoby przeprowadzania ACh w lotny octan dwumetyloaminoetylowy: A – N-demetylacja, B – piroliza ACh

Opracowana przez Szilagyi i wsp. [67] metoda termicznego (pirolitycznego) rozkładu ACh jest powszechnie stosowana do oznaczania tej substancji w ekstraktach z tkanek zwierzęcych [4, 16, 23, 55]. Proces pirolizy przeprowadza się w specjalnym urządzeniu sprzężonym z chromatografem gazowym. Próbkę podgrzewa się 15 s do temperatury 450°C w strumieniu azotu, który powoduje przeniesienie powstającego lotnego produktu pirolizy – octanu dwumetyloaminowego do kolumny chromatografu [16].

Pomimo prostoty i dużej czułości metoda pirolizy nie znalazła dotąd zastosowania do analizy estrów cholinowych izolowanych z roślin.

Przekształcenie ACh w lotny octan dwumetyloaminoetylowy przeprowadza się również na drodze N-demetylacji (ryc. 2), którą wykonuje się przy użyciu mieszaniny tiofenolu i tiofenolanu sodu. Obecne w mieszaninie jony tiofenolanowe powodują nukleofilowe przemieszczenie przy grupie N-metylowej ACh, a następnie jej oderwanie [39]. Reakcję przeprowadza się w atmosferze beztlenowej w środowisku bezwodnego butanonu [39] lub acetonu [71]. W kolejnym etapie procedury usuwa się zbędne produkty reakcji oraz zagęszcza się i ekstrahuje do chloroformu lub dwuchlorometanu powstały octan dwumetyloaminoetylowy [71].

Po raz pierwszy metodę chromatograficznego oznaczania ACh w ekstrak-

tach roślinnych wprowadzili równolegle Devasankaraiah i wsp. [8] oraz Hartmann i Kilbinger [21, 22]. Pierwszy z zespołów wykazał ponadto, iż wykrywana biotestami ACh wyizolowana z nasion *Carum copticum* może być również oznaczana przy użyciu chromatografii gazowej. Hartmann i Kilbinger [21, 22], a następnie Miura i Shih [53] oraz Tretyn i wsp. [70, 71] stosując chromatografię gazową stwierdzili obecność ACh w tkankach wielu gatunków roślin. Identyczność substancji izolowanej z roślin ze wzorcem ACh wykazano za pomocą sprzężonego z chromatografem spektrografu masowego [53].

2.3.4. Inne metody

Poza spektroskopią masową, sprzężoną z chromatografią gazową, obecność ACh w ekstraktach analizowano za pomocą tzw. polowej spektroskopii masowej [29]. Substancja acetylocholinopodobna, wyizolowana z siewek *Vigna*, poddana oczyszczaniu na kationicie, a następnie metodą chromatografii bibułowej, charakteryzowała się podobnym widmem spektroskopowym jak wzorcowa ACh. Okazało się również, że w trakcie oczyszczania część izolowanej z tkanek roślinnych ACh ulega degradacji [29].

Obecność protonów zróżnicowanie związanych z innymi atomami cząsteczki ACh umożliwia identyfikacja tego związku za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H – NMR) [71]. Protony związane z trzema grupami N-metylowymi choliny i ACh absorbują promieniowanie radiowe o podobnym dla obu tych związków przesunięciu chemicznym. Obecność ACh w badanym ekstrakcie roślinnym można stwierdzić na podstawie ujawnienia się sygnału protonów związanych z grupą octanową związku [71].

Poza opisanymi tu metodami stosuje się wiele innych procedur chemicznych służących do ilościowego oznaczania estrów cholinowych, występujących w materiale biologicznym. Ich przegląd można znaleźć w monografii redagowanej przez Hanin [18]. Od czasu ukazania się tej monografii opracowano kilka nowych metod pozwalających na dokładniejsze określanie poziomu ACh w badanych próbkach [31, 64, 66]. W wypadku wielu z nich nie analizuje się bezpośrednio ACh, lecz związki uzyskane w wyniku jej degradacji, takie jak etanol, kwas octowy, a przede wszystkim H_2O_2 . Jedne z najlepszych rezultatów uzyskuje się w przypadku zastosowania wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej HPLC. Po wstępnej izolacji cząsteczki ACh rozkłada się przy użyciu AChE do choliny. Endogenną oraz uzyskaną z enzymatycznego rozkładu cholinę utlenia się oksydazą cholinową do betainy i H_2O_2 . Uwalniany H_2O_2 mierzy się za pomocą wirującej elektrody platynowej. Czulość tej metody wynosi 250 fM (fentamoli – 10^{-15} M) dla choliny oraz 500 fM dla ACh [6].

3. SYNTEZA ACh W ROŚLINACH

Powszechna obecność ACh w tkankach roślinnych (tab. 1) wskazuje na istnienie enzymów biorących udział w syntezie tej substancji w roślinach. U zwierząt ACh syntetyzowana jest z acetylokoenzymu A (acetylo-CoA) oraz choline przy udziale acetylotransferazy cholinowej (ATCh, E.C. 2.3.1.6) [58].

U roślin, poza powszechnie występującym acetylo-CoA, wykryto także obecność choline [7, 11, 32]. Na tej podstawie przypuszczano, że również u roślin enzymem związanym z syntezą ACh jest ATCh.

3.1. ACETYLOTANSFERAZA CHOLINOWA ROŚLIN

Wstępne próby wykrycia ATCh u roślin zakończyły się niepowodzeniem [59]. Jako pierwsi obecność tego enzymu w tkankach roślinnych stwierdzili Barlow i Dixon [3]. W badaniach posłużyli się pąkami i młodymi liśćmi pokrzywy *Urtica dioica* – materiałem niezwykle bogatym w ACh [5, 10], pozbawionym natomiast aktywności AChE [9], enzymu rozkładającego ACh [69]. Aktywność ATCh u *Urtica dioica* oznaczano badając tempo syntezy ACh z jej prekursorów – choline i acetylo-CoA. Stężenie powstającej ACh oznaczano przy użyciu biotestu [3]. Zastosowanie oczyszczonego enzymu umożliwiło bezpośrednie badanie aktywności ATCh [65]. W wyniku przesączenia wstępnie oczyszczonego ekstraktu roślinnego przez kolumnę zawierającą Sefarozę 4B sprzężoną z CoA-SH, a następnie usunięcie zaadsorbowanego białka roztworem NaCl (od 0,0 do 1,0 M), uzyskano 1500-krotne oczyszczenie enzymu. Dysponując preparatem oczyszczonego enzymu, aktywność ATCh badano metodą radiometryczną, oznaczając ilość ^3H -acetylo-CoA włączonego w cząsteczki ACh [65]. Aktywność specyficzna enzymu wyizolowanego z *Urtica dioica* wynosiła 1067 mmoli zsyntetyzowanej ACh w ciągu jednej minuty przez 1 mg białka [65]. Maksimum aktywności ATCh stwierdzono w temp. 40°C [3, 65] i przy pH 9,0 [3]. Najwyższą aktywność omawianego enzymu miały ekstrakty izolowane z najmłodszych części pokrzywy, tj. pąków i młodych liści [3, 65]. Aktywność specyficzna enzymu wyizolowanego z młodych liści tej rośliny była zbliżona do aktywności ATCh występującej w tkance nerwowej owadów [65].

Poza pokrzywą obecność ATCh stwierdzono w grochu *Pisum sativum*, szpinaku *Spinacia oleracea*, słonecznika *Helianthus annuus* oraz sinicy *Oscillatoria agardhii* [65], jak również w nasionach roślin z rodzaju *Allium* [17]. Aktywność specyficzna enzymu izolowanego z wymienionych roślin była około 100 razy niższa niż aktywność ATCh otrzymana z tkanek pokrzywy [65].

Oprócz octanowych estrów choline w tkankach niektórych roślin wykryto obecność estrów kwasu propionowego [54] oraz sinapinowego [42]. Mechanizm powstawania propionylcholine u roślin nie został dotąd poznany. W przypadku sinapiny (estru choline i kwasu sinapinowego) Hadačová i wsp. [17] dowiedli, że enzymem odpowiedzialnym za jej syntezę może być ATCh.

3.2. SUBKOMÓRKOWA LOKALIZACJA MIEJSC SYNTEZY ACh

Informacje dotyczące miejsc syntezy ACh w komórkach roślinnych są skromne. Doświadczenia dotyczące tego zagadnienia prowadził dotąd jedynie Jaffe [35]. Stosując pęcherzyki uzyskane z błon retikulum endoplazmatycznego etiolowanych hypokotyli soi wykazał on zróżnicowany wpływ R i FR na syntezę ACh. Okazało się, że pęcherzyki naświetlane R znacznie szybciej włączały znakowane prekursor ACh w porównaniu z pęcherzykami poddawanymi działaniu FR. Wpływ R na syntezę ACh, w porównaniu z pęcherzykami nienaświetlanymi tą długością światła, był około 100-krotnie wyższy po dodaniu do roztworu inkubacyjnego 0,5% Tritonu X-100 [35]. Na podstawie przedstawionych wyników można przypuszczać, że synteza ACh w komórkach roślinnych odbywa się na terenie cystern endoplazmatycznego retikulum [35] przy udziale kontrolowanej przez fitochrom [35] ATCh [3, 65].

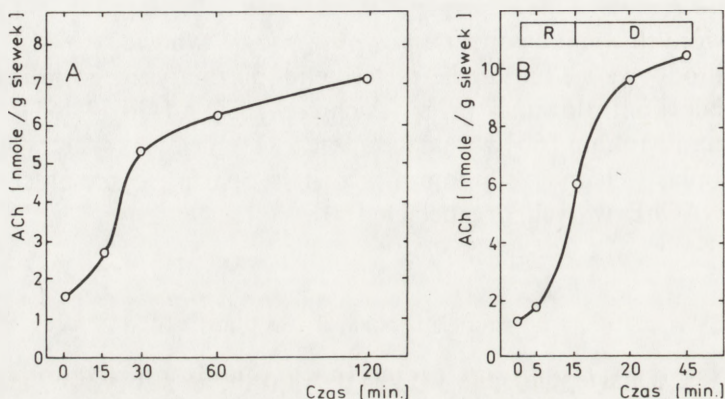
Roshina i Mukhin [60] wysunęli hipotezę, że miejscem syntezy ACh mogą być chloroplasty. Jednakże hipoteza ta została oparta jedynie na stwierdzeniu obecności AChE w tych organelach [60].

3.3. REGULACJA POZIOMU ACh U ROŚLIN

Lin [48], a następnie Jaffe [33, 34] wykazali, że najwyższe stężenie ACh występuje w młodych, rosnących częściach roślin. Poziom ACh podlega wahaniom w zależności od fazy rozwojowej rośliny oraz warunków środowiskowych [33, 72]. Ustalono, że stężenie ACh w tkankach fasoli jest znacznie wyższe w siewkach zielonych, a niższe w etiolowanych. 5-minutowe naświetlenie izolowanych organów tej rośliny R powoduje bardzo szybki wzrost zawartości ACh. FR, stosowane bezpośrednio po R, znosi stymulacyjny wpływ R powodując również szybki spadek poziomu ACh w wierzchołkach korzeni fasoli [34]. Doświadczenia prowadzone nad wpływem R i FR na syntezę ACh wykazały, że w wierzchołkach korzeni fasoli poziom tej substancji regulowany jest przez fitochrom [33, 34]. Hartmann [20], a następnie Hartmann i Kilbinger [21, 22] potwierdzili możliwość udziału fitochromu w regulacji syntezy ACh u mszaków i roślin okrytonasiennych. Podobny system regulacji zawartości ACh u przedstawiciela roślin nagonasiennych, sosny, opisali Kopciewicz i wsp. [43].

Światło białe również wywiera wpływ na poziom endogennej ACh u roślin. Miura i Shih [53] ustalili, że w porównaniu z roślinami nienaświetlanymi, światło białe stymuluje wzrost poziomu ACh w liściach oraz jego spadek w pędach siewek fasoli. Podobny, stymulacyjny wpływ światła białego na stężenie ACh w etiolowanych i zielonych siewkach owsa opisał Tretyn i wsp. [70, 72], wykazując ponadto, że zarówno światło białe, jak i R w podobny sposób wpływają na tempo syntezy ACh w etiolowanych siewkach owsa (ryc. 3) [70].

Wpływ światła na syntezę ACh u roślin pozostaje nieznan. Jaffe [34] opierając się na teoretycznych przesłankach sugerował możliwość zróżnicowanego wpływu R i FR na aktywność AChE. Tretyn i Kwiatkowska [68] stosując cytochemiczną metodę Karnowskiego i Rootsza [41] wykazali, że w etiolowanych koleoptylach owsa AChE występuje po zewnętrznej stronie błon komórkowych tych organów. Naświetlaniu koleoptyli R towarzyszyło zahamowanie aktywności AChE, natomiast stosowane po R światło dalekiej czerwieni wpływało na wzrost aktywności omawianego enzymu [68].



Ryc. 3. Wpływ światła białego (słonecznego) — A oraz R — B na poziom ACh w etiolowanych siewkach owsa. Oba typy światła indukują szybki wzrost stężenia ACh w pędach badanych roślin. W siewkach naświetlanych R wzrost poziomu ACh obserwuje się również w następującej po R ciemności (D) [70]

R i FR może również regulować poziom endogennej ACh w roślinach poprzez kontrolę aktywności ATCh. Na możliwość istnienia tego typu układu kontrolnego wskazują wyniki badań nad wpływem R i FR na syntezę ACh w układach *in vitro* [35].

Na podstawie literatury można przypuszczać, iż poziom ACh w roślinach regulowany jest przez system fitochromowy na drodze zróżnicowanego wpływu R i FR na aktywność AChE i ATCh [35, 36, 68].

4. MIEJSCA WYSTĘPOWANIA ACh W ROŚLINACH

Obecność ACh stwierdzono w tkankach ponad 50 gatunków roślin należących do wszystkich ważniejszych grup systematycznych (tab. 1). Substancję tę wykryto w strzępkach grzybów [12, 25, 57], plechach mszaków [20, 21], w częściach nadziemnych [22, 33, 43, 45, 48, 53, 70, 72], w bulwach [50] oraz korzeniach [9, 10, 22, 33, 34, 46, 48, 53] roślin wyższych. W przypadku części nadziemnych roślin okrytonasiennych ACh wykryto w łodydze [9, 10, 22, 33,

TABELA

Występowanie acetylochliny w roślinach nasiennych. Wykaz rodzin i gatunków roślin, u których stwierdzono obecność tej substancji oraz miejsca jej występowania (na podstawie [14, 49], zmodyfikowane i uzupełnione)

Rodzina	Gatunek	Miejsce występowania acetylochliny	Literatura
1	2	3	4
<i>Atingiaceae</i>	<i>Liquidamber styraciflua</i> L.	liście	[53]
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	pędy	[22]
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Rhus campallina</i> L.	liście	[53]
<i>Aquifoliaceae</i>	<i>Ilex opaca</i> Ait.	liście	[53]
<i>Betulaceae</i>	<i>Betula pendula</i> Roth.	liście	[53]
<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	liście	[53]
	<i>Viburnum dilatatum</i> Thunb.	liście	[53]
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Spinacia oleracea</i> L.	liście, pędy	[2, 22]
<i>Compositae</i>	<i>Helianthus annuus</i> L.	pędy, korzenie	[22]
	<i>Porophyllum lanceolatum</i> DC	liście, pędy, korzenie	[28, 45]
	<i>Xanthium strumarium</i> L.	pędy, korzenie	[45]
<i>Cruciferae</i>	<i>Brassica oleracea</i> v. <i>gongylodes</i> L.	części nadziemne	[27]
	<i>Brassica campestris</i> v. <i>napobrassica</i> L.	części nadziemne	[27]
	<i>Capsella bursa pastoris</i> L.	części nadziemne	cyt. za [49]
	<i>Sinapis alba</i> L.	pędy, korzenie	[22, 45]
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis anguria</i> L.	części nadziemne	[46]
	<i>Cucumis sativus</i> L.	części nadziemne	[27, 74]
	<i>Cucurbita pepo</i> L.	pędy, korzenie	[22]
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Codiaeum variegatum</i> Blume.	liście	[53]
<i>Gramineae</i>	<i>Avena sativa</i> L.	części nadziemne	[70, 71]
	<i>Stipa tenacissima</i> L.	liście	[1]
	<i>Zea mays</i> L.	liście	[53]
<i>Lemnaceae</i>	<i>Lemna gibba</i> G3 L.	całe rośliny	[30]
<i>Loranthaceae</i>	<i>Viscum album</i> L.	pędy	cyt. za [49]
<i>Moraceae</i>	<i>Artocarpus champeden</i> Merr.	liście, nasiona, owoce	[48]
	<i>Artocarpus integra</i> Merr.	liście, nasiona, owoce	[47]
<i>Papilionaceae</i>	<i>Albizzia julibrissin</i> Durazz.	liście, nasiona	[61]
	<i>Phaseolus aureus</i> Roxb.	pędy, korzenie, nasiona	[33, 53]
	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	pędy, korzenie	[22]
	<i>Pisum sativum</i> L.	liście, pędy, korzenie, nasiona	[22, 34, 53, 60]
<i>Pinaceae</i>	<i>Pinus silvestris</i> L.	części nadziemne	[43]
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago rugelii</i> Deone.	liście	[53]
<i>Polygonaceae</i>	<i>Rumex obtusifolius</i> L.	części nadziemne	[46]
<i>Populaceae</i>	<i>Populus grandidentata</i> Michx.	liście	[53]
<i>Rosaceae</i>	<i>Crataegus oryacantha</i> L.	liście, kwiaty, owoce	[13]
	<i>Digitalis ferrugina</i> L.	pędy	[73]
	<i>Digitalis lauta</i> L.	liście	[56]
	<i>Digitalis purpurea</i> L.	liście	[56]
	<i>Prunus serotina</i> Ehrh.	liście	[53]
<i>Smilacaceae</i>	<i>Smilax hispida</i> Muhl.	liście	[53]

c.d. tab.

1	2	3	4
<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum tuberosum</i> L.	bulwy	[50, 57]
<i>Umbelliferae</i>	<i>Daucus carota</i> v. <i>sativa</i> L.	liście	[27]
	<i>Carum copticum</i> Benth.	nasiona	[8]
<i>Urticaceae</i>	<i>Girardinia heterophylla</i> Gandich.	liście	[63]
	<i>Urtica dioica</i> L.	liście,, pędy, korzenie	[5, 10]
	<i>Urtica parviflora</i> Roxb.	liście, włoski	[62]
	<i>Urtica urens</i> L.	liście, pędy, korzenie	[9]

34, 46, 48, 53], hypokotyłu [29, 33, 34, 74], w liściach [1, 2, 5, 9, 10, 13, 22, 28, 33, 34, 46, 48, 53, 56, 60, 61, 62, 63, 72, 74], w pąkach szczytowych [33, 48] oraz w kwiatach [13] i nasionach [8, 47, 53, 61].

Dokładne analizy rozmieszczenia ACh w roślinie przeprowadzono u 4 gatunków: *Urtica dioica* i *U. urens* [10], *Artocarpus integra* [48] oraz *Phaseolus aureus* [33]. W przypadku *Urtica urens* stwierdzono zbliżony poziom ACh we wszystkich organach, natomiast u *Urtica dioica* stężenia ACh było różne w poszczególnych organach rośliny. Najwyższy poziom ACh, poza włoskami parzącymi, odnotowano w korze pierwotnej i floemie, najniższe zaś w rdzeniu wierzchołkowych części pędów pokrzywy [10].

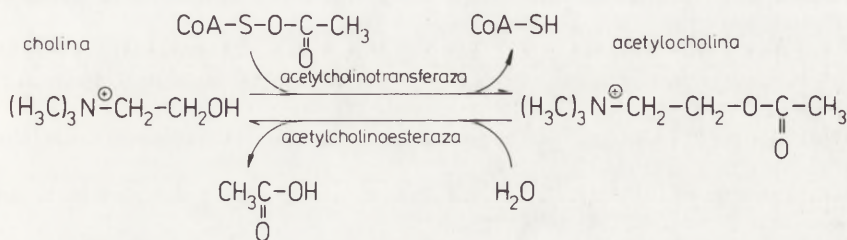
U *Artocarpus integra* najwyższe stężenie ACh wykryto w najmłodszych liściach [48]. W pojedynczym liściu wyższe stężenie ACh obserwowano w nerwie, a niższe w blaszce. W obrębie bezlistnego pędu *A. integra* najwyższy poziom omawianej substancji stwierdzono w rdzeniu, najniższy zaś na terenie ksylemu. Natomiast w korzeniu najwyższe stężenie ACh występowało we floemie, nieco niższe w korze zewnętrznej i zdecydowanie najniższe w ksylemie i rdzeniu. We wszystkich analizowanych organach *A. integra* zaobserwowano występowanie korelacji między poziomem ACh a wiekiem organów. Zarówno w częściach nadziemnych, jak i w korzeniach najwyższy poziom ACh występował w najmłodszych częściach organów [48].

Sugestie Lina [48] o istnieniu gradientu stężenia ACh w nadziemnych i podziemnych częściach roślin potwierdził Jaffe [33]. W badaniach prowadzonych na siewkach *Phaseolus aureus* Jaffe stwierdził, że najwyższe stężenie ACh występuje w pąkach szczytowych pędów i wierzchołkach korzeni oraz w najmłodszych liściach.

Stężenie ACh w roślinach waha się od ułamków nanomoli (nanogramów) [53] do setek mikromoli (mikrogramów) [33, 48] na gram świeżej masy badanej tkanki. Roślinami, u których stwierdzono najwyższe stężenie tej substancji są różne gatunki pokrzywy [5, 9, 10, 62], a komórkami o najwyższej zawartości ACh – włoski parzące [5, 62]. Duże ilości ACh, poza pokrzywami, zawiera wiele innych roślin leczniczych, jak np. *Viscum album*, *Digitalis purpurea*, *D. lanata* [56], *D. ferrugina* [73] oraz *Carum copticum* [8].

5. PODSUMOWANIE

Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że ACh występuje w roślinach. Związek ten wykryto we wszystkich grupach taksonomicznych roślin, od bakterii do roślin okrytonasiennych. Miejscem syntezy ACh u roślin są prawdopodobnie młode liście. W organach tych stwierdzono obecność ATCh. Enzym ten o właściwościach zbliżonych do zwierzęcej ATCh, uczestniczy prawdopodobnie w syntezie ACh z jej prekursorów – choliny i acetylo-CoA (ryc. 4).



Ryc. 4. Synteza oraz degradacja ACh w roślinach. ACh syntetyzowana jest z acetylo-CoA i choliny przy udziale ATCh, a rozkładana do choliny i kwasu octowego przez AChE

W tkankach roślinnych występuje również AChE. Enzym ten rozkłada ACh i ma właściwości zbliżone do zwierzęcej AChE. Obecność zarówno ATCh, jak i AChE w tkankach roślinnych pozwala przypuszczać, że ACh w roślinach podlega podobnemu metabolizmowi jak u zwierząt (ryc. 4). Pomimo braku dowodów występowania w komórkach roślinnych receptorów ACh przypuszcza się, że podobnie jak u zwierząt, również u roślin występuje i funkcjonuje 4-składnikowy system cholinergiczny [14, 53]. Nie świadczy to jednak, iż mechanizm działania roślinnego i zwierzęcego systemu cholinergicznego jest identyczny w obu tych grupach organizmów. Wydaje się, że w przypadku roślin działanie systemu cholinergicznego związane jest z funkcjonowaniem fitochromu.

Autorzy serdecznie dziękują prof. drowi hab. Janowi Kopcewiczowi i dr Elżbiecie Bednarskiej za pomoc w przygotowaniu artykułu. Dziękujemy również prof. drowi hab. Józefowi Surowiakowi, koordynatorowi RP.II, za popieranie badań nad rolą ACh u roślin.

LITERATURA

- [1] ANTWEILER H., PALLADE S., Über den Acetylcholingehalt von *Stica tenacissima* Linne (Espartogras), Arch. Toxicol., **29**: 117-127, 1972.
- [2] APPEL W., WERLE E., Nachweis von Histamin, N-Dimethylhistamin, N-Acetylhistamin und Acetylcholin in *Spinacia oleracea*, Arzneim. — Forsch., **9**: 22-26, 1959.

- [3] BARLOW R. B., DIXON R. O. D., Choline acetyltransferase in the nettle *Urtica dioica* L., *Biochem. J.*, **132**: 15–18, 1973.
- [4] BISHOP M. R., SASTRY B. V. R., STAVIDRA W. B., Identification of acetylcholine and propionylcholine in bull spermatozoa by integrated, gas chromatography and mass spectrometry, *Biochim. Biophys. Acta*, **500**: 440–444, 1977.
- [5] COLLIER H. O. J., CHESHER G. R., Identification of 5-hydroksytryptamine in the sting of nettle (*Urtica dioica*), *Brit. J. Pharmacol.*, **11**: 185–189, 1956.
- [6] DAMEMA G., WESTERNIK B. H. C., HORN A. S., A simple, sensitive, and economic assay for choline and acetylcholine using HPLC, and enzyme reactor, and an electrochemical detector, *J. Neurochem.*, **45**: 1649–1652, 1985.
- [7] DASGUPTA B., Chemical investigations of *Alangium lamarckii*. II. Isolation of choline from the leaves, *Experientia*, **95**: 287–288, 1966.
- [8] DEVASANKARAI AH G., HANIN I., HARANTH P. S. R. K., RAMANAMURTY P. S. V., Cholinomimetic effects of aqueous extracts from *Carum copticum* seeds. *Br. J. Pharmacol.*, **52**: 613–614, 1974.
- [9] EMMELIN N., FELDBERG W., The mechanism of the sting of the common nettle (*Urtica urens*), *J. Physiol.*, **106**: 440–455, 1947.
- [10] EMMELIN N., FELDBERG W., Distribution of acetylcholine and histamine in nettle plants, *New Phytol.*, **48**: 143–148, 1949.
- [11] ENGEL R. W., The choline content of animal and plant products, *J. Nutr.* **25**: 441–446, 1943.
- [12] EWINS A. J., Acetylcholine, a new active principle of ergot, *Biochem. J.*, **8**: 44–49, 1914.
- [13] FIEDLER U., HILDEBRAND G., NEU R., Weitere inhalatstoffe des Weissdorns: der Nachweis von Cholin und Acetylcholin, *Arzein. — Forsch.*, **3**: 36–37, 1953.
- [14] FLUCK R. A., JAFFE M. J., The acetylcholine system in plants, [w] *Commentaries in Plant Science*, red. Smith, H., Pergamon Press, Oxford — New York — Toronto — Paris — Frankfurt 1976, ss. 119–136.
- [15] FONNUM F., Isolation of choline esters from aqueous solutions by extraction with sodium tetraphenylboron in organic solvents, *Biochem. J.*, **113**: 291–298, 1969.
- [16] GREEN J. P., SZILAGYI P. I. A., Measurement of acetylcholine by pyrolysis gas chromatography, [w] *Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods*, red. Hanin, I., Raven Press, New York 1974, 151–162.
- [17] HADAČOVÁ V., HOFFMAN J., MALINI de ALMEIDA R., VACKOVÁ K., KUTAČEK M., KLOZOVA E., Choline esterases and choline acetyltransferase in seed of *Allium altaicum* (Pall.) reysa, *Biol. Plant.*, **23**: 220–227, 1981.
- [18] HANIN I., (red.), *Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods*, Raven Press, New York 1974.
- [19] HANIN I., JENDEN D. J., Estimation of choline esters in brain by a new gas chromatography procedure. *Biochem. Pharmacol.*, **18**: 837–845, 1969.
- [20] HARTMANN E., Über den Nachweis eines Neurohormones beim Laubmooscallus und seine Beeinflussung durch das Phytochrom, *Planta*, **101**: 159–165, 1971.
- [21] HARTMANN E., KILBINGER K., Gas-liquid-chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentration in moss callus, *Biochem. J.*, **137**: 249–252, 1974.
- [22] — Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants, *Experientia*, **30**: 1387–1388, 1974.
- [23] HASEGAWA Y., KUNIYAHARA M., MURUYAMA Y., Determination of picomole amounts of choline and acetylcholine in blood by gas chromatography — mass spectrometry equipped with a newly improved pyrolyser, *J. Chromatogr.*, **239**: 335–342.
- [24] HAUBRICH D. R., REID W. D., Use of choline kinase in the radioisotopic estimation of brain choline and acetylcholine, [w] *Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods*, red. Hanin, I., Raven Press, New York 1974, 33–45.

- [25] HEIRMAN P., Recherches sur l'adrenxine. I. Variabilité des propriétés physiologiques et biochimiques du jus de presse du champignon de couche, *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **49**: 449-454, 1939.
- [26] HESTRIN S., The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application, *J. Biol. Chem.*, **180**: 249-261, 1949.
- [27] HOLTZ P., JANISCH H., Über das Vorkommen von Azetylcholine, Histamin, und Adenosin in Pflanzen, *Arch. Exper. Path. Pharmacol.*, **187**: 336-343, 1937.
- [28] HORTON E. W., FELIPPE G. M., An acetylcholine-like substance in *Porophyllum lanceolatum*, *Biol. Plant.*, **15**: 150-151, 1973.
- [29] HOSHINO T., Identification of acetylcholine as a natural constituent of *Vigna* seedlings, *Plant Cell Physiol.*, **24**: 829-834, 1983.
- [30] HOSHINO T., OCTA T., The occurrence of acetylcholine in *Lemna gibba* G3, *Plant Cell Physiol.*, **19**: 769-776, 1978.
- [31] IKARASHI Y., SASAHARA T., MURUYAMA Y., Determination of choline and acetylcholine levels in rat brain regions by liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, **322**: 191-199, 1985.
- [32] IURISSON E. E., IURISSON F. M., The choline content in some plants, *Aptechn. Delo*, **15**: 36-39, 1966.
- [33] JAFFE M. J., Evidence for the regulation of phytochrome-mediated process in bean roots by the neurohumor, acetylcholine, *Plant Physiol.*, **46**: 768-777, 1970.
- [34] — Acetylcholine as a native metabolic regulator of phytochrome-mediated process in bean roots, [w] *Structural and Functional Aspects of Phytochemistry*, Vol. V. red. Runeckles, V. C., Tso, T. C., Academic Press, New York 1972, 80-104.
- [35] — Phytochrome-controlled acetylcholine synthesis at the endoplasmic reticulum, [w] *Light and Plant Development*, red. Smith, H., Butterworths, London — Boston — Sydney — Wellington — Durban — Toronto 1976, 333-344.
- [36] JAFFE M. J., FLUCK R., The mediation of bean root acetylcholinesterase activity by phytochrome and photochromic pigments, *Plant Physiol. (supplement)*, **49**: 53, 1972.
- [37] JENDEN D. J., HANIN I., LEMB S. J., Gas chromatographic microestimation of acetylcholine and related compounds, *Anal. Chem.*, **40**: 125-128.
- [38] JENDEN D. J., BOOTH R. A., ROCH M., Simultaneous microestimation of choline and acetylcholine by gas chromatography, *Anal. Chem.*, **44**: 1879-1881, 1972.
- [39] JENDEN D. J., HANIN I., Gas chromatographic microestimation of choline and acetylcholine after N-demethylation by sodium benzenethiolate, [w] *Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods*, Raven Press, New York 1974, 135-150.
- [40] JONES R. S., STUTTE C. S., Chromatographic analysis of choline and acetylcholine by UV visualization, *J. Chromatogr.*, **319**: 454-460, 1985.
- [41] KORNOVSKY M. J., ROOTS L. A., A "direct-coloring" tiochrome method for cholinesterases, *J. Histochem.*, **12**: 219-221, 1964.
- [42] KEFELI V. J., KUTACEK M., VACKOVA K., MACHACKOVA J., ZMRHAL Z., VLASOV P. V., GUSOV A. B., SHAPKIN V., Physiological properties of sinapine and sinapylglucose from kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylolidea*), *Fiziol. Rast.*, **24**: 1200-1204, 1977.
- [43] KOPCEWICZ J., CYMERSKI M., PORAZIŃSKI Z., Influence of red and far-red irradiation on the acetylcholine and gibberellin content in scots pine seedlings, *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **25**: 114-117, 1977.
- [44] LADINSKY H., CONSOLO S., Determination of acetylcholine and choline by enzymatic radioassay, [w] *Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods*, red. Hanin, I., Raven Press, New York 1974, 1-17.
- [45] LADEIRA A., FELIPPE G. M., DIETRICH S. M., Detection of acetylcholine and effects of

- exogenous ACh on *Rumex* and *Cucumis* photoblasticity, *Rev. Brasil. Bot.*, **5**: 17–19, 1982.
- [46] LEDEIRA A., DIETRICH S. M. C., FELIPPE G. M., Acetylcholine and flowering of photoperiodic plants, *Rev. Brasil. Bot.*, **5**: 21–24, 1982.
- [47] LIN R. C. I., Presence of acetylcholine in the Malayan jack-fruit, *Artocarpus integra*, *Brit. J. Pharmacol.*, **10**: 247–253, 1955.
- [48] —, Distribution of acetylcholine in the Malayan jack-fruit plant, *Artocarpus integra*, *Brit. J. Pharmacol.*, **12**: 256–269, 1957.
- [49] MARQUARDT P., FALK H., Vorkommen und Synthese von Acetylcholin in Pflanzen und Bakterien, *Arzneim.-Forsch.*, **7**: 203–211, 1957.
- [50] MARQUARDT P., SCHUMACHER H., VOGG G., Die chemische Konstitution des blutdrucksenkenden Factors in der Kartoffel, *Arzneim.-Forsch.*, **2**: 301–304, 1952.
- [51] MARQUARDT P., SPITZNAGEL G., Bacterielle Acetylcholin Bildung in kunstlichem Vahrboden, *Arzneim.-Forsch.*, **9**: 456–465, 1955.
- [52] MASLOVA A. F., Quantitative determination of acetylcholine in biological tissues by the method of polarographic analysis utilizing a rotation platinum electrode, [w] *Choline and Acetylcholine: Handbook of Chemical Assay Methods*, red. Hanin, I., Raven Press, New York 1974, 215–230.
- [53] MIURA G. A., SHIH T.-M., Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline, *Physiol. Plant.*, **61**: 417–421, 1984.
- [54] —, Identification of propionylcholine in higher plants, *Physiol. Plant.*, **62**: 341–345, 1984.
- [55] MURUYAMA Y., KASAKA K., MORI J., HORIKAWA A., HASAGAWA Y., Simple method for the determination of choline and acetylcholine by pyrolysis gas chromatography, *J. Chromatogr.* **164**: 121–127, 1979.
- [56] NEUWALD F., Choline in the leaves of *Digitalis purpurea* and *Digitalis lanata*, *Arch. Pharmacol.*, **285**: 459–461, 1952.
- [57] OURY A., BACQ Z. M., Ester instable de la choline sans cholinesteras dans la pomme de terre et im champignon, *Arch. Inst. Physiol.*, **47**: 92–101, 1938.
- [58] POTTER L. T., Acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase, [w] *Handbook of Neurochemistry: Control Mechanisms in the Nervous System*, red. Lajtha, A., Plenum Press, New York — London, 263–284.
- [59] RIOV J., JAFFE M. J., Evidence for enzymatic thiotransacetylation in plant extracts, *Phytochemistry*, **11**: 2437–2438, 1972.
- [60] ROSCHINA V. V., MUKHIN E. N., Acetylcholinesterase activity in chloroplasts and acetylcholine effects on photochemical reactions, *Photosynthetica*, **19**: 164–171, 1985.
- [61] SATTER R. L., APPLEWHITE P. B., GALSTON A. W., Phytochrome-controlled nyctinasty in *Albizia julibrissin*, *Plant Physiol.*, **50**: 523–525, 1972.
- [62] SAXENA P. R., KISHOR K., PANT M. C., BHARGAVA K. P., Identification of pharmacologically active substance in the indian stinging nattle, *Urtica parviflora* (Rexb.), *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **43**: 869–876, 1965.
- [63] SAXENA P. R., TANGRI K. K., BHARGAVA K. P., Identification of acetylcholine, histamine and 5-hydroxytryptamine in *Giradina heterophylla*, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **44**: 621–627, 1966.
- [64] SINGH A. K., DREWES L. R., Improved analysis of acetylcholine and choline in oanine brain and blood sample by capillary gas chromatography — mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, **339**: 170–174, 1985.
- [65] SMALLMAN B., MANECKJEE A., The synthesis of acetylcholine by plants, *Biochem.*, **J.**, **194**: 361–365, 1981.
- [66] STEIN R. L., Separation of choline and acetylcholine by cation-exchange chromatography, *J. Chromatogr.*, **214**: 148–151, 1981.
- [67] SZILAGYI P. J. A., SCHMIDT D. E., GREEN J. P., Microanalytical determination of

- acetylcholine, other choline esters and choline by pyrolysis — gas chromatography, *Anal. Chem.* **40**: 2009–2013, 1968.
- [68] TRETYN A., KWIATKOWSKA K., Influence of red and far-red irradiation on the ultrastructural localization of acetylcholinesterase in the cells of oat coleoptile, *Acta Biol. Hung.*, **37**: 62 (supplement), 1986.
- [69] —, Charakterystyka roślinnego systemu cholinergicznego. Cholinoestery roślinne, *Post. Biol. Kom.*, **14**: 83–96, 1987.
- [70] TRETYN A., MICHALSKI L., TRETYN M., BOBKIEWICZ W., Changes in the level of endogenous acetylcholine during deetiolation of *Avena sativa* seedlings, [w] *Proc. of IV Intern. Symp. on Plant Growth Regulators*, Pamporovo, 1986, w druku.
- [71] TRETYN A., BOBKIEWICZ W., TRETYN M., MICHALSKI L., The identification of acetylcholine and choline in oat seedlings by gas chromatography and nuclear magnetic resonance (NMR), *Acta Soc. Bot. Polon.*, **56**: 499–511, 1987.
- [72] TRETYN A., TRETYN M., Diurnal acetylcholine oscillation in green oat seedlings, *Acta Physiol. Plant.*, 1988, w druku.
- [73] Tulus R., Uleubelen A., OZER F., Choline and acetylcholine in the leaves of *Digitalis ferrugina*, *Arch. Pharmacol.*, **294**: 11–17, 1961.
- [74] VERBECK M., VENDRIG J. C., Are acetylcholine-like cotyledon-factor involved in the growth of the cucumber hypocotyls?, *Z. Pflanzenphysiol.*, **83**: 335–340, 1977.

Adres autorów: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.

Otrzymano: 21 marca 1988 r.

Przyjęto: 26 maja 1988 r.

KOMUNIKAT

Komisja Mikroskopii Elektronowej Komitetu Patofizjologii Komórki PAN organizuje XIX Konferencję Naukową, która odbędzie się 11–12 września 1989 r. w Porąbce–Kozubniku k. Bielska.

Program Konferencji będzie obejmował referaty plenarne i doniesienia plakatowe. Przewiduje się, że głównymi tematami Konferencji będą struktura i funkcja jądra komórkowego oraz zastosowania mikroskopii elektronowej w biologii i medycynie.

Zgłoszenia udziału w Konferencji z podaniem wstępnego tytułu plakatu prosimy przysyłać pod adresem Komitetu Organizacyjnego:

Zakład Cytochemii i Ultrastruktury Komórki
Centrum Onkologii, Oddział w Gliwicach
Wybrzeże Armii Czerwonej 15
44-100 Gliwice

Następne komunikaty otrzymają ci, którzy prześlą wstępne zgłoszenia do 31 grudnia 1988 r.

FITOCHROM – OCZYSZCZANIE, STRUKTURA, BIOSYNTETA I WŁAŚCIWOŚCI MOLEKULARNE*

PHYTOCHROME – PURIFICATION, STRUCTURE, BIOSYNTHESIS AND MOLECULAR PROPERTIES

Andrzej TRETYN, Jacek KĘSY i Jan KOPCEWICZ

Uniwersytet Mikołaja Kopernika. Instytut Biologii, Zakład Botaniki Ogólnej

Streszczenie. Fitochrom (P) jest fotoreceptorem odgrywającym centralną rolę w kontroli wzrostu i rozwoju roślin. Barwnik ten występuje w postaci dimeru, a każdy monomer, w zależności od gatunku rośliny, zbudowany jest ze 120–127 kilodaltonowego polipeptydu związanego kowalencyjnie z otwartym łańcuchem tetrapirrolowym.

P występuje w dwu fotoodwracalnych formach: P_r – absorbującej światło czerwone (R) i P_{fr} – absorbującej światło dalekiej czerwieni (FR). Badania immunocytochemiczne wykazały, że w komórkach roślin wyrosłych w ciemności fitochrom P_r jest równomiernie rozmieszczony w cytozolu. Po fotokonwersji P_r w P_{fr} , chromoproteina ulega agregacji, tworząc liczne mikroobszary o powierzchni $1 \mu\text{m}^2$. P syntetyzowany jest w formie P_r , której czas połowicznego rozpadu wynosi ok. 100 h. Po fotokonwersji P_r w P_{fr} , czas połowicznego rozpadu białka P obniża się ok. 100 razy.

Summary. Phytochrome is regulatory photoreceptor which plays a central role in the control of plant growth and development. The phytochrome molecules is a dimeric chromoprotein. Each monomer is composed of 124–127 kDa polipeptide (depending on plant species) to which covalently is linked a linear tetrapyrrole chromophore. Phytochrome exist in two photo-interconvertible forms, a red light-absorbing form, P_r , and a far-red light-absorbing form, P_{fr} .

Immunocytochemical studies have demonstrated that phytochrome in dark-grown plants is uniformly distributed throughout the cytosol. Following phytoconversion by red light of the P_r form to P_{fr} , however, the chromoprotein becomes sequestered, forming in cytosol numerous discrete amorphous areas about $1 \mu\text{m}^2$ size. Phytochrome is synthesized as P_r of a half-life about 100 hours. After fotoconversion of P_r into P_{fr} , the half-life of the phytochrome protein is reduced by ca. 100 fold.

* Praca powstała w trakcie badań prowadzonych w ramach problemu CPBP 05.02.4.07.

Wykaz stosowanych skrótów

- FR – światło dalekiej czerwieni (730 nm)
 kDa – kilodaltony
 P – fitochrom
 P_{fr} – forma fitochromu absorbująca światło dalekiej czerwieni
 P_r – forma fitochromu absorbująca światło czerwone
 R – światło czerwone (660 nm)

WSTĘP

Światło jest ważnym czynnikiem środowiskowym, wpływającym na wzrost i rozwój roślin. Stanowi ono dla nich podstawowe źródło energii wykorzystywanej w procesie fotosyntezy. Światło jest dla rośliny również źródłem informacji o zmianach zachodzących w otoczeniu. Sygnały świetlne odbierane są przez wyspecjalizowane receptory roślinne, z których najlepiej poznany jest fitochrom (P).

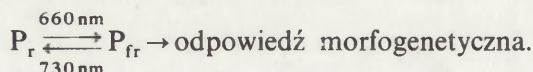
P odgrywa kluczową rolę w kontroli wzrostu i rozwoju roślin [4, 15, 26, 65]. Cząsteczka tego fotoreceptora jest rozpuszczalną w wodzie chromoproteiną zbudowaną z łańcucha polipeptydowego, połączonego konwalencyjnie z grupą chromoforową [43]. Grupę tę stanowi otwarty łańcuch tetrapiolowy [48, 49] zbliżony do fikocyjanobiliny [13]. W zależności od gatunku ciężar natywnej cząsteczki wynosi 120–127 kDa [63].

P występuje w dwóch formach molekularnych: P_r (o maksimum absorpcji przy 660 nm) i P_{fr} (z maksimum absorpcji przy 730 nm). Stosując naświetlanie światłem o odpowiedniej długości fali można przekształcić jedną formę w drugą według następującego schematu:



Po naświetleniu rośliny monochromatycznym R lub FR ustala się tzw. stan fotostacjonarny P, który jest przejściowym stanem równowagi, charakteryzującym ilościowy stosunek obu form P_r i P_{fr} fitochromu [37].

Fotokonwersji fitochromu z formy P_r w P_{fr} towarzyszy wyzwolenie wielu różnorodnych odpowiedzi morfogenetycznych. P_r jest nieaktywną, a P_{fr} aktywną fizjologicznie formą fitochromu. Przedstawiony już schemat można więc rozszerzyć w następujący sposób [43]:



Sama fotokonwersja P_r w P_{fr} nie wystarcza do zapoczątkowania określonej

odpowiedzi fotomorfogenetycznej. Istnieje skomplikowany łańcuch zdarzeń zapoczątkowany fotokonwersją fitochromu, a kończący się określoną odpowiedzią biologiczną, np. kiełkowaniem nasion czy inicjacją kwitnienia [15, 65]. Poszczególne ogniwa tego łańcucha nie zostały dotąd dokładnie poznane. Wydaje się jednak, że odkrycia ostatnich kilku lat pozwalają lepiej zrozumieć molekularne podstawy działania fitochromu.

1. OCZYSZCZANIE I OZNACZANIE FITOCHROMU

1.1. OCZYSZCZANIE FITOCHROMU

Dokładniejsze poznanie struktury i mechanizmu działania P było wynikiem rozwoju metod oczyszczania chromoproteiny. Pionierskie prace dotyczące izolacji P podjął Butler i wsp. [5]. Wszystkie stosowane obecnie metody są w zasadzie rozwinięciem techniki zastosowanej przez tych autorów.

1.1.1. Materiał

Obecność P stwierdzono w komórkach glonów, mszaków, paprotników oraz u wszystkich gatunków roślin wyższych. Jednakże najlepszym źródłem białka P są etiolowane tkanki tylko kilku roślin wyższych. Są to przede wszystkim owies (*Avena sativa* L.) [29, 59] oraz dynia (*Cucurbita pepo* L.) [61]. Tkanki etiolowane używane są z dwu powodów: zawierają znacznie większą ilość P niż tkanki rosnące na świetle (10–100 razy) oraz nie zawierają chlorofilu, który uniemożliwia spektralny pomiar P w trakcie oczyszczania. Rośliny motylkowe, takie jak groch (*Pisum sativum* L.), nie są dobrym materiałem, ponieważ zawierają saponinę – trójterpenoid, który zniekształca własności spektralne chromoproteiny.

1.1.2. Ekstrakcja fitochromu

Dwoma głównymi problemami w oczyszczaniu P są wyjątkowa wrażliwość fitochromu na posthomogenizacyjną proteolizę [57, 58] oraz fakt, że rośliny często zawierają wysokie stężenia związków fenolowych, które po homogenizacji szybko modyfikują fitochrom [16]. Chociaż problemy te występują przy oczyszczaniu większości białek roślinnych, to jednak okazuje się, że P jest szczególnie wrażliwy na działanie obu czynników. W związku z tym zachodzi konieczność stosowania szczególnych warunków jego ekstrakcji, mających na celu minimalizację tych efektów.

Problem proteolitycznej modyfikacji P podczas oczyszczania został częściowo rozwiązany z chwilą wprowadzenia techniki szybkiej izolacji i identyfikacji tej chromoproteiny [57–59]. Obecnie wiadomo, że P, występujący

w tkankach wszystkich przebadanych roślin, jest wrażliwy na P_r -specyficzną proteazę lub proteazy obecne w surowych ekstraktach roślinnych [57, 63]. Proteoliza ta modyfikuje N-końcowy fragment polipeptydu i jest tak szybka, nawet w temperaturze 0°C , że w normalnym czasie, koniecznym do oczyszczenia P, większość cząsteczek białka ulega degradacji. W celu wyeliminowania tych skutków stosuje się:

- 1) przekształcenie P do bardziej proteolitycznie odpornej formy P_{fr} ;
- 2) dodawanie do homogenatów inhibitora proteaz, fluorku α -toluenosulfonylu (PMSF), który hamuje odpowiednie proteazy;
- 3) wykonywanie czynności związanych z izolacją w temperaturze bliskiej 0°C , w możliwie najkrótszym czasie.

Modyfikacje przez fenole są bardzo rozpowszechnionym, choć często nie docenianym problemem przy oczyszczaniu białek roślinnych. Modyfikacje takie mogą silnie wpływać na pomiar spektralny P oraz zmieniać inne jego właściwości [6]. Najpowszechniejszą metodą minimalizacji modyfikacji białka P przez związki fenolowe jest dodawanie do roztworów ekstrakcyjnych substancji redukujących, takich jak 2-merkaptoetanol lub wodorosiarczyn sodowy. Związki te przeciwdziałają powstawaniu utleniających warunków, w których zachodzi tworzenie reaktywnych polifenoli.

1.1.3. Oczyszczanie fitochromu

Metody ekstrakcji P można podzielić na trzy grupy:

- 1) metody konwencjonalne, stosowane przed 1983 r., prowadzące do uzyskania częściowo zdegradowanego białka o ciężarze cząsteczkowym 60 i 120 kDa [10, 16, 33, 46];
- 2) metody z zastosowaniem specjalnych warunków ekstrakcji (naświetlanie światłem czerwonym, stosowanie inhibitorów proteaz), dzięki którym uzyskuje się białko niezdegradowane o ciężarze 124 kDa [59, 60];
- 3) metody chromatograficzne z wykorzystaniem specyficznego immunoadsorpcji [20].

W pierwszym pracach dotyczących oczyszczania P donoszono, że ciężar cząsteczkowy tego białka wynosi 60 kDa [10, 39] lub 120 kDa [16, 46]. Stosunkowo wcześniej wykazano, że 60 kDa cząsteczka P jest produktem proteolizy białka o masie 120 kDa [46]. Niedawno okazało się, że oba te białka powstają w wyniku posthomogenizacyjnej modyfikacji natywnego P o masie 124 kDa [29, 59, 60].

Uzyskanie niezdegradowanego białka P było możliwe dzięki zastosowaniu specjalnych warunków ekstrakcji, o których już tu pisano. Przykładowy schemat takiej metody przedstawiono w tab. 1. Metoda ta polega na wytrącaniu białek kolejno polietylenoiminą oraz siarczanem amonowym. Wytrącone białka poddaje się następnie chromatografii na kolumnach z hydroksyapatytem i Affi-Gel Blue (Bio-Rad) oraz sączeniu na Biogel A1.5M

TABELA 1
Oczyszczanie fitochromu o masie 124 kDa z 1 kg etiolowanych siewek owsa [59]

Etapy oczyszczania	Ilość fitochromu $A(AA)^*$	Ilość białka [mg]	Wydajność [%]	Stopień oczyszczenia
surowy ekstrakt	20,9	6820	100	1
supernant po wytrąceniu białek	17,7	5770	85	1
frakcjonowanie białek siarczanem amonu	12,8	385	61	11
chromatografia na hydroksyapatycie	5,8	20,4	28	93
chromatografia na Affi-Gel Blue	3,9	8,0	19	163
chromatografia na Bio-Gel A1.5M	2,7	4,1	13	220

* $1,118 A(AA) = 1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ 124 kDa fitochromu z etiolowanych siewek owsa [62]

[59]. Wszystkie stosowane roztwory buforowe zawierają 2-merkaptoetanol i PMSF. Preparaty otrzymywane tą metodą wykazują całkowitą fotoodwracalność oraz brak ciemnej rewersji P_r w P_{fr} , która jest wskaźnikiem denaturacji białka P.

1.2. OZNACZANIE FITOCHROMU

Stosowane obecnie metody oznaczania P dzielą się na dwie grupy. Są to techniki spektrofotometryczne i immunologiczne. Pierwsze opierają się na unikatowych właściwościach spektralnych tego fotoreceptora, drugie na możliwości uzyskiwania specyficznych przeciwciał do P.

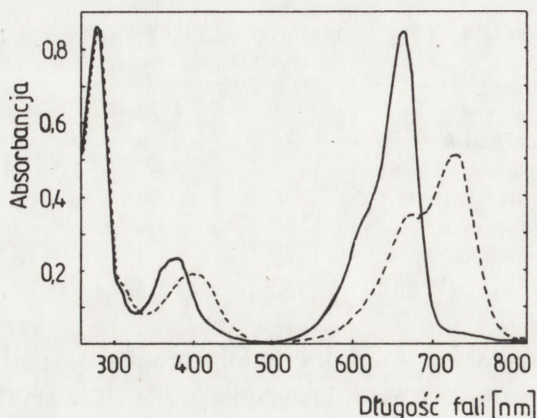
1.2.1. Metody spektrofotometryczne

Ponieważ zarówno forma P_r , jak i P_{fr} niezdegradowanego P absorbują światło w zakresie widzialnym (ryc. 1), pomiary spektrofotometryczne umożliwiają więc szybkie oznaczanie tej chromoproteiny. Oznaczenia można dokonywać poprzez bezpośredni pomiar absorpcji światła, bądź też metodą różnicową, wykorzystującą szczególną własność P, jaką jest zdolność do wykazywania fotoodwracalnych zmian absorpcji światła [4].

Bezpośredni pomiar absorpcji światła jest najprostszą i łatwą w zastosowaniu metodą oznaczania P. Jednakże roztwory, w których dokonuje się pomiaru, nie mogą zawierać innych barwników absorbujących w czerwonym zakresie widma światła białego. Ponieważ współczynnik ekstynkcji dla formy P_r fitochromu przy 660 nm jest około 1,5 raza wyższy niż dla formy P_{fr} przy 730 nm [29], metoda jest więc bardziej czuła dla pierwszej z wymienionych form P. Z bezpośrednich pomiarów można wyliczyć stężenie P, opierając się na prawie Lamberta-Beera:

$$A = alc$$

gdzie A – absorbancja próby, a – współczynnik ekstynkcji, l – długość drogi światła przechodzącego przez próbę, c – stężenie P.



Ryc. 1. Widmo absorpcyjne natywnego 124 kDa fitochromu izolowanego z etiolowanych siewek owsa. Linia ciągła – widmo fitochromu P_r (po naświetleniu światłem czerwonym), linia przerywana – widmo fitochromu uzyskane po naświetleniu światłem dalekiej czerwieni [48]

Najczęściej stosowane spektralne oznaczenie P związane jest z pomiarem zmian absorpcji $\Delta(A)$, które są wynikiem fototransformacji P między formami P_r i P_{fr} . Ponieważ P jest jedynym białkiem roślinnym, wykazującym takie zmiany absorpcji, pomiarów jego stężenia można więc dokonywać nawet wtedy, kiedy w roztworze znajdują się inne barwniki absorbujące w tym samym zakresie widma. Przy oznaczaniu wykorzystuje się fakt, iż na skutek indukowanej światłem czerwonym konwersji formy P_r w P_{fr} absorbancja P przy 660 nm obniża się, a wzrasta przy 730 nm (ryc. 1). Naświetlenie światłem dalekiej czerwieni powoduje wzrost absorbancji przy 660 nm i spadek przy 730 nm. Stężenie oznaczonego w ten sposób P jest proporcjonalne do podwójnej różnicy absorpcji $\Delta(A)$, która wyrażona jest wzorem:

$$\Delta(A) = (A_{660}^{FR} - A_{730}^{FR}) - (A_{660}^R - A_{730}^R),$$

gdzie $A_{660}^{FR} - A_{730}^{FR}$ – różnica między absorbancją przy 660 i 730 nm po naświetleniu próby FR, $A_{660}^R - A_{730}^R$ – różnica między absorbancją przy 660 i 730 nm po naświetleniu próby R.

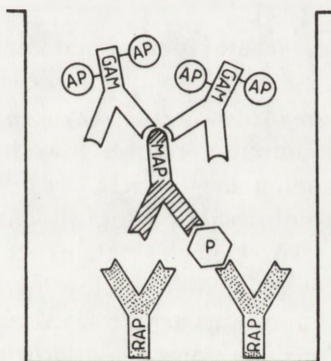
Spektrofotometria różnicowa ma tę zaletę, że można ją stosować do oznaczania P w próbach rozpraszających, np. fragmentach tkanek czy też w zawiesinach.

Metody spektrofotometryczne mają kilka istotnych ograniczeń. Przede wszystkim metodami tymi nie można oznaczać fitochromu pozbawionego grupy chromoforowej oraz fitochromu obecnego w zielonych tkankach, czy też ekstraktach zawierających chlorofil.

1.2.2. Metody immunochemiczne

Metody immunochemiczne są znacznie czulsze od spektrofotometrycznych. Ponadto przy ich stosowaniu nie występują wymienione ograniczenia metod spektrofotometrycznych. Największą wadą metod immunochemicznych jest niemożność rozróżniania cząsteczki pozbawionej od posiadającej grupę chromoforową. Dużą trudnością w stosowaniu metod immunochemicznych jest również otrzymywanie odpowiednich przeciwciał.

Istnieje kilka metod immunochemicznego oznaczania P. Dwiema najczęściej używanymi metodami są metody radioimmunochemiczne (RIA) [21] oraz oznaczania z zastosowaniem przeciwciał sprzężonych z enzymami (ELISA) [38, 52]. Pomiar zawartości P w ekstrakcie metodami radioimmunochemicznymi polega na jego zdolności do współzawodniczenia z wyznakowanym oczyszczonym P w wiązaniu się z ograniczoną ilością przeciwciała. W wyniku tego współzawodnictwa ilość związanego znakowanego P jest odwrotnie proporcjonalna do ilości P w analizowanym ekstrakcie. Czulość tej metody wynosi około 2 ng P w próbce [21]. W odróżnieniu od RIA, ilość P metodą ELISA określa się na podstawie aktywności enzymatycznej enzymu sprzężonego z przeciwciałem. Najczulszym wariantem metody ELISA do oznaczania P jest technika sandwich (ryc. 2). W metodzie tej królicze przeciwciała skierowane przeciw P



Ryc. 2. Oznaczanie fitochromu z zastosowaniem przeciwciał sprzężonych z enzymami (ELISA). RAP – królicze przeciwciała przeciw fitochromowi, MAP – mysie przeciwciała przeciw fitochromowi, GAM – kozie przeciwciała do mysich immunoglobulin G, AP – alkaliczna fosfataza, P – fitochrom [62]

zaadsorbowane są na powierzchni zagłębień (studzienek) specjalnej płytki. Do studzienki dodaje się roztworu zawierającego P. Podczas inkubacji cząsteczki P łączą się z zaadsorbowanymi na ściankach studzienki przeciwciałami, tworząc kompleks antygen–przeciwciała. Po przepłukaniu płytek do studzienek wprowadza się przeciwciała przeciwko P uzyskane od myszy,

a następnie kozie przeciwciała przeciwko mysim immunoglobulinom. To ostatnie przeciwciało sprzężone jest z enzymem. W ostatnim etapie procedury do studzienki wprowadza się substrat dla danego enzymu, a produkt reakcji oznacza się spektrofotometrycznie.

2. SYNTEZA FITOCHROMU

Poziom P podlega zmianom ontogenetycznym. Wewnątrzkomórkowe stężenie tej chromoproteiny regulowane jest czynnikami endo- i egzogennymi [44]. W początkowych stadiach rozwojowych etiolowanych siewek owsa cząsteczki P syntetyzowane są de novo i akumulowane w formie P_r . Ta względna stałość poziomu P ustala się w momencie wyrównania szybkości syntezy i degradacji tego barwnika. W ciemności fitochrom w formie P_r podlega powolnej destrukcji [21]. Naświetlaniu etiolowanych roślin światłem białym lub R towarzyszy szybki spadek poziomu P. Spadek ten jest rezultatem fotokonwersji P_r w P_{fr} . P_{fr} ulega około 100 razy szybszej degradacji w porównaniu z P_r . W tkankach roślin rosnących na świetle poziom P jest około 98–99% niższy w porównaniu ze stężeniem tego barwnika rejestrowanym w siewkach roślin rosnących w ciemności [21]. Po przeniesieniu roślin ze światła do ciemności następuje powolna reakumulacja P, wynikająca ze wzrostu tempa syntezy P_r [44].

Regulacja syntezy przez światło polega na kontroli tempa transkrypcji fitochromowego mRNA i regulacji jego żywotności [43]. Naświetlaniu roślin światłem białym lub czerwonym towarzyszy szybki spadek poziomu fitochromowego mRNA [7]. Krótki impuls (5 min) R powoduje w ciągu 5 godz. ponad 90% spadek zawartości wspomnianego mRNA [8]. W etiolowanych siewkach owsa przeniesionych na światło białe poziom fitochromowego mRNA spada do około 2% poziomu rejestrowanego w tkankach siewek owsa wyrosłych w ciemności [2]. Również w przypadku etiolowanych siewek grochu, poddanych działaniu światła (1–2 godz.), następuje szybki, ponad 90% spadek RNA [34]. Zarówno w przypadku siewek owsa, jak i grochu efekt działania R może być zahamowany i odwrócony w wyniku naświetlania tych roślin FR [8, 17, 34]. Odminną, w porównaniu z wymienionymi tu gatunkami roślin, sytuację stwierdzono w siewkach dyni. W etiolowanych siewkach tej rośliny, naświetlanych światłem czerwonym lub białym, obserwowano odpowiednio 40–50 i 60% spadek poziomu fitochromowego mRNA w porównaniu z roślinami kontrolnymi [28]. Wywołany światłem czerwonym spadek zawartości badanego mRNA nie podlegał rewersji w wyniku naświetlania siewek dyni światłem dalekiej czerwieni.

Nie jest znany wpływ P na aktywność transkrypcyjną własnych genów. W genomie siewek owsa stwierdzono obecność co najmniej 4 genów uczestni-

czących w syntezie tego barwnika [17, 18]. W wyniku porównania sekwencji dwóch z tych genów wykryto około 98% homologii nukleotydów odcinków kodujących oraz niepodlegających translacji odcinków 5-końcowych. Niepodlegające translacji odcinki 3'-końcowe wykazały jedynie 34% homologii sekwencji nukleotydów [18]. Ta duża niehomologia fragmentów 3'-końcowych rokuje nadzieje na możliwość badania ekspresji poszczególnych genów u owsa [45].

Pomimo małej ilości danych oraz pewnych sprzeczności wyników, można przypuszczać, że P reguluje wewnątrzkomórkowy poziom swych własnych cząsteczek [7, 8, 34]. Regulacja syntezy tego barwnika może odbywać się na poziomie transkrypcji, translacji i posttranslacyjnym [45].

3. STRUKTURA FITOCHROMU

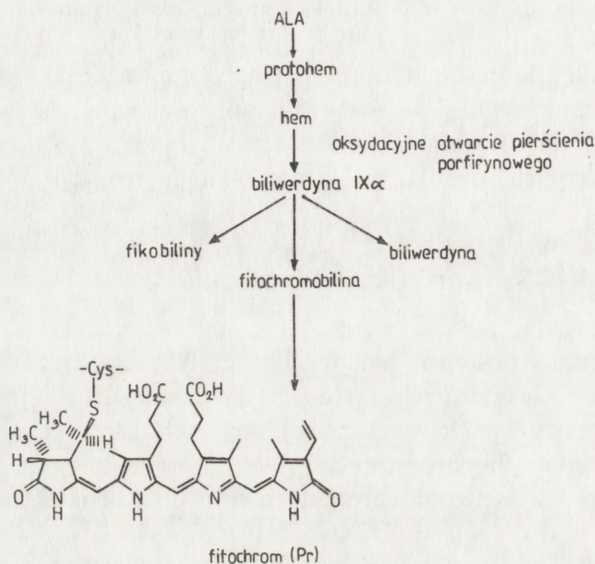
Nastąpił znaczny postęp w badaniach nad strukturą fitochromu. Wprowadzenie zarówno nowoczesnych metod fizykochemicznych, stosowanie kontrolowanej proteolizy i przeciwciał monoklonalnych, jak i techniki klonowania i sekwencjonowania fitochromowego cDNA pozwoliło stosunkowo dobrze poznać strukturę i właściwości chromoforowego oraz białkowego składnika P.

3.1. GRUPA CHROMOFOROWA

Z obu składników P, tj. chromoforowego i białkowego, pierwszy poznany jest tylko w niewielkim stopniu. Już ponad 20 lat temu ustalono, że grupa chromoforowa P syntetyzowana jest z kwasu δ -aminolewulinowego – ALA [2] i zbudowana jest z otwartego łańcucha tetrapiolowego [47]. Chromoforowy składnik P swą budową chemiczną zbliżony jest do fikobiliny – fotosyntetycznego barwnika niektórych glonów, oraz biliwerdyny – niebieskiego barwnika zwierząt [3]. To niezwykle podobieństwo barwników spełniających odmienne funkcje u roślin i u zwierząt pozwala wnioskować o wspólnym ich pochodzeniu. Biosynteza grup chromoforowych P i fikobilin może w początkowych etapach przebiegać podobnie jak biliwerdyny [3]. Prekursorem tych trzech barwników wydaje się hem, który na drodze oksydacyjnego otwarcia pierścienia porfiryнового przekształca się w biliwerdynę IX α [1]. Biliwerdyna IX α po przekształceniu się w fitochromobilinę [13] przyłączana jest kowalencyjnym wiązaniem tioeterowym do 321 aminokwasu łańcucha polipeptydowego P [62], dając cząsteczkę fitochromu P_r.

Badania ostatnich lat wykazały, że syntezy białkowego składnika i grupy chromoforowej P mogą odbywać się niezależnie od siebie [13, 25]. Wykazano,

że gabakulina (kwas 5-amino-1,3-cykloheksadienylokarboksylowy) znacznie skuteczniej hamuje biosyntezę grupy chromoforowej w porównaniu z częścią białkową P. Inhibicyjny wpływ gabakuliny na syntezę P znoszony jest w wyniku egzogenego podania ALA oraz biliwerdyny IX α [13]. Wyniki te

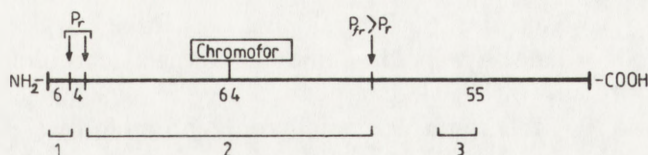


Ryc. 3. Przebieg biosyntezy grupy chromoforowej fitochromu (na podstawie [13], zmodyfikowane)

wskazują na udział obu tych związków w syntezie grupy chromoforowej P, jak również na możliwość niezależnej syntezy białkowego i chromoforowego składnika omawianego barwnika roślinnego. Na podstawie obecnie dostępnej literatury można zaproponować szlak biosyntezy chromoforu P (ryc. 3).

3.2. BIAŁKO FITOCHROMU

Najlepiej dotąd poznano budowę P izolowanego z etiolowanych siewek owsa. Białko P uzyskane z siewek tej rośliny zbudowane jest z 1128 aminokwasów [17, 18]. Jego ciężar cząsteczkowy wynosi 124 kDa [57, 58]. Dwie 124 kDa cząsteczki P łącząc się wiązaniami jonowymi i siłami elektrostatycznymi tworzą dimer. Ciężar dimeru wynosi 253 kDa [23]. Cząsteczki wchodzące w skład dimeru są ze sobą luźno związane i łatwo dysocjują pod wpływem roztworów o dużej sile jonowej. Podczas tego procesu nie obserwuje się zmian widma P [62]. Zastosowanie kontrolowanej proteolizy pozwoliło określić, które z obszarów polipeptydu uczestniczą w procesie dimeryzacji. Ustalono, że w wyniku enzymatycznego trawienia cząsteczka P rozpada się na



Ryc. 4. Schemat ilustrujący budowę cząsteczki fitochromu. Strzałki przedstawiają miejsca wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych. Klamrami zaznaczono trzy typy determinantów dla przeciwciał monoklonalnych [45]

dwa nierówne fragmenty (ryc. 4): większy, globularny fragment N-końcowy o masie 74 kDa oraz wydłużony odcinek C-końcowy o masie 55 kDa [23, 24]. W procesie dimeryzacji uczestniczą jedynie domeny C-końcowe, natomiast globularne domeny N-końcowe wiążą grupy chromoforowe i odpowiadają za spektralne właściwości P [62].

3.3. MOLEKULARNE RÓŻNICE MIĘDZY P_r i P_{fr}

Do badania przestrzennej struktury P używa się m.in. metodę ograniczonej proteolizy oraz przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw różnym determinantom chromoproteiny. Obecne w ekstraktach roślinnych enzymy proteolityczne atakują jedynie określone miejsca polipeptydu [57, 63]. Miejskami szczególnie wrażliwymi na działanie proteaz są N-końcowy oraz środkowy odcinek cząsteczki P. Enzymy te powodują uwalnianie 6 bądź 10 kDa fragmentu N-końcowego oraz dłuższego 55 kDa odcinka C-końcowego (ryc. 4). Odszczepianie wspomnianych polipeptydów następuje w wyniku proteolitycznego ataku na 53, 91 i 648 aminokwas chromoproteiny [62]. Działanie proteaz na cząsteczki P zależne jest od formy molekularnej, w jakiej występuje ten barwnik. Proteolityczny atak na środkowy 648 aminokwas polipeptydu jest bardziej specyficzny dla P_{fr} , natomiast odszczepienie 6 kDa domeny N-końcowej charakteryzuje fitochrom w formie P_r [45]. 6 kDa N-końcowy fragment chromoproteiny stanowi determinant (epitop) dla przeciwciał monoklonalnych 1 typu [45]. Oprócz wspomnianego determinantu wyróżniono dwa dodatkowe, przyłączające przeciwciała typu 2 i 3 (ryc. 4). Przeciwciała 1 typu wykazują 4–5-krotnie większe powinowactwo do P_r niż P_{fr} [9, 45]. Przeciwciała monoklonalne typu 2 i 3 wykazują podobne powinowactwo zarówno do formy P_r , jak i do P_{fr} cząsteczek P izolowanego z siewek owsa [45].

Dane uzyskane na podstawie proteolitycznej degradacji P, stosowania przeciwciał monoklonalnych i badań spektrofotometrycznych sugerują, że podczas fotokonwersji P zachodzą konformacyjne zmiany w obrębie części białkowej i chromoforowej barwnika. W trakcie fotokonwersji P_r w P_{fr} obserwuje się 31° rotację grupy chromoforowej względem łańcucha polipeptydowego [11] oraz przemieszczenie 6 kDa odcinka końcowego w głąb cząstecz-

ki P [45]. N-końcowy, 6 kDa fragment cząsteczki P wykazuje dużą hydrofilność i odpowiada za współdziałanie białkowego i chromoforowego składnika chromoproteiny [58–60]. Przypuszcza się, że ten powierzchniowy odcinek cząsteczki P_r fitochromu ochrania grupę chromoforową przed zewnętrznym środowiskiem wodnym [12, 53].

3.4. FITOCHROM W ROŚLINACH ZIELONYCH

Badania P w roślinach zielonych napotykać ciągle wiele trudności [27]. Wynikają one z obecności chlorofilu uniemożliwiającego spektrofotometryczne mierzenie poziomu P [36] oraz z 50–100-krotnie niższej jego zawartości w roślinach zielonych niż w etiolowanych [20, 21]. Wprowadzenie do badań herbicydu SAN 9789, hamującego biosyntezę karotenoidów i akumulację chlorofilu [22], metod szybkiej eliminacji chlorofilu z ekstraktów [56] oraz przeciwciał monoklonalnych [37] pozwoliło dokładniej poznać molekularne właściwości P roślin zielonych.

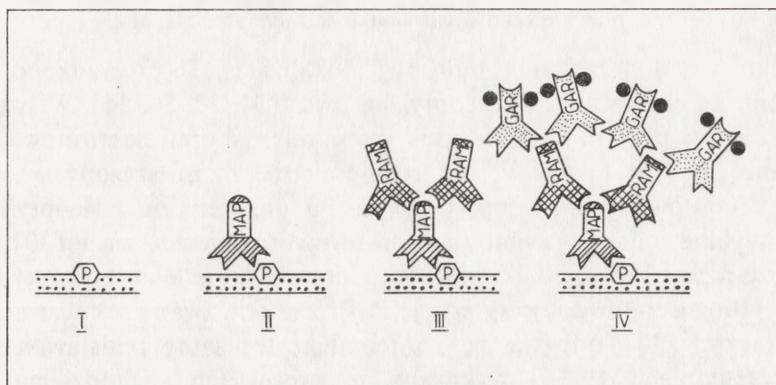
Okazało się, że cząsteczki P izolowane z zielonych i etiolowanych siewek owsa różnią się pod wieloma względami. P zielonych siewek tej rośliny ma ciężar cząsteczkowy rzędu 118 kDa, a maksimum absorpcji dla formy P_r przesunięte jest o 15 nm (z 667 w siewkach etiolowanych do 652 w zielonych) [62].

4. LOKALIZACJA FITOCHROMU

Pełne zrozumienie działania P wymaga poznania jego tkankowej i komórkowej lokalizacji. Duży postęp w badaniach rozmieszczenia tego barwnika przyniosło wprowadzenie metod immunocytochemicznych. Metody te polegają na stosowaniu znakowanych przeciwciał przeciw białkowemu składnikowi P i pozwalają na jego lokalizację na poziomie mikroskopu świetlnego i transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

W ciągu kilku lat badań stosowano kilka odrębnych metod lokalizacji P. Pierwotnie do tego celu stosowano wiele przeciwciał poliklonalnych, wyznakowanych kompleksem peroksydaza–antyperoksydaza [39]. Ostatnio wprowadzono do badań przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciw określonym determinantom cząsteczki P, wyznakowane rodaminą [50] bądź koloidalnym złotem [32, 54].

Wykrywanie fitochromu w tkankach roślinnych przedstawia ryc. 5. Utrwalony materiał w zależności od potrzeb przesycany jest roztworem sacharozy [50] lub zatapia w żywicy, np. w Lowicrylu [31, 32, 54]. Po uzyskaniu półcienkich, kriostatowych lub ultracienkich skrawków barwi się je przy użyciu wcześniej wyznakowanego przeciwciała. Ostatnio stosuje się wieloetapową procedurę



Ryc. 5. Przebieg wieloetapowej procedury immunocytochemicznej lokalizacji fitochromu. Oznaczenia jak do ryc. 2

barwienia, polegającą na traktowaniu skrawków roztworami kolejnych przeciwciał. Obecny na powierzchni skrawka P (ryc. 5, etap I) łączy się ze specyficznymi, skierowanymi przeciw określonemu epitowi, monoklonalnymi przeciwciałami mysimi (MAP, II etap). Do kompleksu tego przyłącza się przeciwciała królicze skierowane przeciw przeciwciałom mysim (MAP + RAM, III etap). W ostatnim etapie do drugiego, nie zablokowanego miejsca przyłącza się kozią immunoglobulinę (MAP + RAAM + GAR, IV etap) w zależności od potrzeby wyznakowaną barwnikiem fluorescencyjnym, np. fluoresceiną [50], bądź koloidalnym złotem [32, 54].

4.1. TKANKOWA LOKALIZACJA FITOCHROMU

Większość dotychczas przeprowadzonych badań nad tkankową lokalizacją P dotyczy etiolowanych pędów traw [39–41]. Sporadycznie zajmowano się badaniem rozmieszczenia P w tkankach innych roślin nago- i okrytonasiennych [41]. Największe ilości P występują w komórkach powstających bezpośrednio z merystemów [40]. Komórki merystematyczne oraz komórki subapikalnej strefy pędów traw zawierają znacznie mniejsze ilości P. Poza strefą submerystematyczną wierzchołków koleoptyli owsa [41] P zlokalizowano również w pobliżu węzła etiolowanych siewek tych roślin, w miejscu połączenia koleoptyla z pierwszym liściem i mezokotylem. Obecność P stwierdzono również w czapeczce korzeniowej [41] oraz w otoczonych przez tkanki korzenia pierwotnego wierzchołkach rozwijających się korzeni przybyszowych [41].

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań zdają się wskazywać, że rozmieszczenie P może być cechą stałą dla danej tkanki i gatunku [40, 41, 50].

4.2. WEWNĄTRZKOMÓRKOWA LOKALIZACJA FITOCHROMU

Badania nad wewnątrzkomórkową lokalizacją P prowadzono przede wszystkim na etiolowanych koleoptylach owsa [31, 32, 50, 54]. W badaniach prowadzonych przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego [40] wykazano, że P w formie P_r jest równomiernie rozmieszczony w cytozolu komórek etiolowanych koleoptyli owsa. Po naświetlaniu koleoptyli R zachodzą szybkie zmiany wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia P [30]. Stwierdzono, że nawet krótkie, kilkunastosekundowe naświetlenie koleoptyli światłem o tej długości powoduje agregację P. Proces ten, zwany sekwestracją (ang. sequestration) [30], odbywa się na terenie cytoplazmy podstawowej. Najnowsze badania [31, 54] wykazały, że proces ten zachodzi na terenie niewielkich obszarów cytoplazmy o wymiarach do 1 μm . W obrębie tych struktur nie stwierdzono obecności membran [32, 54]. Wykazano, że obserwowana *in vitro* tzw. osadzalność (ang. pelletability) P [35, 42] polega na łączeniu się cząsteczek P z nie zidentyfikowanymi strukturami cytoplazmatycznymi. Struktury te, pozbawione membran, wyglądem przypominają miejsca, w których zachodzi sekwestracja P *in vivo* [32].

Zjawisko sekwestracji P obserwowano w komórkach koleoptyli owsa, pszenicy, kukurydzy [14] oraz grochu [50]. Coraz więcej danych wskazuje, że proces ten związany jest z degradacją P [55].

Indukowana R sekwestracja P_{fr} wykazuje odwracalność pod wpływem naświetlania badanych tkanek FR [31, 55]. Po 1–2 godz. od rozpoczęcia naświetlania P występuje ponownie w formie rozpuszczalnej, rozproszony w cytoplazmie podstawowej komórek koleoptyli owsa [31, 55].

5. DEGRADACJA FITOCHROMU

Specyficzne działanie P polega m.in. na szybkim usuwaniu tego barwnika po odbiorze bodźca świetlnego, inicjującego łańcuch zdarzeń prowadzących do powstania określonej odpowiedzi morfogenetycznej. Degradacja obu form P charakteryzuje się odmiennym przebiegiem i czasem trwania. Czas połowicznego rozpadu cząsteczki P_r wynosi ok. 100 godz., natomiast po konwersji P_r w P_{fr} spada ok 100 razy, czyli do 1 godz. [44]. Jak wspomniano w rozdziale poświęconym izolacji P, cząsteczki tej chromoproteiny podlegają szybkiej destrukcji pod wpływem enzymów proteolitycznych. Proces proteolitycznego rozkładu P zależy od formy, w jakiej występuje barwnik. Częściowa degradacja 124 kDa cząsteczki P do form o masach 118 i 114 kDa jest specyficzna dla P_r , podczas gdy leżące w środkowej części polipeptydu miejsce atakowane jest przez proteazy po konwersji P_r w P_{fr} (ryc. 4) [57, 58]. Częściowa degradacja P, prowadząca do powstania form o niższym ciężarze cząsteczkowym, zachodzi prawdopodobnie w ekstraktach roślinnych po uwol-

nieniu endogennych proteaz. Natomiast podczas destrukcji P *in vivo* obserwuje się powstanie form o wyższym ciężarze cząsteczkowym. Po naświetleniu siewek owsa R stwierdzono pojawienie się populacji białek o ciężarze od 129 do 160 kDa. Ich powstawanie obserwuje się już 5 min po naświetleniu siewek, a maksimum tego procesu rejestruje się między 90 a 180 min od zakończenia naświetlania. Następnie pojawia się białko o coraz niższym ciężarze cząsteczkowym. Vierstra i wsp. [64] wykazali, że podobnie jak w przypadku większości krótko żyjących białek zwierzęcych [19], proces degradacji P odbywa się przy udziale ubikuityny (ang. ubiquitine). Obecność tego 71-aminokwasowego polipeptydu stwierdzono u wszystkich organizmów zwierzęcych i roślinnych [19, 64]. Po naświetleniu siewek owsa, do formy P_{fr} fitochromu przyłączonych jest od 1 do 7 cząsteczek tego białka [51]. Proces ten zachodzi w tych obszarach cytoplazmy, w których obserwuje się sekwestrację P [54] i dostarcza sygnału niezbędnego do zapoczątkowania selektywnej proteolizy P_{fr} [51].

LITERATURA

- [1] BEALE S. J., CORNEJO J., Biosynthesis of phycocyanobilin from exogenous labeled biliverdin in *Cyanidium caldarium*, Arch. Biochem. Biophys., **227**: 279–286, 1983.
- [2] BONNER B. A., Incorporation of delta-aminolevulinic acid into the chromophore of phytochrome, Plant Physiol., **42**: S-11, 1967.
- [3] BROWN S. B., HOLROYD J. A., VERNON D. I., Biosynthesis of phycobiliproteins. Incorporation of biliverdin into phycocyanin of red alga *Cyanidium caldarium*, Biochem. J., **219**: 905–909, 1984.
- [4] BUTLER W. L., Absorption spectroscopy *in vivo*: theory and application, Ann. Rev. Plant Physiol., **15**: 451–470, 1964.
- [5] BUTLER W. L., NORRIS K. H., SIEGELMAN H. W., Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **45**: 1703–1708, 1959.
- [6] CHA T.-A., MAKI A. M., LAGARIAS J. C., Low-temperature luminescence characterization of 124-kdalton phytochrome from *Avena sativa*, Biochemistry, **22**: 2846–2851, 1983.
- [7] COLBERT J. T., HERSHEY H. P., QUAIL P. H., Autoregulatory control of translatable phytochrome mRNA levels, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**: 2248–2252, 1983.
- [8] COLBERT J. T., HERSHEY H. P., QUAIL P. H., Phytochrome regulation of phytochrome mRNA abundance, Plant Molec. Biol., **5**: 91–101, 1985.
- [9] CORDONNIER M. M., GREPPIN H., PRATT L. H., Monoclonal antibodies with differing affinities to the red-absorbing and far-red-absorbing forms of phytochrome, Biochemistry, **24**: 3246–3253, 1985.
- [10] CORRELL D. L., EDWARDS J. L., KLEIN W. H., SHROPSHIRE W., Jr., Phytochrome in etiolated annual rye. III. Isolation of photoreversible phytochrome, Biochim. Biophys. Acta, **168**: 36–45, 1968.
- [11] ECKELUND N. G. A., SUNDQUIST C., QUAIL P. H., VIERSTRA R. D., Chromophore rotation in 124 kDa phytochrome as measured by changes in light-induced linear dichroism, Photochem. Photobiol., **41**: 221–224, 1985.

- [12] EILFELD P., RÜDIGER, W., On the reactivity of native phytochrome, *Z. Naturforsch.*, **39**: 742–745, 1984.
- [13] ELICH T. D., LAGARIAS J. C., Phytochrome chromophore biosynthesis. Both 5-aminolevulinic acid and biliverdin overcome inhibition by gabaculine in etiolated *Avena sativa* L. seedlings, *Plant Physiol.*, **84**: 304–310, 1987.
- [14] EPEL B. L., BUTLER W. L., PRATT L. H., TOKUYASU K.T., Immunofluorescence localization studies of the P_r and P_{fr} forms phytochrome in the coleoptile tips of oats, corn and wheat, [w] *Photoreceptors and plant development*, red. Greff, J. D., Antwerpen University Press, Antwerpen 1980, 121–133.
- [15] FRANKLAND B., TAYLORSON R., Light control of seed germination, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series, Vol. 16, Photomorphogenesis, red. Shropshire W., Jr., Mohr H., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1983, 428–456.
- [16] GARDNER G., PIKE C. S., RICE H. F., BRIGGS W. R., “Disaggregation” of phytochrome in vivo – a consequence of proteolysis, *Plant Physiol.*, **64**: 332, **48**: 686–693, 1971.
- [17] HERSHEY H. P., BARKER R. F., COLBERT J. T., LISSEMORE J. L., QUAIL P. H., Phytochrome: Molecular properties, feedback regulation of mRNA levels and genomic clone isolation, [w] *Molecular Form and Function of Plant Genome*, red. Vloten-Doting, L. van Groot G. S. P., Hall T. C., Plenum Publ. Corp. 1985, 101–111.
- [18] HERSHEY H. P., BARKER R. F., IDLER K. B., LISSEMORE J. L., QUAIL P. H., Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for phytochrome: complete amino acid sequence for two gene products expressed in etiolated *Avena*, *Nucl. Acids Res.*, **13**: 8543–8559, 1985.
- [19] HERSHKO A., CIECHANOVER A., Mechanisms of interacellular protein breakdown, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**: 335–364, 1982.
- [20] HUNT R. E., PRATT L. H., Phytochrome immunoaffinity purification, *Plant Physiol.*, **64**: 332–336, 1979
- [21] – Phytochrome radioimmunoassay, *Plant Physiol.*, **64**: 327–331, 1979.
- [22] JABBEN M., DEITZER G. F., Spectrophotometric phytochrome measurements in light-grown *Avena sativa* L., *Planta* **143**: 309–313, 1978.
- [23] JONES A. M., QUAIL P. H., Quaternary structure of 124-kDa phytochrome from *Avena*, *Biochemistry*, **25**: 2987–2995, 1986.
- [24] JONES A. M., VIERSTRA R. D., DANIELS S. M., QUAIL P. H., The role of separate molecular domains in the structure of phytochrome from etiolated *Avena sativa* L., *Planta*, **164**: 501–506, 1985.
- [25] JONES A. M., ALLEN C. D., GARDNER G., QUAIL P. H., Synthesis of phytochrome apoprotein and chromophore are not coupled obligatorily, *Plant Physiol.*, **81**: 1014–1016, 1986.
- [26] KOPCEWICZ J., Rola fitochromu we wzroście i rozwoju roślin, *Wiad. Bot.*, **24**: 67–84, 1980.
- [27] LECHARNY A., Phytochrome and green plants, *Physiol. Veg.*, **23**: 963–982, 1985.
- [28] LISSEMORE J. L., COLBERT J. T., QUAIL P. H., Cloning of cDNA for phytochrome from etiolated *Cucurbita* and coordinate photoregulation of the abundance of two distinct phytochrome transcripts, *Plant Molec. Biol.*, **8**: 485–496, 1987.
- [29] LITTS J. C., KELLEY J. M., LAGARIAS J. C., Structure-function studies on phytochrome: Preliminary characterization of highly purified phytochrome from *Avena sativa* enriched in the 124-kilodalton species, *J. Biol. Chem.*, **258**: 11025–11031, 1985.
- [30] MACKENZIE J. M. Jr., COLEMAN R. A., BRIGGS W. R., PRATT L. H., Reversible redistribution of phytochrome within the cell upon conversion to its physiologically active form, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**: 799–803, 1975.
- [31] McCURDY D. W., PRATT L. H., Kinetics of intracellular redistribution of phytochrome in *Avena* coleoptiles after its photoconversion to the active, far-red-absorbing form, *Planta*, **167**: 330–336, 1986.

- [32] – Immunogold electron microscopy of phytochrome in *Avena*: identification of intracellular sites responsible for phytochrome sequestering and enhanced pelletability, *J. Cell Biol.*, **103**: 2541–2556, 1986.
- [33] MUMFORD F. E., JENNER E. L., Purification and characterization of phytochrome from oat seedlings, *Biochemistry*, **5**: 3657–3662, 1966.
- [34] OTTO V., SCHÄFER E., NAGATANI A., YAMAMOTO K. T., FURUYA M., Phytochrome control of its own synthesis in *Pisum sativum*, *Plant Cell Physiol.*, **25**: 1579–1584, 1984.
- [35] PRATT L. H., Molecular properties of phytochrome, *Photochem. Photobiol.*, **27**: 81–105, 1978.
- [36] – Phytochrome: The protein moiety, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**: 557–582, 1982.
- [37] – Molecular properties of phytochrome and their relationship to phytochrome function, [w] *Strategies of Plant Reproduction*, red. Meudt, W., Allanheld, Osmun Publ., London 1983, 117–182.
- [38] – Phytochrome Immunochemistry, [w] *Techniques in Photomorphogenesis*, red. Smith, H., Holmes, M. G., Academic Press, London 1984, 201–226.
- [39] PRATT L. H., COLEMAN R. A., Immunocytochemical localization of phytochrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 2431–2435, 1971.
- [40] – Phytochrome distribution in etiolated grass seedlings as assayed by an indirect antibody labelling method, *Amer. J. Bot.*, **61**: 195–202, 1974.
- [41] PRATT L. H., COLEMAN R. A., MACKENZIE J. M. Jr., Immunological visualisation of phytochrome, [w] *Light and Plant Development*, red. Smith, H., Batterwords, London – Boston – Sydney – Wellington – Durban – Toronto, 1976, 333–344.
- [42] QUAIL P. H., Irradiation-enhanced phytochrome pelletability in *Avena*: pigment release by Mg^{2+} -gradient elution, *Phytochem. Photobiol.*, **27**: 759–765, 1978.
- [43] – Phytochrome: A regulatory photoreceptor that controls the expression of its own gene, *Trends in Biochem. Sci.*, **9**: 450–453, 1984.
- [44] QUAIL P. H., SCHÄFER E., MARMÈ D., Turnover of phytochrome in pumpkin cotyledons, *Plant Physiol.*, **52**: 128–131, 1973.
- [45] QUAIL P. H., BARKER R. F., COLBERT J. T., DANIELS S. M., HERSHEY H. P., IDLER K. B., JONES A. M., LISSEMORE J. L., Structural features of the phytochrome molecule and feedback regulation of the expression of its genes in *Avena*, [w] *Molecular Biology of Plant Growth Control*, red. Alan. R. Liss, Inc. 1987, 425–439.
- [46] RICE H. V., BRIGGS W. R., JACKSON-WHITE, C. J., Purification of oat and rye phytochrome, *Plant Physiol.*, **51**: 917–926, 1973.
- [47] RÜDIGER W., Chemistry of phytochrome chromophore, [w] *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., Academic Press, London, New York 1972, 129–141.
- [48] – Phytochrome: The chromophore and photoconversion, *Photobiochem. Photobiophys.*, Suppl., 217–227, 1987.
- [49] RÜDIGER W., EIFELD P., THÜMMLER F., Phytochrome, the visual pigment of plants: chromophore structure and chemistry of photoconversion, [w] *Optical Properties and Structure of Tetrapyrroles*, red. Blauer G., Sund H., Walter de Gruyter and Co., Berlin, New York 1985, 349–366.
- [50] SAUNDERS M. J., CORDONNIER M. M., PALEVITZ B. A., PRATT L. H., Immunofluorescence visualization of phytochrome in *Pisum sativum* L. epicotyls using monoclonal antibodies, *Planta*, **159**: 545–553, 1983.
- [51] SHANKIN J., JABBEN M., VIERSTRA R. D., Red-light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 359–363, 1987.
- [52] SHIMAZAKI Y., CORDONNIER M. M., PRATT L. H., Phytochrome quantitation in

- crude extracts of *Avena* by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies, *Planta*, **159**: 534–544, 1983.
- [53] SONG P.-S., The molecular basis of phytochrome (P_{fr}) and interaction with model receptors; [w] *The Biology of Photoreception*, red. Cosens D. J., Vince-Prue D., Soc. Exp. Biol. 1983, 181–206.
- [54] SPETH V., OTTO V., SCHÄFER E., Intracellular localization of phytochrome in oat coleoptiles by electron microscopy, *Planta*, **168**: 299–304, 1986.
- [55] – Intracellular localization of phytochrome and ubiquitin in red-light-irradiated oat coleoptiles by electron microscopy, *Planta*, **171**: 332–338, 1987.
- [56] TOKUHISA J. G., DANIELS S. M., QUAIL P. H., Phytochrome in green tissue: Spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light-grown *Avena sativa* L. *Planta*, **164**: 321–332, 1985.
- [57] VIERSTRA R. D., QUAIL P. H., Native phytochrome: inhibition of proteolysis yields a homogeneous monomer of 124 kilodaltons from *Avena*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**: 5272–5276.
- [58] – Proteolysis alters the special properties of 124 kdalton phytochrome from *Avena*, *Planta*, **156**: 158–165, 1982.
- [59] – Purification and initial characterization of 124 kdalton phytochrome from *Avena*, *Biochemistry* **22**: 2498–2505, 1983.
- [60] – Photochemistry of 124 kdalton *Avena* phytochrome in vitro, *Plant Physiol.*, **72**: 264–267, 1983.
- [61] – Spectral characterization and proteolytic mapping of native 120 kilodalton phytochrome from *Cucurbita pepo* L., *Plant Physiol.*, **77**: 990–998, 1985.
- [62] – The protein, [w] *Photomorphogenesis in Plants*, red. Kendrick R. E., Kronenberg G. H. M., Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk Publ., Dordrecht 1986, 35–60.
- [63] VIERSTRA R. D., CORDONNIER M. M., PRATT L. H., QUAIL P. H., Native phytochrome: immunoblot analysis of relative molecular mass and proteolytic degradation for several plant species, *Planta*, **160**: 521–528, 1984.
- [64] VIERSTRA R. D., LANGAN S. M., HAAS A. L., Purification and initial characterization of ubiquitin from higher plant, *Avena sativa* L., *J. Biol. Chem.*, **260**: 12015–12021, 1985.
- [65] VINCE-PRUE D., Photomorphogenesis and flowering, [w] *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series, Vol. 16, Photomorphogenesis, red. Shropshire W. Jr., Mohr H., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1983, 457–490.

Adres autorów: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.

Otrzymano: 21 marca 1988 r.

Przyjęto: 26 maja 1988 r.

Warunki prenumeraty kwartalnika

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę na kraj przyjmują i informacji o cenach udzielają urzędy pocztowe i doręczyciele na wsi oraz Oddziały RSW „Prasa – Książka – Ruch” w miastach.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa – Książka – Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO BP XV Oddział w Warszawie nr 1658-201045-139-11. Wysyłka za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Terminy przyjmowania prenumerat na kraj i za granicę:

- do 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 1 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpoznawania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

TREŚĆ

S. SZALA, Ekspresja i budowa genu u Eucaryota	413
W. HENDRICH, Wodór – metabolizm i perspektywy fotobiologicznego wytwarzania	431
I. SZUMIEL, Odwrotna krzyżowa wrażliwość dwóch podlinii białaczki mysiej L5178Y na promieniowanie X i UVC	451
A. DMOSZYŃSKA-GIANNPOULOU, Trombomodulina – kofaktor śródbłonkowy białka C, jej właściwości biochemiczne i rola w procesie hemostazy	
A. TRETYN, M. TRETYN, Charakterystyka roślinnego systemu cholinergicznego. Acetylocholina	477
A. TRETYN, J. KĘSY, J. KOPCEWICZ, Fitochron – oczyszczanie, struktura, biosynteza i właściwości molekularne	495