BERNARDINO FANTINI (*)

Lo stato dinamico delle proteine cellulari: modelli alternativi e transizioni disciplinari (**)

Introduzione

Per le teorie fisiologiche dominanti nella seconda metà del XIX secolo, l'organismo è formato da una combinazione temporanea dl sostanze chimiche, siano esse specifiche dei sistemi viventi oppure del tutto simili o identiche alle molecole ordinarie studiate dal chimico organico. Cio che vi è di costante in un organismo vivente è la sua forma, come viene studiata dall'anatomia, che rimane stabile attraverso la vita dell'organismo nonostante i mutamenti chimici che avvengono nei tessuti, nelle cellule che la costituiscono. Queste sostanze sono in uno stato di movimento continuo, vengono assimilate, consumate, modificate, escrete o integrate nella struttura dell'organismo. La cellula, divenuta durante gli anni 1850 l'unità strutturale e funzionale, presenta una attività continua, con variazioni di intensità fra cellula e cellula, fra tessuto e tessuto, anche in risposta a stimoli ambientali.

Questa visione dinamica delle caratteristiche fondamentali della vita veniva illustrata da una metafora classica, quella del vortice o della cascata, contrapposta alla metafora, altrettanto classica ma indicativa di una visione statica, del cristallo. Nel 1869 Thomas H. Huxley riprende questo modello, all'interno di una visione dinamica della base fisica della vita, affermando che le sostanze chimiche si trovano in rapporto all'organismo:

> come le particelle di acqua rispetto ad una cascata o a un vortice [...] La forma dell'organismo è in questo modo determinata dalle attività intrinseche delle molecole organiche di cui essa è composta; e se il vortice si esaurisce, ciò distrugge solo la forma, lasciando le molecole dell'acqua con tutte le loro proprietà intrinsiche intatte. Così, ciò che chiamiamo morte e putrefazione di un animale o di una pianta, è solo la rottura della forma, o modo di associazione, delle sue molecole costituenti.[1]

(*) Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università degli Studi «La Sapienza», Via Lancisi 29, 00161 Roma.

(**) Lavoro dedicato al Professor G.B. Marini-Bettòlo, Uno dei XL, in occasione del 75° compleanno.

[1] Huxley T.H., *Spontaneous Generation*, in «Lay sermons, adresses and reviews», New York: Appleton, 1877, p. 355.

L'esponente più prestigioso della fisiologia di questo periodo, Claude Bernard, ripropone questa metafora, stabilendo una separazione ancora più drastica fra forma e funzioni, «l'indipendenza della forma e della materia», e assegnando al fisiologo generale solo lo studio del comportamento di quest'ultima. La nutrizione, che Bernard considera come «il carattere distintivo, essenziale, dell'essere vivente, la più costante e la più universale delle sue manifestazioni», è la modificazione continua delle particelle che costituiscono l'essere vivente:

> L'edificio organico è la sede di un movimento nutritivo continuo che non lascia a riposo nessuna parte; ciascuna di esse, senza cessa e senza tregua, si alimenta dall'ambiente che la circonda e vi getta i suoi rifiuti e i suoi prodotti. Questo rinnovamento molecolare è impercettibile allo sguardo; ma dato che ne vediamo l'inizio e la fine, l'entrata e l'uscita delle sostanze, ne concepiamo le fasi intermedie e ci rappresentiamo una corrente di materia che traversa incessantemente l'organismo e lo rinnova nella sua sostanza mantenendolo nella sua forma.[2]

Questo quadro programmatico è rimasto invariato nei decenni successivi, trovando via via gli strumenti, teorici e tecnici, per concretizzarsi in diversi programmi di ricerca che coinvolgono sempre più direttamente la comunità dei chimici. La scoperta degli enzimi intracellulari fornisce un primo strumento per poter individuare i singoli passi che costituiscono il metabolismo intermedio, cominciando a rompere la «scatola nera» in cui si svolgono le reazioni chimiche all'interno dell'organismo vivente. In una famosa conferenza, F. Gowland Hopkins nel 1913 invitava i chimici e i biochimici ad uscire dal tradizionale studio statico dei composti chimici per passare al «lato dinamico dei fenomeni biochimici», rispondendo in questo modo alle sollecitazioni dei fisiologi.[3]

Con lo sviluppo della termodinamica il modello si espande, pur rimanendo sostanzialmente lo stesso, per includere il trasporto di energia. Per L.J. Henderson, come in seguito per W. Cannon, che su questa base costruisce il concetto di omeostasi, gli oggetti viventi «conservano, o cercano di conservare, una forma ideale, mentre attraverso di essi scorre un flusso stazionario dl energia e materia che cambia continuamente».[4]

Nei decenni a cavallo fra '800 e '900 lo sviluppo della chimica organica rendeva più concreti gli enti chimici coinvolti nel metabolismo, mostrando che essi non erano strutture particolari, specifiche, ma composti del tutto analoghi a quelli ordinari studiati dalla chimica organica. Emil Fischer rivendicava ai chimici lo studio del metabolismo, perché «è compito della chimica organica, specialmente della chimica di sintesi, accumulare questo materiale assolutamente essenziale», cioè «la conoscenza

[2] Bernard C., *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*, Paris: Baillière et Fils, 1878, Reprint avec une prèface de Georges Canquilhom, Paris: Vrin, 1966; p. 35-36.

[3] Hopkins F.G., *The Dynamic Side of Biochemistry*, Address of the Sectional President to Physicological Section, British Association Birmingham Meeting 1913, «Rep. Brit. Ass.», 1913, 652.

[4] Henderson L.J., *The Fitness of the Environment. An inquiry into the biological significance of the properties of matter*, New York: MacMillan, 1913.

completa di ogni sostanza chimica individuale che si presenta nei cicli di variazioni metaboliche».[5] Questa visione tuttavia era statica, nella linea piena della tradizione di chimica organica, diversa da quella dinamica della chimica fisiologica, in quanto dai risultati di Fischer sui peptidi e sul legame peptidico emergeva una visione delle proteine come strutture rigide, con una precisa disposizione spaziale e stereochimica, come le normali molecole della chimica organica.[6]

Se rimane chiaro, a questo punto, che i tessuti e le cellule sono sede di un «ricambio chimico» continuo, il problema diviene vedere se tale ricambio riguarda anche le molecole, in particolare le proteine, che costituiscono queste strutture. Questo, d'altro canto, corrispondeva al dibattito sulla natura ontologica delle proteine, se esse in altri termini dovessero essere classificate come degli oggetti chimici o piuttosto come il livello minimo di organizzazione delle strutture vitali.[7]

Le teorie sul metabolimo proteico all'inizio del '900

In questo contesto teorico, da una parte dinamico e fisiologico, dall'altro stereochimico e chimico organico nasce la teoria classica sul metabolismo delle proteine, avanzata da Otto Folin nel 1905, secondo la quale vi erano due tipi distinti di metabolismo delle proteine: un metabolismo rapido «esogeno» delle proteine provenienti dagli alimenti e utilizzate come fonte di energia e di molecole utili, ed un metabolismo «endogeno» delle proteine presenti nei tessuti, che Folin considerava limitato ad una specie di meccanismo cellulare di «deterioramento e riparazione». Alla base di questa distinzione vi era un'obiezione di fondo al modello del vortice, considerato uno spreco di energia. Risulta molto più economico dividere in due i costituenti dell'organismo, separando le proteine di struttura, di «sostegno», dalle proteine del metabolismo vero e proprio.

Pubblicando i risultati ottenuti con una complicata serie di analisi dell'urina di soggetti umani alimentati con diete a vario contenuto d'azoto, Folin scrisse che per spiegare le variazioni osservate nella composizione dell'urina sulla base del catabolismo proteico, bisognava introdurre due tipi di catabolismo. «Un tipo è estremamente variabile in quantità, mentre l'altro tende a rimanere costante. Un tipo porta principalmente ad urea e solfati inorganici, senza creatinina e probabilmente senza zolfo neutro; l'altro, il catabolismo costante, è in gran parte rappresentato da creatinina e zolfo neutro ed in misura minore da acido urico e da solfati eterei».

[5] Fischer E., *Synthetical chemistry in relation to biology*, «J. Chem. Soc.», *91*, 1907, 1794-1765.

[6] Fischer aveva sottolineato l'importanza della steoreochimica per la fisiologia in diverse pubblicazioni, fra le quali: Fischer E., *Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme*, «Ber. chem. Ges.», *27*, 1894, 2985-93; Fischer E., *Bedentung der Stereochemie für die Physiologie*, «Z. physiol. Chem.», *26*, 1898, 60-87. Le ricerche sul legame peptidico e sulle proteine sono riassunte in Fischer E., *Untersuchungen über Aminosuren, Polypeptide und Proteine*, Berlin, 1906. Si veda anche Fischer E., *Proteine und Polypeptide*, «Zeit. angew. Chem.», *20*, 1907, 913-917.

[7] Su questo dibattito si veda: Fantini B., *Chemical and biological classification of proteins*, «Hist. Phil. Life Sci.», *5*, 1985, 3-32.

Per Folin era chiaro che i processi metabolici che producono dei prodotti finali costanti in quantità sembrano esser indispensabili per la continuazione della vita e costituiscono una parte essenziale della attività che distingue le cellule viventi da quelle morte. «Chiamerei perciò il metabolismo proteico che tende ad essere costante metabolismo di tessuto o metabolismo endogeno e l'altro il metabolismo proteico variabile, lo chiamerei metabolismo esogeno o intermedio».[8]

L'idea che le proteine strutturali fossero essenzialmente inerti rimase a lungo dominante in biochimica, almeno sino agli anni '30, per essere messa in dubbio con lo svlluppo della «fase classica» della biochimica, culminata nella proposta del ciclo, come modello esplicativo centrale, e lo sviluppo del modello dinamico dei costituenti cellulari, proposto in modo paradigmatico da R. Schoenheimer nel 1942 .

Le ricerche sugli isotopi e il metabolismo intermedio

Lo strumento per tentare di dare una risposta più precisa su quale fosse il destino del vari composti metabolici all'interno della cellula venne dalla disponibilità degli isotopi pesanti o radioattivi dell'idrogeno, ossigeno e azoto, che vennero applicati allo studio dei problemi biologici con grande velocità negli anni '30, nonostante il costo dell'apparecchiatura richiesta e le difficoltà tecniche.

Già in precedenza György Hevesy aveva usato, a partire dal 1923, gli isotopi radioattivi per studiare il trasporto dei fluidi nelle piante e negli animali. La scoperta della radioattività artificiale diede un grande impulso a queste ricerche. Nel 1933 Irène e Frédéric Joliot-Curie, bombardando con particelle alfa alcuni elementi leggeri, il boro, magnesio e l'alluminio, avevano ottenuto la loro trasformazione in isotopi radioattivi: l'alluminio dà origine al fosforo radioattivo, il boro all'azoto, il magnesio al silicio. Nel 1934 Hevesy preparò l'isotopo radioattivo del fosforo ^{32}P e lo usò come indicatore nello studio del metabolismo del fosforo, mostrando che durante la crescita delle piante si ha un continuo scambio di atomi di questo elemento tra le foglie.[9]

Gli sviluppi più importanti per l'applicazione degli isotopi allo studio del metabolismo si ebbero soprattutto dopo la scoperta del deuterio, isotopo pesante dell'idrogeno, realizzata da H.C. Urey nel 1932.[10] Dato che questo isotopo ha una massa doppia dell'idrogeno e differenti proprietà fisiche diveniva più semplice isolare le grandi quantità di isotopi pesanti necessarie per le indagini biologiche, in quanto non si aveva la facilità con cui si potevano seguire gli isotopi radioattivi. Nel giro di un anno Urey e G.N. Lewis misero a punto dei metodi per la concentrazione del deuterio mediante elettrolisi frazionata dell'acqua. Il risultato fu l'«acqua pesante»,

[8] Folin O., *A Theory of Protein Metabolism*, «Am. J. Physiol.», *13*, 1905, 117-138: 122-123.

[9] Una ricostruzione di questi esperimenti è data in Hevesy G., *Historical Sketch of the Biological Application of Tracer Elements*, «Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.», *13*, 1948, 129-150.

[10] Urey H.C. et al., *An Hydrogen Isotope of Mass 2 and its Concentration*, «Phys. Rev.», *40*, 1932, 1-15. Lewis G.N., *The Isotope of Hydrogen*, «J. Amer. Chem. Soc.», *55*, 1933, 1297-98; Lewis G.N., *Concentration of ^{2}H Isotope*, «J. Chem. Phys.», *1*, 1933, 341-44; Lewis G.N., *The Biology of Heavy Water*, «Science», *79*, 1934, 151-153.

una forma diversa della sostanza basilare della vita, che aveva proprietà biologiche e chimiche differenti. G.N. Lewis cominciò a fare esperimenti biologici con essa già nel 1933. Questo nuovo strumento fece sorgere molte speranze. Come scrisse nel 1933 W.F. Aston:

> La sostituzione di ^2H a ^1H, possibile nella molecola, lo è anche nella cellula vivente e la sua estensione dai batteri e i girini sino all'uomo può essere senza problemi lasciata all'immaginazione del lettore. Abbiamo di fronte una nuova chimica e una nuova biologia.[11]

Man mano che una quantità sufficiente di acqua pesante divenne disponibile, si sviluppò una intensa attività di ricerca sui soggetti più disparati, alla ricerca un po' alla cieca di questa nuova biologia. Infatti, come nota R. Kohler,

> Le speranze dei biologi erano tipiche di quel periodo; essi erano inbevuti dalla attesa di una «nuova biologia», ma senza alcun obiettivo specifico. In effetti non c'erano problemi biologici che l'acqua pesante fosse esclusivamente adatta a risolvere; i biologi stava attendendo l'inatteso.[12]

Il programma di Urey di utilizzare il deuterio per ricerche di biologia fu ampiamente sostenuto dalla Rockefeller Foundation, nell'ambito del nuovo indirizzo dl biologia quantitativa o «biologia molecolare», proposto da W. Weaver.[13] Nel 1934 la Rockefeller Foundation aveva finanziato un programma da svolgere all'Università di Copenaghen, proposto da Niels Bohr, dal fisiologo August Krogh, e dal chimico fisico G. Hevesy, che comprendeva la applicazione dell'acqua pesante alla fisiologia del trasporto di fluidi nell'organimo. Nello stesso 1934 un allievo di Urey alla Columbia University, David Rittenberg, per sviluppare il programma, si trasferì nel Dipartimento di biochimica del Columbia College of Physician and Surgeons, il cui direttore Hans T. Clarke, sosteneva l'applicazione massiccia della chimica organica alla biochimica.[14] In questo stesso dipartimento era giunto l'anno precedente, proveniente dall'Istituto di Patologia dell'Università di Friburgo, che era stato costretto ad abbandonare per evitare la persecuzione dei nazisti, Rudolf Schoenheimer.[15] La collaborazione fra Schoenheimer e Rittenberg fu all'origine del programma per applicare gli isotopi allo studio del metabolismo intermedio.

[11] Aston F.W., *The Hydrogen Isotope of Mass 2*, «Science Progress», *28*, 1933, 203-205.

[12] Kohler R.E., *The management of science: the experience of Warren Weaver and the Rockefeller Foundation program in molecular biology*, «Minerva», *14*, 1976, 279-306. Kohler R.E., *Warren Weaver and the Rockefeller Foundation Program in Molecular Biology: A Case Study in the Management of Science*, in «The Sciences in the American Context: New Perspectives», N. Reingold (ed.), Washington: Smithsonian Institution Press, 1979, 249-293:269; Weaver W., *The Natural Sciences*, «Ann. Rep. Rockefeller Foundation», 1938, 203.

[13] Fosdik R.B., *The Story of the Rockefeller Foundation*, New York, 1952.

[14] Clarke H.T., *Impressions of an Organic Chemist*, «Ann. Rev. Biochem.», *27*, 1928. Si veda anche Clarke I.T., *The Excitement and Fascination of Science*, Palo Alto: Stanford University Press, 1965, una collezione di saggi anche storici sulla biochimica e sulle istituzioni in cui questa disciplina si è sviluppata.

[15] Per le notizie biografiche su Schoenheimer si vedano: Clarke H.T., *Rudolf Schoenheimer*, «Science», *94* 1941, 553-4; Quastel J.H., *Rudolf Schoenheimer*, «Nature», *149*, 1942, 15-16; Peyer U., *Rudolf Schoen-*

Schoenheimer concepì l'idea di usare il deuterio come un tracciante molecolare per seguire le reazioni biochimiche e, in collaborazione con Rittenberg, preparò diversi composti fisiologici, in particolare acidi grassi, contenenti atomi di deuterio sotto forma di gruppi metilici o metilenici. Le proprietà fisiche di questi composti rimanevano inalterate, ma il contenuto in deuterio di esse poteva essere facilmente determinato dalle proprietà dell'acqua che si formava dopo la combustione. Il destino delle sostanze nell'organismo poteva dunque essere seguito anche a basse concentrazioni, e un nuovo, fruttuoso strumento sperimentale era a disposizione: «Il numero e le possibili applicazioni di questo metodo sembrano pressoché illimitate»[16].

Schoenheimer derivò l'idea di questo metodo probabilmente da Hevesy, con cui egli aveva lavorato negli anni '20. Anche se questo lavoro, come scrisse lo stesso Hevesy nel 1948, aveva dato risultati scarsi,

> esso nondimeno si dimostrò di grande importanza per lo sviluppo futuro degli indicatori isotopici ... è stato nel corso di questa ricerca che Schoenheimer prese familiarità con il metodo degli indicatori isotopici, che egli applicò diversi anni piu tardi, con così grande successo, allo studio del metabolismo dei grassi e delle proteine.[17]

Non risulta chiaro, tuttavia, come da queste prime fasi, che riguardavano essenzialmente assorbimento e trasporto di fluidi e sostanze non differenziate attraverso l'organismo, Schoenheimer sia passato all'idea di usare gli isotopi come traccianti molecolari, per individuare percorsi metabolici, per seguire le trasformazioni chimiche delle sostanze durante il metabolismo.

Un'altra fonte di ispirazione per il metodo è costituita da precedenti ricerche biochimiche. Knopp, per esempio, aveva seguito la degradazione degli acidi grassi, attaccando un gruppo particolarmente individuabile alla catena. Analizzando poi i residui della trasformazione per ricercare il gruppo marcato, egli era in grado di ipotizzare in che modo la molecola veniva trasformata. Secondo J. Fruton,[18] Schoenheimer semplicemente combinò le tecniche di Knopp e di Hevesy, ma questo evidentemente non spiega storicamente perchè Schoenheimer e non altri ebbe l'idea. Kohler nota come nel 1934 Schoenheimer fosse giunto nelle ricerche sugli steroli ad un punto in cui i metodi tradizionali non erano più sufficienti, di qui la percezione che le molecole marcate con deuterio potessero essere lo strumento idoneo a superare l'impasse. In effetti, l'idea di un metabolimo dinamico era chiaramente presente in Schoenheimer anche prima della possibilità di usare gli isotopi come marcatori. In un lavoro del 1933 dal titolo «Sintesi e distruzione del colesterolo nel-

heimer, Zürich, 1972. Sulle prime ricerche di Schoenheimer in Germania si veda Thomas K., *Fifty Years of Biochemistry in Germany*, «Ann. Rev. Bioch», *23*, 1954. Un articolo importante per la ricostruzione dell'opera complessiva del chimico tedesco è Kohler R.E., *Rudolf Schoenheimer. Isotopic Tracers and Biochemistry in the 1930's*, «Hist. Stud. Phys. Sci.», *8*, 1977, 257-98.

[16] Schoenheimer R., Rittenberg D., *Deuterium as an Indicator in the Study of Intermediary Metabolism*, «J. Biol. Chem.», *111*, 1935, 156-163.

[17] Havesy G., *op. cit.*, nota 9, p. 130.

[18] Fruton J.S., *Molecules and Life. Historical Essays on the Interpaly of Chemistry and Biology*, New York: Wiley, 1972, p. 450-52.

l'organismo», che può essere considerato una sintesi delle ricerche precedenti ed un programma di ricerca nuovo, indica con chiarezza le conseguenze dei suoi lavori precedenti e l'esigenza di nuovi metodi di indagine, avanzando le prime ipotesi sull'uso degli isotopi pesanti.[19] Dagli esperimenti qui riassunti risultava chiaro che il colesterolo era un metabolita implicato in una attività metabolica continua e che era continuamente formato e distrutto.

Tra il 1935 ed il 1938 il gruppo di Schoenheimer produce una serie di quindici articoli, con il titolo comune «Deuterium as an indicator in the Study of Intermediary Metabolism», tutti pubblicati sul *Journal of Biological Chemistry*. Il deuterio veniva usato per marcare le sostanze alimentari in modo da poter seguire il loro trasporto e la loro conversione in altre sostanze. Schoenheimer ed i suoi collaboratori misero a punto un metodo generale per determinare il taaso di sintesi e di distruzione dei componenti individuali dell'organismo, realizzando in questo modo quello che era rimasto solo un sogno per i chimici fisiologici, a partire dalla rivoluzione lavoisieriana. «Le sostanze organiche sintetizzate in un mezzo acquoso contenente acqua pesante conterranno, in generale, deuterio. Il tasso di comparsa del deuterio nel composto organico sarà dunque proporzionale al tasso di sintesi».[20]

I risultati per quel che riguarda gli steroli non furono incoraggianti, dato che le relazioni metaboliche fra i gruppi sterolici non erano così dirette come si sperava. Invece i primi tentativi con gli acidi grassi si rivelarono estremamente promettenti. In esperimenti svolti alimentando dei topi con olio di lino marcato con deuterio, come è indicato nel III degli articoli:

> Ci aspettavamo che [...] pressoché tutto il grasso ingerito sarebbe stato bruciato e che relativamente poco sarebbe stato depositato. Con nostra sorpresa abbiamo trovato che nonostante il fatto che gli animali non avessero preso peso, una grande percentuale del grasso assorbito veniva depositato, indicando che il grasso che veniva bruciato non era ossidato direttamente, ma preso dai depositi di grasso.[21]

Questi risultati contraddicevano dunque le teorie correnti secondo le quali la maggior parte dei grassi ingeriti veniva immediatamente degradata. Di conseguenza

[19] Schoenheimer R., Breusch F., *Synthesis and Destruction of Cholesterol in the Organism*, «J. Biol. Chem.», *103*, 1933, 439-448. I lavori a cui ci si riferisce sono i seguenti: Schoenheimer R., *Ueber die Bildung des Colesterins im Tierorganismus*, «Forschung. u. Fortschr», *5*, 1929, 151-52; Schoenheimer R., *Uber die Spezifität der Resorption von Sterinen, abhangig von ihrer Konstitution*, «Z. Physiol. Chem.», *192*, 1930, 117-123; Schoenheimer R., *New Contributions in Sterol Metabolism*, «Science», *74*, 1931, 579-584; Schoenheimer R., *Die Spezifität der Cholesterinresorption und ihre biologische Bedeutung*, «Klin. Wochschr.», *11*, 1932, 1795.

[20] Il primo di questi articoli è Schoenheimer R., Rittenberg D., *Deuterium as an Indicator in the Study of Intermediary Metabolism*, «J. Biol. Chem.», *111*, 1935, 163. Questi lavori sono riassunti nella Harvey Lecture di Schoenheimer, *The Investigation of Intermediary Metabolism with the Aid of Heavy Hydrogen*, «Harvey Lectures», 1936-1937, 1937, 122-144.

[21] Schoenheimer R., Rittenberg D., *Deuterium as an Indicator in the study of Intermediary Metabolism*. III. *The Role of the Pat Tissues*, «J. Biol. Chem.», *111*, 1935, 175-181.

gli acidi grassi, che erano considerati come metabolicamente inerti, erano invece in uno stato di rapido flusso metabolico.

I risultati di questi esperimenti rimisero in discussione molte delle teorie sui percorsi chimici del metabolismo, che erano derivate da esperimenti di alimentazione controllata, dalle analogie con reazioni chimiche note e per analogie strutturali. Per esempio si riteneva che il colesterolo derivasse dalla ciclizzazione di acidi grassi a lunga catena, mentre Schoenheimer e Rittenberg nel loro articolo XI, mostrano che il colesterolo veniva sintetizzato a partire a piccole molecole, allo stesso modo degli acidi grassi.[22]

Nel 1937 Harold Urey ed i suoi collaboratori riuscirono a concentrare ^{15}N, isotopo stabile dell'azoto, che rapidamente misero a disposizione del gruppo di Schoenheimer, anche per favorire l'applicazione alla biologia della nuova tecnica, in modo da avere sostegni al proprio oneroso programma di ricerca. Le scoperte di Krebs relative al ciclo dell'ornitina nel 1935 avevano posto al centro dell'attenzione il metabolismo dell'azoto e Schoenheimer cominciò a lavorare anche sul metabolismo degli acidi nucleici con ^{15}N, utilizzando uno spettrometro di massa, costruito da Rittenberg. L'obiettivo di questi esperimenti era mettere alla prova l'ipotesi di Folin sulla distinzione fra metabolismo esogeno ed endogeno dell'azoto. A questo lavoro partecipò anche Sarah Ratner, che aveva appena completato una tesi sulla chimica degli aminoacidi sotto la direzione di Clarke. Iniziò una nuova serie di 16 pubblicazioni dal titolo «Studies in protein metabolism», sempre pubblicata sul *Journal of Bological Chemistry*.

I primi risultati, ottenuti nutrendo dei ratti con la tirosina marcata con ^{15}N risultarono altrettanto sorprendenti di quelli ottenuti con gli acidi grassi, in quanto si trovò che la maggior parte degli isotopi era localizzata nei tessuti. Il programma di ricerca fu di conseguenza esteso, per cercare di «seguire l'azoto marcato nei costituenti del corpo degli animali».[23]

Per vedere se gli aminoacidi venivano incorporti nelle proteine come molecole intatte, per sostituzione diretta con altri aminoacidi, Schoenheimer ed i suoi collaboratori utilizzarono una doppia marcatura, con il deuterio nella catena di carbonio e l'^{15}N nel gruppo aminico della leucina. I risultati mostravano che solo il 30% dell'isotopo dell'azoto fornito con la dieta veniva escreto, mentre il restante 70% si ritrovava nei tessuti dei diversi organi. Inoltre, i risultati mostravano che circa il 30% della leucina presente nella dieta era stata incorporata nei tessuti senza distacco del gruppo aminico, mentre il restante 70% di questo gruppo si trovava in altri aminoacidi. Schoenheimer riuscì quindi a dimostrare che i gruppi $-NH_2$ degli amino acidi erano in uno stato di attività metabolica costante e rapida.[24] Gli stessi

[22] Schoenheimer R., Rittenberg D,. *Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism*. XI. *Synthesis and destruction of fatty acids in the organism*, «J. Biol. Chem.», *114*, 1936, 381-396.

[23] Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D., *Studies in Protein Metabolism*. VII. *The Metabolism of Tyrosine*, «J. Biol. Chem.», *127*, 1939, 333-344.

[24] Anche A.E. Brunstein, nell'URSS, aveva scoperto nel 1936 un ciclo di «transaminazione» in cui l'acido glutammico agiva come portatore del gruppo $-NH_2$. Insieme a M. Kricman aveva osservato nei muscoli e in altri tessuti la reazione di transaminazione fra alanina e acido L-glutammico. Successivamente Braunstein osservò la stessa reazione anche fra alanina ed acido aspartico.

risultati si ottenevamo marcando la tirosina: l'azoto 15 finiva col trovarsi anche in altri aminoacidi, come l'acido glutammico, l'acido aspartico, l'arginina e l'istidina, contrariamente alla ipotesi corrente che l'azoto marcato sarebbe rimasto nell'aminoacido con cui era stato introdotto nella dieta. Evidentemente gli aminoacidi interagivano fra di loro ed il poco che si conosceva sulla sintesi proteica non riusciva ad inquadrare questi risultati. In ogni caso era chiaro che le intere proteine dei tessuti, anziché essere biologicamente inerti, sembravano coinvolte in questa attività, contro la teoria di Folin, basata sulla distinzione fra azoto «esogeno» ed azoto «endogeno».

Come si legge nel lavoro originale:

> è pressoché impossibile riconciliare i nostri risultati con qualsiasi teoria che richieda una distinzione tra questi due tipi di azoto. Si è visto che i gruppi azotati delle proteine dei tessuti sono costantemente implicati in reazioni chimiche; il legame peptidico si apre, gli amino acidi liberati si mescolano con altri della stessa specie, qualunque sia la fonte, dieta o tessuto. Questo miscuglio di molecole di aminoacidi, mentre si trovano nello stato libero, prende parte ad una varietà di reazioni chimiche: alcuni rientrano direttamente in posizioni libere lasciate aperte dalla rottura dei legami peptidici; altri trasferiscono il loro azoto a molecole deaminate per formare nuovi amino acidi. Questi a loro volta continuamente entrano negli stessi cicli chimici che rendono la sorgente di azoto indistinguibile.[25]

Da questi risultati derivò il concetto di «metabolic pool», di una riserva intracellulare di aminoacidi metabolicamente reattivi, derivati sia dalle proteine della dieta che da quelle presenti nei tessuti, concetto necessario per non essere costretti ad introdurre uno scambio diretto di aminoacidi o di gruppi chimici più semplici fra molecole complesse. La sostituzione di un aminoacido in una proteina di un tessuto viene paragonato alla sostituzione di un mattone caduto da un muro.

L'idea di un «pool metabolico» come quella di sostituzione delle proteine (*protein turnover*) rompeva con il concetto di linerità e indipendenza delle catene metaboliche, centrale nella tradizione biochimica, che mirava per l'appunto ad individuare le linee o i cicli metabolici, isolando gli enzimi responsabili di ogni singolo passo. Il passaggio fra queste diverse linee non era previsto, né l'interazione chimica fra strutture complesse già formate.

La sintesi proteica e il modello dello «stato dinamico»

Il concetto di «metabolic pool» si legava poi immediatamente al problema della sintesi proteica, che proprio alla fine degli anni '30 cominciava ad essere un proble-

[25] Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D., *Studies in Protein Metabolism X. The Metabolic Activity of Body Proteins Investigated with l(–)-Leucine Containing Two Isotopes*, «J. Biol. Chem.», *130*, 1939b, 703-32: 730.

ma particolarmente studiato. Per spiegare la sintesi proteica era stati ipotizzati due meccanismi: una rottura completa delle proteine nelle unità costituenti, seguita da una nuova sintesi *de novo*, oppure una sostituzione parziale di unità di aminoacidi, con una rottura in polipeptidi e loro successiva riaggregazione per mezzo di reazioni di transpeptidazione. Dato che la tecnica utilizzata dal gruppo di Schoenheimer isolava *in vivo* i prodotti finali, ma non permetteva di vedere i passi intermedi, la scelta fra le due alternative non era possibile. A favore della seconda ipotesi vi erano i risultatl ottenuti nel 1938 da M. Bergmann e J. Fruton *in vitro* con l'azione di enzimi proteolitici sui polipeptidi. Questo modello avrà negli anni successivi importante diffusione, come modello esplicativo dinamico, basato su un modello a passi (*stepwise*), della sintesi delle proteine.[26]

Il problema era spiegare perché le proteine, che non sono materiale di immagazzinamento, come i grassi, continuano ad essere soggette a un turnover anche se gli amino acidi vengono forniti in eccesso nella dieta. Era chiaro che il principio biologico non era legato ad esigenze nutrizionali. L'interpretazione che Schoenheimer avanzò nel 1940 era che tale turnover fosse indispensabile al mantenimento della vita. Sino a che l'organismo vive, l'attività metabolica va avanti automaticamente. Considerando le analogie fra il metabolismo dei grassi e quello delle proteine, Schoenheimer considerò questo fenomeno un principio biologico generale.

> La scoperta della rapida rigenerazione molecolare, con il costante trasferimento di gruppi specifici, suggerisce che il sistema biologico rappresenta un unico grande ciclo di reazioni chimiche strettamente legate ... L'immagine classica deve così essere sostituita da una che renda conto dello stato dinamico della struttura dell'organismo.[27]

Schoenheimer propone a questo proposito la metafora del reggimento militare, nel quale «gli individui di cui è composto cambiano continuamente ... [ma] la cui grandezza fluttua solo entro limiti stretti, ed ha una struttura ben definita ed altamente organizzata». La visione di fondo è quella di una lotta costante fra costruzione e distruzione delle sostanze organiche presenti nell'organismo, della competizione fra due processi distinti, quello della sintesi e quello della degradazione.[28] Le grandi molecole, come grassi e le proteine, subiscono l'azione degli enzimi litici e sono costantemente degradate nei loro frammenti costituenti. Queste modificazioni sono bilanciate dai processi di sintesi. La morte priva l'organismo della capacità di produrre reazioni di ossidazione e niente più resiste al disordine termodinamico: «Le

[26] Bergmann M., *The structure of proteins in relation to biological problems*, «Chem. Rev.», *22*, 1938, 423-435; Bergmann M., Fraenkel-Conrat H., «J. Biol. Chem.», *124*, 1938, 1; Bergmann M., Fruton J.S., «Advances in Enzymol.», *1*, 1941, 63.

[27] Schoenheimer R., *The Dynamic State of the Body Constituents*, Cambridge: Harvard University Press, 1942, Reprinted 1964, pp. 44-45. Questo libro raccoglie le tre Dunham Lectures presentate a Harvard nel 1941.

[28] Questa teorizzazione è del tutto simile a livello di chimica cellulare a quella proposta da Claude Bernard per la fisiologia generale e basata sulla contrapposizione, o meglio sulla sintesi fra «due ordini di fenomeni: 1° fenomeni di creazione vitale o di sintesi organizzatrice; 2° i fenomeni di morte o di distruzione organica» (C. Bernard, *op. cit.* p. 39).

reazioni degradative non bilanciate portano al collasso degli elementi strutturali termodinamicamente instabili».[29]

Negli stessi anni tematiche simili erano sostenute da molti biochimimici. Lo stesso Hevesy usa il termine «molecular rejuvenation»[30] e già nel 1935 Borsook e Keighley[31] sulla base dello studio del bilancio dello zolfo nel metabolismo, avevano ipotizzato che le proteine fossero in uno stato di «continuing metabolism» e successivamente lo stesso Borsook[32] reclamò anche una priorità nei confronti di Schoenheimer, anche se si deve notare come la sua teoria fosse riferita solo alle proteine, mentre Schoenheimer propose una teoria generale, dell'organismo come un unico «grande ciclo».

I lavori di Schoenheimer produssero una notevole eccitazione, che divenne parte del generale clima intellettuale che stava formando la biochimica come disciplina di punta nel corso degli anni '30. Anche se Schoenheimer nel periodo dal 1937 alla sua morte nel 1941 si era occupato esclusivamente di metaboliti di piccole dimensioni, il suo programma di chiara impostazione fisiologica e dinamica continuò a formare un retroterra teorico particolarmente influente per quanti si ponevano l'obiettivo di integrare chimica e biologia.

Jacques Monod e la sintesi de novo *delle proteine*

I risultati cinetici della incorporazione degli amino acidi nelle proteine condotti all'Institut Pasteur di Parigi dal gruppo diretto da Jacques Monod a partire dalla fine degli anni '40 portarono a dei risultati che misero fortemente in dubbio il modello dello «stato dinamico». Questi risultati erano stati ottenuti nel corso delle ricerche sul fenomeno dell'adattamento enzimatico, che in quel periodo sembrava «il solo fenomeno a fornire una presa diretta alla sperimentazione sull'ontogenesi degli enzimi».[33]

Nel batterio *E. coli* l'aggiunta di un galattoside alle colture in crescita provoca la comparsa immediata dell'enzima capace di metabolizzarlo, la β-galactosidasi. Il batterio quindi «si adatta» al nuovo ambiente chimico, o, come si dirà in seguito, con un significativo cambiamento di vocabolario, il galattoside «induce» la sintesi dell'enzima.

Per spiegare il meccanismo di sintesi del nuovo enzima specifico, vengono prese in considerazione due ipotesi: a) la sintesi «completa» dell'enzima, a partire dagli

[29] Schoenheimer, *op. cit.* nota 27, p. 64 (3a Dunham Lecture).

[30] Hevesy G., *Molecular «Rejuvenation» of Muscle Tissue*, «Nature», *141*, 1938, 1097-98.

[31] Borsook H., Keyghley G.L., *The Continuing Metabolism of Nitrogen in Animals*, «Proc. Roy. Soc.», *118*, 1935, 488-521.

[32] Borsook H., Dubnoff J.W., *The Metabolism of Proteins and Amino Acids*, «Ann. Rev. Biochem.», *12*, 1943, 183-204.

[33] Monod J., Cohn M., *La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique)*, «Adv. Enzym.», *13*, 1952, 67-119: 67. Per una ricostruzione delle ricerche di Monod si veda: Monod J., *Pour une éthique de la connaissance*, Textes choisis et présentés par Bernardino Fantini, Paris: Editions La Découverte, 1988.

amminoacidi; b) la riorganizzazione di proteine preesistenti. Monod e i suoi collaboratori per diversi anni sono nettamente a favore della seconda ipotesi, ammettendo la presenza nella cellula non indotta di un «precursore» dell'enzima. Tuttavia all'inizio degli anni '50, la situazione si rovescia e viene affermata con forza la conclusione che l'induzione consiste «nella sintesi *completa* di una *nuova* proteina; nuova non solo come struttura specifica, ma anche per l'origine dei suoi elementi».[34]

Questa ipotesi è il risultato di vari esperimenti, alcuni dei quali relativi all'effetto di specifiche carenze di un singolo amminoacido sulla biosintesi indotta della galattosidasi.

> I risultati ottenuti [...] non presentano ambiguità: in nessun caso c'è una sintesi signiflcativa di β-galactosidasi durante la fase di carenza [...] Occorre dunque ammettere che ciascun aminoacido entra nella composizione delle nuove proteine [...]. La formazione della molecole Gz si produce solo in condizioni che permettano la sintesi *de novo* di una proteina completa.[35]

Risultati paralleli a quelli ottenuti a Parigi erano stati contemporaneamente ottenuti da S. Spiegelmann e H. Halvorson,[36] che avevano mostrato come il blocco della sintesi di un enzima bloccava simultaneamente l'utilizzazione di tutti gli aminoacidi.

Ancora più significativi per il cambiamento di teoria esplicativa furono i risultati degli studi cinetici sulla biosintesi di β-galattosidasi, che obbediva ad una legge molto semplice:

$$dz = p\,dx \qquad \text{ossia } dz/dx = p$$

dove dz è l'incremento della quantità di enzima, dx l'incremento della massa totale di proteine batteriche a partire dal momento dell'addizione dell'induttore e *p* una costante, chiamata tasso differenziale di crescita batterica, che esprime la velocità di sintesi di un costitutente cellulare particolare, come frazione della velocità di crescita globale, in modo che qualunque sia la velocità della crescita batterica risulti

$$p_1 + p_2 + p_3 \cdots = 1$$

Una cinetica lineare di questo tipo indicava che la sintesi di enzima dopo l'induzione era una frazione costante della sintesi proteica totale ed era di fatto incompatibile con l'ipotesi di una conversione di un precursore accumulato, che dovrebbe mostrare una cinetica autocatalitica. L'induzione corrispondeva quindi alla formazione *de novo* di una proteina interamente nuova e l'assenza di precursori implicava che gli aminoacidi dovevano legarsi simultaneamente e non secondo il model-

[34] Monod J., Pappenheimer A.M. Jr., Cohen-Bazire G.., *La cinétique de la biosynthèse de la β-galactosidase chez E. coli considerée comme fonction de la croissance*, «Biochim. Biophys. Acta», *9*, 1952, 648-60.

[35] Ivi.

[36] Halvorson J., Spiegelman S., «J. Bact.», *64*, 1952, 207.

lo «a passi» postulato dalle ipotesi sulla sintesi proteica accettate in quel periodo. Questi risultati furono poi confermati con lo studio della incorporazione dello ^{35}S.[37]

Una conseguenza di queste ricerche fu la messa in questione della teoria dello «stato dinamico» delle proteine intracellulari. Le proteine batteriche sembravano mostrare una stabilità sorprendente e una volta formate sembravano porsi al di fuori del gioco dei processi di equilibrio, di scambio fra i differenti costituenti cellulari. La sintesi di una proteina non è il risultato di un equilibrio dinamico, ma di un processo irreversibile cineticamente lineare.

In un libro manoscritto inedito dal significativo titolo *Cybernetique Enzymatique*,[38] Monod sviluppa le conseguenze teoriche di questa nuova concezione:

> Tutte queste osservazioni mostrano che nelle cellule in crescita attiva [...] le proteine, nel loro insieme, non sono né rinnovate né degradate ad un tasso apprezzabile. Esse si trovano in effetti in uno stato praticamente statico per quanto riguarda la loro struttura molecolare. Questa conclusione può sembrare, ed è parsa in effetti a molti, estremamente sorprendente per le nozioni generalmente accettate sul supposto stato «dinamico» delle proteine *in vivo*.

Monod non mette in dubbio i risultati sperimentali ottenuti da Schoenheimer, che possono però essere spiegati con altri meccanismi, come la degradazione intracellulare, la secrezione, la lisi cellulare. Questo significa che «i tassi di *turnover* misurati [...] esprimono lo stato dinamico del tessuto, piuttosto che lo stato delle molecole proteiche all'interno delle cellule».[39]

In un resoconto dattiloscritto delle proprie ricerche, le affermazioni di Monod sono ancora più drastiche:

> In conclusione, il postulato che un certo stato dinamico basato sullo scambio e il rinnovamento sia associato intrinsicamente alla sintesi, al mantenimento e alla attività delle proteine nella cellula non sembra possa essere mantenuto. Esso corrisponde a meccanismi improbabili, tenuto conto della struttura delle proteine, e l'esperienza mostra che, negli organismi in piena crescita, in piena attività metabolica, le proteine sono strutturalmente statiche.[40]

Metafore e ostacoli epistemologici

Per trovare una spiegazione al successo del modello dello stato dinamico, Monod parla della immagine tradizionale della vita come una fiamma instabile «tremo-

[37] Hogness D.S., Cohn M., Monod J., *Studies on the Induced Synthesis of β-galactosidase in Escherichia coli: the Kinetics and Mechanism of Sulfur Incorporation*, «Biochim. Biophys. Acta», *16*, 1955, 99-116.

[38] Monod J., *Cybernétique enzymatique*, manoscritto, giugno-luglio 1959, Archives de l'Institut Pasteur, Fonds Monod.

[39] Cohn M., Monod J., *Specific Inhibition and Induction of Enzyme Biosynthesis*, in «Adaptation in Micro-Organism», 3rd Symp. Soc. Gen. Micr. 1953, R. Davies, E.F. Gale (eds.), Cambrige: At the University Press, 1953, 132-149.

[40] *Rapport concernant les travaux de Messieurs Jacques Monod, François Jacob et Elle Wollman* (non datato, non firmato, probabilmente dell'inizio degli anni '60), Archives de l'Institut Pasteur, Fonds Monod.

lante, costantemente ricreata di una candela». E questa immagine «certamente descrive la vita e la sua lotta costante e incerta contro la corrente entropica come ci si presenta al nostro livello macroscopico». Questa immagine, continua Monod, viene istintivamente trasferita al livello microscopico, molecolare. Tuttavia questo trasferimento non è possibile, «perché solo le cellule sono viventi, non le molecole, e l'immagine della fiamma della candela non si applica a livello molecolare».[41]

Secondo la testimonianza dello stesso Monod, queste conclusioni erano «contrarie all'intero *Zeitgeist* del tempo» dato che il «mito di Schoenheimer ... era *absolutely overwhelming*». Quando egli presentò negli USA i risultati dei suoi esperimenti in collaborazione con Melvin Cohn all'inizio del 1954,

> essi sollevarono un furore assoluto. C'era l'idea hegeliana che questo stato dinamico fosse una specie di segreto della vita ... In quel periodo le sole persone che erano pienamente coscienti che questa storia dello stato dinamico delle molecole proteiche non poteva essere giusta, erano i cristallografi. Ai quali, naturalmente i fisiologi cellulari e i biochimici dicevano «ma voi state guardando delle molecole morte!»... Fate attenzione, se non fosse vero che le macromolecole, le proteine, sono stabili, allora la biologia molecolare non sarebbe quella che è.[42]

Proprio quest'ultima affermazione è il centro del dibattito in questa fase. La stabilità delle macromolecole all'interno della cellula era una condizione assoluta per la nascente biologia molecolare, in particolare per gli acidi nucleici, il materiale che costituisce il supporto dell'informazione ereditaria, e per estensione anche per le proteine. Come scrive Monod, «tutti i progressi della biologia molecolare moderna fanno apparire più chiaramente che i caratteri essenziali degli esseri viventi sono legati alla complessità, alla precisione e alla stabilità delle strutture delle loro macromolecole».[43] Le macromolecole sono dei cristalli che governano il vortice delle rezioni cellulari, sono la base del trasferimento dell'informazione. Esse devono necessariamente essere di natura più vicina ad un cristallo che ad un fuoco che si consuma. Anche sulle copertine dei libri di testo di biologia generale, il cristallo della doppia elica del DNA sostituisce bruscamente i cicli dinamici del metabolismo intermedio come immagine simbolo delle scienze della vita.

Conclusioni

Molti esperimenti successivi servirono a mitigare l'assolutezza della posizione dl Monod, che voleva sempre soluzioni uniche in natura, per cui secondo il celebre aforisma «ciò che vale per *Escherichia coli* vale anche per l'elefante». Già nel 1957 J. Mandestam, lavorando su cellule di E. coli in uno stato stazionario, non in crescita

[41] *Op. cit.*, nota 38.

[42] Judson H.F., *The Eight Day of Creation. The Makers of the Biological Revolution*, London: Jonathan Cape, 1976, p. 391.

[43] *Op. cit.* nota 38.

esponenziale, mostra la presenza sia di sintesi proteica che di degradazione delle proteine e sottolinea che l'estrapolazione dei dati ottenuti per la fase di crescita esponenziale delle popolazioni batteriche, sui quali Monod aveva costruito la sua teorizzazione, non poteva essere garantita, soprattutto per i tessuti degli organismi superiori adulti, in quanto si tratta di due estremi fisiologici.[44]

Di conseguenza viene accettata l'idea che le proteine cellulari negli animali adulti siano almeno in parte in uno stato dinamico, continuamente degradate e sostituite con una velocità specifica delle diverse proteine. Secondo Sarah Ratner,[45] questo concetto si affermò definitivamente con molto ritardo per «ragioni teleologiche»: perché la natura avrebbe dovuto selezionare un processo cosi enormemente dispensatore di energia e senza funzione? È interessante notare come questo argomento teleologico riprenda esattamente quanto proposto dai biochimici alla fine del secolo scorso. La questione tuttavia rimane aperta, e sono state avanzate molte diverse ipotesi interpretative, che mediano fra i due estremi che si sono storicamente presentati. Così, ad esempio, Robert Schimke nel 1964 ha individuato precise funzioni metaboliche al *turnover* proteico, sulla base della marcata eterogeneità nei tassi di *turnover* fra differenti enzimi. Tale eterogeneità sarebbe il risultato di una distinzione fra enzimi la cui azione è richiesta solo in presenza di particolari condizioni ambientali, come modificazioni della dieta o come risposta a particolari stimoli ormonali, ed enzimi che invece funzionano con continuità nella cellula, la cui attività è controllata dal ben noto meccanismo di regolazione negativa per mezzo di inibizione da feedback. Questi ultimi non avrebbero quindi necessità di fluttuare rapidamente e quindi non sono soggetti a *turnover*, come invece lo sono gli enzimi del primo tipo.[46]

L'opposizione fra i due opposti modelli interpretativi dello stato dinamico dei costituenti cellulari, il ruolo degli ostacoli epistemologici che a tali modelli sono storicamente connessi permettono di vedere in che modo le innovazioni tecnologiche, le trasformazioni disciplinari, le ipotesi teoriche, associate spesso alla riemergenza di vecchie idee su nuove basi interagiscono nella costruzione della conoscenza scientifica, in un processo nel quale continuità e discontinuità sembrano interagire in modo specifico e, quasi sempre, imprevedibile. In particolare il dibattito che si sviluppa negli anni '40 e '50 mostra la contrapposizione netta, teorica e disciplinare, esistente in questo periodo fra due modi diversi di definire la «base della vita», uno biochimico, legato al modello del «ciclo metabolico», l'altro biologico-molecolare che nell'immagine del cristallo portatore di informazione fa il punto di partenza della propria struttura esplicativa.

[44] Mandestam J., *Turnover of protein in starved bacteria and its relationship to the induced synthesis of enzyme*, «Nature», *179*, 1957, 1179-1181. Questi primi dati furono confermati da Borek E., Ponticorvo L., Rittenberg D., *Protein turnover in microorganism*, «Proc. Natl. Acad. Sci.», *44*, 1958, 369-374. Per una rassegna degli sviluppi successivi di questo dibattito si veda: Cameron I.L., Thrasher J.D. (Eds.), *Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body*, New York & London, 1971.

[45] Ratner S., *The dynamic state of body proteins*, in P.R. Srinivasan, J.S. Fruton, J.T. Edsall (Eds.), *The origins of modern biochemistry: A retrospect on proteins*, New York: The New York Academy of Sciences, 1979, 189-209:201.

[46] Schimke R.T., *The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver*, «Biol. Chem.», *239*, 1964, 3808-3817; Berlin C.M., Schimke T., *Influence of turnover rates on the responses of enzyme to cortisone*, «Mol. Pharmacol», *1*, 1965, 149-156.