

ANNA NOWOTNY-MIECZYŃSKA
Zakład Fizjologii Roślin IUNG — Puławy

PROBLEMY BIOSYNTETY BIAŁKA

Białko jest podstawowym składnikiem protoplazmy i dlatego już od dawna zostało uznane za najważniejszy związek budulcowy każdej żywej substancji. Pogląd ten panował już wówczas, gdy o budowie białka i jego biologicznych właściwościach nie wiele było jeszcze wiadomo. Problem budowy i składu białka został ostatecznie wyjaśniony z końcem ubiegłego stulecia dzięki badaniom chemików-organików, wśród których E. Fischer, Danilewski, Nencki zajmują czołowe miejsca. Natomiast problemy biologicznych właściwości białek do dnia dzisiejszego nie są całkowicie wyjaśnione.

Chemicy-organicy stwierdzili, że w toku kwaśnej hydrolizy białek zachodzi uwalnianie się z drobiny białek wolnych aminokwasów, obok dłuższych i krótszych peptydów. Te peptydy powstały na skutek częściowej hydrolizy białek. Tak więc zostało udowodnione, że cząsteczka białka składa się z szeregu cegiełek i że tymi cegiełkami są aminokwasy połączone ze sobą w dłuższe i krótsze łańcuchy. Łączenie się tych cegiełek ze sobą odbywa się za pośrednictwem tzw. wiązań peptydowych ($-\text{CO}-\text{NH}-$), powstałych z syntezy grupy aminowej jednego aminokwasu z grupą karboksylową drugiego aminokwasu. W zależności od ilości związanych ze sobą aminokwasów rozróżniamy dwu-, trój- i wielopeptydy, które z kolei łączą się z sobą dając makrocząsteczkę białka. Tak więc dzięki rozbiciu drobiny białka została udowodniona jego wewnętrzna budowa.

Chemikom-organikom wydawało się jednak, że jeśli rozbicie drobiny białka udało się przeprowadzić w laboratorium chemicznym, to i proces odwrotny, tj. powiązanie aminokwasów w cząsteczkę białka, można będzie również przeprowadzić poza obrębem żywej komórki. Jednakże tak E. Fischer, jak i inni badacze substancji białkowych, nie zdawali sobie sprawy z tego, że proste połączenie aminokwasów w łańcuch peptydowy nie jest bynajmniej równoznaczne z przywróceniem białku jego biologicznych funkcji, tj. tych właściwości, jakimi obdarzone było białko przed rozbiciem jego cząsteczki; innymi słowy: nie zdawali sobie sprawy z tego, że białko podlega nie tylko chemicznym i fizycznym, ale także

i biologicznym prawom. Dziś wiemy, że istotną cechą ciał białkowych jest ich wysoka swoistość, czyli ich biologiczne przeznaczenie. Białkiem są przecież enzymy (w całości lub częściowo, ale zawsze białkiem) i każdy z nich ma ściśle określone pole działania; białkiem jest hormon insulina; białkiem są niektóre antybiotyki; białko wchodzi w skład wirusów, białko nadaje grupie hemu we krwi charakterystycznych właściwości. Wszystkie wymienione rodzaje białek dają przy hydrolizie mieszaninę aminokwasów, których nauka zna już około 40 różnych rodzajów, a 24 z nich udało się wyosobnić z białek różnego pochodzenia. Każde z tych białek obdarzone jest innymi funkcjami w żywych organizmach. Stwierdzono, że mikrostruktura białka, a więc krótkie peptydy, są tych właściwości pozbawione i dopiero makrostruktura przejawia zdolności przemiany materii i tworzenia zróżnicowanej struktury komórkowej.

Przez długi czas lędzono się, że tzw. enzymatyczną syntezę białka będzie można studiować *in vitro*, jednak i tych nadziei nie udało się do dzisiaj zrealizować. Chemicy-organicy, którzy, jak E. Fischer, tak bardzo przyczynili się do wyjaśnienia zagadnienia budowy białek, nie przypuszczali, jak wielkie trudności przedstawiać będzie synteza żywego białka, tj. obdarzonego różnymi funkcjami w żywym ustroju. Mimo że nasza wiedza od czasu pionierskich badań E. Fischera posuwała się tak bardzo naprzód a metodyka badawcza została tak bardzo udoskonalona, jesteśmy wciąż jeszcze dalecy nie tylko od możliwości syntetyzowania żywego białka, ale nawet od wyśledzenia, jak ten proces przebiega w żywym organizmie. Jak już podkreślałam, chemicy wyobrażali sobie, że przez złączenie z sobą różnych aminokwasów otrzymają białko, z którego wyszli. Nie zdawali sobie jednak sprawy z tego, że to wiązanie ze sobą aminokwasów nie zachodzi „na chybił trafił”, ale że rządzą tu bliżej nie znane nam prawa. Dziś wiemy przynajmniej to, że dla nadania cząsteczce białka specyficznych biologicznych właściwości należałoby powiązać ze sobą aminokwasy według ściśle określonej kolejności, czyli sekwencji. Stwierdzono bowiem, że nawet przestawienie dwu następujących po sobie aminokwasów wpływa na zmianę biologicznych funkcji białka, jakkolwiek ani fizyczne, ani chemiczne cechy białka nie ulegną zmianie. Tak więc połączenie ze sobą różnych aminokwasów (a znamy ich już około 40 rodzajów) w różnej kolejności może nam dać ogromną ilość i ogromną wielorakość kombinacji, z których jedne mogą być obdarzone biologicznymi właściwościami, inne natomiast nie. Długie łańcuchy peptydowe ulegają jeszcze wtórnym przemianom, a więc związaniu się w różnego rodzaju struktury, ale te wtórne przemiany odgrywają w specyficzności białka znacznie mniejszą rolę, aniżeli sekwencja aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym.

Dynamiczny stan białka w żywym organizmie

Od czasu poznania zasadniczej budowy cząsteczki białka biologowie zaczęli żywo interesować się białkową przemianą materii w ustrojach. Przez wiele lat panował ogólny pogląd, że żywy organizm jest rodzajem maszyny, w której pokarm jest opałem, a narządy pracującymi częściami maszyny. W związku z takim pojęciem Voit (1882) rozróżniał w każdym żywym organizmie dwa rodzaje białek: białko krążące i białko tkanekowe, przy czym to ostatnie nie pozostawałoby w żadnej łączności z białkiem pokarmowym.

W kilka lat później wystąpił Folin (1905) ze swoją teorią o endogennej i egzogennej przemianie materii białkowej w żywych organizmach. Według tej teorii, endogenna przemiana białkowa wiąże się tylko o tyle z białkiem pokarmowym, o ile chodziłoby o uzupełnienie ścierających się części ustrojowej „maszyny”. Natomiast egzogenna przemiana miała być uzależniona tylko od dostawy białka pokarmowego. Białko to (według teorii Folina) zostaje w ustroju spalane, energia spalania wykorzystana do szeregu procesów biochemicznych, natomiast produkty spalania zostają wydalone z organizmu. Według teorii Folina synteza białka zachodzi tylko tak długo, jak długo organizm rośnie, natomiast ustaje zupełnie, gdy organizm staje się dorosły. Teoria Folina miała ogromną ilość zwolenników, jakkolwiek nauka gromadziła coraz to więcej dowodów, że teoria ta jest mylna: według obserwacji licznych badaczy, w żywym organizmie rosnącym czy też dorosłym, głodującym, czy też w pełni odżywienia azotowego, zachodzi nieustanny wir przemian, polegających na syntezie, rozpadzie i znów resyntezie ustrojowego białka.

Pierwszym, który usiłował podważyć teorię Folina, był Borsook (1935), który przytaczał szereg przekonujących dowodów przeczących teorii Folina. Według opinii Borsooka organizmu żywego nie można przyrównywać do bezwładnej maszyny, ponieważ w ustroju zachodzi ustawiczny wir przemian anabolicznych i katabolicznych i ponieważ te przemiany są w bezpośrednim związku z białkowymi składnikami pokarmu. Białko żywe jest wysoce labilne i podlega następującym przemianom: białko \rightleftharpoons aminokwasy \rightleftharpoons produkty kataboliczne. Borsook przytacza wyniki swojego doświadczenia: karmiąc szczury (będące w równowadze odżywienia) mieszaniną aminokwasów z wykluczeniem aminokwasów siarkowych, stwierdził w odchodach znacznie większą zawartość siarki niż by tego należało spodziewać się na gruncie endo- i egzogennej przemiany materii.

Borsook przytacza także obserwacje Mischera (lata 70 ubiegłego stulecia) nad przemianami białkowymi u łososi. Ryby te, wędrując mie-

siącami w górę rzek bez białkowego pokarmu, budują jednak organy generatywne kosztem białka mięśni, którego budowa i skład jest odmienny od budowy i składu protamin, czyli białek (o charakterze zasadowym) znajdujących się w plemnikach ryb. Byłoby to dowodem, że składniki białka różnych tkanek ustawicznie wymieniają się wzajemnie.

Poglądy Borsooka poparli i inni biochemicy, jednakże badaczom brakowało dostatecznie czułej metody do uzasadnienia swoich poglądów. Udowodnienie takie natrafiało na wiele trudności: jak wiadomo pokarmy, a także i tkanki, składają się przede wszystkim z białek, węglowodanów i tłuszczów. Pokarmy zostają już w przewodzie pokarmowym rozbite na związki proste, a więc białka na aminokwasy, tłuszcze na kwasy tłuszczowe, a węglowodany na cukry proste. Te produkty zostają przez ustrój wessane, po czym łączą się z całą masą takich samych związków, ale pochodzących z tkanki. Badacz traci je z oczu; nie wie, czy związki, które dopiero co powstały na skutek różnych przemian, mają swój początek w tkankach, czy też w pobranych przez ustrój pokarmach. Zwłaszcza trudne są one do odróżnienia w organizmach dorosłych, u których należy przyjąć nie tylko stałą wagę, ale i w przybliżeniu stałość składu chemicznego. Jak więc odróżnić od siebie te związki? Dopiero wprowadzenie do nauk biologicznych pierwiastków izotopowych ułatwiło badaczom to zadanie, ponieważ związki nacechowane izotopami stanowiły tę pieczęć, która pozwoliła na odróżnienie związków pokarmowych od związków tkankowych. Badań tych podjął się Schoenheimer, który w całym cyklu doświadczeń prowadzonych na szczurach (1937—1942) i posługując się azotem ciężkim i deuterium w całej rozciągłości potwierdził poglądy Borsooka i tym samym obalił teorię Folina.

Badania Schoenheimera wykazały, że w każdym żywym ustroju, głodującym czy też będącym w tzw. równowadze azotowej, zachodzą przemiany białkowe, polegające na tym, że grupy aminowe różnych aminokwasów są przerzucane do innych reszt aminokwasowych, że przy tych przemianach wiązania peptydowe wciąż się otwierają, wprowadzając grupę aminową aminokwasu pochodzącego bądź z białka pokarmowego, bądź z białka różnych tkanek i znów się zamykają. Byłaby więc stała wymiana między grupami aminowymi białka tkankowego i białka pokarmowego. W tym wirze przemian nie ma miejsca, dowodzi Schoenheimer, na odróżnienie przemian endogenicznych od egzogenicznych. Wszystkie te przemiany, które stwierdził Schoenheimer, zachodzą z zachowaniem całkowitego planu organizacyjnego białka, tzn. że swoistość różnych rodzajów białek zostaje całkowicie zachowana. Tego rodzaju dynamiczny stan dotyczy nie tylko substancji białkowych, ale także i węglowodanów i związków tłuszczowych. Wszystkie te przemiany za-

chodzą w ustroju niezwykle szybko; pewne pojęcie o szybkości tych przemian mogą dać doświadczenia Schoenheimera, który głodzoną szczurom wstrzykiwał ciężką wodę. Po upływie 24 godz. stwierdzono, że wszystkie aminokwasy izolowane z białek (z wyjątkiem lizyny) miały deuter, czyli uległy różnym procesom uwodorowania i odwodorowania. Według Schoenheimera, stwierdzenie dynamicznego stanu w żywej substancji zbliża nas bardzo do zrozumienia czym jest „żywa” substancja.

Opisane powyżej badania zachęciły biochemików do studiowania problemów związanych z biosyntezą białka. Jednym z najważniejszych pytań, które postawili sobie biochemicy, było następujące: czy biosynteza białka zachodzi przy udziale wolnych aminokwasów, czy też krótszych lub dłuższych peptydów? Na podstawie różnych obserwacji badacze skłaniają się raczej do koncepcji syntezy żywego białka z wolnych aminokwasów, a nie z peptydów.

Pytanie drugie dotyczyło udziału związków bogatych w energię, a więc przede wszystkim ATP (adenozyno-trójfosforowy kwas) w biosyntezie białka. Borsook i Dubnoff (1947) wykazali, że synteza kwasu hipurowego (z kwasu benzoowego i glicyny) w homogenacie wątroby świnek morskich jest stymulowana przez ATP. Stąd wniosek, że i w biosyntezie białka udział tego związku mógłby być potrzebny. Zanim jednak przejdziemy do rozważania powyższych kwestii, omówimy próby badacza radzieckiego Breslera otrzymania „żywego” białka w syntezie pozakomórkowej.

Badania Breslera (1952)

Rozważając problem rozpadu i resyntezy „żywego” białka w komórkach Bresler usiłował uzyskać odpowiedź na następujące pytanie: czy w warunkach laboratoryjnych nie udałoby się przesunąć równowagi procesu od rozpadu białka do syntezy? Obiektem badań Breslera były różnego rodzaju białka, między innymi także i insulina. Bresler shydrolizował te substancje na drodze enzymatycznej i na skutek tego otrzymał mieszaninę peptydów składających się z 6—10 reszt aminokwasowych. Celem przeprowadzenia resyntezy tych peptydów w białko Bresler zastosował do hydrolizatu ciśnienie 5 000—10 000 atmosfer. W hydrolizacie znajdowała się mała domieszka proteolitycznych enzymów oraz pewna ilość substancji buforowych, mających zapewnić enzymom optymalne warunki działania. Wynik doświadczenia był następujący: z hydrolizatu insuliny, a więc z białka o ściśle określonych własnościach biochemicznych, powstała substancja o masie cząsteczkowej zbliżonej do masy cząsteczkowej białka wyjściowego, jednakże własności biologiczne zostały przywrócone tylko częściowo: hydrolizat odzyskał tylko część swoich

hormonalnych funkcji. Byłoby to dowodem, że Breslerowi faktycznie nie udało się otrzymać makrostruktury białka z małowcząsteczkowych produktów rozpadu przy pomocy proteolitycznych enzymów. Jednakże doświadczenie to wykazało, że reakcja rozpadu białka pod wpływem proteolitycznych enzymów może być w pewnym sensie odwracalna.

Reasumując wyniki swoich doświadczeń, Bresler pisze: „Badania moje dalekie są jeszcze od pełnej syntezy białka, jest to jednak krok naprzód, odsłaniający wiele możliwości i budzący wiele nadziei”. Bresler przyznaje, że synteza pod ciśnieniem może być przykładem płodnym, lecz nie można stąd wyciągać daleko idących wniosków. I istotnie, o pełnej syntezie białka *in vitro* będzie można mówić dopiero wtedy, gdy uda się otrzymać białko nie z peptydów, ale z wolnych aminokwasów i gdy otrzymana substancja będzie obdarzona pełnią biologicznych właściwości.

Na podstawie wyników swoich licznych badań nad problemem białka Bresler podziela poglądy innych badaczy, a mianowicie, że w przyrodzie musi istnieć mechanizm, który wytwarza cząsteczkę białka z aminokwasów z ominięciem stadiów pośrednich, tj. peptydów. Według niego, pogląd o stopniowym wzroście cząsteczki poprzez peptydy krótsze a potem dłuższe nie ma podstaw doświadczalnych. Ponieważ jednak synteza białka jest tylko jednym z ogniw ogólnej przemiany materii w ustroju, więc zachodzi w związku z innymi procesami, a w szczególności z procesami oddychania, a zatem może się zmieniać w zależności od środowiska zewnętrznego. Bresler nie porusza jednak w swoich rozważaniach nad biosyntezą białka (w dostępnej mi literaturze) najnowszych teorii mechanizmu biosyntezy białka, a mianowicie współzależności między produkcją białka przez żywą komórkę a produkcją kwasów nukleinowych.

Kwasy nukleinowe i hipotezy biosyntezy białka

Kwasy nukleinowe zostały wykryte w latach 70 ubiegłego stulecia (przez Mischera — ucznia ojca biochemii: Hoppe-Seylera), ale dopiero w ostatnim dziesięcioleciu wysunęły się na czoło wszystkich innych związków organizmów roślinnych i zwierzęcych, zarówno niższych, jak i wyższych. Substancja ta, obejmując przodującą rolę pośród „żywych” substancji, usunęła nieco w cień związki białkowe, które tę przodującą pozycję zajmowały przez długi okres czasu. Kwasami nukleinowymi interesują się obecnie nie tylko biochemicy i fizjologowie, ale i mikrobiologowie i genetycy.

Podstawowym elementem w budowie kwasów nukleinowych jest nukleotyd, składający się: 1) z kwasu fosforowego; 2) pentozy: rybozy lub dezoksyrybozy; 3) zasady: purynowej lub pirymidynowej. Nu-

kleotydy łączą się z sobą w łańcuchy polinukleotydowe i wykazują podobną różnorodność w budowie, jak łańcuchy polipeptydowe. Dawniej rozróżniano kwasy nukleinowe: roślinne i zwierzęce, obecnie jednak podział ten został zarzucony i jako podstawę do rozróżnienia kwasów nukleinowych przyjęto w drobinie rodzaj ich węglowodanowej składowej, a więc rybozę lub dezoksyrybozę. Odróżniamy więc kwasy: rybonukleinowe, w skrócie oznaczane literami: KRN i dezoksyrybonukleinowe: KDN. Stwierdzono, że polinukleotydy izolowane z tkanek różnego pochodzenia mogą mieć różny skład purynowo-pirymidynowy, rozróżniamy więc nukleotydy czysto purynowe lub czysto pirymidynowe, lub też mieszane purynowo-pirymidynowe. Dawny pogląd, że w cząsteczce polinukleotydowej zasady purynowe i pirymidynowe wzajemnie się przeplatają, już został zarzucony.

Prowadzone są badania nad rozmieszczeniem kwasów nukleinowych na terenie komórki. Sposób wykrywania tych związków zawdzięcza nauka głównie cytochemikom Feulgenowi i Rosenbeckowi (1924). Według wyników tych badań, główną „siedzibą” KDN są (u wszystkich organizmów) jądra komórkowe, a stężenie tej substancji zależy od stadium rozwojowego ustroju: zwiększonej aktywności komórki odpowiada zawsze zwiększona produkcja KDN. Substancja ta może występować także i w mitochondriach oraz w plastydach komórek roślinnych. Sporadycznie stwierdzano jej obecność i w jąderkach komórek roślinnych i zwierzęcych; KDN może przenikać z jądra do cytoplazmy i z komórki do komórki.

Drugi typ kwasów nukleinowych, a więc KRN, jest niemal wszechobecny w komórkach wszystkich organizmów. Występuje zarówno na terenie cytoplazmy, jak i jąder komórkowych. W dojrzałych komórkach niemal cały KRN jest związany z białkiem, natomiast w młodych embrionalnych komórkach — w postaci wolnej. Najbogatsze w KRN są mikroscopy skupiając około 60% ogólnej ilości tego związku w komórce. Ogólna jednak zawartość KRN w komórkach waha się w zależności od stanu funkcjonalnego komórki; stwierdzono więc duże ilości KRN w strefach intensywnej produkcji białka, tj. w tkankach embrionalnych, twórczych i gruczołowych. Ta pozytywna korelacja między występowaniem KRN a produkcją białka nasunęła biochemikom myśl o udziale KRN w produkcji ciał białkowych. Zaobserwowano, że obecność KRN w komórce jest warunkiem normalnego przebiegu syntezy białka, a więc także i wzrostu, oraz mnożenia się komórek. Synteza białka stanowiącego tworzywo jądra byłaby uwarunkowana obecnością KDN, a synteza białka cytoplazmatycznego obecnością KRN.

Szczególnie dużą zawartością kwasów nukleinowych odznaczają się bakterie; najwięcej jest ich w młodych hodowlach, a potem ilość ich

nieco spada, w miarę jak bakterie starzeją się. Fakt ten tłumaczy niezwykle zdolności życiowe bakterii, ich intensywną przemianę materii, szybkość mnożenia się, co z kolei łączy się ze wzmożoną syntezą białka. Stwierdzono niejednokrotnie, że wbudowanie niektórych nacechowanych aminokwasów w cząsteczkę białka komórek, np. gronkowca, jest silnie stymulowane przez wzbogacenie środowiska odżywczego bakterii fragmentami 2 i 3 nukleotydów typu KRN. W roku 1928 Grifisch zaobserwował ciekawe zjawisko transformacji szczepów bakteryjnych pod wpływem zabitych bakterii. Grifisch stwierdził mianowicie, że żywe bakterie *Streptococcus pneumoniae* były w organizmie myszy pobudzone do mutacji pod wpływem zabitych bakterii i zyskały charakter biochemiczny martwych mikroorganizmów. W kilkanaście lat później udało się Avery'emu (1944) wyekstrahować czynnik wywołujący tę transformację i okazało się, że tym czynnikiem był swoisty KDN zabitych bakterii.

Od roku 1944 nauka notuje wiele prac nad procesami transformacyjnymi u różnych bakterii oraz ulepszeń w oczyszczaniu bakteryjnego KDN. Wykazano, że pod wpływem KDN izolowanego z jednego szczepu bakterii następowała zmiana procesów biochemicznych w szczepach ulegających transformacji. Być więc może, rozumują biochemicy, KDN jednego szczepu bakterii oddziałuje na nukleinowe ośrodki syntezy w obcej komórce bakteryjnej w kierunku odtwarzania drobin KDN identycznych z czynnikiem transformującym. Tę zdolność transformacyjną mają tylko cząsteczki KDN o nietkniętej strukturze. Usunięcie z cząsteczki KDN choćby jednej zasady, np. purynowej, inaktywuje tę substancję. Destrukcyjny wpływ na procesy transformacyjne wywiera też dezoksyrybonukleinaza niszcząc aktywność KDN już przy minimalnym stężeniu. Natomiast zupełna odporność KDN na czynniki denaturujące białko dowodzi, że białko nie stanowi funkcjonalnej części cząsteczki KDN. Nowe własności, tj. własności nabyte, są przez „transformowane” bakterie dziedziczone.

Hipotezy biosyntezy białka

Casperson i Brachet (1947) jako pierwsi i niezależnie od siebie wystąpili z poglądem o przyczynowej łączności produkcji kwasów nukleinowych i procesów syntezy białka. Badania, które następowały później, miały ten pogląd potwierdzić w całej rozciągłości. Casperson stwierdził, że w reticulocytach królików, 20-krotnemu wzrostowi produkcji KRN odpowiadała w przybliżeniu ta sama zdolność syntetyzowania hemoglobiny i innych białek. Coldwell i Macker (1950) stwierdzili, że produkcja KRN w komórce *Bacillus lactis aerogenes* jest w przybliżeniu proporcjonalna do wzrostu tejże komórki, a tym samym także i zdolności synte-

tyzowania białka. Badacz ten pierwszy wysunął przypuszczenie, że specyficzne uszeregowanie się aminokwasów w makrocząsteczce białka jest determinowane przez specyficzne uszeregowanie się nukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym. Inni mikrobiologowie również dostarczyli dowodów na udział kwasów nukleinowych w syntezie białka. Gale i Folkes (1953) wykazali, że synteza białka w drobnoustrojach *Staphylococcus aureus* zostaje całkowicie zahamowana przez wprowadzenie do komórki drobnoustroju — rybonukleazy. Zaobserwowali też, że synteza białka jest bardziej uzależniona od obecności w komórce kwasów rybonukleinowych niż dezoksyrybonukleinowych. Wszystkie te obserwacje dowodziłyby, że udział kwasów nukleinowych w procesach syntezy białka nie ulega wątpliwości. Nie znany jest jednak dotychczas zupełnie mechanizm tego procesu, tzn. sposób, w jaki łańcuchy polinukleotydowe pośredniczą w tworzeniu się łańcuchów polipeptydowych. Biochemicy wysuwają coraz to nowe koncepcje i hipotezy, jednak jak dotychczas nikomu jeszcze nie udało się wyjść poza krąg mniej lub więcej pomyślowych hipotez, ale tylko hipotez.

Najwięcej zwolenników zyskały sobie następujące hipotezy:

1. Cząsteczki kwasów nukleinowych stanowią wzorzec, na którym modeluje się makrocząsteczka białka.
2. Kwasy nukleinowe ze względu na swoje powinowactwo z cząsteczką białka pozwalają reakcjom przebiegać w jednym kierunku, tzn. że zapobiegają reakcjom odwracalnym.
3. Kwasy nukleinowe obdarzone są zdolnością przyłączania do swej cząsteczki bogatych w energię grup fosforanowych, przez co stają się czynnikiem energetycznym w syntezie białka.
4. Cząsteczki polinukleotydów odgrywają rolę enzymów, katalizujących proces syntezy białka.

Hipoteza Dounce'a

Jedną z najbardziej twórczych hipotez wydaje się hipoteza Dounce'a (1952—1953), w której autor łączy teorię modelu (czy wzorca) z teorią energetyczną. Według przypuszczeń Dounce'a w każdej komórce roślinnej czy zwierzęcej istnieje tyle różnych konfiguracji łańcuchów polinukleotydowych, ile jest możliwości specyficznego „ustawienia” łańcuchów peptydowych w drobinie białka komórki. Pierwszym etapem w syntezie białka byłoby według tej hipotezy połączenie się cząsteczki kwasu nukleinowego z wysoko energetycznym związkami ATP. Następnym etapem byłoby połączenie się cząsteczki kwasu nukleinowego z aminokwasami i powstanie przejściowego połączenia nukleino-aminokwasowego. Zdolność cząsteczki kwasu nukleinowego łączenia się z wysoko energe-

tycznym związkiem ATP nadaje cząsteczce kwasu nukleinowego energii potrzebnej do wytworzenia wiązań peptydowych pomiędzy resztami sąsiadujących ze sobą aminokwasów przyłączonych do modelu nukleinowego. Jak już wspominałam, model ten ustala odpowiednią sekwencję, czyli specyficzną kolejność aminokwasów w przyszłej drobinie białka. Trzecim, a zarazem ostatnim etapem biosyntezy białka, byłoby oderwanie się łańcucha polipeptydowego od nukleinowego modelu, po czym dopiero może nastąpić specyficzne zwijanie się łańcucha polipeptydowego już bez udziału modelu nukleinowego. Cząsteczka kwasu nukleinowego, po uwolnieniu się od świeżo utworzonego łańcucha polipeptydowego może służyć jako model dla następnej syntezy łańcucha polipeptydowego, ale równie dobrze może służyć jako model dla odtworzenia się łańcucha polinukleotydu, czyli do autokatalitycznej syntezy.

Dounce wprowadza do swego hipotetycznego procesu szereg hipotetycznych enzymów, które mają współdziałać z ATP; nazywa je enzymami klasy pierwszej, drugiej itd. Enzymy te byłyby obdarzone zdolnością katalizowania połączeń pomiędzy danym nukleotydem a grupą aminową danego aminokwasu; te połączenia zachodziłyby tylko przy pewnym ściśle określonym segmencie łańcucha polinukleotydu. Autor posuwa swoje przypuszczenie tak daleko, że uważa za rzecz całkiem możliwą istnienie tylu różnych enzymów, ile jest różnych rodzajów aminokwasów w komórce, mających brać udział w syntezie łańcucha polipeptydowego. Autor sądzi też, że w komórce może istnieć tyle różnych rodzajów łańcuchów nukleotydu (mających służyć jako model dla syntezy białka) ile jest różnych rodzajów białek spotykanych w przyrodzie.

Tak więc kwasy nukleinowe odgrywałyby w powyższej hipotezie przede wszystkim rolę dystrybutorów aminokwasów, ustawiając ich kolejność według określonego planu budowy przyszłej cząsteczki białka. Byłyby też dostawcami energii dzięki zdolności łączenia się z ATP (energii potrzebnej do tworzenia się wiązań peptydowych). Szereg hipotetycznych przejściowych związków, jak kompleks nukleino-aminokwasowy, wprowadza autor dla łatwiejszego zrozumienia hipotezy syntezy białka.

Hipoteza biosyntezy białka, zaproponowana przez Dounce'a zainteresowała nie tylko biochemików, ale także i genetyków. W proponowanym schemacie tego skomplikowanego procesu autor uwzględnia ścisłą łączność pomiędzy cząsteczkami kwasów nukleinowych a dziedzicznym charakterem tej komórki, która produkuje kwasy nukleinowe. Hipoteza Dounce'a przewiduje nie tylko biosyntezę białka, ale także biosyntezę cząsteczek kwasów nukleinowych i to w ten sam sposób, jak przy produkcji cząsteczek białka. Jeżeli więc cząsteczki kwasów nukleinowych

mogą służyć jako model do odtwarzania samych siebie, to równie dobrze mogłyby służyć do reprodukcji genów, w skład których wchodzi, według wszelkich danych, kwas dezoksyrybonukleinowy. Opierając się na powyższej hipotezie, cząsteczki KDN byłyby obdarzone podstawowymi właściwościami genów, a mianowicie zdolnością:

- 1) autokatalizy czyli samoodtwarzania się;
- 2) heterokatalizy czyli indukowania w komórkach syntezy związków chemicznych z nimi spokrewnionych;
- 3) do mutacji.

Tak więc wyrażone jeszcze kilka lat temu nadzieje badania struktury i powstawania genów stawałyby się coraz to bardziej realne.

Hipoteza Borsooka

Borsook omówił swoją hipotezę biosyntezy białka na zjeździe biochemików w Brukseli w roku 1955. Hipoteza ta jest w ogólnych zarysach bardzo podobna do naszkicowanej powyżej hipotezy Dounce'a, różnica jednak polega na tym, że według Borsooka pierwszą fazą w biosyntezie białka jest aktywacja grup karboksylowych wolnych aminokwasów komórki; według Borsooka tylko aktywowane aminokwasy mogą być przeniesione do swego modelu, którym, jak w hipotezie Dounce'a, jest cząsteczka kwasów nukleinowych. Na tym modelu zachodziłoby uszeregowanie aminokwasów według pewnego swoistego następstwa, które z kolei jest dyktowane przez specyficzne rozmieszczenie zasad purynowych i pirymidynowych w łańcuchu polinukleotydowym. Połączenie się z sobą reszt aminokwasowych za pośrednictwem wiązań peptydowych, a potem uwolnienie się nowopowstałego łańcucha od swego modelu, stanowiłoby ostatnią fazę syntezy nowej cząsteczki białka.

Według hipotezy Borsooka aktywatorami grup karboksylowych aminokwasów byłyby związki bogate w energię, a więc ATP, przy czym to aktywujące działanie byłoby czynnością enzymatyczną. Jako na argument przemawiający za słusznością takiego przypuszczenia Borsook powołuje się na liczne dawniej poczynione obserwacje, mianowicie, że zwiększonemu pobieraniu węglowodanów towarzyszy zwiększona produkcja ATP i równocześnie wzrasta stężenie aminokwasów we krwi; dlatego to spożycie węglowodanów wpływa na wzmożoną syntezę białka. Stwierdzono też, że tworzenie się adaptywnych enzymów w mikroorganizmach zależy nie tylko od obecności wolnych aminokwasów w komórce, ale także i od źródła energii (Spiegelmann i Dunn 1947—1948).

Procesy biosyntezy białka przebiegają stosunkowo wolniej niż inne enzymatyczne procesy, niemniej jednak bardzo szybko. Badania prowadzone przez Schoenheimera wykazały, że tzw. „półobrót” białka

wątroby u człowieka wynosi około 80 dni, czyli że w ciągu 80 dni około połowa białka wątroby, stanowiącej centrum najważniejszych przemian, ulega całkowitej przebudowie.

Stwierdzono, że antybiotyki hamują syntezę białka i że to hamujące działanie należy być może przypisać zablokowaniu przez tę substancję niektórych segmentów w łańcuchu nukleotydowym, na którym modeluje się makrocząsteczka białka. Być może także i produkcja ATP potrzebna do aktywacji grup karboksylowych u aminokwasów również zostaje zahamowana przez wprowadzenie do organizmu antybiotyków.

Jak widzimy, w hipotezach biosyntezy białka, wysuwanych przez cytowanych (i nie cytowanych) biochemików, nie są uwzględniane stadia pośrednie w formie coraz to dłuższych peptydów; według wszelkich danych, synteza białka w żywych ustrojach zachodzi bezpośrednio z wolnych aminokwasów zgrupowanych wokół nukleinowego modelu. Badania prowadzone na gruczołach mlecznych różnych zwierząt ssących są zgodne z powyższym założeniem.

Biosynteza enzymów

Pojęcie biokatalizatorów sformułował w roku 1836 Berzelius w następujący sposób: „wiele jest substancji w przyrodzie obdarzonych właściwościami wpływania na inne związki, wywołując w nich różne wewnętrzne przemiany”. Te właściwości można nazwać „siłą katalityczną”, a przemiany zachodzące pod wpływem tej siły: „katalizą”. W drugiej połowie XIX wieku Pasteur i Liebig wymienili między sobą poglądy na temat katalizy w żywych organizmach. Pasteur przyznawał zdolność wytwarzania siły życiowej czyli „fermentów” tylko żywym organizmom, natomiast Liebig wystąpił z zdecydowaniem przeciwko utożsamianiu „siły życiowej” z działalnością fermentów. Liebig stał na stanowisku, że fermenty mają ściśle określony skład chemiczny i że ich działanie ma charakter przemian czysto chemicznych. W roku 1878 Kühn wprowadził termin *e n z y m y*, a Bertrand niedługo potem wytłumaczył rolę koenzymów.

Praktyczne zastosowanie reakcji enzymatycznych było przez długie lata ograniczone tylko do zjawisk fermentacji alkoholowej, octowej i mlecznej, wywołanej przez mikroorganizmy. Nauka była daleka w owe czasy od odróżnienia indywidualnych enzymów. Dzisiaj znamy ich już około 200 rodzajów, w tym wiele enzymów otrzymano w stanie krystalicznym, a z każdym dniem nauka odkrywa jeszcze coraz to nowe enzymy.

Biokatalizatory są wytworem żywych organizmów; istnieje szereg komórek w organach zwierząt i roślin, które są wyspecjalizowane do

produkcji enzymów. Jednak problem biosyntezy enzymów nie wyszedł jeszcze spoza kręgu najrozmaitszych hipotez. Hipotezy te są, jak zobaczymy, bardzo podobne do hipotez dotyczących biosyntezy białek, co jest zrozumiałe, ponieważ nie ma enzymów, w których skład nie wchodziłyby białka, albo które nie byłyby w całości białkami. Białkowa część złożonego enzymu nadaje całości zdolność katalizowania ściśle określonych procesów, natomiast niebiałkowa, małącząsteczkowa decyduje o aktywności enzymu. Tak więc problem biosyntezy enzymów jest równocześnie problemem biosyntezy białka.

W związku z powyższym zagadnieniem wysuwane są dwa następujące zagadnienia:

1. Czy produkcję enzymów w komórce poprzedza istnienie jakiegoś prekursora, prostego lub złożonego, z którego na mocy wewnątrzdrobinowych przemian powstają drobiny aktywnego enzymu?

2. Czy istnieje współzależność między zdolnością komórki do produkowania enzymów i zdolnością syntetyzowania cząsteczek kwasów nukleinowych?

Gdyby w komórkach istniał jakiś prekursor enzymów, to proces syntezy tych substancji musiałby być niezależny od zapasu wolnych aminokwasów w komórce ustroju. Tymczasem badania Spiegelmana wykazały, że drobnoustroje głodujące w zakresie pokarmów azotowych nie wykazały żadnych możliwości syntetyzowania enzymów. Stwierdzono, że nawet niedobór niektórych aminokwasów wpływał hamująco na syntezę enzymów. Dopiero wprowadzenie brakujących aminokwasów, czy też uzupełnienie niedoboru tych związków, powodowało przebieg tych procesów. Na podstawie tych i innych obserwacji Spiegelmann wyklucza zupełnie koncepcję prekursorów w produkcji enzymów.

W związku z drugim zagadnieniem, a więc współzależności syntezy enzymów i występowania kwasów nukleinowych w komórkach, Spiegelmann dowodzi, że według wyników jego badań produkcji enzymatycznych białek zawsze towarzyszy obecność kwasów nukleinowych. Stwierdzono, że z dwóch typów kwasów nukleinowych raczej KRN niż KDN bierze udział w tym procesie, natomiast KDN, według wszelkich danych, nie odgrywa tu bezpośredniej roli. Aby to zagadnienie rozstrzygnąć, stwarzano w sposób sztuczny przeszkody w produkcji KDN i przekonano się, że brak KDN nie hamuje produkcji enzymów. Być jednak może, że wpływ KDN jest pośredni, np. przez wpływ na produkcję KRN.

Mechanizm tworzenia się białka enzymów wyobraża sobie Gale (1955) w następujący sposób: specyficzne uszeregowanie poszczególnych nukleotydów w łańcuchu KRN stwarza z góry warunki przyłączania się doń reszt aminokwasowych tylko w specjalnych punktach tego łańcucha;

przyłączone do łańcucha KRN reszty łączą się z sobą za pośrednictwem wiązań peptydowych, tworząc łańcuch polipeptydowy, który na koniec uwalnia się od swego modelu, dając „życie” drobinie nowego enzymu. Tak więc według koncepcji Gale'a łańcuch KRN determinuje specyficzność enzymatycznego białka. Jakie jednak czynniki determinują specyficzną budowę KRN — tego nam badacz nie tłumaczy.

Tak więc widać, że w ogólnych zarysach hipoteza syntezy enzymów pokrywa się z hipotezami Borsooka i Dounce'a. Być może w chwili pisania tych słów istotny mechanizm biosyntezy białka i biosyntezy enzymów jest już poznany.

Istnieje jednak jeszcze dużo spornych kwestii i nierozstrzygniętych zagadnień także i w zakresie działalności enzymów. Wiemy np., że enzymy należące do proteidów, jak np. katalaza, zawdzięczają swą aktywność fizyko-chemicznemu i chemicznemu wymiennemu działaniu pomiędzy aktywnymi grupami a grupami białkowej komponenty enzymów. Natomiast w enzymach prostych, czyli czysto białkowych, jak np. ureaza, taką grupę czynną stanowi pewien układ aminokwasów w drobinie enzymu. O tej właśnie grupie aminokwasów enzymologia w istocie rzeczy wie jeszcze bardzo niewiele, a to dlatego, że wydzielenie jej z całości drobinie bez uszkodzenia tego enzymu natrafia na ogromne trudności. Rozwojowi badań z tego zakresu musi towarzyszyć nie tylko znajomość przestrzennej budowy białek, ale także i poznanie procesów biosyntezy białka.

Problemy związane z enzymatyką budzą ogólne zainteresowanie, ponieważ enzymy stanowią to istotne narzędzie, które umożliwia nieprzerwany tok przemian chemicznych i energetycznych w żywych organizmach.

Problem mnożenia się wirusów

Jednym z głównych zagadnień wirusologii jest zagadnienie mnożenia się wirusów; jest ono szczególnie ciekawe dla tych biochemików, którzy interesują się procesami biosyntezy białka.

Wiadomo, że naturalnym środowiskiem bytowania wirusów jest tylko komórka żywego organizmu i to takiego, który znajduje się w pełni metabolicznej aktywności i który rozwija się na takim podłożu, które mu tę pełnię zapewnia. Sam proces mnożenia się wirusów udało się „podpatrzeć” na bakteriofagach i proces ten w najogólniejszych zarysach przedstawia się w następujący sposób: fagi, wprowadzone do hodowli bakterii, zostają przez nie na mocy adsorpcji przytrzymane, ale w taki sposób, że ich zewnętrzna komponenta, stanowiąca substancję białkową, pozostaje na zewnątrz komórki bakteryjnej, a wnika tylko część wewnętrzna, a więc część nukleinowa. Po krótszym lub dłuższym

okresie tzw. latencji, czyli utajonego życia fagów-agresorów, następuje w organizmie zaatakowanym spontaniczne mnożenie się wirusów fagów, które nie różnią się od formy macierzystej.

Jaki jest jednak mechanizm procesu mnożenia się fagów? Zagadnienie nie jest jeszcze wyjaśnione, jednak wydaje się nie ulegać wątpliwości, że nowopowstałe fagi czerpią dla siebie materiał: z komórki zaatakowanego gospodarza, z jego środowiska odżywczego, oraz z materiału wirusa „macierzystego”, a więc z tego, który zakażenie wywołał. Dowiodły tego badania prowadzone z pomocą ciężkiego azotu. Wszystko przemawia za tym, że punkt ciężkości mechanizmu mnożenia się wirusów w zaatakowanym organizmie spoczywa na nukleinowej części wirusa, który wniknął do komórki obcego ustroju. Kwasy nukleinowe są więc najwidoczniej odpowiedzialne za proces mnożenia się patogenów.

W pracowni Stanley'a stwierdzono całkowitą inaktywację wirusa mozaiki tytoniowej pod wpływem działania rybonukleazy. Fakt przenikania bezbiałkowego kwasu nukleinowego do wnętrza komórki bakteryjnej, wystarczający do zainicjowania błyskawicznej multiplikacji wirusów, byłby argumentem przemawiającym za tym, że głównym bodźcem do tworzenia się nowych cząsteczek nukleoproteidów, a więc nowych cząsteczek i białka i kwasów nukleinowych, są tylko i jedynie kwasy nukleinowe agresorów. Mechanizm działania kwasów nukleinowych w kierunku wytwarzania nowych cząsteczek białka fagów, a także odtwarzanie się cząsteczek ich nukleinowej składowej, mógłby (według przypuszczeń wirusologów-biochemików) polegać na tym, że kwasy nukleinowe fagów-agresorów są nosicielami grup fosforanowych i jako takie byłyby zdolne do przekazywania energii na rzecz tworzenia się wiązań peptydowych białkowej części nowopowstających fagów, i to kosztem białka zaatakowanej komórki bakteryjnej.

Byłby to więc typowy przykład odtwarzania się białka dzięki obecności swoistych cząstek kwasów nukleinowych, jakkolwiek mechanizm tego procesu nie jest jeszcze znany. W procesie tym niewątpliwie wykorzystywane są enzymy komórek zaatakowanego organizmu, które kierują syntezą białka fagów i odtwarzania się nowych cząstek kwasów nukleinowych. Mnożenie się wirusów jest oczywiście związane ze zmianami biologicznymi gospodarza i dlatego każdy czynnik wpływający na aktywność tej komórki będzie miał wpływ na energię tworzenia się białka dla nowych wirusów. Mielibyśmy więc i na tym przykładzie dowód współzależności między produkcją kwasów nukleinowych w komórce i produkcją „żywych” białek. Powstawanie „życia” wirusów stanowiłoby pewien arcytyp tych wszystkich przemian azotowych (a więc przede wszystkim biosyntezy białka), które w każdej chwili dokonują się we wszystkich żywych organizmach.

LITERATURA

1. Avery O. T. 1944: J. Exp. Med. 79, 137.
2. Borsook H., Keighley H. 1935: The continuing metabolism of Nitrogen in animals; Proc. Roy. Soc. S. B. 118. 488, London.
3. Borsook H., Dubnoff H. 1947: J. Biol. Chem. 168, 397.
4. Borsook H. 1955: The biosynthesis of polipeptides and proteins. Pasadena, California.
5. Bresler S. 1952: Problemy biochemii. Z. 8. (Tłumaczenie).
6. Brachet J. 1947: Symp. Soc. Exp. Biol. 1. 207.
7. Casperson T. 1947: Symp. Soc. Exp. Biol. 1. 127.
8. Coldwell P. C., Macker E. J. 1950: J. Chem. Soc. 3151.
9. Dounce A. L. 1952: Enzymolog. 15, 251.
10. Feulgen, Rosenbeck: wg Postępy biochemii T. I., Z. 2. 1956.
11. Folin O. 1905: A theory of protein metabolism. Amer. J. Physiol. 13, 117.
12. Gale F., Folkes J. 1953: Bioch. J. 55. XI. 1954: Nature, 173, 1223.
13. Gale F. 1955: Symposium of aminoacid metabolism, Baltimore, J. H. Press.
14. Schoenheimer R. 1942. The dynamic state of body constituents. Cambridge. Harvard University.
15. Spiegelmann S., Dunn 1947: J. Gen. Physiol. 31, 158.
16. Spiegelmann S. i Harlyn O. 1955: Symposium of aminoacid metabolism, Baltimore. J. H. Press.