

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1969
tom 15
nr 1

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postęпах Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach. Artykuły są honorowane wg ustalonych stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek pracy; żądanie dalszych odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie nadsyłając pracę. Autora obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich ponosi autor.

Redakcja zastrzega sobie możliwość wprowadzenia skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy.

Forma maszynopisu. Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich stopnie i tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

Rozdziały w tekście należy oznaczyć numeracją rzymską a podrozdziały — arabską. Tytuły nie wydzielone z tekstu nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków, schematów i wzorów. W żądanym miejscu należy pozostawić wolny wiersz i oznaczyć: Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1 lub liczbą rzymską w nawiasie — numer odpowiedniego wzoru. W tekście należy odwołać się do numeracji wzoru po słownym wymienieniu związku, np.: kwas glutaminowy (I).

Powołując się na literaturę należy podać w tekście, w nawiasie, kolejny numer pozycji w spisie literatury.

Załączniki do tekstu. Każdy załącznik należy dołączyć na oddzielnej kartce, opatrzony kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście, np. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablica powinna zawierać nagłówek opisujący jej treść, jej rubryki powinny być zaopatrzone w odpowiedni tytuł.

Podpisy i objaśnienia pod rysunkami i schematami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem. W fotografiach i wykresach należy oznaczyć „górze” i „dół”.

Literatura. Wykaz literatury należy wypisać oddzielnie, na ostatnich stronach maszynopisu, w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Polen

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1969
tom XV
zeszyt 1

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)
Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), J. Trojanowski (Lublin)

Komitet Redakcyjny
Redaktor — Zofia Lassota
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

Instytut Biochemii i Biofizyki
Warszawa 12 ul Rakowiecka 36
tel. 44-52-01, wewn. 506

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1968

Nakład 2050 (1915+135)	Oddano do składania 29.X.1968
Ark. wyd. 11,5; ark. druk. 9.75 + 2 kol.	Podpisano do druku w styczniu 1969
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono w lutym 1969
Cena zł 20.—	Zam. nr 1887/68. N-25.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

MARIA SARNECKA-KELLER*, JADWIGA NOWORYTKO**

Biosynteza zwierzęcych glikoproteidów

Biosynthesis of Animal Glycoproteins

The subcellular localisation of glycoproteins biosynthesis and some enzymes involved in this process are described.

Badania lat ostatnich ujawniły szerokie rozpowszechnienie glikoproteidów w tkankach zwierzęcych oraz nagromadziły szereg nowych danych o strukturze tej grupy białek złożonych (46). Wykazano również udział glikoproteidów w strukturach pewnych błon komórkowych i śródkomórkowych oraz ich znaczenie jako połączeń spełniających określone funkcje biologiczne. Fakty te łącznie z obserwowanymi przez wielu autorów zaburzeniami w poziomie glikoproteidów w płynach fizjologicznych, związanymi z określonymi stanami patologicznymi (73, 74), dały podstawę do podjęcia prac nad biosyntezą tych związków. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie procesami anabolicznymi, prowadzącymi do dobudowywania określonych jednostek oligosacharydowych do łańcucha polipeptydowego, a każdy miesiąc przynosi w tym zakresie nowe dane, w związku z czym nawet najnowsze opracowania biosyntezy glikoproteidów są niekompletne i nieaktualne.

I. Udział transferaz glikozylowych w biosyntezie glikoproteidów

Fakt, że nukleotydydowe pochodne monosacharydów są bezpośrednimi prekursorami w syntezie różnych polisacharydów (10) nasunął przypuszczenie o podobnym mechanizmie biosyntezy składników cukrowych glikoproteidów. Nukleotydydowe pochodne monosacharydów wchodzących w skład części cukrowej glikoproteidów są szeroko rozpowszechnione (10), a podobne pochodne oligosacharydowe znajdują się w tkankach bogatych w glikoproteidy zawierające w grupie prostetycznej te właśnie fragmenty

* Doc. dr, Katedra Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

** Dr, Katedra Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wykaz stosowanych skrótów: OSM — glikoproteid z gruczołów podszczękowych owcy, NANA — kwas N-acetylowuraminowy, Glk — glukoza, Gal — galaktoza, Man — mannoza, AcNHGlk — acetyloglukozoamina.

cukrowe. Yourdian i wsp. (24, 25) wyodrębnili cztery izomeryczne formy kwasu UDP-N-acetyloglukozoaminylo-galaktozylo-sialowego z kolostrum krowy i kozy, a Kobata (26, 27) uzyskał z mleka ludzkiego urydyno-5'-/2 lub 4-O-L-fukopiranozylo-4-O-D-galaktopiranozylo-N-acetyloglukozoaminylo-1 pirofosforan oraz odpowiedni nukleotyd dwusacharydowy bez fukozy. Czy te aktywne formy oligosacharydów mogą być rozpatrywane jako pośredniki w syntezie glikoproteidów, czy też są katabolicznymi produktami tych połączeń, pozostaje do dzisiaj sprawą dyskusyjną. Jednak już w 1962 roku Kohn i wsp. (28) zwrócili uwagę na reakcję transglikozylacji jako na proces syntezy łańcuchów heterosacharydowych glikoproteidów. Inni autorzy nawet scharakteryzowali częściowo pewne transferazy, biorące przypuszczalnie udział w syntezie glikoproteidów (23, 71), ale roli tych enzymów nie można było określić, dopóki nie znano odpowiedniego dla nich akceptora białkowego.

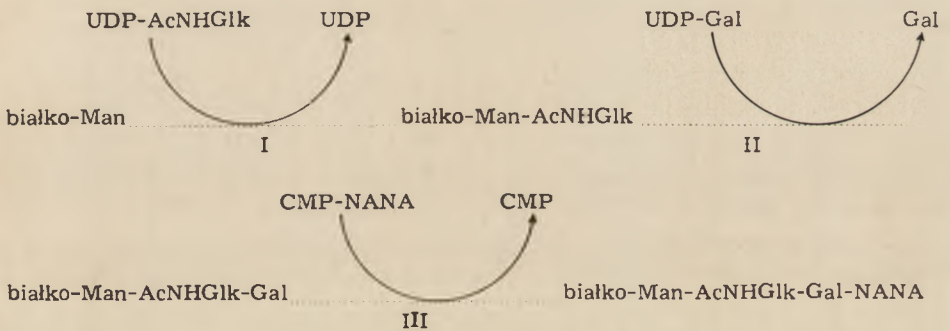
Badania etapów biosyntezy łańcucha cukrowego glikoproteidów rozpoczęli w 1964 roku Carlson i wsp. (7) wyodrębniając transferazę sialylową z gruczołu mlecznego szczura i gruczołu podszczękowego owcy. Enzym ten katalizuje przeniesienie reszty kwasu N-acetyloneuraminowego (NANA) z CMP-NANA na laktozę z utworzeniem sialylo/2→3/laktozy. Prócz tego transferaza z gruczołów podszczękowych przenosi NANA na wyodrębniony z nich glikoproteid, w którym po potraktowaniu neuraminidazą ulegają odsłonięciu reszty N-acetylogalaktozoaminowe. Podobnego typu enzym uzyskano (3) z kolostrum kozy. Bierze on udział w przenoszeniu kwasu sialowego z jego pochodnej cytydynomonofosforanowej na glikoproteidy zawierające galaktozę jako końcową resztę. W tym samym roku Roseman (52) stwierdził, że sialylotransferazy traktować należy jako grupę enzymów, różniących się swoistością działania wobec atomu węgla akceptora. W każdym razie według tego autora muszą istnieć conajmniej dwa tego typu enzymy syntetyzujące odmienne izomery jednostki sialylogalaktozylowej występujące w kwaśnym α_1 -glikoproteidzie (21). Rolę transferazy sialylowej potwierdzili O'Brien i wsp. (47), którzy w 1966 roku opisali pojawianie się enzymów zdolnych do przeniesienia reszty NANA z CMP-NANA na endogenne białkowe akceptory we frakcji mikrosomów wątroby szczura.

W 1965 roku McGuire i wsp. (36) wykazali wbudowywanie galaktozy do łańcucha oligosacharydowego glikoproteidów potraktowanych uprzednio neuraminidazą i galaktozydazą. Okazało się, że transferaza galaktozy występuje w wielu tkankach szczura i przenosi galaktozę zarówno na glikoproteidy jak i na N-acetyloglukozoaminę. Preparat tego enzymu otrzymano również z kolostrum kozy. Zawierał on dwie galaktozylotransferazy i przenosił także N-acetylogalaktozoaminę na różne endogenne akceptory, których obecność wykazano w wielu tkankach.

W tej samej pracowni wyodrębniono z kolostrum kozy (22) 100—200-krotnie oczyszczony enzym katalizujący przeniesienie N-ace-

tyloglukozoaminy z UDP-N-acetyloglukozoaminy na pewne związki o charakterze glikoproteidów. Dobrymi akceptorami okazały się produkty otrzymane z kwaśnego α_1 -glikoproteidu oraz fetuiny po potraktowaniu ich neuraminidazą, β -galaktozydazą i heksozoaminidazą. Również rybonukleaza B oraz ovoalbumina przyłączają N-acetyloglukozoaminę w obecności tej transferazy. Biorąc pod uwagę strukturę glikoproteidowych akceptorów autorzy przypuszczają, że reszty N-acetyloglukozoaminowe są przenoszone na końcowe jednostki mannozy w glikoproteidach i że reakcja ta stanowi bardzo ważny etap w biosyntezie glikoproteidów. Zdaniem autorów transferazy galaktozylowe i N-acetyloglukozoaminowe stanowią również rodziny enzymów, tak jak transferazy sialylowe. Każdy z tych enzymów wymaga odpowiedniego nukleotydu cukrowego oraz akceptora glikoproteidowego z charakterystyczną końcową resztą monosacharydową.

Współdziałanie (53) transferaz glikozylowych prowadzi do stopniowego dobudowywania łańcuchów oligosacharydowych. Tworzenie sekwencji tetrasacharydowej występującej w kwaśnym α -glikoproteidzie (75) zachodzi według schematu 1.



Schemat 1. Biosynteza tetrasacharydowego fragmentu kwaśnego α_1 -glikoproteidu
I — transferaza N-acetyloglukozoaminy, II — transferaza galaktozylowa, III — transferaza sialylowa

Podobnego typu transferazy opisali również inni autorzy. W 1966 roku Sarcione i Carmady (59) wykazali w rozpuszczalnej w dezoksycholanie frakcji mikrosomów wątroby szczura obecność układu enzymatycznego, katalizującego wbudowywanie galaktozy z UDP-galaktozy w białka mikrosomów wątroby. W 1967 roku Spiro i Spiro (69) uzyskali z gruczołu tarczycowego częściowo oczyszczone preparaty transferazy sialylowej i galaktozylowej i oznaczyli ich aktywności względem różnych substratów. Najlepszym akceptorem dla reszty NANA, przenoszonej przez sialylotransferazę z CMP-NANA, są uzyskane z tyreoglobuliny i fetuiny glikopeptydy i glikoproteidy z galaktozą w pozycji terminalnej. Glikoproteidy i glikopeptydy nie zawierające galaktozy nie wiążą reszty sialylowej, enzym jest również nieaktywny w stosunku do wolnej galaktozy. Dla transferazy galaktozylowej najlepszymi akceptorami oka-

zały się glikopeptydy zawierające na końcu łańcucha N-acetyloglukozaminę. Po odszczepieniu tej reszty z glikopeptydu enzym wykazywał niską aktywność. Był mało aktywny również względem glikopeptydów zawierających N-acetyloglukozaminę w środkowej pozycji w łańcuchu sacharydowym. Dobrym akceptorem jest również wolna AcNHGlc, która w obecności UDP-Gal i transferazy galaktozylowej przekształca się w N-acetylolaktozoaminę. Aktywatorem tego enzymu są jony Mn^{2+} , a przez pCMB jest on całkowicie hamowany.

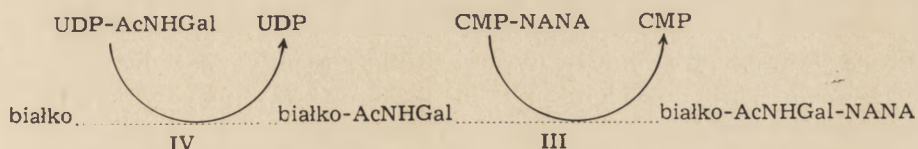
Badając szybkość syntezy łańcucha oligosacharydowego tyreoglobuliny przy współdziałaniu obydwu transferaz Spiro i Spiro (69) stwierdzili, że synteza zachodzi szybciej w obecności nukleotydu pochodnej monosacharydu zajmującego bliższą nieredukującego końca pozycję w łańcuchu, natomiast nie ulega przyspieszeniu w obecności aktywnej formy cukrowca zajmującego pozycję dalszą od tego końca. Zjawisko to potwierdza przypuszczenie (22), że synteza jednostek sacharydowych glikoproteidów odbywa się stopniowo przez dołączanie kolejnych monosacharydów począwszy od redukującego końca łańcucha względnie od miejsc jego rozgałęzień.

Każdy etap przyłączania monosacharydu wymaga odpowiedniej transferazy glikozylowej, a każdy enzym — indukującego akceptora. Akceptorową cząsteczką w każdym etapie jest produkt utworzony przez enzym w reakcji poprzedzającej. Enzymy niezbędne do syntezy pojedynczego typu jednostki heterosacharydowej tworzą więc zdaniem Rosemana (53) układy wielotransferazowe wykazujące kolejno współdziałającą specyficzność.

Ważny moment w badaniach biosyntezy glikoproteidów stanowi wyodrębnienie przez McGuire i Rosemana (37) z ziarnistości gruczołów podszczękowych preparatu przenoszącego N-acetylogalaktozoaminę z jej urydynowej pochodnej na akceptor białkowy uzyskany z glikoproteidu gruczołów podszczękowych owcy (OSM) przez enzymatyczne lub chemiczne usunięcie z niego reszt dwusacharydowych. Zawarta w preparacie transferaza N-acetylogalaktozoaminy charakteryzuje się wysoką specyficznością względem białkowego biorcy. Wykazuje ona aktywność jedynie wobec białkowego rdzenia OSM. Nawet mieszanina peptydów uzyskanych z OSM działaniem pronazy jest nieaktywna jako akceptor N-acetylogalaktozoaminy. Niemożliwość zastąpienia akceptora białkowego w pierwszym etapie procesu transglikozylacji mieszaniną powstałych z niego peptydów względnie aminokwasów podkreślali już Harboni i wsp. (18), którzy badali biosyntezę OSM w przeżywających skrawkach gruczołów podszczękowych w obecności rozmaitych znakowanych substratów i inhibitorów.

Ta wysoka specyficzność transferazy N-acetylogalaktozoaminy sugeruje, że jest ona rzeczywiście enzymem katalizującym pierwszy etap — utworzenie wiązania cukier-białko — w syntezie OSM. Synteza

dwusacharydowej jednostki typowej dla OSM przebiega więc według schematu 2.



Schemat 2. Biosynteza dwusacharydowej jednostki cukrowej OSM

III — transferaza sialylowa, IV — transferaza N-acetylogalaktozoaminyłowa

Wiązania w produkcie utworzonym pod działaniem transferazy N-acetylogalaktozoaminowej są labilne w środowisku alkalicznym (37), podobnie jak wiązania łączące grupy hydroksylowe aminokwasów części białkowej ze składnikiem cukrowym w OSM (19).

Transferaza gruczołów podszczękowych owcy, syntetyzująca wiązanie cukier-białko, jest podobna do transferazy ksylozyłowej (11, 12), wyizolowanej z jajowodów kurzych, która ma zdolność wbudowywania ksylozy do bliżej niescharakteryzowanych, endogennych białek zawierających serynę. Przypuszcza się, że transferaza ksylozyłowa może mieć istotne znaczenie dla inicjowania syntezy łańcuchów heterosacharydowych takich kompleksów białkowo-cukrowych jak siarczan chondroityny-białko i heparyna, w których stwierdzono wiązanie składnika cukrowego przy udziale ksylozy (31, 32). Być może, transferaza N-acetylogalaktozoaminyłowa spełnia podobną funkcję w syntezie glikoproteidów, w których występuje wiązanie O-seryloglikozydowe jak na przykład w OSM (46).

II. Tkankowa i subkomórkowa lokalizacja biosyntezy glikoproteidów

Najwięcej uwagi poświęcono dotychczas badaniom nad lokalizacją biosyntezy glikoproteidów osocza krwi. Nie ulega obecnie żadnej wątpliwości, że głównym miejscem syntezy tych związków jest wątroba. Już w 1949 roku Werner (72) uznał wątrobę za miejsce powstawania białek zawierających heksozoaminę, stwierdziwszy, że obserwowany po wykrwawieniu zwierząt wzrost związanych heksozoamin w surowicy, nie zachodzi u królików, u których uprzednio uszkodzono wątrobę fosforem czy benzenem. Ten ścisły związek pomiędzy usunięciem wątroby lub jej eksperymentalnym uszkodzeniem a obniżeniem poziomu glikoproteidów surowicy krwi potwierdzono wielokrotnie (2, 29, 44, 45, 54). Najbardziej miarodajne są wyniki Athineosa i Winzlera (2), którzy podawali dożylnie ^{14}C -glukozaaminę psom normalnym i po usunięciu wątroby. Pomiar radioaktywności niedializującej frakcji osocza, oraz białkowego odpowiednika kwaśnego α_1 -glikoproteidu ludzkiego wykazały, że glikoproteidy osocza są syntetyzowane głównie, a kwaśny α_1 -glikoproteid wyłącznie — w wątrobie.

Obserwowana w wielu schorzeniach zależność poziomu frakcji seromukoidowej od stanu czynnościowego wątroby (5, 13, 14, 15, 16, 17, 73) sugerowała również rolę tego organu w biosyntezie glikoproteidów. Jednak interpretacja tej zależności mogła często budzić wątpliwości ze względu na nieuwzględnianie całego szeregu ubocznych czynników.

Bezspornymi dowodami na lokalizację biosyntezy glikoproteidów osocza w wątrobie są wyniki badań z zastosowaniem znakowanych prekursorów. Miller i wsp. (38, 39, 40) wykazali w wątrobie szczura wbudowywanie ^{14}C -lizyny do wszystkich frakcji białkowych osocza krwi z wyjątkiem γ -globulin, których synteza zachodziła poza wątrobą. Spiro (66) podając szczurom ^{14}C -glukozę i mierząc radioaktywność glikoproteidów surowicy, wątroby i innych tkanek stwierdził, że najwcześniej maksimum specyficznej aktywności heksozoaminy pojawia się w wątrobie, co wskazuje na ten narząd jako na pierwsze miejsce syntezy cukrowego składnika glikoproteidów osocza. Wyniki te w pełni potwierdził Sarcione (55), który badał u szczura wbudowywanie znakowanych prekursorów zarówno do frakcji seromukoidowej jak i do pozostałych białek osocza wytrącających się kwasem trójchlorooctowym. Co więcej autor ten (56) wykazał, że leucyna i glukozę znakowane ^{14}C szybciej wbudowują się do kwaśnego α_1 -glikoproteidu niż do innych białek osocza. A zatem wątroba jest miejscem syntezy zarówno cukrowej jak i białkowej części kwaśnego α_1 -glikoproteidu.

Wbudowywanie ^{14}C -glukozyaminy w pochodne aminocukrowe oraz kwasy sialowe glikoproteidów surowicy krwi wykazali też Winzler i wsp. (1, 28) stwierdzając przy tym, że wątroba jest wyłącznym miejscem syntezy kwaśnego α_1 -glikoproteidu. Lokalizację syntezy glikoproteidów osocza krwi w wątrobie potwierdziło wielu autorów (34, 35, 49, 61, 62).

Badania nad syntezą glikoproteidów w innych tkankach nie są w takim stopniu zaawansowane. Spiro i Spiro (67) inkubując skrawki oraz frakcję ziarnistości tarczycy z glukozą i leucyną znakowanymi ^{14}C stwierdzili, że zarówno synteza części białkowej jak i cukrowej tyreoglobuliny zachodzi w gruczole tarczycowym. Louisot i wsp. (33) wykazali wbudowywanie ^{14}C -glukozyaminy przez śluzówkę jelita cienkiego. Rozmieszczenie specyficznych transferaz glikozylowych (7, 37) oraz dane o biosyntezie OSM (18) wskazują na gruczoły podszczękowe ssaków jako na miejsce syntezy OSM.

Bekesi i Winzler (4) wykazali wbudowywanie ^{14}C -fukozy nie tylko w białka wątroby i osocza, lecz również w glikoproteidy ściany jelita cienkiego oraz — w mniejszym stopniu — w glikoproteidy innych tkanek. Po hepatektomii stwierdzili znaczne obniżenie syntezy glikoproteidów osocza i niezmienną biosyntezę glikoproteidów w tkankach pozawątrobowych. Można z tego wnosić, że inne tkanki mogą także syntetyzować swe własne glikoproteidy, dla których połączenia białkowo-

-cukrowe zawarte w osoczu krwi nie stanowią materiału prekursorowego. Nie można jednak wykluczyć, że w nieobecności egzogennej fukozy, glikoproteidy osocza produkowane w wątrobie mogą być źródłem fukozy użytkowanej przez inne tkanki. Z badań Bekesi i Winzlera wynika również, że glikoproteidy tkankowe mogą, w pewnym stopniu, uczestniczyć w syntezie glikoproteidów surowicy krwi.

Pierwsze badania nad subkomórkowym zlokalizowaniem syntezy cukrowego składnika glikoproteidów przeprowadzili w 1964 roku Winzler i wsp. (50, 51, 76). Badali oni wbudowywanie ^{14}C -glukozoaminy w glikoproteidy osocza krwi szczurów i wpływ puromycyny na ten proces *in vivo*. Okazało się, że najszybciej wbudowuje się glukozoamina do frakcji mikrosomów wątroby przekształcając się w UDP-AcNHGlc, a następnie w UDP-AcNHGal i urydynową pochodną kwasu sialowego. Autorzy wysunęli przypuszczenie, że frakcja mikrosomów jest miejscem, w którym cukrowy składnik wbudowuje się do glikoproteidów dołączając się wówczas, gdy łańcuch peptydowy jest już gotowy, ale jeszcze związany z ziarnistościami. Równocześnie Spiro i Spiro (67) badając mechanizm biosyntezy tereoglobuliny wywnioskowali, że zarówno synteza cukrowej jak i peptydowej części białka jest związana z ziarnistościami komórek.

Gani i wsp. (9) stwierdzili, że ^{14}C -glukozoamina w skrawkach i izolowanych komórkach tarczycy przekształca się w takie same związki jak w skrawkach wątroby (51, 76). Niektórzy autorzy sugerowali, że aparat Golgi'ego jest miejscem, w którym następuje wbudowywanie cukru w makrocząsteczki (48).

Sarcione i wsp. (57, 58, 60) badając wbudowywanie galaktozy i glukozoaminy znakowanych ^{14}C w subkomórkowe frakcje wątroby szczura potwierdzili, że synteza składnika cukrowego glikoproteidów związana jest z frakcją mikrosomów. Ponieważ nie mogli oni wykazać wbudowywania znakowanych prekursorów monosacharydowych do rybosomów, doszli do wniosku, że miejscem wbudowywania cukru jest rozpuszczalna w dezoksyholanie frakcja mikrosomów, a więc membrany. Zatem ich zdaniem łańcuch polisacharydowy syntetyzuje się na gotowym polipeptydzie, gdy znajduje się on wewnątrz *reticulum* endoplazmatycznego po odłączeniu od rybosomów. Również Sinahora i Skyp-Peck (63) nie mogli wykazać wbudowywania ^{14}C -glukozoaminy do rybosomów wątroby myszy, ani wyodrębnić znakowanego tRNA po wstrzyknięciu ^{14}C -glukozoaminy. Doszli oni do wniosku, że heksozoamina nie przyłącza się do kompleksu RNA-aminokwas, a w mRNA nie istnieje specyficzny kodon dla kompleksu RNA-aminokwas-heksozoamina. Wbudowywanie heksozoaminy w polipeptyd byłoby uwarunkowane specyficznością enzymów zdolnych do tworzenia wiązania cukier-białko tylko w określonym miejscu nowo utworzonego łańcucha polipeptydowego.

Potwierdzeniem przypuszczenia, że łańcuchy oligosacharydowe syn-

tetyzują się na odłączonych od rybosomów łańcuchach polipeptydowych, znajdujących się wewnątrz szorstkiej części *reticulum* endoplazmatycznego są wyniki badań C o o k a i wsp. (8) oraz M o l n a r a (41) nad biosyntezą glikoproteidów w membranach komórek raka Ehrlicha. B o u c h i l l o u x i C h e f t e l (6) inkubując skrawki tarczycy owcy z ^3H -leucyną i ^{14}C -glukozoaminą stwierdzili, że tylko aminokwas wbudowuje się do polisomów. S p i r o i S p i r o (68) też uważają, że synteza części peptydowej i cukrowej glikoproteidów zachodzi oddzielnie. Puromycyna bowiem hamuje wbudowywanie aminokwasów, natomiast nie wpływa w widoczny sposób na syntezę części cukrowej. Pierwsza, zdaniem autorów, syntetyzuje się część białkowa, do której następnie stopniowo dołączają się monosacharydy w kolejności charakterystycznej dla danego glikoproteidu. Do takich samych wniosków doszli S u - C h e n L i i wsp. (70), którzy badali kinetykę włączania ^{14}C -glukozoaminy i ^{14}C -leucyny w mikrosomalne frakcje wątroby i tkanki nowotworu *Walker 256* szczura. Znakowany aminokwas był wbudowywany szybko w nierozpuszczalną w dezoksycholanie frakcję mikrosomów, natomiast piętno znakowanego aminocukru pojawiało się z dużym opóźnieniem w rozpuszczalnych w dezoksycholanie membranach.

Natomiast M o l n a r i wsp. (42) oraz H e l g e l a n d (20) wykazali pojawienie się piętna w białkach związanych z rybosomami w wątrobie szczura po podaniu ^{14}C -glukozoaminy. Kinetyka tego procesu wskazywała, że miejscem dołączenia glukozoaminy do białek są rybosomy. Autorzy wysunęli hipotezę, że na rybosomach tworzy się wiązanie asparaginylo-glukozoaminowe czyli to, które inicjuje proces syntezy łańcucha oligosacharydowego. Potwierdzili to L a w f o r d i S c h a c h t e r (30), którzy zaobserwowali, że w homogenatach wątrób traktowanych ^{14}C -glukozoaminą w obecności puromycyny rybosomy wykazywały mniejszą radioaktywność w porównaniu z kontrolnymi homogenatami bez inhibitora. Pewna część glukozoaminy wbudowuje się zatem w powstający polipeptyd związany jeszcze z rybosomami, natomiast następne cząsteczki heksozoaminy wiązane są już po jego odłączeniu od rybosomów. Kwas sialowy przyłączany jest w końcowym etapie biosyntezy, wówczas gdy glikoproteid znajduje się wewnątrz gładkiego *reticulum* endoplazmatycznego. Także M o l n a r i S y (43) twierdzą, że dołączanie glukozoaminy do glikoproteidów zaczyna się wtedy, gdy polipeptyd jest jeszcze połączony z tRNA na rybosomach. S i m k i n i J a m i e s o n (64, 65) stosując metodę immunologiczną do badania mechanizmu biosyntezy glikoproteidów osocza w subkomórkowych strukturach wątroby świnek morskich, potwierdzili wbudowywanie ^{14}C -glukozoaminy do nierozpuszczalnej w dezoksycholanie frakcji mikrosomów. Sądzą oni, że glikoproteidy pozostające jeszcze w połączeniu z rybosomami są raczej prekursorami, a nie gotowymi glikoproteidami osocza. W każdym razie, według tych autorów, w rybosomach nie zachodzi wbudowywanie kwasu sialowego.

Sprzeczności w poglądach na subkomórkową lokalizację procesu syntezy składnika cukrowego glikoproteidów wyjaśniły badania *Louisota* i wsp. (33), którzy wykazali, że w śluzówce jelita cienkiego wbudowywanie ^{14}C -glukozoaminy zachodzi w różnych subkomórkowych frakcjach. Ponieważ najczęściej część cukrowa jest związana ze składnikiem białkowym poprzez glukozoaminę, autorzy stwierdzają, zgodnie z sugestiami poprzednich badaczy (20, 42), że te „wiązące” cząsteczki glukozoaminy są wbudowywane do polipeptydu jeszcze przyłączonego do rybosomów. Reszta natomiast cząsteczek glukozoaminy, zajmujących dalsze miejsca w łańcuchach heterosacharydowych, dobudowuje się w dalszych etapach syntezy, gdy polipeptyd wędruje poprzez przestrzenie *reticulum* endoplazmatycznego.

III. Uwagi końcowe

Kluczowym zagadnieniem w biosyntezie glikoproteidów jest powstawanie łańcuchów oligosacharydowych i tworzenie wiązań pomiędzy składnikiem białkowym i cukrowym. Nie ulega już wątpliwości, że transglikozylacja odgrywa w tym procesie zasadniczą rolę. W ciągu trzyletniego okresu, jaki upłynął od wykrycia pierwszej transglikozylazy zdolnej do przenoszenia reszty monosacharydu na akceptor białkowy, w wielu tkankach stwierdzono obecność podobnego typu enzymów charakteryzujących się wysoką specyficznością zarówno względem przenoszonej reszty cukrowej jak i akceptora białkowego. Z enzymów tych transferaza N-acetyloglukozoaminy posiada największe znaczenie, gdyż warunkuje tworzenie wiązania cukier-białko. Dotychczasowe dane nasuwają przypuszczenie, że specyficzność tego enzymu, oraz innych, podobnych do niego transferaz, dotychczas niewykrytych, determinuje ułożenie jednostek heterosacharydowych wzdłuż gotowego już, ale pozostającego jeszcze w połączeniu z rybosomami łańcucha polipeptydowego. Specyficzność natomiast innych transferaz decyduje o sekwencji monosacharydów w stopniowo wydłużających się łańcuchach heterosacharydowych. Synteza każdej jednostki oligosacharydowej wymagałaby więc współdziałania zespołu transferaz, których specyficzność warunkowałaby określoną strukturę glikoproteidu, wraz z zakodowaną w mRNA informacją o syntezie łańcucha polipeptydowego. Nie można jeszcze z całą pewnością odrzucać możliwości istnienia w mRNA takiego kodu, który umożliwiłby równoczesne wbudowywanie aminokwasu i heksozoaminy. Negatywne wyniki badań zmierzających do wykrycia połączenia tRNA-aminokwas-cukier nie przesadzają jeszcze sprawy. Nie jest jasną również rola nukleotydocy pochodnych oligosacharydów, chociaż dotychczasowe wyniki badań raczej zaprzeczają możliwości rozpatrywania tych związków jako materiału prekursorowego dla syntezy glikoproteidów.

LITERATURA

1. Athineos E., Kukral J. C., Winzler R. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 338 (1964).
2. Athineos E., Winzler R. J., *Federation Proc.* **21**, 403 (1962).
3. Bartholomew B. A., Jourdian G. W., Roseman S., *Abstr. VI, 6-th Intern. Congress of Biochemistry 1964*, str. 503.
4. Bekesi J. G., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 3873 (1967).
5. Bollet A. I., Rozhin J., Simpson W., *J. Clin. Invest.* **36**, 51 (1957).
6. Bouchilloux S., Cheftel C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 305 (1966).
7. Carlson D. M., McGuire E. J., Jourdian G. W., Roseman S., *Federation Proc.* **23**, 380 (1964).
8. Cook G. M. W., Laico M. T., Eylar E. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **54**, 247 (1965).
9. Gan J. C., Trujillo J. L., Chaikoff I. L., *Biochim. Biophys. Acta* **136**, 351 (1967).
10. Ginsburg V., *Advan. Enzymol.* **26**, 35 (1964).
11. Grebner E. E., Hall C. W., Neufeld E. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 672 (1966).
12. Grebner E. E., Hall C. W., Neufeld E. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 391 (1966).
13. Greenspan E. M., *Arch. Internal. Med.* **93**, 863 (1954).
14. Greenspan E. M., *Advan. Internal. Med.* **7**, 101 (1955).
15. Greenspan E. M., Dreiling D. A., *Arch. Internal. Med.* **91**, 474 (1953).
16. Greenspan E. M., Lehman I., Graff M. M., Schoenbach E. B., *Cancer* **4**, 972 (1951).
17. Greenspan E. M., Tepper B., Terry L. L., Schoenbach E. B., *J. Lab. Clin. Med.* **39**, 44 (1952).
18. Harbon S., Herman G., Clauser H., *Biochemistry* **5**, 3309 (1966).
19. Harbon S., Herman G., Rossignol B., Jollès P., Clauser H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 57 (1964).
20. Helgeland L., *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 106 (1965).
21. Jeanloz R. W., Closse A., *Federation Proc.* **22**, 538 (1963).
22. Johnston I. R., McGuire E. J., Jourdian G. W., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **241**, 5735 (1966).
23. Jourdian G. W., Carlson D. M., Roseman S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 352 (1963).
24. Jourdian G. W., Roseman S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **106**, 202 (1963).
25. Jourdian G. W., Shimizu F., Roseman S., *Federation Proc.* **20**, 161 (1961).
26. Kobata A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 346 (1962).
27. Kobata A., *J. Biochem. Tokyo* **53**, 167 (1963).
28. Kohn P., Winzler R. J., Hoffman R. C., *J. Biol. Chem.* **237**, 304 (1962).
29. Larmo A. L., Teir H., Rytomaa T., *Exptl. Cell Res.* **27**, 95 (1962).
30. Lawford G. R., Schachter H., *J. Biol. Chem.* **241**, 5408 (1966).
31. Lindahl U., Roden L., *J. Biol. Chem.* **240**, 2821 (1965).
32. Lindahl U., Roden L., *J. Biol. Chem.* **241**, 2113 (1966).
33. Louisot P., Frot-Coutaz J., Bertagnolie G., Got R., Colobest I., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 385 (1967).
34. Macbeth R. A. L., Bekesi J. G., Sugden E., Bice S., *J. Biol. Chem.* **240**, 3707 (1965).

35. McGarrahan I. F., Maley F., *J. Biol. Chem.* **237**, 2458 (1962).
36. McGuire E., Jourdian G. W., Carlson M., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **240**, PC4112 (1965).
37. McGuire E. J., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **242**, 3745 (1967).
38. Miller L. L., Bale W. F., *J. Exptl. Med.* **99**, 125 (1954).
39. Miller L. L., Bly C. G., Bale W. F., *J. Exptl. Med.* **99**, 133 (1954).
40. Miller L. L., Bly C. G., Watson H. L., Bale W. F., *J. Exptl. Med.* **94**, 431 (1951).
41. Molnar J., *Biochemistry* **6**, 3064 (1967).
42. Molnar J., Robinson G. B., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 1882 (1965).
43. Molnar J., Sy D., *Biochemistry* **6**, 1941 (1967).
44. Nettelblatt E., Sundblad L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **102**, 225 (1959).
45. Neuhaus O. W., Belagno H. F., Milanskas A. T., *Federation Proc.* **20**, 164 (1961).
46. Noworytko J., Sarnecka-Keller M., *Post. Biochem.* **15**, 15 (1969).
47. O'Brien D., Canady M. R., Hall C. W., Neufeld E., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 331 (1966).
48. Peterson M., Lebland C. P., *J. Cell Biol.* **21**, 143 (1964).
49. Richmond J. E., *Biochemistry* **2**, 676 (1963).
50. Robinson G. B., Molnar J., Winzler R. J., *Federation Proc.* **23**, 273 (1964).
51. Robinson G. B., Molnar J., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **239**, 1134 (1964).
52. Roseman S., Abstr. VI, 6-th Congress of Biochemistry 1964, str. 467.
53. Roseman S., Abstr. I, 7-th Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo 1967, Symp. II 5, 3.
54. Rosenhund R., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **10**, 216 (1958).
55. Sarcione E. J., *Biochemistry* **1**, 1132 (1962).
56. Sarcione E. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 516 (1963).
57. Sarcione E. J., *J. Biol. Chem.* **239**, 1686 (1964).
58. Sarcione E. J., Bohne M., Leahy M., *Biochemistry* **3**, 1973 (1964).
59. Sarcione E. J., Carmady P. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 689 (1966).
60. Sarcione E. J., Sokal I. E., *Federation Proc.* **23**, 273 (1964).
61. Shetlar M. R., Capps J. C., Hern D. L., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 93 (1964).
62. Shetlar M. R., Hern D., Bradford R. H., Endecott B., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 615 (1961).
63. Sinahora H., Sky-Peck H. H., *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 90 (1965).
64. Simkin J. L., Jamieson J. C., *Biochem. J.* **103**, 38P (1967).
65. Simkin J. L., Jamieson J. C., *Biochem. J.* **103**, 153 (1967).
66. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **234**, 742 (1959).
67. Spiro R. G., Spiro M. J., *Federation Proc.* **23**, 316 (1964).
68. Spiro R. G., Spiro M. J., *J. Biol. Chem.* **241**, 1271 (1966).
69. Spiro M. J., Spiro R. G., Abstr. IV, 7-th Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo 1967, D-37.
70. Su-Chen Li, Yu-Teh, Shetlar M. R., Abstr. IV, 7-th Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo 1967, str. 709.
71. Watkins W. M., Hassid W. Z., *J. Biol. Chem.* **237**, 1432 (1962).

72. Werner I., *Acta Physiol. Scand.* **19**, 27 (1949).
73. Winzler R. J., *Methods Biochem. Anal.* **2**, 279 (1955).
74. Winzler R. J., w *The Plasma Proteins*, tom I, red. Putman F. W., Academic Press, New York 1960.
75. Winzler R. J., *Clin. Chem.* **11**, 339 (1965).
76. Winzler R. J., Molnar J., Robinson G. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 3157 (1964).

JADWIGA NOWORYTKO*, MARIA SARNECKA-KELLER**

Składnik cukrowy zwierzęcych glikoproteidów

Sugar Component of Animal Glycoproteins

Present knowledge of the composition and structure of sugar component enclosed in animal glycoproteins is given. Types of bond between protein and polisaccharide as well as some problems connected with the nomenclature of sugar-containing proteins are discussed.

Rozwój chemii złożonych połączeń wielkocząsteczkowych w ostatnich latach przyczynił się do nagromadzenia materiału dotyczącego struktury glikoproteidów. Budowa żadnego z tych białek nie została jednak całkowicie wyjaśniona, a w piśmiennictwie spotyka się wiele rozbieżności i kontrowersyjnych poglądów, szczególnie o ich grupie prostetycznej. Wyczerpujące dane o składzie i strukturze heterosacharydowych części glikoproteidów znaleźć można w obszernych opracowaniach (30, 43, 44, 47, 137). W artykule przedstawiono jedynie panujące obecnie poglądy na charakter składnika cukrowego glikoproteidów i omówiono tylko te struktury, które można uważać za udowodnione. Jako kryterium przynależności połączenia cukrowo-białkowego do glikoproteidów przyjęto definicję tych związków proponowaną przez Gottschalka (41, 50). Z omawianych szczegółowo składników cukrowych wykluczono grupy prostetyczne tych glikoproteidów, które dotychczas nie zostały dokładnie poznane lub były niedawno przedmiotem odrębnych opracowań (19, 38, 126, 127).

I. Składnik cukrowy a próby klasyfikacji połączeń białkowo-cukrowych

Określenie „glikoproteid” nie jest w nomenklaturze chemicznej ściśle sprecyzowane. Różni autorzy nadają mu odmienne znaczenie, w zależności od przyjętego kryterium podziału połączeń białkowo-cukrowych. Dlatego

* Dr, Katedra Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

** Doc. dr, Katedra Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wykaz stosowanych skrótów: BSM — glikoproteid z gruczołów podszczękowych wołu, OSM — glikoproteid z gruczołów podszczękowych owcy, PSM — glikoproteid z gruczołów podszczękowych świni, NANA — kwas N-acetyloneuraminowy, NGNA — kwas N-glikolyloneuraminowy, Gal — galaktoza, Glk — glukoza, Fuk — fukoza, Man — mannoza, AcNHGlk — acetyloglukozoamina, AcNHGal — acetylogalaktozoamina.

też w piśmiennictwie spotyka się wiele określeń, co utrudnia wzajemne porozumienie. Od dawna zdawano sobie jednak sprawę z tego, że najważniejszą podstawą klasyfikacji w tej grupie związków jest charakter składnika cukrowego oraz jego sposób powiązania z białkiem.

Pierwszą próbę klasyfikacji połączeń białkowo-cukrowych, opartą na składzie chemicznym ich grupy prostetycznej, przeprowadził *Levenne* w 1925 roku (89) wyodrębniając spośród mukoproteidów kwasy mukotynosiarłkowe i chondroitynosiarłkowe, różniące się charakterem zawartej w nich heksozoaminy. Nazwą mukoproteidy *Levenne* określał wszystkie związki białek z cukrami, zaliczając do nich glikoproteidy, mukoidy i mucyny, których składnik cukrowy nie był wówczas określony.

Ścisłej sprecyzowaną i do niedawna najszerzej stosowaną była klasyfikacja *Meyera* z 1938 roku, później dwukrotnie uzupełniana i modyfikowana (108, 109). *Meyer* podzielił związki cukrowo-białkowe na mukoproteidy, mukoidy i glikoproteidy, przyjmując za podstawę podziału ogólną zawartość cukrowców oraz charakter wiązania łańcucha heterosacharydowego z białkiem. Zdaniem *Meyera* mukoproteidy są związkami, w których pomiędzy częścią sacharydową a białkiem występuje słabe wiązanie jonowe, zaś w mukoidach i glikoproteidach obydwa składniki połączone są wiązaniem kowalencyjnym. Jako glikoproteidy określił on połączenia zawierające mniej niż 4% cukru, a jako mukoidy — związki z większą zawartością fragmentu niebiałkowego. Te ostatnie podzielone zostały na mukoidy neutralne, kwaśne i nierozpuszczalne. Nazwą mukopolisacharydy oznaczył *Meyer* śluzowate heteropolisacharydy nie powiązane ze składnikiem białkowym.

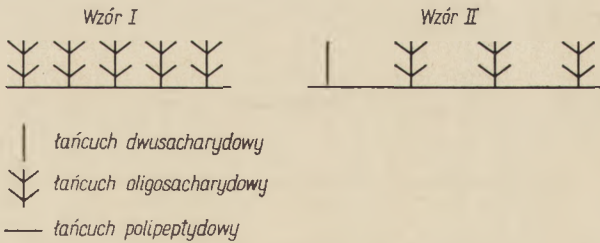
Według propozycji *Stacey*a (151) mukoproteidy reprezentowałyby połączenia białkowo-cukrowe ze stosunkowo dużą zawartością składnika białkowego, których część cukrowa zawiera zawsze heksozoaminę. Mukopolisacharydy natomiast byłyby kompleksami cukrowo-białkowymi, w których część cukrowa dominuje. Inne klasyfikacje połączeń białkowo-cukrowych podali *Blix*, (9), *Masamune* (105), *Kent i Whitehouse* (84) oraz *Bettelheim-Jevons* (5), ale ich propozycje nie zyskały szerszego uznania.

Wyniki badań nad strukturą składnika sacharydowego połączeń białkowo-cukrowych spowodowały rewizję klasyfikacji wprowadzonej przez *Meyera*. W 1960 roku *Jeanloz* (69) zaproponował wycofanie z nazw chemicznych przedrostka „muko” jako terminu przestarzałego, związanego z własnościami fizycznymi, charakterystycznymi nie tylko dla połączeń białek z cukrami. Białka związane z polisacharydami podzielił on na dwie grupy: 1. kompleksy sacharydowo-białkowe, czyli połączenia zawierające słabe wiązanie typu jonowego lub wodorowego między składnikiem białkowym i cukrowym, jak na przykład w kompleksie siarczan chondroityny-białko, oraz 2. połączenia, w których oba składniki związane są wiązaniami kowalencyjnymi. Tylko związki należące do drugiej

grupy powinny jego zdaniem nosić nazwy glikoproteidy, glikopolipeptydy, czy glikopeptydy w zależności od charakteru części niecukrowej.

Typ wiązania polisacharydu z białkiem nie stanowi jednak istotnej różnicy między tymi dwoma grupami połączeń. Lindahl i wsp. (92, 93, 129) oraz Gregory i wsp. (54) wykazali bowiem istnienie wiązań kowalencyjnych między polipeptydem a częścią cukrową w kompleksie siarczan chondroityny-białko, a Lindahl i wsp. (90, 91) — w heparynie. W związku z tym Gottschalk zaproponował w 1962 roku przyjęcie innego kryterium rozróżnienia właściwych glikoproteidów od kompleksów białkowo-cukrowych (41, 50). Jako glikoproteidy określił on białka złożone, których grupę prostetyczną stanowi jeden lub więcej heterosacharydów, związanych z łańcuchem polipeptydowym wiązaniami kowalencyjnymi, przy czym w polisacharydach tych nie ma seryjnego powtarzania się jakiejś określonej jednostki. Natomiast cechą charakterystyczną kompleksów białkowo-cukrowych jest duża cząsteczka związanego heterosacharydu, w którym wielokrotnie powtarzają się określone fragmenty cukrowe. Wiązanie białka z sacharydem może w tej grupie związków mieć charakter zarówno kowalencyjny jak i elektrostatyczny.

Interesująca jest teoria Uhlenbrucka (160), która nawiązuje do klasyfikacji Meyera i stanowi uzupełnienie zróżnicowania między mukoidami i glikoproteidami. Według tego autora zasadniczą cechą odróżniającą te dwie grupy związków jest sposób ułożenia reszt cukrowych wzdłuż łańcucha polipeptydowego. Autor proponuje dla mukoidów i glikoproteidów struktury przedstawione wzorami I i II. Dużą odporność mukoidów na działanie czynników proteolitycznych i denaturujących tłumaczy on małą długością odsłoniętych odcinków łańcucha polipeptydowego znajdujących się pomiędzy poszczególnymi jednostkami heterosacharydowymi.



Przyjmując koncepcję Uhlenbrucka można przypuszczać, że charakter produktów rozpadu proteolitycznego mógłby decydować o zaliczeniu danego związku do grupy mukoidów względnie glikoproteidów. Z mukoidów bowiem pod działaniem enzymów proteolitycznych powstawałyby duże fragmenty peptydowe zawierające więcej niż jeden łańcuch heterosacharydowy, podczas gdy glikoproteidy w tych samych warunkach rozpadałyby się na peptydy zawierające co najwyżej jeden fragment cukrowy.

II. Ogólna charakterystyka składnika cukrowego

Zawartość cukrowców w glikoproteidach waha się od około 3% (118) do około 42% (43, 48, 59), a nawet — jak podają niektórzy autorzy — do około 65% (30). W skład części cukrowej wchodzi głównie heksozoaminy, heksozy, fukoza oraz kwasy sialowe. W kwaśnym α_1 -glikoproteidzie i glikoproteidach tkankowych wykazano również obecność drobnych ilości ksylozy (82, 161, 162). Najbardziej typowymi składnikami są heksozoaminy: glukozoamina i galaktozoamina, które występują we wszystkich dotychczas poznanych glikoproteidach jako pochodne N-acetylowe. Z heksoz wchodzi w skład glikoproteidów galaktoza i mannoza. Dane o obecności glukozy są niejednoznaczne, donoszono o jej występowaniu w haptoglobinie (24) i ceruloplazminie świni (82, 83). Kwasy sialowe: kwas N-acetyloneuraminowy (NANA), kwas N-glikolyloneuraminowy (NGNA) oraz O-acetylowe pochodne NANA występują z reguły we wszystkich glikoproteidach. Duże ich ilości nadają glikoproteidom charakterystyczne własności fizyczne i chemiczne.

Uzyskiwane przez różnych autorów dane o rodzaju oraz wzajemnych stosunkach ilościowych monosacharydów grupy prostetycznej glikoproteidów mieszczą się w szerokich granicach, różniąc się znacznie nawet dla tego samego glikoproteidu (tablica I).

Składnik cukrowy składa się przeważnie z kilku lub kilkunastu jednostek oligosacharydowych, które nie przerywają nigdy ciągłości łańcucha polipeptydowego, lecz są do niego przyłączone w różnych miejscach. W ovoalbuminie (27, 87, 118, 121) i γ -globulinie (50, 128) przyjmuje się obecność tylko jednego łańcucha oligosacharydowego, a w glikoproteidach gruczołów podszczękowych — aż około 800 jednostek cukrowych w jednej cząsteczce (43, 50). Masa cząsteczkowa poszczególnych jednostek oligosacharydowych jest różna dla rozmaitych glikoproteidów: od 512 dla glikoproteidów gruczołów podszczękowych (43, 50) do 3500 dla γ -globuliny (50, 128) oraz fetuiny (141). Poszczególne jednostki oligosacharydowe mogą być zbudowane z dwóch do sześciu rodzajów monosacharydów, z których przynajmniej jeden jest aminoheksozą. Ilość reszt monosacharydowych w scharakteryzowanych dotychczas, poszczególnych łańcuchach cukrowych jest bardzo różna. Wynosi ona dwa monosacharydy w glikoproteidach gruczołów podszczękowych bydła (52), osiem w ovoalbuminie (113), około dziesięciu w kwaśnym α_1 -glikoproteidzie (32) i siedemnaście w fetuinie (145).

Jednostki oligosacharydowe glikoproteidów mogą mieć ten sam skład jakościowy, ilościowy i strukturę, jak na przykład w glikoproteidach gruczołów podszczękowych wołu (BSM) i owcy (OSM) (45) lub mogą być różne jak w tyreoglobulinie (144, 149, 150). Sprawę tę komplikuje jednak stwierdzone niedawno zjawisko polimorfizmu czyli mikroheterogenności glikoproteidów (132).

Tablica 1

Skład komponentu cukrowego niektórych glikoproteidów w g/100 g białka

Rodzaj glikoproteidu	Heksozy całkowite	Mannoza	Galaktoza	Glucozo- amina	Galaktozo- amina	Fukoza	Kwasy sialowe	Pozycja literatury
Albumina jaja	1,7—2,19	1,7—2,19	—	0,8—1,4	—	—	—	27, 35, 61, 74, 86, 88, 94, 118, 138, 139, 168
Kwaśny α_1 -glikoproteid	13,1—16,8	5,5—6,5	6,5—11,2	12,2—15,3 ^b	—	0,7—1,5	10,8—14,7 ^c	6, 32, 59, 64, 135, 136, 166
Fetuina	6,7—8,3	1,9—3,0	4,4—5,5	4,5—6,3	—	—	5,8—8,7	34, 51, 134, 140
Glikoproteid z gruczołów podszczękowych owcy (OSM)	0,45 ^a	0,15	0,30	2,7	13,6—15,0	0,40	25,4—25,5	52, 106
Glikoproteid z gruczołów podszczękowych wołu (BSM)	0,7—2,4	—	0,7—2,4	2,3—3,4	13,9—14,6	0,5—1,6	24,7—28,1	60, 117, 158
Glikoproteid z gruczołów podszczękowych świni (PSM)	12,6	—	12,6	1,3	17,5—24,0	7,0	20,0—24,5	56, 122
Glikoproteid z gruczołów podszczękowych psa (DSM)	15,9	—	15,9	10,0	10,0	12,1	9,2	57

a — obliczono jako sumę galaktozy i mannozy

b — jako pochodna N-acetylowa

c — jako kwas N-acetyloneuraminowy

Prawdopodobnie charakterystyczną cechą łańcuchów cukrowych tworzących grupy prostetyczne glikoproteidów jest ich budowa rozgałęziona, chociaż nie można tego jeszcze uogólnić. Tego rodzaju struktury stwierdzono w części cukrowej kwaśnego α_1 -glikoproteidu (32, 33, 77, 164), ovoalbuminy (27, 28), fetuiny (142) i ovomukoidu (18, 23, 152, 153). Wyjątek stanowią jednostki cukrowe glikoproteidów gruczołów podszczękowych o strukturze dwusacharydu (46, 52).

Reszty cukrowe jednostek oligosacharydowych połączone są wiązaniami glikozydowymi w kolejności charakterystycznej dla danego glikoproteidu. Kwasy sialowe i fukoza występują z reguły na końcu oligosacharydu i dotychczas nie stwierdzono ich wiązania się z łańcuchem polipeptydowym. Reszty kwasu siałowego wiążą się najczęściej z grupami hydroksylowymi przy różnych atomach węgla galaktozy lub z grupą hydroksylową przy C-6 galaktozoaminy. Heksozoaminy mogą występować zarówno na końcu nieredukującym, jak i wewnątrz łańcucha heterosacharydowego, a także na jego końcu redukującym, wiążącym się z łańcuchem polipeptydowym.

W glikoproteidach nie stwierdzono powtarzania się jakiegoś określonego fragmentu łańcucha cukrowego jak na przykład w mukopolisacharydach, jednak można i tutaj wyróżnić pewne uprzywilejowane sekwencje. Na przykład N-acetylolaktozoamina czyli O- β -D-galaktopiranozylo/1 \rightarrow 4/N-acetyloglukozoamina występuje w miejscu rozgałęzień grupy prostetycznej tak w kwaśnym α_1 -glikoproteidzie (2, 32), jak i w grupie cukrowej fetuiny (142) oraz w części sacharydowej ovomukoidu (26, 115). Fukozylo/1 \rightarrow 2/galaktozę znaleziono w trójsacharydzie wyodrębnionym z glikoproteidu gruczołów podszczękowych świni (PSM) (80) i w oligosacharydach z mleka ludzkiego (85).

III. Składnik cukrowy kwaśnego α_1 -glikoproteidu

Monosacharydami części cukrowej kwaśnego α_1 -glikoproteidu są D-mannoza, D-galaktoza, L-fukoza, D-acetyloglukozoamina i kwas sialowy. Jeanloz (71) za pomocą chromatografii gazowej wykazał ponadto galaktozoaminę oraz ksylozę w ilości mniejszej niż 0,1 mola na mol glikoproteidu.

Przyjmuje się, że w cząsteczce kwaśnego α_1 -glikoproteidu występują krótkie łańcuchy oligosacharydowe związane z fragmentem polipeptydowym. Sugestie Izumi i wsp. (66) oraz Gota i wsp. (39), że składnik cukrowy jest pojedynczym łańcuchem heterosacharydowym nie wytrzymują krytyki w świetle wyników utleniania nadjodanem i analizy glikopeptydów. Na podstawie oznaczeń średniej masy cząsteczkowej glikopeptydów uzyskanych przez kolejne trawienie kwaśnego α_1 -glikoproteidu enzymami proteolitycznymi oraz porównania zawartości cukrów w częs-

tecze glikopeptydu ze składem cukrowym natywnego glikoproteidu Kamiyama i Schmid (77) przypuszczają, że w cząsteczce tego glikoproteidu znajduje się 5 do 7 jednostek heterosacharydowych. Wyniki utleniania nadjodanem (33, 64) oraz metylacji (70) wskazują na rozgałęzioną strukturę heterosacharydów — prawdopodobnie występuje 16 rozgałęzień, z których każde kończy się sekwencją: NANA lub Fuk $/2 \rightarrow 4$ D-Gal/ $1 \rightarrow 4$ /AcNHGlc. Yamashina (166) wykazał obok kwasu N-acetyloneuraminowego również kwas O,N-dwuacetyloneuraminowy.

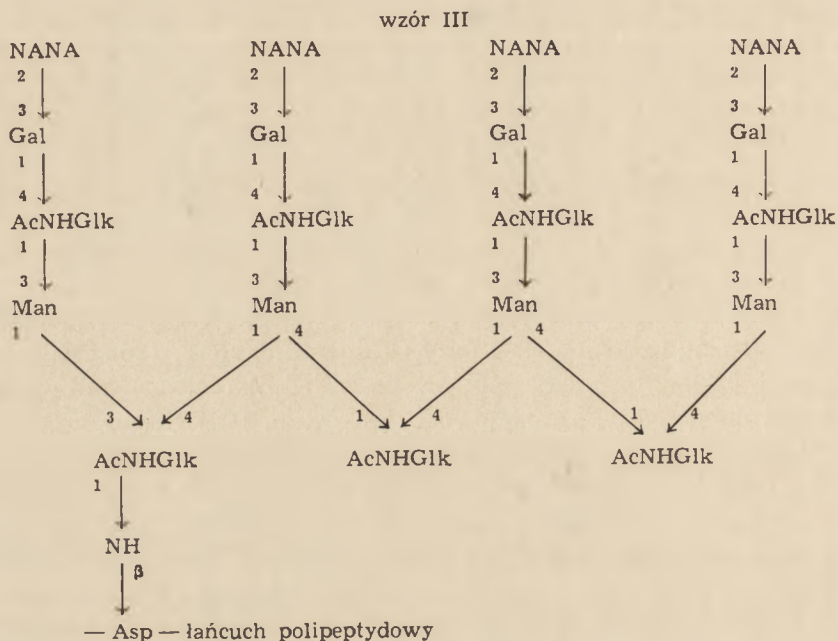
Reszty kwasów sialowych mogą wiązać się z grupą hydroksylową przy C-3, C-4 lub C-6 galaktozy, podczas gdy fukoza jest prawdopodobnie wiązana wyłącznie z grupą -OH przy C-3 galaktozy (72, 125). Degradacja za pomocą β -galaktozydazy cukrowego składnika kwaśnego α_1 -glikoproteidu, wolnego od kwasu sialowego, wskazuje, że większość cząsteczek D-galaktozy ma konfigurację β i znajduje się w pozycji przedostatniej łańcucha heterosacharydowego (62). Pokrywa się to z danymi uzyskanymi w wyniku utleniania nadjodanem. Możliwe jest jednak, że niewielka ilość cząsteczek galaktozy zajmuje dalsze pozycje w łańcuchach cukrowych.

Galaktoza wiąże się z grupą hydroksylową przy C-4 glukozoaminy, czego dowodem jest wyodrębnienie 2-acetamido-2-dezoksy-4-O/ β -D-galaktopiranozylo/-D-glukozy (32) oraz 2-acetamido-2-dezoksy-3,6-dwu-O-metylo- α -D-glukopiranozy (70). Nie jest wykluczone, że pewna ilość cząsteczek galaktozy jest związana z grupą -OH przy C-6 glukozoaminy.

Sposób powiązania mannozy i glukozoaminy w łańcuchu heterosacharydowym nie jest całkowicie wyjaśniony. Wyniki utleniania nadjodanem tetrasacharydu składającego się z drobin galaktozy i mannozy oraz dwóch drobin N-acetylglukoaminy, który powstaje pod działaniem kwasu siarkowego na kwaśny α_1 -glikoproteid, wskazują, że mannoza jest podstawiona przy C-2 lub C-4, a nieredukująca glukozoamina przy C-4. Tetrasacharydowi przypisano zatem strukturę β -D-galaktazylo/ $1 \rightarrow 4$ /-N-acetylglukoaminylo/ $1 \rightarrow 4$ lub 2/mannozylo/ $1 \rightarrow 4$ /N-acetylglukoaminy (32).

Obecność wiązań α -mannozydowych wykazano przy użyciu α -mannozydazy. Przyjmuje się, że pewne reszty mannozy zlokalizowane są wewnątrz łańcucha cukrowego i w sąsiedztwie acetylglukoaminy (95). Zarówno wyniki stopniowej degradacji enzymatycznej za pomocą neuraminidazy, β -galaktozydazy i β -N-acetylglukoaminidazy (63), jak też procesu metylacji wskazują na strukturę rozgałęzioną, przy czym w miejscu rozgałęzienia występuje N-acetylglukoamina.

Każde odgałęzienie zawiera zdaniem Winzlera (164) kolejno mannozę, acetylglukoaminę, galaktozę i NANA lub w niektórych łańcuchach — fukozę. Winzler przyjmuje, że w cząsteczce kwaśnego α_1 -glikoproteidu występują cztery jednostki oligosacharydowe o strukturze przedstawionej wzorem III.



Według Marshalla i Poratha (104) cząsteczka kwaśnego α_1 -glikoproteidu zawiera 11 heterosacharydowych łańcuchów, przy czym jeden typ łańcucha występuje pięciokrotnie, drugi dwukrotnie, a pozostałe tylko jeden raz.

W wyniku stopniowego utleniania nadjodanem wolnego od kwasu sialowego kwaśnego α_1 -glikoproteidu oraz jego pochodnych powstających wskutek równoczesnego działania neuraminidazy i β -galaktozydazy, Hughes i Jeanloz (65) ustalili strukturę pewnych fragmentów jego części cukrowej. W każdej drobinie glikoproteidu znajduje się według nich 8 do 9 łańcuchów heterosacharydowych zawierających reszty cukrowe o sekwencji:

O- β -D-galaktopiranozylo/1 \rightarrow 4/-O-2-acetamido-2-dezoksy- β -D-glukopiranozylo/1 \rightarrow 2 lub 6/-D-mannopiranoza

oraz pięć łańcuchów o sekwencji:

O- β -D-galaktopiranozylo/1 \rightarrow 6/-O-2-acetamido-2-dezoksy- β -D-glukopiranozylo/1 \rightarrow 2 lub 6/-D-manoza.

Budowę fragmentów łańcuchów heterosacharydowych proponowaną przez Hughesa i Jeanloza odnaleźć można w strukturze podanej przez Winzlera. Różnią się one tylko położeniem wiązań między poszczególnymi monosacharydami. Zdaniem autorów 30 do 40% łańcuchów ma strukturę rozgałęzioną przy C-3 lub C-4 reszt mannozy. Przypuszczalnie każda jednostka mannozy wiążąc się z resztą cukrową jest podstawiona przez dwie reszty acetyloglukozoaminy. Dane uzyskane przez tych badaczy zgodne są z wynikami kwasowej degradacji kwaśnego α_1 -glikopro-

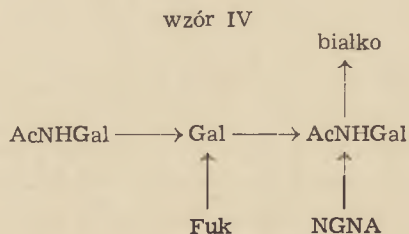
teidu (32), lecz nie zostały dotychczas potwierdzone na drodze metylacji.

Budowa głównego łańcucha polisacharydowego nie jest jeszcze ustalona. Stwierdzono jedynie, że zawiera ona kilka jednostek D-mannozy i acetyloglukozoaminy (33).

IV. Składnik cukrowy glikoproteidów gruczołów podszczękowych

Grupa prostetyczna glikoproteidów gruczołów podszczękowych ssaków okazała się specjalnie dogodnym materiałem do badań, ponieważ wykazuje bardzo prostą strukturę. Składnik cukrowy OSM i BSM zawiera jednakową ilość moli N-acetylogalaktozoaminy i kwasu sialowego. Pojedyncza jednostka sacharydowa w OSM, którą wyizolowano w stanie analitycznie czystym (48, 52), jest dwusacharydem o budowie odpowiadającej D-N-acetylneuraminylo/2→6/N-acetylogalaktozaminie. W BSM występuje podobna struktura (45, 46, 50). Te dwa glikoproteidy różnią się jednak rodzajem kwasu sialowego (13, 46). OSM zawiera praktycznie wyłącznie NANA i niekiedy nieznaczne ilości NGNA (10). W BSM stwierdzono kilka rodzajów kwasów sialowych, przy czym przeważa kwas N,O-dwuacetylneuraminowy (O-acetyl przy C-7) i kwas N-acetylo-O-dwuacetylneuraminowy (O-acetyl przy C-7 i C-8 lub C-9). Obok nich wykazano również NGNA i NANA (12).

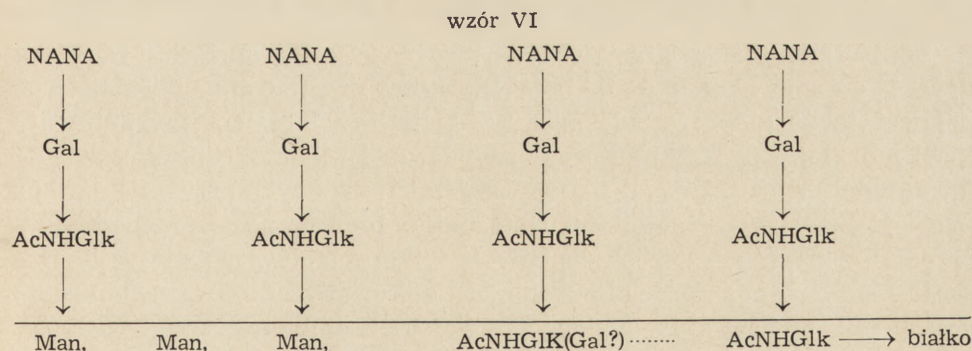
Hashimoto i wsp. (56) stwierdzili, że część cukrowa glikoproteidu z gruczołów podszczękowych świni (PSM) obok kwasów sialowych i galaktozoaminy zawiera również 12% galaktozy i 7% fukozy. Duże ilości tych dwóch monosacharydów w PSM znaleźli również Katzman i Eylar (79). Wydzielili oni (80) z PSM trójsacharyd o składzie α -L-fukopiranozylo/1→2/- β -D-galaktopiranozylo/1→4/-N-acetylo-D-galaktozaminitol. Nie stwierdzili jednak, czy pierwotna, niezredukowana forma tego sacharydu wiąże się bezpośrednio z łańcuchem polipeptydowym czy też jest fragmentem większej jednostki cukrowej. Gdyby ten trójsacharyd stanowił całość jednostki cukrowej, wówczas równoczesne występowanie kwasu sialowego i fukozy w PSM sugerowałoby obecność conajmniej dwóch typów łańcuchów cukrowych. Jednak Carlson (21) stwierdził, że jednostki heterosacharydowe PSM są pentasacharydami o strukturze podanej we wzorze IV. Rozgałęziony charakter tego łańcucha stwarza możliwość przyłączenia zarówno fukozy jak i kwasu sialowego.



VI. Składnik cukrowy fetuiny

Składnik cukrowy fetuiny stanowi 22% cząsteczki i złożony jest z galaktozy, mannozy, N-acetyloglukozoaminy, N-acetylogalaktozoaminy i kwasów sialowych, występujących w stosunku molowym 12,4:8,1:::13,2:1,6:13,6 (140). Kwasy sialowe reprezentowane są w 93% przez NANA i w 7% przez NGNA.

W 1961 roku *Graham* (51) określił końcowy fragment łańcuchów heterosacharydowych fetuiny jako układ monosacharydów: NANA lub NGNA/2→?/galaktozylo/1→3/N-acetyloglukozoamina. W następnym roku *Spiro* (141) wysunął przypuszczenie, że składnik cukrowy fetuiny utworzony jest z trzech jednostek heterosacharydowych o masie cząsteczkowej około 3500. Każda z nich zawiera przypuszczalnie 4 reszty kwasów sialowych, 4 — galaktozy, 6 reszt acetyloheksozoaminy i 3 reszty mannozy. Zdaniem tego autora łańcuchy sacharydowe są rozgałęzione, a wszystkie pozycje końcowe zajęte przez kwasy sialowe. Kwasy te są związane α-ketozydowo z C-3 galaktozy, która połączona jest z C-4 N-acetyloglukozoaminy wiązaniem β-glikozydowym (142, 143). W 1964 roku *Spiro* (147) poddając fetuinę degradacji według Smitha potwierdził ten sposób wiązania trzech reszt monosacharydowych. Wykazał również, że N-acetyloheksozoamina bierze udział w wiązaniu cukrowca ze składnikiem białkowym, a każde odgałęzienie łańcucha stanowi N-acetyloneuraminylo/2→3/β-D-galaktopiranozylo/1→4/N-acetylo-D-glukozoamina. Zdaniem *Spiro* (145) każda jednostka sacharydowa zawiera cztery tego typu boczne łańcuchy trójsacharydowe, które wiążą się z głównym łańcuchem złożonym z trzech reszt mannozy i dwóch reszt N-acetyloheksozoaminy. Proponowaną przez niego strukturę jednostki sacharydowej fetuiny przedstawia wzór (VI).



Struktura rdzenia jednostki sacharydowej fetuiny nie jest jeszcze wyjaśniona. Mannoza, która w natywnej fetuinie nie jest utleniana przez nadjodan, ulega tej reakcji po odszczepieniu heksozoamin, co wskazywałoby na wiązanie bocznych łańcuchów cukrowych z mannozą, która w głównym łańcuchu stanowiłaby wobec tego punkty rozgałęzienia.

Trzy jednostki heterosacharydowe są według Lloyda i Kabata (96) przyłączone w trzech miejscach skądniaka białkowego, który jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym (146).

VII. Polimorfizm glikoproteidów

Wyniki badań za pomocą wolnej elektroforezy, ultrawiorowania, chromatografii na *Amberlicie* IRC-50, metody immunologicznej oraz analizy końcowych aminokwasów wskazywały, że kwaśny α_1 -glikoproteid jest białkiem jednorodnym. W 1962 roku Schmid i wsp. (132) stwierdzili jednak, że rozdziela się on w czasie elektroforezy na żelu skrobiowym przy pH 2,9 na siedem odrębnych smug, które według autorów są polimorficznymi odmianami. Te odmiany kwaśnego α_1 -glikoproteidu nie są artefaktami, gdyż białko to cechuje duża trwałość w zakresie pH 1 do 13, a zmiany konformacyjne jakie zachodzą przy pH 2,7 są odwracalne; ponadto podobne odmiany kwaśnego α_1 -glikoproteidu uzyskuje się za pomocą elektroforezy przy pH 2 do 4 oraz innych metod rozdzielania na przykład chromatografii na *DEAE*-celulozie. Poza tym otrzymane białka wykazują ruchliwość elektroforetyczną przy pH 8,6 i 4,0, współczynnik sedymentacji i ekstynkcji oraz chemiczny skład podobny do natywnego, kwaśnego α_1 -glikoproteidu. Schmid nie wyklucza jednak drobnych różnic chemicznych, niewykrywalnych stosowanymi przez niego metodami i ostatecznie stwierdza, że odmiany polimorficzne, wykazujące przy pH 2,9 różne ładunki mają różny skład chemiczny i strukturę przestrzenną. Ponieważ Kamiyama i Schmid (77) przypuszczają, że pewne łańcuchy oligosacharydowe kwaśnego α_1 -glikoproteidu mają jedno rozgałęzienie, a inne dwa rozgałęzienia, składnik cukrowy odmian polimorficznych mógłby więc zawierać jednostki heterosacharydowe o odmiennej strukturze.

Istnienie odmian polimorficznych kwaśnego α_1 -glikoproteidu potwierdzili Marshall i Porath (104), wykazując podobną mikroheterogenność także dla ceruloplazminy, α_2 -globuliny i β -globuliny surowicy krwi ludzkiej. Co więcej autorzy ci wykazali istnienie grupy sześciu glikopeptydów, powtarzającej się we wszystkich badanych przez nich glikoproteidach, ale w różnej ilości i stosunku. Identyczność glikopeptydów wyodrębnionych z czterech badanych glikoproteidów potwierdzili stosując różne metody rozdzielania. Ponieważ glikopeptydy z kwaśnego α_1 -glikoproteidu wykazywały podobne zawartości aminokwasów i cukrów, wobec tego wykluczyli różnice składu chemicznego jako przyczynę polimorfizmu. Natomiast zdaniem tych autorów mikroheterogenność może być wywołana różnym rodzajem jednostek heterosacharydowych względnie miejscem ich przyłączenia do łańcucha polipeptydowego.

Marshall (101) wyodrębnił z kwaśnego α_1 -glikoproteidu 8 jego odmian i oznaczył ich skład chemiczny i własności. W wyniku tych

badań przyjmuje on, że polimorfizm nie jest następstwem różnic struktury I- i III-cio rzędowej. Przyczyną tego zjawiska może być natomiast przyłączenie jednostek heterosacharydowych w różnych miejscach do łańcucha polipeptydowego. Obecność 11 odrębnych łańcuchów sacharydowych o conajmniej trzech odmiennych strukturach (104) w kwaśnym α_1 -glikoproteidzie warunkuje dużą różnorodność ich rozmieszczenia w cząsteczce białka.

Yamashina i wsp. (170) twierdzą jednak, że polimorfizm wywołany jest raczej różnym charakterem jednostek oligosacharydowych występujących w różnych odmianach glikoproteidu.

Heterogenność grup prostetycznych (110) wielu glikoproteidów a także stwierdzenie, że odmiany glikoproteidów nie są podjednostkami form natywnych, lecz modyfikacjami występującymi w przyrodzie (133), sugeruje, że polimorfizm jest powszechny w tej grupie związków.

VIII. Sposób wiązania składnika cukrowego z białkiem

Według Schultze'go i Heremansa (137) między jednostkami heterosacharydowymi a białkiem mogą występować typy wiązań:

- (I) wiązanie N-acyloglikozyloaminowe, między amidem aminokwasu a C-1 monosacharydu
- (II) wiązanie O-glikozydowe między grupą hydroksylową aminokwasu a C-1 monosacharydu
- (III) wiązanie estrowe między grupą karboksylową aminokwasu a grupą hydroksylową przy C-1 monosacharydu
- (IV) wiązanie N-glikozydowe między grupą aminową aminokwasu a C-1 monosacharydu
- (V) wiązanie imidoestrowe między imidem aminokwasu a C-1 monosacharydu
- (VI) wiązanie peptydowe utworzone między grupą aminową aminokwasu i grupą karboksylową kwasu muraminowego.

Okazało się, że łańcuchy heterosacharydowe są w glikoproteidach zawsze związane kowalencyjnie z grupami funkcjonalnymi aminokwasów. We wszystkich badanych dotychczas glikoproteidach pochodzenia zwierzęcego cukrem biorącym udział w wiązaniu składnika cukrowego z białkiem jest zawsze N-acetylo-D-heksozoamina. Jej udział stwierdzono w ovoalbuminie (15, 98, 168), ovomukoidzie (114, 154), kwaśnym α_1 -glikoproteidzie (31, 32), γ -globulinie (130, 131) oraz w glikoproteidach gruczołów podszczękowych bydła (52). W wiązaniu bierze udział redukująca grupa heksozoaminy, którą może być N-acetyloglukozoamina jak

w glikoproteidach białek jaj i osocza krwi (65, 98, 120, 163) albo N-acetylogalaktozoamina jak w glikoproteidach gruczołów podszczękowych (14, 46, 52). Aminokwasami, których udział w wiązaniu stwierdzono dotychczas, są asparagina, seryna, treonina i hydroksylizyna.

Z wymienionych, możliwych wiązań składnika cukrowego z białkiem w glikoproteidach zwierzęcych wykazano dotychczas z całą pewnością jedynie wiązanie N-acetyloglukozylaminowe (I) oraz O-glikozydowe (II).

Wiązanie typu I wytwarza się między grupą hydroksylową przy C-1 acetylo-D-heksozoaminy i grupą amidową asparaginy. Po raz pierwszy ustalono występowanie tego typu wiązania w albuminie jaja (99). Stwierdzono, że w tym glikoproteidzie kwas asparaginowy związany jest bezpośrednio ze składnikiem cukrowym. Na podstawie ilości amoniaku uwolnianego w czasie hydrolizy glikopeptydów uzyskanych z ovoalbuminy wysunięto przypuszczenie o występowaniu wiązania N- β -aspartyloglukozylaminowego (15, 35, 75, 98, 100, 121). Udział β -karboksylu kwasu asparaginowego w wiązaniu wykazano reakcją z fluorodwunitrobenzenem (76, 121) i fenyloizotiocyanianem (37). Słuszność tej struktury wiązania potwierdzono ostatecznie porównując własności 2-acetamido-1-L- β -aspartyloamido-1,2-dwudezoksy- β -D-glukozy, wyodrębnionej z glikoproteidu jaja z własnościami syntetycznego związku (16, 36, 103, 119, 159, 167). W ten sposób wykluczono równocześnie możliwość wiązania iminoeterowego wysuniętą uprzednio przez Yamashinę i Makino (168).

Wiązanie typu I stwierdzono również w ovomukoidzie (112, 114), γ -globulinie (120, 128, 130, 131) oraz w kwaśnym α_1 -glikoproteidzie (17, 31, 67, 78, 99, 171). Winzler (163) potwierdził na drodze chromatograficznej identyczność fragmentu wyodrębnionego z kwaśnego α_1 -glikoproteidu z syntetyczną 2-acetamido-1-L- β -aspartyloamido-1,2-dwudezoksyglukozą. Pewne dane sugerują występowanie wiązania typu I w fetuinie (145), tyreoglobulinie (150) oraz transferynie (68).

Przypuszczenie Tanaki (154) o udziale kwasu glutaminowego w wiązaniu łańcucha polipeptydowego z acetyloglukozaminą w ovomukoidzie nie zostało dotychczas potwierdzone.

Wiązanie typu II po raz pierwszy stwierdzono w glikoproteidach bakteryjnych (157), wykazując równocześnie, że uczestniczy w nim grupa hydroksylowa seryny.

Blix (11), Graham i wsp. (53) a także Hashimoto i wsp. (58) przedstawili dane sugerujące, że w OSM i BSM conajmniej połowa łańcuchów sacharydowych może być związana z łańcuchem polipeptydowym poprzez serynę i treoninę. Koncepcja ta wydawała się bardzo prawdopodobna z uwagi na niezwykle wysoką zawartość hydroksyaminokwasów w składniku białkowym tych glikoproteidów. Jedynie ilość wolnych grup hydroksylowych seryny i treoniny jest wystarczająca dla związania olbrzymiej ilości łańcuchów dwusacharydowych w OSM i BSM. Przypuszczenie to wkrótce potwierdziło wielu badaczy (1, 8, 22, 55, 155, 156), którzy

równocześnie wykazali, że w wiązaniu tym bierze udział anomeryczny atom węgla N-acetylogalaktozoaminy. Obecność wiązań II w OSM potwierdzono ostatnio na drodze enzymatycznej (7). Glukozydaza O-serylo-N-acetylogalaktozoaminidowa ze śledziony wołu rozszczepia wiązanie między N-acetylogalaktozoaminą a resztami seryny lub treoniny w wolnych od NANA OSM i wielkocząsteczkowych peptydach uzyskanych z tego glikoproteidu.

Obok seryny i treoniny również hydroksylizyna może uczestniczyć w wiązaniu typu II, co stwierdzono dotychczas w tropokolagenie (20) oraz glikoproteidach pewnego typu membran (148).

Na podstawie badań OSM owiec australijskich (40, 42, 49, 53) i BSM (117) Gottschalk i wsp. wysunęli przypuszczenie, że obok wiązania II występują w tych glikoproteidach również wiązania typu III. Zdaniem autorów cukrem biorącym udział w tym wiązaniu jest N-acetylogalaktozoamina, której węgiel anomeryczny łączy się z grupami karboksylowymi kwasu asparaginowego i glutaminowego. Przypuszczenie to oparto na wynikach reakcji glikoproteidów z borowodorkiem litu, pod wpływem którego uwalniały się łańcuchy sialylo-galaktozoaminy jako redukujące dwusacharydy, a równocześnie zachodziła przemiana reszt kwasów dwukarboksylowych w odpowiednie hydroksyaminokwasy. Obecności wiązania typu III w glikoproteidach gruczołów podszczękowych nie potwierdzili jednak Hashimoto i wsp. (57, 58). Uważają oni przy tym, że ilość aminokwasów dwukarboksylowych w białkowym składniku jest zbyt mała do wyłącznego tworzenia wiązań estrowych. Również Best i wsp. (4), a ostatnio Bertolini i Pigman (3, 124) nie uzyskali przekonujących danych o istnieniu wiązań III w tej grupie glikoproteidów.

Yamashina i wsp. (169) podają, że w kwaśnym α_1 -glikoproteidzie obok zasadniczego wiązania typu I występuje równocześnie wiązanie typu II, w którym uczestniczy treonina. Podobnie Chosson (25) przypisuje temu aminokwasowi udział w wiązaniu heterosacharydu z częścią peptydową ovomukoidu. Możliwość występowania obok wiązania typu I dodatkowych typów wiązań sugeruje się również dla tyreoglobuliny (150) i transferyny (68), lecz przypuszczenia te nie zostały dotychczas w pełni uzasadnione. Zdaniem Marshalla (102) wiązania typu I i II nie występują obok siebie w jednym glikoproteidzie, lecz ostatnie doniesienia Dawsona i Clampa (29), którzy badali globulinę typu K w *myeloma* wydają się zaprzeczać tej koncepcji.

Występowania pozostałych typów wiązań nie stwierdzono jak dotąd w glikoproteidach zwierzęcych. Sugestie Winzlera i Inouye (165) o udziale grupy γ -karboksylowej kwasu glutaminowego w wiązaniu grupy aminowej glukozoaminy w kwaśnym α_1 -glikoproteidzie nie znalazły potwierdzenia.

Uwagi końcowe

Spośród składników cukrowych glikoproteidów jedynie strukturę części cukrowej OSM i BSM można uważać za udowodnioną zarówno odnośnie zawartości monosacharydów, sposobu wzajemnego ich połączenia jak też typu wiązania poszczególnych jednostek cukrowych z białkiem. Grupy prostetyczne innych glikoproteidów poznano fragmentarycznie i nawet skupiający największą uwagę badaczy kwaśny α_1 -glikoproteid nasuwa jeszcze ciągle wiele zagadnień. Przyczyna tego tkwi niewątpliwie w trudnościach natury metodycznej.

Stosowane różne metody wyodrębniania glikoproteidów mogą nie zawsze doprowadzać do uzyskiwania związków o tym samym stopniu czystości. Nie wiadomo wobec tego, czy wykrywanie przez niektórych autorów drobnych ilości pewnych monosacharydów jest wynikiem zastosowania bardziej precyzyjnych metod analitycznych, czy też wyodrębniania tych składników łącznie z właściwym materiałem badanym. Złożony charakter glikoproteidów powoduje trudności przy stosowaniu metod normalnie używanych w analizie białek prostych i wolnych polisacharydów. Składnik cukrowy w zależności od swego charakteru w mniejszym lub większym stopniu blokuje pozostałą część drobinę i obniża jej podatność na odczynniki chemiczne i enzymy. Fakt, że w danym glikoproteidzie mogą występować reszty heterosacharydowe o różnej długości łańcucha, odmiennym składzie i strukturze ogranicza interpretację danych uzyskiwanych w wyniku badań nad całą cząsteczką. Natomiast po hydrolitycznym rozszczepieniu łańcucha polipeptydowego większość badań sprowadza się nie do analizy indywidualnych glikopeptydów, lecz ich frakcji, które obejmują związki różniące się bądź to częścią peptydową bądź też charakterem łańcucha cukrowego. Badania strukturalne komplikuje dodatkowo istnienie odmian polimorficznych, których różnice strukturalne nie zostały dotychczas wyjaśnione.

Poważnym ułatwieniem analitycznym byłaby możliwość badania obu składników glikoproteidów oddzielnie. Dlatego też duże nadzieje budzi wydzielenie w ostatnim okresie enzymów zdolnych do rozszczepiania wiązań między obu komponentami (97, 116, 170). Podobnie obiecująco przedstawia się możliwość wykorzystania spektrometrii masowej (107).

Dokładniejsze poznanie większej liczby struktur grup prostetycznych glikoproteidów umożliwi wysunięcie szerszych uogólnień o charakterze składników cukrowych typowych dla tej grupy związków, co doprowadzi bez wątpienia do ściślejszego określenia pojęcia glikoproteidu. Pozwoli to także na bliższe sprecyzowanie różnic między poszczególnymi grupami glikoproteidów. Już samo porównanie grupy prostetycznej OSM, zbudowanej z kilkuset jednostek dwusacharydowych, z oktasacharydowym, pojedynczym łańcuchem owoalbuminy świadczy o tym, że tego rodzaju

zróźnicowanie jest potrzebne. Nie jest wykluczone, że również typ wiązania składnika cukrowego z białkiem będzie stanowił podstawę dalszej klasyfikacji glikoproteidów.

LITERATURA

1. Anderson B., Seno N., Sampson P., Riley G., Hoffman P., Meyer K., *J. Biol. Chem.* **239**, PC 2716 (1964).
2. Barker S. A., Pardoe G. I., Stacey M., Hopton J. W., *Nature* **197**, 231 (1963).
3. Bertolini M., Pigman W., *J. Biol. Chem.* **242**, 3776 (1967).
4. Best J. S., Bhavanandan V. P., Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 141 (1965).
5. Bettelheim-Jevons F. R., *Advan. Protein Chem.* **13**, 35 (1958).
6. Bezkorovainy A., Winzler R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 559 (1961).
7. Bhargava A. S., Buddecke E., Werries E., Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 457 (1966).
8. Bhavanandan V. P., Buddecke E., Carubelli R., Gottschalk A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 352 (1964).
9. Blix G., *Glycoproteide w Physiologische Chemie*, red. Flaschentrager B., Lehnartz E., Springer Berlin 1951, tom I, str. 751.
10. Blix G., Fourth Intern. Congress of Biochemistry, Vienna 1958 cyt. wg Gottschalk A., *The chemistry and biology of sialic acids and related substances*, Cambridge 1960.
11. Blix G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **106**, 164 (1963).
12. Blix G., Lindberg E., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1809 (1960).
13. Blix G., Lindberg E., Odin L., Werner I., *Acta Soc. Med. Upsalien.* **61**, 1 (1956).
14. Blix G., Svennerholm L., Werner I., *Acta Chem. Scand.* **4**, 717 (1950).
15. Bogdanov V. P., Kaverzneva E. D., Andrejeva A., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 168 (1962).
16. Bogdanov V. P., Kaverzneva E. D., Andrejeva A. P., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 69 (1964).
17. Bourrillon R., Got R., Meyer D., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 178 (1964).
18. Bragg P. D., Hough L., *Biochem. J.* **78**, 11 (1961).
19. Buchowicz J., *Post. Biochem.* **12**, 5 (1966).
20. Butler W. T., Cunnigham L. W., *J. Biol. Chem.* **241**, 3882 (1966).
21. Carlson M., *J. Biol. Chem.* **241**, 2984 (1966).
22. Carubelli R., Bhavanandan V. P., Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 67 (1965).
23. Chatterjee A. K., Montgomery R., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 426 (1962).
24. Cheftel R., Cloase L., Mosetti M., Rafelson M., Jayle M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 993 (1960).
25. Chosson A., D. Sc. Thesis, Faculté des Sciences 1964, Université de Lille, France.
26. Chosson A., Montreuil J., Scheppler N., *Compt. Rend.* **255**, 3261 (1962).

27. Clamp J. R., Hough L., *Chem. Ind. (London)* str. 82 (1963).
28. Clamp J. R., Hough L., *Biochem. J.* **94**, 502 (1965).
29. Dawson G., Clamp J. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 349 (1967).
30. Dierewickaja W. A., *Uspiechi Biolog. Chimii* **8**, 168 (1967).
31. Eylar E. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 195 (1962).
32. Eylar E. H., Jeanloz R. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 622 (1962).
33. Eylar E. Jeanloz R. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1021 (1962).
34. Fisher H. W., O'Brien D., Puck T. T., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 241 (1962).
35. Fletcher A. P., Marks G. S., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **87**, 265 (1963).
36. Fletcher A. P., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 505 (1963).
37. Fletcher A. P., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **88**, 37P (1963).
38. Gołaszewski T., *Post. Biochem.* **11**, 509 (1965).
39. Got R., Bourrillon R., Gornillot P., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 126 (1962).
40. Gottschalk A., *Nature* **186**, 949 (1960).
41. Gottschalk A., *Perspectives Biol. Med.* **5**, 327 (1962).
42. Gottschalk A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **106**, 169 (1963).
43. Gottschalk A., Glycoproteins and glycopeptides w *Comprehensive Biochemistry*, red. Florkin M., Stotz E. H. Elsevier, Amsterdam 1963, tom VIII, str. 17.
44. Gottschalk A., Glycoproteins. Their composition, structure and function, Elsevier, Amsterdam 1966.
45. Gottschalk A., Interaction between glycoproteins and viruses, w The amino sugars, red. Balazs E. A., Jeanloz R. W., Academic Press, New York 1966, tom II B, str. 341.
46. Gottschalk A., Graham E. R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 380 (1959).
47. Gottschalk A., Graham E. R. B., The basis structure of glycoproteins w The proteins. Composition, structure and function, red. Neurath H., Academic Press, New York 1966, tom IV, str. 95.
48. Gottschalk A., McKenzie H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 226 (1961).
49. Gottschalk A., Murphy W. H., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 81 (1961).
50. Gottschalk A., Murphy W., Graham E., *Nature* **194**, 1051 (1962).
51. Graham E. R. B., *Australian J. Sci.* **24**, 140 (1961). cyt. wg Graham E. R. B., Fetuin w Gottschalk A., Glycoproteins, Elsevier Amsterdam 1966, str. 353.
52. Graham E. R. B., Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 513 (1960).
53. Graham E. R. B., Murphy W. H., Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **74**, 222 (1963).
54. Gregory I. D., Laurent T. C., Roden L., *J. Biol. Chem.* **239**, 3312 (1964).
55. Harbon S., Herman G., Rossignol B., Jollés P., Clauser H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 57 (1964).
56. Hashimoto Y., Hashimoto S., Pigman W., *Arch. Biochem. Biophys.* **104**, 282 (1964).
57. Hashimoto Y., Pigman W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **93**, 541 (1962).
58. Hashimoto Y., Tsuihi S., Nisizawa K., Pigman W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **106**, 233 (1963).

59. Heimbürger N., Heide K., Haupt H., Schultze H. E., *Clin. Chim. Acta* **10**, 293 (1963).
60. Heimer R., Meyer K., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **42**, 728 (1956).
61. Hewitt L. F., *Biochem. J.* **32**, 1554 (1938).
62. Hughes R. C., Jeanloz R. W., *Biochemistry* **3**, 1535 (1964).
63. Hughes R. C., Jeanloz R. W., *Biochemistry* **3**, 1543 (1964).
64. Hughes R. C., Jeanloz R. W., Abstr. 1-st Meeting Feder. Eur. Biochem. Soc. London A778, 62, 1964.
65. Hughes R. C., Jeanloz R. W., *Biochemistry* **5**, 253 (1966).
66. Izumi K., Makino M., Yamashina I., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 196 (1961).
67. Izumi K., Makino M., Yamashina I., *J. Biochem. (Tokyo)* **51**, 365 (1962).
68. Jamieson G. A., *J. Biol. Chem.* **240**, 2914 (1965).
69. Jeanloz R. W., *Arthritis Rheumat.* **3**, 233 (1960).
70. Jeanloz R. W., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 303 (1960).
71. Jeanloz R. W., Abstr. III, 7-th Inter. Congress of Biochemistry Tokyo 1967, str. 571.
72. Jeanloz R. W., Closse A., *Federation Proc.* **22**, 538 (1963).
73. Johansen P., Marshall R. D., Neuberger A., *Nature* **181**, 1355 (1958).
74. Johansen P. G., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **77**, 239 (1960).
75. Johansen P., Marshall R. D., Neuberger A., *Biochem. J.* **78**, 518 (1961).
76. Jevons F., *Nature* **181**, 1346 (1958).
77. Kamiyama S., Schmid K., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 80 (1962).
78. Kamiyama S., Schmid K., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 266 (1962).
79. Katzman R. L., Eylar E. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 623 (1966).
80. Katzman R. L., Eylar E. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 769 (1966).
81. Kaufman H. H., Marshall R. D., Abstr. 6-th Intern. Congress of Biochemistry — New York 1964, Pergamon Press Oxford, tom II, str. 159.
82. Kawierzniowa E., Gaszko G., *Ukr. Biochim. Z.* **35**, 507 (1963).
83. Kaya T., Osaki S. Sato T., *J. Biochem. (Tokyo)* **50**, 24 (1964).
84. Kent P. W., Whitehouse M., *Biochemistry of the aminosugars*, Butterworths, Londyn 1955.
85. Kuhn R., Baer H. H., Ganko A., *Chem. Ber.* **89**, 2513 (1956).
86. Lee Y. C., Montgomery R., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 263 (1961).
87. Lee Y. C., Montgomery R., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 9 (1962).
88. Lee Y. C., Wu Y. C., Montgomery R., *Biochem. J.* **91**, 96 (1964).
89. Levene P. A., *Hexosamines and mucoproteins*, Longmans, Green and Co., Londyn 1925.
90. Lindahl U., Cifonelli I. A., Lindahl B., Roden L., *J. Biol. Chem.* **240**, 2817 (1965).
91. Lindahl U., Roden L., *J. Biol. Chem.* **240**, 2821 (1965).
92. Lindahl U., Roden L., *J. Biol. Chem.* **241**, 2113 (1966).
93. Lindahl U., Roden L. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 254 (1964).
94. Linderstrøm-Lang K., Ottesen M., *Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **26**, 403 (1949).
95. Li Yu-Teh, *J. Biol. Chem.* **241**, 1010 (1966).
96. Lloyd K., Kabat E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 385 (1964).

97. Makino M., Kojima T., Yamashina I., *Biochem. Biophys., Res. Comm.* **24**, 961 (1966).
98. Marks G., Marshall R., Neuberger A., *Biochem. J.*, **85**, 15P (1962).
99. Marks G., Marshall R., Neuberger A., *Biochem. J.* **87**, 274 (1963).
100. Marks G. S., Marshall R. D., Neuberger A., Papkoff H., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 340 (1962).
101. Marshall W. E., *J. Biol. Chem.* **241**, 4731 (1966).
102. Marshall R. D., Abstr. III 7-th Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo 1967, str. 573.
103. Marshall R. D., Neuberger A., *Biochemistry* **3**, 1596 (1964).
104. Marshall W. E., Porath J., *J. Biol. Chem.* **240**, 209 (1965).
105. Masamune H., Proc. Intern. Congr. Biochem. 3-rd, Brussels, 1955, str. 72.
106. McCrea J. F., *Biochem. J.* **55**, 132 (1953).
107. Mester L., Vass G., Szabados L., Schimpl A., Senn M., Abstr. IV Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo 1967, str. 712.
108. Meyer K., *Advan. Protein Chem.* **2**, 249 (1945).
109. Meyer K., w Some conjugated proteins. Symposium. red. Cole W. H., Rutgers, New Brunswick N. Y., 1953, str. 64, cyt. wg Gottschalk A., *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam 1966.
110. Montgomery R., Abstr. III, 7-th Intern. Congress of Biochemistry Tokyo 1967, str. 577.
111. Montgomery R., Lee Y. C., Wu Y. Ch., *Biochemistry* **4**, 566 (1965).
112. Montgomery R., Wu Y. Ch., *J. Biol. Chem.* **238**, 3547 (1963).
113. Montgomery R., Wu Y. Ch., Lee Y. C., *Biochemistry* **4**, 578 (1965).
114. Montreuil J., Biserta G., Chosson A., *Compt. Rend.* **256**, 3372 (1963).
115. Montreuil J., Chosson A., *Compt. Rend.* **255**, 3071 (1962).
116. Murakami M., Eylar E., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 556 (1965).
117. Murphy W. H., Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 349 (1961).
118. Neuberger A., *Biochem. J.* **32**, 1435 (1938).
119. Neuberger A., Abstr. 6-th Intern. Congress of Biochemistry New York 1964, str. 105.
120. Nolan C., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 453 (1962).
121. Nuenke R. H., Cunningham L. W., *J. Biol. Chem.* **236**, 2452 (1961).
122. Odin L., Ciba Foundation Symposium, Chem. and Biol. of Mucopolysaccharides 1958, str. 234, cyt wg Neurath H., The proteins. Composition, structure and function, Academic Press, New York 1966, str. 128.
123. Peabody R. A., Goldthwait D. A., Greenberg G. R., *J. Biol. Chem.* **221**, 1071 (1956).
124. Pigman W., Bertolini M., Abstr. IV, 7-th Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo 1967, D-66.
125. Popenoe E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 584 (1959).
126. Poznański S., Jakubowski J., Rymaszewski J., Repts A., *Post. Biochem.* **13**, 521 (1967).
127. Prasał Z., *Post. Biochem.* **13**, 43 (1967).
128. Reseveal J. W., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 425 (1961).
129. Roden L., Lindahl U., *Federation Proc.* **24**, 606 (1965).
130. Rothfus J. A., *Federation Proc.* **20**, 383 (1961).
131. Rothfus J. A., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 1402 (1963).
132. Schmid K., Binette J. P., Kamiyama S., Pfister V., Takahashi S., *Biochemistry* **1**, 959 (1962).
133. Schmid K., Polis A., Hunziker K., Fricke R., Yayoshi M., *Biochem. J.* **104**, 361 (1967).

134. Schultze H. E., *Deut. Med. Wochschr.* **83**, 1742 (1958).
135. Schultze H. E., Göllner I., Heide K., Schönenberger M., Schwick G., *Z. Naturforsch.* **106**, 463 (1958).
136. Schultze H. E., Heide K., Haupt H., *Clin. Chim. Acta* **7**, 854 (1962).
137. Schultze H. E., Heremans J., F., Molecular biology of human proteins with special reference to plasma proteins, Elsevier, Amsterdam, 1966, tom I.
138. Sörensen M., *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **20**, 3 (1934).
139. Sörensen M., *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **22**, 487 (1938).
140. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **235**, 2860 (1960).
141. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 382 (1962).
142. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 646 (1962).
143. Spiro R. G., *Federation Proc.* **21**, 409 (1962).
144. Spiro R. G., *New Engl. J. Med.* **269**, 566 i 616 (1963).
145. Spiro R. G., *Diabetes* **12**, 223 (1963).
146. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **238**, 644 (1963).
147. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **239**, 567 (1964).
148. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **242**, 4813 (1967).
149. Spiro R. G., Spiro M. J., *Federation Proc.* **22**, 138 (1963).
150. Spiro R. G., Spiro M. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 1603 (1965).
151. Stacey M., *Advan. Carbohydrate Chem.* **2**, 161 (1946).
152. Stacey M., Woolley M., *J. Chem. Soc. str.* 184 (1940).
153. Stacey M., Woolley J. M., *J. Chem. Soc. str.* 550 (1942).
154. Tanaka M., *J. Pharm. Soc. Japan* **81**, 1460 (1961).
155. Tanaka M., Bertolini M., Pigman W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 404 (1964).
156. Tanaka K., Pigman W., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 1487 (1965).
157. Tsugita A., Akabori S., *J. Biochem. (Tokyo)* **46**, 695 (1959).
158. Tsuihi S., Hashimoto Y., Pigman W., *J. Biol. Chem.* **236**, 2172 (1961).
159. Tsukamoto H., Yamamoto A., Miyashita C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 151 (1964).
160. Uhlenbruck G., Proc. 10-th Intern. Congr. Blood Transfusion, Stockholm 1964, Karger, Basel, cyt. wg Schultze H. E., Heremans J. F., Molecular Biology of human proteins with special reference to plasma proteins, Elsevier, Amsterdam 1966, tom I, str. 15.
161. Weicker H., Graesslin D., *Nature* **212**, 715 (1966).
162. Weicker H., Jeanloz R. W., *Federation Proc.* **26**, 607 (1967).
163. Winzler R. J., 7-th West Central States Biochem. Conf. Iowa City 1964.
164. Winzler R. J., *Clin. Chem.* **11**, 339 (1965).
165. Winzler R. J., Inouye T., *Abstr. Am. Chem. Soc. 139-th Meeting March 1961*, str. 4c, cyt. wg Jeanloz R. W., *Advan. Enzymol.* **25**, 433 (1963).
166. Yamashina I., *Acta Chem. Scand.* **10**, 1666 (1956).
167. Yamashina I., Ban I. K., Makino M., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 382 (1963).
168. Yamashina I., Makino J. *J. Biochem. (Tokyo)* **51**, 359 (1962).
169. Yamashina J., Makino M., Ban I. K., Kajimo T., *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 168 (1965).
170. Yamashina I., Makino M., Yamauchi T., *Abstr. III, 7-th Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo 1967*, str. 575.
171. Yosizawa Z., Sato T., Schmid K., *Biochim. Biophys. Acta* **121**, 417 (1966).

Komunikat

VII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się we Wrocławiu w dniach 18 do 20 września 1969 roku. W programie zjazdu przewidziane jest sympozjum na temat „Peptydazy” oraz obrady w sekcjach.

Informacji szczegółowych udziela Komitet Organizacyjny VII Zjazdu PTBioch.:

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,

Wrocław
ul. Chałubińskiego 4.

TERESA SAWICKA*

Metabolizm nukleozydodwufosfocukrów

Metabolism of Nucleoside Diphosphate Sugars

Some aspects of sugar nucleotide metabolism are reviewed.

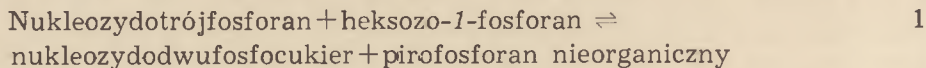
Od czasu odkrycia przez Leloir'a (24) urydynodwufosfoglukozy w ekstraktach z drożdży, ciągle wzrasta ilość i różnorodność nukleotydów cukrowych izolowanych z naturalnych źródeł. Początkowo poznano pochodne cukrowe urydyny, a następnie również adenozyne, cytydyny, guanozyne, inozyne i tymidyny. Okazało się, że komponentem cukrowym mogą być w tych związkach monosacharydy, aminocukry, kwasy uronowe oraz w pewnych wypadkach związki polihydroksylowe zbliżone do węglowodanów, np. rybitol i glicerol. Dla przykładu można przytoczyć glicerolowe pochodne CDP, D-glukozowe pochodne ADP, D-glukozowe, D-galaktozowe, D-rybozowe i N-acetylo-D-glukozaaminowe pochodne dTDP (34), L-galaktozowe pochodne GDP (8) itd. Do chwili obecnej poznano ponad 60 związków tego typu (11).

Zaktywowana reszta cukrowa nukleozydodwufosfocukrów może brać udział w różnych przemianach. Najważniejszą metaboliczną funkcją nukleotydocukrów jest ich rola w reakcjach transglikozylacji. Reakcje te obejmują bardzo różnorodne procesy, jak np. syntezę sacharozy, glikozydów i skrobi u roślin wyższych, chityny u grzybów, wielocukrów ściany komórkowej u bakterii oraz glikogenu i glukuronidów u zwierząt.

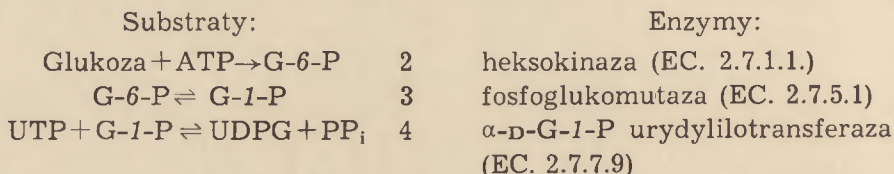
I. Biosynteza nukleozydodwufosfocukrów

Syntezę nukleotydocukrów katalizują enzymy należące do grupy transferaz. Enzymy te przenoszą grupę nukleotydylową z nukleozydotrójfosforanu na fosforan cukru z utworzeniem nieorganicznego pirofosforanu, według ogólnej reakcji opisanej po raz pierwszy przez Munch-Petersena i wsp. (31).

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa
Wykaz stosowanych skrótów: G-1-P — glukoza-1-fosforan, G-6-P — glukoza-6-fosforan, Gal-1-P — galaktoza-1-fosforan, dTDP — dezoksytymidyno-5'-dwufosforan



Ponieważ na drodze odwracalnej reakcji, pod wpływem nieorganicznego pirofosforanu zachodzi pirofosforoliza nukleozydodwufosfocukrów, enzymy katalizujące ten proces nazywa się również pirofosforylazami. Synteza większości nukleozydodwufosfocukrów o różnorodnych komponentach nukleozydowych i cukrowych przebiega według przedstawionego wyżej schematu. Ester fosforowy cukru wchodząc w reakcję z UTP może pochodzić z różnych źródeł. Dla przykładu podano niżej pełny przebieg biosyntezy urydynodwufosfoglukozy:



Okazało się, że ekstrakty z tkanek ssaków mogą katalizować syntezę pochodnych D-glukozowych zarówno UDP jak również pochodnych CDP, ADP, GDP, TDP i IDP oraz pochodnych D-mannozowych ADP, IDP i GDP (49). W reakcjach tych biorą udział odpowiednie nukleozydotrójfosforany i heksozo-1-fosforany. Analogiczne reakcje prowadzące do syntezy D-glukozowych pochodnych są również katalizowane przez preparaty roślinne (1).

Reakcje prowadzące do biosyntezy nukleozydodwufosfocukrów są na ogół specyficzne zarówno w stosunku do komponentu nukleozydowego jak też cukrowego. Zdaniem Koczetkowa (22) w cząsteczkach nukleotydów cukrowych istnieją współzależności strukturalne spowodowane występowaniem wodorowych wiązań między heterocykliczną zasadą a monosacharydem. Rezultatem różnorodności wtórnej struktury nukleozydodwufosfocukrów jest według Koczetkowa wysoka specyficzność reakcji, w której biorą udział te związki. Równocześnie zdaniem tego autora, konsekwencją charakterystycznej konformacji określonej reszty nukleozydowej jest możliwość przyłączenia wyłącznie odpowiedniej reszty cukrowej. Na temat budowy przestrzennej nukleotydów i nukleotydów wysunięto w latach pięćdziesiątych kilka interesujących hipotez. Tak np. Leveda hl i James (27) na podstawie danych doświadczalnych zaproponowali taką strukturę ATP, w której grupy fosforanowe są zawinięte zajmując miejsce w sąsiedztwie pierścienia zasady. Taka struktura umożliwia, zdaniem autorów oddziaływanie między aminową grupą adeniny i dwiema końcowymi grupami fosforanowymi. Tego typu budowa przestrzena warunkuje ich zdaniem biologiczną aktywność wszystkich nukleozydotrójfosforanów. Syntetyczne analogi UDPG ze zmodyfi-

kowanym pierścieniem uracylu odegrały dużą rolę dla wyjaśnienia współzależności strukturalnych między dwoma komponentami: nukleotydo-
wym i cukrowym oraz wpływu tych współzależności na przebieg reakcji
biochemicznych. Ponieważ w cząsteczce uracylu wiązania wodorowe
występują przy grupach karbonylowych C-2 i C-4 oraz przy atomie
wodoru związanym z N-3 (schemat 1), wobec tego modyfikacje w tych
pozycjach powinny zmieniać powinowactwo grup w wiązaniach wodo-
rowych, a co za tym idzie aktywność biologiczną tych związków. I tak
stwierdzono (20), że 6-azaurydynodwufosfoglukoza może brać udział
w biosyntezie sacharozy i kwasu glukuronowego, a 3-N-metylourydy-
nodwufosfoglukoza i cytydynodwufosfoglukoza nie mogą brać udziału
w powyższych reakcjach. Reszta rybozowa nukleotydów cukrowych od-
grywa równie duży wpływ na biochemiczną aktywność tych związków.
W wypadku podstawienia glukozy w miejscu rybozy syntetycznie otrzy-
many uracylo-6'-fosforan glukozy okazał brak aktywności biologicznej
w enzymatycznej interkonwersji heksoz (50).

Doświadczenia przeprowadzone w naszej pracowni przyczyniają się
do potwierdzenia hipotez o bezpośrednim udziale pierścienia zasady
w biosyntezie koenzymów. Stwierdzono (41), że ekstrakty z wątroby
szczura oraz z tkanek ślimaka *Helix pomatia* nie katalizowały biosyntezy
UDPG w obecności 5,6-dwuhydro-UTP otrzymanego w wyniku wodorowa-
nia. Gdy natomiast zastosowano niezmodyfikowany UTP i glukozo-1-
fosforan — synteza przebiegała intensywnie. W tym wypadku pierścień
uracylu w UTP pod wpływem wodorowania traci swój aromatyczny
charakter i to jest prawdopodobnie przyczyną utraty aktywności biolo-
gicznej tego związku.

Badania nad substancjami, które wpływają na wewnątrzkomórkowe
stężenie nukleotydocukrów są raczej fragmentaryczne. Według Melo
i Gläsera (30) jednym z czynników zapobiegających nagromadzeniu
nukleozydodwufosfocukrów w komórce są pirofosfatazy. Enzymy te roz-
kładają nukleotydy cukrowe na odpowiednie monosacharydy i nukleo-
zydy. Pirofosfatazy nie wymagają do swego działania nieorganicznego
pirofosforanu i występują całkowicie niezależnie od pirofosforylaz.

W niektórych przypadkach metabolity pośrednie ciągu glikolitycz-
nego mogą być aktywatorami syntezy nukleotydocukrów. Tak np. S a n -
w a l i P r e i s s (43) stwierdzili, że synteza ADP-glukozy w ekstraktach
z glonu *Chlorella pyrenoidosa* jest aktywowana przez glicero-3-fosforan,
który jest równocześnie jednym z pierwszych produktów fotosyntezy,
fruktozo-6-fosforan, fruktozo-1,6-dwufosforan i α -glicerofosforan; po-
dobnie glicero-3-fosforan aktywuje przebieg syntezy ADP-glukozy
w chloroplastach liści szpinaku. Stężenie niektórych nukleotydocukrów
w komórce może być regulowane przez ujemne sprzężenie zwrotne,
w którym końcowy produkt hamuje reakcję syntezy. U wielu gatunków
bakterii nagromadzające się dTDP-L-ramnoza, CDP-paratoza, GDP-man-

noza i GDP-L-fukoza hamują aktywność pierwszego enzymu niezbędnego do ich syntezy. W wątrobie szczura kwas CMP-N-acetyleneuraminowy jest inhibitorem syntezy swojego prekursora: N-acetylo-D-mannoaminy (23).

II. Przemiany wewnątrzcząsteczkowe nukleozydodwufosfocukrów

Reszta sacharydowa nukleozydodwufosfocukrów może ulegać wielu przekształceniom. Pierwszą zbadaną reakcją tego typu była 4-epimeryzacja UDP-D-galaktozy do UDP-D-glukozy (24). Reakcja ta oraz towarzyszące jej inne reakcje enzymatyczne odgrywają decydującą rolę w utrzymaniu równowagi metabolicznej między glukozą a galaktozą w organizmach żywych. Wykazano zarówno w drożdżach jak i w tkankach ssaków, że nieodzownym warunkiem przemiany galaktozy w glukozę jest uprzednia jej fosforylacja.

Enzymatyczne ufosforylowanie galaktozy katalizuje galaktokinaza w obecności ATP (46). Przemiana α -galaktozo-1-fosforanu w α -glukozy-1-fosforan przebiega w następujących reakcjach:

1. Gal-1-P + UDNG \rightleftharpoons UDPGal + G-1-P 5
2. UDPGal \rightleftharpoons UDPG 6
3. UDPG + PP_i \rightleftharpoons UTP + G-1-P 7

Enzymy katalizujące powyższe reakcje noszą następujące nazwy:

1. urydyliłotransferaza galaktozo-1-fosforanu (EC. 2.7.1.2)
2. 4-epimeraza UDP-glukozy (EC. 5.1.3.2),
3. urydyliłotransferaza glukozy-1-fosforanu (EC. 2.7.7.9).

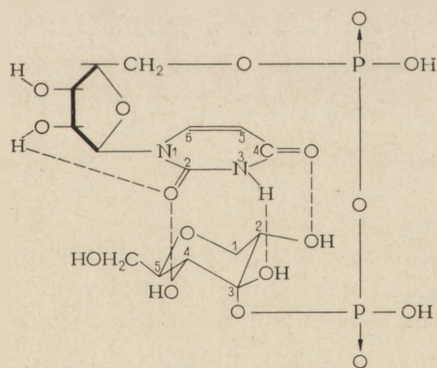
Ażeby podkreślić biologiczne znaczenie tego układu enzymatycznego wystarczy wspomnieć, że wrodzony brak aktywnej urydyliłotransferazy galaktozo-1-fosforanu powoduje u dzieci chorych na galaktozemię nagromadzenie galaktozy w tkankach, a w dalszych konsekwencjach objawy chorobowe (18).

Ostatnio (42) udało się rozdzielić za pomocą chromatografii na żelu *Sephadex* G-200 urydyliłotransferazę glukozy-1-fosforanu od urydyliłotransferazy galaktozo-1-fosforanu w hemolizatach krwi ludzkiej normalnej. Brak tego drugiego enzymu we krwi galaktozemików może być wykorzystany w diagnostyce galaktozemii.

Mechanizm, według którego przebiegają reakcje epimeryzacji nie jest, jak dotychczas, wystarczająco jasny. Wyizolowano wiele enzymów (lub układów enzymatycznych), które katalizują epimeryzację jednej lub więcej hydroksylowych grup cukrowych, wymagając do swego działania obecności NAD. Do takich enzymów należą: epimeraza UDP-glukuronianowa (EC. 5.1.3.6) wyizolowana ze skóry królików (17), 4-epimeraza UDP-glukozy (EC. 5.1.3.2) z wątroby cielęcej (28) (EC. 5.1.3.7), epimeraza UDP-acetyloglukozoaminowa z wątroby szczura (12). Podobnie NAD jest aktywatorem przemiany dTDP-glukozy od dTDP-ramnozy katalizowanej

przez układ enzymatyczny z *Pseudomonas aeruginosa* (13). Stwierdzono (29), że NAD może również występować w postaci kompleksu z enzymem jak w wypadku epimerazy UDP-glukozy drożdżowej. Zdaniem Hassida (14), reakcja epimeryzacji wymagająca katalitycznych ilości NAD powinna przebiegać poprzez pośredni związek ketonowy pozbawiony asymetrii przy C-4. Jednak dotychczas nie udało się wyizolować takiego związku i przypuszcza się, że występuje on w postaci kompleksu z enzymem. Za występowaniem reakcji oksydoredukcyjnej, prowadzącej do powstania takiego ketozwiązku przemawia fakt, że w homogenatach z komórek fibroblastów linii L, aktywność 4-epimerazy UDP-D-glukozy jest nieoznaczalna, natomiast w obecności NAD i w podwyższonym pH — enzym ten jest całkowicie aktywny (33). Czynnikiem hamującym epimerazę w komórkach nowotworowych są więc prawdopodobnie wysoki stosunek zredu. NAD do NAD i niskie pH .

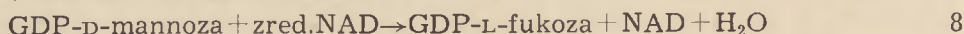
Wielu autorów uznaje możliwość występowania drugiego obok NAD akceptora wodoru, którym mogłyby być według teorii De Robichona-Sulmajs tra (5) pierścień uracylu w cząsteczce UDP-cukru. Jeżeli przedstawi się przestrzenny model struktury UDPG (schemat 1) według typu zaproponowanego dla ATP, to okazuje się że N z $-NH$ uracylu znajduje się nad C-3, a węgle grup karbonylowych nad C-2 i C-4 cząsteczki heksozy. Przyjmując taką konfigurację można wysunąć hipotezę o bezpośrednim udziale reszty uracylu w reakcji utleniania zachodzącej przy enzymatycznej epimeryzacji UDPG do UDPgalaktozy.



Schemat 1. Budowa przestrzenna urydynodwufosfoglukozy

Obok najczęściej spotykanej epimeryzacji przy węglu czwartym, znane są obecnie i inne typy epimeryzacji. Stwierdzono, że redukcja heksoz do dezoksycukrów pociąga za sobą we wszystkich badanych przypadkach powstawanie 4-keto-6-dezoksyheksoz jako związków pośrednich. Jako przykład mogą służyć badania Ginsburga (10), który stwierdził, że enzymy izolowane z *Acetobacter aerogenes* katalizują kilkustopniową przemianę GDP-D-mannozy (wzór I) do GDP-L-fukozy

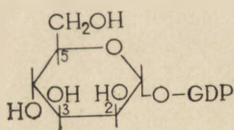
(wzór II) według równania:



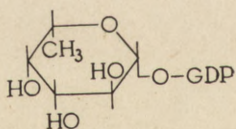
Pierwszym etapem tej przemiany jest wewnątrzcząsteczkowa oksydo-redukcja wymagająca NAD, w której grupa hydroksylowa przy C-4 przechodzi w grupę ketonową, a grupa $-\text{CH}_2\text{OH}$ przy C-5 w grupę CH_3 . Następnie zachodzi inwersja przy C-3 i C-5 i powstaje guanozyno-5-dwufosfo-4-keto-6-dezoksy-D-mannoza jako związek pośredni. Redukcja z zred. NAD przy C-4 daje w rezultacie L-fukozę.

Obecnie wiadomo, że synteza GDP-L-fukozy niekoniecznie musi przebiegać drogą epimeryzacji z GDP-D-mannozy. Ishihara i wsp. (16) oraz Ishihara i Heath (15) stwierdzili, że w wątrobie świni występują enzymy katalizujące bezpośrednią fosforylację L-fukozy przez ATP do L-fukozy-1-fosforanu a następnie syntezę GDP-L-fukozy przy współdziałaniu GTP. Zgadza się to z obserwacjami Kaufmana i Ginsburga (19), że komórki HeLa wbudowują ^{14}C -L-fukozę bezpośrednio do glikoproteidów. Włączenie to odbywa się prawdopodobnie poprzez GDP-L-fukozę, której stężenie wzrasta znacznie w komórkach hodowanych na pożywce zawierającej L-fukozę.

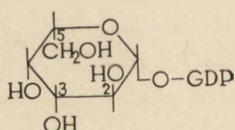
Goudsmit i Neufeld (9) stwierdziły, że ekstrakty z gruczołu białkowego ślimaka *Helix pomatia* katalizują przemianę GDP-D-mannozy do GDP-L-galaktozy (wzór III). D-Mannoza i L-galaktoza różnią się konfiguracją przy C-3 i C-5. Konwersja tych heksoz jest pierwszym przypadkiem podwójnej epimeryzacji, która nie prowadzi do syntezy dezoksy-cukru.



I



II



III

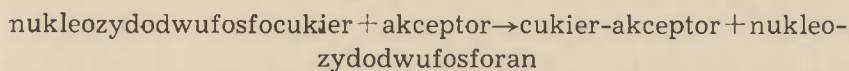
Znane są obecnie przykłady przemian u roślin, w których epimeryzacja UDP-pentoz jest poprzedzona enzymatyczną dekarboksylacją. Tak np. Neufeld i wsp. (32) wyizolowali enzymatyczny preparat z kielków pszenicy katalizujący dekarboksylację kwasu UDP-D-glukuronowego do UDP-pentoz, stanowiących mieszaninę UDP-D-ksylozy i UDP-L-arabinozy. Tak więc, enzymatyczny preparat obok dekarboksylazy zawierał również UDP-ksylozo-4-epimerazę, która katalizowała przekształcenia dwóch nukleotydów pentozowych.

III. Rola nukleozydwufosfocukrów w syntezie polimerów cukrowych

W latach trzydziestych Parnas i Baranowski (36) oraz Cori i Cori (2) stwierdzili, że α -D-glukozy-1-P jest pierwszym produktem degradacji glikogenu i że glikogen może być syntetyzowany

in vitro na drodze odwracalnej reakcji z glukozo-1-P. Wkrótce potem okazało się, że fosforylaza z kartofla katalizuje syntezę skrobi z α -D-glukozo-1-P, a fosforylaza z *Pseudomonas saccharophila* może syntetyzować sacharozę z glukozo-1-P i D-fruktozy. Przyjął się wtedy powszechnie pogląd, że główna droga syntezy kompleksów cukrowych prowadzi poprzez sacharydo-1-fosforan. Dopiero w 1957 roku gdy Leloir i Cadedini (26) odkryli reakcję enzymatycznego przeniesienia glukozy z UDPG na glikogen okazało się, że fosforylasy odgrywają głównie rolę w procesie degradacji wielocukrów a nie ich syntezy. Jak dotychczas poznano jedynie 6 enzymów tego typu: 1. fosforylaza glikogenowa (EC. 2.4.1.1), 2. fosforylaza skrobi (EC. 2.4.1.1), 3. fosforylaza sacharozowa (EC. 2.4.1.7), 4. fosforylaza celobiozowa (EC. 2.4.1.20), 5. fosforylaza maltozowa (EC. 2.4.1.8), 6. fosforylaza laminarobiozy.

Dzięki odkryciom Leloir a wiadomo, że synteza prawie wszystkich wielocukrów przebiega poprzez enzymatyczny proces dający się wyrazić równaniem:



9

Ponieważ w procesie biosyntezy nukleozyddwufosfocukrów komponent cukrowy zostaje podniesiony na wyższy poziom energetyczny, zatem przeniesienie go na akceptor nie wymaga już dostarczenia energii.

Synteza polisacharydów wymaga „primera” oligosacharydowego, który wydłuża się przez stopniowe dodawanie jednostek cukru, w większości wypadków do jego nieredukującego końca. Na ogół transferazy cukrowe są specyficzne w stosunku do akceptora. Np. w doświadczeniach *in vitro* syntetaza glikogenu jest dwukrotnie bardziej aktywna gdy akceptorem jest glikogen niż gdy jest nim skrobia. Jeżeli „primer” glikogenowy jest uprzednio trawiony enzymami skracającymi jego łańcuch — jego efektywność akceptorowa jest mniejsza w stosunku do glikogenu natywnego (25).

Transglukozyłazy odpowiedzialne za syntezę polisacharydów zawierających wiązanie α -1,4 nie zawsze są specyficzne w stosunku do nośnika nukleozydowego. Goldemberg (6) wykazał, że syntetaza glikogenu może katalizować przeniesienie reszty glukozowej na glikogen nie tylko z UDP-D-glukozy, ale również, chociaż znacznie wolniej, z ADP-D-glukozy. Z drugiej strony, UDP-D-glukoza może być substratem w syntezie skrobi pomimo, że synteza ta przebiega dziesięciokrotnie szybciej, jeżeli donatorem glukozy jest ADP-glukoza (4). Obecnie przyjął się powszechnie pogląd, że ADP-glukoza jest fizjologicznym donatorem glukozy podczas syntezy α -1,4-glukanów u bakterii i roślin, podczas gdy UDP-glukoza spełnia tę funkcję podczas syntezy glikogenu u zwierząt. Zdaniem Hassida (14) jednym z przykładów wysokiej specyficzności

transglukozyłazy w stosunku do reszty nukleozydowej jest syntetaza celulozy, dla której substratem jest wyłącznie GDP-D-glukoza.

Synteza większości dwu- i trójcukrowców roślinnych i zwierzęcych takich jak np. trehaloza, sacharoza, laktoza i rafinoza przebiega przy udziale koenzymów urydynowych, których nie udało się jak dotychczas w doświadczeniach *in vitro* zastąpić innymi koenzymami nukleozydowymi.

W niektórych wypadkach w syntezie homopolisacharydów mogą uczestniczyć równocześnie dwa rodzaje nukleotydów. W 1962 roku Su i Hassid (44, 45) wysunęli hipotezę o możliwości równoczesnego udziału nukleotydów guaniny i urydyny w syntezie polisacharydów roślinnych zawierających obie enantiomorficzne formy galaktozy. Badania prowadzone przez nich nad D,L-galaktanem występującym w niektórych morskich glonach sugerowały, że prekursorem reszt L-galaktozowych tego polimeru może być GDP-L-galaktoza, natomiast UDP-D-galaktoza może dostarczać reszt D-galaktozowych.

Podobnie Goudsmit i Ashwell (7) stwierdzili, że prekursorem reszty D-galaktozowej podczas syntezy galaktogenu występującego w gruczole białkowym ślimaka *Helix pomatia* może być UDP-D-galaktoza. Sawicka (39) oraz Sawicka i Chojnacki (41) stwierdzili ponadto, że w gruczole białkowym syntetyzującym galaktogen występują wszystkie niezbędne enzymy katalizujące następujące etapy reakcji: glukoza-6-fosforan → glukoza-1-fosforan → UDP-glukoza → UDP-galaktoza → galaktogen. Goudsmit i Neufeld (8) wyizolowały z gruczolu białkowego ślimaka GDP-L-galaktozę oraz wykazały, że w ekstraktach z tej tkanki przebiega enzymatyczne przekształcenie GDP-mannozy w GDP-L-galaktozę (9). Tak więc wydaje się, że GDP-L-galaktoza jest prekursorem reszty L-galaktozowej w syntezie galaktogenu oraz, że biosynteza tego polimeru u ślimaków przebiega zgodnie ze schematem zaproponowanym przez Su i Hassida dla galaktanów roślinnych.

Mechanizm biosyntezy heteropolisacharydów, występujących głównie u bakterii różni się od sposobu biosyntezy polimerów zbudowanych wyłącznie z reszt cukrowych. Jako przykład może służyć przebieg syntezy komponentu polisacharydowego antygeny O u *Salmonella newington* (37). Większość komórek bakteryjnych otacza nie tylko błona cytoplazmatyczna, lecz również sztywna ściana, w której skład wchodzi peptydoglikany, kwas teichoiczny i lipopolisacharydy. Funkcje lipopolisacharydów ściany komórkowej bakterii nie są jak dotychczas znane, wiadomo jednak, że u bakterii gramujemnych związki te są endotoksynami wywołującymi w ustroju zakażonym mechanizmy obronne takie jak gorączkę, fagocytozę, zaburzenia w gospodarce hormonalnej i czynnościach układów enzymatycznych.

Bakteryjny kompleks lipopolisacharydowy składa się z trzech komponentów: lipidu A, antygeny O (somaticznego) oraz trzonu, który jest

kompleksem zawierającym glukozę, galaktozę, N-acetyloglukozoaminę, heptozę, kwas ketodezoksyoktonowy, fosforan oraz etanoloaminę. Skład trzonu jest podobny dla wszystkich grup bakterii gramujemnych, natomiast O-antygen wykazuje duży stopień zróżnicowania oraz specyficzność grupową. U *Salmonella newington* O-antygen zbudowany jest z powtarzających się trójek cukrowych: mannozy, ramnozy i galaktozy. Komórka syntetyzuje lipid A, trzon i antygen O niezależnie od siebie, po czym komponenty te łączą się wiązaniem kowalencyjnym tworząc lipopolisacharyd. Badania Nikaïdo i wsp. (35) wykazały, że synteza trzonu przebiega stopniowo z prekursorów nukleozydodwufosfocukrowych oraz akceptora. Cząsteczki cukrowe są przyłączane kolejno do nie-redukującego końca oligosacharydu. Synteza przebiega więc analogicznie jak w przypadku większości polisacharydów.

Biosynteza antygeny O przebiega w sposób odmienny. U *Salmonella newington* heksozy przenoszone są enzymatycznie z nukleozydodwufosfopochodnych, UDP-galaktozy, TDP-ramnozy i GDP-mannozy na nośnik fosfolipidowy. Podstawowym składnikiem tego nośnika jest alkohol poliizoprenoidowy zbudowany z jedenastu jednostek izoprenowych. Reakcją zapoczątkowującą biosyntezę antygeny O jest przeniesienie galaktozo-1-P z UDP-galaktozy na fosfolipid-P tworząc galaktozo-P-P-fosfolipid. Następnie przenoszone są kolejno ramnoza i mannoza. Tak więc rolą nośnika fosfolipidowego jest tworzenie trójcukrowych jednostek przed ich polimeryzacją w długie łańcuchy. Widać tu wyraźnie trzy zasadnicze różnice w stosunku do opisywanego poprzednio mechanizmu biosyntezy homopolisacharydów:

1. Reszta cukrowa nie jest przenoszona bezpośrednio na akceptor polisacharydowy, lecz na fosfolipidowy nośnik pośredniczący w tej reakcji.
2. Galaktoza jest przenoszona razem z resztą fosforanową i łączy się z fosfolipidowym akceptorem poprzez pirofosforanowy mostek.
3. Jednostki trójcukrowe dołączone są do redukującego końca łańcucha heksozosacharydowego.

Ogromna różnorodność nukleozydodwufosfocukrów występujących u bakterii jest związana z biosyntezą specyficznych polisacharydów antygeny O. Chojnacki i wsp. (3) wykazali, że u *Salmonella typhimurium* bardzo podobne reakcje glukozo-1-fosforanu z różnymi nukleozydo-5'-trójfosforanami są katalizowane przez odrębne białka enzymatyczne.

Odrębne zagadnienie stanowi udział nukleozydodwufosfocukrów w biosyntezie substancji grupowych krwi ludzkiej. Substancje te, występujące na powierzchni erytrocytów oraz komórek innych tkanek są glikoproteidami, zawierającymi wysoki procent węglowodanów (47). Około 80% populacji wydziela rozpuszczalne substancje grupowe typu A, B i O (H), pozostałe 20%, tak zwani „nie wydzielacze”, nie wytwarza tych substancji (38). Większość „nie wydzielaczy” wydziela duże ilości

substancji typu Le (Lewis) — glikoproteidów podobnych w składzie do substancji A, B i O (H).

Prace grupy Ginsburga wykazały, że mleko kobiet, u których nie zachodzi synteza substancji grupowych typu A, B i O (H), lub które mają typ krwi Le, nie zawiera specyficznych transferaz fukozowych (38). Brak jest zatem enzymu, który umożliwia u wydzielaczy przeniesienie L-fukozy z GDP-L-fukozy i jej przyłączenie do reszt D-galaktozowych poprzez wiązanie α -(1→2). Specyficzna transferaza N-acetylo-D-galaktozoaminy występuje wyłącznie w mleku kobiet z typem krwi A lub AB (20). Enzym ten katalizuje przeniesienie N-acetylo-D-galaktozoaminy z UDP-N-acetylo-D-galaktozoaminy na resztę galaktozową oligosacharydu poprzez wiązanie α -(1→3). Ponadto stwierdzono (21), że transferaza D-galaktozowa, która katalizuje przeniesienie D-galaktozy z UDP-D-galaktozy na 2'-fukozylolaktozę występuje tylko w mleku kobiet z typem krwi B lub AB. Dane te przemawiają za hipotezą Watkinsa i Morgana (48), według której różnice w typach krwi poszczególnych osobników są wynikiem genetycznie uwarunkowanej obecności lub braku specyficznych transglukozyłaz.

W artykule tym poruszono różnorodne aspekty metabolizmu nukleozydowufosfocukrów. Jednak uwaga badaczy jest obecnie skierowana głównie na udział tych związków w syntezie składników ściany komórkowej u zwierząt i roślin.

LITERATURA

1. Barber G. A., Hassid W. Z., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 397 (1964).
2. Cori C. F., Schmidt G., Cori G. T., *Science* **89**, 464 (1939).
3. Chojnacki T., Sawicka T., Korzybski T., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 3 (1968).
4. deFekete M. A. R., Leloir L. F., Cardini E. C., *Nature* **187**, 918 (1960).
5. deRobichon-Szulmajster H., *J. Mol. Biol.* **3**, 253 (1961).
6. Goldenberg S. H., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 357 (1962).
7. Goudsmit E. M., Ashwell G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 4 (1965).
8. Goudsmit E. M., Neufeld E. F., *Biochim. Biophys. Acta* **121**, 192 (1966).
9. Goudsmit E. M., Neufeld E. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 6 (1967).
10. Ginsburg V., *J. Biol. Chem.* **236**, 2389 (1961).
11. Ginsburg V., *Advan. Enzymol.* **26**, 35 (1964).
12. Glaser L., *J. Biol. Chem.* **234**, 2801 (1959).
13. Glaser L., Kornfeld S., *J. Biol. Chem.* **236**, 1795 (1961).
14. Hassid W. Z., Some Aspects of Sugar Nucleotide Metabolism, in Current aspects of Biochemical Energetics, Academic Pres, New York, Londyn 1966.
15. Ishihara H., Heath E. C., *J. Biol. Chem.* **243**, 1110 (1968).
16. Ishihara H., Massare D. J., Heath E. C., *J. Biol. Chem.* **243**, 1103 (1968).
17. Jacobsen B., Davidoson E. A., *J. Biol. Chem.* **237**, 638 (1962).

18. Kalckar H. M., Anderson E. P., Isselbacher K. J., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 267 (1965).
19. Kaufman R. L., Ginsburg V., *Exp. Cell. Res.* **50**, 127 (1968).
20. Kobata A., Grollman E. F., Ginsburg V., *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 1 (1968).
21. Kobata A., Grollman E. F., Ginsburg V., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 2 (1968).
22. Koczetkow H. K., Budowski E. J., Szibajew W. N., *Biochimija* **28**, 4 (1963).
23. Kornfeld R., *J. Biol. Chem.* **243**, 13 (1967).
24. Leloir L. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **33**, 186 (1951).
25. Leloir L. F., Role of uridine diphosphate glucose in the synthesis of glycogen, Ciba Foundation Symposia, Control of glycogen metabolism, 1964, str. 68.
26. Leloir L. F., Cardini C. E., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6340 (1955).
27. Levedahl B. H., James T. W., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 298 (1956).
28. Maxwell E. S., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1074 (1956).
29. Maxwell E. S., DeRobichon-Szulmajster Kalckar H. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 407 (1958).
30. Melo A., Glaser L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 5 (1966).
31. Munch-Petersen A., Kalckar H. M., Cutolo E., Smith E. E. B., *Nature* **172**, 1037 (1953).
32. Neufeld E. F., Feingold D. S., Hassid W. Z., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4430 (1958).
33. Neufeld E. F., Ginsburg V., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 297 (1965).
34. Neufeld E. F., Hassid W. Z., *Advan. Carbohydrate Chem.* **18**, 309 (1963).
35. Nikaido H., Naide Y., Makela P. H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **133**, 229 (1966).
36. Parnas J. K., Baranowski T., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **120**, 307 (1935).
37. Robins P. W., Bray D., Dankert M., Wright A., *Science* **158**, 3808 (1967).
38. Shen L., Grollman E. F., Ginsburg V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 224 (1968).
39. Sawicka T., *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.* **15**, 521 (1967).
40. Sawicka T., Biosynteza Nukleozydodwufocukrów i Galaktogenu u Ślimaka *Helix pomatia*. Praca doktorska, Warszawa, 1967.
41. Sawicka T., Chojnacki T., *Comp. Biochem. Physiol.* **26**, 707 (1968).
42. Sawicka T., Chojnacki T., *Clin. Chim. Acta* **23**, (1969).
43. Sanwal G. G., Preiss J., *Arch. Biochem. Biophys.* **119**, 454 (1967).
44. Su J. C., Hassid W. Z., *Biochemistry* **1**, 468 (1962).
45. Su J. C., Hassid W. Z., *Biochemistry* **1**, 474 (1962).
46. Trucco R. E., Caputto R., Leloir L. F., Mittelman N., *Arch. Biochem. Biophys.* **18**, 137 (1948).
47. Watkins W. M., *Science* **152**, 3719 (1966).
48. Watkins W. M., Morgan W. T. J., *Vox Sang.* **4**, 97 (1959).
49. Verachtert H., Bass S. T., Hansen R. G., *Federation Proc.* **23**, 379 (1964).
50. Żmudzka B., Szer W., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 321 (1962).

JANINA ANDRZEJCZUK-HYBEL*

Enzymy amyloリティczne

Amylolytic Enzymes

Recent data on the structure and properties of amylolytic enzymes are described.

Rozpowszechnione we wszystkich organizmach żywych enzymy amyloリティczne czyli amylazy stanowią jedną z najwcześniej poznanych grup enzymów wykazujących własności hydrolityczne. Rozkładają one skrobię, glikogen oraz pokrewne im wielo- i kilkucukrowce. W grupie tej wyróżnia się enzymy katalizujące hydrolizę wyłącznie wiązań α -1,4-glikozydowych w cukrach złożonych: α -amylazy czyli endoamylazy (4-glukanohydrolazy α -1,4-glukanu; (EC. 3.2.1.1)) β -amylazy czyli egzoamylazy

Tablica 1

Enzymy współdziałające z amylazami

Nazwa systematyczna	Nazwy potoczne
6-glukanohydrolaza amylopektyny (EC. 3.2.1.9)	glukozydaza amylopektynowa, enzym-R
6-glukanohydrolaza oligodekstryn (EC. 3.2.1.10)	oligo-1,6-glukozydaza, dektrynaza graniczna
glukozydaza α -D-glukozydów (EC. 3.2.1.20)	α -glukozydaza, maltaza
3-glukozydaza α -1,3-glukozydów (EC. 3.2.1.27)	α -1,4-glukozydaza, enzym-Z
6-glukanohydrolaza dekstryn (EC. 3.2.1.33)	dekstryno-1,6-glukozydaza, amyl-1,6-glukozydaza

(maltohydrolazy α -1,4-glukanu; (EC. 3.2.2.2)); oraz glukoamylaza czyli amyloglukozydaza (glukozydaza α -1,4-glukanu; (EC. 3.2.1.3)). Okazało się, że ten ostatni enzym może także katalizować hydrolizę wiązań α -1,6-glikozydowych we wszystkich wymienionych uprzednio substra-

* Mgr inż., Katedra Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: PMB — p-rtęciobenzoesan, EDTA — etylenodwuminoctano

tach, dlatego też nazwano ją 4 : 6 glukohydrolazą α -1,4 : 1,6 glukanu (28). Amylazom towarzyszą zazwyczaj enzymy pokrewne, które działają na inne wiązania glikozydowe w substracie i produktach jego rozkładu, umożliwiając ich całkowitą hydrolizę na cukry proste (tablica 1).

Wiele wiadomości o enzymach amylolytycznych znajdzie czytelnik w artykule F. Nowotnego w *Postęпах Biochemii* (60) a także w IV tomie *The Enzymes* (16, 17).

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie nowszych badań nad strukturą i właściwościami enzymów amylolytycznych. Ze względu na to, że amylazy znalazły zastosowanie w wielu procesach technologicznych, szczególnie w przemyśle spożywczym, poznanie ich budowy i własności ma duże znaczenie.

I. Amylasy katalizujące rozkład wiązania α -1,4-glikozydowego

1. α -Amylasy

α -Amylasy występują w organizmach zwierzęcych głównie w ślinie, krwi, trzustce i wątrobie (71). Szczególnie duże ilości α -amylaz są wytwarzane przez niektóre gatunki niższych grzybów z rodzaju *Aspergillus* i *Rhizopus*, a ponadto przez wiele bakterii z rodzaju *Bacillus* i innych (16). W roślinach α -amylasy występują obok β -amylaz (17), ilość ich zmienia się w zależności od okresu rozwojowego; w większej ilości pojawiają się na przykład w bulwach topinamburu podczas ich przechowywania (33).

α -Amylasy z wielu źródeł otrzymano w stanie krystalicznym, a pierwszy raz już w roku 1948 ze śliny ludzkiej (56).

Ciężary cząsteczkowe α -amylaz różnego pochodzenia wahają się w granicach od 45 000 do 60 000 (16, 42, 61) (tablica 2). Wyjątek stanowi α -amylaza z *B.stearothermophilus*, o znacznie niższym ciężarze cząsteczkowym (10). Inne stałe cząsteczkowe różnych α -amylaz są bardzo zbliżone i odpowiadają formie monomeru (16).

Tablica 2

Ciężary cząsteczkowe różnych α -amylaz

Źródło enzymu	Ciężar cząsteczkowy
<i>B.subtilis</i>	48 900 wg (41)
<i>A.oryzae</i>	51 — 52 000 wg (59)
Słód	59 500 wg (16)
<i>B.stearothermophilus</i>	15 000 wg (10)
Zwierzęce	45 — 49 000 wg (16)

α -Amylasy różnego pochodzenia wykazują różny zakres pH i temperatury dla optymalnego działania i trwałości (tablica 3).

Tablica 3

Optimum pH i temperatury dla niektórych α -amylaz

Źródło enzymu	pH	Temperatura
<i>B.stearothermophilus</i>		
wg (10)	4,6 — 5,1	65 — 75°C
Topinambur wg (33)	5,5 — 6,0	70 — 75°C
<i>A.oryzae</i> wg (59)	4,8 — 5,8	40 — 50°C
Zwierzęce wg (16)	6,0 — 7,0	40 — 55°C

Skład aminokwasowy α -amylazy ze śliny (16), z *A.oryzae* (59) i *B.stearothermophilus* (53) jest zbliżony. Amylaza z *Bacillus subtilis* różni się brakiem aminokwasów siarkowych. Poszczególne enzymy różnią się stosunkiem tyrozyny do tryptofanu, wskutek czego ich widma w ultrafioletcie wykazują znaczne różnice. α -Amylaza z *Aspergillus oryzae* zawiera stosunkowo mało aminokwasów zasadowych a szczególnie dużo hydroksyaminokwasów, co nadaje jej bardziej kwaśny charakter i warunkuje specyficzną zbitą strukturę.

W α -amylazie z *A.oryzae* według Akabori i Ikenaka (2) N-końcową resztę stanowi alanina, natomiast w części C-końcowej występują: seryna, alanina i glicyna tworząc strukturę rozgałęzioną. Jednak inni autorzy wykryli tylko serynę (59, 80) i przypuszczają, że C-końcowy odcinek łańcucha jest nierozgałęziony, o sekwencji: ... (Wal. Tre. Ala.Leu). Ser-OH. α -Amylaza z *A.oryzae* zawiera kilka procent cukrowców (3, 27). Przypuszczano, że cukrowce te są połączone z białkiem enzymu poprzez hydroksylową grupę seryny (83), jednak Anai i wsp. (4) zidentyfikowali skład fragmentu glikopeptydowego (kwas asparaginowy, seryna, N-acetyloglukozoamina, amoniak, mannoza, galaktoza i ksyloza w stosunku molarnym 1 : 1 : 2 : 1 : 6 : 0,8 : 0,5) i sugerują, że cukrowce są związane poprzez redukującą grupę glukozoaminy z azotem amidowym γ -karboksylowej grupy kwasu asparaginowego, zgodnie ze schematem: Ser-Asp-NH-cukrowce. W innych α -amylazach nie znaleziono składnika cukrowego (29, 36).

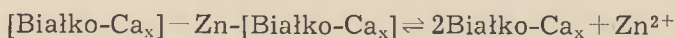
Fizjologiczna funkcja oraz trwałość α -amylazy jest uwarunkowana określoną zawartością jonu wapniowego Ca^{2+} (16). Ilość kationów Ca^{2+} oraz siła ich wiązania z cząsteczką białka enzymu jest różna dla poszczególnych α -amylaz (16). Cząsteczka amylazy z *A.oryzae* wiąże stosunkowo trwale 10 jonów wapnia (61), zaś cząsteczka amylazy z *B.subtilis* słabiej — 3—5 jonów Ca^{2+} (34). Zupełnie luźno wiążą Ca^{2+} amylazy roślinne, na przykład słodowa (16). Jon wapniowy może być związany

za pomocą wiązań chelatowych wewnątrz cząsteczki białkowej oraz elektrostatycznie na powierzchni łańcucha polipeptydowego (16). Mimo wielu badań (16, 19, 74) miejsca i grupy w łańcuchu peptydowym wiążące jony Ca^{2+} oraz rodzaj wiązań nie zostały w pełni ustalone. Imanischi (34) badał niektóre stałe termodynamiczne dla amylazy z *B.subtilis*, reaktywowanej jonami Ca^{2+} , które uprzednio usunięto metodą Stein'a i wsp. (75). Jego dane wskazują, że enzym wiąże Ca^{2+} w trzech równoważnościowych i elektrostatycznie niezależnych miejscach, rozmieszczonych wzdłuż cząsteczki białka. Każde miejsce ma strukturę przestrzenną, umożliwiającą bezpośrednie łączenie się z jonami wapnia. Imanischi przypuszcza, że jedną z grup wiążących jon wapniowy może być zjonizowana grupa karboksylowa $-\text{COO}^-$, a drugą iminowa $-\text{NH}$. Po denaturacji stężonym mocznikiem powodującej rozwinięcie układu globularnego enzym wiąże Ca^{2+} znacznie słabiej. W amylazach słabiej wiążących jony wapniowe mogą być zastąpione przez inne kationy: Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} (16). Jednakże powinowactwo do Ca^{2+} jest największe.

Wewnętrznie związane jony wapniowe mają szczególnie duże znaczenie dla zachowania struktury α -amylaz. Ich rola polega na utrwalaniu drugo- i trzeciorzędowej struktury białka enzymu, wskutek czego jest ona odporniejsza na wpływ niekorzystnych czynników środowiska a szczególnie na działanie enzymów proteolitycznych (16, 73). Dużej zawartości jonów Ca^{2+} wewnętrznie związanych zawdzięcza na przykład α -amylaza z *A.oryzae* swoją szczególnie zbitą strukturę, o której świadczy między innymi niska lewoskrętność ($\alpha)_D$ od -10° do -30° i wysoka stała dyspersji = 293 nm (16). O ochronnym działaniu jonów wapniowych na amylazy przekonano się działając na nie różnymi czynnikami wiążącymi jony metali. Dializa z EDTA (etylenodwuaminocteroocjan) w ciągu 50 godzin usuwa wszystkie jony wapnia z amylazy śliny, a w ciągu 150 godzin z amylazy bakteryjnej. W amylazie grzybów natomiast nawet po 6 dniach pozostaje jeszcze 10% pierwotnej zawartości tego składnika. Szczególnie trudno jest usunąć Ca^{2+} w temperaturze i pH optymalnych dla działania enzymu; zmiany temperatury i pH w zakresie trwałości enzymu przyspieszają ten proces, ale staje się nieodwracalny (13). Amylazy pozbawione całkowicie Ca^{2+} są bardzo nietrwałe i można je przechowywać wyłącznie w niskich temperaturach. Ponadto zmniejsza się znacznie zakres pH , w którym są one trwałe: dla amylaz zwierzęcych z 3,5—11 na 3,5—9, a dla bakteryjnych z 3,5—13 na 4—8 (16). Nie zaobserwowano natomiast zasadniczych zmian stałej sedymentacji oraz skręcalności optycznej. Konformacja cząsteczek amylaz po usunięciu Ca^{2+} zmienia się jedynie na niewielkich odcinkach, ale wszystkie amylazy z wyjątkiem enzymu z *A.oryzae* są szybciej rozkładane przez enzymy proteolityczne (73). Prawie wszystkie amylazy po usunięciu jonów wapnia są nieaktywne (31, 34, 54, 75). Tylko pewne amylazy roślinne oraz amylaza z *B. subtilis* zachowują w niskich temperaturach aktywność enzy-

matyczną w środowisku wolnym od Ca^{2+} i proteaz. Jednakże nie jest to pewne, gdyż bardzo trudno jest usunąć całkowicie ze środowiska zarówno jon wapniowy, do którego amylazy wykazują bardzo duże powinowactwo, jak i enzymy proteolityczne.

Cząsteczka α -amylazy z *B.subtilis* wiąże obok jonów wapnia również jon cynkowy Zn^{2+} (16, 41) tworząc dimer dysocjujący przy dużym rozcieńczeniu do monomeru zgodnie z reakcją:



W kompleksie tym mocniej związany jest jon Ca^{2+} (41). Jon Zn^{2+} wiąże się z imidazolowymi grupami histydyny w cząsteczkach białka (37). Formą aktywną enzymu jest prawdopodobnie monomer.

Badania nad zasadniczymi grupami funkcyjnymi centrum aktywnego α -amylaz wskazywały, że mogą nimi być wolne N-końcowe grupy α -aminowe, a także ϵ -aminowa grupa lizyny (16). Udział N-końcowych grup $-\text{NH}_2$ jak również grup C-końcowych w centrum aktywnym α -amylazy z *A.oryzae* nie został w pełni udowodniony (23, 72). Rola grup $-\text{SH}$ i wiązań $-\text{S-S}-$ w cząsteczce α -amylaz również nie jest dostatecznie wyjaśniona. W niektórych przypadkach wiązania $-\text{S-S}-$ prawdopodobnie utrzymują naturalną strukturę (38). Ponadto przypuszcza się, że jedno z wiązań $-\text{S-S}-$ α -amylazy u *A.oryzae* bierze udział w tworzeniu jej centrum aktywnego (91). Redukcja wszystkich mostków $-\text{S-S}-$ w α -amylazie z *A.oryzae* powoduje całkowity zanik jej aktywności (76). Dla większości α -amylaz stwierdzono odwracalność procesów denaturacji cieplnej (90), świetlnej (82), wysokim ciśnieniem (57) oraz 8M mocznikiem (35, 38). α -Amylaza z *A.oryzae* po denaturacji 8M mocznikiem polegającej na redukcyjnym rozrywaniu wiązań $-\text{S-S}-$ odzyskiwała pierwotną konformację po rozcieńczeniu mocznika i utlenianiu na powietrzu (37), podobnie jak rybonukleaza z trzustyki (89), trypsyna (12) i inne białka. Ciekawym zjawiskiem jest katalityczne działanie jonów Cu^{2+} zarówno na utlenianie grup $-\text{SH}$ jak i na enzymatyczną aktywność.

W oparciu o dane dotyczące mechanizmu utleniania grup $-\text{SH}$ w związkach niebiałkowych o niskim ciężarze cząsteczkowym Ise-mura i wsp. (38) proponują schemat reakcji utleniania zredukowanego białka. Według tego schematu elektrony z jonów siarczkowych są przekazywane na jon miedziowy, koordynacyjnie związany z odpowiednimi rodnikami łańcucha polipeptydowego, a następnie na tlen cząsteczkowy, czemu towarzyszy uwolnienie jonu miedziowego z kompleksu i połączenie reaktywnych atomów siarki w wiązanie dwusiarczkowe.

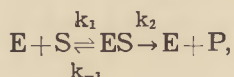
Ważną rolę w działaniu amylazy z *B. subtilis* przypisuje się resztom histydyny. Wykazano, że podstawienie 20—30% reszt histydyny zawartej w cząsteczce hamuje działanie α -amylazy w 94% (54). Także wskazuje się na udział pierścienia imidazolowego histydyny w centrum aktywnym α -amylaz roślinnych (23).

2. β -amylazy

Enzymy te występują prawdopodobnie wyłącznie w roślinach. Szczególnie dobrze poznano β -amylazy z ziaren zbóż (pszenicy, jęczmienia i żyta), soi i bulw topinamburu. Wszystkie β -amylazy wykazują zbliżony skład aminokwasowy. Ciężary cząsteczkowe β -amylaz różnego pochodzenia mieszczą się w granicach od 59 000 (amylaza słodu) do 152 000 (amylazy z topinamburu). Dla β -amylazy z soi wartość ta wynosi 61 700, a z pszenicy 64 000. Wszystkie wykazują słabo kwaśny charakter. W β -amylazie z soi resztę N-końcową stanowi kwas glutaminowy, a C-końcową — glicyna (20).

Niektóre β -amylazy okazały się niejednorodne. β -Amylazę z ziarna jęczmienia rozdzielono za pomocą chromatografii jonowymiennej na cztery aktywne frakcje (43), zaś β -amylazę z pszenicy na trzy składniki A, B i E (79), różniące się ruchliwością elektroforetyczną i pH optymalnego działania. Składnik E zawiera więcej glicyny i metioniny, a także wykazuje wyższą aktywność właściwą od A i B. Jego liczba obrotów wynosi 14 200, podczas gdy składnika A i B — 11 800 (liczba wiązań glikozydowych hydrolizowanych na 1 min. w 20°C (na mol E.)).

β -Amylasy w przeciwieństwie do α -amylaz nie zawierają jonów metali ani innych niebiałkowych kofaktorów. β -Amylasy wykazują obecność głównie grup -SH (a nie -S-S- jak α -amylazy); w enzymie z pszenicy występuje również jedno wiązanie -S-S- (79). Różny stopień inaktywacji enzymów różnego pochodzenia czynnikami utleniającymi świadczy o różnej reaktywności poszczególnych grup -SH. Natomiast wszystkie β -amylazy tracą całkowicie swą aktywność pod wpływem HgCl_2 , AgNO_3 , J_2 oraz *p*-rtęciobenzoesanu (PMB). Grupom -SH przypisuje się stabilizujące działanie na strukturę enzymu na podstawie ich zdolności do tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych typu $\text{N}\dots\text{H-S}$ albo $\text{O}\dots\text{H-S}$ (21). Katalityczna rola grup -SH w β -amylazach nie jest całkowicie wyjaśniona. Przypuszczano, że grupy te występują w aktywnym centrum enzymu i biorą udział w tworzeniu kompleksu enzym-substrat (ES) (17). Jednak Gertler i Birk (21) na podstawie badań nad hamowaniem β -amylazy z soi przez PMB uważają, że grupy -SH nie pełnią takiej roli, bowiem kolejne podstawienie grup -SH z utworzeniem siarczków nie zmienia wartości stałej K_m . Zgodnie z równaniem:



K_m zależy od k_1 , k_{-1} i k_2 i wynosi $(k_{-1} + k_2)/k_1$.

Jeżeli przyjąć, że kompleks ES może nie dysocjować i enzym będzie działał w kompleksie (6), wtedy $K_m = k_{-1}/k_1 = K_s$, gdyż tworzenie kompleksu ES będzie praktycznie niezależne od k_2 . Wykazano, że podstawienie grup -SH ma wpływ tylko na wartość stałej k_2 . Zależność wartości

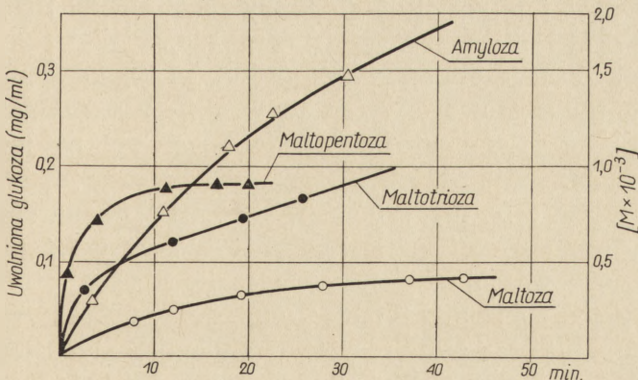
Km od pH w zakresie charakterystycznego dla grup $-SH$ $pK = 9,3-8,5$ wskazuje, że hamowanie przez PMB nie jest kompetycyjne. Ponieważ β -amylazy działają na zasadzie hydrolizy kwasowo-zasadowej (81) (w której grupy kwasowe oddają elektrony na tlen osłabiając w ten sposób wiązanie C-O) zaś nie dysocjujące grupy $-SH$ mogą działać jak grupy kwasowe. Przypuszcza się (21), że biorą one bezpośredni udział w rozrywaniu wiązania glikozydowego. Większość β -amylaz inaktywuje się czynnikami utleniającymi grupy $-SH$, z wyjątkiem β -amylazy topinamburu, w której grupy $-SH$ są zamaskowane (17).

Amylazy wykazują optimum aktywności w zakresie pH 4—6. Dla β -amylazy soi optymalne pH wynosi 5—6 (20), dla różnych składników amylazy pszenicy — 4,6—6,2 (79), dla β -amylazy słodowej — 5,2 (17), zaś dla β -amylazy z bulw topinamburu — 5,5—6 (17). β -Amylazy w przeciwieństwie do α -amylaz wykazują z reguły większą trwałość w niższych pH .

Optimum temperatury leży w granicach od 40—55°C. Wyjątek stanowi β -amylaza z bulw topinamburu, która działa najaktywniej podczas powolnego wzrostu temperatury od 60—80°C (17). Dzięki tej właściwości β -amylazy bulwy niektórych gatunków tej rośliny mają słodki smak po ugotowaniu.

3. Glukoamylaza

Enzym ten katalizuje hydrolizę wiązań α -1,4 i 1,6 glikozydowych, odrywając kolejno jednostki glukozy od nieredukującego końca cząsteczki wielocukru. Podczas hydrolizy zarówno wiązania α -1,4 jak i α -1,6 zachodzi przegrupowanie Waldena, wskutek czego powstaje glukoza w formie β (26, 62). Enzym ten jest wytwarzany przez mikroorganizmy, głównie przez niektóre szczepy z rodzaju *Aspergillus* i *Rhizopus* (64, 85). Znaleziono go także w słodzie jęczmiennym (43). Glukoamylazę wykryli po raz pierwszy Tsujisaka i wsp. w 1958 roku z *R. delemar*



Rys. 1. Krzywa szybkości hydrolizy różnych substratów przy pH 5,15 w temperaturze 15°C przez glukoamylazę z *R.delemar* wg (63)

i *A.niger* (84). Ciężar cząsteczkowy enzymu wynosi przypuszczalnie około 70 000 (63). Glukoamylaza z *Rhizopus delemar* wykazuje największą aktywność w pH 4—5 i w temperaturze 40—50°C (62, 84). Enzym atakuje równocześnie kilka łańcuchów cząsteczki wielocukrowca, co ustalono badając skład produktów powstających po hydrolizie znakowanych substratów (65) Szybkość hydrolizy jest zależna od długości łańcucha glukozydowego (rysunek 1).

Glukoamylaza katalizuje rozrywanie wiązania pomiędzy glikozydowym atomem węgla glukozy i glikozydowym tlenem (15). Z wartości K_m i V_{max} dla reakcji z maltozą zawierającą wiązania α -1,4 glikozydowe i panozą zawierającą wiązania α -1,6 glikozydowe wynika, że w cząsteczce istnieje jedno centrum aktywne, które katalizuje hydrolizę zarówno wiązania α -1,4 jak i α -1,6 glikozydowego (28, 29). Izomaltoza działa w reakcji hydrolizy maltozy i panozy jako inhibitor kompetywny.

II. Enzymy katalizujące rozkład wiązań α -1,6 i α -1,3

6-Glukanohydrolaza amylopektyny (EC. 3.2.1.9) działa na amylopektynę i glikogen oraz na produkty ich rozkładu przez β -amylazy i fosforylazy (46, 52). Katalizuje ona hydrolizę wiązań α -1,6-glikozydowych, odległych od siebie co najmniej o 5 jednostek glukozy. Enzym ten nie działa na oligosacharydy typu izomaltozy i panozy, ani na silnie rozgałęziony glikogen o wiązaniach-1,6, powtarzających się co 3—4 jednostki glukozy (52). Przypuszcza się zatem, że jest on wiązany przez określoną liczbę jednostek glukozy w łańcuchu wielocukrowca, a hydroliza następuje tylko w przypadku nałożenia się wiązania α -1,6-glikozydowego na centrum aktywne enzymu. Glukozydaza amylopektynowa występuje głównie w roślinach. Optimum pH dla tego enzymu ze słodu wynosi 5,0—5,3 (52), natomiast dla enzymu z nasion bobu — 6,5—7,0 (30). Inhibitorami dla słodowej glukozydazy są molibdenian amonu i chlork rtęciowy, natomiast PMB nie hamuje jej działania (52).

6-Glukanohydrolaza oligodekstryn (EC. 3.2.1.10) katalizuje hydrolizę wiązania α -1,6-glikozydowego wyłącznie w niskocząsteczkowych cukrowcach (46, 86). Nie działa natomiast na glikogen ani na jego graniczne dekstryny (46, 52).

Glukozydaza α -D-glukozydów (EC. 3.2.1.20) zwana również α -glukozydazą lub maltazą, katalizuje hydrolizę wiązań α -1,4-glikozydowych tylko w kilkocukrowcach, na przykład w maltozie i maltotriozie. Maltaza katalizuje także transglukozylację (65). Enzym ten wyodrębniono z drożdży (25). Duże ilości maltazy wytwarzane są przez *Rhizopus delemar*, oraz niektóre szczepy z rodzaju *A.niger* i *A.oryzae* (88). Występuje ona także w słodzie jęczmiennym (39) i w wątrobie zwierzęcej i ludzkiej (45).

3-Glukohydrolaza α -1,3-glikozydów (EC. 3.2.1.27) zwana potocznie α -1,3-glikozydazą katalizuje hydrolizę wiązań α -1,3-glikozydowych, jej podstawowym substratem jest nigeroz. Występuje ona prawie w całym świecie roślinnym (32).

6-Glukohydrolaza dekstryn (EC. 3.2.1.33) zwana dawniej amylo-1,6-glikozydazą, katalizuje hydrolizę wiązań α -1,6-glikozydowych w dekstrynach o krótkich łańcuchach bocznych. Najbardziej aktywnie działa na dekstryny glikogenu odznaczające się dużą częstotliwością wiązań -1,6- (47, 50). Występuje w mięśniach (47), w słodzie jęczmiennym (40, 51) i w niektórych szczepach z rodzaju *Aspergillus* (14). Optimum jej działania leży przy pH 7,2—7,6.

III. Mechanizm działania amylaz

Niektóre zagadnienia dotyczące mechanizmu działania α - i β -amylaz przedstawiają Nowotny (60) oraz Fischer i Stein (16) i French (17). Zarówno sposób działania enzymów amyloolitycznych jak i mechanizm katalizowanych przez nie reakcji nie jest dotychczas całkowicie wyjaśniony, między innymi ze względu na niedostatecznie wyjaśnioną budowę podstawowych ich substratów — skrobi i glikogenu.

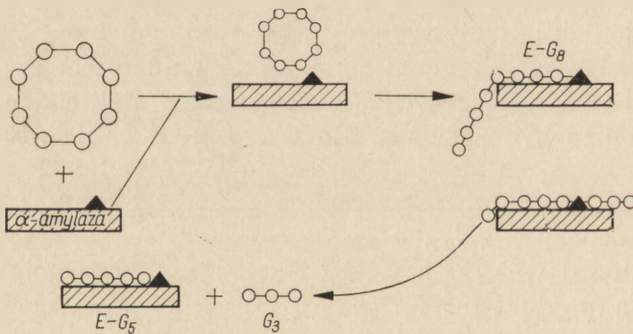
Zarówno α - jak i β -amylazy wykazują niskie powinowactwo do kilkowców, gdyż szybkość hydrolizy jest nieproporcjonalna do stopnia polimeryzacji substratu. Ze wzrostem ilości jednostek cukru w łańcuchu z 2→3→4 stopień hydrolizy wzrasta w stosunku 1 : 100 : 10⁵ (81). Działanie β -amylazy na maltozę jest bardzo powolne, natomiast dla optymalnego działania enzymu wystarcza już cząsteczka o 4—6 jednostkach glukozy w łańcuchu (18, 77).

Wiadomo od dawna, że α -amylazy działają na łańcuchy wewnętrzne substratów, a produktami reakcji są początkowo wysokocząsteczkowe dekstryny, przechodzące w miarę przebiegu reakcji w dekstryny niskocząsteczkowe. Po długotrwałej hydrolizie wielocukrowców z udziałem α -amylaz końcowymi produktami są głównie maltoza, maltotrioza, izomaltoza i glukoza.

Natomiast β -amylazy działają od strony nieredukującego końca zewnętrznych łańcuchów wielo- i kilkowców. Katalizują one hydrolizę co drugiego wiązania α -1,4-glikozydowego, aż do miejsca rozgałęzienia łańcucha. Produktem reakcji działania β -amylazy na łańcuchy nierozgałęzione cukrowców jest β -maltoza, natomiast na rozgałęzione cząsteczki np. amylopektyny czy glikogenu — β -maltoza i wysokocząsteczkowe tzw. dekstryny graniczne. Na podstawie analiz produktów hydrolizy wysunięto sugestie o kilku sposobach działania β -amylaz na substraty (17). Zakłada się, że β -amylazy mogą działać w sposób jednołańcuchowy, wielołańcuchowy i wielokrotny. W sposobie jednołańcuchowy

wym łańcuchy substratu ulegają kolejno całkowitej hydrolizie. W sposobie wielołańcuchowym natomiast enzym działa na wiele cząsteczek substratu jednocześnie, skracając je o kolejne jednostki maltozy. Po oderwaniu cząsteczki maltozy od danego łańcucha enzym oddysocjowuje i działa na inny łańcuch, proces ten powtarza się wielokrotnie prowadząc do hydrolizy kilku łańcuchów substratu jednocześnie. Wielokrotne działanie β -amylazy jest sposobem pośrednim między sposobami pojedynczym i wielołańcuchowym. W tym wypadku enzym po utworzeniu kompleksu z określonej długości fragmentem cząsteczki wielocukrowca oddysocjowuje wraz z nim a następnie uwalnia kilka kolejnych jednostek maltozy przez rozerwanie odpowiednich wiązań α -1,4-glikozydowych.

Podobnie jak dla β -amylaz sugeruje się również możliwość różnych sposobów działania i dla α -amylaz. Abdulla ch i wsp. (1) badając mechanizm rozkładu cyklicznych dekstryn Schardingera (cyklo G_8) pod wpływem α -amylazy z trzustki wieprzowej stwierdzili, że enzym rozkłada substrat nie oddysocjując od niego po rozerwaniu każdego z wiązań (rysunek 2). Przypuszczają więc, że α -amylaza działa w sposób wielokrotny. Pewnych danych o mechanizmie działania α -amylaz mogą dostarczyć prace poświęcone zjawisku tworzenia się wielocząsteczkowych nierozpuszczalnych kompleksów z dekstrynami glikogenu (45, 48).



Rys. 2. Sposób działania α -amylazy na dekstryny Schardingera (cyklo G_8) wg (1)
E — enzym, G_3 , G_5 i G_8 — wielocukry złożone z 3, 5 i 8 reszt glukozy

Ciekawa pod względem sposobu działania na substraty okazała się amylaza wyizolowana z *Bacillus polymyxa* (68). Enzym ten przypomina sposobem działania zarówno α jak i β -amylazy. Działa on mianowicie na skrobię, glikogen, oraz cykliczne dekstryny rozkładające wiązania α -1,4-glikozydowe w zewnętrznych łańcuchach, przy czym produktem końcowym reakcji jest β -maltoza podobnie jak przy działaniu β -amylaz. Enzym ten jednakże nie wymaga sąsiedztwa nieredukującego końca, co różni go od typowych β -amylaz. Ponadto od typowych β -amylaz różni go zdolność przeskakiwania przez wiązanie α -1,6-glikozydowe w rozgałęzionym łańcuchu substratu co z kolei upodabnia go do α -amylaz. Chemizm reakcji hydrolizy prowadzonej przez α i β -amylazy również

poznano w niewielkim stopniu. Przypuszcza się, że α -amylazy rozrywają wiązanie glikozydowe pomiędzy węglem glikozydowym i tlenem, co potwierdzono w badaniach z $H_2^{18}O$ (16). W pierwszej fazie następuje protonacja glikozydowego mostka tlenowego do jonu oksoniowego, a następnie zachodzi rozerwanie wiązania od strony C_1 i tworzy się pośrednio jon karbonyowy. Enzym uwolniony z kompleksu wchodzi w reakcję ze skróconą o U-X cząsteczką wielocukrowca.

Mechanizm działania β -amylaz oparty jest na hipotezie tzw. indukcyjnego dopasowania (ang. *induced-fit*) (17). Sugeruje się niezbedność wolnej grupy -OH przy C_4 od strony nieredukującego końca cząsteczki substratów. Prawdopodobnie grupa -OH w połączeniu z grupą X cząsteczki enzymu nadaje pewną orientację — indukuje dopasowanie się enzymu do substratu. Sugestii o niezbedności wolnej grupy -OH od strony nieredukującego końca nie potwierdziły badania nad wiązaniem się β -amylazy na fragmentach wewnętrznych skrobi i na amylozie cyklicznej (81), gdyż okazało się, że enzym może tworzyć kompleks zarówno z wewnętrznymi fragmentami skrobi jak i cykloamylozą. Nie poznano także bliżej natury grup A, B, X — katalitycznych grup enzymu.

IV. Metody wyodrębniania i oczyszczania

Jako wstępne etapy przy wyodrębnianiu i oczyszczaniu enzymów amylolitycznych stosuje się najczęściej: frakcjonowane wytrącanie za pomocą soli nieorganicznych głównie siarczanu amonu (22, 40, 43, 58, 68), za pomocą rozpuszczalników organicznych, głównie acetonu (24, 58, 68) oraz selektywną denaturację zanieczyszczeń przez ogrzewanie do odpowiedniej temperatury (24, 43, 58). W 1948 roku Ball s i wsp. (7) za pomocą wielokrotnego wysolenia siarczanem amonu oczyścili β -amylazę z topinamburu. Metodę Ballsa i wsp. zmodyfikowano następnie (11, 58) osiągając około 30-krotne oczyszczenie enzymu.

Halvorson i Ellias (25) za pomocą wstępnej denaturacji cieplnej w $70^\circ C$ oczyścili α -amylazę z soi, słodu i jęczmienia od β -amylazy. Greenwood i wsp. (23) stosując ekstrakcję chlorkiem wapnia i n-oktanołem, strącanie acetonem oraz adsorbcję na glikogenie, oczyścili 700-krotnie α -amylazę z nasion bobu. Obecnie coraz częściej do wstępnego oczyszczania i rozdzielania amylaz stosuje się sączenie na różnego rodzaju żelach dekstranowych typu *Sephadex* (8, 20, 43, 91), a także chromatografię kolumnową na modyfikowanych wymienniczkach celulozowych. Szczególnie przydatną okazała się dwuetyloaminoetyloceluloza (DEAE-celuloza) (20, 64, 78, 81, 91) i karboksymetyloceluloza (CM-celuloza) (20).

Stosując chromatografię kolumnową na DEAE-celulozie Toda i Akabori (81) oczyścili do stanu jednorodności krystaliczną α -amylazę z preparatu handlowego, a Tkachuk i Tipples (78) rozdzielili

β -amylazę z mąki pszenicy na trzy składniki A, B i E. Stosując słaby anionit, duolit A-2, wydzielono z oczyszczonego preparatu handlowego („Taka-diastry”) dwie frakcje maltazy — maltazę I i maltazę II (56). Krzyżanowski (44) stosując *DEAE-Sephadex* A-50 w jednym z etapów końcowych oczyszczania α -amylazy z mięśni szkieletowych królika uzyskał 1340-krotne oczyszczenie enzymu.

V. Zastosowanie

Jednym z podstawowych czynników wpływających na tak szybki rozwój badań nad właściwościami i oczyszczaniem enzymów amylolitycznych jest ich coraz bardziej powszechne zastosowanie w szeregu gałęzi przemysłu spożywczego. Dlatego w zakończeniu tego artykułu należy wspomnieć o najważniejszych procesach technologicznych, w których są one użytkowane.

Ogólnie biorąc zastępowanie procesów chemicznych enzymatycznymi wynika z następujących właściwości tych ostatnich:

1. enzymy dzięki specyficzności katalizują ściśle określone reakcje,
2. działają w łagodnych warunkach, co zwiększa wydajność gotowego produktu i zachowania w nim ważnych składników odżywczych
3. procesy mogą być łatwo przerwane w odpowiednim momencie, a ich szybkość może być regulowana
4. produkcja przemysłowa preparatów enzymatycznych jest tania, gdyż opiera się na prostych surowcach odpadkowych
5. dodatek tych preparatów nie jest szkodliwy i nie powoduje obniżenia smaku produktów.

Podstawowymi źródłami enzymów amylolitycznych są hodowle pleśni rodzajów *Aspergillus* oraz niektórych bakterii, na przykład *Bacillus subtilis*.

Największe znaczenie posiadają enzymy amylolityczne w przemyśle fermentacyjnym, piekarskim i skrobiowym. W procesach fermentacyjnych (gorzelnictwo, piekarstwo) enzymy te stosuje się w celu zastąpienia kosztownego siodu tańszymi surowcami zbożowymi oraz poprawienia wydajności i ekonomiki procesu fermentacji alkoholowej (5, 9, 49, 66, 67, 69, 87). W przemyśle piekarskim stosuje się zależnie od wymagań produkowanego pieczywa preparaty o różnym składzie enzymatycznym (stosunek α - do β -amylazy) oraz o różnej odporności na temperaturę (termo-stabilne enzymy bakteryjne lub labilne pleśniowe). Ma to na celu regulowanie szybkości procesu fermentacji ciasta i uzyskanie w ten sposób właściwej struktury pieczywa (67, 70). Wreszcie w przemyśle skrobiowym (syropiarstwo, otrzymywanie glukozy) proces enzymatyczny zastępuje mniej korzystną hydrolizę kwasową, a ponadto dobór odpowiedniego składu enzymatycznego preparatów amylolitycznych pozwala uzyskiwać

bogatszy asortyment syropów i większe wydajności glukozy przy zastosowaniu glukoamylazy (42, 58, 67, 68).

Te i szereg innych zastosowań doprowadziły do produkcji enzymów amylolytycznych w ilościach tysięcy ton rocznie, przy czym na ogół otrzymuje się preparaty o stosunkowo niskiej czystości.

LITERATURA

1. Abdullah M., French D., Robyt J. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 595 (1966).
2. Akabori S., Ikenaka T., *J. Biochem.* **42**, 603 (1955).
3. Akabori S., Ikenaka T., Hagihara B., *J. Biochem.* **41**, 577 (1954).
4. Anai M., Ikenaka T., Matsushima Y., *J. Biochem.* **59**, 57 (1966).
5. Bachman B., Produkcja i stosowanie preparatów amylolytycznych w przemyśle spożywczym, pr. zbiorowa, WPLiS 1966, str. 88.
6. Bailey J. M., French D., *J. Biol. Chem.* **226**, 1 (1957).
7. Balls A. K., Walden M. K., Thompson R. R., *J. Biol. Chem.* **173**, 9 (1948).
8. Blandamer A. H., *Nature* **197**, 591 (1963).
9. Brish Y. N., Ganikyak N. I., *Spir. Prom.* **28**, 37 (1962).
10. Campbell L. L., Manning G. B., *J. Biol. Chem.* **236**, 2962 (1961).
11. Englard S., Singer S. P., *J. Biol. Chem.* **187**, 213 (1950).
12. Epstein C. J., Goldberger R. F., *J. Biol. Chem.* **273**, 2175 (1962).
13. Falbriad J. G., Stein E. A., Wyniki niepublikowane.
14. Feniksowa R. W., Rodzewicz V. L., Szilowa A. A., Dobro-linska G. M., Abstr. I-st Int. Congr. Food Sci. 1962, str. 14.
15. Fleetwood J. G., Weigel H., *Nature* **196**, 984 (1962).
16. Fischer E. H., Stein E. A., The Enzymes, tom IV, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., Academic Press, wyd. II, 1960, str. 313.
17. French D., The Enzymes, tom IV, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., Academic Press, wyd. II, 1960, str. 345.
18. French D., Jounquist R. W., *Starke* **15**, 425 (1963).
19. Fujita I. S., Isemura T., *J. Biol. Chem.* **47**, 537 (1964).
20. Gertler A., Birk Y., *Biochem. J.* **95**, 621 (1965).
21. Gertler A., Birk Y., *Biochim Biophys. Acta* **118**, 98 (1966).
22. Gertler A., Birk Y., *Israel J. Chem.* **2**, 235 (1964).
23. Greenwood C. T., Mac Gregor A. W., Milne E. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 459 (1965).
24. Greenwood C. T., Mac Gregor A. W., Milne E. A., *Starke* **17**, 219 (1965).
25. Halverson H., Ellias E., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 28 (1958).
26. Hamazu Z., Hiromi K., Ono S., *J. Biochem.* **57**, 39 (1965).
27. Hanafusa H., Ikenaka T., Akabori S., *J. Biochem.* **42**, 55 (1955).
28. Hiromi K., Hamazu Z. I., Takahashi K., Ono S., *J. Biochem.* **59**, 411 (1966).
29. Hiromi K., Kawai M., Ono S., *J. Biochem.* **59**, 476 (1966).
30. Hobson P. N., Whalau W. J., Peat S., *J. Chem. Soc.* str. 1451 (1951).
31. Hsiu J., Fischer E. H., Stein E. A., *Biochemistry* **3**, 61 (1964).
32. Hutson S. H., Manners D. J., *Biochem. J.* **89**, 91p (1963).
33. Ikemiya M., Deobald H. J., *J. Agric. Food. Chem.* **14**, 237 (1966).

34. Imanishi A., *J. Biochem.* **60**, 381 (1966).
35. Imanishi A., Kakiuchi K., Isemura T., *J. Biochem.* **54**, 89 (1963).
36. Isemura T., Fujita S., *J. Biochem.* **44**, 443 (1957).
37. Isemura T., Kakiuchi K., *J. Biochem.* **51**, 385 (1962).
38. Isemura T., Takagi T., Maeda Y., Yutani K., *J. Biochem.* **53**, 155 (1963).
39. Jörgensen B. B., Jörgensen O. B., *Acta Chem. Scand.* **17**, 1765 (1963).
40. Jörgensen O. B., *Acta Chem. Scand.* **18**, 53 (1964).
41. Kakiuchi K., Hamaguchi K., Isemura T., *J. Biochem.* **57**, 167 (1965).
42. Kakiuchi K., Kato S., Imanishi A., Isemura T., *J. Biochem.* **55**, 102 (1964).
43. Kemoni M., Seppala P., Raili V., Enari T. M., *Acta Chem. Scand.* **19**, 2003 (1965).
44. Krzyżanowski M., *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. sci. biol.* **14**, 675 (1966).
45. Lejeune N., Thines-Sempoux D. G., Hers H. G. *Biochem. J.* **84**, 28P (1962).
46. Lerner J., *The Enzymes*, tom IV, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., Academic Press, wyd. II 1960, str. 379.
47. Levitzki A., Heller J., Schramm M., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 101 (1964).
48. Loyter A., Schramm M., *J. Biol. Chem.* **241**, 2611 (1966).
49. MacCutchan W. N., Hidy P. H., Patent U.S.3.061.521 (1962).
50. MacWilliam I. C., *Nature* **181**, 1143 (1958).
51. MacWilliam I. C., Harris G., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 442 (1959).
52. Manners D. J., Sparra K. L., *J. Inst. Brew.* **72**, 360 (1966).
53. Manning G. B., Campbell L. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 2952 (1961).
54. Maruyama T., Niwa M., Yamamoto T., *J. Biochem.* **60**, 286 (1966).
55. Matsushima T., *J. Biochem.* **47**, 830 (1960).
56. Mayer K. H., Fisher E. H., Staub A., Bernfeld P., *Helv. Chim. Acta* **31**, 2158 (1948).
57. Miyagawa K., Sannoe K., Suzuki K., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 467 (1964).
58. Nakayama S., Amagase S., *J. Biochem.* **54**, 375 (1963).
59. Narita K., Murakami H., Ikenaka T., *J. Biochem.* **59**, 170 (1966).
60. Nowotny F., *Post. Biochem.* **1**, 207 (1955).
61. Oikawa A., Maeda A., *J. Biochem.* **44**, 745 (1957).
62. Ono S., Hiromi K., Hamazu Z., *J. Biochem.* **57**, 34 (1965).
63. Ono S., Hiromi K., Zinbo M., *J. Biochem.* **55**, 315 (1964).
64. Pazur J. H., Ando T., *J. Biol. Chem.* **234**, 1966 (1959).
65. Pazur J. H., Ando T., *J. Biol. Chem.* **235**, 297 (1960).
66. Piller K., *Produkcja i stosowanie preparatów amylolytycznych w przemyśle spożywczym*, pr. zbiorowa, WPLiS, 1966.
67. Reed G., *Enzymes in Food Processing*, Academic Press 1966.
68. Robyt J., French D., *Arch. Biochem. Biophys.* **104**, 338 (1964).
69. Rogols S., Hough R. L., *Starke* **15**, 1 (1963).
70. Rubenthaler G., Finey K. F., Pomeranz Y., *Food Technol.* **19**, 239 (1965).
71. Rutter W. J., Arnold M., Brosemer R. W., Miller J. A., *J. Biol. Chem.* **236**, 1229 (1961).
72. Sirisinha S., Allen P. Z., *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 137 (1965).
73. Stein E. A., Fischer E. H., *J. Biol. Chem.* **232**, 867 (1958).
74. Stein E. A., Fischer E. H., *J. Biol. Chem.* **247**, 537 (1964).
75. Stein E. A., Hsiu J., Fischer E. H., *Biochemistry* **3**, 56 (1964).

76. Takagi T., Isemura T., *J. Biochem.* **56**, 344 (1964).
77. Thoma J. A., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **23**, 2511 (1960).
78. Tkachuk R., Tipples K. H., *Cereal Chem.* **42**, 111 (1965).
79. Tkachuk R., Tipples K. H., *Cereal Chem.* **43**, 62 (1966).
80. Toda H., *J. Biochem.* **54**, 1 (1963).
81. Toda H., Akabori S., *J. Biochem.* **53**, 101 (1963).
82. Tomita G., Kim S. S., *Nature* **207**, 975 (1965).
83. Tsugita A., Akabori S., *J. Biochem.* **46**, 659 (1959).
84. Tsujisaka Y., Fukumoto J., Jamamoto T., *Nature* **181**, 770 (1958).
85. Underkofler L. A., Denault L. J., Hou E. F., *Starke* **17**, 179 (1965).
86. Underkofler L. A., Roy D. K., *Cereal Chem.* **28**, 18 (1951).
87. Underkofler L. A., Sevwrson G. M., Goering K. J., *Ind. Eng. Chem.* **38**, 980 (1946).
88. Vedernikowa E. J., Linskinskaja J. L., Linetskaja G. N., *Mikrobiologija* **31**, 1087 (1962).
89. White F. H., *J. Biol. Chem.* **236**, 1353 (1961).
90. Yamamoto T., Nishida A., *Agric. Biol. Chem.* **28**, 656 (1964).
91. Yutani K., Takagi T., Isemura T., *J. Biochem.* **57**, 590 (1965).

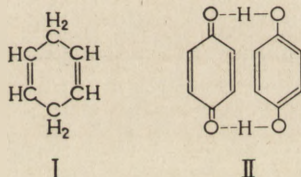
ALICJA K. DRABIKOWSKA*

Biologiczne funkcje chinonów

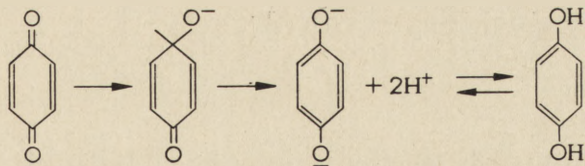
Biological Function of Quinones

Distribution of quinones and the concept of their function in some organisms are presented.

Chinony należą do dwuketonów, pochodnych cykloheksadienu-1,4 (wzór I). Funkcyjne grupy karbonylowe mogą znajdować się w tym samym lub, w przypadku pierścieni skondensowanych, w dwóch różnych pierścieniach. Chinony łatwo ulegają redukcji do hydrochinonów. Przepuszczalny mechanizm tej reakcji przedstawia schemat 1. W równocząsteczkowej mieszaninie chinonu i hydrochinonu powstaje chinhydron (wzór II).



Chinony są składnikami zarówno organizmów zwierzęcych jak i roślinnych. Do tej pory w przyrodzie zidentyfikowano około 200 różnych chinonów, wśród których można wyróżnić trzy zasadnicze grupy: 1) benzochinony, 2) naftochinony, 3) chinony będące pośrednikami w przemianach tyrozyny i tryptofanu. Chinony dwóch pierwszych grup biorą udział w procesach utleniania i magazynowania energii. Biologiczną



Schemat 1. Przepuszczalny mechanizm redukcji chinonów

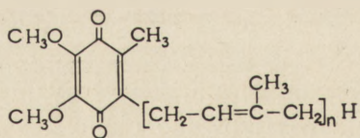
* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa
Wykaz stosowanych skrótów: PQ — plastochinon, MK — menachinon (witamina K₂)

aktywność tych związków warunkują zarówno rodzaj i podstawniki pierścienia aromatycznego, jak i łańcuch boczny. Najlepiej wyjaśniona jest rola ubichinonów, plastochinonów i witamin K i im przede wszystkim poświęcony jest niniejszy artykuł.

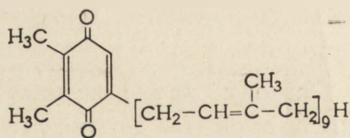
I. Benzochinony

1. Ubichinony

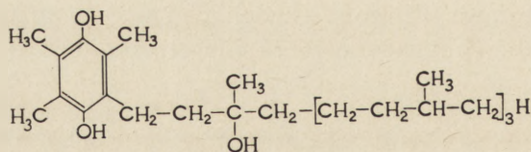
Ubichinony (Koenzym Q, wzór III) są najbardziej rozpowszechnionymi w przyrodzie chinonami. Do niedawna uważano, że naturalne ubichinony zawierają 10, 9, 8, 7, 6 i 5 jednostek izoprenowych. Ostatnio (34) wyodrębniono także homologi ubichinonu występujące jednak w ilościach około 500—1000 razy mniejszych, zawierające jedną, dwie, trzy i cztery jednostki izoprenowe. Obecność ubichinonów z bocznym łańcuchem o różnej długości świadczy o niskiej specyficzności enzymów alkilujących. Ubichinony występują głównie w strukturach podkomórkowych. U zwierząt zawierają je mitochondria (43) i mikrosomy (79), w których łańcuch oddechowy jest prawdopodobnie związany z lipoproteidową frakcją membranową (37) oraz jądra komórek wątroby (54); znaleziono je także w supernatancie po odwirowaniu mikrosomów, zawierającym niewrażliwą na antymycynę reduktazę zred. NAD: cytochrom c (24); stanowią również składnik rozpuszczalnej oksydazy aldehydowej (77). Diplock i Haslewood (32) oznaczyli u różnych gatunków kręgowców zawartość ubichinonów i sugerują, że ich ilość w tkankach zwiększa się wraz z rozwojem ewolucyjnym zwierząt.



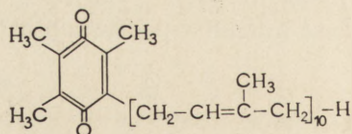
III



IV



V



VI

U roślin ubichinony występują we frakcji lżejszych cząstek, które mogą odpowiadać mitochondriom lub mikrosomom, a szczególnie duże ilości znajdują się w ścianach komórkowych.

U bakterii ubichinony znajdują się w różnych cząstkach transportujących elektrony (9), a także w chromatoforach tych spośród fotosyntety-

zujących bakterii, które zawierają całkowity aparat do zamiany energii świetlnej w chemiczną (101). U pewnych bakterii zamiast ubichinonów występuje menachinon (witamina K₂) (55). Ze względu na zawartość tych chinonów bakterie można podzielić na cztery grupy: 1) zawierające tylko ubichinon, 2) tylko menachinon, 3) zarówno ubichinon jak i menachinon, 4) nie zawierające żadnego chinonu. W tej klasyfikacji nie mieszczą się bakterie fotosyntetyzujące.

Występowanie ubichinonów głównie w mitochondriach i to w stosunkowo dużych ilościach wskazywało na ich udział w transporcie elektronów (patrz artykuły przeglądowe (92, 93)). Potwierdzeniem tej hipotezy jest cykliczna oksydoredukcja ubichinonu w preparatach mitochondrialnych w czasie utleniania substratów cyklu kwasów trójkarboksylowych (26, 50). Redfearn i Pumphrey (83) wykazali, że szybkość redukcji ubichinonu mitochondrialnego w obecności bursztynianu i zredu. NAD jest znacznie mniejsza niż szybkość utleniania tych substratów przez odpowiednie oksydazy. Zdaniem tych autorów ubichinon stanowi boczne ogniwo łańcucha oddechowego, biorące udział w utlenianiu substratów mitochondrialnych. Badając kinetykę utleniania i redukcji ubichinonu mitochondrialnego *in situ* w preparatach fosforylujących i niefosforylujących Chance (18) doszedł do wniosku, że przenoszenie elektronów w łańcuchu oddechowym może zachodzić w dwojaki sposób. W mitochondriach fosforylujących transport elektronów przebiega głównie przez cytochrom b, a w nieznacznej tylko mierze przez ubichinon. Natomiast w mitochondriach niefosforylujących ubichinon, zajmujący pozycję pomiędzy flawiną a miejscem wrażliwym na antymycynę A, jest przenośnikiem prawie całej ilości elektronów z substratów na układ cytochromowy. Tylko niewielka ilość elektronów jest przenoszona przez cytochrom b, który przejmuje je prawdopodobnie wprost z flawiny, podobnie jak cytochrom b₂ (19).

Odmienne poglądy na rolę ubichinonu reprezentuje Green (42), według którego zmiany oksydoredukcyjne ubichinonu są tego samego rzędu co zmiany oksydoredukcyjne innych składników łańcucha oddechowego. Na tej podstawie uważa, że ubichinon jest jednym z głównych ogniw łańcucha oddechowego. Także wyniki badań Szarkowskiej i Klingenberga (95) wskazują, że ubichinon znajduje się na głównej drodze utleniania fizjologicznych substratów. Wydaje się, że sprzeczność danych o jego roli jest wynikiem przede wszystkim stosowania różnych metod oznaczania stanu oksydoredukcyjnego ubichinonu i używania do badań różnego materiału. Prawdziwą początkową szybkość redukcji ubichinonu trudno oznaczyć, gdyż przeciętnie jego ilość jest około 10 razy większa niż cytochromów a lub b. Zatem gdy zaledwie 10% ubichinonu ulegnie redukcji przez substrat, cytochromy są już całkowicie zredukowane. Według Krögera i Klingenberga (59) oksydoredukcyjne zmiany ubichinonu odpowiadają zmianom innych komponent łańcucha

oddechowego, zaś stopień redukcji ubichinonu przemawia za umieszczeniem go pomiędzy flawiną a cytochromem b. Szybkość zmian oksydoredukcyjnych ubichinonu w różnych stanach funkcjonalnych mitochondriów, jest taka sama jak NAD i cytochromu b. Jedynie przy przejściu do stanu aktywnego stan oksydoredukcyjny cytochromu b ustala się nieco wcześniej niż ubichinonu i NAD, co można tłumaczyć ich stosunkowo dużym stężeniem molarnym. Ubichinon jako grupa prostetyczna nie jest, podobnie jak NAD, mocno związany z białkiem. Jego nadmierna w stosunku do innych komponent łańcucha oddechowego ilość służy być może jako „zbiornik” dla protonów dostarczanych przez różne enzymy flawinowe. Znajdując się w warstwie lipidowej błony może stanowić „ruchomy” pomost pomiędzy silnie związanymi ze strukturą mitochondriów enzymami flawinowymi a układem cytochromowym.

Rolę ubichinonu w transporcie elektronów próbowano wyjaśnić badając aktywność mitochondriów i preparatów submitochondrialnych pozbawionych ubichinonu za pomocą ekstrakcji izooktanem (19, 26) lub acetonem (62, 63). Mitochondria takie tracą zdolność przenoszenia elektronów z bursztynianu na tlen. Próby przywrócenia tej aktywności przez dodanie ubichinonu dały jednak również wyniki niejednoznaczne.

Lester i Fleischer (63) stwierdzili, że ekstrahowane mitochondria odzyskują aktywność po dodaniu ubichinonu lub jego homologów. Interesujące było, że aktywność oksydazy bursztynianowej zwiększał jednoczesny dodatek cytochromu c mimo, że mitochondria przed i po ekstrakcji zawierały tę samą ilość cytochromu c. Według Redfearna i Burgosa (80) już dodanie samego cytochromu c przywraca 40% aktywności, którą wykazują mitochondria w obecności cytochromu c i ubichinonu. Transport elektronów w takich mitochondriach jest hamowany przez antymycynę A. W mitochondriach pozbawionych ubichinonu dodanie bursztynianu powoduje znaczną redukcję cytochromu c_1 i b, natomiast małą — cytochromu a i a_3 . Autorzy ci przypuszczają więc, że ubichinon leży na bocznym torze transportu elektronów, a utlenianie bursztynianu w obecności cytochromu c przebiega na drodze niezależnej od ubichinonu, która może także funkcjonować w normalnych warunkach fizjologicznych.

Natomiast według Goldbergera i Greena (48) dodanie samego cytochromu c nie przywraca aktywności preparatom ekstrahowanym a dodanie bursztynianu nie powoduje redukcji cytochromu b. Wskazywałoby to, że ubichinon jest funkcjonalnym składnikiem łańcucha oddechowego, znajdującym się na głównej drodze transportu elektronów. W krytycznej ocenie tych wyników należy wziąć pod uwagę możliwość zmian konformacyjnych, rozpadu lub przemieszczenia komponent łańcucha oddechowego podczas ekstrakcji. Być może, wskutek zmian tego rodzaju mogą powstawać nowe, нефизjologiczne drogi transportu elektronów. Zastanawiające jest jednak, że pozbawione ubichinonu układy

wykazują dużą specyficzność w stosunku do katalitycznych ilości ubichinonu (Q_{10}) oraz tę samą wrażliwość na inhibitory łańcucha co preparaty wyjściowe.

Rola ubichinonu w utlenianiu zred. NAD długi czas była niejasna (26, 106), gdyż dodanie ubichinonu (Q_{10}) do mitochondriów ekstrahowanych izooktanem lub acetonem nie przywracało aktywności oksydazy zred. NAD. W roku 1966 S z a r k o w s k a (94) zastosowała do ekstrakcji zliofilizowanych mitochondriów n-pentan, który usuwa całkowicie ubichinon, a nie inaktywuje enzymu. Takie mitochondria utleniają zred. NAD i bursztynian dopiero po dodaniu ubichinonu (Q_{10}). Szybkość utleniania substratów przez odtworzony układ enzymatyczny zwiększa się po dodaniu wyekstrahowanych fosfolipidów mitochondrialnych, które stwarzają prawdopodobnie odpowiednie środowisko dla działania nierozpuszczalnego w wodzie, egzogenego ubichinonu (Q_{10}) z aktywnymi centrami enzymu. Świadczyłoby o tym odtworzenie aktywności oksydazy zred. NAD przez rozpuszczalne homologi o krótszym łańcuchu izoprenowym w nieobecności fosfolipidów.

Możliwość specyficznego odtwarzania aktywności oksydazy bursztynianowej i zred. NAD przez dodanie ubichinonu a także kinetyka reakcji ubichinonu w mitochondriach (59) wskazują jednoznacznie na kluczową rolę tego składnika w łańcuchu przenoszącym elektrony z substratu na tlen, zaś rozbieżność wyników uzyskiwanych przez różne pracownie może okazać się tylko pozorna w świetle dalszych badań.

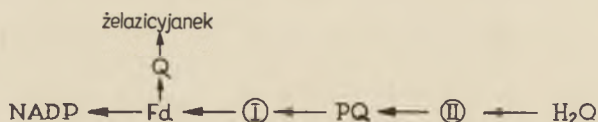
2. Plastichinony

U roślin we frakcji lipidowej chloroplastów występują cztery tak zwane plastochinony: PQ-A, PQ-B, PQ-C i PQ-D o tych samych maksimach absorpcji przy 255 i 263 nm, a chromatograficznie różne (52). Badania w spektrografii masowym (30, 31) oraz pomiary w podczerwieni (22) wyjaśniły szczegóły ich budowy. Każdy z nich zawiera pierścień benzenowy i łańcuch zbudowany z dziewięciu jednostek izoprenowych. Różnice w budowie dotyczą jedynie podstawników w tym łańcuchu. W plastochinonie A, odkrytym w 1946 roku (58) i zidentyfikowanym jako 2,3-dwumetylo-5-solanezylo-benzochinon (100), (wzór IV) wszystkie izoprenowe jednostki są nienasycone. Początkowo przypuszczano, że PQ-B ma o dwa atomy wodoru mniej w drugiej jednostce izoprenowej niż PQ-A, jednak okazało się (31, 47), że jest on pochodną plastochinonu C zestryfikowaną kwasem o 16 atomach węgla, zawierającym jedno nienasycone wiązanie. Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej oraz kolumnowej udało się rozdzielić PQ-B na sześć homologów, wykazujących to samo widmo w ultrafiolecie: PQ-B₁, PQ-B₂, PQ-B₃, PQ-B₄, PQ-B₅, PQ-B₆ (47). Prawdopodobnie są to izomery PQ-B różniące się tylko po-

zycją grupy estrowej w izoprenowym łańcuchu bocznym. Plastochinon C zawiera grupę hydroksylową w łańcuchu bocznym, a plastochinon D jest prawdopodobnie jego izomerem. Rozdzielono je na sześć składników (47), które różnią się prawdopodobnie położeniem grupy hydroksylowej w łańcuchu izoprenowym.

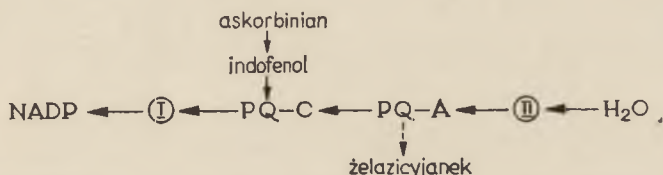
Plastochinony A i B występują u roślin wyższych w dużych ilościach, natomiast plastochinony C i D tylko w nieznacznych. Głony nie zawierają plastochinonu A (35). Przed kilku laty wyizolowano z liści drzewa kaurukowego także plastochromanol (105), powstający prawdopodobnie z plastochinonu. Jego funkcja nie jest dotąd poznana. Plastochinony skupione są głównie w lamelach chloroplastów zawierających dużą ilość lipidów, którym dotychczas nie udało się przypisać określonej funkcji metabolicznej (2a, 46). Prawie 90% tych chinonów występuje w oczyszczonej frakcji lamel (4). Duże stężenie plastochinonów w chloroplastach roślin wyższych i glonów nasuwało myśl o ich ważnej funkcji w procesie fotosyntezy. Wyniki różnych doświadczeń wykazały, że pełnią one rolę składnika oksydoredukcyjnego w transporcie elektronów związanym z przemianą energii świetlnej w energię chemiczną, a ponadto określili ich miejsce w kompleksie enzymatycznym transportującym elektrony. W roku 1957 Lynch i French (65) stwierdzili, że chloroplasty ekstrahowane rozpuszczalnikami tłuszczowymi tracą zdolność utleniania i odzyskują ją po dodaniu frakcji wyekstrahowanych lipidów, a ściślej zawartego w niej plastochinonu (6, 7, 60).

Według Redfearna i Frienda (82) fotoredukcja sztucznych akceptorów przez chloroplasty zanika całkowicie już po wyekstrahowaniu 40% plastochinonu, a dodanie egzogenego plastochinonu przywraca zaledwie w niewielkim stopniu pierwotną aktywność. Trebst i wsp. (97, 98) wykazali, że usunięcie rozpuszczalnikami tłuszczowymi 70% plastochinonu powoduje zanik fotoredukcji żelazicyjanku, natomiast nie zmienia redukcji NADP, która ustaje dopiero w wyniku dalszej ekstrakcji. Sugerują oni istnienie dwóch miejsc działania chinonów (schemat 2). Jedno z nich znajdowałoby się w miejscu łańcucha, z którego elektrony przenoszone są na żelazicyjanek, drugie natomiast w tej części łańcucha, która uczestniczy w redukcji NADP. Hipotezę tę potwierdza zachowanie się wyekstrahowanych chloroplastów wobec egzogenych chinonów: redukcja NADP zachodzi wyłącznie po dodaniu plastochinonu, natomiast redukcja żelazicyjanku zarówno po dodaniu plastochinonu A jak i innych niespecyficznych chinonów.



Schemat 2. Lokalizacja chinonów w fotosyntetycznym transporcie elektronów

Henninger i Crane (53) ustalili, że zdolność ekstrahowanych heptanem chloroplastów do redukcji indofenolu zaledwie w nieznacznym stopniu przywraca sam plastochinon A lub C. Znacznie większą redukcję powoduje jednoczesne dodanie obu tych chinonów. Autorzy uważają, że zmniejszenie szybkości fotoredukcji indofenolu i NADP w obecności układu redukującego: askorbinian + indofenol jest wynikiem wyekstrahowania całej ilości PQ-C. Fotoredukcję indofenolu przywracają już nieznaczne ilości PQ-A oraz PQ-C, przy czym ilość PQ-C potrzebna do uzyskania maksymalnej fotoredukcji jest dziesięć razy mniejsza niż PQ-A. PQ-B może zastąpić PQ-C. Inne chinony występujące w chloroplastach jak PQ-D, α -tokoferolochinon i witamina K₁ nie przywracają chloroplastom aktywności utraconej przez ekstrakcję. Wyniki te wskazują, że obydwie plastochinony wchodzi w skład głównego łańcucha fotosyntetycznego transportu elektronów. Według autorów plastochinon C zlokalizowany jest za plastochinonem A w miejscu, w którym elektrony z indofenolu wprowadzane są do łańcucha (schemat 3). Do podobnego wniosku doszli Arnon i Crane (1) stosując do ekstrakcji aceton zamiast heptanu.



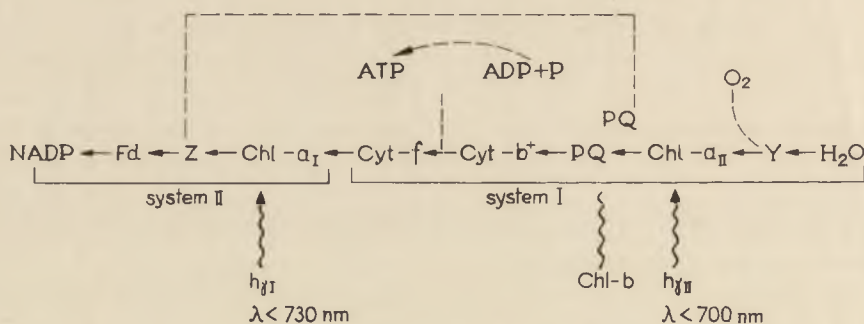
Schemat 3. Lokalizacja plastochinonu A i C w fotosyntetycznym transporcie elektronów

Dane różnych autorów o stopniu uszkodzenia łańcucha oraz rekonstrukcji układu transportującego elektrony w chloroplastach ekstrahowanych rozpuszczalnikami usuwającymi plastochinon są rozbieżne. Można było przypuszczać, że przyczyną tego jest stosowanie różnej procedury ekstrakcji. Ostatnio Wood i wsp. (109) wykazali, że plastochinony odtwierzają tylko pewną część aktywności pierwotnej chloroplastów nigdy nie równą aktywności wyjściowej. W znacznie większym stopniu aktywność pierwotną przywracają naturalne ekstrakty lipidowe, co świadczy, że pełna aktywność chloroplastów uwarunkowana jest obecnością innych substancji poza plastochinonami znajdujących się w ekstrakcie. To tłumaczyłoby wyniki Redfearna i Frienda (82), którzy przez dodanie plastochinonów otrzymywali tylko 40% aktywności pierwotnej. Prawdopodobnie ekstrahowanie chloroplastów usuwa lub rozkłada inne jeszcze czynniki. W lipidowej frakcji chloroplastów znaleziono zredukowaną formę plastochinonu, nie jest to jednak jedyny obecny w ekstrakcie czynnik. Stwierdzono poza tym, że zredukowany plastochinon przywraca w znacznie większym stopniu fotoredukcję niż forma utleniona. Możliwe to tłumaczyć większą zdolnością przenikania formy

zredukowanej do właściwego miejsca w łańcuchu, gdyż ma ona bardziej hydrofilowy charakter niż forma utleniona chinonu.

W badaniach nad funkcją plastochinonu w fotosyntetycznym transporcie elektronów oprócz metody ekstrakcji i rekonstrukcji przez dodanie egzogenego plastochinonu stosowano jeszcze dwie inne metody. Jedna z nich polegała na bezpośrednim pomiarze spektrofotometrycznym szybko zachodzących zmian oksydoredukcyjnych plastochinonu w całych strukturach komórkowych, lub nawet całych komórkach, druga zaś — na pomiarze stanu oksydoredukcyjnego plastochinonu wyekstrahowanego z chloroplastów znajdujących się w różnych stanach metabolicznych.

Plastochinon w chloroplastach ulega redukcji pod wpływem światła a utlenieniu w ciemności (25, 81). R u m b e r g i wsp. (84, 85) oraz W i t t i wsp. (108) zastosowali metodę analizy błyskowej do badania zmian widma poszczególnych składników łańcucha transportu elektronów w całych komórkach *Chlorella* lub izolowanych chloroplastach szpinaku. Zmiany absorpcji plastochinonu rejestrowano przy 254 nm w obecności światła o długości fali krótszej niż 700 nm. Pod wpływem tego światła następują zmiany oksydoredukcyjne plastochinonu co wskazuje na jego lokalizację w II-im systemie przenoszącym elektrony (schemat 4).



Schemat 4. Fotosyntetyczny transport elektronów wg (105)

Fd — ferredoksyna, Z — chemicznie niezidentyfikowany przenośnik elektronów, PQ — plastochinon, Y — chemicznie niezidentyfikowany przenośnik elektronów

Zmianom absorpcji plastochinonu towarzyszy zawsze równoczesna zmiana absorpcji przy 513 nm, którą przypisuje się chlorofilowi b. Obydwa związki zachowują się identycznie w różnych stanach metabolicznych i wykazują taki sam potencjał oksydoredukcyjny, około 0 V (107). Reakcji oksydoredukcyjnych tych związków nie udało się rozdzielić w czasie. Ekstrakcja plastochinonu powoduje zanik widma chlorofilu b, które pojawia się znów po dodaniu egzogenego plastochinonu (104). Ponieważ usunięcie chlorofilu b nie powoduje żadnych zmian w transporcie elektronów ani w zachowaniu się plastochinonu wydaje się, że chlorofil b leży na bocznym torze. W obecności żelazicyjanku lub żelazicyjanku i indofenolu zredukowany plastochinon w chloroplastach jest utleniany po-

nownie, prawdopodobnie przez chlorofil b lub powoli przez tlen. Po dodaniu chlorofenyldwumetylomocznika, który hamuje dopływ elektronów z wody i w obecności układu redukującego: indofenol + askorbinian, dostarczającego elektronów do łańcucha tuż przed pierwszą reakcją świetlną, można zaobserwować wyraźną redukcję chlorofilu b i plastochinonu. Wskazywałoby to na odwrotny transport elektronów w tym układzie.

Udział plastochinonu w fotosyntetycznym procesie transportu elektronów wiąże się z zagadnieniem fosforylacji, która według przyjętego poglądu zachodzi pomiędzy cytochromem b a cytochromem f. Krogman i Olivero (60) wykazali, że po wyekstrahowaniu plastochinonu reakcja fosforylacji cyklicznej nie zachodzi, ale może być odtworzona przez dodanie plastochinonu A lub jego homologów o łańcuchu izoprenowym składającym się z nie mniej niż czterech jednostek izoprenowych. Także Trebst i Pistorius (99) stwierdzili zanikanie fosforylacji cyklicznej wraz z rozkładem plastochinonu wywołanym naświetlaniem.

Nadmiar plastochinonu w chloroplastach w stosunku do innych składników łańcucha tłumaczy chemiosmotyczna teoria fosforylacji Mitchella (74). Według niej przenośnikami protonów mogą być chinony o lipofilowych własnościach, a elektronów — układ cytochromowy. Transport elektronów zachodzi poprzez błonę na nieznany dotychczas akceptor. W wyniku tego transportu następuje akumulacja jonów wodorowych na wewnętrznej powierzchni błony, a jonów hydroksylowych na zewnętrznej. ATP powstaje z ADP i fosforanu nieorganicznego przez odszczepienie wody, której jony wodorowe i hydroksylowe zobojętniają odpowiednie ładunki błony. W procesie tym plastochinon stanowi pulę rezerwową protonów, a jego duży nadmiar w porównaniu z innymi składnikami łańcucha wywołuje wysoki potencjał błony.

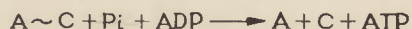
3. Inne benzochinony i ich rola

W roku 1957 Barbieri i Lederer (3) wyodrębnili *p*-benzochinon ze stonogi. Fieser i Ardoa (38) znaleźli jego pochodne w wydzielinie pajęczaków (*Gonyleptine*): dominującym składnikiem jest 2,3-dwumetylobenzochinon, w mniejszych ilościach występują 2,5-dwumetylo- i 2,3,5-trójmetylobenzochinon. Wydzielina ta działa bakteriostatycznie na gramodatnie i gramujemne bakterie oraz na pierwotniaki. Chinony wykazujące *in vitro* bakteriostatyczne własności wyodrębniono także z kielków pszenicy poddanych fermentacji (23). Zidentyfikowano je jako metoksy-*p*-benzochinon oraz 2,6-dwumetoksy-*p*-benzochinon.

Z kielków pszenicy Jong i wsp. (56) wyodrębnili monoglukozyd 2-metoksyhydrochinonu i 2,6-dwumetoksyhydrochinonu. Po hydrolizie te hydrochinony w obecności tlenu łatwo utleniają się do odpowiednich benzochinonów. Podobnie jak i innym glukozydom, autorzy przypisują im rolę czynnika odtruwającego. Związany z glukozą metoksybenzo-

chinon jest fizjologicznie nieczynny. Pod wpływem odpowiednich enzymów glukozydy te mogą ulegać hydrolizie a ich produkty działać jako regulatory procesów metabolicznych. Prawdopodobnie w określonym etapie rozwoju rośliny dominuje jeden z procesów: hydroliza glukozydu lub jego tworzenie.

W wielu tkankach roślin występuje tokoferol (witamina E) (wzór V) i jego forma utleniona, α -tokoferolochinon. W chloroplastach występuje α -tokoferolochinon w znacznych, zaś β - i γ - tylko w śladowych ilościach (16). Obecność tokoferolu stwierdzono także w tkankach zwierzęcych. Nad udziałem tokoferolu w utlenianiu tkankowym i jego przemianą do tokoferolochinonu szeroko dyskutowało wielu badaczy. Początkowo sądzono, że pełni on rolę w procesach utleniania tkankowego, funkcjonując w odwracalnym systemie utleniającym, w którym zachodziłoby kolejno utlenianie do chinonu i cyklizacja do chromanolu. Badania S l a t e r a (91) oraz G r e e n a (45) wskazują jednak, że witamina E nie jest przenośnikiem elektronów, choć nie wykluczają jej udziału w oksydacyjnej fosforylacji. Przypuszcza się, że tokoferolochinon może pełnić rolę czynnika C w proponowanych schematach oksydacyjnej fosforylacji (schemat 5), ponieważ znaczna część tkankowego tokoferolu i tokoferolochinonu znajduje się w mitochondriach.



Schemat 5. Mechanizm oksydacyjnej fosforylacji

Witaminy E przypisuje się także rolę antyutleniacza (44, 17), ponieważ dodanie tokoferolu do homogenatów wątroby zwierząt hodowlanych na diecie bez witaminy E zmniejsza znacznie wytwarzanie aldehydu malonowego. Potwierdzeniem tej hipotezy jest hamowanie przez tokoferol lipidowej peroksydacji (96).

Ponadto sądzono, że witamina E, podobnie jak witamina A, pełni rolę czynnika kontrolującego poziom ubichinonu w tkankach, na co nie uzyskano jednak bezspornych dowodów. Również wpływ tokoferolu na poziom ubichinonu w mitochondriach nie jest dotychczas jednoznacznie określony. U zwierząt tokoferol przekształca się ostatecznie w 2,5,6-trójmetylo-3-farnezylo-farnezylo-geranylo-geranylo-1,4-benzochinon (wzór VI), który według M a r t i u s a i F ü r e r a (72) jest aktywną formą witaminy E.

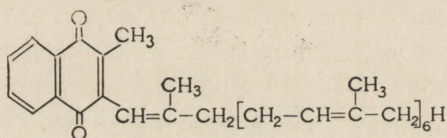
II. Naftochinony

1. Występowanie naftochinonów

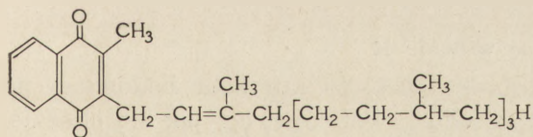
Różnorodność chinonów naftalenowych w przyrodzie jest równie duża jak i chinonów benzenowych, dlatego też omówione będą tylko niektóre z nich.

Najlepiej poznanymi chinonami naftalenowymi i najważniejszymi ze względu na funkcję biologiczną są chinony wykazujące właściwości witaminy K. Związkom tym przypisuje się rolę w procesie krzepnięcia krwi, w reakcjach fotosyntezy i w transporcie elektronów z substratów fizjologicznych na tlen. Występują one zarówno u zwierząt jak i u roślin, pełniąc jednak odrębne funkcje.

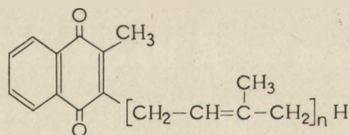
Pierwszym poznanym chinonem należącym do tej rodziny związków jest wyodrębniona z alfalfa (29, 66) witamina K_1 (filochinon, wzór VIII), drugim — witamina K_2 (menachinon MK, wzór IX) otrzymana z gnijącego mięsa ryb (73). Obecnie znamy wiele chinonów należących do tej grupy związków. Dotychczas nie wiadomo, który z tych związków jest najaktywniejszą formą witaminy K. Filochinon występuje głównie w zielonych częściach roślin (28), obecność jego stwierdzono jednak i w etiolowanych roślinach. Według E g g e r a (35) ilość jego jest 60 razy mniejsza niż plastochinonu. Małe stężenia filochinonu oraz liczne związki o podobnych właściwościach, ekstrahujące się razem z nim utrudniają jego identyfikację i ilościowe oznaczanie tak, że wartości podawane przez różnych autorów znacznie się różnią.



VII



VIII



IX

Menachinon występuje głównie u bakterii. Przypisuje mu się rolę pośrednika w transporcie elektronów. Długość łańcucha waha się od 6 do 9 jednostek izoprenowych. Nie udało się dotąd wykryć menachinonu o 10 jednostkach (8). Menachinony o 7 i 6 jednostkach występują w gnijącym mięsie ryb, natomiast u bakterii znaleziono menachinony o 7, 8 i 9 jednostkach, przy czym najczęściej występuje MK-8. Polglase i wsp. (76) donieśli, że *E.coli* hodowane w warunkach tlenowych zawierają głównie ubichinon a tylko niewiele menachinonu, natomiast w warunkach beztlenowych — wyłącznie menachinon w znacznym stężeniu. W komórkach bakteryjnych menachinon podobnie jak ubichinon występuje w ścianie komórkowej i frakcji błon plazmatycznych (57, 78).

Menachinony różnią się głównie stopniem nasycenia łańcucha bocz-

nego. U *M.phlei* znaleziono menachinon, w którym druga jednostka izoprenowa nie ma podwójnego wiązania (2). Podobny chinon wyodrębniono z *Corynebacterium diphtheriae* (88, 90). Menachinon jest jedynym chinonem w tych organizmach. Jest on związany z cząstkami zawierającymi cytochromy i pełni rolę przenośnika w transporcie elektronów (10, 89).

Naftochinony mogą różnić się także podstawnikami w pierścieniu. U *Streptococcus faecalis* znaleziono zdemetylowane formy trzech homologów menachinonu o 9, 8 i 7 jednostkach izoprenowych (5, 33). Zdemetylowane menachinony występują także u *Haemophilus parainfluenze* (64). Ich podstawowa struktura jest podobna do plastochinonu. Łańcuchy izoprenowe zawierają 7, 6 i 5 jednostek izoprenowych. Łańcucha o 5 jednostkach izoprenowych w chinonie dominującym nigdzie indziej dotąd nie znaleziono.

Z *Chlorobium thiosulfatophilum* wyodrębniono chlorobiumchinon nazwany tak przez odkrywców (39), którego charakterystyczną cechą jest niepełna wielokrotność jednostek izoprenowych w łańcuchu bocznym (wzór VII). Innego rodzaju izomerię wykryto w szczepie *Chromatium D* (40) i u glonów *Anecystis* (51): w bocznym łańcuchu izoprenowym znajdują się grupy hydroksylowe, które znacznie zwiększają polarność chinonu.

Obecność witaminy K w tkankach zwierzęcych wykazali Martius i Esser (71, 70). Po podaniu w pokarmie 2-metylo-1,4-naftochinonu znakowanego ^{14}C w grupie metylowej radioaktywność odnajdowano w pochodnej witaminy K_2 , co wskazywałoby na obecność układu enzymatycznego zdolnego do zamiany niespecyficznego dla danego organizmu chinonu w formę specyficzną.

2. Rola witamin K

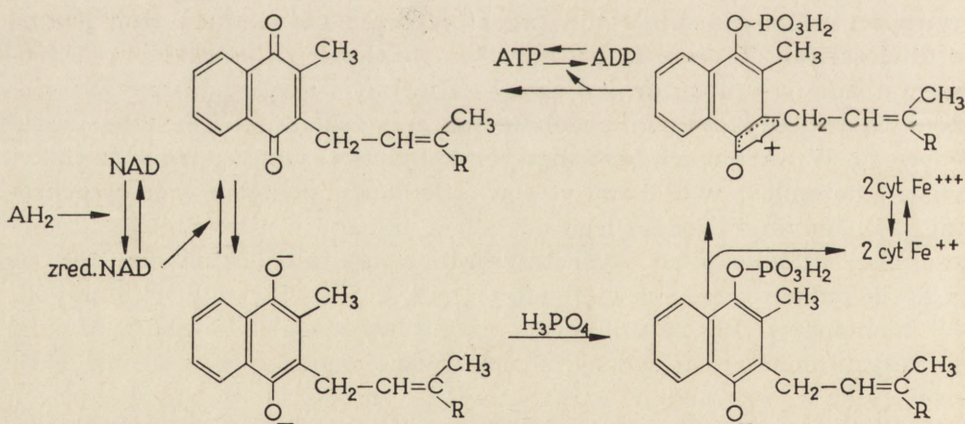
W 1929 roku Dam (27) zaobserwował, że kurczęta hodowane na diecie beztłuszczowej mają skłonność do krwotoków, co, jak się okazało, było związane z brakiem czynnika rozpuszczalnego w tłuszczach, nazwanego witaminą K. Przypuszczenie, że witamina K jest koenzymem enzymów katalizujących wytwarzanie czynników białkowych biorących udział w procesie krzepnięcia krwi nie znalazło poparcia doświadczalnego.

Występowanie witaminy K w organizmach przynależących do różnych typów filogenetycznych i w różnych tkankach świadczyło o jej udziale w jakichś ogólnych procesach. Ze względu na łatwość utleniania się i redukcji przypisywano jej rolę koenzymu w transporcie elektronów i fosforylacji oksydacyjnej (69, 102, 103) o czym świadczyłyby występowanie witaminy K głównie w mitochondriach. Małe stężenie witaminy K uniemożliwia jednak oznaczenie zmian oksydoredukcyjnych. Pośrednim dowodem jej udziału w procesach utleniania jest występowanie w wątrobie wołu reduktazy witaminy K, wyodrębnionej przez Marki i Martiusa (67). Znajduje się ona głównie we frakcji cytoplazma-

tycznej. Jednak około 10% aktywności związanej jest z mitochondriami (68). Grupą prostetyczną tego enzymu jest FAD, substratami — NAD i NADP, a akceptorami chinony. O udziale witaminy K w procesach utleniania komórkowego świadczy także rozkojarzanie oksydacyjnej fosforylacji przez dwukumarol, czynnik działający antagonistycznie do witaminy K. *Martius* uważał, że dwukumarol przerywa tylko transport elektronów pomiędzy NAD i cytochromem c, jednak *Cooper* i *Lehninger* (23) wykazali, że hamuje on także fosforylację związaną z utlenianiem zredukowanego cytochromu c i że obie fosforylacje są jednakowo wrażliwe na ten czynnik, co wskazywałoby, że witamina K nie może być przenośnikiem elektronów a jedynie czynnikiem wiążącym procesy utleniania z fosforylacją.

Najlepiej poznano rolę witaminy K u *M. phlei*, które zawierają tylko ten jeden składnik chinonowy, co upraszcza znacznie badania. Naturalny chinon tych bakterii, [(MK-9 (H))] różni się od witaminy K₂ tym, że jedna jednostka izoprenowa jest uwodorowana (75, 41). Z badań na układach izolowanych wynika, że utlenianie substratów i oksydacyjna fosforylacja zachodzą wyłącznie w obecności obu frakcji: cząstek i rozpuszczalnej (8a), w tej ostatniej bowiem występują enzymy katalizujące fosforylację. Natomiast cząstki *M. phlei* zawierają szereg dehydrogenaz, związany NAD⁺, flawoproteidy, MK-9(H) i cytochromy b, c i a (87). Udział menachinonu w reakcjach utleniania ustalono na podstawie pomiarów zmian oksydoredukcyjnych endogennego chinonu oraz zmian aktywności utleniania substratów przez preparaty naświetlane promieniami o długości fali 360 nm, co prowadzi do rozkładu witaminy K bez naruszenia badanych struktur. Związany naftochinon ulega cyklicznym zmianom oksydoredukcyjnym podobnie jak inne składniki łańcucha oddechowego. W warunkach beztlenowych znajduje się on w formie zredukowanej, natomiast w tlenowych — w utlenionej, podobnie jak cytochromy (14). Innym dowodem jego udziału w procesach utleniania jest zanik zdolności utleniania po wyekstrahowaniu naturalnego chinonu lub po jego degradacji przez naświetlanie (11, 12, 86). Po dodaniu witaminy K, jej homologów lub naturalnego chinonu wyekstrahowanego z *M. phlei* procesy utleniania i oksydacyjnej fosforylacji mogą znów zachodzić jednak tylko w przypadku substratów dehydrogenaz współdziałających z NAD. Układ taki wykazuje, podobnie do natywnego, wrażliwość na inhibitory łańcucha oddechowego. Natomiast zdolności utleniania bursztynianu przez cząstki nie przywraca dodanie witaminy K, niezależnie od procedury stosowanej do usunięcia natywnej formy chinonu (15). Odzyskanie zdolności utleniania bursztynianu następuje dopiero po dodaniu do naświetlanych cząstek nienaświetlanej frakcji supernatantowej. Być może, rozkładowi ulega nie tylko witamina K, ale jeszcze inny czynnik niezbędny do utleniania bursztynianu. Częściowo oczyszczony czynnik wrażliwy na światło jest prawdopodobnie białkiem (61).

Wiele naftochinonów może odtwarzać transport elektronów, natomiast związaną z transportem elektronów fosforylację przywracają jedynie witamina K₁ i jej homologi posiadające grupę metylową w pozycji 2 pierścienia oraz nienasycony łańcuch co najmniej pięciowęglowy w pozycji 3 pierścienia. W odtworzonym układzie transport elektronów zachodzi na drodze omijającej część składników głównego łańcucha oddechowego lub przez bezpośrednie przenoszenie na tlen (20, 21, 36). W organizmach zwierzęcych obecne są dwie formy chinonów: *cis* i *trans* (49). Przejście formy *trans* w formę *cis* wymaga warunków oksydacyjnej fosforylacji. Zamiana odwrotna natomiast jest prawdopodobnie niezależna od tego procesu. Choć rola naftochinonów w fosforylacji nie jest w pełni udowodniona, wiele faktów świadczy o ich udziale w tym procesie: 1. cząstki z komórek bakteryjnych poddane naświetlaniu, wskutek czego w bardzo krótkim czasie przestają fosforylować, choć nadal utleniają, odzyskują zdolność do fosforylacji po dodaniu witaminy K₁ (12), 2. pewne analogi witaminy K są kompetycyjnymi inhibitorami oksydatywnej fosforylacji i działają jako czynniki rozkojarzające, 3. ATP powstaje w czasie utleniania fosforanu zredukowanego menadionu w obecności systemu bakteryjnego (13). Brodie i Ballantine (12) podają nawet mechanizm fosforylacji, w której udział bierze ufosforylowana forma naftochinonu (schemat 6). Jednak dotychczasowe badania nie dostarczyły wystarczających dowodów na poparcie tej hipotezy.



Schemat 6. Mechanizm fosforylacji naftochinonów wg (13)

LITERATURA

1. Arnon D. L., Crane F. L., Biochemistry of Quionones, red. Morton R. A., Academic Press, Londyn i New York 1965 str. 433.
2. Azered R., Cyrot M. O., Lederer E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 249, (1967).

- 2a. Bantley J. W., Whyborn A. G., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 163 (1963).
3. Barbier M., Lederer E., *Biochimie* **22**, 236 (1957).
4. Barr R., Magree L., Crane F. L., *Am. J. Botany* **54**, 365 (1967).
5. Baum R. H., Dolin M. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 3425 (1965).
6. Bishop N. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **45**, 169 (1959).
7. Bishop N. J., Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, red. Wolstenholme G., E. W. i O'Connor C. M., J. A. Churchill LTD. Londyn 1961.
8. Bishop D. H. L., King H. K., *Biochem. J.* **85**, 550 (1962).
- 8a. Brodie A. F., *J. Biol. Chem.* **234**, 398 (1959).
9. Brodie A. F., *Federation Proc.* **20**, 995 (1961).
10. Brodie A. F., Biochemistry of Quinones red. Morton' R. A., Academic Press, Londyn i New York 1965 str. 355.
11. Brodie A. F., Ballantine J., *J. Biol. Chem.* **235**, 226 (1960).
12. Brodie A. F., Ballantine J., *J. Biol. Chem.* **235**, 232 (1960).
13. Brodie A. F., Davis P., *Federation Proc.* **18**, 198 (1959).
14. Brodie A. F., Russel P. J., V International Congress of Biochemistry Plenary Lecture. Reprint No 89, Moscow 1963.
15. Brodie A. F., Watanabe T., Vitamins and Hormones, red. Harris R. S., Wool I. G., Loraine J. A., Academic Press, New York i Londyn, 1966, tom 24, str. 447.
16. Bucke C., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 19 (1966).
17. Bunyan J., McHale D., Green J., *Brit. J. Nutr.* **17**, 391 (1963).
18. Chance B., Biochemistry of Quinones, red. Morton R. A., Academic Press Londyn i New York 1965 str. 327.
19. Chance B., Boeri E., wg Quinones in Electron Transport, Wolstenholme G. E. W. i O'Connor C. M., J. A., Churchill LTD. Londyn 1965 str. 130.
20. Colpa-Boonstra J. P., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 222 (1957).
21. Colpa-Boonstra J. P., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 122 (1958).
22. Cooper C., Lehinger A. L., *J. Biol. Chem.* **219**, 519 (1956).
23. Cosgrove D. J., Daniels D. H., Green E. N., Hutchinson J. B., Moran T., Whitehead J. K., *Nature* **169**, 966 (1952).
24. Crane F. L., Biochemistry of Quinones R. A. Morton, Academic Press, Londyn i New York 1965, str. 183.
25. Crane F. L., Ehrlich D., Kegel L. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 37 (1960).
26. Crane F. L., Widmer C., Lester R. L., Hatefi Y., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 476 (1959).
27. Dam H., *Biochem. Z.* **215**, 475 (1929).
28. Dam H., *Advan. Enzymol.* **2**, 285 (1942).
29. Dam H., Geiger A., Gloved J., Karrer P., Karrer W., Rotschild E., Salomon H., *Helv. Chim. Acta* **22**, 310 (1939).
30. Das B. C., Lounasmaa M., Tendille C., Lederer E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 318 (1965).
31. Dans B. C., Lounasmaa M., Tendille C., Lederer E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 211 (1967).
32. Diplock A. T., Haslewood G. A. D., *Biochem. J.* **104**, 1004 (1967).
33. Dolin M. J., Baum R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 202 (1965).
34. Daves G. D., Muraca R. F., Whittick J. S., Friis P., Folker K., *Biochemistry* **6**, 2861 (1967).
35. Egger K., *Planta* **64**, 41 (1965).

36. Ernster L., Biological Structure and Function, red. Goodwin W., i Lindberg O., Academic Press, 1961, t. II, str. 138.
37. Ernster L., *J. Cell. Biol.* **15**, 541 (1962).
38. Fieser L. E., Ardoe M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 774 (1956).
39. Frydman B., Rapoport H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 823 (1963).
40. Fuller R. C., Smilie R. M., Rigopoulos N., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 197 (1961).
41. Gale P. H., Arison B. H., Trenner N. R., Page A. C., Jr. Folkers K., *Biochemistry* **2**, 200 (1963).
42. Green D. E., Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, Wolstenholme G. E. W. i O'Connor C. M., Churchill J. A., LDT Londyn, 1961, str. 130.
43. Green D. E., Wharton D. C., *Biochem. Z.* **336**, 474 (1963).
44. Green D. E., Diplock A. T., Bunyan J., Edwin E. E., McHale D., *Nature* **190**, 318 (1961).
45. Green J., *Proc. Natur. Soc.* **21**, 196 (1962).
46. Greenwood A. D., Leech R. M., Williams J. P., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 148 (1963).
47. Griffiths W. T., Wallwork J. C., Pennock J. F., *Nature* **211**, 1037 (1966).
48. Goldberger R., Green D. E., The Enzymes, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., Academic Press, New York, 1963 t. VIII, str. 91.
49. Gutnick P. J., Dumphly J., Sakamoto H., Phillips P. G., Brodie A. F., *Science* **158**, 1469 (1967).
50. Hatefi Y., Lester R. L., Crane F. L., Widmer C., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 490 (1959).
51. Henninger M. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 233 (1965).
52. Henninger M. D., Crane F. L., *Biochemistry* **2**, 1168 (1963).
53. Henninger M. D., Crane F. L., *J. Biol. Chem.* **241**, 5190 (1966).
54. Jayaraman J., Ramasarma T., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 258 (1963).
55. Jeffries L. R., Cawthorne M. A., Harris M., Diplock A. T., Green J., Price S. A., *Nature* **215**, 257 (1967).
56. Jonga H. L. B., de Klaar W. J., Vliegthart J. A., *Nature* **172**, 402 (1953).
57. Kashkeet E. R., Brodie A. F., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 52 (1963).
58. Kofler M., Lengeman A., Ruegg R., Clopart-ditJean L. H., Rarond A., Isler O., *Helv. Chim. Acta* **42**, 1283 (1959).
59. Kroger A., Klingenberg M., *Biochem. Z.* **344**, 21 (1966).
60. Krogmann D. W., Olivero E., *J. Biol. Chem.* **237**, 3292 (1962).
61. Kurup C. K. R., Brodie A. F., *J. Biol. Chem.* **241**, 4016 (1966).
62. Lester R. L., Fleischer S., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 470 (1959).
63. Lester R. L., Fleischer S., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 358 (1961).
64. Lester R. L., White D. C., Smith S. L., *Biochemistry* **3**, 949 (1964).
65. Lynch V. H., French C. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 382 (1957).
66. MacCorquodale D. W., Thayer S. A., Doisy E. A., Binkley S. B., *J. Biol. Chem.* **131**, 357 (1939).
67. Marki F., Martius C., *Biochem. Z.* **333**, 111 (1960).
68. Marki F., Martius C., *Biochem. Z.* **334**, 293 (1961).
69. Martius C., *Angew. Chem.* **67**, 161 (1955).
70. Martius C., Esser H. O., *Biochem. Z.* **331**, 1 (1958).
71. Martius C., *Am. J. Clin. Nutr.* **9**, 97 (1961).
72. Martius C., Fürer E., *Biochem. Z.* **316**, 474 (1963).

73. McKee R. W., Binkley S. B., *J. Biol. Chem.* **131**, 327 (1939).
74. Mitchell P., *Biochem. Soc. Symp.* (Cambridge, England) **22**, 142 (1962).
75. Noll H., *J. Biol. Chem.* **235**, 2207 (1960).
76. Polglase W. T., Pun W. T., Wihaar J., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 425 (1966).
77. Rajagopalan K. V., Fridovich I., Hand-Ler P., *J. Biol. Chem.* **237**, 922 (1962).
78. Rebel G., Sensebrenner M., Mandel P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **46**, 1113 (1964).
79. Redfearn E. R., *Biochemistry of Quinones*, red. Morton R. A. Academic Press, Londyn i New York, 1965, str. 149.
80. Redfearn E. R., Burgos J., *Nature* **209**, 711 (1966).
81. Redfearn E. R., Friend J., *Nature* **191**, 806 (1962).
82. Redfearn E. R., Friend J., *Biochem. J.* **84**, 34P (1962).
83. Redfearn E. R., Pumphrey A. M., *Biochem. J.* **76**, 64 (1960).
84. Rumberg B., Smidt-Mende P., Witt H. T., Skerra B., Vater J., Weikard J., *Z. Naturforsch. sect. B*, **20**, 1086 (1965).
85. Rumberg B., Smidt-Mende P., Siggel U., Skerra B., Witt H. T., *Z. Naturforsch. sect. B*, **20**, 1102 (1965).
86. Russel P. J., Brodie A. F., Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, red. Wolstenholme G. E. W. i O'Connor J. A., Churchill L. D. T., Londyn, 1961, str. 205.
87. Schils D. J. J., Hovenkamp H. G., Colpa-Boonstera J. P., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 129 (1960).
88. Scholes P. B., King H. K., *Biochem. J.* **91**, 9P (1964).
89. Scholes P. B., King H. K., *Biochem. J.* **97**, 754 (1965).
90. Scholes P. B., King H. K., *Biochem. J.* **97**, 766 (1965).
91. Slater E. C., VI-th International Congress of Biochemistry New York, Academic Press, Londyn, 1958, str. 316.
92. Szarkowska L., *Post. Biochem.* **6**, 323 (1960).
93. Szarkowska L., *Post. Biochem.* **10**, 77 (1964).
94. Szarkowska L., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 519 (1966).
95. Szarkowska L., Klingenberg M., *Biochem. Z.* **338**, 674 (1963).
96. Tappel A. L., Zolkin H., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 333 (1959).
97. Trebst A., *Proc. Roy. Soc. B* **157**, 355 (1963).
98. Trebst A., Eck H., Wagner S., *Natl. Acad. Sci. Natl. Res. Council Publ.* **1145**, 174 (1963).
99. Trebst A., Pistorius E. Z., *Naturforsch. sect. B* **20**, 885, (1965).
100. Trenner N. R., Arison B. H., Ericson R. E., Shunk C. H., Wolfe D. E., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2026 (1959).
101. Vernon L. P., *Plant Physiol.* **15**, 73 (1964).
102. Vosileit W. D., Nason A., *J. Biol. Chem.* **208**, 785 (1954).
103. Weber K., Brodie A. T., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 447 (1957).
104. Weikard J., Muller A., Witt H. T., *Z. Naturforsch. sect. B* **18**, 139 (1963).
105. Whittle K. J., Dumphy P. J., Pennock J. F., *Biochem. J.* **96**, 17C (1965).
106. Widmer C., Crane F. L., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 203 (1958).
107. Witt H. T., Müller A. Z., *Phys. Chem. N. F.* **21**, 1 (1959).
108. Witt H. T., Rumberg B., Schmidt-Mende P., Siggel U., Skerra B., Vater J., Weckard J., *Angew. Chemie* **19**, 321 (1965).
109. Wood P. M., Bhagavan H. N., Crane F. L., *Plant. Physiol.* **41**, 633 (1966).

MARIA ERECIŃSKA*, TADEUSZ CHOJNACKI**

Biosynteza i funkcje fosfolipidów bakteryjnych

The Biosynthesis and Functions of Microbial Phospholipids

The pathways of the biosynthesis of phospholipids in bacteria are reviewed and compared with those in higher animals. The phospholipid composition in bacterial cells is discussed with relation to the metabolic function of the cell and the structure of cell membrane.

Funkcjonowanie komórki żywej wymaga dużej specyficzności i zdolności do adaptacji powierzchni ograniczających czyli tzw. błon. Stabilność błon jest wynikiem działania sił wiążących lipidy z lipidami i lipidy z białkami, a w jej utrzymaniu biorą udział zarówno polarne jak i hydrofobowe obszary cząsteczek lipidu. Szczegółowa znajomość zestawu chemicznego składników lipidowych może zatem dać stosunkowo jasny obraz molekularnej architektury danej błony. Lipidy błon nie są całkowicie nieczynnymi składnikami strukturalnymi błon, ulegają one zarówno procesowi aktywnej wymiany z otoczeniem, jak i delikatnym przemianom metabolicznym, co nadaje błonie dynamiczny charakter (49). Badania szkoły Greena (34, 52, 53, 91) zwróciły uwagę na znaczenie funkcji lipidów w reakcjach łańcucha oddechowego mitochondriów zwierzęcych, a ostatnio wiele danych wskazuje, że i lipidy bakteryjne mogą odgrywać czynną rolę w przemianach komórki. Bakterie są szczególnie dogodnym obiektem badań nad zależnością między własnościami błon a strukturą chemiczną i funkcją lipidów. Lipidy bakteryjne, odznaczające się ogromną różnorodnością budowy zawarte są głównie w błonach, natomiast w cytoplazmie jest ich niewiele (39, 68, 69, 83, 96, 107, 118, 136, 137, 138, 142, 146), przy czym skład lipidowy błony bakterii może się zmieniać pod wpływem zmiany warunków otoczenia (110, 122). Bakterie gramodatnie charakteryzują się obecnością ściśle ograniczonej ściany, pod którą znajduje się cienka błona protoplazmatyczna. Lipidy stanowią tylko około 2% masy tych bakterii, przy czym charakteryzują

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

** Doc. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki Polska Akademia Nauk, Warszawa
Wykaz stosowanych skrótów: ACP — białkowy nośnik reszt acylowych

się one obecnością kompleksu lipopolisacharydowego, zawierającego aminokwasy i aminocukry (111).

U gramujemnych bakterii nie można wyróżnić ściśle odgraniczonych błon, a warstwa otaczająca komórkę (ang. *cell envelope*) zawiera większość składników zarówno ściany jak i błony protoplazmatycznej bakterii gramodatnich (93). Błony bakterii gramujemnych zawierają od 20—30% lipidów w przeliczeniu na suchą masę, ponadto białko i czasami węglowodany (39, 146). Lipidy często występują w postaci kompleksów lipoproteidowych i lipopolisacharydowych.

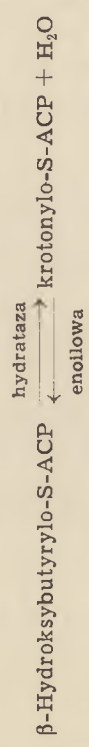
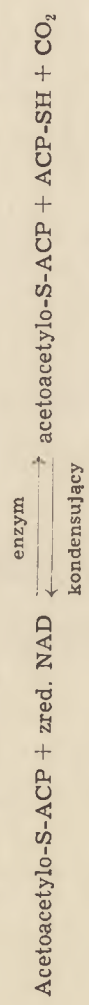
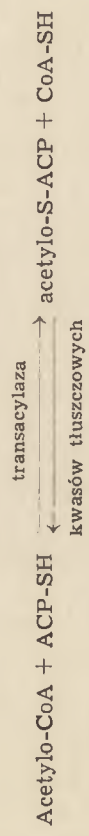
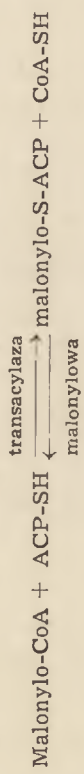
Odkrycie lizozymu umożliwiło wyodrębnienie czystych błon bakteryjnych i dokładne zbadanie ich składu. Błona *S. faecalis* (142) skupia 94% lipidów komórki, chociaż stanowi ona tylko 9% jej suchej masy. Pozostałe 6% lipidów znajduje się w cytoplazmie, natomiast ściana bakteryjna nie zawiera ich w ogóle. Podobnie w błonie *M. lysodeikticus* stanowiącej 86% suchej masy komórki zawarta jest niemal cała ilość lipidów komórki (39, 96, 97).

Lipidy bakteryjne składają się głównie z fosfolipidów, chociaż niekiedy lipidy obojętne mogą stanowić ich główną część (106).

Odrębność lipidów bakteryjnych od lipidów organizmów wyższych polega na braku steroli i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (10); charakteryzuje je natomiast obecność kwasów tłuszczowych o rozgałęzionych łańcuchach, hydroksykwasów i glikolipidów (32, 137, 138).

I. Biosynteza kwasów tłuszczowych

U bakterii spotykamy 4 klasy kwasów tłuszczowych: nasycone, nienasycone, o rozgałęzionym łańcuchu i cyklopropanowe. Wolne kwasy tłuszczowe stanowią bardzo niewielki procent materiału lipidowego komórki, mniej niż 10% u *E. coli* i *Azotobacter agilis* (75), a 2% u *Sarcina lutea* (67). Na ogół występują kwasy tłuszczowe o 14—18 atomach węgla, przy czym badania wskazują na dość wyraźną różnicę składu kwasów tłuszczowych bakterii gramodatnich i gramujemnych. Wszystkie dotąd zbadane gramodatnie mikroorganizmy zawierają kwasy tłuszczowe o rozgałęzionym łańcuchu. Według MacFarlane (96) 80% kwasów tłuszczowych *M. lysodeikticus* stanowią rozgałęzione kwasy tłuszczowe o długości łańcucha C₁₅. Obecność nasyconego kwasu tłuszczowego o C₁₅ i rozgałęzionym łańcuchu stwierdzono u *Sarcina lutea* (5) oraz u *B. subtilis* (100, 121). Bakterie gramujemne nie zawierają kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu, natomiast cechuje je obecność nasyconych, nienasyconych oraz cyklopropanowych kwasów tłuszczowych. Jedyńm wyjątkiem jest gramodatni *Lactobacillus*, który zawiera typowe dla gramujemnych mikroorganizmów cyklopropanowe kwasy tłuszczowe (58, 59).



Schemat 1. Synteza kwasów tłuszczowych u *E. coli* wg Majerusa i wsp. (102)

ACP — białkowy nośnik reszt acylowych

1. Nasycone kwasy tłuszczowe

Ustalenie, że malonylo-CoA i pochodne S-acylowe (94, 95, 143) są pośrednimi związkami w syntezie kwasów tłuszczowych o długim łańcuchu skierowało badania nad biosyntezą kwasów tłuszczowych na nowe tory. W roku 1960 zauważono (139), że częściowo oczyszczone ekstrakty *Cl. kluyveri* katalizują reakcję kondensacji między malonylo-CoA i HCO_3^- . L e n n a r z i wsp. (88) opisali rozpuszczalny system z *E. coli* katalizujący kondensację acetylo-CoA i malonylo-CoA. Enzym ten katalizuje ponadto odwodnienie β -hydroksyacylo-CoA do β, γ - lub α, β -enoilowych pochodnych. Dalsze badania doprowadziły do wykrycia w ekstraktach *Cl. kluyveri* (7) i *E. coli* (47, 48, 88, 144) białkowego nośnika reszt acylowych (ang. *acyl carrier protein* — ACP). Białko to jest trwałe w 0,1 N HCl w temperaturze pokojowej oraz we wrzącej wodzie. Oczyszczone ACP okazało się homogennym białkiem o ciężarze cząsteczkowym około 10 000 (102). Jego grupą prostetyczną jest 4-fosfopanteteina (103) połączona z białkiem wiązaniem dwuścirowym poprzez hydroksylową grupę seryny. Obecność merkaptoetanolaminy w grupie prostetycznej sprawia, że ACP wykazuje wolną grupę -SH.

Wyodrębnienie butyrylo-S-ACP (46) oraz innych pochodnych (6) potwierdziło hipotezę, że wszystkie reakcje wydłużania czy skracania łańcucha kwasu tłuszczowego zachodzą gdy jest on związany wiązaniem acylowym z ACP; białko to pełni zatem raczej rolę koenzymu, a nie enzymu w syntezie kwasów tłuszczowych. Układ syntetazy kwasów tłuszczowych z *E. coli* rozdzielono na frakcje, które katalizowały kolejne etapy syntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (102). Ostatnio zaś wykazano (101), że miejsce reakcji ACP z reduktazą β -ketoacylową różni się od aktywnego miejsca jego grupy prostetycznej (schemat 1).

2. Nienasycone kwasy tłuszczowe

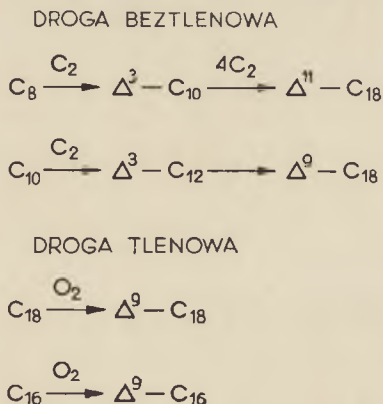
Bakterie cechuje obecność kwasów tłuszczowych nienasyconych o jednym podwójnym wiązaniu, natomiast nie zawierają one i nie potrafią syntetyzować wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (127). U drożdży i w tkankach zwierzęcych nienasycone kwasy tłuszczowe powstają z nasyconych homologów w obecności tlenu (14, 15). Podobnie *Myc. phlei* (37, 38, 90) przekształca w warunkach tlenowych stearynian w oleinian i 10-metylostearynian. Oleinian może ulegać również przekształceniu w 10-metylostearynian z udziałem metioniny jako źródła fragmentu jednowęglowego. Natomiast *Cl. butyricum* i cały rodzaj *Lactobacillus* syntetyzują nienasycone kwasy tłuszczowe w nieobecności tlenu (41, 44) z prekursorów o 8 i 10 atomach węgla, zaś z kwasów o dłuższym łańcuchu powstają wyłącznie wyższe homologu nasycone (33, 44, 102, 123, 144). Sugeruje to istnienie odrębnej drogi syntezy długołańcuchowych kwasów nienasyconych. Według S c h e u e r b r a n d t a i wsp. (123) jeden z β -hy-

droksykwasów będący pośrednikiem w syntezie nasyconych kwasów tłuszczowych ulega β , γ -dehydratacji, a łańcuch powstałego w ten sposób nienasyconego kwasu tłuszczowego wydłuża się następnie przez kolejne przyłączanie fragmentów dwuwęglowych. W ten sposób w miarę wydłużania łańcucha zwiększa się odległość podwójnego wiązania od grupy karboksylowej.

Z *E. coli* wyodrębniono kompleks (109), który katalizuje nie tylko syntezę kwasów tłuszczowych z acetylo-CoA i malonylo-CoA ale i dehydratację hydroksydecenoilo-CoA prowadzącą do β , γ - i α , β -decenoilo-CoA (19). Syntetaza kwasów tłuszczowych *E. coli* wydłuża α , β - C_{10} ACP do nasyconych kwasów tłuszczowych, a β , γ - C_{10} ACP i β (-OH) C_{10} ACP — do mieszaniny nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Pugh i wsp. (117) wyosobnili z tego układu trzy czynne frakcje, E_{II} , E_{III} i E_{IV} i okazało się, że frakcja E_{III} bierze udział w syntezie nasyconych kwasów tłuszczowych z β -hydroksyacylo-ACP (135). Ze związków tych powstają albo ich nasycone homologi (podczas inkubacji z E_{III} i zređ. NADP) albo kwas palmitynowy (podczas inkubacji z E_{III} , zređ. NADP, malonylo-CoA i E_{II}). Frakcja E_{IV} katalizowała zaś przemianę β -hydroksydecenoilo-CoA głównie do nienasyconego kwasu *cis*-wakcenenowego. Ostatnio Bloch i wsp. (13) wyosobnili z ekstraktów *E. coli* niemal homogenne białko o ciężarze cząsteczkowym 28 000, katalizujące wzajemne przekształcanie tioestrów β -hydroksydecenianu, β , γ -decenianu i α , β -decenianu. Enzym wykazywał wysoką specyficzność w stosunku do kwasów tłuszczowych, zależną od długości łańcucha węglowego (działał na kwasy tłuszczowe o C_{10}) i mniejszą specyficzność zależnie od obecności wiązania tioestrowego. Ponadto odznaczał się termostabilnością i niewrażliwością na działanie czynników blokujących grupy -SH.

Bakterie mogą zatem syntetyzować jednonienasycone kwasy tłuszczowe w dwojaki sposób (schemat 2):

1. drogą tlenową przez desaturację acylowych estrów długołańcuchowych



Schemat 2. Drogi syntezy kwasów tłuszczowych o jednym podwójnym wiązaniu wg Erwina i Blocha (33)

kwasów tłuszczowych; enzymy katalizujące tę reakcję związane są z nierozpuszczalnymi frakcjami komórek uzyskiwanymi drogą wirowania (ang. *particulate fraction*)

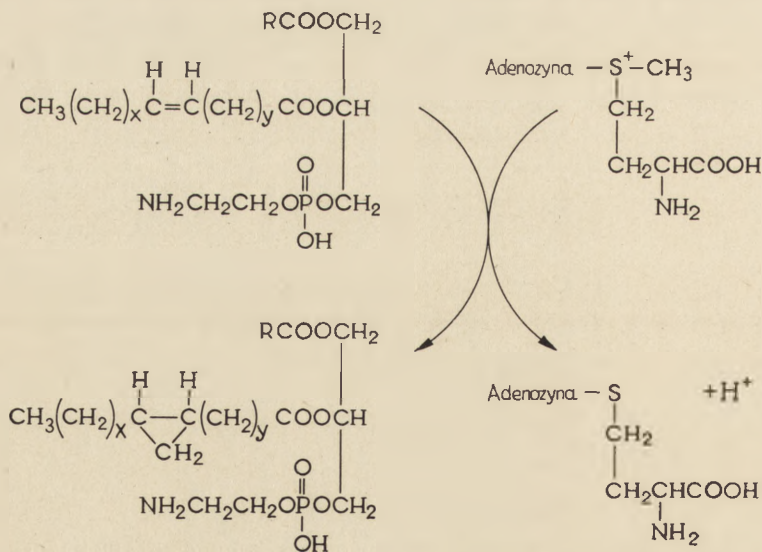
2. drogą beztlenową przez dehydratację hydroksykwasów o średniej długości łańcucha; reakcję tę katalizują enzymy wchodzące w skład rozpuszczalnej syntetazy kwasów tłuszczowych.

3. Kwasy tłuszczowe o rozgałęzionym łańcuchu

Podobieństwo budowy kwasów tłuszczowych i aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach nasunęło myśl wspólnoty dróg ich biosyntezy. Lennarz (86) zauważył, że *Micrococcus lysodeikticus* rosnący w obecności ^{14}C -izoleucyny włączał około 10% dodanego izotopu do kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu, przy czym włączanie odbywało się bez uprzedniego rozkładu do fragmentów dwuwęglowych. Następnie wykazano, że i inne, znakowane związki rozgałęzione: izowalerianian, izomaślan, leucyna i walina ulegały u różnych typów bakterii włączeniu do kwasów tłuszczowych o rozgałęzionych łańcuchach złożonych z 14, 15 i 16 atomów węgla (8, 71, 145). Udział aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu w syntezie kwasów tłuszczowych o tym samym charakterze można obecnie uznać za udowodniony. Dodać należy, że zarówno malonylo-CoA jak i związane z CoA estry o rozgałęzionym łańcuchu biorą udział w syntezie rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (62).

4. Cyklopropanowe kwasy tłuszczowe

Odkrycie kwasów tłuszczowych zawierających pierścień cyklopropanowy zawdzięczamy badaniom Liu i Hoffmanna (92). Cyklopropano-



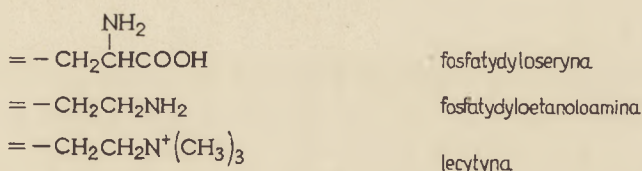
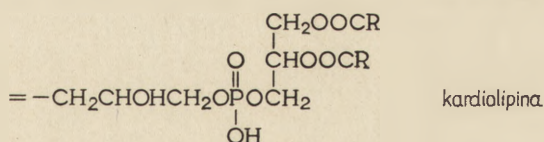
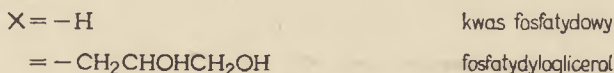
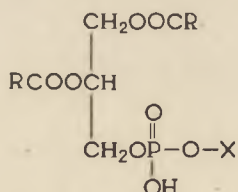
Schemat 3. Biosynteza cyklopropanowych kwasów tłuszczowych

nowe ugrupowanie kwasów tłuszczowych znajduje się na ogół w pozycji β (57), chociaż u *Cl. butyricum* 66% tych kwasów zawiera to ugrupowanie w pozycji γ. „Most metylenowy” pochodzi od donatorów jednowęglowych elementów (92). Ekstrakty *Serratia marcescens* i *Cl. butyricum* inkubowane z S-adenozylometioniną znakowaną w grupie metylowej syntetyzują znakowane kwasy cyklopropanowe (85, 147) w obecności fosfolipidu zawierającego nienasycony kwas tłuszczowy. Kwasy cyklopropanowe powstają z jednego z acylowych łańcuchów fosfatydyloetanolaminy (schemat 3).

Chung i Law (26, 27) oczyszili syntetazę kwasów cyklopropanowych. Wydałym substratem są dla niej nieoczyszczone fosfolipidy w stanie micellarnym, natomiast właściwy substrat, fosfatydyloetanolamina, reaguje wolno i dopiero dodanie anionowego detergentu zwiększa szybkość reakcji.

II. Biosynteza fosfolipidów

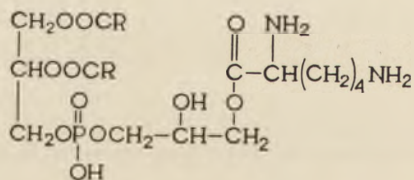
Fosfolipidy stanowią 70—90% lipidów bakteryjnych. Dane o ich występowaniu u poszczególnych gatunków bakterii zebrał Kates (78). Głównymi fosfolipidami bakteryjnymi są fosfatydyloglicerol, fosfatydyloetanolamina, kardiolipina i u niektórych gatunków aminoacylowe estry fosfatydyloglicerolu (2, 3, 4, 20, 63, 72, 79, 80, 98, 130, 133) (wzór I).



I

Fosfatydyloglicerol występuje u większości bakterii, a u niektórych gatunków stanowi do 70% fosfolipidów (70, 97), natomiast fosfatydylocholinę (lecytyna) wyodrębniono tylko z kilku gatunków: *Agrobacterium* (74), *Hyphomicrobium*, *Nitrosocystis oceanus* i *Rhodopseudomonas spheroides* (54). *Cl. butyricum* cechuje obecność fosfatydów N-metyloetanolaminowych i plazmalogenów (11). Interesującym fosfolipidem jest otrzymany ze ściany *Halobacterium cutirubrum* dwueterowy analog fosfatydyloglicerolu (84).

W roku 1962 MacFarlane opisała u *Cl. welchii* i *S. aureus* nową grupę pochodnych fosfatydyloglicerolu (98) mianowicie O-acylo pochodne, w skład których wchodzi lizyna i alanina (99). Obecność O-lizylo-, O-alanylo- i O-glicylo-fosfatydyloglicerolu stwierdzono u *S. faecalis*, przy czym zawartość estrów aminoacylowych rośnie ze wzrostem kultury bakteryjnej (140, 141). Badania van Deenena i wsp. (55, 56, 65, 87) rzuciły nieco światła na występowanie i chemiczne własności tych związków. Czysty lizylofosfatydyloglicerol wyodrębniony z *S. aureus* poddano procesom degradacyjnym (65) i ustalono, że wiązanie estrowe między lizyną a glicerolem w tym związku jest bardziej labilne (inkubacja w pH 9 powodowała rozkład do lizyny i fosfatydyloglicerolu), lizyna ma konfigurację L, glicerol związany z lizyną — konfigurację D, natomiast glicerol pierwotnie połączony z acylowymi resztami kwasów tłuszczowych — konfigurację L. Identyczną konfigurację cząsteczek glicerolu stwierdzono w fosfatydyloglicerolu wyodrębnionym ze *S. aureus* (55, 56). Dalsze dane o budowie lizylofosfatydyloglicerolu uzyskano badając reakcję enzymatycznej transacylacji, wysoce specyficzną w stosunku do fosfatydyloglicerolu (87). Z wielu syntetycznych analogów jedynie 2'-dezyksyfosfatydyloglicerol służył jako akceptor grupy lizynowej, natomiast analog 3' okazał się nieczynny. Wyniki te sugerują, że enzymatyczna aminoacylacja zachodzi w pozycji 3'-(pierwszorzędowa grupa hydroksylowa) glicerolu i że otrzymany związek jest 3'-fosfatydylo-1'-/3'-O-L-lizylo/glicerolem (wzór II).

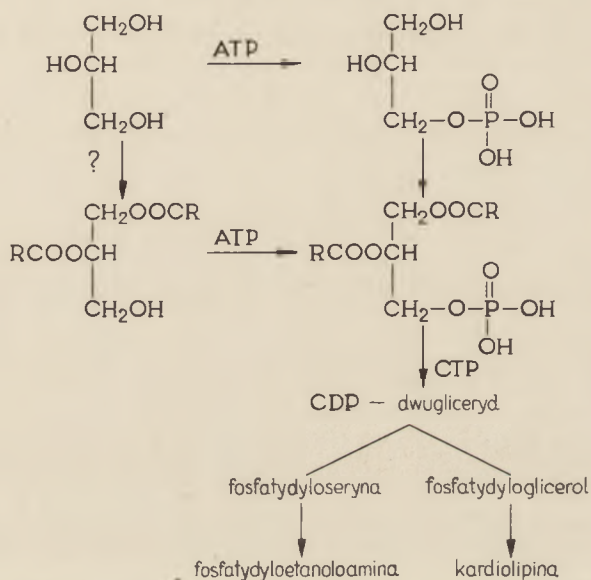


II

Nagromadzenie lizylofosfatydyloglicerolu można wywołać hodując bakterie w środowisku poniżej pH 5. W tych warunkach spada ilość fosfatydyloglicerolu i absolutna ilość komórkowych lipidów, a zwiększenie ilości lizylofosfatydyloglicerolu tylko częściowo kompensuje spadek ilości fosfatydyloglicerolu. Aminoacylowe estry fosfatydyloglicerolu znaleziono

u *B. cereus*, *S. faecalis*, *B. megaterium* i *L. acidophilus*, nie stwierdzono zaś ich obecności u *E. coli* (64). B o n s e n i w s p. przeprowadzili chemiczną syntezę estrów fosfatydyloglicerolu (16) i stwierdzili, że syntetyczny 3-fosfatydylo-1' (-3'-O-L-lizylo-)glicerol ma własności fizyczne i chemiczne bardzo zbliżone do naturalnego lizylofosfatydyloglicerolu z *S. aureus* (17). Ostatnio doniesiono z dwóch różnych ośrodków o istnieniu pochodnych fosfatydyloglicerolu zawierających glukozoaminę (110, 112).

Większość badań nad biosyntezą fosfolipidów przeprowadzono u *E. coli* (81). Główne etapy tej biosyntezy przedstawia schemat 4.



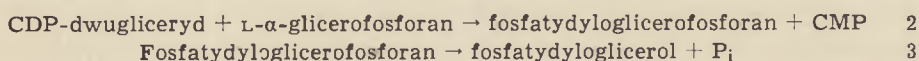
Schemat 4. Synteza fosfolipidów u *E. coli* wg Changa i Kennedy'ego (24)

Kluczową rolę w syntezie fosfolipidów u *E. coli* odgrywa CDP-dwugliceryd (76, 77). Częściowo oczyszczone rozpuszczalne preparaty katalizują reakcję 1.



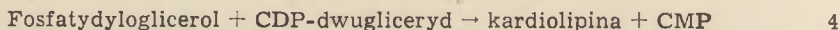
Dekarboksylację fosfatydyloseryny do fosfatydyloetanoloaminy katalizuje enzym, występujący we frakcji nierozpuszczalnej (76). Dekarboksylaza ta jest bardzo aktywna, toteż nie stwierdza się nagromadzenia jej substratu, a występowanie fosfatydyloseryny w niewielkich ilościach przy jednoczesnym nagromadzeniu fosfatydyloetanoloaminy świadczy, że pierwszy z tych związków jest pośrednikiem w syntezie drugiego.

Z nierozpuszczalnej, zawierającej błony frakcji Changa i Kennedy'ego (21, 22, 23) wyodrębnili enzymy katalizujące reakcje 2 i 3:



Pulsowe znakowanie hodowli *E. coli* ^{32}P wskazuje, że w fazie logarytmicznej znakowana fosfatydyloetanoloamina jest metabolicznie stała, natomiast z kinetyki znakowania fosfatydyloglicerolu wynika, że związek ten spełnia w komórce dynamiczną funkcję.

Fracja nierozpuszczalna *E. coli* katalizuje również dalszą przemianę fosfatydyloglicerolu do kardiolipiny według reakcji 4 (131):

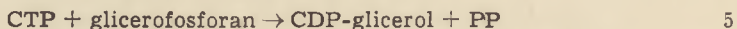


Synteza kwasu fosfatydowego u *E. coli* przebiegać może kilkoma drogami. Jedną z nich może być fosforylacja α, β -dwupalmitynianu przez ATP, katalizowana przez termostabilną kinazę glicerydową (114, 115, 116), drugą zaś acylacja glicerofosforanu katalizowana przez acylotransferazę glicerofosforanową związaną z frakcją rozpuszczalną.

Synteza kwasu fosfatydowego przy udziale kinazy glicerydowej wymaga istnienia aktywnej metabolicznie puli dwuglicerydu. Badania z użyciem ^{32}P wskazują jednak, że u *E. coli* dwugliceryd zawiera jedynie 5% całkowitej radioaktywności frakcji kwasu fosfatydowego, nie zanikającej po ustaniu wzrostu lub dodaniu nieznakowanego glicerolu. Szybkie wbudowanie radioaktywnego glicerofosforanu w lipidy przy braku aktywnej metabolicznie puli dwuglicerydu sugeruje zatem, że u *E. coli* glicerofosforan jest nieodzownym pośrednikiem w syntezie kwasu fosfatydowego. Rola aktywnej kinazy glicerydowej pozostaje niejasna.

Pośrednikiem w syntezie drogą acylacji jest zapewne palmitylo-ACP, ponieważ zarówno ten związek jak i oczyszczony ACP pobudzają wbudowywanie znakowanego glicerofosforanu do lipidów złożonych (1, 42, 43, 115). Po wbudowaniu glicerolu w lipidy obecność reszty fosforanowej jest zbędna, ponieważ substratem dla acylotransferazy może być monogliceryd. Specyficzność tego enzymu jest niewielka, na co wskazuje fakt, że jego substratem może być zarówno palmitylo-ACP jak i palmitylo CoA, a składnikami estrów mogą być także kwasy tłuszczowe nie występujące u *E. coli* (np. kwas linolenowy).

W rozpuszczalnej frakcji ekstraktów z *Lactobacillus arabinosus* (126) znaleziono enzym katalizujący odwracalną reakcję 5:



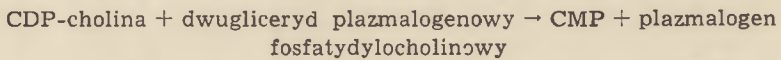
Jony Mg^{2+} , Mn^{2+} i Co^{2+} przyspieszają reakcję. ATP i GTP nie mogą zastąpić CTP, zaś fosfocholina lub fosfoetanoloamina — glicerofosforanu. U *S. aureus* opisano podobny enzym katalizujący syntezę CDP-rybitolu z CTP i rybitolo-5-fosforanu.

Synteza fosfatydylocholiny u bakterii odbywa się drogą stopniowego dołączania grup metylowych do fosfatydyloetanoloaminy. Dawcą grupy metylowej jest S-adenozylometionina (73, 85). Metylacja fosfatydyloetanoloaminy jest główną drogą syntezy lecytyny. Sherr i Law (128, 129) wykazali, że u *Agrobacterium tumefaciens* nie zachodzi wybiórcze znakowanie lecytyny po podaniu znakowanej choliny. Nie udało się też

wykryć transferazy fosfocholina: dwugliceryd, a wcielenie piętna z choliny do lipidów zachodzi pośrednio, przez włączanie fragmentów jednowęglowych powstających z rozpadu choliny (40, 45).

Z przedstawionego opisu widać, że u bakterii główna, jeśli nie jedyna, droga syntezy fosfatydyloetanoloaminy prowadzi przez CDP-dwugliceryd, podczas gdy u zwierząt związek ten powstaje z dwuglicerydu i CDP-etanoloaminy (82). Fosfatydylocholina u bakterii powstaje przez metylację fosfatydyloetanoloaminy, podczas gdy u zwierząt zarówno tą drogą (18) jak i w wyniku reakcji CDP-choliny z dwuglicerydem.

Niewiele dotychczas wiadomo o syntezie plazmalogenów bakteryjnych. K i y a s u i K e n n e d y (83) wykazali następującą reakcję (6):



6

oraz identyczną reakcją z CDP-etanoloaminą.

Prekursorami aldehydów użytkowanych do syntezy plazmalogenów (głównie etanoloaminowych) są kwasy tłuszczowe o rozgałęzionym łańcuchu (145).

Ostatnie lata dostarczyły ciekawych danych o biosyntezie aminoacylowych estrów fosfatydyloglicerolu. Jest to głównie zasługą L e n n a r z a i współpracowników. Podczas inkubacji ^{14}C -lizyny z nieoczyszczonymi ekstraktami ze *S. aureus* (89) zawierającymi ATP i Mg^{2+} zachodzi synteza lizylo-fosfatydyloglicerolu. Wbudowywanie lizyny zachodzi co najmniej w dwóch etapach. W pierwszym, katalizowanym przez rozpuszczalny enzym w obecności ATP, powstaje lizylo-sRNA. W drugim, katalizowanym przez enzym z frakcji nierozpuszczalnej lizyna z lizylo-sRNA jest przenoszona na fosfatydyloglicerol. Etap ten jest dość skomplikowany i zachodzi w obecności Mg^{2+} , niezidentyfikowanego termostabilnego czynnika, oraz detergentu. Podobnie alanylo-fosfatydyloglicerol u *Cl. welchii* powstaje w reakcji alanylo-sRNA z fosfatydyloglicerolem (50, 51). Lizylo-sRNA jest specyficznym substratem w syntezie lizylofosfatydyloglicerolu przez *S. aureus*, nie musi jednak pochodzić z tych bakterii. Jednak fragmenty lizylo-sRNA otrzymane np. po degradacji RN-azą trzustkową nie mogą służyć jako substrat. Badania nad specyficznością syntetazy alanylo-fosfatydyloglicerolu wykazują, że otrzymane z alanylo-sRNA laktylo-sRNA, a także fragmenty alanylo-sRNA otrzymane po trawieniu RN-azą trzustkową nie mogą być substratami, zaś alanylo-sRNA przygotowany z cysteinylo-sRNA jest wykorzystywany w nieznacznym stopniu. Wyniki te wskazują na stosunkowo wysoką specyficzność syntetaz aminoacylofosfatydyloglicerolu. Z 14-tu różnych syntetycznych aminoacylo-sRNA bakterie wykorzystywały tylko niektóre do syntezy lipidów. U *S. aureus* powstawał tylko lizylo-fosfatydyloglicerol, a u *Cl. welchii* alanylo-fosfatydyloglicerol; *S. faecalis* syntetyzował ponadto jeden lub więcej nowych aminoacylowych lipidów.

Udział aminoacylo-sRNA w biosyntezie fosfolipidów bakteryjnych jest przykładem roli tego połączenia w biosyntezie związków niebiałkowych.

III. Udział fosfolipidów w aktywnym transporcie

Nikaido (108) doniósł, że transportowi β -galaktozydów u *E. coli* towarzyszy zwiększone włączanie do frakcji lipidowej ^{32}P ze środowiska. Podobnie L. i M. Hokinowie (60, 61) wykazali, że aktywnemu transportowi sodu w tkankach gruczołów ślinowych pewnych ptaków morskich towarzyszy pobranie znakowanego ^{32}P ze środowiska inkubacyjnego. W obu wypadkach radioaktywność znajdowała się głównie w kwasie fosfatydowym. Nikaido (108) wysunął hipotezę, że gen permeazy decyduje o powstawaniu białka o dużym powinowactwie do substratu permeazy, a białko to tworzy kompleks z fosfolipidem, działającym jako nośnik wskutek zmian konformacyjnych zachodzących w części białkowej pod wpływem cyklicznych zmian chemicznych w komponencie fosfolipidowym. Szczegółowe badania Tarlova i Kennedy'ego (132) wykazały, że w warunkach, w których zachodzi pobieranie i akumulacja β -galaktozydów wcielane są zarówno piętnowane glicerol jak i seryna, a zatem wzrost syntezy kwasu fosfatydowego jest wynikiem stymulacji ogólnej syntezy glicerofosfatydów. Autorzy ci są zdania, że stymulacja ta towarzyszy, ale niekoniecznie jest przyczynowo związana z mechanizmem transportu.

IV. Rola fosfolipidów w reakcjach enzymatycznych

Hunter i Godson (66) już w roku 1961 wysunęli hipotezę o udziale lipidów w biosyntezie białka. Według niej aminowe grupy aminokwasów wchodziłyby w kontakt z fosforanowymi grupami fosfolipidów odpowiednio usytuowanymi w stosunku do łańcucha sRNA. Tworzenie kompleksów lipoaminokwasowych zachodziłoby spontanicznie, czemu sprzyjałaby bliskość naładowanych grup fosforanowych. Odkrycie O-acylowych estrów fosfatydyloglicerolu oraz wyjaśnienie mechanizmu ich syntezy mogło sugerować udział tych związków w biosyntezie białka. Przeczy jednak temu kilka faktów. Po pierwsze — tylko bardzo nieliczne aminokwasy zidentyfikowano jako składniki estrów, podczas gdy synteza białek wymaga pełnego kompletu aminokwasów. Po drugie nagromadzenie ich obserwuje się w fazie stacjonarnej wzrostu bakterii, zaś gdyby pełniły one bardziej dynamiczną rolę nagromadzałyby się w fazie logarytmicznej. Oczywiście, jest rzeczą możliwą, że połączenia typu O-acylowych pochodnych są tak labilne, że wyizolowanie ich obecnie stosowanymi metodami jest nieosiągalne. Badania Sekuzu i wsp.

(124, 125) nad fosfolipidami mitochondrialnymi wykazały, że w pewnych warunkach mogą one odgrywać bardziej specyficzną rolę w reakcjach enzymatycznych. Stwierdzono, że do działania dehydrogenazy jabłczanowej z *Myc. avium* i *Myc. phlei* (9, 134) niezbędny jest fosfolipid. Dodanie fosfolipidów wyekstrahowanych z tego samego mikroorganizmu przywraca funkcję enzymatyczną dehydrogenazy w bakteriach sztucznie pozbawionych lipidów. Kardiolipina działa podobnie, natomiast tween i dezoksycholan są nieczynne. Podobnie układ utleniający jabłczan, otrzymany po sonifikacji *Pseudomonas ovalis chester* (36, 113) jest czynny dopiero po oddaniu fosfolipidu, przy czym przy użyciu ubichinonu jako sztucznego akceptora aktywatorem jest nienasycona fosfatydyloetanoloamina.

V. Lipidy a budowa błon biologicznych

Biologiczne błony zawierają bardzo różnorodne składniki lipidowe różniące się strukturą łańcuchów. Chociaż pewne właściwości różnych błon mogą być jednakowe, mimo wielu uderzających różnic w składzie lipidowym, należy liczyć się z możliwością uwarunkowania określonej funkcji danej błony przez określony skład lipidowy (29, 30, 31).

Davson-Danielli w swoim dwuwarstwowym modelu błony zakłada istnienie matrycy powierzchniowego białka (wg 31). Rozłożenie ładunków tego białka powinno być mniej więcej komplementarne w stosunku do przylegających anionowych warstw lipidowych (12) i dlatego białka błony powinnyby mieć raczej kationowy charakter. Białka te jednak nie tylko nie są zasadowe, lecz nawet zawierają większość aminokwasów kwaśnych (28). Według modelu Davson-Danielli kwasy tłuszczowe lipidów błony dwuwarstwowej tworzą stosunkowo płynną fazę, a węglowodorowe łańcuchy wszystkich lipidów złożonych nie mają kontaktu z innymi lipidami lub sąsiednimi białkami, mogą mieć zatem różną budowę i skład. Jednak w błonach naturalnych jest prawdopodobnie inaczej i łańcuchy węglowodorowe każdego z typów lipidów są specyficznym dobrane. Badania nad monomolekularnymi filmami syntetycznych fosfolipidów wykazały, że utkanie molekularne zależy w znacznym stopniu od długości łańcucha i ilości nienasyconych wiązań. Lipidy błony mitochondrialnej (35) mają bardziej nienasycone kwasy tłuszczowe niż lipidy mieliny czy lipidy błony bakteryjnej, dzięki czemu prawdopodobnie błona mitochondrialna odznacza się większą „płynnością” ułatwiającą procesy dyfuzji. Chapman i Fluck (25) wykazali, że optymalna temperatura, w której zachodzi tworzenie błon, zależy od stopnia nienasylenia łańcuchów węglowodorowych i od obecności grup polarnych w lipidach. Poszczególne tkanki mogą osiągnąć tę samą „płynność” mimo różnic w składzie kwasów tłuszczowych dzięki modyfikującemu

efektowi grupy polarnej, innemu w cząsteczce fosfatydylocholiny niż np. w cząstkach fosfatydyloetanoloaminy. U bakterii, które nie zawierają wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, występują kwasy tłuszczowe mononienasycone o rozgałęzionym łańcuchu i cyklopropanowe, które zwiększając odstęp między sąsiadującymi parafinowymi łańcuchami zmniejszają siły van der Waalsa.

Zarówno białka jak i lipidy można w zasadzie uważać za powiązane siłami hydrofobowymi, przy czym pewne powierzchniowe lipidy wykazują tendencję do tworzenia wiązań hydrofobowych, zaś białka błony mają taką sekwencję aminokwasów, która pozwala im zachować hydrofobowe wnętrze. Powstały lipoproteid może pełnić rolę podjednostki błony co potwierdzili doświadczalnie Rasin i wsp. (118, 119) rekonstruując z tego typu podjednostek błonę u *Mycoplasma laidlawii*. Taki model sugeruje, że genetycznie kontrolowana sekwencja aminokwasów białek błony umożliwia ich specyficznym hydrofobowym połączenie z łańcuchami lipidowymi.

Grupy polarne fosfolipidów mogą mieć również duże znaczenie we wzajemnym oddziaływaniu lipid-białko (30). Błony zwierzęce mają przewagę ładunku ujemnego, choć zawierają duże ilości fosfolipidów cholinowych, które w fizjologicznym pH są obojętne. Błony bakteryjne zbudowane są w większości z fosfolipidów kwaśnych. U niektórych jednak typów bakterii gromadzą się O-aminoacylowe estry fosfatydyloglicerolu, a aminokwasy występujące w tych połączeniach mają przeważnie charakter zasadowy. Można zatem przypuszczać, że połączenia te działają jako nośniki aminokwasów potrzebnych do budowy ściany bakteryjnej bądź też swymi dodatnio naładowanymi grupami aminowymi zubożniają ładunek błony (100). Są dane, że lipidy biorą aktywny udział w samym procesie syntezy ściany bakteryjnej.

Matsushashi i wsp. (104, 105) wykazali, że u *S.aureus* glicyna jest wbudowywana do glikopeptydu ściany bakteryjnej po uprzedniej aktywacji do glicylo-sRNA. Glicylo-sRNA przenosi około 5 reszt glicynowych na wolną grupę ε-aminową lizyny w pentapeptydzie połączonym z lipidem.

Ten pobieżny rzut oka na syntezę fosfolipidów bakteryjnych pozwala nam stwierdzić, że badania mechanizmu biosyntezy tych związków przyczynić się mogą nie tylko do wyjaśnienia procesów metabolicznych zachodzących w komórce drobnoustroju, ale i do wyświetlenia struktury i funkcji błon biologicznych.

LITERATURA

1. Ailhaud G. P., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **241**, 3866 (1966).
2. Akamatsu Y., Ono Y., Nojima S., *J. Biochem.* **57**, 430 (1965).
3. Akamatsu Y., Ono Y., Nojima S., *J. Biochem.* **59**, 176 (1966).

4. Akamatsu Y., Ono Y., Nojima S., *J. Biochem.* **61**, 96 (1967).
5. Akashi S., Saito K., *J. Biochem.* **47**, 222 (1960).
6. Alberts A. W., Majerus P. W., Talamo B., Vagelos P. R., *Biochemistry* **3**, 1563 (1964).
7. Alberts A. W., Vagelos P. R., *Federation Proc.* **20**, 273 (1961).
8. Allison M. J., Bryant M. P., Katz I., Keeney M. J., *J. Bacteriol.* **83**, 1084 (1962).
9. Asano A., Kaneshiro T., Brodie A. F., *J. Biol. Chem.* **240**, 895 (1965).
10. Asselineau J., Lederer E. w *Lipide metabolism* red. Bloch K., Willey, New York 1960, str. 337.
11. Baumann N. A., Hagen P. O., Goldfine H., *J. Biol. Chem.* **240**, 1559 (1965).
12. Benson A. A., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **43**, 265 (1966).
13. Bloch K., Brock D., i Kass L., *Proc. VII Internat. Congress Biochem. Col. X-2, Tokyo 1967.*
14. Bloomfield D. K., Bloch K., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 220 (1958).
15. Bloomfield D. K., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **235**, 337 (1960).
16. Bonsen P. P. M., de Haas G. H., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 93 (1965).
17. Bosen P. P. M., de Haas G. H., van Deenen L. L. M., *Biochemistry* **6**, 1114 (1967).
18. Bremer J., Greenberg D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 205 (1961).
19. Brock D. J. H., Kass L. R., Bloch K., *Federation Proc.* **25**, 340 (1966).
20. Brundish D. E., Shaw N., Baddiley J., *Biochem. J.* **104**, 205 (1967).
21. Chang Y. Y., Kennedy E. P., *Federation Proc.* **26**, 277 (1967).
22. Chang Y. Y., Kennedy E. P., *J. Lipid Res.*, **8**, 447 (1967).
23. Chang Y. Y., Kennedy E. P., *J. Lipid Res.* **8**, 456 (1967).
24. Chang Y. Y., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **242**, 516 (1967).
25. Chapman D., Fluck D. J., *J. Cell Biol.* **30**, 1 (1966).
26. Chung A. E., Law J. H., *Biochemistry* **3**, 967 (1964).
27. Chung A. E., Law J. H., *Biochemistry* **3**, 1989 (1964).
28. Criddle R. S., Bock R. M., Green D. E., Tisdale H., *Biochemistry* **1**, 827 (1962).
29. Deenen van L. L. M., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **43**, 296 (1966).
30. Deenen van L. L. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 717 (1966).
31. Deenen van L. L. M., w *Progress in the Chem. Fats and Lipids 1966*, t. VIII, str. 1.
32. Distler J., Roseman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 897 (1964).
33. Erwin J., Bloch K., *Science* **143**, 1006 (1964).
34. Fleischer S., Brierley G. P., Klouwen H., Slaughterback D. B., *J. Biol. Chem.* **237**, 3264 (1962).
35. Fleischer S., Rouser G., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 588 (1965).
36. Francis M. J. O., Phizackerley P. J. R., *Biochem. J.* **95**, 25P (1965).
37. Fulco A. J., Bloch K., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 545 (1962).
38. Fulco A. J., Levy R., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **239**, 998 (1964).
39. Gilby A. R., Few A. V., McQuillen K., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 21 (1958).
40. Goldfine H., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 504 (1962).
41. Goldfine H., *Federation Proc.* **20**, 273 (1961).
42. Goldfine H., *Federation Proc.* **25**, 405 (1966).
43. Goldfine H., *J. Biol. Chem.* **241**, 3864 (1966).
44. Goldfine H., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **236**, 2596 (1961).
45. Goldfine H., Ellis M. E., *J. Bacteriol.* **87**, 8 (1964).

46. Goldman P., *J. Biol. Chem.* **239**, 3663 (1964).
47. Goldman P., Vagelos P. R., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **5**, 414 (1961).
48. Goldman P., Alberts A. W., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **238**, 3579 (1963).
49. Goldstein I. J., Hollerman C. E., Smith E. E., *Biochemistry* **4**, 876 (1965).
50. Gould R., Lennarz W. J., *Federation Proc.* **26**, 278 (1967).
51. Gould R., Lennarz W. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 510 (1967).
52. Green D. E., Fleischer S., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 554 (1963).
53. Green D. E., Fleischer S., Symp. Biochem. Problems of Lipids BBA Library **1**, 325 (1963).
54. Hagen P. O., Goldfine W., Williams P. J., *Science* **151**, 1543 (1966).
55. Haverkate F., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 106 (1964).
56. Haverkate F., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 78 (1965).
57. Hildebrandt J. G., Law J. H., *Biochemistry* **3**, 1304 (1964).
58. Hofmann K., Lucas R. A., Sax S. M., *J. Biol. Chem.* **195**, 473 (1952).
59. Hofmann K., Henis D. B., Panos C., *J. Biol. Chem.* **228**, 349 (1957).
60. Hokin L. E., Hokin M. R., *Federation Proc.* **22**, 8 (1963).
61. Hokin L. E., Hokin M. R., *J. Gen. Physiol.* **44**, 61 (1960).
62. Horning M. G., Martin D. B., Karmen A., Vagelos P. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 101 (1960).
63. Houtsmuller U. M. T., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 96 (1964).
64. Houtsmuller U. M. T., van Deenen L. L. M., *Biochem. J.* **88**, 44P (1963).
65. Houtsmuller U. M. T., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 564 (1965).
66. Hunter G. D., Godson G. N., *Nature* **189**, 140 (1961).
67. Huston C. K., Albro P. W., Grindey G. B., *J. Bacteriol.* **89**, 768 (1965).
68. Ibbots F. A., Abrams A., *Federation Proc.* **23**, 222 (1964).
69. Ibbots F. A., Abrams A., *Biochemistry* **3**, 2008 (1964).
70. Jones G. E., Benson A. A., *J. Bacteriol.* **89**, 260 (1965).
71. Kaneda T., *J. Biol. Chem.* **238**, 1229 (1963).
72. Kanemasa Y., Akamatsu Y., Nojimo S., *Biochim. Biophys. Acta* **144**, 382 (1967).
73. Kaneshiro T., Law J. H., *J. Biol. Chem.* **230**, 1709 (1964).
74. Kaneshiro T., Marr A. G., *J. Lipid Res.* **3**, 184 (1962).
75. Kaneshiro T., Marr A. G., *J. Biol. Chem.* **236**, 2615 (1961).
76. Kanfer J., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **237**, 270PG (1962).
77. Kanfer J., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1720 (1964).
78. Kates M. w Advances in Lipid Research red. Paoletti R. i Kritchevsky D., Academic Press, New York 1964 t. II, str. 17.
79. Kates M., Sastry P. S., Yengoyan L. S., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 705 (1963).
80. Kates M., Yengoyan L. S., Sastry P. S., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 252 (1965).
81. Kennedy E. P., *The Harvey Lectures 1961—62*, **57**, 143 (1962).
82. Kennedy E. P., Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **222**, 193 (1956).
83. Kiyasu I. Y., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **235**, 2590 (1960).
84. Kushner D. J., Bayley S. T., Boring J., Kates M., Gibbons N. E., *Can. J. Microbiol.* **10**, 483 (1964).

85. Law J. H., Zalkin H., Kaneshiro T., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 143 (1963).
86. Lennarz W. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 112 (1961).
87. Lennarz W. J., Bonsen P. P. M., Deenen van L. L. M., *Biochemistry* **6**, 2307 (1967).
88. Lennarz W. J., Light R. J., Bloch K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 840 (1962).
89. Lennarz W. J., Nesbitt J. A. III, Reiss J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 934 (1966).
90. Lennarz W. J., Scheuerbrandt G., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **237**, 664 (1962).
91. Lester R. J., Fleischer S., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 358 (1961).
92. Liu T. Y., Hofmann K., *Biochemistry* **1**, 189 (1962).
93. Luria S. E. w *The Bacteria*, red Gunsalus J. C. i Stanier R. Y., Academic Press, New York tom I, str. 1.
94. Lynen F., *Federation Proc.* **20**, 941 (1961).
95. Lynen F., Tada M., *Angew. Chemie* **73**, 513 (1961).
96. MacFarlane M. G., *Biochem. J.* **79**, 4P (1961).
97. MacFarlane M. G., *Biochem. J.* **80**, 45P (1961).
98. MacFarlane M. G., *Biochem. J.* **82**, 40P (1962).
99. MacFarlane M. G., *Nature* **196**, 136 (1962).
100. MacFarlane M. G., w *Advances in Lipid Research* red. Paoletti R. i Kritchevsky D., Academic Press, New York 1964 tom II, str. 91.
101. Majerus P. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 2325 (1967).
102. Majerus P. W., Albertus A. W., Vagelos P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1231 (1964).
103. Majerus P. W., Albertus A. W., Vagelos P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 410 (1965).
104. Matsuhashi M., Dietrich C. P., Gilbert J. M., *Federation Proc.* **24**, 607 (1965).
105. Matsuhashi M., Dietrich C. P., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 587 (1965).
106. Merdinger E., Devine E. M., *J. Bacteriol.* **89**, 1488 (1965).
107. Nagata Y., Shibuya I., Marno B., *J. Biochem.* **61**, 623 (1967).
108. Nikaido H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 486 (1962).
109. Norris A. T., Matsumura S., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **239**, 3653 (1964).
110. Opden Kamp J. A. F., Houtsmuller U. M. T., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 438 (1965).
111. Osborn M. J., Rosen S. M., Rothfield L., Zeleznick L. D., Horrecker B. L., *Science* **145**, 783 (1964).
112. Phizackerley P. J. R., MacDougall J. C., Francis M. J. O., *Biochem. J.* **99**, 21C (1966).
113. Phizackerley P. J. R., Francis M. J. O., *Biochem. J.* **101**, 524 (1966).
114. Pieringer R. A., *Federation Proc.* **24**, 476 (1965).
115. Pieringer R. A., Bonner H. Jr., Kunnes R. S., *J. Biol. Chem.* **242**, 2719 (1967).
116. Pieringer R. A., Kunnes R. S., *J. Biol. Chem.* **240**, 2833 (1965).
117. Pugh E. L., Sauer F., Waite M., Toomey R. E., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **241**, 2634 (1966).
118. Rasin S., Argaman M., Avigan J., *J. Gen. Microbiol.* **33**, 477 (1963).
119. Rasin S., Morowitz H. J., Terry T. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 219 (1965).

120. Saito K., *J. Biochem.* **47**, 688 (1960).
121. Saito K., *J. Biochem.* **47**, 710 (1960).
122. Salton M. R. J., w *Microbiological Cell Walls*, J. Willey, New York, 1960.
123. Scheuerbrandt G., Goldfine H., Baronowsky P. E., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **236**, PC70 (1961).
124. Sekuzu I., Jurtschuk P., Green D. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 71 (1961).
125. Sekuzu I., Jurtschuk P., Green D. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 975 (1963).
126. Shaw D. R. D., *Biochem. J.* **82**, 297 (1962).
127. Shaw R. w *Advances in Lipid Research*, red. Paoletti R. i Kritchevsky D., **4**, 107 (1966).
128. Sherr S. J., Law J. H., *Federation Proc.* **24**, 476 (1965).
129. Sherr S. L., Law J. H., *J. Biol. Chem.* **240**, 3760 (1965).
130. Smith P. F., Koostra W. L., Hendriksen C. V., *J. Bacteriol.* **90**, 282 (1965).
131. Stanacew N. Z., Chang Y. Y., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **242**, 3018 (1967).
132. Tarlov A. R., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **240**, 49 (1965).
133. Thorne K. J. I., Constable B. J., Day K. C., *Nature* **206**, 1156 (1965).
134. Tobari J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 50 (1964).
135. Toomey R. E., *Federation Proc.* **25**, 340 (1966).
136. Tourtellotte M. E., Jensen R. G., Gander G. W., Morowitz H. J., *J. Bacteriol.* **86**, 370 (1963).
137. Yudkin M. D., *Biochem. J.* **82**, 40P (1962).
138. Yudkin M. D., *Biochem. J.* **98**, 923 (1966).
139. Vagelos P. R., Alberts A. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 2786 (1960).
140. Vorbeck M. L., Marinetti G. V., *Federation Proc.* **23**, 375 (1964).
141. Vorbeck M. L., Marinetti G. V., *J. Lipid Res.* **6**, 3 (1965).
142. Vorbeck M. L., Marinetti G. V., *Biochemistry* **4**, 296 (1965).
143. Wakil S. J., Ganguly J., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2597 (1959).
144. Wakil S. J., Pugh E. L., Sauer F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 106 (1964).
145. Wegner G. H., Foster E. M., *J. Bacteriol.* **85**, 53 (1963).
146. Weibull C., *Acta Chem. Scand.* **11**, 881 (1957).
147. Zalkin H., Law J. H., Goldfine H. *J. Biol. Chem.* **238**, 1242 (1963).

MARIANNA RAJCHERT-TRZPIL*

Episom F u *Escherichia coli*

Episom F of *Escherichia coli*

I. Istota episomów i plazmidów bakteryjnych

Badania nad procesem koniugacji u *Escherichia coli* doprowadziły do wykrycia u różnych bakterii nowego rodzaju elementów genetycznych, odrębnych od struktur chromosomalnych i występujących niezależnie od normalnego genomu. Chociaż elementy te różnią się między sobą szeregiem cech, wykazują jednak wiele wspólnych właściwości. Biorąc pod uwagę wzajemne podobieństwo tych elementów Jacob i Wollman (42) zaproponowali zaliczenie ich do odrębnej grupy twórców genetycznych i nadanie im wspólnej nazwy — episomy. Episomy charakteryzują się między innymi tym, że mogą występować w komórce w dwóch postaciach, często wzajemnie wykluczających się: jako struktury związane w jakiś sposób z chromosomem i replikujące się razem z nim oraz jako autonomiczne, niezależnie namnażające się jednostki, istniejące w cytoplazmie. Pewne elementy genetyczne, istniejące, jak się wydaje, tylko w stanie autonomicznym Lederberg i wsp. (45) nazwali plazmidami. Nie wszyscy autorzy trzymają się ściśle tej klasyfikacji determinantów pozachromosomalnych. Niektórzy używają terminów plazmidy i episomy wymiennie, inni wszystkie genetyczne elementy cytoplazmatyczne nazywają episomami, a jeszcze inni plazmidami.

Episomy może bakteria nabyć podczas podziałów komórkowych, w wyniku koniugacji, transdukcji i być może, w czasie transformacji. Bakteria po nabyciu episomu z reguły przekazuje go komórkom potomnym. Dotychczas nie zaobserwowano spontanicznego nabywania, czy wytwarzania episomów, co jest ważną cechą charakteryzującą te twory.

Episomy i plazmidy zawierają determinanty genetyczne ważnych biologicznie cech, na przykład wytwarzania pewnych toksyn bakteryjnych, czy też czynników bakteriobójczych, płodności niektórych komórek lub ich oporności na różne leki.

* Dr, Zakład Mikrobiologii i Higieny Akademii Medycznej, Warszawa.

Dotychczas wyróżnia się następujące rodzaje episomów i plazmidów (21):

- 1) czynnik płci u *E.coli* oznaczony symbolem F,
- 2) łagodne bakteriofagi, a ściślej mówiąc ich materiał genetyczny,
- 3) determinanty produkcji kolicyn,
- 4) elementy R przenoszące oporność na kilka leków, w szczególności oporność na niektóre antybiotyki,
- 5) czynnik Fo-lac kontrolujący zakaźne przenoszenie determinanta wykorzystywania laktozy jako jedyne źródła węgla, odkryty u *Salmonella typhi* ST2,
- 6) elementy kontrolujące produkcję penicylinazy i oporność na niektóre leki antybakteryjne u *Staphylococcus aureus* (53, 54, 58, 59),
- 7) element Mu, przekazywalny czynnik zwiększający częstotliwość mutacji w kierunku oporności na streptomycynę u *E.coli* (26),
- 8) determinanty zarodnikowania u laseczek (37),
- 9) a być może także czynnik kontrolujący produkcję hemolizyny u *E.coli* (65).

Ponieważ w stanie autonomicznym episomy dzielą się bardzo szybko, ich rozprzestrzenianie się w populacji jest często tak skuteczne, że w krótkim czasie większość osobników staje się nosicielem tych struktur. Te właściwości episomów, istotne zarówno teoretycznie jak i praktycznie, spowodowały, że są one obecnie obiektem badań w wielu ośrodkach naukowych. Jednym z episomów, któremu poświęcono wiele uwagi jest episom F, warunkujący zróżnicowanie płciowe komórek *E.coli* K12.

II. Episom F u *Escherichia coli* K12

Odkrycie koniugacji i rekombinacji u *E.coli* K12 przez Lederberga i Tatum a w 1946 roku (46) zapoczątkowało badania nad płciowością bakterii. Do tego czasu sądzono, że procesy płciowe nie występują u tych organizmów. Wyniki badań Hayesa (29), Lederberga i wsp. (45) oraz Cavalli-Sforzy i wsp. (14) nad procesem koniugacji wskazywały na istnienie w komórkach dawcy pozajądrowego, plazmatycznego czynnika, przenoszonego podczas kontaktu bakterii prawie do wszystkich komórek biorcy i, jak stwierdzono, niezbędnego w procesie przekazywania chromosomu z komórki dawcy (29, 45). Element ten nazwano czynnikiem płodności F (*fertility*).

Zróżnicowanie płciowe zaobserwowano następnie u różnych dzikich szczepów *E.coli* (6, 24, 57), a także i u innych szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae* należących do *Serratia* (4), *Salmonella* (72) i *Proteus* (22). Zróżnicowanie płciowe wykryto także poza obrębem rodziny *Enterobacteriaceae* w rodzajach *Vibrio* (7) i *Pseudomonas* (35, 47). Komórki posiadające czynnik płciowy uważa się za komórki męskie, a nie posia-

dające go — za żeńskie. Najlepiej poznano czynnik F u *E. coli* K12. O budowie i właściwościach czynników płci występujących u innych szczepów niewiele wiadomo.

U *E. coli* K12 istnieją trzy typy płciowe komórek: żeńskie F^- oraz męskie, typu F^+ i typu Hfr w zależności od usytuowania czynnika F (28, 29). Bakterie męskie typu F^+ , zawierające czynnik F w stanie autonomicznym w cytoplazmie, przekazują w czasie koniugacji komórkom żeńskim tylko czynnik F, nie przekazują chromosomu. Drugi typ komórek męskich, Hfr, powstający w wyniku połączenia się episomu F z genomem gospodarza jest zdolny do przekazywania chromosomu komórkom żeńskim.

Dawców typu Hfr wykryli Cavalli-Sforza (13) i niezależnie od niego Hayes (30). Cavalli-Sforza uzyskał szczep Hfr działając na komórki iperytem azotowym, natomiast Hayes otrzymał inny typ Hfr będący spontanicznym mutantem. W krzyżówce z dawcami Hfr powstaje duża liczba rekombinantów sięgająca nawet 20% liczby rodziców (Hfr — ang. *high frequency of recombination*). Odkrycie dawców typu Hfr umożliwiło dokładne i wszechstronne badanie samego procesu koniugacji, a także organizacji i struktury materiału genetycznego u bakterii *E. coli*.

Komórki żeńskie mogą powstawać w populacjach męskich przez samorzutną eliminację czynnika F z komórek F^+ , natomiast spontanicznego nabywania F nigdy nie zaobserwowano. Czynnik F można usunąć z komórki działając jonami kobaltu i niklu (33), podwyższoną temperaturą, barwnikami akrydynowymi (34) oraz głodem tyminowym (15). Episomy wbudowane w chromosom nie ulegają działaniu wymienionych czynników. Borowski (9) stwierdził znaczne zwiększenie liczby komórek penicylinazo-ujemnych w populacjach szczepów *S. aureus* penicylinazo-dodatnich pod wpływem takich związków jak chinina, tymol, detergenty, iperyt azotowy, co może być wynikiem usunięcia z bakterii plazmidów noszących geny produkcji penicyliny.

Działając znanym, silnym mutagenem — nitrozoguanidyną, na bakterie F^+ Takahashi i Barnard (67) zaobserwowali utratę właściwości dawcy u tych komórek. Najprawdopodobniej konwersja dawców F^+ w komórki o fenotypie F^- nie była wynikiem usunięcia z komórki episomu F, a jego uszkodzenia. Za tym wnioskiem przemawiałyby również wyniki Cuzina i Jacoba (16), którzy uzyskali różne defektywne mutanty działając nitrozoguanidyną na komórki Hfr, a więc na zintegrowany episom.

Zmiana komórek biorców F^- w F^+ zachodzi po wprowadzeniu do nich czynnika F, najczęściej na drodze koniugacji, a czasem także transdukcji (18). Po zmieszaniu w odpowiednich warunkach dawców F^+ z komórkami F^- , cząstki F przenoszone są szybko do biorców, zmieniając je w F^+ . Jacob i Wollman (38) oraz Sneath i Lederberg (64) wy-

kazali, że w optymalnych warunkach przejście czynnika F trwa około 4 minut. Dawcy typu F^+ w czasie koniugacji, oprócz cząstki F, mogą przekazywać partnerowi materiały nieczynne genetycznie, prawdopodobnie pochodzenia cytoplazmatycznego. Na przykład Borek i Ryan (8) donieśli o przeniesieniu powstałych po naświetleniu promieniami UV produktów indukujących wegetatywny rozwój profaga λ , a Fisher (23) zaobserwował przenoszenie represora dla rozwoju tego faga.

Występowanie czynnika F w stanie autonomicznym wykazano drogą analizy genetycznej oraz dzięki obserwacjom kinetyki zamiany komórek F^- w F^+ . W badaniach genetycznych stwierdzono, że element F nie wykazuje sprzężenia z żadnym chromosomalnym genem co sugeruje, że jest on cząstką pozachromosomalną (29, 30). Wprowadzenie zaledwie kilku komórek F^+ do hodowli bakterii żeńskich powoduje bardzo szybko zamianę całej tej populacji w komórki typu F^+ . Badania kinetyki konwersji komórek F^- w F^+ wykazały, że element F replikuje się znacznie szybciej niż genom gospodarza, co nasuwało wnioski o niezależności czynnika F od chromosomu gospodarza (45). Duża wydajność i szybkość przekazywania autonomicznego czynnika F i elementu oporności na leki R do biorcy wskazywałaby, według Jacoba i wsp. (36), że episomy są zlokalizowane tuż przy błonie cytoplazmatycznej w centralnej części komórki. Przypuszczenie to potwierdzają badania Kawakami'ego i Landmana (43), którzy wykazali, że pewne plazmidy u gramodatnych bakterii oraz episom Fo-lac u *S. schottmülleri* są przytwierdzone do wewnętrznej strony błony cytoplazmatycznej, a przechodzenie ich do komórki potomnej jest skoordynowane z rozdzieleniem materiału chromosomalnego po podziale. Rozdział całego materiału genetycznego, w tym również cząstek episomalnych do potomnych komórek jest u bakterii równomierny mimo braku centrosomów i centrioli.

Z krzyżówek pomiędzy F^+ a F^- można wyizolować rekombinanty dla cech chromosomalnych obecnych u dawcy. Pojawianie się takich rekombinantów jest jednak bardzo rzadkie w porównaniu z częstością kontaktów zachodzących między komórkami: jeden rekombinant powstaje na 10^4 — 10^7 komórek rodzicielskich. Pojawianie się małej liczby rekombinantów w tym systemie można tłumaczyć tym, że w populacji dawców F^+ tylko niewiele komórek jest zdolnych do przekazywania w czasie koniugacji materiału chromosomalnego do biorcy. Powstawanie niewielu rekombinantów w wyniku krzyżówek $F^+ \times F^-$ można też tłumaczyć inaczej: każda komórka F^+ może, ale tylko z bardzo małym prawdopodobieństwem, przekazać cechy chromosomalne. Wyniki testu fluktuacji Lurii i Delbrücka zastosowanego przez Jacoba i Wollmana (39) do badania pochodzenia płodnych komórek w hodowli F^+ przemawiały na korzyść pierwszej hipotezy. Okazało się, że zdolność przekazywania chromosomu, a więc płodność populacji F^+ zależy głównie, jeśli nie wyłącznie, od obecności w populacji nielicznych, specjalnych mutantów.

Jacob i Wollman za pomocą techniki replik płytkowych wyodrębnili te mutanty z hodowli bakterii F^+ i stwierdzili, że czynnik F nie znajduje się u nich w cytoplazmie, ale jest włączony do chromosomu. Tak więc częstotliwość powstających rekombinantów w krzyżówkach $F^+ \times F^-$ okazała się ściśle zależna od liczby obecnych w hodowli F^+ komórek Hfr (3, 25, 31, 39, 71).

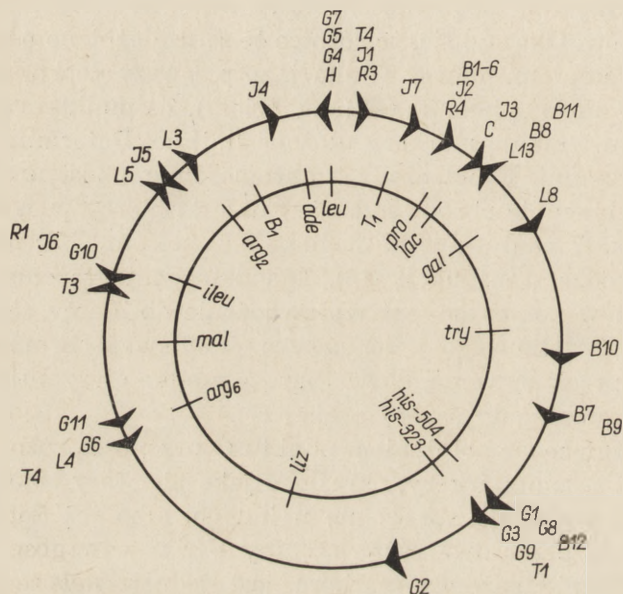
W wyniku badań nad koniugacją (40, 41, 69, 71) ustalono, że wszystkie komórki danego szczepu Hfr przekazują swoje chromosomy w pewien charakterystyczny dla niego sposób, który może być różny dla poszczególnych szczepów. Okazało się, że różnice te są uzależnione od tego, który z punktów chromosomu dawcy wnika jako pierwszy do komórki biorcy. Locus ten nazwano symbolem „O” (ang. *origin*). Za punktem O w stałych odstępach czasu wnikają markery ułożone liniźnie. Determinant męskości typu Hfr (czynnik F połączony z chromosomem) jest umiejscowiony na końcowym biegunie chromosomu i wnika do biorcy jako ostatni. Położenie czynnika F na dystalnym biegunie chromosomu Hfr potwierdzono również na drodze transdukcji (18). Dla pełnego wyrażenia cechy Hfr u rekombinantów konieczne jest wprowadzenie do biorcy obu biegunów chromosomu: początkowego i końcowego. Ponieważ chromosom często pęka w czasie przekazywania, biorcy bardzo rzadko otrzymują cechę Hfr; powstające rekombinanty są najczęściej F^- .

Szczepy różniące się położeniem punktu O przenoszą różne fragmenty chromosomu. Czasem markery, określone jako pierwszy i końcowy u jakiegoś szczepu wykazują sprzężenie u innego, albo też dany fragment jest przenoszony przez dwa różne szczepy Hfr w odwrotnej kolejności. Względne położenie każdego markera jest jednak zawsze takie samo u wszystkich szczepów.

Na podstawie zachowania się różnych szczepów Hfr Jacob i Wollman (40) wysunęli ogólnie już przyjętą hipotezę o zorganizowaniu materiału genetycznego komórek *E.coli* w postaci kolistego, zamkniętego chromosomu. Przyłączenie się w komórkach Hfr czynnika F w jednym z wielu możliwych miejsc na chromosomie powoduje przerwanie kolistej struktury i przekazywanie chromosomu w zorientowany sposób. Obecnie znanych jest 17 różnych możliwych punktów przyczepu F na chromosomie *E.coli* K12 (50) (rysunek 1).

Sposób przyłączania się episomu do chromosomu nie jest ostatecznie wyjaśniony. Pewne informacje o mechanizmie łączenia się elementu F z chromosomem bakteryjnym uzyskano w wyniku badań nad pośrednimi typami dawców. Komórki takiego dawcy w czasie koniugacji przekazują zarówno markery chromosomalne jak i swój czynnik płciowy w postaci autonomicznej. Adelberg i Burns (1, 2) wyizolowali z jednego ze szczepów Hfr pośredni typ dawcy wykazujący właściwości zarówno populacji Hfr jak i F^+ , z tą różnicą, że częstotliwość przekazywania chromosomu była niższa w porównaniu ze szczepami Hfr, a przeka-

zywanie autonomicznego czynnika mniej częste niż w systemie F^+ . W wyniku krzyżówki z takimi szczepami komórki biorcy otrzymywały charakterystyczny dla tych szczepów czynnik płci stając się dawcami tego samego typu. Adelberg i Burns nazwali takie szczepy F_2 , a dziki typ F oznaczyli jako F_1 . Inni autorzy nadali wspólną nazwę F' wszystkim rodzajom pośrednich typów dawcy, pozostając przy określeniu F dla typu dzikiego. Przekazywanie cech bakteryjnych z komórki do komórki przez czynnik F' nazwano seksdukcją, albo F -dukcją (42).



Rys. 1. Miejsce przyłączenia się episomu F na chromosomie *E. coli* K 12 według (12) Strzałki na zewnętrznym kole oznaczają punkt O i kierunek przekazywania chromosomu przez szczepu Hfr różnego typu

Na wewnętrznym kole oznaczono położenie na chromosomie cech syntezy aminokwasów (leu — leucyny, pro — proliny, try — tryptofanu, his — histydyny, liz — lizyny, arg — argininy, ileu — izoleucyny) tiaminy B₁ i adeniny (ade), fermentacji cukrów (lac — laktozy, gal — galaktozy, mal — maltozy) oraz cechy oporności na faga T_1 .

Badanie kinetyki tworzenia zygot przez szczepy F' wykazało, że w komórkach tych szczepów zachodzi często przejście czynnika płciowego ze stanu autonomicznego w stan przyłączenia i odwrotnie. Połączenie więc czynnika płciowego F' z chromosomem jest u dawcy typu pośredniego nietrwałe.

Najważniejszą różnicą między dzikim czynnikiem płci F a jego pochodnymi F' jest fakt, że te ostatnie posiadają określony rejon homologii z chromosomem bakterii i w wyniku zakażenia komórek biorcy czynnik F' zmienia je w dawców pośrednich przenoszących geny chromosomalne w tej samej sekwencji jak wyjściowy szczep dawcy. Badany przez Adelberga i Burnsa (1, 2) pochodny czynnik F' przyłączał się zawsze w tym samym miejscu na chromosomie bakteryjnym pomiędzy

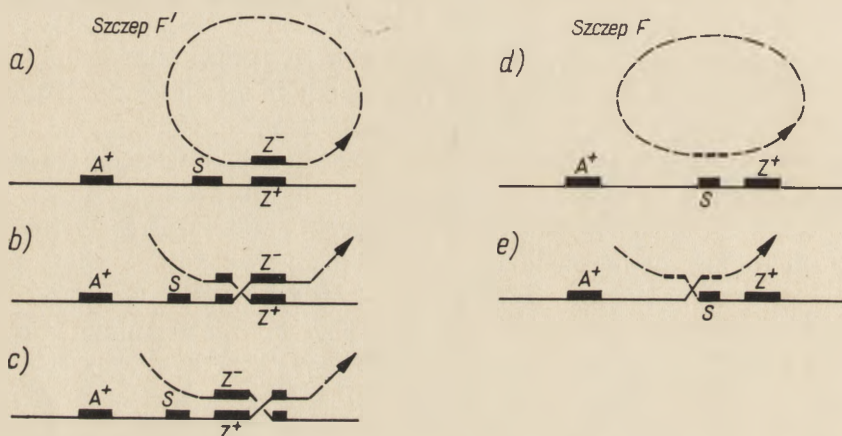
locus pro kontrolującym syntezę proliny, a *locus lac* determinującym fermentację laktozy. W tym regionie był również przyłączony czynnik F w oryginalnym szczepie Hfr, z którego uzyskano nowy typ dawcy. Przypuszczano, że element F' powstaje z czynnika F w wyniku przyłączenia do niego fragmentu chromosomu bakteryjnego, a następnie przemieszcza się do cytoplazmy. Tworzenie czynnika F' byłoby więc analogiczne do powstawania faga λ dg, który również nosi kawałek bakteryjnego chromosomu uzyskanego na drodze rekombinacji profaga λ z genomem gospodarza (3).

Driskell-Zamenhof i Adelberg (20) stwierdzili, że czynnik F' jest prawie dwa razy bardziej wrażliwy na rozpad wbudowanego fosforu radioaktywnego niż element F, co wskazywało, że istotnie F' zawiera jakiś dodatkowy fragment DNA. Dalsze badania (21) wykazały, że właściwości F' zależą od obecności w tym czynniku małego segmentu bakteryjnego chromosomu. Prawdopodobnie ten segment umożliwia parowanie F' z bakteryjnym chromosomem w określonym, homologicznym, zawsze tym samym regionie. Okazało się bowiem, że po wprowadzeniu czynnika F zawierającego region *lac* do szczepu biorcy, mającego w swym chromosomie ubytek DNA w okolicy *lac*, powstaje typ dawcy nie dający się odróżnić od typu dzikiego: wykazuje on niską płodność i różny porządek w przekazywaniu markerów. W tym przypadku czynnik F' nie mógł parować z homologicznym miejscem na chromosomie bakteryjnym i zachowywał się jak czynnik F u dawcy F⁺ typu dzikiego.

Wymiana materiału genetycznego między genomem gospodarza a elementem F najprawdopodobniej jest obustronna. Działając barwnikami akrydynowymi na szczep zawierający czynnik F' uzyskano komórki F⁻ o szczególnych właściwościach. Wprowadzenie bowiem do tych komórek czynnika F pochodzącego z typu dzikiego powodowało powstanie szczepu F' a nie F⁺. Można to tłumaczyć tym, że wprowadzony czynnik F został wbudowany w tym miejscu chromosomu, w którym istniał mały fragment czynnika F pozostawiony po utworzeniu elementu F' w wyjściowym szczepie. Ten fragment episomu F służy prawdopodobnie jako region homologiczny dla łączenia się elementu F' z chromosomem, co powoduje powstanie dawcy typu F'. Pozostawiony na chromosomie fragment czynnika F może więc stanowić o właściwościach specjalnego *locus sfa* (ang. *sex factor affinity*) (2).

Bardzo wnikliwa analiza przeprowadzona przez Scalfego i Grossa (61) wykazała, że punkt O narzucony przez F' nie jest ściśle identyczny z punktem O u oryginalnego szczepu, ale powstaje w obrębie nowego regionu homologii, który znajduje się bardzo blisko dawnego. Do doświadczeń użyto pośredniego dawcę noszącego markery A⁺Z⁻ na chromosomie, a marker Z⁻ na czynniku F'. Gdy takiego dawcę skrzyżowano z biorcą A⁻Z⁻ i krzyżówkę przerwano wcześniej, okazało się,

że gen Z^+ z chromosomu dawcy jest przenoszony ze znaczną częstotliwością jako początkowy marker. Ponieważ gen Z^+ nigdy nie jest przekazywany jako pierwszy marker przez oryginalny szczep Hfr, zmiana kolejności jego wnikania musi być spowodowana powstaniem innego regionu homologii niż u szczepu wyjściowego. Region ten mieści się w obrębie genu Z , który uprzednio został włączony do czynnika F . Można stąd wnosić, że zdolność przekazywania chromosomu przez szczepy pośrednie pojawia się w wyniku przyłączenia na drodze rekombinacji czynnika F' w regionie homologii z chromosomem. Na rysunku 2 przedstawiono schematycznie hipotezę dotyczącą przyczyn różnej orientacji przekazywania materiału chromosomalnego przez szczepy F' , wynikającą z omówionych wyżej doświadczeń.



Rys. 2. Orientacja przekazywania markerów przez szczepy F^+ i F' według (61).

Linia przerywana — element F , linia ciągła — chromosom bakteryjny

Chromosom bakteryjny o cechach A^+ (pierwszy z przekazywanych markerów) i Z^+ (ostatni marker). Strzałki wskazują orientację przekazywania markerów.

a) przedstawia w jaki sposób czynnik F' noszący gen z mutacją Z^- decyduje o miejscu parowania z chromosomem.

b) przy rekombinacji w tym regionie na lewo od genu Z , do biorcy z cechą Z^- będzie przenoszony jako pierwszy allel Z^- i cechy tej nie stwierdzi się u rekombinantów.

c) przy rekombinacji po prawej stronie od genu Z , pierwszym przenoszonym markerem będzie allel Z^+ .

d) czynnik F paruje z chromosomem w rejonie homologii „s”. W wyniku rekombinacji episomu F z chromosomem marker Z^+ przekazywany jest jako ostatni (e).

Nie ma dotąd bezpośrednich dowodów, że czynniki F są całkowicie wbudowane w chromosom w wyniku rekombinacji. Wskazywały na to dane z niektórych prac (70), sugerujące, że element F u komórek Hfr w trakcie przekazywania chromosomu jest podzielony na dwie części, przy czym jedna z nich ma znajdować się na początku chromosomu, a druga na końcu. Jeśli założy się, że dziki czynnik F paruje w jednym z kilkunastu regionów homologicznych dla F na chromosomie w taki sam sposób jak czynnik F' , można przyjąć, że wbudowywanie czynnika F odbywa się również na drodze rekombinacji. Świadczą za tym omówione uprzednio obserwacje (21) o możliwości przyłączenia się elementu

F-lac w różnych miejscach chromosomu, jeśli biorca ma ubytek w chromosomie w regionie lac. Element F-lac jest jednym z czynników F', a w przypadku ubytku na chromosomie w regionie lac zaczyna zachowywać się jak dziki typ F. Ponadto za przyjęciem koncepcji włączania do chromosomu episomów na drodze rekombinacji mogą również — *per analogiam* — przemawiać wyniki badań nad powstawaniem faga λ dg (66). Ten sposób włączania cząstki F do chromosomu tłumaczyłby logicznie większość znanych faktów obserwowanych w procesie koniugacji i rekombinacji u *E.coli* K12 (31).

Możliwe jest jednak, że w pewnych przypadkach episom F nie jest całkowicie wbudowany do chromosomu. Świadczą o tym obserwacje nad przekazywaniem F₁₃, jednego z czynników F'. Po pobraniu F₁₃ przez komórki F⁻ następuje odłączenie materiału chromosomalnego od cząstki F₁₃ i biorcy zostają zmienieni w dawców F⁺ dzikiego typu. Ten proces o uderzającym podobieństwie do procesu indukcji zygocytnej sugeruje, że fragment chromosomu bakteryjnego jest względnie luźno związany z czynnikiem F₁₃. Driskell-Zamenhof (21) wnioskuje z tego doświadczenia, że w komórkach Hfr element F jest najprawdopodobniej tylko przyczepiony w sposób mniej lub bardziej ścisły do chromosomu bakterii.

Obecność czynników płci, zarówno w stanie autonomicznym jak i wbudowanym nadaje komórkom gospodarza nowe właściwości: stają się one dawcami materiału genetycznego, ulegają też zmianie ich zdolności wiązania i namnażają fagów, pewne właściwości powierzchniowe oraz ich ruchliwość. Komórki dawców wykazują większą tendencję do autoaglutynacji i łatwiej pobierają kwaśny barwnik niż komórki F⁻ (10, 17, 48). Wraz z wprowadzeniem czynnika do komórki żeńskiej, nabywa ona nowy antygen powierzchniowy f⁺, obecny tylko w męskich komórkach typu F⁺, Hfr i F' (55, 56). Poza tym stwierdza się u dawców obecność pewnych struktur powierzchniowych, wrażliwych na działanie nadjodanu, które decydują o tworzeniu par koniugacyjnych; działanie nadjodanem na komórki żeńskie nie zmienia ich zdolności koniugacyjnych (64).

Czynnik F, zarówno w stanie autonomicznym jak i przyłączonym, determinuje obecność receptorów dla pewnych fagów zawierających RNA (MS2, μ 2, f2). Fagi te nie adsorbują się na komórkach F⁻ (10, 17). Obecność czynnika F w komórce powoduje natomiast utratę miejsc receptorowych dla fagów namnażających się tylko na szczepach żeńskich (17), a także uniemożliwia lizogenezację łągodnym fagiem tau (27).

Inną jeszcze zmianą występującą w komórkach zawierających F jest ich zmniejszona ruchliwość. Selekcja hodowli w kierunku największej ruchliwości prowadzi do uzyskania komórek F⁻. Przyczyna tego zjawiska nie jest znana (63).

Ta zależność niektórych właściwości komórek od obecności episomu F pozwala przypuszczać, że o wszystkich tych cechach decyduje czynnik F.

Bardzo przekonująco są sugestie Brintona, który na podstawie swych obszernych badań nad czynnikiem F twierdzi, że zdolność do koniugacji, powstawanie nowego antygeny powierzchniowego, obecność receptorów dla adsorbcji fagów „męskich” (adsorbujących się wyłącznie na komórkach męskich wszystkich rodzajów), utrata zdolności do koniugacji po zadziałaniu nadjodanem zależą od obecności na powierzchni komórek dawców pilii typu F. Według Brintona liczba pilii ściśle odpowiada liczbie cząstek czynnika F w komórce, który determinuje ich syntezę (11, 12, 52). Również Knolle (44) oraz Valentine (68) przyjmują, że występowanie antygeny F^+ oraz innych wymienionych powyżej właściwości u komórek dawców są związane z obecnością pilii typu F.

Interesujące jest zagadnienie czy cykl replikacyjny rozpoczyna się zawsze w tym samym miejscu chromosomu. Z danych Nagaty (51) wynikałoby, że włączenie episu F do chromosomu u *E.coli* narzuca nowe miejsce rozpoczęcia replikacji chromosomalnego DNA i kierunek odtwarzania jego nici. U komórek Hfr replikacja DNA chromosomalnego rozpoczynałaby się w hipotetycznym replikatorze czynnika płci i postępowałaby w kierunku przeciwnym do kierunku przekazywania DNA w czasie koniugacji. Natomiast u komórek F^- replikacja rozpoczynałaby się w przypadkowym miejscu na chromosomie (51). Jednak późniejsze dane Berga i Caro (5) wskazują, że integracja episu F tylko u niektórych szczepów lub w szczególnych warunkach doświadczalnych oddziałuje na replikację chromosomu, oraz że wyniki Nagaty (51) zależały od przypadkowego zastosowania takich właśnie szczepów.

Driskell i Adelberg (19) wykazali, że czynnik F zawiera fosfor. Wyniki badań (20) nad wpływem mitomycyny C (hamującej syntezę DNA) na włączanie ^{32}P do cząstek F i F' u *E.coli* K12 wskazywały, że ich podstawowym składnikiem jest DNA. Okazało się, że czynnik F jest około 100 razy mniejszy od chromosomu bakteryjnego, a wielkość badanego F' jest rzędu 3—8% wielkości chromosomu. Bezpośredni dowód, że czynnik F zawiera DNA przedstawili Marmur i wsp. (49). Przekazali oni do biorcy *Serratia marcescens* epism F-lac noszący geny fermentacji laktozy pochodzące z chromosomu *E.coli* K12. Z porównania DNA wyodrębnionego z niezakażonych komórek *Serratia marcescens* z DNA komórek zakażonych wynikało, że przejściu czynnika F-lac towarzyszy pojawienie się nowych, dwóch rodzajów DNA o innej zawartości G+C. Jeden z nich zawierał 50% G+C co jest wartością charakterystyczną dla *E.coli*, drugi — 44% G+C (DNA normalnych komórek *S.marcescens* zawiera 58% G+C). Suma obu rodzajów DNA odpowiadała 1% całkowitej ilości DNA w komórce, przy czym ilość DNA o składzie 44% G+C była dziesięciokrotnie mniejsza niż DNA zawierającego 50% G+C. Badania przeprowadzone przez Hermana i Forro (32) z użyciem komórek F^+ znakowanych tymidyną 3H wykazały również, że przekazywany do F^- materiał radioaktywny wynosi około 1% całego zna-

kowanego DNA komórek F⁺. Silver (62) stwierdził ponadto, że materiał przekazywany do biocy w czasie koniugacji nie zawiera ani RNA, ani białek, przynajmniej w ilościach wykrywalnych stosowanymi metodami analitycznymi.

Prawdopodobnie episom F a także i inne episomy występują w postaci zamkniętego, kolistego i podwójnego łańcucha DNA (31), na co wskazują zachowanie się i niektóre właściwości czynnika F w stanie autonomicznym i zintegrowanym oraz czynników F'. Przymuszenie to zostało poparte przez Rotha i Helinskiego (60), którzy wykazali, że kwas dezoksyrybonukleinowy czynnika kolicynogennego col E₁ z komórek *Proteus mirabilis* col E₁ jest kolistą cząstką.

LITERATURA

1. Adelberg E.A., Burns S.N., *Genetics* **44**, 497 (1959).
2. Adelberg E.A., Burns S.N., *J. Bacteriol.* **79**, 321 (1960).
3. Adelberg E.A., Pittard J., *Bacteriol. Rev.* **29**, 161 (1965).
4. Belser W.L., Bunting M.J., *J. Bacteriol.* **72**, 582 (1956).
5. Berg C.M., Caro L.G., *J. Mol. Biol.* **29**, 419 (1967).
6. Bernstein H.L., *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **12**, 93 (1958).
7. Bhaskaran K., Iyer S.S., *Nature* **189**, 1030 (1961).
8. Borek E., Ryan A., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 67 (1960).
9. Borowski J., w dyskusji: Novick R.P., *Post. Microbiol.* **5**, 345 (1966).
10. Bradley D.E., *J. Gen. Microbiol.* **35**, 471 (1964).
11. Brinton C.C., Gamski P., Carnahan J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 776 (1964).
12. Brinton C.C., *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **27**, 1003 (1965).
13. Cavalli-Sforza L.L., *Boll. Ist. Sieroter. Milano* **29**, 281 (1950).
14. Cavalli-Sforza L.L., Lederberg J., Lederberg E.M., *J. Gen. Microbiol.* **8**, 89 (1953).
15. Clowes R.C., Moody E.E.M., Pritchard R.H., *Genet. Res.* **6**, 147 (1965).
16. Cuzin F., Jacob F., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **260**, 2087 (1965).
17. Dettori R., Maccacaro G.A., Piccinin G.L., *Giorn. Microbiol.* **9**, 141 (1961).
18. DeWitt S., Adelberg E.A., *J. Bacteriol.* **83**, 673 (1962).
19. Driskell P.J., Adelberg E.A., *Bacteriol. Proc.* **186** (1961).
20. Driskell-Zamenhof P.J., Adelberg E.A., *J. Mol. Biol.* **6**, 483 (1963).
21. Driskell-Zamenhof P. J., Bacterial Episomes. The Bacteria, red. I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier, Academic Press, New York, Londyn 1964, tom V, str. 155.
22. Falkow S., Wohlieter J.A., Citarella R.V., Baron L.S., *J. Bacteriol.* **88**, 1958 (1964).
23. Fisher K.W., *J. Gen. Microbiol.* **28**, 711 (1962).
24. Furness G., Rowley D., *J. Gen. Microbiol.* **17**, 550 (1957).
25. Gross J. D., Conjugation in Bacteria. The Bacteria, tom V, red. I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier, Academic Press, New York, Londyn 1964.
26. Gundersen W.B., Jyssum K., Lie S., *J. Bacteriol.* **83**, 616 (1962).
27. Hakura A., Otsuji N., Hirota Y., *J. Gen. Microbiol.* **35**, 69 (1964).
28. Hayes W., *Nature* **169**, 118 (1952).
29. Hayes W., *J. Gen. Microbiol.* **8**, 72 (1953).
30. Hayes W., *Cold. Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **18**, 75 (1953).

31. Hayes W., *The Genetics of Bacteria and their Viruses*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1964.
32. Herman R. K., Forro J. J., *Abstr. Biophysical Soc. FB—II* (1962).
33. Hirota Y., *Nature* **178**, 92 (1956).
34. Hirota Y., Iijima T., *Nature* **180**, 655 (1957).
35. Holloway B.W., Fargie B.J., *J. Bacteriol.* **80**, 362 (1960).
36. Jacob F., Brenner S., Cuzin F., *Cold. Spring Harbour Quant. Biol.* **28**, 329 (1963).
37. Jacob F., Schaeffer P., Wollman L., *Episomic Elements in Bacteria. Microbial Genetics, Tenth. Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, University Press, Cambridge 1960, str. 67.
38. Jacob F., Wollman E.L., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **240**, 2566 (1955).
39. Jacob F., Wollman E.L., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **242**, 303 (1956).
40. Jacob F., Wollman E.L., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **245**, 1840 (1957).
41. Jacob F., Wollman E.L., *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **12**, 75 (1958).
42. Jacob F., Wollman E.L., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **247**, 154 (1958).
43. Kawakami M., Landman O.E., *J. Bacteriol.* **92**, 398 (1966).
44. Knolle P., *Proc. IV Congr. Hung. Association Microbiologists* (1964).
45. Lederberg J., Cavalli L.L., Lederberg E.M., *Genetics* **37**, 720 (1952).
46. Lederberg J., Tatum E.L., *Nature* **158**, 558 (1946).
47. Loutit J.S., Pearce L., *J. Bacteriol.* **90**, 425 (1965).
48. Maccacaro G.A., Comolli R., *J. Gen. Microbiol.* **15**, 121 (1956).
49. Marmur J., Rownd R., Falkow S., Baron L.S., Schildkraut C., Doty P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 972 (1961).
50. Matney T.S., Goldschmidt E.P., Erwin N.S., Scroggs R.A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 278 (1964).
51. Nagata T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 551 (1963).
52. Nishimura Y., Ishibashi M., Meynell E., Hirota Y., *J. Gen. Microbiol.* **49**, 89 (1967).
53. Novick R.P., *Post. Microbiol.* **5**, 345 (1966).
54. Novick R.P., Richmond M.H., *J. Bacteriol.* **90**, 467 (1965).
55. Ørskov F., Ørskov I., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **51**, 280 (1961).
56. Ørskov I., Ørskov F., *Acta Path. Microbiol. Scand.* **48**, 37 (1960).
57. Ørskov I., Ørskov F., *J. Bacteriol.* **91**, 69 (1966).
58. Poston S.M., *Nature* **210**, 802 (1966).
59. Richmond M.H., *Brit. Med. Bull.* **21**, 260 (1965).
60. Roth T.F., Helinski D.R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 650 (1967).
61. Scaife J., Gross J.D., *Genet. Res. Camb.* **4**, 328 (1963).
62. Silver S.D., *J. Mol. Biol.* **6**, 349 (1963).
63. Skaar P.D., Richter A., Lederberg J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**, 329 (1957).
64. Sneath P.H.A., Lederberg J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 86 (1961).
65. Smith H.W., Halls S., *J. Gen. Microbiol.* **47**, 153 (1967).
66. Stern C., *Discussion. Methodology in Basic Genetics.*, red. W.L. Burdette, Holden-Day Inc., San Francisco 1963, str. 129.
67. Takahashi J., Barnard R.A., *Mutation Res.* **4**, 111 (1967).
68. Valentine R. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 156 (1966).
69. Wollman E.L., Jacob F., *Ann. Inst. Pasteur* **95**, 641 (1958).
70. Wollman E.L., Jacob F., *Sexuality and the Genetics of the Bacteria*, Academic Press, New York, Londyn 1961, str. 187.
71. Wollman E.L., Jacob F., Hayes W., *Cold. Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **21**, 141 (1956).
72. Zinder N. D., *Science* **131**, 924 (1960).

BARBARA LUBAS *

Chemiczne i fizyczne zmiany DNA pod wpływem promieniowania jonizującego *in vitro*

Chemical and Physical Changes Produced in DNA by Action of Ionizing Radiation *in vitro*

Radiolysis of DNA and its purine and pyrimidine bases, action of free radicals on DNA derivatives and formation of hydroperoxides is presented. Conformational changes produced by ionizing radiation in DNA macromolecule: main-chain scission, cross-linking and denaturation are discussed.

Ze względu na podstawową rolę DNA w przenoszeniu informacji genetycznej, wpływ promieniowania jonizującego na jego biosyntezę, strukturę i własności ma szczególne znaczenie w naukach biologicznych. Uszkodzenia radiacyjne DNA obejmują zarówno zmiany fizykochemiczne, tzn. zmiany ciężaru cząsteczkowego oraz naruszenie drugo- i trzeciorzędowej struktury, jak i reakcje radiochemiczne w obrębie struktury pierwszorzędowej. Zmiany fizykochemiczne i chemiczne są od siebie nawzajem zależne, a zastosowany w tym artykule podział zagadnień miał na celu jedynie bardziej przejrzyste przedstawienie omawianego materiału.

I. Wydajność podstawowych reakcji radiochemicznych w DNA

Wrażliwość danego układu na promieniowanie można wyrazić jako funkcję liczby przemian wywołanych pod wpływem określonej dawki promieniowania. Wydajność radiacyjną G powstania lub rozpadu jakiegoś związku mierzy się liczbą określonych zmian chemicznych wywołanych przez 100 elektronowoltów pochłoniętej energii.

Początkowe pochłanianie energii promieniowania można traktować jako procesy czysto fizyczne pierwotnych aktów jonizacji i wzbudzenia atomów, przy czym rozkład energii w napromienianym materiale jest przypadkowy i nie zależy od jego budowy chemicznej. Mechanizm popromiennych reakcji chemicznych może być jonowy lub wolnorodnikowy. Na powstawanie wolnych rodników (cząsteczek nie posiadających ładun-

* Mgr. Katedra Chemii Ogólnej Śląskiej Akademii Medycznej, Zabrze-Rokitnica
Wykaz stosowanych skrótów: EPR — paramagnetyczny rezonans elektronowy, LET — liniowa strata energii

ku, ale zawierających niesparowane elektrony) w napromienionych roztworach substancji biologicznych, w tym również DNA, wskazują wyniki badań techniką paramagnetycznego rezonansu elektronowego (EPR) (27, 61, 84, 88). Przekazywanie energii przez rodniki lub jony możliwe jest w roztworze dzięki dyfuzji.

Oddziaływanie między substancją a rodnikami prowadzi do spadku jej stężenia oraz do utraty jej charakterystycznych własności (dezaktywacji). Wyprowadzono teoretycznie (25) zależności na prawdopodobieństwo występowania tych zjawisk ze wzrostem dawki w funkcji stałych szybkości reakcji i wydajności tworzenia rodników. Spadek stężenia substancji ze wzrostem dawki ma charakter wykładniczy zarówno w przypadku substancji czystej jak i w obecności domieszek (7).

Pozwala to stosować pojęcie „dawki 37⁰/o” (D_{37}), tzn. dawki, potrzebnej do obniżenia stężenia lub aktywności substancji do $1/e = 0,37$ początkowej wartości. Wielkość D_{37} może informować o wydajności tworzenia rodników oraz szybkości ich reakcji z substancją.

W tabelicy 1 zestawiono orientacyjne wydajności radiacyjne wszystkich podstawowych reakcji dla napromienianego DNA.

Tabela 1

Wydajność średnia i „dawki 37⁰/o” dla różnych typów uszkodzeń radiacyjnych w DNA (roztwór 0,003⁰/o, napromieniany w powietrzu) (według 89)

Poziom organizacji strukturalnej	Charakter uszkodzenia DNA	D_{37} w kiloradach	Wydajność radiacyjna G/100ev
Struktura trzeciorzędowa	Naruszenie oddziaływań międzycząsteczkowych	< 0,25	> 500
	Zmiany konfiguracji DNA	~ 0,25	~ 500
Struktura drugorzędowa	Przejście formy „B” w „A”	0,25—0,7	500
	Uszkodzenie wiązań wodorowych	~ 9,5	~ 13
Struktura pierwszorzędowa	Uszkodzenia zasad	50	1,5
	Powstawanie wodoronadtlenków	70	1,1
	Dezaminacja	130	0,5
	Pojedyncze zerwania łańcucha	170	0,4
	Defosforylacja	700	0,1
	Sięciowanie	~ 500	~ 0,15
	Degradacja (cięcia poprzeczne podwójnego łańcucha)		
	a) wskutek nałożenia się działania pośredniego i bezpośredniego	1700	0,04
b) wskutek działania bezpośredniego	5 000	0,01	

Jak wynika z tzw. teorii tarczowej Lea (52), znając D_{37} można, przy założeniu równomiernego rozkładu rodników w napromienianym obiekcie biologicznym, wyliczyć dla tego obiektu tzw. promienioczułą objętość

efektywną lub efektywny promieniocyfły ciężar cząsteczkowy. Obie te wielkości są odwrotnie proporcjonalne do D_{37} przy czym współczynniki proporcjonalności wylicza się, przyjmując założenie (9, 66), że na jeden akt jonizacji przypada energia 60 eV, a na jeden gram substancji biologicznej i dawkę 1 rada — energia 87 ergów.

Dla większości makrocząsteczek biologicznych — enzymów, hormonów, fagów, wyznaczone w ten sposób objętości i ciężary cząsteczkowe efektywne dobrze pokrywają się (34, 43) z rzeczywistymi ciężarami cząsteczkowymi określonymi z pomiarów fizykochemicznych. Dla jednoniciowego DNA z faga 174 G i n o z a (34) wyliczył, w oparciu o $D_{37} = 386$ kiloradów, efektywny ciężar cząsteczkowy wynoszący $1,74 \times 10^6$, co dobrze zgadza się z fizycznym ciężarem tego typu DNA, znalezionym przez S i n s h e i m e r a (85).

II. Sekwencja reakcji radiochemicznych w DNA

Radioliza DNA przy różnych jego stężeniach w roztworze zależy od wielkości strat jonizacyjnych i wydajności tworzenia rodników na każdy akt jonizacji. Wskazuje na to zgodność danych ze spektrofotometrii wodnych roztworów DNA z wydajnościami tworzenia rodników w suchym DNA oznaczonymi techniką EPR (83, 84, 88). Wydajność tworzenia rodników jest analogiczna dla suchego DNA i dla wody i waha się w granicach 1—2 rodników na jedną parę jonów czyli 3—6 rodników na 100 eV (45). W suchym DNA sygnał EPR osiąga wartość nasycenia w zakresie dawek 100—200 kiloradów, a maksymalną wydajność rodników obserwuje się dla dawek mniejszych od 100 kiloradów, przy wyższych zaś wydajność ta spada i np. po dawce 1 megarada jest rzędu zaledwie 0,17—1,7/100 eV (88).

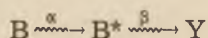
Podstawowe popromienne uszkodzenia chemiczne DNA związane są ze zmianami w obrębie zasad azotowych. Stwierdzono (8, 26, 31), że zasady pirymidynowe są bardziej wrażliwe na promieniowanie niż purynowe.

Krzywe wydajności radiacyjnej dla wolnych nukleozydów (44, 46) i dla nukleotydydów (72) świadczą, że wiązania glikozydowe ani fosfodwuestrowe nie chronią zasad przed atakiem ze strony wolnych rodników. Podobnie połączenie nukleotydydów w łańcuch polinukleotydydowy, wiązania wodorowe między komplementarnymi zasadami w podwójnej spirali DNA, a także sama spiralizacja nie daje takiego efektu ochronnego, przy dowolnym stężeniu napromienianych wodnych roztworów DNA (8). Z dobrym przybliżeniem można więc wyliczyć wydajność radiacyjną radiolizy DNA z wyrażenia:

$$G = \frac{G_{G-C} \cdot C_{G-C} + G_{A-T} \cdot C_{A-T}}{2} \quad 1$$

gdzie C_{G-C} i C_{A-T} — procentowe zawartości molowe odpowiednio dla zasad pirymidynowych i purynowych w cząsteczce, G_{G-C} i G_{A-T} — średnie wydajności radiacyjne odpowiednio dla zasad pirymidynowych i purynowych.

Rossberg (71) zaproponował następujący tok reakcji radiochemicznych w DNA:



gdzie B — liczba zasad (o współczynniku ekstynkcji E) w spirali DNA,

B^* — liczba uwolnionych zasad (o współczynniku ekstynkcji $E' = kE$),

Y — stężenie produktów o współczynniku ekstynkcji $E = 0$, wytworzonych wskutek reakcji radiochemicznych,

α — współczynnik wydajności uwalniania zasad przez depolimeryzację,

β — współczynnik wydajności tworzenia produktów radiochemicznych.

Na podstawie równań opisujących spadek liczby zasad i stężenie wolnych zasad w funkcji dawki oraz współczynników α i β (15, 24) Rossberg (70) znalazł teoretycznie analityczną formę zmiany maximum ekstynkcji w funkcji dawki, współczynników ekstynkcji oraz współczynników α i β . Dane teoretyczne okazały się zgodne z doświadczalnymi, co potwierdziło słuszność schematu. Współczynniki α i β zależne są od stężenia roztworu i można je wyznaczyć doświadczalnie. Z pomiarów lepkości napromienianych roztworów DNA wynika (70), że zawsze $\alpha > \beta$.

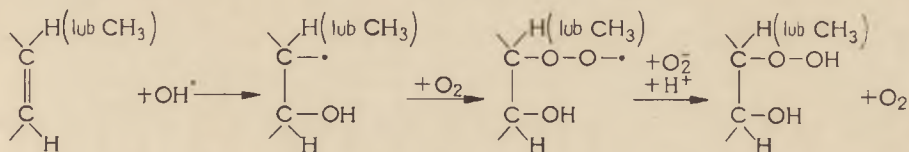
Wyliczono (76,77), że około 20% wolnych rodników w roztworze atakuje w DNA rybozę powodując utlenienie wiązań i hydrolizę a wskutek tego rozerwanie łańcucha i uwalnianie się zasad. Pozostała część (80%) rodników powoduje utlenianie i wtórne zmiany chemiczne zasad w łańcuchu DNA.

III. Utlenianie i wtórne zmiany zasad pirymidynowych

Przyczyną dużej wrażliwości zasad pirymidynowych na promieniowanie jest łatwość utleniania pod wpływem wolnych rodników wiązania w położeniu 4—5 pierścienia; w purynach miejsce to jest chronione pierścieniem imidazolowym.

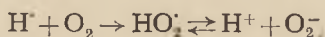
Fakt, że w napromienianym roztworze kwasy nukleinowe są utleniające na 4—5 wiązaniu pirymidyn wykazali Scholes, Weiss i Whe-

eler (82), a potwierdzili Ekert i Monier (28, 29, 30). Według Scholesa, Weissa i Wheelera, podwójne wiązanie 4—5 pod wpływem promieniowania otwiera się, powodując powstanie hydroksywodoronadtlenku. Proces ten składa się z trzech etapów (schemat 1).



Schemat 1. Etapy powstawania hydroksywodoronadtlenku przy radiolizie DNA

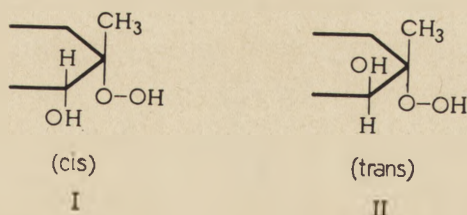
1. promieniowanie powoduje radiolizę wody, a rodnik OH^\bullet działając na 4—5 podwójne wiązanie pirymidyny daje rodnik hydroksyhydropirymidylowy
2. rodnik ten wchodzi w reakcję z obecnymi w roztworze cząsteczkami tlenu powodując powstanie rodnika hydroksyhydronadtlenopirymidynowego
3. jon O_2^- , powstający w reakcji



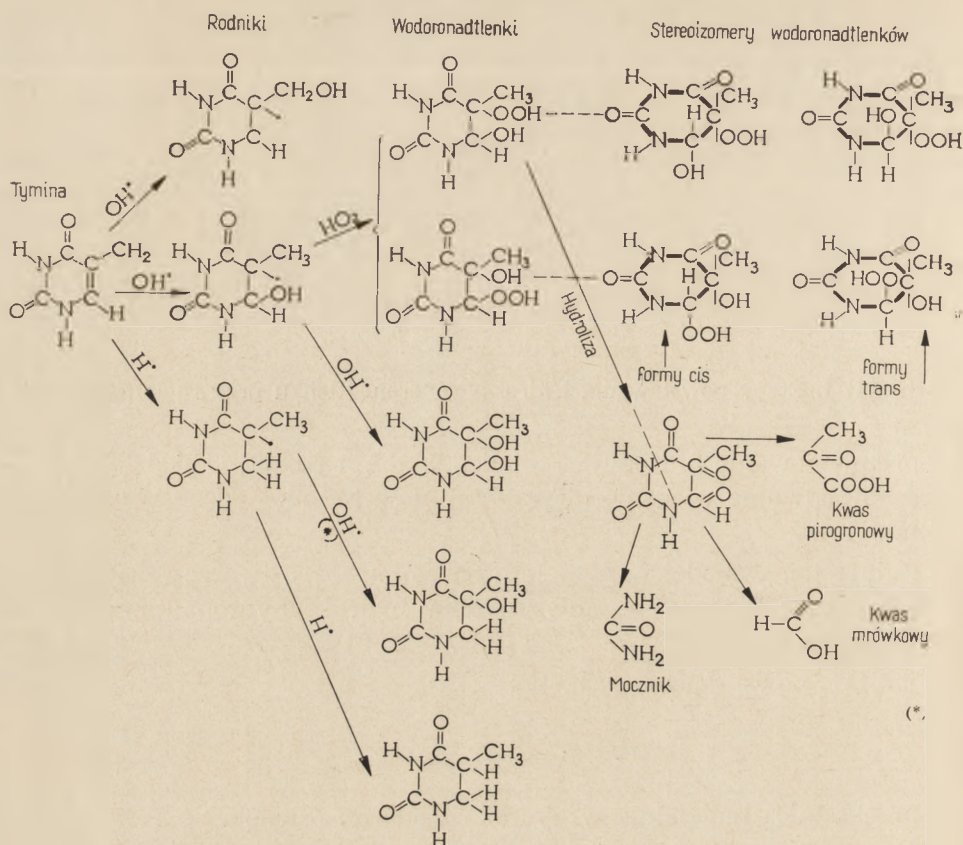
przekształca ten rodnik w hydroksywodoronadtlenek.

Losy powstałych nadtlenków zmieniają się zależnie od zasady, w której one występują, rozpatrzmy więc kolejno tyminę i cytozynę.

Wydajność radiacyjna uszkodzeń tyminy jest duża — wynosi $G = 2,4$ dla roztworu 10^{-3} M (51). Podstawową reakcją jest utlenianie tyminy z powstaniem hydroksywodoronadtlenku. Wydajność jego tworzenia wynosi jednak jedynie $G = 0,85$ (51), ponieważ jest on częściowo niszczony przez promieniowanie. Nadtlenek tyminy jest dosyć trwały. Posiada on dwa izomery przestrzenne: *cis* (80%) i *trans* (20%) (29):



przy czym w temperaturze pokojowej forma *cis* może przechodzić w *trans*. Procesy związane z przekształceniami radiacyjnymi tyminy przedstawia schemat 2.



Schemat 2. Schematyczny przebieg reakcji radiochemicznych przy napromieniowaniu tyminy (wg 28, 29)

(*) — reakcje przeważające w warunkach beztlenowych lub przy niedoborze tlenu.

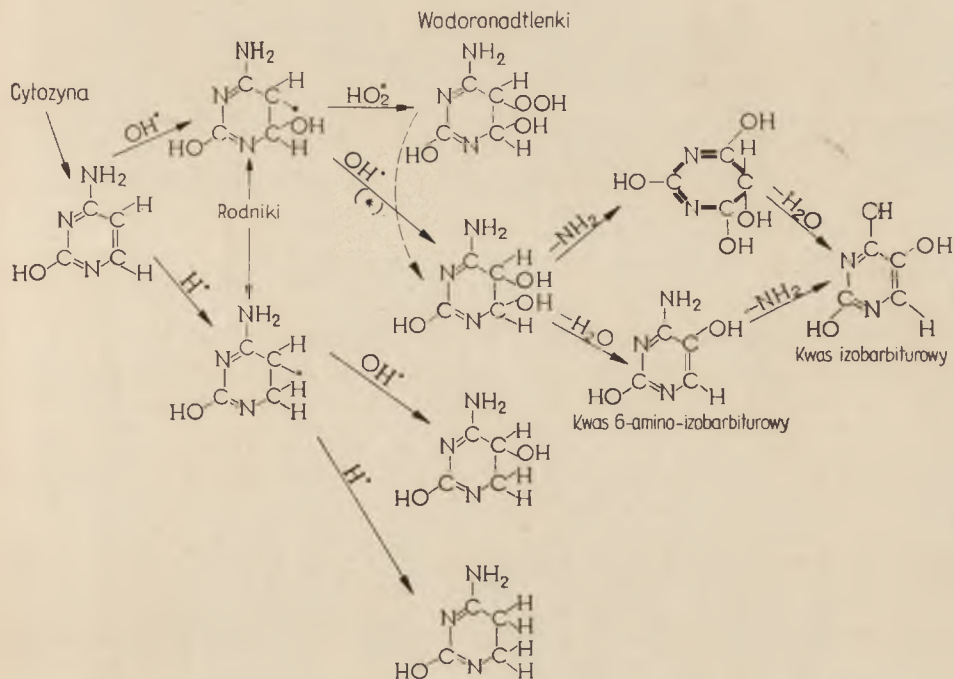
W rezultacie hydrolizy powstałe wodoronadtlenki rozpadają się często na produkty prostsze: kwas pirogronowy, kwas mrówkowy i mocznik.

Wodoronadtlenek powstający przy radiolizie cytozyny jest nietrwały i rozpada się z uwolnieniem tlenu do glikolu (30, 50, 51). Wydajność tej reakcji wynosi $G = 0,12$ (51). Glikol cytozyny też nie jest trwały i przekształca się w kwas izobarbiturowy, na dwóch możliwych drogach:

a. przez uwolnienie NH_2 , a następnie wody ($G = 0,2$)

b. przez uwolnienie wody (przejście w 5-hydroksycytozynę), a następnie uwolnienie NH_2 ($G = 0,34$).

Opisane procesy przedstawiono schematycznie według Ekerta i Moniera (30) na schemacie 3, uwzględniając również powstanie rodnika hydropirymidylowego i dwóch innych typów wodoronadtlenków.

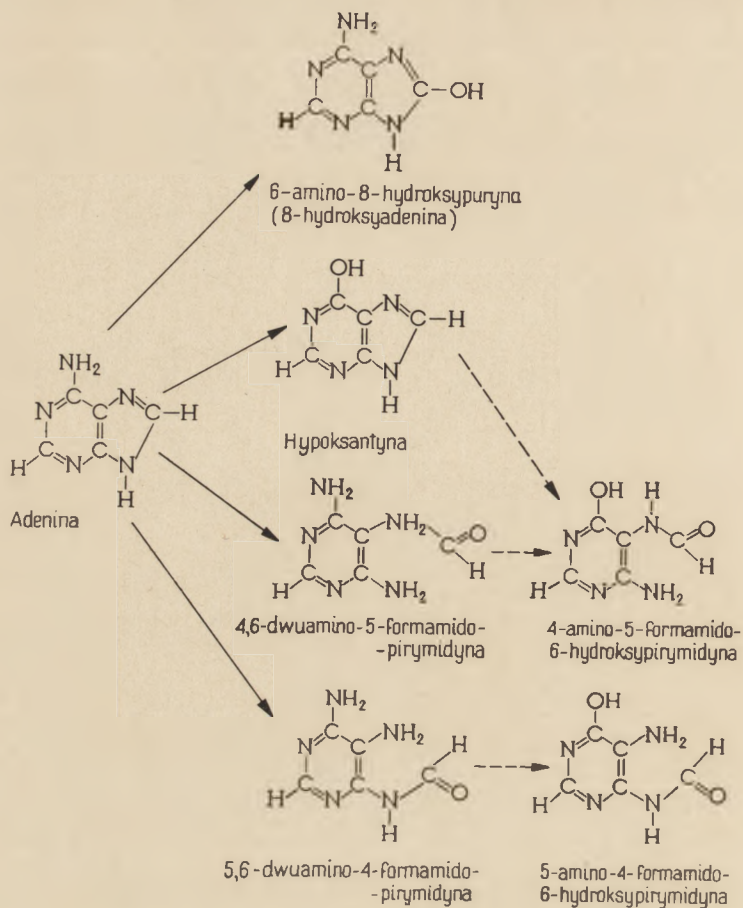


Schemat 3. Schematyczny przebieg reakcji radiochemicznych przy napromieniowaniu cytozyny (wg 30)

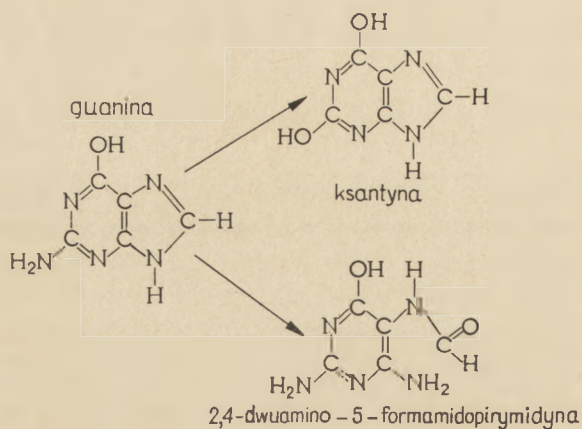
IV. Radioliza zasad purynowych

Proces ten jest słabiej zbadany niż radioliza zasad pirymidynowych. Podstawowe reakcje radiochemiczne zasad purynowych wynikają z prac H e m s a (39, 40, 41) oraz P o n n a m e r u n y i w s p. (67, 68). Autorzy ci stwierdzili, że przy napromienianiu adeniny możliwe są dwie drogi zmian chemicznych: z zachowaniem układu pierścienia pirymidyny i imidazolu oraz z otwarciem pierścienia imidazolowego. W pierwszym przypadku powstaje 8-hydroksyadenina (z wydajnością $G = 0,20$) i hipoksantyna (z wydajnością $G = 0,05$). Otwieranie pierścienia imidazolowego, którego czułość na promieniowanie jest około 2,5 razy większa niż pirymidynowego (51) powoduje powstanie czterech typów związków formamidowych (schemat 4).

Związki formamidowe oraz ksantyna są również produktami radiolizy guaniny. H e m s (41) zidentyfikował tu — oprócz ksantyny — 2,4-dwumino-5-formamido-6-hydroksypirymidynę (schemat 5).



Schemat 4. Schemat radiolizy adeniny (wg 40)



Schemat 5. Schemat radiolizy guaniny (wg 67, 68)

V. Wpływ tlenu na radiolizę zasad

Przy napromienianiu roztworów wodnych zasad pirymidynowych w środowisku beztlenowym rodnik hydroksyhydropirymidyłowy reaguje z drugim rodnikiem OH^\cdot do formy glikolowej:



Schemat 6. Schemat radiolizy zasad pirymidynowych w środowisku beztlenowym

Wydajności tworzenia glikolu tyminy w środowisku beztlenowym wynoszą: $G = 0,51$ dla izomeru *cis* i $0,38$ dla izomeru *trans* (60). Oprócz glikoli przy beztlenowym napromienianiu tyminy powstają ponadto 5-hydroksy-6-dwuhydrotymina oraz 5,6-dwuhydrotymina (29, 60). Glikol tyminy jest produktem trwałym (12) w odróżnieniu od glikolu cytozyny (p. rozdz. III).

Sądząc ze schematów 2 i 3, odpowietrzanie roztworów nie powinno silnie wpływać na sumaryczną wydajność radiolizy pirymidyn, ponieważ w środowisku beztlenowym mogą zachodzić wszystkie reakcje działania rodników z wyjątkiem tworzenia hydroksywodoronadtlenków, a reakcje z rodnikami OH_2^\cdot są zastąpione reakcjami z rodnikami H^\cdot . Dane doświadczalne (8, 47, 75) potwierdzają te przypuszczenia — wydajności radiolizy zasad pirymidynowych w obecności tlenu są jedynie niewiele wyższe niż dla środowiska beztlenowego. Przy napromienianiu wodnych roztworów zasad pirymidynowych w atmosferze powietrza krzywe zależności liczby niezmienionych zasad od dawki mają charakter wykładniczy aż do 200—300 kiloradów i nie zmieniają nachylenia po przekroczeniu dawki 70 kiloradów kiedy w roztworze wyczerpuje się praktycznie cały tlen, ani też po dodatkowym nasyceniu roztworów tlenem (47, 75, 89).

Sprawa wpływu tlenu na radiolizę zasad purynowych nie jest ostatecznie wyjaśniona. W środowisku beztlenowym sumaryczne wydajności radiolizy puryn są 2—2,5-krotnie niższe niż w warunkach nasycenia tlenem, a ponadto inny tu jest skład końcowych produktów radiolizy (11, 21, 41). Jak dotąd nie wyjaśniono jednak, czy radioliza puryn przebiega poprzez etap wodoronadtlenków. Nie jest wykluczone, że w obecności tlenu tworzą się nietrwałe wodoronadtlenki (z uwolnieniem amoniaku i kwasu mrówkowego lub dwutlenku węgla), które następnie rozpadają się do kwasu szczawiowego i mocznika. Znaleziona w warunkach nadmiaru tlenu większa ilość amoniaku może świadczyć o rozpadzie nietrwałych związków formamidowych (41, 42).

VI. Powstawanie związków swobodnych

Jak już wspomniano, przy napromienianiu DNA oraz nukleotydów i zasad zawierających grupy aminowe powstaje swobodny amoniak w ilości proporcjonalnej do dawki (8, 47, 53, 80).

Dezaminacja DNA i jego zasad nigdy nie polega jedynie na oderwaniu grupy aminowej, lecz na degradacji całej cząsteczki z rozerwaniem pierścieni imidazolowych i pirymidynowych. Świadczy o tym np. fakt, że przy radiolizie adeniny i guaniny powstaje nie jedna lecz 1,5 cząsteczki NH_3 na każdą rozpadającą się cząsteczkę zasady (78, 80).

Przy napromienianiu kwasów nukleinowych i nukleotydów zachodzi również defosforylacja. Uwalnianie anionu PO_4^{3-} może zachodzić wskutek dwóch różnych mechanizmów: bezpośredniego działania promieniowania jonizującego, powodującego rozerwanie w łańcuchach wiązania 3'-4' oraz wskutek działania pośredniego przez utlenienie atomu węgla w położeniu 5', co prowadzi do hydrolizy. Do uwolnienia grupy fosforanowej konieczne jest rozerwanie łańcucha odpowiednio w dwóch miejscach toteż ilość powstającego fosforanu jest w przybliżeniu proporcjonalna do kwadratu dawki (14, 79).

Wydajności molowe reakcji dezaminacji i defosforylacji zależą od atmosfery w jakiej przeprowadzane jest napromienianie (tablica 2). Reakcja dezaminacji w atmosferze tlenu wykazuje maksymalną wydajność radiacyjną około trzykrotnie większą niż w próżni, co świadczy, że proces ten związany jest z działaniem rodników utleniających OH^\cdot i OH_2^\cdot (47, 67).

Tablica 2

Wydajność reakcji dezaminacji i defosforylacji w DNA w zależności od atmosfery napromieniowania

(roztwór 0,05%; dawka 150 kiloradów) (wg 80)

Atmosfera	Wydajność dezaminacji $\left(\times 10^5 \frac{\text{mola}}{\text{dm}^3}\right)$	Wydajność defosforylacji $\left(\times 10^5 \frac{\text{mola}}{\text{dm}^3}\right)$
Tlen	6,3	—
Powietrze	5,0	0,8
Wodór	3,1	1,2
Próżnia	2,3	9,2

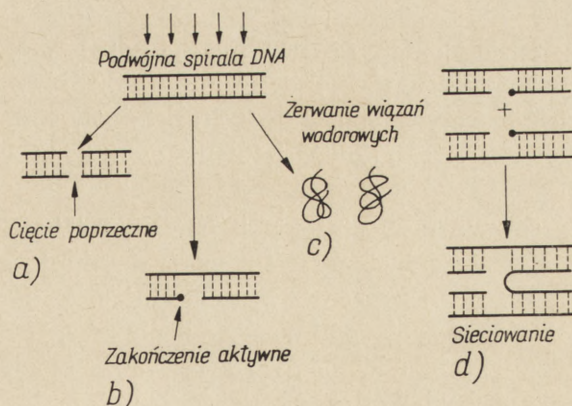
Na obie reakcje wpływa ponadto wyraźnie pH środowiska, przy czym istnieje korelacja między krzywymi ich wydajności przy tym samym pH (8). Dla nukleotydów i polinukleotydów wydajności te osiągają maksimum przy $\text{pH} = 7$, a minimum w środowisku silnie zasadowym i słabo kwaśnym.

Wśród związków swobodnych powstających przy napromienianiu nukleozydów, nukleotydów i DNA zidentyfikowano ponadto estry fosforanowe (46, 47) oraz związki karbonylowe (46, 64). Powstawanie związków karbonylowych jest związane z radiolizą rybozowej części nukleozydów, przy czym wydajność ich tworzenia jest dużo wyższa przy radiolizie nukleozydów purynowych niż pirymidynowych (46, 47). Wydajności tworzenia związków karbonylowych i nietrwałych estrów są dla danego związku bardzo zbliżone, co nasuwa przypuszczenie, że tworzą się one w wyniku tych samych reakcji utleniających.

VII. Typy i charakterystyka zmian konformacyjnych

Zależnie od warunków napromieniania mogą w DNA występować w różnym stopniu następujące zmiany fizyczne cząsteczek (10):

1. *Degradacja*, czyli równoczesne złamanie obydwu łańcuchów podwójnej spirali (rys. 1a) z przegrupowaniem atomów na końcach złamania, co prowadzi do spadku średniego ciężaru cząsteczkowego.
2. *Pojedyncze złamanie łańcucha* z wytworzeniem tzw. *zakończeń* (lub centrów) *aktywnych* (rys. 1b), które w obecności tlenu ulegają utlenieniu, rozpoczynając cykl opisanych w poprzednim rozdziale reakcji chemicznych, a przy braku tlenu prowadzą do tzw. sieciowania.
3. *Sieciowanie* (rys. 1d), polegające na łączeniu się zakończeń aktywnych dwóch różnych drobin DNA o odpowiadającej sobie konfiguracji, co prowadzi do wzrostu średniego ciężaru cząsteczkowego.
4. *Niszczenie wiązań wodorowych* między komplementarnymi zasadami podwójnej spirali, prowadzące do denaturacji czyli przejścia uporządkowanej spirali w nieuporządkowane kłęбки (rys. 1c).



Rys. 1. Typy zmian konformacyjnych podwójnej spirali DNA pod wpływem promieniowania (wg 1, 4)

Degradacja i sieciowanie właściwe są większości napromienianych w roztworze polimerów. Zjawiska te charakteryzować można przez parametry p (gęstość pęknięcia łańcucha) i q (gęstość sieciowania) wyrażające stosunek liczby pęknięć lub jednostek usieciowanych do liczby jednostek podstawowych łańcucha. Dla jednołańcuchowych polimerów oba te parametry nie zależą od mocy dawki, a do dawki D są wprost proporcjonalne (19):

$$p = k \cdot D; \quad q = l \cdot D \quad 2$$

Współczynniki k i l oznaczają odpowiednio podatność polimeru na pęknięcie lub sieciowanie.

Prawdopodobieństwo degradacji dwuniciowego DNA, tzn. równoczesnego zerwania leżących naprzeciw siebie wiązań między monomerami w obu łańcuchach można w świetle wzoru (2) zapisać w formie

$$p^2 = k^2 D^2 \quad 3$$

Uwzględniając jednak poprawkę na pojedyncze pęknięcia, które mogą istnieć w obrębie jednej nici przed napromienieniem prawdopodobieństwo to wyrażono (24) wzorem

$$p^2 = k^2(D^3 + D_0^2 + \xi DD_0) \quad 4$$

gdzie D_0 oznacza dawkę promieniowania, po której hipotetyczny pojedynczy łańcuch DNA zawierający wszystkie nukleotydy obecne w 1 ml roztworu zostałby tak zdegradowany, że jego średni ciężar cząsteczkowy byłby równy wyjściowemu średniemu ciężarowi cząsteczkowemu danego DNA,

$\xi = 2$, jeśli wyjściowy DNA zawiera pojedyncze pęknięcia o rozkładzie przypadkowym w liczbie porównywalnej z liczbą końców podwójnego łańcucha,

$\xi = 0$, jeśli w nienapromienionym DNA nie ma pojedynczych pęknięć i $0 < \xi < 2$, dla przypadków pośrednich.

Zgodność wyliczeń teoretycznych w oparciu o to równanie z danymi doświadczalnymi posłużyło jako dowód istnienia dwuniciowego DNA w roztworze (24).

Degradacja przeważa przy stężeniach poniżej 0,4% polimeru w roztworze, ale już przy stężeniach powyżej 0,6% dominuje sieciowanie (6). Prawdopodobieństwo utworzenia wiązania sieciującego można opisać iloczynem ac , gdzie c — stężenie polimeru w roztworze, a — współczynnik proporcjonalności (prawdopodobieństwo rozerwania łańcucha bez utworzenia wiązania wynosi wtedy $1-ac$).

Liczbę usieciowanych jednostek przypadających na wagowo średnią cząsteczkę określa się jako współczynnik sieciowania δ . Gdy $\delta = 1$ w roz-

tworze zaczyna się tworzyć nierozpuszczalna struktura usieciowania (20). Punkt ten nosi nazwę punktu żelowania a odpowiadająca mu dawka promieniowania — dawki żelowania. Jak wynika z teoretycznych rozważań *Alexandra i Charlesby'ego* (1) dawkę żelowania dla polimeru można wyrazić w postaci

$$D_{\text{žel}} = \frac{NE}{aM} \cdot \frac{ac}{4-5e^{-ac}} \quad 5$$

gdzie N — liczba Avogardo

E — energia zaabsorbowana przy aktywacji przez jednostkę monomeru,
 M — początkowy średni ciężar cząsteczkowy.

Jeżeli $ac < 0,223$, żel nie wytworzy się mimo dowolnie dużej dawki. Minimalna dawka promieniowania dla tworzenia żelu $(D_{\text{žel}})_{\text{min}} = 0,46 NE/aM$. Dla większości polimerów „ a ” ma wartość rzędu 50, a zatem

$$(D_{\text{žel}})_{\text{min}} = 9 \cdot 10^7 E/m.$$

Przy wyższych stężeniach $D_{\text{žel}}$ rośnie, ponieważ na pojedynczą cząsteczkę przypada wówczas mniejsza część całkowitej ilości promieniowania. Ta teoretyczna zależność dawki żelowania od stężenia została dla DNA potwierdzona doświadczalnie.

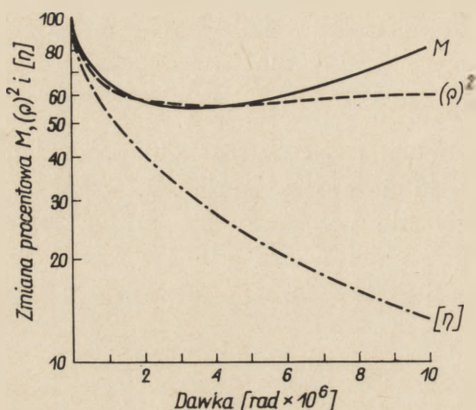
VIII. Degradacja i sieciowanie drobin DNA

Zmiany ciężaru cząsteczkowego DNA związane z degradacją i sieciowaniem zależą, poza dawką, od warunków napromieniania, a zwłaszcza od obecności tlenu, zawartości wody w próbce oraz od energii promieniowania. Naturę tych zmian określa się mierząc lepkość istotną $[\eta]$, średni ciężar cząsteczkowy M oraz wyznaczając promień bezwładności ρ z pomiarów rozpraszania światła. *Alexander* i wsp. (4) założyli, że DNA zachowuje się w roztworze jak usztywniona spirala, dla której

$$M = 1.15 \rho^2 = 9.1 \cdot 10^6 [\eta] \quad 6$$

jeżeli ρ wyraża się w angströmach, a $[\eta]$ w dl/g. Okazało się następnie (55), że przy napromienianiu w powietrzu zmiany tych parametrów są w przybliżeniu te same dla DNA suchego i zawierającego niewielką (do 25%) ilość wody. Ze wzrostem dawki lepkość istotna maleje monotonicznie, natomiast zmiany M i ρ^2 (rysunek 2) wskazują, że proporcjonalność wyrażona wzorem 6 zostaje zakłócona. Poza to przy dawkach większych niż $2 \cdot 10^6$ radów obserwuje się przy zmianach ciężaru cząsteczkowego różnicę dla zerowej i 25%-owej zawartości wody w próbce.

Opisane zależności między M , ρ i $[\eta]$ można tłumaczyć zakładając, że w DNA suchym lub o niewielkiej zawartości wody przy małych dawkach przeważa degradacja, przy większych — sieciowanie. Wzajemne nakładanie się obu tych procesów powoduje, że M i ρ^2 są w przybliżeniu



Rys. 2. Zależność zmian ciężaru cząsteczkowego, promienia bezwładności i lepkości istotnej DNA od dawki przy napromieniowaniu elektronami (wg 55)

stałe, gdyż straty długości cząsteczki kompensuje jej rozgałęzienie, natomiast lepkość istotna $[\eta]$, która w odróżnieniu od M i ρ określa w pierwszym przybliżeniu jedynie długość cząsteczki, stale maleje ze wzrostem dawki.

Zmiany ciężaru cząsteczkowego napromienianego DNA wskutek degradacji oceniano również ze zmian stałych sedymentacji (86), posługując się wzorem Mandelkerna i wsp. (58).

1. Wpływ wody

Wiązanie poprzeczne może powstać, jak już wspomniano, wskutek atakowania obojętnej cząsteczki przez zakończenie aktywne lub przez rekombinację dwóch zakończeń aktywnych, przy czym drugi z tych procesów daje większe prawdopodobieństwo utworzenia wiązania. Ponieważ szansa spotkania się dwóch aktywnych zakończeń o odpowiadającej sobie konfiguracji zależy od ruchów cząsteczek, wzrośnie ona wybitnie przy zwiększonej ilości wody w próbce (w suchym DNA rekombinacja zdarza się jedynie przypadkowo). Z drugiej jednak strony w rozcieńczonych roztworach duże odległości między drobinami utrudniają sieciowanie.

Wpływ wody na zależność zmian M , ρ i $[\eta]$ od dawki dla DNA napromienionego w powietrzu zbadali Lett i Alexander (54). Stwier-

dzili oni, że ze wzrostem zawartości wody w DNA lepkość istotna spada liniowo, a sądząc z charakteru zmian ciężaru cząsteczkowego maleje prawdopodobieństwo tworzenia wiązań poprzecznych. Uzupełnianie się procesów sieciowania i degradacji powoduje, że ze wzrostem zawartości wody w próbce DNA zawartość frakcji żelowej początkowo rośnie, a następnie spada (tablica 3).

Tablica 3

Zależność współczynnika degradacji oraz procentowej zawartości żelowej frakcji DNA od procentowej zawartości wody w próbce dla dawki 10^6 radów (według 54)

Zawartość wody w %	Współczynnik degradacji $\times 10^9$	Zawartość żelowej frakcji DNA w %
50	9,1	16,2
100	13,4	40,0
150	18,2	47,6
200	22,5	45,7
250	26,9	20,0
300	31,3	3,3
400	40,2	2,4

W obecności dużej ilości wody wyraźnie zaznacza się wpływ wytwarzania rodników. Stosunek efektywności bezpośredniego i pośredniego działania promieniowania wynosi wówczas koło 1,3.

2. Wpływ tlenu

Lett, Stacey i Alexander (55) stwierdzili, że przy napromienianiu w powietrzu wzrost ciężaru cząsteczkowego DNA jest mniejszy niż w próżni, czyli że obecność tlenu sprzyja przewadze degradacji nad sieciowaniem. Efekt ten nie jest wywołany wzrostem liczby cięć poprzecznych, ponieważ przy małych dawkach obecność tlenu nie wpływa na spadek lepkości istotnej. Wyjaśniono następnie (2), że w obecności tlenu, zwłaszcza zaś przy dużej zawartości wody zmniejsza się liczba wiązań poprzecznych wskutek utleniania centrów aktywnych.

3. Wpływ rodzaju promieniowania

Zmiany własności fizyko-chemicznych DNA pod wpływem cząstek α z polonu (3) wskazują, że przy niskich dawkach napromienianie powoduje praktycznie jedynie degradację molekuł, a sieciowanie jest znikome, w związku z czym zależność M , ρ i $[\eta]$ podana we wzorze 6 nie zostaje zakłócona. Dopiero przy dawkach większych od 3×10^6 radów spada jedynie

$[\eta]$ a M i q^2 nie maleją wskutek sieciowania. Efekty te są pozatem w bardzo niewielkim stopniu zależne od zawartości wody i tlenu. Ze spadku lepkości istotnej można wyliczyć, że przy napromienianiu cząstkami α wystąpi jedno cięcie poprzeczne łańcucha na każde 600—700 eV pochłoniętej energii, bez względu na zawartość wody w próbce. Wartość ta niższa niż dla elektronów zgodna jest z wartością średniej straty energii przy przejściu cząstek α przez łańcuch DNA. Przyjmując bowiem, że liniowa strata energii (LET) dla cząstek o energii 3—4 MeV przy przejściu przez obiekt biologiczny wynosi 105—145 keV (3, 5), a średnia droga przez element łańcucha DNA wynosi 62 Å (48) wyliczamy stratę energii równą 650—900 eV. Gęstość jonizacji jest tak duża, że łatwo powstają złamania równoczesne w dwóch łańcuchach, co prowadzi do degradacji drobin, natomiast złamania pojedyncze z wytworzeniem zakończeń aktywnych zdolnych do sieciowania właściwe są raczej elektronom wtórnym (promieniowanie δ), które mają dużo niższą wartość współczynnika LET.

Zmiany lepkości istotnej oraz ciężaru cząsteczkowego DNA w roztworach wodnych pod wpływem promieni γ z ^{60}Co świadczą, że mechanizm działania tego promieniowania jest podobny jak przy napromienianiu elektronami. Stwierdzono też (16), że spadek lepkości charakterystycznej DNA ze wzrostem dawki oraz efektywność pośredniego i bezpośredniego działania są bardzo podobne dla wiązki elektronów o energii 15 MeV i dla promieniowania X o napięciu szczytowym 140 kV.

Przy napromienianiu DNA *in vitro* miękkim promieniowaniem X stwierdzano metodą chromatografii kolumnowej, że dawki do 1 kilorada nie powodują zmian ciężaru cząsteczkowego, ale już dawka 10 kiloradów wywołuje przesunięcie ku wyższym gradientom, świadczące o sieciowaniu drobin (35).

4. Wpływ rodzaju i pochodzenia DNA

Dla oszacowania uszkodzenia DNA przy małych dawkach wygodniej jest odnosić wydajność efektu poradiacyjnego do pojedynczego aktu jonizacji lub reakcji z rodnikiem, niż do dawki. Liczbę pierwotnych aktów jonizacji w DNA można wyliczyć znając „dawkę 37%” dla komórek z których izolowano DNA (36).

Określa się w ten sposób minimalną liczbę potencjalnych uszkodzeń, nie uwzględniając działania pośredniego poprzez rodniki wytworzone w środowisku.

Jak widać z tablicy 4 najmniejszą liczbę bezpośrednich uszkodzeń przypadającą na D_{37} charakteryzuje się DNA izolowany z fagów nieco większą DNA z bakterii i drożdży, jeszcze większą DNA pochodzenia zwierzęcego a maksymalną DNA rośliny.

Tablica 4

Porównanie liczby bezpośrednich uszkodzeń radiacyjnych dla DNA izolowanego z różnych organizmów (według 36)

Organizm	Zawartość DNA w komórce w g	D ₃₇ w radach	Liczba bezpośrednich uszkodzeń w DNA przypadająca na D ₃₇
Fagi S-13 i Φ X-174	4×10^{-18}	250 000	0,9
Fag T ₁	8×10^{-17}	90 000	6,3
Fag T ₂	$2,1 \times 10^{-16}$	40 000	7,3
<i>E.coli</i>	6×10^{-16}	2—5 000	10— 25
<i>D.pneumoniae</i>	$2-5 \times 10^{-15}$	10—15 000	17— 64
Drożdże	6×10^{-15}	10—20 000	50—100
Zwierzęta	6×10^{-12}	100	520
Rośliny	6×10^{-11}	100—200	5000

IX. Denaturacja drobin i zmiany w strukturze drugorzędowej

Na silne naruszenie drugorzędowej struktury DNA pod wpływem działania promieniowania jonizującego zwrócili uwagę Peacocke i Preston (62, 63). Oszacowali oni, że energia 100 eV powodująca średnio 2,3 pęknięcia łańcucha polinukleotydowego wywołuje zerwanie aż 38 wiązań wodorowych.

Denaturację DNA wywołaną przez promieniowanie bada się przez oznaczanie krzywych miareczkowania (62, 63), lepkości istotnej (38, 69), temperaturowych zależności gęstości optycznej (13, 17), reakcji formaldehydowej (37) oraz oznaczania widm absorpcyjnych w zakresie długości fali 240—260 nm (70, 71, 73).

1. Zależność denaturacji od dawki; denaturacja a degradacja

Peacocke i Preston (62, 63) stwierdzili, że denaturujące działanie promieniowania zaznacza się przy bardzo małych dawkach, a potem stopniowo się zmniejsza. Wprowadzili oni pojęcie czynnika natężenia denaturacji, który zdefiniowali jako tę część wiązań wodorowych typu Watsona i Cricka (93), które zostały rozerwane przy danej wartości równoważnika związanego kwasu przypadającego na 4 gramoatomy fosforu. Czynniki ten można wyliczyć z odwracalnych krzywych miareczkowania.

Sarkar (73) zaproponował aby denaturację DNA pod wpływem promieniowania szacować na podstawie widm absorpcyjnych w nadfioletcie metodą Fredericq'a i wsp. (33). Sarkar wprowadził tzw. czynnik denaturacji, którego wartość rośnie ze wzrostem dawki i ustalił, że dla

DNA z *E. coli* wzrost ten dla dawek do 7 kiloradów jest szybszy, a dla większych — wolniejszy, zaś przy dawce 15 kiloradów wartość czynnika denaturacji stanowi ponad 50% wartości maksymalnej znalezionej dla próbki zdenaturowanej kwasem. Reakcję formaldehydową Fraenkel-Conrata (32) można obserwować tylko dla cząsteczek DNA z uszkodzonymi wiązaniami wodorowymi między komplementarnymi zasadami (74). H a g e n (37) obliczył na podstawie tej reakcji procent zniszczonych przez promieniowanie X wiązań wodorowych w DNA i przedstawił jego zależność od dawki. Oceniając uszkodzenia wiązań wodorowych w DNA na podstawie zmian lepkości stwierdzono (38), że krzywe efektu dawki mają dla niższych dawek dwie składowe: jedną o $D_{37} = 700$ radów, drugą o $D_{37} = 2500$ radów. A l e x a n d e r i w s p. (4) są zdania, że początkowy spadek lepkości istotnej roztworów wywołany jest denaturacją, degradacja zaś jest przyczyną spadku lepkości po napromienieniu dużo większymi dawkami.

Zaobserwowano też, że napromienienie dawką rzędu 10 kiloradów obniża temperaturę topnienia (fazowego przejścia termicznego spirala-kłębek) DNA (13) oraz, że obniżenie to jest proporcjonalne do dawki (17).

Badania widma absorpcyjnego napromienianego DNA wykazały, że wysokość charakterystycznego maksimum przy 260 nm maleje ze wzrostem dawki, a przy dawkach powyżej 300 kiloradów zanika całkowicie (70, 71). Krzywe obrazujące zależność stosunku wysokości maksimum do stężenia DNA od dawki dla DNA rozpuszczonego w wodzie destylowanej (a więc bez charakterystycznych wiązań wodorowych między zasadami) wykazują monotoniczny spadek związany z uszkodzeniami zasad. Takież krzywe dla DNA natywnego (w 1M NaCl) przy niskich dawkach wykazują wzrost świadczący o niszczeniu wiązań wodorowych zanim jeszcze nastąpi uszkodzenie zasad.

2. Wpływ składu nukleotydowego DNA

P e a c o c k e i P r e s t o n (63) z charakteru krzywych miareczkowania wywnioskowali, że wiązania wodorowe typu A—T niszczone są przez promieniowanie w większym stopniu niż wiązania G—C.

Poglądowi temu przeczą wyniki prac W i n i e c k i e g o (94), który badał DNA izolowany z faga T_2 o zawartości 35% G—C, DNA ze spermy łososia o zawartości 43% G—C oraz DNA z *M. lysodeikticus* o zawartości 72% G—C, a stopień uszkodzenia wiązań wodorowych oceniał metodą oznaczania temperaturowych zależności gęstości optycznej (krzywych topnienia). Winiecki potwierdził obserwacje innych autorów (13, 17) o wpływie promieniowania na profil topnienia DNA, nie znalazł jednak różnic zależnych od składu nukleotydowego DNA. Sprawa wpływu składu nukleotydowego na radiolizę DNA pozostaje zatem w dalszym ciągu otwarta.

3. Denaturacja radiacyjna a cieplna

Szereg danych wskazuje na istotną różnicę między tymi procesami. Winiecki (94) prześledził profile topnienia natywnego i napromienianego DNA z faga T_2 i wykazał, że dawka 10 kradów nieco ogranicza, a dawka 250 kradów w ogóle uniemożliwia renaturację. Pozwala to wnioskować, że uszkodzenia radiacyjne wiązań wodorowych są nieodwracalne.

Badano też czy w napromienianych roztworach występuje wzrost gęstości optycznej, który towarzyszy denaturacji cieplnej i wskazuje na stopień utraty uporządkowania podwójnej spirali DNA. Okazało się, że napromienianie DNA dawkami denaturującymi wywołuje niewielki przyrost gęstości optycznej. Przyrost ten zależy od składu nukleotydowego. W DNA o dużej zawartości zasad G—C stopień utraty uporządkowania jest mniejszy niż w DNA o dużej zawartości zasad A—T, mimo że, jak wspomniano, wielkość uszkodzenia wiązań wodorowych oceniana według przesunięcia krzywej topnienia jest taka sama dla DNA o różnym składzie nukleotydowym. Efekt ten można wyjaśnić przyjmując, że oprócz wiązań wodorowych między zasadami czynnikami stabilizującymi strukturę DNA w roztworze mogą być też oddziaływania dipolowe między zasadami (59, 91), oraz związana strukturalnie woda hydratacyjna (56, 57, 92). Dzięki tym czynnikom napromieniony DNA mimo uszkodzeń wiązań wodorowych zachowuje własności optyczne zbliżone do własności DNA natywnego. Denaturacja radiacyjna różni się więc w sposób istotny od termicznej, ponieważ nie musi prowadzić do obserwowanego w wyższych temperaturach rozejścia się nici tworzących podwójną spiralę natywnego DNA.

Badając kinetykę rozdzielania łańcuchów polinukleotydowych natywnego i napromienianego DNA uzyskano wyniki świadczące, że zmiany denaturacyjne powstają w napromienianej cząsteczce DNA stopniowo, niemniej jednak temperaturowe przejście fazowe spirala—kłębek jest skokowe podobnie jak w DNA nienapromienianym (69).

X. Inne zmiany konfiguracyjne

Zgodnie z hipotezą Spitzkowskiego i wsp. (18, 87) pierwotną reakcją przy napromienianiu roztworów wysokopolimeryzowanego DNA (o $M > 10^6$) jest naruszenie drugorzędowej struktury (uszkodzenia wiązań wodorowych i deformacja podwójnej spirali) i związane z tym naruszenie struktury trzeciorzędowej, czyli parametrów elipsoidy obrotowej, którą spirala tworzy w roztworze. Według Taylora i wsp. (90) zachodzi wtedy przejście elipsoidy w kulę, według Cole i Ellisa (22, 23) stosunek większej do mniejszej osi elipsy zmniejsza się około dwu-

krotnie. W obu przypadkach efektem makroskopowym może być spadek lepkości, który istotnie występuje przy małych dawkach rzędu 1500—2500 radów, kiedy to ciężar cząsteczkowy jeszcze się nie zmienia.

Stosunkowo niskie dawki wywołują też inne zmiany konfiguracyjne, poprzedzające degradację. Charakter tych zmian jest dwustopniowy: początkowo D_{37} jest rzędu 270—810 radów, a następnie w zakresie od 1000—10000 radów nie ma prawie żadnych zmian (49). Można to wyjaśnić zakładając, że w roztworze istnieją dwie formy struktury drugorzędowej — forma A i mniej oporna na działanie promieniowania forma B. Zerwanie niektórych wiązań wodorowych oraz pojedyncze uszkodzenia łańcucha ułatwia przejście konfiguracyjne B→A, które poprzedza depolimeryzację.

Jeszcze mniejsze dawki rzędu 100—200 radów powodują w roztworze DNA naruszenie oddziaływań międzycząsteczkowych, prawdopodobnie wywołując zmiany w otoczce hydratacyjnej DNA przez osłabienie wiązań wodorowych między dipolami wody, które mogą odgrywać dużą rolę w stabilizacji jego drugorzędowej struktury.

LITERATURA

1. Alexander P., Charlesby A., *J. Pol. Sci.* **23**, 355 (1957).
2. Alexander P., Lett J. T., *Nature* **185**, 933 (1960).
3. Alexander P., Lett J. T., Kopp P., Itzaki R., *Rad. Res.* **14**, 373 (1961).
4. Alexander P., Lett J. T., Moroson M., Stacey K. A., *Inter. J. Rad. Biol.* (Suppl.) **1**, 47 (1959).
5. Alexander P., Lett J. T., Ormerod M. G., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 320 (1961).
6. Alexander P., Stacey K. A., *Nature* **184**, 958 (1959).
7. Allen A. O., *Radiacjonnaja chimija wody i wodnych roztworow* (tłum. ros.) Izd. lit. nauki i techniki, Moskwa 1963, str. 179.
8. Amigarowa M. J., Dużenkowa N. A., Sawicz A. W., Szalpow M. J., *Pierwicznije radiobiologiczeskije prociessy*, Atomizdat, Moskwa 1964.
9. Andrews H. L., *Radiation Biophysics*, Prentice Hall, 1961, str. 194.
10. Bacq Z. M., Alexander P., *Fundamentals of Radiobiology*, Pergamon Press, 1961.
11. Barron E. S. G., Johnson P. H., Cobure A., *Rad. Res.* **1**, 410 (1954).
12. Barszcz D., Tramer Z., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 9 (1963).
13. Belman I., Levine E., Troll W., *Federation Proc.* **21**, 374 (1962).
14. Butler J. A. V., *Rad. Res.* (Suppl.) **1**, 403 (1959).
15. Butler J. A. V., Conway B. E., *Proc. Roy. Soc. B*, **141**, 552 (1953).
16. Butler J. A. V., Pain R. H., Robins A. B., Rotblatt J., *Proc. Roy. Soc. B* **149**, 12 (1957).
17. Cejtlin P. I., Jaskiewicz O. P., Riabczenko N. I., *Radiobiologija* **4**, 3 (1964).

18. Cejtlin P. I., Spitkowski D. M., Tongur W. S., Proc. Isth. Symp. for Nucleic Acids and Nucleoproteids, Izd. AN ZSRR, 1961, str. 68.
19. Charlesby A., *J. Pol. Sci.* **11**, 513 (1953).
20. Charlesby A., *J. Pol. Sci.* **11**, 521 (1953).
21. Conlay J. J., *Nature* **197**, 555 (1963).
22. Cole L. J., Ellis M. E., *Cancer Res.* **14**, 738 (1954).
23. Cole L. J., Ellis M. E., *Federation Proc.* **15**, 411 (1956).
24. Cox R. A., Overend W. G., Peacocke A. R., Wilson S., *Proc. Roy. Soc. B*, **149**, 511 (1958).
25. Dale W. M., Meredith W. J., Tweedie M. C. K., *Nature* **151**, 280 (1943).
26. Daniels M., Scholes G., Weiss J., Wheeler C. M., *J. Chem. Soc.* str. 226 (1957).
27. Dorlet C., Van de Vorst A., Bertinchamps A. J., *Nature* **194**, 707 (1962).
28. Ekert B., Monier R., *Ann. Inst. Pasteur* **92**, 556 (1957).
29. Ekert B., Monier R., *Nature* **184**, 58 (1959).
30. Ekert B., Monier R., *Nature* **186**, 309 (1960).
31. Emmerson P., Scholes G., Thomson D. H., Ward G. F., Weiss J., *Nature* **186**, 319 (1960).
32. Fraenkel-Conrat H., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 160 (1961).
33. Fredericq E., Oth A., Fontaine F., *J. Mol. Biol.* **3**, 11 (1961).
34. Ginoza W., *Nature* **199**, 459 (1963).
35. Guda H. E., Frajola W. J., Lesser M. A., *Science* **137**, 607 (1962).
36. Guild W. R., *Rad. Res. (Suppl.)* **3**, 257 (1963).
37. Hagen U., *Nature* **197**, 1004 (1963).
38. Hagen U., *Nature* **194**, 182 (1962).
39. Hems G., *Nature* **181**, 721 (1958).
40. Hems G., *Nature* **185**, 525 (1960).
41. Hems G., *Nature* **186**, 710 (1960).
42. Hems G., *Rad. Res.* **13**, 777 (1960).
43. Hutchinson F., Arena J., *Rad. Res.* **13**, 137 (1960).
44. Jermolajewa N. W., *Biochimija* **26**, 897 (1961).
45. Kalmanson A. E., *Usp. Biol. Chim.* **5**, 285 (1963).
46. Kruszyńska N. P., Szalpow M. J., *Radiobiologija* **3**, 360 (1964).
47. Kruszyńska N. P., Szalpow M. J., Swobodnoradikalnyje procesy w biologiczeskich sistiemach (Symposium), Moskwa Izd. MOIP, 1964, str. 29.
48. Kuhn W., Kuhn H., *J. Colloid Sci.* **3**, 11 (1948).
49. Kuzin A. M., Radiacjonnaja biochimija, Moskwa, Izd. AN ZSSR, 1962, str. 74.
50. Latarjet R., Ekert B., Apelgot S., Rebeyrotte N., *J. Chim. Phys.* **58**, 1046 (1961).
51. Latarjet R., Ekert B., Demerseman P., *Rad. Res. (Suppl.)* **3**, 247 (1963).
52. Lea D. E., Action of Radiations on Living Cells, Cambridge Univ. Press, Londyn 1946, str. 69.
53. Lemmon R. M., *Nature* **212**, 1481 (1966).
54. Lett J. T., Alexander P., *Rad. Res.* **15**, 159 (1961).
55. Lett J. T., Stacey K. A., Alexander P., *Rad. Res.* **14**, 349 (1961).
56. Lewin S., *Lab. Practice* **13**, 400 (1964) i 824 (1964).
57. Lewin S., *Biochem. J.* **95**, 44 (1965).
58. Mandelkern L., Krigbaum W. R., Scheraga H. A., Flory P., *J. Chem. Phys.* **20**, 1392 (1952).
59. Michelson A. M., *J. Chem. Soc.* str. 3655 (1959).

60. Nofre C., Cier A., *Bull. Soc. Chim. France* **4**, 1326 (1966).
61. Patten R. A., Gordy W., *Nature* **202**, 361 (1964).
62. Peacocke A. R., Preston B. N., *J. Pol. Sci.* **31**, 1 (1958).
63. Peacocke A. R., Preston B. N., *Proc. Roy. Soc. B*, **153**, 103 (1960).
64. Philips Q. O., Criddle W. J., *J. Chem. Soc.* **76**, 2740 (1962).
65. Pollard E. C., Diamond A. E., *Phytopath.* **46**, 214 (1956).
66. Pollard E. C., Guild W. R., Hutchinson F., Setlow R. B., *Prog. Biophys.* **5**, 72 (1955).
67. Ponnameruna C. A., Lemmon R. M., Bennett E. L., Calvin M., *Science* **134**, 113 (1961).
68. Ponnameruna C. A., Lemmon R. M., Calvin M., *Rad. Res.* **18**, 540 (1963).
69. Riabczenko N. J., Cejtlin P. J., *Radiobiologija* **3**, 331 (1963).
70. Rossberg C., *Z. Naturforsch.* **176**, 548 (1962).
71. Rossberg C., *Strahlentherapie* **121**, 443 (1963).
72. Rysina T. N., Libinson R. J., *Biofizika* **3**, 487 (1958).
73. Sarkar M., *Nature* **196**, 269 (1962).
74. Sarkar M., Dounce A. L., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 160 (1961).
75. Sawicz A. W., Szalpow M. J., *Radiobiologija* **1**, 23 (1961).
76. Scholes G., Ward J. F., Weiss J., *J. Mol. Biol.* **2**, 379 (1960).
77. Scholes G., Ward J. F., Weiss J., *Science* **133**, 2016 (1961).
78. Scholes G., Weiss J., *J. Exptl. Cell. Res. (Suppl.)* **2**, 219 (1952).
79. Scholes G., Weiss J., *Nature* **171**, 920 (1953).
80. Scholes G., Weiss J., Sowriemiennyje problemi citologii (tłum. ros.), Moskwa, Izd. Inastr. Lit. 1955, str. 123.
81. Scholes G., Weiss J., *Rad. Res. (Suppl.)* **1**, 177 (1959).
82. Scholes G., Weiss J., Wheeler C. M., *Nature* **178**, 157 (1956).
83. Shen-Pei-Gen, Blumenfeld L. A., Kalmansen A. E., Pasyński A. G., *Biofizika* **4**, 263 (1959).
84. Shields H., Gordy W., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **45**, 269 (1959).
85. Shinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **1**, 43 (1959).
86. Shooter K. V., Pain R. H., Butler J. A. V., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 497 (1956).
87. Spitkowski D. M., Cejtlin P. I., Tongur W. S., *Biofizika* **5**, 3 (1960).
88. Stacey K. A., Proc. II Intern. Congress Rad. Res. Harrogate, Aug. 5—11, 1962. str. 96.
89. Szalpow M. I., *Radiobiologija* **2**, 654 (1962).
90. Taylor B., Greenstein G., Hollaender A., *Arch. Biochem.* **16**, 19 (1948).
91. Timasheff S. N., Witz J., Luzzati V., *Biophys. J.* **1**, 525 (1961).
92. De Voe H., Tinoco I., *J. Mol. Biol.* **4**, 488 (1962).
93. Watson J. D., Crick F. M. C., *Nature* **171**, 780 (1953).
94. Winiecki J. P., *Radiobiologija* **5**, 3 (1965).

RECENZJE

Mechanizmy integracji kletkowego obrotu, pod red. S. A. Nejfacha, Leningradzki Oddział Wydawnictwa „Nauka” 1967 r. str. 315

Celem tej zbiorowej pracy było opisanie podstawowych procesów przemiany materii, ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień energetycznych, jako elementów składowych jednego, zintegrowanego mechanizmu działalności życiowej komórki.

W pierwszym rozdziale p.t. „Dynamiczne, strukturalne i genetyczne czynniki integracji metabolizmu” redaktor książki, członek-korespondent Akademii Nauk Medycznych ZSRR, kierownik Zakładu Genetyki Biochemicznej Instytutu Medycyny Doświadczalnej w Leningradzie, przedstawił teoretyczne i filozoficzne przesłanki dla traktowania każdego ze względnie odizolowanych procesów przemiany materii jako części składowej większego, bardziej ogólnego, mechanizmu. Integrację autor uważa za najbardziej charakterystyczną cechę procesów życiowych. Rozwijając tę tezę autor szeroko omawia ewolucję procesu integracji, podkreślając dynamiczne, strukturalne i genetyczne czynniki leżące u jej podstaw. Wśród tych czynników szczególnie ważną rolę przypisuje błonom struktur podkomórkowych. Na poparcie swych tez Nejfach szczegółowo cytuje prace oryginalne, głównie autorów z krajów zachodnich. Filozoficzne aspekty tej pracy nie są nowe. Odczytać w niej można z łatwością jedno z podstawowych sformułowań dialektyki marksistowskiej: jedność wszechzwiązków i względnej izolacji. Podkreślając zintegrowanie pozornie odizolowanych od siebie procesów przemiany materii autor wykazuje na przykładzie żywej komórki, że jedność taka istnieje.

Autorka drugiego rozdziału: „Strukturalna i molekularna organizacja procesu fotosyntezy”, O. P. Osipowa w zasadzie nie rozwija głównych koncepcji Nejfacha. Podaje natomiast szczegółowy przegląd najnowszych danych piśmiennictwa o budowie, składzie chemicznym i funkcji chloroplastów, być może, zbyt mało uwagi poświęcając charakterystyce i roli DNA występującego w plastydach. Szkoda także, że autorka nie cytuje prac Granicka. Koncepcja względnej autonomii plastydów, którą wysuwa ten autor, między innymi na podstawie występowania w nich DNA, znajduje się w pewnej sprzeczności z zasadniczą tendencją książki, zmierzającą do wykazania pełnej integracji funkcji życiowych komórki. Tym bardziej przeto autorka powinna była ustosunkować się do tej rozbieżności.

W trzecim rozdziale: „Strukturalna organizacja utleniania biologicznego i procesów sprzężonych” W. S. Gajechoki omówił mechanizmy procesów oksydoredukcyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem fosforylacji oksydacyjnej. Wartość przeglądu podnosi fakt szczegółowego omówienia przebiegu tych procesów także poza mitochondriami. W innych przeglądach zagadnienie to jest na ogół traktowane tylko marginesowo.

Czwarty rozdział stanowi praca T. B. Kazakowej p.t. „Genetyczna kontrola syntezy strukturalnych elementów łańcucha oddechowego”. W oparciu o występowanie DNA w mitochondriach autorka omawia możliwość autonomicznej reprodukcji tych inkluzentów komórkowych, a także inne formy dziedziczności poza chromo-

somalnej. Przegląd napisany jest w sposób oryginalny i nowoczesny, daje kompilacyjne, zwięzłe podsumowanie najnowszych danych piśmiennictwa w tej dziedzinie.

W piątym rozdziale: „Koordynacja oddychania i glikolizy” W. S. Repin kontynuuje i rozwija myśl przewodnią pierwszego rozdziału. Na przykładzie dwu, na pozór odizolowanych procesów — glikolizy i oddychania, wykazuje jak ściśle są one ze sobą powiązane, stanowiąc dwa wzajemnie uzupełniające się elementy tego samego mechanizmu. Omawia molekularne mechanizmy skoordynowanej kontroli genetycznej syntezy enzymów biorących udział w procesach oddychania i glikolizy, a także automatyczną regulację ich aktywności w komórce. Zagadnienia te znajdują się w centrum zainteresowania współczesnej biochemii.

Szósty i ostatni rozdział p.t. „Sprzężenie energii utleniania i aktywnego transportu przez błony” także nawiązuje do głównej koncepcji Nejfacha — integracji metabolizmu komórki, uwarunkowanej w szczególności istnieniem błon endocytoplazmatycznych. Jego autor N. K. Monachow opisuje budowę komórki jako systemu układów pozornie oddzielonych błonami. Błony te bowiem nie tylko dzielą komórkę na względnie odizolowane przestrzenie, ale także i łączą poszczególne elementy w jedną zintegrowaną całość. Stwarza to sytuację, w której poszczególne struktury podkomórkowe są otwarte wobec otaczającej je protoplazmy, zaś cała komórka pozostaje z kolei otwarta wobec otaczającego ją środowiska. Aktywny transport przez błony, jak wykazuje autor na podstawie danych piśmiennictwa, odbywa się dzięki sprzężeniu tego procesu z reakcjami utleniania biologicznego.

W sumie książka stanowi cenną i oryginalną pozycję godną polecenia szerokim kręgom biochemików i fizjologów. Pierwszy jej rozdział zainteresuje ponadto filozofów zajmujących się zagadnieniami biologicznymi.

J. Buchowicz

T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifer, W. Kuryłowicz. Antibiotics, Origin, Nature and Properties. Tom I i II, stron 1651, Wydawnictwo: Pergamon Press — Oxford, PWN., Warszawa

Odkrycie penicyliny w 1929 r., a ściślej rewelacyjne wyniki uzyskane po zastosowaniu jej w lecznictwie na początku lat 40-tych stały się przyczyną niezwykle szybkiego rozwoju badań nad antybiotykami. Wprowadzenie do medycyny w następnych latach kolejno takich leków jak streptomycyna, chloramfenikol, tetracykliny, erytromycyna i oleandomycyna, półsyntetyczne penicyliny i cefalosporyny, kolimycyna i innych, wpłynęło na jakościową zmianę skuteczności zwalczania i zapobiegania większości zakaźnych chorób bakteryjnych. Wśród nowoodkrytych antybiotyków znaleziono szereg związków skutecznych w zwalczaniu grzybic, zakażeń wywołanych przez patogenne pierwotniaki i większe wirusy oraz związków o wybitnym selektywnym działaniu cytostatycznym, mniej lub bardziej skutecznych w leczeniu schorzeń nowotworowych. Względy poznawcze i praktyczne związane ze ścisłą kooperacją zaplecza naukowo-badawczego z przemysłem antybiotyków i substancji biosyntetycznych skłoniły do pogłębienia badań w zakresie genetyki drobnoustrojów-producentów, rozszerzyły znacznie przedmiot i zakres mikrobiologii technicznej.

Rozwijające się w ostatnim dziesięcioleciu prace zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu działania poznanych uprzednio antybiotyków przyczyniły się w znacznej mierze do pogłębienia naszej wiedzy o podstawowych procesach życiowych zachodzących w żywej komórce, związanych z biosyntezą i funkcją błony komór-

kowej, biosyntezą białka oraz budową, powstawaniem i funkcją kwasów nukleinowych. Ta nowa gałąź wiedzy o antybiotykach zrodziła niezwykle bogate i wszechstronne piśmiennictwo naukowe obejmujące wiadomości z różnych dziedzin nauki: mikrobiologii, genetyki, biochemii, chemii, farmakologii, medycyny i bioinżynierii.

Twórcza praca badawcza, wymagająca ciągłego, systematycznego śledzenia postępu w tej dziedzinie jest znacznie utrudniona małą liczbą dostępnych u nas opracowań monograficznych. Nieliczne opracowania zbiorcze o antybiotykach stają się stosunkowo szybko nieaktualne ze względu na tempo nowych odkryć.

Opracowana przez wybitnych fachowców, twórców „szkoły antybiotycznej” w Polsce prof. prof. T. Korzybskiego i W. Kuryłowicza, pierwsza polska monografia (W. Kuryłowicz, T. Korzybski „Antybiotyki”, P.W.N., Warszawa 1955) obejmowała dane o pochodzeniu, budowie i własnościach około 400 substancji o działaniu antybiotycznym. Drugie wydanie tej książki (W. Kuryłowicz, T. Korzybski „Antybiotyki”, P.W.N., Warszawa 1959) z suplementem opracowanym przez dr Z. Kowszyk-Gindifer oraz niemieckie (W. Kuryłowicz, T. Korzybski „Antibiotica”, VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena 1961) zawierało już dane o 800 związkach. Recenzowana książka jest zaktualizowanym i znacznie poszerzonym, angielskim wydaniem wspomnianej wyżej monografii z 1959 roku i obejmuje szczegółowe dane z piśmiennictwa dotyczące ponad 1000 związków. Autorzy, zgodnie z tytułem książki, postawili sobie za cel zestawienie w niej aktualnej wiedzy o rodzaju, pochodzeniu i własnościach poszczególnych antybiotyków. Jest chyba rzeczą oczywistą, że olbrzymia liczba opisanych w monografii związków, wymagała przyjęcia pewnego, jednolitego kryterium ich podziału.

Zagadnienie klasyfikacji antybiotyków do dziś jest sprawą otwartą i dyskusyjną. Płaszczyzną podziału poszczególnych związków na oddzielne grupy może być ich budowa i związane z nią własności chemiczne lub też źródło ich pochodzenia czy właściwości biologiczne. Pod względem chemicznym antybiotyki stanowią bardzo zróżnicowaną grupę związków, reprezentujących praktycznie wszystkie rodzaje struktur, przy czym bardzo często spotyka się wśród nich struktury nietypowe dla większości innych produktów pochodzenia naturalnego. Aktualna znajomość ich budowy jest często fragmentaryczna i niekompletna, wiadomo także, że wiele czynników o działaniu antybiotycznym jest mniej lub więcej skomplikowaną mieszaniną kilku indywiduów chemicznych. Ograniczona jest także w znacznej mierze nasza obecna znajomość mechanizmów i dróg ich biosyntezy przez drobnoustroje.

Istniejące próby klasyfikacji antybiotyków na podstawie ich budowy czy własności chemicznych (Shemiakin i Chochłow, Waksman i Lechevalier, Macey) oraz na ich biogenezie z układów prostszych (Abraham i Newton) są więc siłą faktu niekompletne i nie obejmują wszystkich poznanych związków. Są one przy tym nieprecyzyjne, mocno dyskusyjne i jest rzeczą wątpliwą, czy znajdą one kiedyś pełne zastosowanie. System Abrahama i Newtona jest napewno klasyfikacją przyszłości, jak na razie mało jednak przydatną.

W omawianej książce oraz w jej poprzednich wydaniach przyjęli autorzy za podstawę klasyfikacji antybiotyków ich pochodzenie, uwzględniając także wśród dobrze poznanych związków charakter i zakres działania antybiotycznego, ewentualnie podobną budowę chemiczną. Zgadzam się z autorami, że podział ten pozwala aktualnie na logiczne i przejrzyste pogrupowanie wszystkich znanych i opisanych antybiotyków niezależnie od stopnia poznania ich struktury.

Zamieszczone na wstępie, krótkie i treściwe wprowadzenie zapoznaje czytelnika z podstawowymi zagadnieniami specyficznego przedmiotu badań. Autorzy podają definicję antybiotyku i omawiają istotne jej cechy, charakteryzują dalej ogólnie budowę chemiczną i własności tej grupy związków. We wstępie omawiają autorzy także źródło i pochodzenie antybiotyków, specyfikę i zakres ich działania biologicznego oraz wspominają o problemach związanych z ich biogenezą. Wstęp kończy

wykaz czasopism poświęconych wyłącznie antybiotykowi, spis wydanych w druku streszczeń dotyczących międzynarodowych konferencji i sympozjów na temat antybiotyków oraz obszerny wykaz monografii i prac poglądowych dotyczących tych związków.

Systematyczny przegląd poznanych i opisanych dotychczas antybiotyków rozpoczynają autorzy od omówienia metabolitów wytwarzanych przez drobnoustroje rzędu *Eubacteriales* (część I) i *Actinomycetales* (część II). Czynniki antybiotyczne produkowane przez klasę *Eumycetes* omówiono w części III (metabolity grzybów niższych — *Fungi imperfecti*) i w części IV (antybiotyki izolowane z grzybów *Basiliomycetes* i *Ascomycetes*). Oddzielnie w części V uszeregowano czynniki antybiotyczne, produkowane przez porosty i algi, w części VI — izolowane z roślin wyższych i VII — pochodzenia zwierzęcego. Źródłem większości poznanych antybiotyków są, jak wiadomo, drobnoustroje rzędu *Actinomycetes*, stąd też część II omawianej monografii jest najobszerniejsza. Olbrzymią liczbę związków produkowanych przez promieniowce podzielili autorzy w określone grupy w zależności od zakresu i typu ich działania antybiotycznego omawiając w odrębnych rozdziałach związki hamujące wzrost bakterii Gram-dodatnich (B), antybiotyki o szerokim spektrum działania (D), aktywne przeciw bakteriom kwasoodpornym (E), czynniki o działaniu przeciwgrzybowym (polieny) (F), przeciwgrzybowe o strukturze niepolienowej (G), związki aktywne przeciw pierwotniakom (H), wirusom zwierzęcym i roślinnym (I) oraz antybiotyki o działaniu przeciwnowotworowym (J). Część II uzupełniają także dwa rozdziały, w których omówiono dwie grupy antybiotyków o wspólnej budowie chemicznej: makrolidy (A) i polipeptydy (C).

W treści książki przy omawianiu kolejno poszczególnych antybiotyków podają autorzy jego nazwę i synonimy, charakterystyczne własności fizyczne oraz źródło pochodzenia — szczep lub szczepy wytwarzające dany związek. Przytoczone są dane dotyczące hodowli szczepu, doboru właściwego podłoża, przebiegu fermentacji z określeniem wpływu dodatku substancji stymulujących wzrost i biosyntezę.

Oddzielnie omówiono stosowane metody izolowania i oczyszczania właściwego produktu oraz własności chemiczne i fizyczne czystych lub oczyszczonych preparatów z podaniem składu, stałych fizycznych, wzoru i budowy przestrzennej. Autorzy cytują także dane dotyczące przebiegu prac nad odbudową, ustaleniem wzoru i ewentualną syntezą omawianego związku. Przy opisie właściwości biologicznych starają się oni określić typ i zakres działania antybiotycznego oraz przytaczają dane dotyczące ewentualnego jego mechanizmu. Całość uzupełnia opis podstawowych własności farmakologicznych wraz z danymi o praktycznym zastosowaniu w lecznictwie. Po każdym opisie przytoczone są odnośniki do piśmiennictwa wykorzystane w jego treści.

Tom II kończy starannie przygotowany indeks autorów, indeks podmiotowy z zaznaczonymi tłustym drukiem miejscami głównego opisu oraz indeks nazw systematycznych drobnoustrojów i organizmów wyższych produkujących antybiotyki. Książka jest wydana i opracowana niezwykle starannie i nadano jej naprawdę nienaganną formę graficzną.

Treść napisana jest możliwie prostym, zwięzłym językiem z zachowaniem prawidłowej, współczesnej nomenklatury mikrobiologicznej, biochemicznej i chemicznej.

Omawiana monografia jest cenną pozycją wydawniczą nie tylko w skali krajowej, umożliwiającą pracownikom placówek naukowych i przemysłowych szeregu specjalności szybkie zdobycie wyczerpujących wiadomości związanych z wiedzą o antybiotykach.

Należy wyrazić żal, że brak jest aktualnej wersji polskiej omawianej monografii.

J. Cieślak

N. M. Emanuel' and Yu. N. Lyaskovskaya: The Inhibition of Fat Oxidation Processes. Tłumaczyła z rosyjskiego **K. A. Allen.** Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig, 1967, stron 389

Książka ta jest tłumaczeniem wydania rosyjskiego z roku 1961. Głównym zagadnieniem przedstawionym wyczerpująco na 389 stronach druku jest hamowanie procesów utleniania tłuszczów zwierzęcych. Wiadomo, że tłuszcze zwierzęce są niezwykle nietrwałe w obecności tlenu, a substancje zawierające tłuszcze ulegają zmianom w czasie produkcji i magazynowania. Łańcuch sprzężonych ze sobą reakcji utleniania prowadzi do pojawienia się związków typu nadtlenczków, ketonów, oksykwasów itp. w tłuszczach i związkach zawierających tłuszcze, wskutek czego tłuszcze mogą się stać nawet toksyczne. Jednocześnie ulegają zniszczeniu witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, a zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych ulega obniżeniu. Zatem jednym z czołowych zadań przemysłu żywnościowego staje się zapobieganie utlenianiu tłuszczów.

Autorzy podzielili monografię na następujące działy: kinetyka i chemia procesów utleniania tłuszczów, kataliza i oksydacyjny rozpad tłuszczów, teoria łańcuchowa i chemia czynności hamujących, antyutleniacze i synergistyki — ich właściwości i działanie hamujące. W pierwszych trzech rozdziałach omówiono wyczerpująco teoretyczne podstawy procesów utleniania tłuszczów ze szczególnym zwróceniem uwagi na kinetykę procesu. Rozdziały te czynią omawianą książkę ciekawą nie tylko dla pracujących w przemyśle spożywczym, ale również i dla szerszego kręgu biologów i biochemików.

Zagadnienie racjonalnego użytkowania nietrwałych tłuszczów może być rozwiązane przez użycie naturalnych lub sztucznych antyutleniaczy, zatem konieczny jest rozwój nowych gałęzi przemysłu chemicznego, wyspecjalizowanych w syntezie szerokiego asortymentu tych związków. Spotęgowane działanie ochronne przeciw utlenianiu można osiągnąć używając mieszanin różnych antyutleniaczy. Synergistycznemu działaniu różnych mieszanin naturalnych i sztucznych antyutleniaczy jest właśnie poświęcony ostatni rozdział omawianej książki.

Monografia skierowana jest przede wszystkim do pracowników przemysłu żywnościowego, w szczególności — przemysłu tłuszczowego. Dla nich stanowić może bardzo cenną pozycję, chociaż nadmienić należy, że ze względu na pojawienie się wydania rosyjskiego już w roku 1961, a tłumaczenia w roku ubiegłym, ze względów oczywistych bogata literatura nie wykracza poza rok 1960.

M. Erecińska

J. D. Bernal. The Origin of Life, Weidenfeld et Nicolson, London 1967, str. 346+XVI

J. D. Bernal jest krystalografem specjalizującym się w wyjaśnianiu budowy krystalicznej związków organicznych, zwłaszcza aminokwasów. W r. 1957 wziął udział w konferencji moskiewskiej na temat pochodzenia życia i od tego czasu nie przestał się tym tematem interesować. Utrzymując osobisty kontakt z uczestnikami tej konferencji, reprezentującymi tak różne nauki jak astrofizyka, paleontologia czy biologia molekularna, ten fizyk wypracował zintegrowany obraz naszych dzisiejszych wiadomości o powstaniu życia.

Właściwy traktat Bernala obejmuje tylko 182 strony omawianej książki. Resztę stanowią dopiski, przedruk oryginalnych artykułów Oparina, Haldane'a i Muellera,

rozdział poświęcony ogólnej krytalografii, wreszcie obszerny słowniczek. W ten sposób, książka Bernala daje nie tylko obraz współczesnych poglądów na początek życia, w ujęciu autora, ale zawiera także źródłową dokumentację rozwoju tego zagadnienia.

Książka Bernala pełna jest głębokich humanistycznych refleksji i stanowi nie tylko najpełniejszy dotąd obraz w piśmiennictwie zagadnienia początku życia, ale również pasjonującą lekturę dla każdego dociekliwego umysłu.

J. Heller

SPRAWOZDANIA

Konferencja naukowa na temat metabolizmu krwinki czerwonej

27 kwietnia 1968 r. odbyła się w Łodzi konferencja na temat metabolizmu krwinki czerwonej zorganizowana przez Łódzki Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Uczestniczyło w niej około 70 pracowników naukowych zainteresowanych bezpośrednio krwinką czerwoną lub pracujących nad podobnymi przemianami w innych komórkach. Wygłoszono 11 referatów dotyczących głównie dwóch problemów: związków fosforanowych erytrocytów oraz badań nad hemoglobinami.

Konferencję otworzyła doc. W. Leyko. Przedstawiła ona wyniki badań nad wolnymi nukleotydami krwinek czerwonych, prowadzonych w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego przy ściślejszej współpracy z Katedrami Chemii Fizjologicznej A. M. i W. A. M., Fizjologii W. A. M. oraz ze Stacją Krwiodawstwa w Łodzi i klinikami A. M. Łodzi i Warszawy. Podsumowanie tych badań przedstawia się następująco. Nie zaobserwowano zmian w zawartości nukleotydów adeninowych w krwinkach czerwonych u osób dotkniętych cukrzycą i stwardnieniem rozsianym. W gościecu przewlekłym postępującym i w gruźlicy płuc dochodzi do zmniejszenia ilości ATP w erytrocytach. Podwyższenie zawartości ATP stwierdzono w różnych schorzeniach przebiegających z hypoalbuminemią oraz u osób pracujących w atmosferze CS_2 a także w methemoglobinemii doświadczalnej (u zwierząt—*in vivo* i u ludzi—*in vitro*) i w żółtaczkach samoistnych u ciężarnych. W erytrocytach krwi pępowinowej i krwi żyłnej matki nie stwierdza się różnic w zawartości wolnych nukleotydów. Natomiast krwinki czerwone zdrowych dzieci w porównaniu z dorosłymi zawierają większe ilości nukleotydów adeninowych, a ponadto stosunek NAD/NADP jest w nich mniejszy od jedności. Badano także zachowanie się wolnych nukleotydów w czasie konserwacji krwi. Stwierdzono, że w krwinkach czerwonych konserwowanych z dwumetylosulfotlenkiem i sacharozą w mieszaninie alkoholu ze stałym CO_2 , po kilku miesiącach przechowywania, obserwuje się nieznaczny spadek zawartości nukleotydów adeninowych, podczas gdy w czasie konserwacji w standardowych warunkach po dwóch miesiącach ulegają one całkowitemu rozkładowi.

Smiegielska i wsp. (Łódź) omówili wpływ promieni Roentgena na pełną krew. Dawki rzędu 75—2000 r nie wywołują ani ilościowych ani jakościowych zmian w składzie nukleotydowym krwinek czerwonych, nie zmieniają stopnia hemolizy krwi, ani też zawartości potasu w pełnej krwi i w osoczu i żelaza w osoczu. Duda i wsp. (Łódź) donieśli, że w niedokrwistościach hemolitycznych obserwuje się wyraźny wzrost zawartości wolnych nukleotydów (szczególnie adeninowych) w krwinkach, natomiast w niedokrwistościach sideropenicznych zwiększenie ilości dotyczy jedynie NADP, IMP i UDPX. Chojnacki i Sawicka (Warszawa) stwierdzili, że w hemolizatach prawidłowej krwi ludzkiej wbudowywanie się glukozy- $1-^{32}P$ (G-1-P) do materiału nukleotydowego ma miejsce wyłącznie w obecności UTP. Inne trójfosforany nukleozydów (ATP, CTP, GTP i TTP) nie katalizowały wbudowywania się G-1-P. Inkorporacja ^{32}P z galaktozy- $1-^{32}P$ do nukleotydów przebiegała zarówno w obecności UTP jak i UDPG. Reakcję wymiany składnika fosfocukrowego z UDPG obserwowano również po dodaniu G-1-P. Zachara i Myśliwiec (Łódź) przedstawili dane dotyczące zawartości wolnych nukleotydów w różnym wieku dojrzałych erytrocytów. Stwierdzili oni, że różnice w zawartości AMP, ADP, ATP, GTP oraz NAD i NADP zarówno w przeliczeniu na objętość erytrocytów jak i na ilość hemoglobiny są niezmiennie statystycznie.

Następne doniesienia dotyczyły badań nad hemoglobinami. Pawlak (Poznań) wykazał, że w krwinkach czerwonych u chorych z wrodzoną niesferocytową niedokrwiistością hemolityczną występują dodatkowe frakcje hemoglobiny. Autor przypuszcza, że powstawanie tych frakcji jest dziedzicznie uwarunkowane, oraz że istnieje związek między ich występowaniem a objawami klinicznymi u chorych. Szyszko i Lipiński (Warszawa) omówili popromienne zaburzenia syntezy Hb u szczura *in vivo*. Jednorazowe naświetlenie wyższą dawką (700 r) nie powodowało żadnych zmian w czasie 3-tygodniowej obserwacji. Natomiast podawanie dawki frakcjonowanej 50 r dziennie przez 10 dni powodowało poczynając od 9 dnia po napromienianiu istotne zmiany w trzech spośród sześciu frakcji Hb, rozdzielonych elektroforezą w żelu skrobiowym. Dotyczyły one wzrostu I i III frakcji oraz zmniejszenia frakcji IV. Autorzy sądzą, że jest to reakcja wtórna, zależna od niedokrwiistości popromiennej i skrócenia czasu dojrzewania erytroblastów. W stanach głębokiego niedokrwienia, wywołanego innymi czynnikami, obserwuje się analogicznie zwiększenie HbF i zmniejszenie normalnej Hb dojrzałej. Lipiński badał też przy pomocy ^{59}Fe i ^{14}C glicyny oraz ^{14}C proliny popromienne uszkodzenia syntezy Hb *in vitro* w jądrzystych krwinkach ptaków. Po dawce 5000 r ilość wbudowanego Fe wzrasta a zmniejsza się wbudowywanie glicyny i proliny, przy czym stosunek glicyny do proliny jest wyższy niż w układzie kontrolnym. Po napromienieniu maleje również synteza RNA krwinek a znakowane guanina i cytozyna podane równocześnie wbudowywane są tak, że stosunek G/C w RNA jest większy od jedności. Autor przypuszcza, że zmiany te są wynikiem popromiennego uszkodzenia kodu informacyjnego. Józwiak, Murawski i Daszyński (Warszawa) przedstawili wyniki badań nad przechowywaniem hemoglobiny w temperaturze ciekłego azotu. Po 4-miesięcznym okresie przechowywania nie stwierdzili wypadania Hb z roztworu, zmian zawartości Hb odpornej na denaturację ługiem, zmian w widmie absorpcyjnym ani przyrostu MetHb. Nie zaobserwowali też zmian w powinowactwie do tlenu, interakcji hemów i efekcie tlenowym Bohra. Jedyłą dostrzegalną różnicą było nie oddzielanie się HbA₂ od HbA, mimo, że w świeżych hemolizatach rozdział był wyraźny. Wolff-Płodowska i Murawski stwierdzili, że widmo absorpcyjne „kwaśnej” MetHbA₂ różni się od widm MetHbA₁ i MetHbF wyraźnie zaznaczonym szczytem przy 530 nm i wyższymi współczynnikami absorpcji poniżej 600 nm.

Kwiatkowska i Mularczyk przedstawili doniesienie dotyczące mechanizmu aglutynacji krwinek przez ufimbriowane bakterie. Wykazali oni, że aglutynacja ta nie zachodzi w obecności mocznika i przypuszczają, że w procesie aglutynacji biorą udział wiązania wodorowe, powstające między powierzchnią krwinki a fimbriami bakterii.

Doc. Leyko podsumowała wyniki konferencji i zwróciła się do uczestników z sugestią nawiązania ściślejszej współpracy w rozwiązywaniu trudniejszych problemów i wymiany doświadczeń w opanowywaniu niektórych technik. Łódzki ośrodek może służyć pomocą w analizie składu związków fosforanowych erytrocytów oraz innych komórek i tkanek, elektroforezy białek surowicy i hemoglobin w żelu skrobiowym oraz hemoglobin na bloku skrobiowym. Katedra Biochemii U.Ł. jest w trakcie uruchamiania analizy hemoglobin techniką „finger printing”. Ostatnie metody są dobrze opracowane w Instytucie Hematologii w Warszawie i doc. Murawski gorąco poparł taką wymianę, oferując ze swej strony wszechstronną pomoc. Instytut Hematologii dysponuje również *pH*-statem. „Finger printing” jest też opracowany w Ośrodku Radiobiologii W.A.M. w Warszawie. Urządzenia do konserwacji krwi i tkanek w płynnym azocie (polskiej produkcji) są w Instytucie Hematologii i Katedry Patologii Ogólnej i Doświadczalnej W.A.M. w Łodzi.

Zamykając obrady doc. Leyko zaproponowała aby tego typu spotkania odbywały się raz na dwa lata.

B. Zachara

Laboratoire de Chimie Biologique Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Paryskiego*

Placówka ta kierowana przez profesora Max-Fernanda Jayle'a jest odpowiednikiem Zakładów Chemii Fizjologicznej naszych Akademii Medycznych, jednak zarówno pod względem liczby pracowników (100 osób) jak zajmowanej powierzchni znacznie je przewyższa. Dzieje się tak dzięki pomocy finansowej CNRS (*Centre National de la Recherche Scientifique*) i INSERM (*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*) — instytucji organizujących i koordynujących badania naukowe.

Główny nurt działalności badawczej ośrodka dotyczy metabolizmu wszystkich grup hormonów sterydowych, metodyki ich oznaczania w płynach biologicznych i tkankach oraz prób dynamicznych badania czynności gruczołów produkujących te hormony. Tą problematyką zajmuje się sześć zespołów badawczych, kierowanych przez doktorów: Pasqualiniego i Crepy, profesorów: Begue, Drosdowskiego i Longchampta oraz dr Weinmanna.

Poza tą tematyką rozwijają się też badania nad strukturą gonadotropin i metodami ich oznaczania w płynach ustrojowych oraz białkami krwi, których stężenie wzrasta w przebiegu procesów zapalnych. Tą tematyką zajmują się trzy zespoły kierowane przez doktorów: Henry'ego i Moretti'ego i profesora Bourrillon. Jeden zespół (pod kierunkiem dr Anette Alfsen) bada wpływ wiązania białko-białko i białko-steryd na konformację cząsteczek białkowych.

Grupa dr Pasqualiniego zajmuje się obecnie metabolizmem wolnych i sprzężonych kortykosterydów w jednostce funkcjonalnej płód-łożysko u ludzi i zwierząt. W ramach tej tematyki opracowano następujące zagadnienia: jednoczesny metabolizm u człowieka siarczanu — ^3H -kortykosteronu oraz kortykosteronu, kortyzolu i kortyzonu znaczonego ^{14}C , metabolizm siarczanu — ^3H -kortykosteronu w jednostce funkcjonalnej płód-łożysko, metabolizm siarczanu — ^3H -kortykosteronu przez tkanki płodu ludzkiego (współpraca z Laboratorium prof. Egona Diczfalusy'ego w Sztokholmie), hydrolizę siarczanów sterydów przez łożysko ludzkie i metabolizm $1,2\text{-}^3\text{H}$ -kortykosteronu *in vivo* u szczura.

Pod kierunkiem dr Pasqualiniego pracuje również laboratorium oznaczania aldosteronu i czterohydroaldosteronu w celach diagnostycznych. Ilość czterohydroaldosteronu w moczu jest więc 2—5 razy większa niż aldosteronu — i zmienia się proporcjonalnie do jego poziomu. Dlatego opracowana przez zespół metoda oznaczania czterohydroaldosteronu ma taką samą wartość diagnostyczną jak oznaczanie aldosteronu i jest coraz częściej stosowana w klinice.

Zespół dr Odette Crepy zajmuje się aktualnie badaniami porównawczymi metabolizmu 17β -estradiolu i jego epimeru 17α - oraz oddziaływaniem między cząsteczkami sterydów (17β - i 17α - estradiol i testosteron) i białkami surowicy. W ubiegłych latach zespół ten pracował nad metodyką analizy sterydów sprzężonych z kwasem siarkowym i glukuronowym. Opracowano powszechnie dziś stosowaną metodę rozdzielania siarczanów i glukozydouronianów na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu i eluowanej butanolem o wzrastającej zawartości wody, następnie zaś mikrometodę oznaczania siarczanów sterydów w płynach biologicznych, opartą na reakcji z błękitem metylenowym, metodą ich wykrywania na chromatogramach bibułowych i płytkowych oraz metodę wykrywania glukozydouronianów na bibule i płytkach przy pomocy 1-(2-pirydylo-azo)2-naftolu. Prace te przyczyniły się w znacznej mierze do poznania składu frakcji sterydów sprzężonych w materiale biologicznym.

* autor sprawozdania przebywał w opisywanym ośrodku w latach 1966/67 jako stypendysta Min. Zdrowia

Zespoły profesorów Begue i Longchampta pracują nad porównaniem metabolizmu siarczanu estronu u ludzi zdrowych i pacjentów ze schorzeniami wątroby oraz nad metabolizmem różnych sterydów w tkance guza z komórek śródmiażdżowych Leydiga, wywołanego przez wielokrotne iniekcje gonadotropiny szczurom. Dotychczas zbadano *in vitro* metabolizm DHA, testosteronu, cholesterolu, Δ^4 androstendionu oraz 17α -hydroksypregnenolonu i 17α -hydroksy progesteronu. Wśród produktów metabolizmu nie stwierdzono sterydów sprzężonych. W przygotowaniu są doświadczenia zmierzające do chemicznego blokowania rozwoju guza.

Zespół kierowany przez prof. Drosdowskiego pracuje nad syntezą sterydów fenolowych, ich pochodnych 3-metoksy i 3-etoksy oraz odpowiednich siarczanów, octanów i glukozydouronianów. Związki te otrzymano w celu zbadania ich zachowania podczas chromatografii gazowej, cienkowsarstwowej, bibułowej i na płytkach z włókna szklanego. Ponadto opracowano metodę oznaczania testosteronu techniką chromatografii gazowej po przeprowadzeniu go w pochodną heptafluoromasłową, a także metodę ilościowego oznaczania estrogenów w osoczu. Od szeregu lat prowadzone są też systematyczne badania farmakologiczne estrogenów dostarczanych przez przemysł i syntetyzowanych w laboratoriach: ich działanie na receptor maciczo-pochwowy, przysadkę, gonady obu płci i nadnercza.

Grupa dr Weinmanna pracuje nad syntezą chemiczną sterydów 7α - i 7β -hydroksy pochodnych zawierających deuter w pozycji 15.

Struktura gonadotropin występujących w płynach biologicznych (krew i mocz) stanowi zasadniczy temat działalności zespołu prof. Bourrillon. Badania dotyczą gonadotropiny kosmówkowej (HCG — *Human Chorion Gonadotropin*), gonadotropiny występującej w moczu kobiet po okresie przekwitania (HMG — *Human Menopausal Gonadotropin*) i gonadotropiny z krwi żebnych klaczy (PMSG — *Pregnant Mare Seric Gonadotropin*). Ustalono ich strukturę glikoproteidową, aktywność biologiczną, własności fizyko-chemiczne i skład komponenty węglowodanowej i białkowej. Od roku 1959 grupa ta systematycznie bada niedializującą frakcję moczu, charakteryzującą się dużo wyższą zawartością węglowodanów niż otrzymany tą samą metodą preparat osocza ludzkiego. Uzyskano dane, że frakcja ta z prawidłowego moczu ludzkiego nie jest złożona wyłącznie z białek osocza, jak na ogół sądzono, lecz raczej z kompleksów węglowodanowych typu polisacharydów lub glikopeptydów.

Praca zespołu dr Moretti dotyczy białek krwi, których stężenie wzrasta w przebiegu procesów zapalnych. Należą do nich przede wszystkim haptoglobina i orozomukoid. Zespół wyosobnił haptoglobinę ludzką, królika i szczura, zbadał ich właściwości fizyczne i chemiczne oraz ich okresy półtrwania, prowadzi prace nad metabolizmem tych białek, a także mechanizmem ich biosyntezy.

Działalność zespołu dr Henry'ego dotyczy porównania wyników oznaczania hormonów gonadotropowych (FSH, LH, HCG i HMG) metodami biologicznymi i immunologicznymi oraz identyfikacji 17-ketosterydów w moczu zwierząt laboratoryjnych przed i po stymulacji za pomocą gonadotropin.

Z tego przeglądu problematyki badawczej widać, że *Laboratoire de Chimie Biologique* w Paryżu skupia liczną grupę wysoko wykwalifikowanych samodzielnych pracowników nauki, prowadzących badania w kilku odrębnych dziedzinach biochemii. Ośrodek ten dysponuje nowoczesną aparaturą w zakresie chromatografii gazowej, spektrofotometrii i radioizotopii, ekstrakcji przeciwiwprądowej (metoda Craiga), automatycznego rozdzielania i oznaczania złożonych mieszanin aminokwasów i monosacharydów (autoanalizatory *Technicon* pracujące według zasady Steinna-Moore'a) itp. Dobre warunki lokalowe — Zakład zajmuje około 50 pomieszczeń i laboratoriów specjalnie przystosowanych do badań naukowych — oraz życzliwość i talent organizacyjny kierownika tego ośrodka, prof. Jayle'a, który osobiście układa program pobytu każdego stypendysty, stwarzają bardzo korzystne warunki do odbywania stażu naukowego.

Sylwetka i działalność prof. Jayle'a zasługują na szczególną uwagę. Jego dorobek naukowy wyraża się liczbą ponad 500 publikacji oraz 10 monografii i podręczników. Jest on między innymi autorem fundamentalnej monografii poświęconej analizie hormonów sterydowych i ich metabolitów pt. „Analyse des Steroides Hormonaux” oraz monografii pt. „Les Haptoglobines”. Wraz ze współpracownikami jest twórcą dynamicznej próby badania czynności narządków, stwarzającej nowe perspektywy w zakresie diagnostyki schorzeń tego narządu oraz autorem modyfikacji próby Thorna nie wymagającej hospitalizacji chorego. Prof. Jayle pełni również funkcję dyrektora *Fondation de Recherche en Hormonologie* — instytucji zajmującej się opracowywaniem metod rutynowego oznaczania sterydów, wykonywaniem oznaczeń oraz ustalaniem norm w tym zakresie. Jest założycielem i redaktorem naczelnym czasopisma poświęconego związkom o strukturze sterydowej *Journal Europeen des Steroides*, którego pierwszy numer ukazał się w maju 1966 roku. W ramach obowiązków dydaktycznych prowadzi również wykłady z biochemii dla studentów medycyny.

Ta niezwykła aktywność naukowa i olbrzymi dorobek są dziełem człowieka niewidomego od 26 lat. We wrześniu 1941 roku, w toku badań nad haptoglobunami, prof. Jayle uległ poważnemu wypadkowi w wyniku którego utracił wzrok. To tragiczne w skutkach wydarzenie nie przerwało jednak jego działalności naukowej. Prace nad haptoglobunami były nadal kontynuowane pod kierunkiem profesora przez jego pięciu współpracowników, którzy przygotowali z tego tematu cztery doktoraty chemii i jeden farmacji. Pozostał również dyrektorem zespołu laboratoriów w *Ecole de Puericulture*, którą to funkcję objął rok przed wypadkiem. Talent organizacyjny i poważne osiągnięcia naukowe przyniosły profesorowi w roku 1955 nominację na kierownika Katedry Biochemii Wydziału Lekarskiego po prof. Michale Polonowskim, który zginął w wypadku samochodowym.

W krótkiej monografii * poświęconej działalności naukowej prof. Jayle'a znajdujemy następującą jego wypowiedź: „Wolałbym nie poruszać tego tematu, ale wówczas informacje o mojej działalności naukowej nie byłyby kompletne. Gdy w roku 1941 w wyniku wypadku w laboratorium straciłem wzrok, sądziłem, podobnie jak większość ludzi z mego otoczenia, że oznacza to koniec mojej kariery naukowej. Jednakże 13-letnie doświadczenie po wypadku przekonało mnie, że kalectwo nie zniszczyło sił żywotnych organizmu. Pozostawia ono nienaruszone zdolności organizacyjne człowieka, jeśli został on dotknięty kalectwem w pełni sił życiowych”...

„W dziedzinie badań naukowych wydaje mi się, że pośrednia obserwacja zjawisk przy udziale współpracowników ma tę samą wartość poznawczą, co obserwacje bezpośrednie. Moja działalność wykładowcy zyskuje na przejrzystości, gdyż przygotowując się do wykładów muszę poświęcić na to znacznie więcej czasu niż inni. To co straciłem w sensie szybkości zdobywania informacji, nie mogąc czytać czasopism naukowych, zyskałem dzięki większemu skupieniu umysłu, uwolnionego od wielu czynników rozpraszcających uwagę”.

„Pragnąłbym, aby powyższe zdania nie zostały uznane jako przejaw nadmiernej ufności we własne siły, lecz jako próba obiektywnej analizy działalności człowieka walczącego z trudnościami, wśród których nieufność i sceptycyzm innych nie należą do najmniej ważnych”.

Robert Courier, profesor College de France i członek Akademii, inaugurując obrady zorganizowanego przez prof. Jayle'a międzynarodowego kolokwium na temat czynności dokrewnej jajnika (maj 1965 — Paryż), powiedział między innymi: „Obrady nasze przypadają w 10 rocznicę nominacji prof. Jayle'a na stanowisko kierownika Katedry Biochemii Wydziału Lekarskiego, katedry którą rozstał zmarły tra-

* „*Titres et travaux scientifiques de M.F. Jayle*” wyd. Declume, Paryż, 1954, str. 12.

gicznie Michał Polonowski... Nominacja ta nastąpiła 14 lat po tragicznym wybuchu nadtlenków, który na zawsze odebrał wzrok profesorowi. Jest to triumf woli, triumf duchowy i naukowy, który prof. Jayle odnosi każdego dnia w dyscyplinie kroczącej w czołowie współczesnej medycyny. Drogi Kolego, uratowała pana wiara podobna do tej, jaka ożywiała Beethovena, kiedy pogrążony w absolutnej ciszy komponował swe najpiękniejsze symfonie”.

B. Szukalski

SPIS TREŚCI

M. Sarnecka-Keller, J. Noworytko—Biosynteza zwierzęcych glikoproteidów	3
J. Noworytko, M. Sarnecka-Keller—Składnik cukrowy zwierzęcych glikoproteidów	15
T. Sawicka—Metabolizm nukleozydodwufosfocukrów	37
J. Andrzejczuk-Hybel — Enzymy amylolityczne	49
A. K. Drabikowska — Biologiczne funkcje chinonów	65
M. Erecińska, T. Chojnacki — Biosynteza i funkcje fosfolipidów bakteryjnych	83
M. Rajchert-Trzpil — Episom F u <i>Escherichia coli</i>	101
B. Lubas — Chemiczne i fizyczne zmiany DNA pod wpływem promieniowania jonizującego „ <i>in vitro</i> ”	113
Recenzje książek (J. Buchowicz, J. Cieślak, M. Erecińska, J. Heller)	135
Konferencja naukowa na temat metabolizmu krwinki czerwonej (B. Zachara)	141
Laboratoire de Chimie Biologique Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Paryskiego (B. Szukalski)	143

W 2-gim zeszycie 15 tomu ukażą się:

1. Biochemia wiązania fosfor—węgiel, P. Mastalerz
2. Enzymy nukleolityczne w analityce, B. Filipowicz
3. Rozmieszczenie specyficznych nukleaz i ich rola w metabolizmie kwasów nukleinowych, H. Sierakowska
4. Rola jąderka komórkowego w metabolizmie kwasów nukleinowych i białka, J. Malec
5. Działanie antybiotyków na biosyntezę białka, J. Passent
6. Mutanty oddechowe drożdży, A. Putrament, R. Lorenc
7. Elektronowy rezonans paramagnetyczny i jego zastosowanie w biochemii, T. Mikulski
8. M. S. Cwiet — twórca chromatografii kolumnowej, W. Ostrowski

POSTĘPY BIOCHEMII

January 1969

ARTICLES IN POLISH

Volume 15	Number 1
M. Sarnecka-Keller, J. Noworytko — Biosynthesis of Animal Glycoproteins (Dept. Biochem. Biophys. Univ., Kraków)	3
J. Noworytko, M. Sarnecka-Keller — Sugar Component of Animal Glycoproteins (Dept. Biochem. Biophys. Univ., Kraków)	15
T. Sawicka — Metabolism of Nucleoside Diphosphate Sugars (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	37
J. Andrzejczuk-Hybel — Amylolytic Enzymes (Dept. Biochem. High School Agricult., Warszawa)	49
A. K. Drabikowska — Biological Function of Quinones (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	65
M. Erecińska, T. Chojnacki — The Biosynthesis and Functions of Microbial Phospholipids (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	83
M. Rajchert-Trzpil — Episom F of <i>Escherichia coli</i> (Dep. Microbiol. Hyg. Med. School, Warszawa)	101
B. Lubas — Chemical and Physical Changes Produced in DNA by Action of Ionizing Radiation „ <i>in vitro</i> ” (Inst. of Oncology, Gliwice)	113
Chronicle	135

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalnej), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.* 7, 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., *Podręcznik Biochemii*, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

M. Sarnecka-Keller J. Noworytko—Biosynteza zwierzęcych glikoproteidów	3
J. Noworytko, M. Sarnecka-Keller—Składnik cukrowy zwierzęcych glikoproteidów	15
T. Sawicka—Metabolizm nukleozydodwufocukrów	37
J. Andrzejczuk-Hybel—Enzymy amylolityczne	49
A. K. Drabikowska—Biologiczne funkcje chinonów	65
M. Erecińska, T. Chojnacki—Biosynteza i funkcje fosfolipidów bakteryjnych	83
M. Rajchert-Trzpil—Episom F u <i>Escherichia coli</i>	101
B. Lubas—Chemiczne i fizyczne zmiany DNA pod wpływem promieniowania jonizującego „ <i>in vitro</i> ”	113
Recenzje książek (J. Buchowicz, J. Cieślak, M. Erecińska, J. Heller)	135
Laboratoire de Chimie Biologique Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Paryskiego (B. Szukalski)	143
Konferencja naukowa na temat metabolizmu krwinki czerwonej (B. Zachara)	141