

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1972

tom 18

nr 2

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Biochemii publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postępkach 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 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, opatrzonej 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.

Maly

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 2
tom XVIII
zeszyt 2

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), B. Filipowicz (Łódź),
W. Gajewski (Warszawa), Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejb-
baum-Katzenellenbogen (Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poz-
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),
K. L. Wierzchowski (Warszawa)

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 1972

Nakład 2130 (2008+122)	Oddano do składania 29.I.1972 r.
Ark. wyd. 13,0, druk. 11,0	Podpisano do druku w kwietniu 1972 r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono w maju 1972 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 184/72 A-87

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

IRENA SZUMIEL *, MARIA E. ZAJDEL **

Udział adenozyjno-3', 5'-monofosforanu w regulacji czynności genów u zwierząt

Adenosine-3', 5'-monophosphate and Control of Gene Activity in Animals

Some recently formulated hypotheses, concerning the role of cyclic AMP as intracellular transmitter of several types of stimuli are reviewed. Particular attention is given to the problem of the biosynthesis of specific proteins in response to the extracellular stimuli. Possible mechanisms of cAMP effects on the activity of the cellular genome are discussed.

Do kluczowych problemów współczesnej biologii należy mechanizm oddziaływania środowiska na komórkę. Stosunkowo dobrze poznano dotychczas zależność wewnątrzkomórkowych przemian metabolicznych od składu chemicznego środowiska otaczającego komórkę. Przyczyniły się do tego badania kinetyki poszczególnych procesów enzymatycznych *in vitro* w różnych stężeniach jonów i efektorów allosterycznych o niskiej masie cząsteczkowej. Natomiast o wiele gorzej poznano procesy, za pośrednictwem których środowisko wywiera wpływ na czynność genów. Model indukowanej syntezy enzymów w komórce bakteryjnej stworzony przez Jacoba i Monoda rozpatruje oddziaływania allosteryczne między białkiem represorowym, regulującym czynność genu, a niskocząsteczkowym derepresorem. Derepresorem takim może być substrat przemiany enzymatycznej, analog substratu lub metabolit innej przemiany niż ta, która podlega regulacji na poziomie genu. Model Jacoba i Monoda (37) przenoszony jest powszechnie, jakkolwiek z zastrzeżeniami, na komórkę zwierzęcą — układ o wiele bardziej złożony od bakterii.

Funkcje białek regulatorowych przypisuje się w komórkach organizmów wyższych histonom i białkom jądrowym o charakterze kwaśnym. Jednakże stawiane, zgodnie z modelem Jacoba i Monoda, wymaganie absolutnej swoistości białek regulatorowych względem poszczególnych genów, przy

* Dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, Warszawa

** Mgr, Centrum Medyczne Szkolenia Podyplomowego, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — adenozyjno-3', 5'-monofosforan, db-cAMP — N₆O₂-dwubutyroloadenozyjno-3', 5'-monofosforan, ACTH — hormon adrenokortykotropowy, LH — hormon luteinizujący, MSH — melanotropina, TSH — hormon tyreotropowy

niewielkiej heterogenności zarówno histonów (31, 68) jak białek kwaśnych chromatyny (18) stwarzają znaczną trudność w zastosowaniu tego modelu regulacji czynności genów do organizmów eukariotycznych. Dodatkową trudność wywołują — ogromna różnorodność bodźców powodujących w komórce jednoczesne zmiany w metabolizmie i biosyntezie białek oraz odmienna reakcja na te same bodźce różnych komórek organizmu, wyposażonych w identyczny genom.

W organizmach wielokomórkowych komórki są w przeważającej większości odizolowane od środowiska, w którym organizm przebywa. U zwierząt bodźce pochodzące ze środowiska zewnętrznego odbierane są przez narządy receptorowe i przetwarzane na endogenne bodźce, między innymi hormonalne i nerwowe, które z kolei działają na komórki narządów wewnętrznych. Przykłady zamieszczone w tabelicy 1 świadczą o udziale adenozy-3',5'-monofosforanu (cykliczny AMP, cAMP) w przekazywaniu wielu typów bodźców endogennych, głównie u zwierząt, jakkolwiek przypisuje się cAMP rolę przekaźnika również w innych grupach orga-

Tabela 1

Typy bodźców przekazywanych za pośrednictwem cAMP oraz rodzaje odpowiedzi komórkowych

Obiekt	Bodziec	Odpowiedź komórki	Zmiana zawartości cAMP w komórce	Odsyłacz
Synapsa	elektryczny	wydzielanie noradrenaliny lub acetylocholino	podwyższenie	
Płytko neuro-motoryczna	elektryczny	wydzielanie acetylocholino	podwyższenie	(75)
Komórki tylnego płata przysadki	elektryczny	wydzielanie wazopresyny	podwyższenie	
Komórki tłuszczowe	ACTH, LH, TSH glukagon, adrenalina	aktywacja lipolizy	podwyższenie	(13)
Komórki przedniego płata przysadki	czynnik wydzielania hormonu wzrostowego	wydzielanie samatotropiny	podwyższenie	(75)
Komórki śliniankowe	adrenalina	wydzielanie amylazy	podwyższenie	(75)
Komórki pęcherza moczowego ropuchy	wazopresyna	wzmocniony transport Na ⁺ i wody	podwyższenie	(75)
Komórki Purkinjowe	adrenalina	hyperpolaryzacja błon	podwyższenie	(86)
Pręciki siatkówki oka żaby	światło	spadek przepuszczalności błon dla Na ⁺	obniżenie	(7)
Melanocyty	MSH	rozszerzenie melanoforów	podwyższenie	(75)

c.d. Tablicy 1

Komórki tłuszczowe	insulina	zahamowanie lipolizy	obniżenie	(61)
Płytki krwi	teofilina	hamowanie agregacji wywołanej przez ADP	podwyższenie	(66)
Komórki nerki ludzkiej w hodowli zsynchronizowanej, napromienione w fazie G ₂ promieniami X	kofeina teobromina teofilina	skrócenie popromiennego opóźnienia mitotycznego	podwyższenie	(82)
Limfocyty	5-fosforan pirydoksalu	przedłużenie popromiennego opóźnienia mitotycznego	obniżenie	(82)
Komórki warstwy aleuronowej nasienia jęczmienia	fitohemaglutynina	transformacja blastyczna	prześciowe podwyższenie	(15, 87)
Komórki nowotworowe	kwasy giberelowy	synteza amylazy	podwyższenie	(73)
Komórki nabłonkowe z jajnika chomika chińskiego	db-cAMP	przywrócenie hamowania wzrostu przez zetknięcie		(38)
Śluzowiec <i>Dictostylium discoideum</i>	db-cAMP	przekształcenie morfologiczne		(33, 34)
	db-cAMP	agregacja i wytworzenie spor		(14)

nizmów. Liczne prace poświęcono zwłaszcza roli cAMP w mechanizmie działania hormonów białkowych i peptydowych oraz amin katecholowych (80).

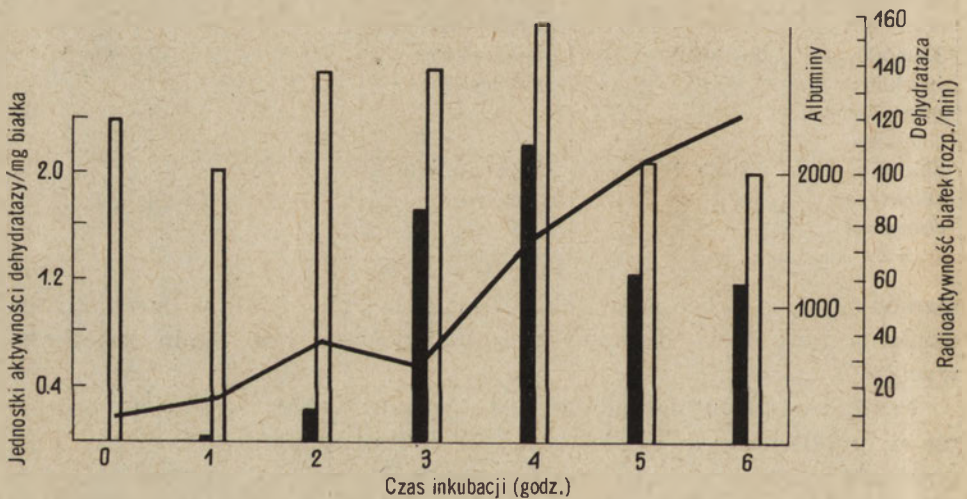
Prowadzone ostatnio badania nad cyklicznym AMP, omówione obszernie w publikowanym w *Postęпах Biochemii* artykule Kahla (42), pozwoliły na stworzenie modelu powstawania w komórce zwierzęcej swoistej reakcji na niektóre rodzaje nieswoistych bodźców, których cAMP jest przekaźnikiem. Niniejsze omówienie tego modelu ograniczone jest do najbardziej kontrowersyjnej, lecz i najbardziej interesującej jego części, dotyczącej regulacji biosyntezy kwasów rybonukleinowych i białek komórkowych.

I. Cykliczny AMP a hormonalna regulacja transkrypcji

Hormonalna indukcja enzymów w sposób swoisty dla danej tkanki oraz ogólne pobudzenie transkrypcji i translacji genów są faktami dobrze poznanymi i udokumentowanymi, jednakże brak jest zadowalającego wy-

jaśnienia mechanizmu tych zjawisk. W ostatnich latach stwierdzono, że wspólną cechą wielu hormonów zwierzęcych jest zdolność zwiększania zawartości cAMP w tkankach docelowych. Ponadto swoisty efekt hormonu, zarówno metaboliczny, jak odnoszący się do biosyntezy białek, można wywołać *in vitro* i *in vivo*, podając cAMP lub jego analog N_6O_2' -dwubutyryloadenozyno-3',5'-monofosforan (db-cAMP), który łatwiej od cAMP przenika przez błony komórkowe.

Ilustracją skutków działania cAMP na syntezę białek *in vivo* mogą być wyniki badań Josta i wsp. (39). Wykazali oni, że dootrzewnowe podanie szczirom glukagonu powoduje wzrost aktywności dehydratazy serynowej w wątrobie badanych zwierząt, a ten sam skutek można uzyskać zastępując glukagon db-cAMP. Po iniekcji dootrzewnowej czynnika pobudzającego zwierzęta otrzymywały znakowaną trytem leucynę, a następnie zabijano je i oznaczano w homogenatach z wątroby aktywność dehydratazy serynowej oraz radioaktywność właściwą albumin i jednorodnego antygenowo preparatu dehydratazy. Wyniki doświadczeń przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Wpływ db-cAMP na szybkość syntezy albuminy i dehydratazy serynowej (wg 39)

Linia przedstawia aktywność dehydratazy serynowej. Czarne prostokąty przedstawiają względną szybkość włączenia 3H -leucyny do dehydratazy serynowej, białe prostokąty pokazują względną szybkość włączenia 3H -leucyny do albuminy. Względna szybkość włączenia określono jako liczbę impulsów na minutę w badanym białku enzymatycznym na 100 000 impulsów na minutę w białku całkowitym, strąconym kwasem trójchlorooctowym.

Jak widać, pomiędzy 2 a 4 godziną od podania db-cAMP szybkość włączenia znakowanej leucyny do dehydratazy serynowej wzrosła 11-krotnie i równocześnie wzrosła jej aktywność. Natomiast synteza albumin uległa bardzo niewielkim zmianom w czasie trwania doświadczenia. Wynik ten

dowodzi, że db-cAMP jest zdolny do indukcji dehydratazy serynowej w komórkach wątroby.

Przykładem swoistego wpływu db-cAMP na komórki *in vitro* może być praca Wicksa (108) nad wpływem glukagonu i db-cAMP na syntezę transaminazy tyrozyna: α -ketoglutaran w wątrobie zarodków szczurzych hodowanych w płynie Eagle'a. Jak wiadomo, glukagon powoduje wzrost aktywności tego enzymu (106, 109). Dane zamieszczone w tablicach 2 i 3 dowodzą, iż taki sam wynik można uzyskać podając zamiast hormonu db-cAMP, przy czym wzrost aktywności enzymu przebiega równolegle do jego biosyntezy, mierzonej włączaniem trytowanej leucyny. O tym, że obserwowany wzrost aktywności transaminazy związany jest z syntezą białka enzymatycznego świadczy hamowanie indukcji przez inhibitory transkrypcji (aktynomycyna D) i translacji (cykloheksimid).

Tablica 2

Wzrost aktywności transaminazy tyrozynowej w wątrobie zarodków szczurów w 2 godziny po podaniu glukagonu db-cAMP wg Wicksa (108)

Czynnik pobudzający	Końcowe stężenie (M)	Aktywność transaminazy tyrozynowej jednostki/mg białka
Kontrola	—	7,5±0,6
db-cAMP	9×10 ⁻⁴	18,4±0,7
Glukagon	1,1×10 ⁻⁴	17,1±1,0

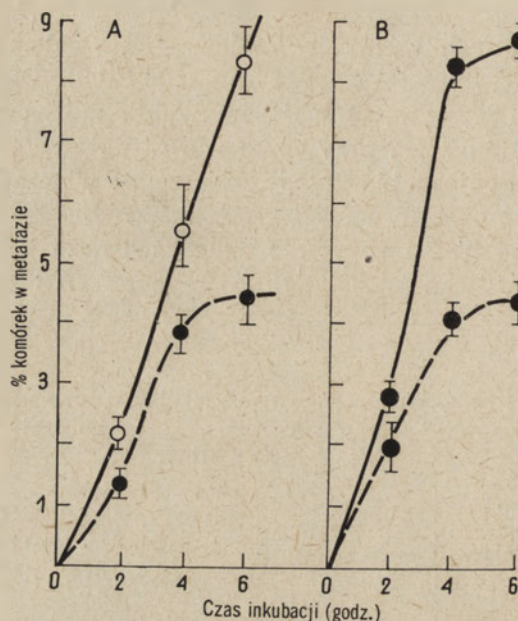
Tablica 3

Wpływ db-cAMP na indukcję transaminazy tyrozyna: α -ketoglutaran w wątrobie zarodków szczurów *in vitro* wg Wicksa (108)

Czynnik dodany do hodowli	Aktywność transaminazy tyrozynowej (jedn./mg białka)	Radioaktywność		Względna aktywność enzymu A × 10 ³ B
		transaminazy imp/min. (A)	białka całkowitego imp/min mg × 10 ³ (B)	
—	12,2	97,0	54,1	1,8
—	9,0	105,0	64,9	1,6
db-cAMP	59,2	362,0	68,1	5,3
„	64,3	333,0	71,1	4,7

Innym przykładem udziału cAMP w regulacji transkrypcji genów jest jego pośrednictwo w mitogennym działaniu niektórych hormonów na tymocyty szczura (62, 104, 105). Rozpoczęcie przez komórki pozostające w fazie G₁ (lub G₀) syntezy DNA poprzedzającej podział wiąże się z kolejną

transkrypcją i translacją szeregu genów (2). Tego rodzaju zmiany w tymocytach można wywołać zarówno hormonem wzrostowym jak i odpowiednim stężeniem cAMP, co ilustruje rysunek 2.



Rys. 2. Wpływ hormonu wzrostowego (A) i cyklicznego AMP (B) na podziały mitotyczne tymocytów szczura (wg 62)

●- - ● komórki kontrolne, inkubowane w roztworze soli z dodatkiem glukozy; ○- - ○ komórki inkubowane w środowisku kontrolnym z dodatkiem hormonu wzrostowego; ●- - ● komórki inkubowane w środowisku kontrolnym z dodatkiem cAMP

Za pomocą cAMP lub db-cAMP można wywołać analogiczne, kończące się podziałami komórkowymi, przemiany w limfocytach krwi obwodowej, których transformację blastyczną przeprowadza się zazwyczaj *in vitro* fitohemaglutyniną. Również i w tym przypadku stwierdza się aktywację nieczynnych przed transformacją genów (30), zaś przebieg złożonych przemian charakteryzujących blastogenezę jest jednakowy dla fitohemaglutyniny i db-cAMP (16).

Przedstawione przykłady udziału cAMP w procesach aktywacji genów świadczą, że związek ten zdolny jest do zapoczątkowania przemian prowadzących do syntezy określonych rodzajów mRNA i odpowiadających im swoistych białek, bądź też bierze w tych przemianach bezpośredni udział.

II. Cykliczny AMP a hormonalna regulacja translacji genów

Jak wiadomo, hormony wywierają wpływ nie tylko na proces transkrypcji ale i na translację informacji genetycznej (27, 50, 51). Jeśli zatem cAMP jest przekaźnikiem bodźców hormonalnych, należy się spodziewać

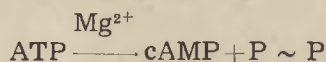
jego działania na jeden z etapów translacji. Przypuszczenie to potwierdzają doświadczenia, w których wywołuje się za pomocą cAMP indukcję syntezy swoistego białka, pomimo obecności w badanym układzie aktywnymycyny D w stężeniach hamujących w około 95% syntezę RNA. Na przykład pobudzenie przez ACTH lub cAMP syntezy sterydów w komórkach guza kory nadnercza, związane z syntezą białek kontrolujących przekształcenie cholesterolu w Δ^5 pregnenolon, zachodzi w obecności aktywnymycyny D, a zatem przy zahamowaniu transkrypcji (20). Badając włączanie znakowanej leucyny do rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych, Grower i Bransome (26) stwierdzili w tych komórkach, poddanych działaniu zarówno hormonu, jak i cyklicznego nukleotydu, zwiększenie szybkości syntezy jednej z kilkunastu frakcji białkowych, otrzymanych w wyniku rozdziału elektroforetycznego, przy jednoczesnym zmniejszeniu szybkości syntezy innej frakcji białkowej. Te zmiany w syntezie białek zbiegają się z przyspieszeniem syntezy Δ^5 -pregnenolonu.

Wpływ db-cAMP na translację śledzili również Adiga i wsp. (1) w bezkomórkowym układzie syntezy białka z przysadki wołu. W układzie tym — niezależnym od przebiegu transkrypcji, z racji sposobu przygotowania — warunkiem pobudzenia syntezy białek przez db-cAMP było dodanie frakcji „enzymów pH 5” z wątroby szczura. Również w przednim płacie przysadki szczura, db-cAMP wywołuje 50—80% wzrost włączania znakowanych aminokwasów do białek, mimo jednoczesnego zahamowania syntezy RNA za pomocą aktywnymycyny D w ponad 90% (56).

III. Cyklaza adenylowa jako pośredni lub bezpośredni receptor bodźców

Przytoczone przykłady wybrane spośród licznych prac (80) dowodzących, że hormony i czynniki wzrostowe swoiście działające na różnego rodzaju tkanki docelowe można zastąpić przez odpowiednie stężenie cAMP, nasuwają przypuszczenie, że zawartość cAMP komórkowego podlega regulacji pod wpływem bodźców pochodzących spoza komórki.

Dwa enzymy wpływają na ilość cAMP w komórce: cyklaza adenylowa (91) i fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów purynowych (17). Cyklaza adenylowa, zlokalizowana w błonach komórkowych, błonach retikulum cytoplazmatycznego (102) i błonie jądrowej (88), katalizuje syntezę cAMP według schematu (91):



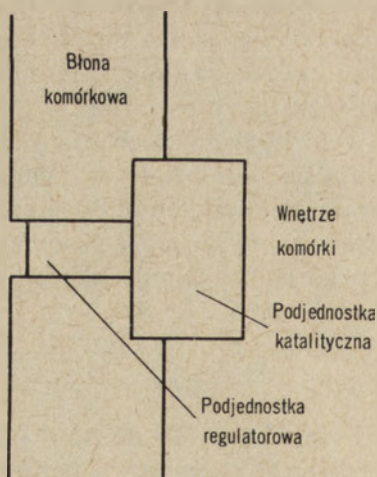
fosfodwuesteraza zaś — hydrolizę cAMP do AMP (17).

Należałoby zatem spodziewać się wpływu hormonów na przynajmniej jeden z tych enzymów. W istocie okazało się, że cyklaza adenylowa aktywowana jest przez liczne hormony, przy czym aktywacja przebiega swo-

ięcie dla danej tkanki. Natomiast niewiele jest danych o hormonalnej regulacji czynności fosfodwuesterazy.

Doświadczenia nad aktywacją cyklazy adenylowej *in vitro* przeprowadzano przy użyciu preparatów błon komórkowych, w których oznaczano aktywność cyklazy adenylowej, badając jej zdolność do syntezy ^{14}C -cAMP z ^{14}C -ATP w obecności lub nieobecności hormonów. Stwierdzono w ten sposób, że cyklaza adenylowa pewnych tkanek aktywowana jest przez jeden, a innych przez dwa lub więcej hormonów. Na przykład enzym pochodzący z ciała żółtego aktywowany był tylko przez hormon luteinizujący, zaś cyklazę adenylową związaną z błonami komórek kory nadnercza pobudzał tylko ACTH (80). Natomiast w preparatach błon otrzymanych z wątroby szczura cyklazę adenylową aktywowano zarówno adrenaliną jak glukagonem. Okazało się, że jest to spowodowane istnieniem dwóch niezależnych układów cyklazy adenylowej, z których jeden może być aktywowany przez adrenalinę, a drugi przez glukagon. Udało się selektywnie inaktywować te układy enzymatyczne (8). Układ aktywowany przez adrenalinę dużo łatwiej tracił aktywność przy inkubacji w 37° i pod działaniem ultradźwięków niż układ aktywowany przez glukagon. Badania cytochemiczne Reika i wsp. (77) wskazują, że oba układy cyklazy adenylowej różnią się rozmieszczeniem w wątrobie. Układ wrażliwy na adrenalinę i jej analog, izoproterenol, rozmieszczony jest niemal wyłącznie na powierzchni komórek mięsaszowych, natomiast układ aktywowany przez glukagon — na powierzchni komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego.

Tego rodzaju różnicom lokalizacji układów cyklazy adenylowej nie da się przypisać wyników uzyskanych dla komórek tłuszczowych. Zawar-



Schemat 1. Model cyklazy adenylowej według Robisona i wsp. (79)

ta w ich błonach cyklaza adenylova aktywowana jest przez 5 hormonów: kortykotropinę, glukagon, adrenalinę, hormony tyreotropowy i luteinizujący. Wyróżnia się dla układu cyklazy adenylowej tych komórek 3 miejsca receptorowe dla hormonów, wykazujące odmienną wrażliwość na jony Ca^{2+} , trypsynę i propranolol (3, 49).

Swoistą reakcję układu cyklazy adenylowej na hormony Robison i wsp. (79) wyjaśniają, zakładając istnienie 2 typów podjednostek: katalitycznej, warunkującej syntezę cAMP i regulującej — wiążącej hormon. Miejsce receptorowe, wiążące hormon, byłoby zatem częścią podjednostki regulującej, której budowa byłaby uzależniona od typu tkanki. Natomiast podjednostka katalityczna miałaby jednakową budowę we wszystkich komórkach danego organizmu. Hipotetyczny model cyklazy adenylowej według Robisona i wsp. (79) przedstawia schemat 1.

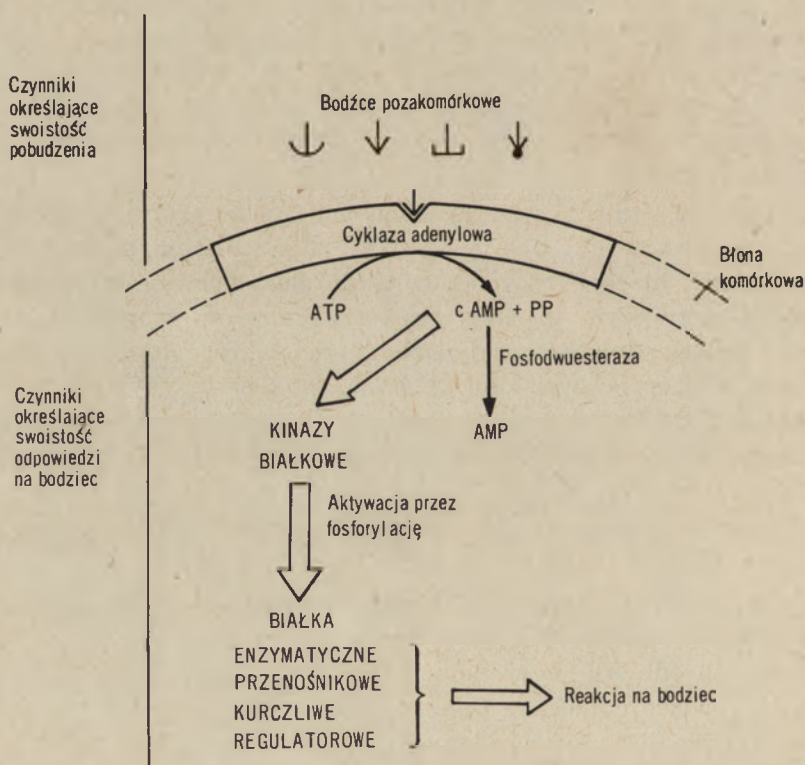
Odmienne od Robisona i jego grupy stanowisko zajmuje Hechter i wsp. (28), którzy wyrażają pogląd, że hormony oddziałujące na cyklazę adenylową są wiązane przez swoiste receptory znajdujące się w błonie komórkowej i tylko owe receptory są zdolne do zaktywowania cyklazy. Pogląd ten podzielają również Rodbell i wsp. (81) na podstawie badań nad aktywowaną przez glukagon cyklazą adenylową błon wątroby szczura (6, 72). Według nich glukagon wiązany jest przez określoną liczbę miejsc w błonie komórkowej. Miejsca wiążące mają charakter lipoproteidu, zaś przyłączaniu do nich cząsteczek glukagonu nie towarzyszy wytworzenie wiązań kowalencyjnych. Funkcją miejsc wiążących jest rozpoznanie i przyłączenie hormonu, a następnie przekazanie informacji o tym zdarzeniu do cząsteczek cyklazy adenylowej, reagujących na tak przekształcony bodziec wzmożoną aktywnością.

Następstwem istnienia układu swoistych receptorów hormonów (lub czynników wzrostowych) byłaby specyficzna aktywacja tylko tych cząsteczek cyklazy, które byłyby odpowiednio zlokalizowane w błonach komórkowych, przy czym ta sama cząsteczka enzymu mogłaby reagować na sygnał jednego lub większej liczby układów receptorowych. Wydaje się, że taka koncepcja swoistości aktywacji cyklazy adenylowej jest bardziej prawdopodobna od zaproponowanej przez Robisona, wobec bardzo dużej liczby i różnorodności bodźców oddziałujących na ten enzym (tablica 1). Można się spodziewać, że znaczny postęp poczyniony ostatnio w metodyce wyodrębniania i oczyszczania cyklazy adenylowej (70) ułatwi rozstrzygnięcie, która z przedstawionych hipotez jest słuszna.

Opisana swoistość tkankowa aktywacji układu cyklazy adenylowej stanowi jedną z zasadniczych przesłanek modelu, przewidującego zróżnicowany sposób odbioru przez komórki bodźców tego samego typu, przy czym różne bodźce odbierane przez tę samą komórkę mogą wywoływać skutek aktywacji cyklazy adenylowej ten sam wynik: wytworzenie cAMP.

IV. Fosfokinazy współdziałające z cAMP

W świetle dotychczas przedstawionych danych pierwszym etapem reakcji komórki na niektóre rodzaje bodźców zewnętrznych byłyby aktywacja cyklazy adenylowej i wytworzenie cAMP. Mechanizm działania cAMP nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony, jednakże dostępne dane wskazują, że nukleotyd ten może powodować zarówno aktywację różnego rodzaju enzymów jak i syntezę białek. Kuo i Greengard (53, 54) oraz Langan (57) sądzą, iż różnorodne oddziaływania cAMP mogą być realizowane za pośrednictwem kinaz białkowych. Kinazy te, aktywowane przez cAMP wprowadzają reszty fosforanowe do różnego typu białek, obecnych w komórce. Mogą to być białka enzymatyczne, kurczliwe lub regulatorowe. Ich fosforylacja przez odpowiednie kinazy powoduje przejście w postać aktywną. W ten sposób reakcja na bodziec, którego przekaźnikiem jest cAMP, byłaby uzależniona od obecności w komórce charakterystycznego dla danego typu tkanki zespołu kinaz białkowych i ich substratów. O ile zatem wspomniana poprzednio swoistość receptorów związanych czynnościowo z cyklazą adenylową decydowałaby o przyjmowaniu lub nieprzyjmowaniu bodźca przez komórkę, to profil enzymatyczny

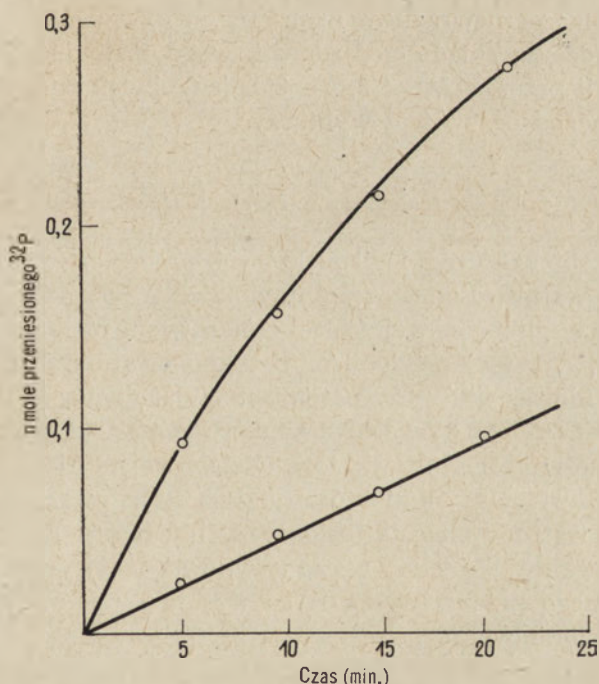


Schemat 2. Działanie cAMP jako przekaźnika bodźców pozakomórkowych

ny komórki, a zwłaszcza kinazy białkowe, decydowałyby z kolei o specyficzności reakcji te bodźce, których nieswoistym, powszechnym przekaźnikiem jest cAMP. Postulowane działanie cAMP z zaznaczeniem etapów decydujących o swoistości reakcji komórki na bodziec przedstawiono na schemacie 2.

1. Regulacja czynności enzymatycznej fosfokinaz

Jednym z warunków, jakie powinien spełniać model mechanizmu działania cAMP, jest powszechność występowania i swoistość substratowa fosfokinaz. Na podstawie prac Kuo i Greengarda (54, 55) oraz Kleina i Makmana (46) można sądzić, że fosfokinazy istotnie wchodzi w skład komórek wszystkich organizmów zwierzęcych, występując zarówno w postaci rozpuszczonych (64, 85, 100) jak i wbudowane w błony cytoplazmatyczne (100, 103) a nawet w chromatinę (85). Związek między fosfokinazami zawartymi w różnych strukturach komórkowych nie jest jasny (85). Wobec stosunkowo niewielkiej swoistości substratowej większości badanych fosfokinaz (55, 76) można sądzić, że lokalizacja enzymu ma duże znaczenie dla jego funkcji w komórce, decydując o rodzaju substratu (100). Jednakże znane są również przykłady dość dużej swoistości substratowej, zwłaszcza *in vitro* w układzie zawierającym



Rys. 3. Aktywacja kinazy histonowej z wątroby cielęcej przez cAMP (wg 57)

cAMP. Na przykład opisana przez L a n g a n a (57) fosfokinaza z wątroby cielęcej, przenosząca reszty fosforanowe z ATP na grupy -OH seryny histonów bogatych w lizynę (F1 i F2b), ulega bardzo znacznej aktywacji pod wpływem cAMP, jeżeli substratem jest histon (rysunek 3). Zastąpienie histonu innym białkiem zasadowym — protamina — powoduje zanik aktywującego działania cAMP.

Regulacja czynności fosfokinaz przez cAMP wiąże się z budową czwartorzędową tych enzymów. T a o, S a l a s i L i p m a n (93) stwierdzili, że w skład kinazy z retikulocytów króliczych wchodzi 2 typy podjednostek: katalityczna i regulatorowa. Podjednostka regulatorowa może odwracalnie wiązać cAMP; przyłączenie cAMP powoduje oddysocjowanie podjednostki katalitycznej i odblokowanie jej miejsc aktywnych. Podobny mechanizm aktywacji przez cAMP podają dla fosfokinazy z kory nadnercza wołu G i l l i G a r r e n (22), dla fosfokinazy z wątroby szczura — Y a m a m u r a i w s p. (52, 111, 112), zaś dla fosfokinazy z mięśni szkieletowych królika grupa K r e b s a (10, 78) oraz Y a m a m u r a i w s p. (111).

Jak wynika z prac tych autorów, podjednostka regulatorowa, określana jako wewnątrzkomórkowy receptor cAMP lub białko R, hamuje czynność katalityczną fosfokinazy w nieobecności cAMP; jeśli skutek nie dość łagodnej procedury oczyszczania spowoduje się dysocjację enzymu na podjednostki i ich oddzielenie, to podjednostki katalityczne zachowują się jak fosfokinaza niewrażliwa na cAMP. W związku z tym konieczne byłoby sprawdzenie składu podjednostkowego fosfokinaz nie podlegających aktywacji przez cAMP (43, 64, 85), jakkolwiek istnienia takich fosfokinaz nie można oczywiście wykluczyć.

2. Udział fosfokinaz w regulacji transkrypcji

Udział fosfokinaz w regulacji niektórych procesów metabolicznych nie ulega już dziś wątpliwości. Szczególnie dokładnie poznano regulację czynności fosforylasy glikogenowej, której opis zawiera niemal każdy podręcznik biochemii, a której mechanizm poznano ostatnio jeszcze dokładniej (99). Wiele trudności nastrocza natomiast wyjaśnienie, za pośrednictwem jakich czynników cAMP reguluje czynność genów. L a n g a n (57, 58) przypuszcza, że w procesie tym biorą udział swoiste kinazy, aktywowane przez cAMP i fosforylujące niektóre histony. Substratem dla wydzielonej przez niego z wątroby cielęcia fosfokinazy był histon F1, w którym fosforylacji podlegała tylko jedna reszta serynowa: jak wynika z porównania przeprowadzonego przez L a n g a n a (58) ta sama reszta podstawiana była grupą fosforanową *in vivo*.

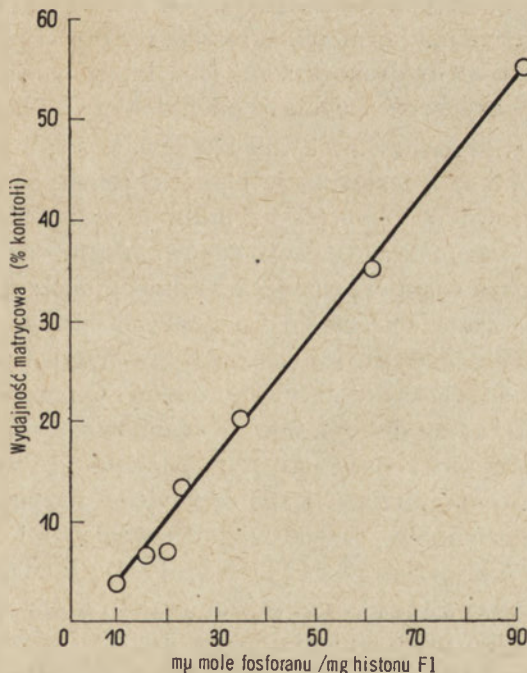
Jedną z bardziej znanych hipotez, wiążących regulację czynności genów z fosforylacją białek chromatyny jest hipoteza K l e i n s m i t h a, A l l f r e y a i M i r s k y ' e g o (48) przyjmująca, że liczba reszt fosfo-

ranowych zawartych w białkach decyduje o konformacji i funkcji kompleksu chromatynowego. Zgodnie z tą hipotezą i postulatem Langana należałoby się spodziewać zmian zawartości reszt fosforanowych w histonach w procesach, którym towarzyszy aktywacja genów. Zmiany takie istotnie zaobserwowano, nie tylko w histonach, lecz i w białkach kwaśnych chromatyny.

Przejściu komórek regenerujących wątroby z fazy G_1 w fazę S towarzyszy fosforylacja frakcji F2b (90), a następnie fosforylacja histonu F1 (89) powodująca niemal dwukrotny wzrost zawartości fosforu w tej frakcji białkowej. Hormonalna indukcja syntezy białek mleka — kazeiny i α -laktoalbuminy — w gruczole sutkowym szczura *in vitro* wiąże się z fosforylacją histonów (zwłaszcza F3) i białek niehistonowych chromatyny (96).

W wątrobie szczurów, którym wycięto nadnercza a następnie podano hydrokortyzon stwierdzono nasilenie procesu transkrypcji w porównaniu z wątrobą zwierząt nie otrzymujących hormonu. Towarzyszył temu niemal dwukrotny wzrost włączania znakowanego fosforanu do histonów lizynowych i nieco niższy — do histonów argininowych (67). Zawartość ATP w komórkach wątroby nie ulegała w tym doświadczeniu zmianom.

Znacznie zwiększoną fosforylacją histonu F1 z wątroby szczura otrzymującego glukagon stwierdził L a n g a n (58). Podobny skutek powo-



Rys. 4. Zależność między wydajnością matrycową kompleksu DNA-histon F1 dla polimerazy DNA z *Escherichia coli* a zawartością fosforu w histonie F1 (wg 89)

dowało podanie zwierzęciu insuliny. Dalszym przykładem związku między aktywacją genów a fosforylacją białek jądrowych jest jedna z najwcześniej obserwowanych zmian zachodzących w limfocytach poddanych działaniu fitohemaglutyniny, mianowicie podwyższona fosforylacja białek chromatyny (47), między innymi histonu F1 (15). Natomiast w dojrzewających erytrocytach ptasich, w których aktywność chromatyny spada, obserwuje się obniżenie zawartości fosforu w białkach chromatyny (21). Spada również kilkakrotnie aktywność fosfokinazy zawartej w jądrach retikulocytów, w miarę ich dojrzewania (21). Podobną zmianę aktywności fosfokinazy stwierdzono także w regenerującej wątrobie szczura (71).

O tym, że fosforylacja histonów może w istotny sposób wpływać na funkcję chromatyny, świadczą wyniki prac grupy Stocken'a. Oznaczane przez nich *in vitro* aktywności polimerazy DNA (69) i polimerazy RNA (89) były tym niższe, im wyższa była zawartość fosforu w histonie F1 związanym z DNA. Zależność tę dla polimerazy RNA ilustruje rysunek 4.

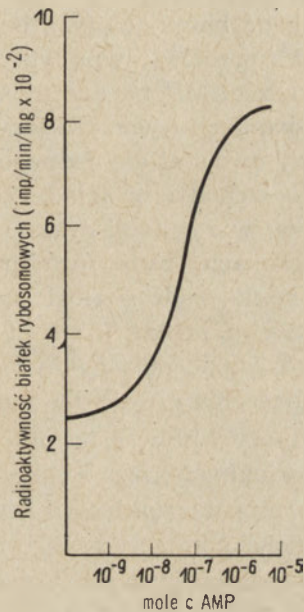
Przytoczone przykłady związku między fosforylacją histonów lub niefrakcjonowanych białek chromatyny a czynnością genów znakomicie uzupełniałyby model regulacji aktywności chromatyny za pośrednictwem cAMP, gdyby udało się uchwycić związek między cAMP a czynnością fosfokinazy, dla której substratem są białka kwaśne (43) związane z regulacją czynności genów. Brak też jest wyjaśnienia, co powodowałoby wybór przez fosfokinazę histonową cząsteczek histonów, zlokalizowanych w chromatynie w miejscach odpowiadających genom podlegającym transkrypcji wskutek działania hormonu. Wreszcie fosforylację histonów obserwowano pod wpływem hydrokortyzonu (67), który należy do hormonów, nie zmieniających aktywności cykazy adenylowej (107).

Mimo tych zastrzeżeń, związek między zawartością cAMP w komórce i czynnością fosfokinaz a fosforylacją białek chromatyny wydaje się niewątpliwy. Jest prawdopodobne, że czynniki te stanowią konieczny lecz niewystarczający warunek aktywacji genów. Można sądzić, że bardziej odpowiadałoby rzeczywistości przyjęcie kilkustopniowego aktywowania chromatyny, przy czym fosforylacja niektórych histonów i następująca wskutek niej zmiana konformacji chromatyny byłyby zaledwie etapem przygotowującym do właściwej aktywacji genów. O przebiegu tego wstępnego etapu decydowałoby dziedzicznie uwarunkowane rozmieszczenie fosfokinazy w chromatynie. Należy przy tym pamiętać, że wyspecjalizowana komórka dysponuje ograniczoną liczbą odpowiedzi na bodźce i że reakcje na różne bodźce hormonalne są pod wieloma względami do siebie podobne (94). Postulowane przez Brittena i Davidsona (9) geny wiążące czynniki aktywujące (ang. *sensor genes*), których aktywacja pociąga za sobą kolejne uaktywnienie całego szeregu innych podporządkowanych genów, mogłaby być właśnie miejscem działania mechanizmu regulacyjnego zależnego od cAMP.

3. Udział fosfokinaz w regulacji translacji

W poszukiwaniu mechanizmu oddziaływania cAMP na proces translacji zwrócono uwagę na fosforylację białek rybosomowych i znaczenie tego procesu dla regulacji translacji genów.

Loeb i Blat (60) wykazali włączanie reszt fosforanowych do białek rybosomowych wątroby szczura zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Enzym katalizujący tę reakcję zawarty był we frakcji rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych tych samych komórek, z których pochodziły rybosomy, użyte do doświadczeń *in vitro*. Wpływ cAMP na proces fosforylacji białek rybosomowych przedstawia wykres zamieszczony na rysunku 5.



Rys. 5. Zależność fosforylacji *in vitro* białek rybosomowych wątroby szczura od cAMP (wg 60). Mierzono włączanie ³²P-fosforanu z ³²P-ATP

Fosforylację białek rybosomów wyodrębnionych z kory nadnerczy wykryli także Walton i wsp. (100). Badana przez nich fosfokinaza, pochodząca z frakcji rozpuszczalnej oraz z błon retikulum endoplazmatycznego komórek kory nadnercza była, podobnie jak w poprzednio opisanym przykładzie, aktywowana przez cAMP. Wykazano (100), że podlegające fosforylacji białko jest dość silnie związane z rybosomami; płukanie preparatów rybosomów 0,5M roztworem NH₄Cl, usuwając wszystkie zasocjowane z rybosomami czynniki inicjujące biosyntezę białka, nie powoduje jednakże odłączenia białka podlegającego fosforylacji. Dopiero przemywanie rybosomów 0,88M roztworem KCl powoduje ich dysocjację na podjednostki i pozbawia zarazem substratu dla fosfokinazy.

Garren i wsp. (20) dopatrują się w przedstawionych danych potwierdzenia tezy, jakoby hormonalna regulacja translacji polegała na fosforylowaniu białka rybosomowego przez specyficzną fosfokinazę, której czynność byłaby zależna od zawartości cAMP w komórce. Jest to sugestia bardzo pociągająca, zwłaszcza w zestawieniu z pracą Kabata (40), który stwierdził inaktywację rybosomów z retikulocytów króliczych w następstwie fosforylacji białka oznaczonego symbolem S_1 ; białko to decyduje o zdolności przyłączenia mRNA i tworzenia polirybosomów. Fosforylacja białka S_1 jest jednak, jak się wydaje, procesem niezależnym od cAMP.

Rozpatrując wpływ wywierany przez cAMP na translację należy wziąć pod uwagę, że hormony podwyższające zawartość cAMP w komórce działają na proces translacji bądź hamująco (92), bądź pobudzająco (25, 110). Aby zatem pogodzić te dwa przeciwstawne wpływy — pobudzający i hamujący — wywierane przez cAMP na aparat syntezy białka należałoby przyjąć, iż w niektórych tkankach (tych, w których cAMP pobudza translację) brak jest fosfokinazy swoistej dla jednego z białek rybosomowych, albo też, że białko to nie wchodzi w skład rybosomów z tych tkanek. Inną możliwością jest udział w regulacji cyklu rybosomowego (32, 35, 60, 98) w poszczególnych tkankach, bądź fosfokinazy aktywowanej przez cAMP, opisanej przez Garrena, bądź analogicznego enzymu niezależnego od tego nukleotydu, opisanego przez Kabata i Richa (40, 41). Zainteresowanie, jakie budzi koncepcja cyklu rybosomowego pozwala się spodziewać wyjaśnienia znaczenia cAMP dla funkcji rybosomów.

Wydaje się, że cAMP może wpływać na proces translacji nie tylko za pośrednictwem swoistej fosfokinazy, lecz i bezpośrednio. Khairallah i Pitot (44) przypuszczają, że nukleotyd ten uczestniczy w procesie odłączania gotowego łańcucha polipeptydowego od polirybosomów. Autorzy ci badali w układzie bezkomórkowym z wątroby szczura odłączanie od polirybosomów białek znakowanych ^{14}C przez odpowiednie podanie zwierzętom doświadczalnym ^{14}C -waliny. Ilość nowopowstałego białka, odłączanego z polirybosomów pod wpływem działania „enzymu uwalniającego” oznaczano przez pomiar radioaktywności. Wyniki doświadczenia, przedstawione w tablicy 4, wykazały, że cAMP nie tylko może zastępować ATP i GTP w procesie uwalniania białek z rybosomów, lecz najprawdopodobniej uczestniczy w aktywacji „enzymu uwalniającego”. Świadczy o tym więcej niż addytywny (por. B_1 i B_4 z B_3 , tablica 4) wpływ dwumetyloaminopuryny — inhibitora fosfodwuesterazy nukleotydów cyklicznych — na uwalnianie łańcuchów polipeptydowych. Wprawdzie wyniki Khairallaha i Pitota przemawiają za regulacyjną czynnością cAMP w translacji, jednakże przy obecnym stanie wiedzy trudno jest stwierdzić, z całą pewnością, czy wpływ cAMP na translację w badanym układzie nie jest wynikiem dostarczania przez ten nukleotyd energii, skoro wiąza-

nie 3' okazało się w świetle pracy Greengarda i Kuo (24) wiązaniem wysokoenergetycznym.

Należy wspomnieć jeszcze o jednej możliwości regulacji procesu translacji za pośrednictwem cAMP. Jak wiadomo z doświadczeń *in vitro* (5, 36) białka zasadowe hamują translację mRNA. Fosforylacja tych białek przez kinazy zależne od cAMP mogłaby pozbawiać je charakteru inhibitora. Jednakże brak jest dotychczas prac wyjaśniających bliżej znaczenie biologiczne zasadowych białek cytoplazmatycznych (95), ponadto rolę czynnika znoszącego ich hamujący wpływ na translację przypisywano dotychczas proteazom (63, 65).

Tablica 4

Wpływ cAMP na uwalnianie ¹⁴C-białek z polirybosomów wątroby szczura (wg 44)

Bezkomórkowy układ biosyntezy białka	Radioaktywność białek (rozpad/min/mg RNA)
A — całkowity	722
B — pozbawiony ATP i CTP	15
B ₁ — z dodatkiem cAMP	524
B ₂ — „ AMP	48
B ₃ — „ cAMP i dwumetyloaminopuryny	1320
B ₄ — „ dwumetyloaminopuryny	312
B ₅ — „ cAMP, pozbawiony enzymu uwalniającego	18

V. Uwagi końcowe

Z dotychczas opublikowanych prac doświadczalnych wynika, że łańcuch przyczynowy: „hormon — cyklaza adenylova — cAMP — swoista fosfokinaza — białko kurczliwe, transportowe lub regulatorowe” odpowiada rzeczywistemu mechanizmowi regulacyjnemu dla wielu przemian metabolicznych. Zastosowanie tego modelu dla regulacji syntezy białek na etapie zarówno transkrypcji jak translacji budzi najwięcej zastrzeżeń, mimo iż — jak wynika z przytoczonych tu prac — wiele argumentów przemawia na korzyść takiego modelu regulacyjnego. Najślabszym ogniwo w wspomnianym łańcuchu jest ogniwo ostatnie — między fosfokinazami a białkami aparatu genetycznego. Wydaje się, że rozpatrując zdarzenia zachodzące w komórce wskutek podwyższenia zawartości cAMP nie należy zaniedbywać istotnych zmian następujących w układzie mikrokanalikowym (75), a zwłaszcza w transporcie jonów (19, 75, 83, 86). Trudno w obecnym stanie badań stwierdzić z całą pewnością, czy działanie bodźca pozakomórkowego na receptor wbudowany w błonę powoduje równoległe uaktywnienie układu cyklazy adenylowej i układu transportowego czy też aktywacja jednego z tych układów jest następstwem aktywacji drugiego. Nie ulega jednak wątpliwości, że pobudzenie czynności

cyklazy adenyłowej wiąże się ze zwiększonym pobieraniem jonów wapnia ze środowiska i uruchomieniem tych jonów ze stanu związanego wewnątrz komórki (75). Rasmussen (75) uważa ten jon za nieodzowny do prawidłowego funkcjonowania układów regulacyjnych z udziałem cAMP, między innymi do czynności fosfokinaz białkowych. Na równą uwagę zasługują zmiany w transporcie jonów sodu i potasu w powiązaniu z zawartością cAMP wewnątrz komórki. Świadczą o tym zmiany potencjału błon komórkowych pod wpływem cAMP, db-cAMP lub hormonów, stwierdzone w komórkach Purkinjego (86) oraz komórkach wątroby (19) i mózgu (83) szczura. Praca Quastela i Kaplana (74) zwraca uwagę na znaczne zwiększenie pobierania jonów potasu przez limfocyty poddane działaniu fitohemaglutyniny oraz niezbędność tego jonu dla transformacji blastycznej. Bitensky i wsp. (7) uważają cyklazę adenyłową za ogniwo wiążące przyjęcie fotonu przez pręcik siatkówki oka żaby ze zmianą przepuszczalności błon tej komórki dla jonów Na^+ .

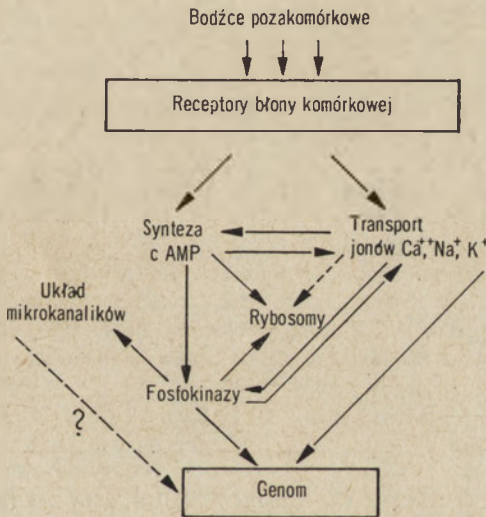
O związku systemów cyklazy adenyłowej i transportu jonów sodu i potasu świadczy również hamowanie cyklazy przez ouabainę — inhibitor adenozynotrójfosfatazy transportowej (11).

Nie jest zatem wykluczone, że bodźce wywołujące aktywację cyklazy adenyłowej powodują jednocześnie zmiany w położeniu i przemieszczaniu się jonów sodu, potasu i wapnia i tym właśnie zmianom należy przypisać wpływ na funkcję genomu. Prace świadczące na korzyść tego poglądu są dotychczas nieliczne. Kierszenbaum i wsp. (45) stwierdzają nagromadzenie jonów Ca^{2+} i Na^+ w jądrach komórkowych, w obszarach odpowiadających heterochromatynie. Lezzi i Gilbert (59) podają, że identyczne zmiany w układzie „pufów” i pierścieni Balbianiego w chromosomach śliniankowych *Chironomus thummi* można wywołać odpowiednimi proporcjami hormonu juwenalnego i ekdysonu lub jonów sodu i potasu: inkubacja izolowanych jąder komórek śliniankowych w środowisku o podwyższonej zawartości K^+ wywoływała te same zmiany w morfologii chromosomów co ekdyson, zaś jony Na^+ działały podobnie jak hormon juwenalny. Komórki interstycjalne stułbii umieszczone w roztworze 0,2% NaCl i 0,2% CaCl_2 w ciągu kilkunastu godzin przekształcają się w komórki parzydelkowe (12).

Hipotetyczną rolę jonów w regulacji czynności jądra komórkowego omawia przeglądowa praca Sieberta i Langendorfa (84).

Związek cAMP z przemieszczaniem się jonów wewnątrz komórki pozostaje zatem w sferze domysłów. Niektórzy autorzy uważają (103), że intensywna fosforylacja białek błon retikulum endoplazmatycznego przez fosfokinazę aktywowaną przez cAMP pozostaje w związku przyczynowym z transportem jonów jednowartościowych. Oczywiście oddziaływanie cAMP na genom za pośrednictwem transportu jonów nie wyklucza omówionego uprzednio mechanizmu z udziałem fosfokinaz postulowanego przez Kuo, Greengarda i Langana.

Obecny stan badań nad mechanizmem działania cAMP na czynność genomu komórkowego można ująć w sposób przedstawiony na schemacie 3. Związki przyczynowe między działaniem bodźców pozakomórkowych a syntezą cAMP oraz czynnością fosfokinaz omówiono w podrozdziałach I—III, zaś powiązania z transportem jonów — na początku podrozdziału V. Wyjaśnienia wymaga zatem zaznaczony strzałką ze znakiem zapytania związek między układem mikrokanalikowym a czynnością genomu. Na związek taki zdaje się wskazywać praca Vasilieva i wsp. (97) o inicjacji syntezy DNA w zahamowanych przez zetknięcie mysich komórkach zarodkowych pod działaniem kolcemidu, który wiąże się z kurczliwymi białkami mikrokanalików (101). Rozległe zmiany w układzie wakuolarnym limfocytów transformowanych fitohemaglutyniną Hirschhorn i wsp. (29) uważają za konieczne do rozpoczęcia syntezy DNA i prawidłowego przebiegu transformacji. Jednakże brak jest bliższych danych o możliwym mechanizmie oddziaływania układu mikrokanalikowego na genom.



Schemat 3. Związki przyczynowe pomiędzy zmianami następującymi w komórce pod wpływem bodźców pozakomórkowych

Wymaga również komentarza strzałka oznaczająca na schemacie związek między transportem jonów a rybosomami. Wiadomo jakie jony i w jakich stężeniach potrzebne są do funkcjonowania rybosomów *in vitro*. Wydaje się, że nie można wykluczyć lokalnych wahań stężeń jonów, zwłaszcza kationów jedno- i dwuwartościowych, jako nieswoistego czynnika oddziałującego na translację.

Celowość badania mechanizmów regulacji czynności genów w powiązaniu ze stanem i funkcją błon komórkowych potwierdzają takie badania jak opublikowana niedawno praca O. Greengard (23); autorka ta

wykazała, że indukcja transaminazy tyrozynowej przez glukagon w wątrobie rozwijającego się zarodka szczurzego następuje dopiero z chwilą wykształcenia się w błonach komórkowych układu cykazy adenylowej. Można się spodziewać, że dalsze badania w tym kierunku zmienią w szczególności przedstawiony model działania cAMP, niemniej jednak przyniosą potwierdzenie roli tego nukleotydu w regulacji czynności genomu komórkowego.

LITERATURA

1. Adiga P. R., Murthy P. V. N., Mc Kenzie J. M., *Biochemistry* **10**, 711 (1971).
2. Baserga R., *Cell. Tissue Kinet.* **1**, 167 (1968).
3. Bär H. P., Hetcher P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **63**, 350 (1969).
4. Benjamin W. B., Goodwan R. M., *Science* **166**, 629 (1969).
5. Berlinguet L., Normand A., *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 509 (1968).
6. Birnbaumer L., Pohl S. L., Rodbell M., *J. Biol. Chem.* **246**, 1857 (1971).
7. Bitensky M. W., Gorman R. E., Miller W. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 561 (1971).
8. Bitensky M. W., Russel V., Robertson W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 706 (1968).
9. Britten R. J., Davidson E. H., *Science* **165**, 349 (1969).
10. Brostrom M. A., Reimann E. M., Walsh D. A., Krebs E. G., *Advan. Enz. Regul.* **8**, 191 (1970).
11. Burke G., *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 30 (1970).
12. Burnett A. L., w *Morphological and Biochemical Aspects of Cytodifferentiation*, red. E. Hagen, P. Zilliken, S. Karger, Basel 1967, str. 110.
13. Butcher R. W., Robison G. A., Hardman J. G., Sutherland E. W., *Advan. Enz. Regul.* **6**, 357 (1968).
14. Chassy B. M., Love L. L., Krichevsky M. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 296 (1969).
15. Cross M. E., Ord M. G., *Biochem. J.* **118**, 191 (1970).
16. Cross M. E., Ord M. G., *Biochem. J.* **124**, 21P, 241 (1970).
17. Drummond G. J., Perrot-Yee S., *J. Biol. Chem.* **236**, 1126 (1961).
18. Elgin S. C. R., Bonner J., *Biochemistry* **9**, 4440 (1970).
19. Friedmann N., Somlyo A. V., Somlyo A. P., *Science* **171**, 400 (1971).
20. Garren L. D., Ney R. L., Davis W. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1443 (1965).
21. Gershay E. L., Kleinsmith L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **194**, 519 (1969).
22. Gill G. M., Garren L. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 786 (1971).
23. Greengard O., *Biochem. J.* **115**, 19 (1969).
24. Greengard P., Kuo J. F., *Federation Proc.* **28**, 467 (1969).
25. Griffin D. M., Szego C. M., *Life Sci.* **7**, 1017 (1968).
26. Grower M. F., Bransome E. D., *Science* **168**, 483 (1970).
27. Hamilton T. H., *Science* **161**, 649 (1968).
28. Hechter O., Halkerston J. D. K., *Hormones* **5**, 697 (1964).
29. Hirschhorn R., Grossman J., Weismann G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med* **133**, 1361 (1970).

30. Hirschhorn R., Troll W., Brittinger G., Weismann G., *Nature* **222**, 1247 (1969).
31. Hnilica L. S., Busch H., *J. Biol. Chem.* **238**, 918 (1963).
32. Hogan B. L. M., Korner A., *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 139 (1968).
33. Hsie A. W., Puck T. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 358 (1971).
34. Hsie A. W., Waldren C. A., *J. Cell. Biol.* **47**, 92a (1970).
35. Hultin T., w *Biochemistry of Rybosomes and Messenger-RNA* red. R. Lindigkeit, P. Langen, J. Richter, Acad. Verlag, Berlin 1968, str. 379.
36. Jachymczyk W., Sieliwanowicz B., IX Zjazd PT Biochem. Streszczenie prac, Katowice 1971, str. 40.
37. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
38. Johnson G. S., Friedman R. M., Pastan J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 425 (1971).
39. Jost J. P., Hsie A., Hughes S. D., Ryan L., *J. Biol. Chem.* **245**, 351 (1970).
40. Kabat D., *Biochemistry* **9**, 4160 (1970).
41. Kabat P., Rich A., *Biochemistry* **8**, 3742 (1969).
42. Kahl A., *Post. Biochem.* **18**, 199 (1972).
43. Kaplowitz P. B., Platz R. B., Kleinschmith L. J., *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 739 (1971).
44. Khairallah E. A., Pitot M. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 269 (1967).
45. Kierszenbaum A. L., Libanati C. M., Tandler C. J., *J. Cell. Biol.* **48**, 314 (1971).
46. Klein M. J., Makman M. H., *Science* **172**, 863 (1971).
47. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Science* **154**, 780 (1966).
48. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Science* **154**, 1182 (1966).
49. Kono T., *J. Biol. Chem.* **244**, 5777 (1969).
50. Korner A., *Progr. Biophys.* **17**, 61 (1967).
51. Korner A., *Biochim. J.* **115**, 30P (1969).
52. Kumon A., Yamamura J., Nishizuka Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **41**, 1290 (1970).
53. Kuo J. F., Greengard P., *J. Biol. Chem.* **244**, 3417 (1969).
54. Kuo J. F., Greengard P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 1349 (1969).
55. Kuo J. F., Krueger B. K., Sanes J. R., Greengard P., *Biochim. Biophys. Acta* **212**, 79 (1970).
56. Labrie F., Bérard G., Gauthier M., Lemay A., *J. Biol. Chem.* **246**, 1902 (1971).
57. Langan T. A., *Science* **162**, 579 (1968).
58. Langan T. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 1276 (1969).
59. Lezzi M., Gilbert L. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 498 (1969).
60. Loeb T. E., Blat C., *FEBS Lett.* **10**, 105 (1970).
61. Loten E. G., Sneyd J. G. T., *Biochem. J.* **100**, 187 (1970).
62. Mac Manus J. P., Whitefield J. F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **132**, 409 (1969).
63. Maggio R., *J. Cell Comp. Physiol.* **50**, 135 (1957).
64. Majumdez G. C., Turkington R. W., *J. Biol. Chem.* **246**, 2650 (1971).
65. Mano Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 216 (1966).
66. Mills D. C. B., Smith J. B., *Biochem. J.* **121**, 185 (1971).
67. Murthy L. D., Pradhan D. S., Sreenivasan A., *Biochim., Biophys. Acta* **199**, 500 (1970).

68. Neidle A., Waelsch H., *Science* **145**, 1059 (1964).
69. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **107**, 403 (1968).
70. Pastan J., Pricer W., Blanchette-Mackie J., *Metabolism* **19**, 809 (1970).
71. Pawse A. R., Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.*, **122**, 721 (1971).
72. Pohl S. L., Birnbaumer L., Rodbell M., *J. Biol. Chem.* **246**, 1849 (1971).
73. Pollard C. J., *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 511 (1970).
74. Quastel M. R., Kaplan J. G., *J. Cell. Biol.* **47**, 164a (1970).
75. Rasmussen H., *Science* **170**, 404 (1970).
76. Reddi A. H., Ewing L. L., Williams-Ashman H. G., *Biochem. J.* **122**, 333 (1971).
77. Reik L., Petzold G. L., Higgins J. A., Greengard P., Barnett R. J., *Science* **168**, 382 (1970).
78. Reimann E. M., Walsh D. A., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **246**, 1986 (1971).
79. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **139**, 703 (1967).
80. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W., *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 150 (1968).
81. Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L., *J. Biol. Chem.* **246**, 1861 (1971).
82. Soifer F., *Int. J. Radiat. Biol.* **19**, 191 (1971).
83. Shimizu H., Creveling C. R., Daly J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **65**, 1033 (1970).
84. Siebert G., Langendorf H., *Naturwissenschaften* **57**, 119 (1970).
85. Siebert G., Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **122**, 721 (1971).
86. Siggins G. R., Oliver A. P., Hoffer B. J., Bloom F. E., *Science* **171**, 192 (1971).
87. Smith J. W., Steiner A. L., Newberry W. M., Parker C. W., *J. Clin. Invest.* **50**, 432 (1971).
88. Soifer D., Hechter O., *Biochim. Biophys. Acta* **230**, 539 (1971).
89. Stevely W. S., Stocken L. A., *Biochem. J.* **110**, 187 (1968).
90. Sung M. T., Dixon G. H., Smithies O., *J. Biol. Chem.* **246**, 1358 (1971).
91. Sutherland E. W., Rall T. W., *Pharmacol. Rev.*, **12**, 265 (1960).
92. Swislocki N. I., *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 242 (1970).
93. Tao M., Salas M., Lipman F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **67**, 408 (1970).
94. Tata J. R., *Nature* **219**, 331 (1968).
95. Toczko K., Kanabus J., *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. Sci. Biol.* **14**, 459 (1966).
96. Turkington R. W., Riddle M., *J. Biol. Chem.* **244**, 6040 (1969).
97. Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Guelstein V. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 977 (1971).
98. Vaughan M. H., Warner J. R., Darnell J. E., *J. Mol. Biol.* **25**, 235 (1967).
99. Walsh D. A., Perkins J. P., Brostrom C. O., Ho E. S., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **246**, 1968 (1971).
100. Walton G. M., Gill G. N., Abrass J. B., Garren L. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 880 (1971).
101. Weisenberg R. C., Borisy C. G., Taylor E. W., *Biochemistry* **7**, 4466 (1968).
102. Weiss B., Costa F., *Science* **156**, 1750 (1967).
103. Weller M., Rodnight R., *Nature* **225**, 187 (1970).

104. Whitfield J. F., Mac Manus J. P., Rixon R. H., *J. Cell Physiol.* **75**, 213 (1970).
105. Whitfield J. F., Mac Manus J. P., Rixon R. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **134**, 1170 (1970).
106. Wicks W. D., *J. Biol. Chem.* **243**, 900 (1968).
107. Wicks W. D., *Science* **160**, 997 (1968).
108. Wicks W. D., *J. Biol. Chem.* **244**, 3941 (1969).
109. Wicks W. D., Kenney F. T., Lee K. Z., *J. Biol. Chem.* **244**, 600P (1969).
110. Wilson B., Raghupathy E., Tonoue T., Tong W., *Endocrinology* **83**, 877 (1968).
111. Yamamura H., Kumon A., Nishizuka Y., *J. Biol. Chem.* **246**, 1544 (1971).
112. Yamamura H., Takeda M., Kumon A., Nishizuka Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **40**, 675 (1970).

ANDRZEJ KAHL*

Cykliczny 3', 5'-adenozynomonofosforan

Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate

Present knowledge of the regulatory mechanisms for 3',5'-AMP synthesis and decomposition in living organisms is given. The influence of this compound on metabolism is presented with special preference of the role of its receptors.

Historia badań nad cyklicznym adenzynomonofosforanem (cAMP) obejmuje okres około 10 lat i jest przykładem zdumiewającej kariery, jaką w biochemii zrobił ten nukleotyd. Gdy w 1960 roku Sutherland i Rall (158) zwrócili uwagę, że cAMP uczestniczy we wpływie katecholamin na glikolizę, nikt nie przypuszczał, że do pośrednictwa tego związku trzeba się będzie wkrótce odwoływać przy wyjaśnianiu mechanizmów działania większości (jeśli nie wszystkich) znanych hormonów. cAMP znalazł się jednocześnie w zasięgu zainteresowań biochemii, mikrobiologii, fizjologii (neurofizjologii i endokrynologii) i farmakologii. Wynikało to z bardzo różnorodnej aktywności biologicznej i szerokiego rozpowszechnienia omawianego nukleotydu. Jego występowanie stwierdzono u ssaków, bakterii, pierwotniaków, śluzowców i wyższych roślin (aczkolwiek dane dotyczące ostatniej grupy organizmów są skąpe).

Odkąd wykazano, że omawiany nukleotyd i enzymy regulujące jego stężenie w tkankach ssaków stanowią zasadniczą część β -receptorów układu adrenergicznego**, wiedza o roli cAMP wzbogaciła się o spostrzeżenia

* Lek. med., mgr biol., doktorant PAN, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Wrocław; obecny adres: Instytut Onkologii, Zakład Radiobiologii, Warszawa, ul. Wawelska 15.

Wykaz używanych skrótów: c — przed skrótem nazwy nukleozydomonofosforanu oznacza jego 3',5'-cykliczną pochodną, db-cAMP — N_6, O_2 -dwubutyrylo-cAMP, AC — cyklaza adenylova, PDE — fosfodwuesteraza cyklicznych 3',5'-nukleozydomonofosforanów, TAT — aminotransferaza tyrozynowa, ACTH — hormon adrenokortykotropowy, STH — hormon somatotropowy, LTH — prolaktyna, LH — hormon luteotropowy, TSH — hormon tyreotropowy.

** wg R. Gryglewskiego receptory β -adrenergiczne są to receptory, których pobudzenie wywołuje w organizmie dodatnie działanie inotropowe i chronotropowe na czynność serca oraz rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli i naczyń krwionośnych (R. Gryglewski, A. Hoszowska — „Leki beta-adrenergiczne, chemia — farmakologia — klinika”, Kraków 1970).

i teorie nagromadzone przez farmakologię w okresie, gdy nie domyślano się jeszcze związku cAMP z czynnością β -receptorów.

Udział cAMP stwierdzono w wielu procesach życiowych, fizjologicznych i patologicznych. Wymienię tylko niektóre z nich, aby zilustrować, jak bardzo odległe przejawy biologicznej aktywności różnych organizmów mogą mieć pewne wspólne ogniwa biochemiczne skupione wokół cAMP:

- chemotaksja, wytwarzanie wici (43, 179) i indukcje enzymatyczne u bakterii (124, 125),
- agregacja rozproszonych komórek i wytwarzanie plazmodiów u śluzowców (7, 14, 83),
- hormonalne indukcje enzymatyczne u ssaków (162),
- kontrola syntezy i rozpadu glikogenu (71, 108),
- kontrola lipolizy (37, 90, 164),
- sterydogeneza (51, 58, 63, 66),
- uwalnianie insuliny i hormonów przysadki (134),
- gospodarka mineralna (w szczególności jonami Ca^{2+} , PO_4^{3-} i Na^+) u ssaków (113, 116) i w komórkach niższych organizmów (34),
- regulacja aktywności mitotycznej tymocytów (100, 170, 171, 172, 174) i transformacja blastyczna (69, 171),
- wytwarzanie przeciwciał (52, 95),
- zahamowanie kontaktowe (75).

Udział cAMP w wymienionych procesach przyjmuje się za udowodniony, lub wielce prawdopodobny, o ile spełnione są dwa warunki:

- 1) proces przebiega ze zmianą stężenia cAMP w komórkach, tkankach, płynach ustrojowych lub w środowisku inkubacyjnym, co można wykryć bezpośrednio (pomiar ilości cAMP) lub pośrednio (pomiar aktywności enzymów wytwarzających i rozkładających cAMP),
- 2) proces można wywołać (naśladować) przez zmianę stężenia cAMP (dodanie nukleotydu, zaktywowanie, lub zahamowanie enzymów, które go wytwarzają lub rozkładają).

Jest bardzo prawdopodobne, że u podstaw wszystkich różnorodnych przejawów biologicznej aktywności cAMP leżą podobne mechanizmy biochemiczne; od ich wyjaśnienia zależy uporządkowanie spostrzeżeń, dotyczących działania omawianego nukleotydu. Ponadto należałoby poznać mechanizm regulacji stężenia cAMP w organizmach. Zagadnienia te są przedmiotem wielkiej liczby publikacji. Próbę podsumowania obecnego stanu wiedzy o cAMP i procesach, na które wpływa, stanowią trzy artykuły przeglądowe (124, 125, 134) oraz monografia (60).

Wzrastające zainteresowanie cAMP sprawiło, że zwrócono uwagę na rolę innych cyklicznych 3',5'-nukleotydów — cGMP (48, 64, 65, 165), cIMP (57, 65), cUMP (80, 91) i cCMP (91). Badania te są jednak znacznie mniej zaawansowane i prowadzone głównie pod kątem wykrycia wpływu wspomnianych nukleotydów na reakcje, w których bierze udział cAMP oraz na regulację jego stężenia w komórkach. Na podstawie dotychczasowych da-

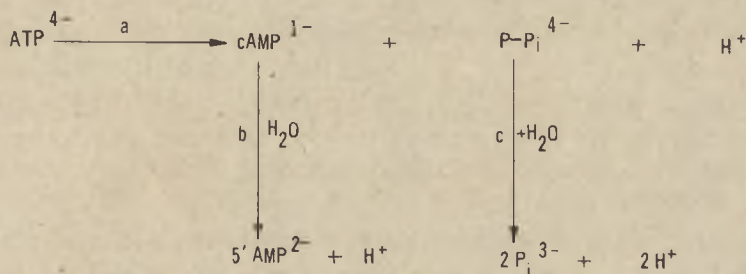
nych można jednak przypuszczać, że biologiczne znaczenie innych cyklicznych 3',5'-nukleotydów — prócz cGMP — jest mniejsze, niż cAMP, co jednak nie wyklucza ich działania na nie wykryte dotychczas ogniwa regulacyjne, na które nie wpływa cAMP.

Celem niniejszego artykułu jest omówienie głównych problemów biochemicznych związanych z metabolizmem cAMP i udziałem tego nukleotydu w mechanizmach regulacyjnych. O najważniejszych trudnościach metodycznych, które towarzyszą rozwiązywaniu tych zagadnień, będę wspominał przy omawianiu poszczególnych problemów.

I. Metabolizm cAMP

W powstawaniu i rozpadzie cAMP w organizmach żywych (rysunek 1) biorą udział 2 enzymy:

- cyklaza adenyłowa (AC) — nie uwzględniona w spisie enzymów (45) (wydanie z 1964 r.),
- fosfodwuesteraza nukleotydów cyklicznych (PDE) (E C 3.1.4.1).



Rys. 1. Powstawanie i rozpad cAMP w organizmach żywych

a — cyklaza adenyłowa; b — fosfodwuesteraza 3',5'-cyklicznych nukleotydów; c — pirofosfataza pirofosforanu nieorganicznego.

Metabolity przedstawiono w postaci całkowicie zjonizowanej, aby ułatwić rozważania w podrozdziale II/4 (str. 214).

Drugi produkt przekształcenia ATP pod wpływem AC — pirofosforan nieorganiczny — pojawia się w ilościach stechiometrycznych z cAMP jedynie *in vitro*, gdyż w żywych komórkach jest natychmiast rozkładany przez pirofosfatazę (EC. 3.6.1.1) (154), albo wiązany przez jakiś układ akceptorowy (60). Oba procesy (a także hydroliza cAMP pod wpływem PDE) przesuwają równowagę reakcji katalizowanej przez AC w kierunku tworzenia cAMP.

Metabolizm cAMP badano u przedstawicieli większości typów zwierząt (60, 134), u bakterii (124, 134), grzybów (7, 14, 83), a także u roślin wyższych (130). Przedstawiony schemat jest słuszny dla wszystkich badanych organizmów prócz bakterii, u których często nie występuje PDE, zaś rozkład cAMP jest zastąpiony usuwaniem tego nukleotydu w niezmienionej

postaci do środowiska (17, 102, 110, 124). Różnice występują również w budowie, w właściwościach i wewnątrzkomórkowym rozmieszczeniu AC i PDE.

1. Powstawanie cAMP

Cyklaza adenylova (AC) u bakterii, grzybów i zwierząt jest silnie związana z błonami komórkowymi lub z siateczką endoplazmatyczną (16, 38, 42, 60, 73, 121, 124, 129, 131, 145, 158). Z tych powodów zwykło się ją nazywać nierozpuszczalną lub cząstkową. Wyjątek stanowi rozpuszczalna AC z *Brevibacterium liquefaciens* (67, 158). Cyklazy adenylova — z wyjątkiem kilku pochodzenia bakteryjnego — są silnie aktywowane przez jony Mg^{2+} (124, 125, 134) i słabiej — przez Mn^{2+} (60, 134). Jon Ca^{2+} wywiera najczęściej działanie hamujące (60, 134); wyjątek stanowi AC kory mózgowej wołu (15). Związki rtęcioorganiczne i inne odczynniki na grupy -SH są silnymi inhibitorami AC (60, 134). Cyklazy z różnych źródeł ujawniają maksymalną aktywność przy pH od 7,2 do 8,2 (60, 134, 159).

Substratem dla AC jest ATP. Wynikają z tego poważne kłopoty metodyczne związane z lokalizacją zarówno AC jak i ATPazy w błonach. Większość prac nad aktywnością AC w surowym materiale biologicznym (z wyjątkiem przypadków stosowania jonu F^- , o którym wspomnę w dalszej części podrozdziału) jest obciążona teoretycznie tym zastrzeżeniem. Zastosowanie dwufosfoimidowego analogu ATP (AMP-PNP), który nie jest rozkładany przez ATPazę, a zachowuje własności substratu dla AC, pozwoli ominąć wspomnianą trudność (136, 138). Ponieważ aktywność AC zależy od stosunku $ATP : Mg^{2+}$ i osiąga szczyt przy zastosowaniu równomolarnych lub wyższych stężeń Mg^{2+} w mieszaninie inkubacyjnej przy pH około 7, można sądzić, że substratem jest w rzeczywistości kompleks $Mg-ATP^{2-}$ ($K_M = 0,25-0,50$ mM) (60); takie właśnie połączenie tworzy jon, magnezowy z ATP przy pH 6,5 (143, 150). Wolny ATP może nawet hamować AC w błonach komórek tłuszczowych (60). W warunkach pełnego skompleksowania ATP przez jony magnezowe GTP jest silnym aktywatorem AC (49), a sam nie ulega przekształceniu. Cyklizacja GTP zachodzi pod wpływem odrębnego, rozpuszczalnego (68) enzymu — cyklazy guanylowej (64, 68, 169).

Jak się wydaje, brak jest dotychczas danych o wpływie 5'-AMP — produktu hydrolizy cAMP — na aktywność AC.

Osobnego omówienia wymaga wpływ fluorku — anionu „niefizjologicznego”. Nie działa on na cyklazy bakteryjne (134, 158), natomiast powoduje kilkakrotny wzrost aktywności AC z tkanek ssaków, o ile bada się enzym w homogenatach. Aktywujący wpływ fluorków nie występuje, gdy badanie przeprowadza się na nierozbitych komórkach. Najbardziej prawdopodobną przyczyną tej rozbieżności jest nieprzepuszczalność błon komórkowych dla F^- (134); można również sądzić, że omawiany jon jest niezwykłym efektem allosterycznym AC ssaków, którego centrum zostaje

odsłonięte podczas homogenizacji. Możliwość, że aktywujący wpływ F^- jest spowodowany zahamowaniem ATPazy (co zwiększa ilość substratu dla AC) można odrzucić, gdyż doświadczenia przeprowadzono przy odpowiednio wysokich stężeniach ATP. W świetle ostatnich badań wpływ F^- zależy od stopnia zagregowania podjednostek AC, co wykryto przy próbach przeprowadzenia cząstkowej AC do roztworu. Przy użyciu *Lubroru PX* otrzymano z mięśnia sercowego kota (96) rozpuszczalny preparat AC o masie cząsteczkowej w granicach od 100 000 do 200 000, niewrażliwy na działanie hormonów, lecz jeszcze aktywowany przez fluorki. W podobny sposób otrzymano rozpuszczalną AC z mózgu szczura (76); według Sutherlanda stanowi ona enzym rozbity na podjednostki, które można z powrotem zagregować. Ujawnia się przy tym dwoisty wpływ fluorków: pobudzają one enzym zagregowany, hamują zaś rozbity na podjednostki.

Cyklazy adenyłowe nie wymagają koenzymów i prawdopodobnie wszystkie mają budowę lipoproteidową (81, 159). Są bardzo labilne, co utrudnia ich izolowanie i oczyszczanie (dodatek dwumetylosulfotlenku lub dwutiotreitolu częściowo zapobiega inaktywacji). Od nienaruszonego wiązania AC z błonami zależy zdolność enzymu do ulegania aktywacji pod wpływem różnych czynników (między innymi hormonów oraz związków działających na β -receptory); wydaje się przeto, że fragment błony jest integralnym składnikiem cząsteczki enzymu. U ssaków AC znajduje się przede wszystkim na powierzchni komórek (hepatocyt — (129), komórka tłuszczowa — (135), erytrocyt — 38)), co ma szczególne znaczenie w rozpoznawaniu i przyjmowaniu bodźców hormonalnych. Do zagadnienia tego powrócę jeszcze w następnej części podrozdziału.

Wielka różnorodność aktywatorów (między innymi jony, hormony, nukleotydy, związki pobudzające β -receptory układu adrenergicznego) wskazuje, że cyklazy adenyłowe u ssaków są prawdopodobnie białkami allosterycznymi, w natywnej postaci zawierającymi podjednostki katalityczne i regulatorowe (60). Bezpośredniego potwierdzenia takiej budowy AC (to znaczy rozdzielenia i oczyszczenia wspomnianych podjednostek) nie udało się dotychczas osiągnąć. Jednak dowody pośrednie (które przedstawię na przykładzie działania hormonów na AC) skłaniają do przyjęcia hipotezy o istnieniu wspomnianych podjednostek.

Analiza wpływu hormonów na omawiany enzym dostarczyła dotychczas największej ilości danych o budowie i heterogenności AC w tkankach ssaków. Trudności metodyczne spowodowane kilkakrotnie już wspomnianą labilnością cyklaz ujawniają się tu szczególnie jaskrawo, gdyż przedmiotem badania są przede wszystkim własności regulatorowych składników enzymu; te własności wynikają zaś ze sposobu powiązań podjednostek układu AC ze sobą i z błonami. Brutalny zabieg, jakim jest nawet najbardziej łagodne rozerwanie komórki, może całkowicie znosić aktywujący wpływ hormonów na cyklazy (20, 81, 122, 147, 166, 168, 176). Ta destrukcyjna zmiana w układzie AC jest spowodowana uszkodzeniem błon (121),

uwolnieniem enzymów proteolitycznych (60) i depolaryzacją struktur subkomórkowych (60). Rozległość uszkadzającego wpływu homogenizacji najlepiej ilustruje następujący przykład. Pod wpływem wstrzykniętego hormonu (na przykład noradrenaliny, ACTH) stężenie cAMP *in vivo* w tkankach (mięsień sercowy, nadnercza) wzrasta w ciągu kilku minut o dwa rzędy wielkości, natomiast aktywność AC w homogenatach tych narządów po dodaniu wspomnianych hormonów zwiększa się tylko 3—4 razy (58, 117). Wprowadzone niedawno metody badania AC w nienaruszonych komórkach (tkankach) (70, 87, 136, 146) eliminują w znacznym stopniu uszkodzenie enzymu, nie uwalniają jednak od zastrzeżeń interpretacyjnych (na przykład przy oznaczaniu K_M , stałych aktywatorowych i inhibitorowych).

Dopóki nie zostaną wyizolowane i oczyszczone podjednostki cyklazy adenylowej, o jej heterogenności w komórkach i tkankach można będzie sądzić jedynie na podstawie swoistości hipotetycznego składnika regulatorowego AC względem aktywatorów (przede wszystkim — hormonów i jonów) oraz inhibitorów. Przyjęto kilka kryteriów jako podstawę do rozstrzygnięcia sprawy identyczności lub braku podobieństwa podjednostek regulatorowych AC, między innymi:

- 1) przebieg pobudzenia AC pod wpływem różnych hormonów;
- 2) addytywność wpływów różnych hormonów (w obecności lub przy braku fluorków i innych jonów);
- 3) zmiany stałych Michaelisa wywołane obecnością hormonów;
- 4) wpływ czynników uszkadzających (detergenty, enzymy, zabiegi preparatywne) na przetrwanie aktywującego wpływu hormonów.

W wyniku tak przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

- 1) stopień zaktywowania AC z tej samej tkanki zależy od rodzaju zastosowanego hormonu na przykład: ACTH, TSH, LH, adrenalina, glukagon aktywują AC w błonach komórek tłuszczowych, natomiast wazopresyna, parathormon, STH i LTH są bez wpływu (12, 13, 60, 137); parathormon aktywuje 6-krotnie AC w homogenatach kory nerki, a wazopresyna — znacznie słabiej (160),
- 2) pobudzający wpływ tych samych hormonów na aktywność AC zależy od rodzaju tkanki, z której pochodzi enzym (na przykład wazopresyna i parathormon nie wpływają na AC komórek tłuszczowych, aktywują zaś AC w rdzeniu nerki (25, 60)),
- 3) najczęściej nie stwierdza się addytywnego wpływu różnych hormonów na aktywność AC z tej samej tkanki, co sugeruje, że określona tkanka posiada pojedynczy układ AC. Klasycznym przykładem takiego układu jest AC z komórek tłuszczowych aktywowana przez co najmniej 6 hormonów (ACTH, TSH, LH, sekretynę, glukagon i adrenalinę) (8, 13, 137).

Wydaje się więc, że tkankowa i hormonalna swoistość regulatorowej części układu AC jest udowodniona. Zastrzeżenie może budzić jedynie

brak addytywności wpływów poszczególnych hormonów. Skłania to do przyjęcia założenia, że regulator wykazuje swoistość względem grup hormonów, a nie pojedynczych hormonów. Należy jednak pamiętać, że przy badaniach *in vitro* stężenia hormonów dobiera się często arbitralnie, gdyż zbyt mało wiadomo o fizjologicznych poziomach tych związków w tkankach *in vivo*. Dlatego sztucznie stworzony układ może być bardzo odległy od naturalnego (odnosi się to także do badania wpływu jonów). Przedstawione zastrzeżenia nie podważają jednak podstawowego wniosku o dwuskładnikowej (regulator + jednostka katalityczna) budowie układu AC.

Część regulatorowa układu AC (zwana także dykryminatorem) jest zlokalizowana w błonie komórkowej i kontaktuje się z zewnętrzną powierzchnią komórki. Najlepiej poznany glukagonowy dyskryminator układu AC w wątrobie szczura ma budowę lipoproteidową; jest inaktywowany przez detergenty i fosfolipazę A. Jego powinowactwo do glukagonu jest regulowane przez GTP lub GDP, przy czym miejsca przyłączenia tych nukleotydów i hormonu są różne. Glukagon wiąże się z dyskryminatorem poprzez swój hydrofobowy, C-końcowy odcinek ($K_a = 4 \times 10^{-9}$ M) (99, 135).

Birnbauer (cyt. wg 60, str. 201) przypuszcza, że w skład regulatorowej części układu AC wchodzi dodatkowy składnik (ang. *transducer*), co ma wyjaśniać nieidentyczność miejsc wiążących jony i hormony, a w szczególności możliwość odróżnienia aktywności AC pobudzanej przez fluorki od aktywności stymulowanej przez hormony; (rozdzielanie takie było możliwe po podziałaniu digitoniną na AC komórek tłuszczowych i wątrobowych).

Drugą zasadniczą część układu AC — podjednostkę katalityczną — Birnbauer nazywa wzmacniaczem (ang. *amplificator*) (cyt. wg 60, str. 201), ponieważ w tkankach *in vivo* zmiany stężeń hormonów od 10^{-12} do 10^{-9} M powodują przez aktywację AC zwiększenie stężenia cAMP od 10^{-7} do 10^{-5} M (21). O stosunku wielkości podjednostki katalitycznej do całego układu AC świadczy porównanie mas cząsteczkowych solubilizowanych preparatów AC z tkanek ssaków (100 000—200 000 (76, 96)) i tak zwanych „cząstek bogatych w AC” o najlepiej zachowanej, natywnej strukturze, wyizolowanych z kory nadnerczy (500 000 000 (125)).

Na zakończenie należy wspomnieć, że własności regulatora układu AC zmieniają się podczas rozwoju osobniczego (84, 140, 141). W okresach najwcześniejszych regulator jest wrażliwy jedynie na jony (między innymi fluorki (60)), natomiast zdolność do reagowania na hormony i związki pobudzające β -receptory pojawia się stopniowo podczas wzrostu i dojrzewania organizmu. Na uwagę zasługuje fakt, że u kijanek pojawianie się wrażliwości AC na katecholaminy zbiega się w czasie z pojawianiem się tego typu hemoglobiny, który występuje u zwierząt dorosłych (60, 140). Fakt ten nabiera szczególnego znaczenia w świetle dowodów świadczących o wpływie cAMP na syntezę białka.

2. Rozpad cyklicznego AMP

Fosfodwuesteraza 3',5'-AMP (EC 3.1.4.1.) (PDE) hydrolizuje cAMP do 5'AMP i jest najlepiej poznanym enzymem z grupy fosfodwuesteraz swoistych względem cyklicznych 3',5'-nukleotydów. Nie ma dowodów, aby cAMP był *in vivo* hydrolizowany w inny sposób. Z wyjątkiem niektórych bakterii (17, 102, 110, 124) aktywność PDE stwierdzono u przedstawicieli wszystkich typów organizmów. PDE są najczęściej enzymami wewnątrzkomórkowymi (rozpuszczalnymi lub związanymi z błonami, z których mogą być uwolnione działaniem detergentów (33, 42); u *Dictyostelium* (133) i *Physarum* (112) istnieją również PDE pozakomórkowe, wydzielane do środowiska.

Grupy -SH są niezbędne dla aktywności PDE, gdyż związki rtęcioorganiczne hamują omawiane enzymy, a β -merkaptotoetanol przywraca im aktywność.

Aktywujący wpływ jonów dwuwartościowych (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+}) jest wspólną cechą prawie wszystkich PDE (możliwe, że omawiane enzymy są metaloproteidami (28)). Aktywujący wpływ metyloksantyn i imidazolu jest charakterystyczną cechą fosfodwuesteraz tkanek ssaków (60, 114, 134, 139). Optymalne pH dla działania PDE z różnych źródeł waha się w granicach od 7,5 do 8,0. Wyjątek stanowią PDE z mięśnia sercowego psa (114) i z mózgu ryb (177), dla których optimum pH wynosi 8,5—9,0. Wobec różnych cyklicznych 3',5'-nukleotydów swoistość substratowa PDE jest różna, zależnie od źródła enzymu. Najlepszym substratem jest cAMP; cIMP i cGMP są rozkładane słabiej, zaś aktywność wobec pirymidynowych cyklicznych 3',5'-nukleotydów jest znikoma. Szkoda, że wiadomości o wpływie PDE na cykliczne 2',3'-nukleotydy są skąpe; związki te mogą być (*in vitro*) słabymi inhibitorami (57, 65). Obecność różnych nukleotydów w mieszaninie inkubacyjnej wpływa często regulująco na aktywność PDE wobec cAMP; na przykład ATP hamuje enzym mózgu szczura (27), zaś cGMP może pobudzać lub hamować PDE — zależnie od źródła enzymu (9, 48, 111, 139); zjawiska te występują prawdopodobnie również w tkankach *in vivo* (57).

Analog cAMP — N_6, O_2' -dwubutyrylo-cAMP (db-cAMP) — nie jest hydrolizowany przez PDE i nie wpływa na jej aktywność; ponieważ zachowuje on wiele biologicznych własności cAMP, często jest stosowany w badaniach nad rolą tego nukleotydu (60, 124, 125).

Istotne z doświadczalnego punktu widzenia okazało się wykrycie wybiórczych inhibitorów PDE, których wpływ na aktywność AC i innych układów enzymatycznych można pominąć. Takimi inhibitorami PDE z różnych źródeł (prócz enzymów bakteryjnych) okazały się metyloksantyny (60, 124, 125, 134), papaweryna (163) i hipoglikemizujące pochodne sulfonilomocznika (10, 18). Zastosowanie tych związków umożliwiło kontrolowane zwiększenie puli endogennego cAMP i badanie wpływu tego

stanu na metabolizm (między innymi na indukcje enzymatyczne); równocześnie zaś pozwoliło wyjaśnić dobrze znane farmakologiczne efekty wspomnianych inhibitorów PDE w oparciu o teorie działania cAMP.

Znaczna trwałość PDE ułatwia oczyszczanie enzymu i frakcjonowanie otrzymanych preparatów. Ta właśnie okoliczność sprawiła, że tory badań nad AC i PDE były zgoła odmienne. Najwięcej wiadomości o budowie układu AC dostarczyła analiza działania hormonów, natomiast doniesienia o wpływie hormonów na PDE pojawiają się dotychczas sporadycznie (4, 60), zaś badania nad izolowaniem i charakterystyką podjednostek PDE są znacznie zaawansowane.

Z tkanek ssaków wyizolowano kilka preparatów fosfodwuesteraz rozkładających cAMP. Różnią się one stopniem spolimeryzowania podjednostek (35, 60, 97, 139, 162), obecnością lub brakiem pewnych naturalnych, białkowych aktywatorów (30, 32, 79), oraz stopniem utlenienia grup -SH (60). Nie wiadomo, czy różnice te są spowodowane zabiegami preparatywnymi, czy rzeczywiście reprezentują różne formy PDE *in vivo*. Wydaje się jednak, że przynajmniej aktywatory białkowe mogą być tkankowo swoiste. Ich obecność, stopień spolimeryzowania podjednostek PDE oraz sposób połączenia tych kompleksów z błonami warunkują tkankową heterogenność omawianych enzymów.

Wspomniana niejednorodność budowy otrzymywanych preparatów PDE znajduje odbicie w niejednakowych stałych Michaelisa oraz w zróżnicowanym wpływie różnych nukleotydu i jonów na aktywność enzymu. Wartości K_M (wobec cAMP jako substratu) dla większości PDE znajdują się w przedziałach od 10^{-6} do 10^{-4} M. Enzym w homogenatach może ujawniać niejednorodną kinetykę z dwoma różnymi stałymi Michaelisa (4, 60), przy czym jego aktywności w każdym przedziale kinetycznym mogą ulegać niezależnym zmianom pod wpływem innych nukleotydu i jonów.

Rozpuszczalne PDE mają masy cząsteczkowe około 200 000 (24, 29, 109); możliwe, że reprezentują one monomeryczną postać PDE. Asocjacją tych podjednostek próbuje się wyjaśnić heterogenność uzyskiwanych preparatów cząstkowej PDE z tej samej tkanki (161). Przypuszcza się nawet, że fosfodwuesterazy wszystkich cyklicznych 3',5'-nukleotydu są zbudowane z tych samych podjednostek połączonych w różny sposób (162).

Na aktywność PDE w tkance mózgowej ssaków wpływają — oprócz wspomnianych już złożonych oddziaływań nukleotydu — przynajmniej dwa związki wielkocząsteczkowe:

- 1) ciepłostały, białkowy aktywator o masie cząsteczkowej 40 000, niewrażliwy na mocznik w stężeniu 8M, niskie pH i nukleazy, inaktywowany przez trypsynę lub gotowanie w pH 12,3 (30, 31, 32),
- 2) czynnik aktywujący fosfodwuesterazę (PAF, ang. *phosphodiesterase activating factor*) — ciepłostały, niedializujący aktywator, od którego zależy ujawnienie się pobudzających wpływów fizjologicznych stężeń wapnia ($pCa = 5,9-4,9$) na aktywność PDE (79).

Udział PDE w regulacji metabolizmu cAMP w tkankach ssaków nie ulega wątpliwości. Należy podkreślić fakt, że we wszystkich badanych tkankach aktywność PDE jest znacznie większa (niekiedy 100 razy) od aktywności AC (22, 159, 168). Ponieważ mimo to stężenia cAMP *in vivo* mogą zmieniać się o dwa rzędy wielkości (przeciętny poziom cAMP u ssaków jest z rzędu 0,5nM/1 gram mokrej masy tkanki), należy sądzić, że istnieje precyzyjny mechanizm kontroli aktywności i współdziałania PDE z AC. Może on polegać na wielokrotnie już wspomnianych oddziaływaniach różnych nukleotydów na oba enzymy. Należy wreszcie pamiętać, że pomimo występowania w błonach, lokalizacja obu enzymów jest prawdopodobnie różna.

Wspomniałem już, że bakterie pozbawione aktywności PDE (17, 102, 110, 124) usuwają cAMP do środowiska w reakcjach sprzężonych z transportem cukrów przez błonę komórkową do wnętrza komórki. Proces ten jest katalizowany przez układ enzymatyczny, który przenosi grupę fosfoenolopirogronianu kolejno (enzym I) na 2 różne białka, a następnie (enzym II) na transportowany cukier (115). Podczas ostatniej reakcji następuje równocześnie wydalenie cAMP z komórki bakteryjnej (124). Do zjawisk tych powrócę w następnym podrozdziale przy omawianiu represji metabolicznej.

II. Wpływ cAMP na metabolizm

Nie ma dotąd zadowalającej klasyfikacji biochemicznych efektów działania cAMP. Wynika to z wciąż jeszcze fragmentarycznych wiadomości o mechanizmach wpływu cAMP na metabolizm. Przy tym mechanizmy te — jak się wydaje — ulegały znacznym przeobrażeniom ewolucyjnym i dlatego różnią się u odległych organizmów (na przykład bakterii i ssaków). Mimo to można już obecnie sformułować przynajmniej trzy uogólnienia:

- 1) u wszystkich badanych organizmów cAMP oddziałuje na metabolizm poprzez zmianę biologicznych własności pewnych swoistych białek (receptorów), z którymi się łączy. Różne — zależnie od organizmu — są natomiast mechanizmy działania wspomnianych receptorów i reakcje biochemiczne, na które receptory te wpływają;
- 2) z kompleksu cAMP — receptor białkowy można uwolnić omawiany nukleotyd w niezmienionej postaci; w połączeniu cAMP z białkiem prawdopodobnie nie biorą udziału wiązania kowalencyjne;
- 3) w tkankach ssaków wszystkie efekty działania cAMP można wyjaśnić aktywowaniem kinaz białkowych (EC 2.7.1.37.) przez ten nukleotyd (hipoteza Kuo i Greengarda (88)).

Z termodynamicznego punktu widzenia pewnych wyjaśnień wymaga punkt 2): z badania nad powstaniem (60, 61) i rozpadem (60, 62) cAMP

pod wpływem omówionych poprzednio enzymów (AC i PDE) wynika, że standardowa wolna energia hydrolizy wiązania 3'-fosforanowego tego nukleotydu wynosi prawie 12 kcal; cAMP ma więc wiązanie 3'-fosforanowe bogate w energię. Skłania to do przypuszczenia, że mechanizm oddziaływania cAMP na metabolizm mógłby polegać na wytwarzaniu wiązań kowalencyjnych (adenylylacje, fosforylacje), na przykład z białkami. Aczkolwiek znane są enzymy, których aktywność może być regulowana przez adenylylację (u *Escherichia coli* — synteza glutaminowa, EC.6.3.1.2.(5) i polimeraza RNA, EC.2.7.7.6. (26)), to jednak brak dotychczas danych o udziale cAMP w tych procesach, zaś dawcą grup adenylowych jest ATP. Również z ATP (rzadziej — z GTP (91)) pochodzi fosforan we wszystkich znanych dotychczas, pobudzanych przez cAMP, reakcjach fosforylacji pod wpływem kinaz białkowych. O sposobie połączenia cAMP z jego receptorami białkowymi można sądzić na podstawie spostrzeżenia, że związany nukleotyd jest niewrażliwy na działanie PDE (118), można go jednak *in vitro* oddzielić w niezmienionej postaci od białka (dializa, wypieranie związanego radioaktywnego cAMP przez nieznakowany nukleotyd) (44, 46). Odzwierciedla to zapewne odwracalność łączenia się cAMP z receptorami *in vivo*.

Najlepiej poznanymi receptorami cAMP są białka regulujące aktywność niektórych genów u bakterii i inhibitory kinaz białkowych u ssaków; znacznie mniej wiadomo o powinowactwie cAMP do pewnych rybosomalnych czynników biorących udział w translacji.

1. Receptory cAMP u bakterii

Badania nad receptorami cAMP u bakterii podjęto, aby wyjaśnić wpływ omawianego nukleotydu na indukcje enzymatyczne u tych organizmów. Obecność cAMP jest konieczna do prawidłowego przebiegu syntezy enzymów katabolicznych (między innymi w operonach laktozowym, arabinozowym, galaktozowym (124, 125, 181), co potwierdzają następujące spostrzeżenia (124, 125, 127):

- mutanty *E. coli* pozbawione AC nie syntetyzują β -galaktozydazy i innych enzymów katabolicznych pod wpływem odpowiednich induktorów;
- mutanty te w obecności cAMP i induktorów syntetyzują wspomniane enzymy z taką wydajnością, jak szczepy dzikie w obecności samych induktorów;
- działanie induktorów na hodowle rosnące w obecności glukozy lub innych dobrze metabolizowanych cukrów jest bardzo słabe (tak zwana represja metaboliczna);
- dodanie glukozy lub innego cukru, który może ulegać ufosforylowaniu, do indukowanych hodowli rosnących na gorzej wykorzystywanych źródłach węgla (na przykład bursztynian, glicerol) powoduje przejściowe

- zahamowanie indukcji. Jest to tak zwana represja przejściowa;
- dodanie glukozy do hodowli *E. coli* na gorzej wykorzystywanych źródłach węgla powoduje szybką ucieczkę cAMP z komórek do podłoża: stężenie nukleotydu w komórkach obniża się z 5,0 nM/g mokrej masy bakterii do 0,5 nM/g (17);
 - zdolność związku do wywoływania represji przejściowej lub metabolicznej jest wprost proporcjonalna do jego zdolności obniżania stężenia cAMP w komórkach;
 - dodanie cAMP do hodowli na pożywce zawierającej glukozę znosi represję metaboliczną i przejściową (40);
 - dodanie cAMP do hodowli *E. coli* w stanie represji metabolicznej powoduje zwiększenie ilości mRNA odpowiadającego operonowi laktozowemu (128);
 - indukcja β -galaktozydazy jest hamowana przez aktynomycynę D.

Z przedstawionych danych wynika, że w operonie laktozowym cAMP reguluje syntezę enzymów na poziomie transkrypcji (126). Wniosek ten oraz udział białkowego receptora cAMP w tym procesie potwierdzają badania nad syntezą β -galaktozydazy w układzie pozakomórkowym. Wspomniany receptor, określany w języku angielskim jako: *cAMP receptor protein* — *CR-protein*, *cAMP binding protein* — *CBP*, *catabolite genes activator protein* — *CAP*, wyizolowano z komórek *E. coli* i oczyszczono przeszło 1000-krotnie na kolumnach z fosfocelulozy (44, 148). Jest to prawdopodobnie białko proste (zawiera mniej niż 1% RNA wagowo) o masie cząsteczkowej około 40 000. Traci ono aktywność przy ogrzewaniu przez 5 minut w temperaturze 60°C; jest trwałe przy przechowywaniu w -70°C w naczyniach plastikowych (ulega szybko inaktywacji w zetknięciu ze szkłem). Nie ma aktywności polimerazy RNA, ani kinazy białkowej. Łączy się swoiście z cAMP ($K_d = 1 \times 10^{-6}$ M), na co nie ma wpływu obecność innych nukleotydów (ATP, GTP, ADP, 5'-AMP, 3'-AMP) prócz cGMP, który kompetycyjnie hamuje wiązanie receptora z cAMP (produkty hydrolizy cGMP — 5'-GMP i 3'-GMP wywierają bardzo słabe działanie hamujące).

Istnieją mutanty *E. coli*, na przykład *E. coli* 21i⁻-3, *E. coli* X7901, u których białko CR ma obniżone powinowactwo do cAMP ($K_d = 2 \times 10^{-5}$ M). Podczas indukcji w operonie laktozowym zachowują się one fenotypowo podobnie do mutantów pozbawionych aktywności AC, z tą jednak różnicą, że na dodanie cAMP nie reagują syntezą β -galaktozydazy (44, 181).

Układ bezkomórkowy, w którym można prześledzić wpływ białka CR na sytezę β -galaktozydazy zawiera między innymi (23, 126, 180) DNA operonu laktozowego (pochodzący z różnych fagów noszących ten operon w swym genomie) oraz receptor cAMP i układ potrzebny do syntezy RNA wyodrębniany z różnych szczepów *E. coli*. Pozwala to badać zależność syntezy mRNA operonu laktozowego od zmian w DNA (przy zastosowaniu

DNA operonów laktozowych noszących mutacje w różnych miejscach) i od powinowactwa białka CR do cAMP (przy zastosowaniu receptora cAMP ze szczepów *E. coli* 21i-3, *E. coli* X7901, lub przez wprowadzenie cGMP, który zmniejsza powinowactwo receptora do cAMP. W ten sposób wykazano, że:

- 1) na transkrypcję w operonie laktozowym wpływa kompleks receptor-cAMP (jego składniki wprowadzane do układu osobno są nieaktywne);
- 2) miejscem działania kompleksu jest promotor (127, 148);
- 3) przy użyciu dwuniciowego DNA fagowego i RNA-polimerazy z czynnikiem σ transkrypcja operonu laktozowego w nieobecności kompleksu receptor-cAMP przebiega na obu niciach DNA; dodanie kompleksu powoduje przepisywanie lac-mRNA z właściwej nici DNA (47);
- 4) kompleks cAMP-receptor powoduje zwiększenie częstotliwości inicjacji syntezy operonu laktozowego we właściwych miejscach na nici DNA (39, 47, 74, 165) (etap wrażliwy na rifampicynę (149));
- 5) dodanie guanozynoczworofosforanu (ppGpp) znacznie zwiększa omówiony wpływ kompleksu cAMP-receptor na transkrypcję operonu laktozowego (39, 165).

Przedstawione spostrzeżenia nasuwają wniosek, że receptor cAMP u bakterii jest spokrewniony z czynnikiem σ polimerazy RNA zależnej od DNA (44), aczkolwiek nie jest z nim identyczny. Kompleks receptor-cAMP zwiększa powinowactwo polimerazy do promotora w operonie laktozowym. O polimerazę mogą tu konkurować dwa układy: 1) receptor-cAMP i II) czynnik Ψ i ppGpp. Każdy z tych układów kieruje polimerazę do różnych miejsc transkrypcji: I — nasila syntezę mRNA; II — wykorzystuje ją do syntezy rRNA i tRNA. Dodanie ppGpp uwalnia polimerazę spod wpływu czynnika Ψ , przez co może ona być w większym stopniu wykorzystana do syntezy mRNA (39, 165).

2. Receptory cAMP w tkankach ssaków

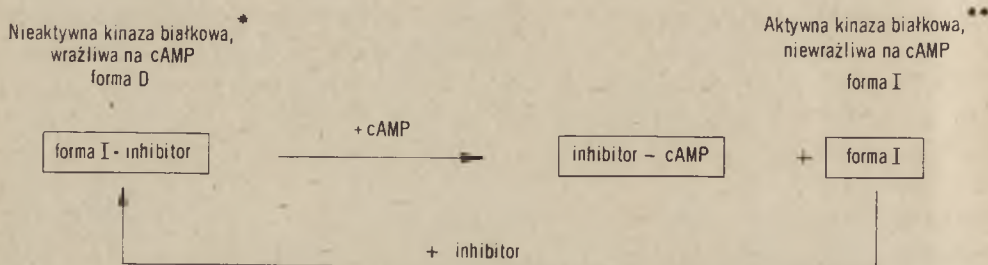
Wpływ cAMP na metabolizm wyższych organizmów polega na regulowaniu — w sposób bezpośredni lub pośredni — aktywności pewnych enzymów. Wpływ ten — podobnie jak u bakterii — wymaga udziału swoich receptorów, które w tkankach ssaków są inhibitorami kinaz białkowych. Zanim poznano ten mechanizm działania cAMP, wiadomo było, że omawiany nukleotyd aktywuje kinazy *in vitro* i *in vivo*.

Pobudzone przez cAMP kinazy białkowe występują we wszystkich tkankach ssaków, u zwierząt bezkręgowych i u bakterii (60, 89). Mają niewielką swoistość substratową: fosforylują *in vitro* histony (60, 93), protaminę i kazeinę (41), białka rybosomowe (78, 167) oraz niektóre enzymy (kinazę fosforylasy b, EC.2.7.1.38 (41), syntetazę glikogenową, EC.2.4.1.11. (153), dehydrogenazę pirogronianową, EC. 1.2.4.1. (175), lipazę (37, 72), polimerazę RNA z *E. coli*, EC.2.7.7.6. (105, 106)). O zmianach aktywności biologicznej spowodowanych przez fosforylację wymienionych

białek wspomnę w dalszych częściach podrozdziału; tu natomiast zajmę się mechanizmem aktywowania kinaz przez cAMP w tkankach ssaków.

W wyjaśnieniu wpływu cAMP na kinazy odegrały rolę trzy spostrzeżenia:

- 1) w różnych tkankach występują białka swoiście wiążące cAMP (50, 53);
- 2) zdolność różnych preparatów kinaz białkowych (izolowanych z tej samej tkanki) do ulegania aktywacji pod wpływem cAMP zależy w znacznym stopniu od metody oczyszczania enzymu. Można otrzymać preparaty mało aktywne, lecz silnie pobudzane przez cAMP lub aktywne, niewrażliwe na cAMP (86);
- 3) cAMP łączy się z tymi preparatami kinazy, których aktywność pobudza.



Rys. 2. Budowa wrażliwej i niewrażliwej na cAMP kinazy białkowej

* ang. *dependent protein kinase*

** ang. *independent protein kinase*

W oparciu o przedstawione dane powstała hipoteza wyjaśniająca mechanizm działania cAMP na kinazy białkowe (rysunek 2). Przyjmuje ona, że o białkowy inhibitor kinaz (który jest jednocześnie receptorem cAMP) konkurują aktywna kinaza i cAMP, przy czym powinowactwo nukleotydu do inhibitora jest większe, niż enzymu. Powoduje to oddysocjowanie inhibitora od kinazy, która osiąga wówczas pełną aktywność. Słuszność tej hipotezy potwierdziło frakcjonowanie preparatów wrażliwej na działanie cAMP kinazy na DEAE-celulozie (oddzielenie aktywnej postaci od inhibitora), miareczkowanie aktywnej postaci inhibitorem (zahamowanie kinazy i przywrócenie jej wrażliwości na cAMP) oraz wiązanie inhibitora z cAMP (kora nadnerczy (54, 55, 56), mięśnie szkieletowe (85), mięsień sercowy wołu (46), wątroba szczura (86, 178)). Masy cząsteczkowe aktywnej kinazy, jej inhibitora i kompleksu obu białek wykazują znaczne rozbieżności zależnie od rodzaju tkanki i metod oczyszczania. Na przykład kompleks otrzymany z nadnerczy wołu ma masę cząsteczkową 144 000, wolny inhibitor — 92 000, aktywna kinaza — 60 500 (lub 2-krotnie więcej w przypadku powstawania dimerów) (56), natomiast z mięśnia sercowego wołu można otrzymać preparaty aktywnej kinazy o masie cząsteczkowej 60 000, inhibitory o masach 40 000, 80 000, lub 160 000 i kompleks o masie 240 000 (46). Rozbieżności te mogą być spowodowane polimeryzacją podjednostek podczas preparatyki i tkankową heterogennością obu składni-

ków kinazy. Większość danych wskazuje, że inhibitor w natywnej postaci wiąże się z kinazą w stosunku molowym 1 : 1. Ogrzewanie takiego kompleksu przez godzinę w temperaturze 42°C prowadzi do nieodwracalnego zinaktywowania inhibitora, co powoduje 3-krotny wzrost aktywności kinazy.

Inhibitor z wątroby szczura wiąże 54 μM cAMP/1 mg białka (86). O wpływie innych nukleotydów na powinowactwo cAMP do inhibitora brak dotychczas przekonujących danych.

3. Fosforylacja histonów

W badaniach *in vitro* frakcje F1 i F2b histonu z grasicy są znacznie lepszymi substratami dla stymulowanych przez cAMP kinaz białkowych z różnych tkanek, niż frakcja F2a i F3 (107, 132). W reakcjach tych ulegają fosforylacji tylko grupy -OH seryny i treoniny, przy czym miejsca wiązania fosforanu (*in vitro*) są swoiste (94): na przykład w histonie F1 jest to jedynie ser-37 (od końca -NH₂ łańcucha) (144). Fosforan włączony do histonów jąder limfocytów ulega całkowitej wymianie w ciągu kilku godzin, o ile zachowany jest jądrowy układ syntezy ATP (3). Nasilenie fosforylacji histonu F1 w różnych komórkach (*in vivo* i *in vitro*) występuje wkrótce po zaktywowaniu w nich cykazy adenylowej pod wpływem różnych czynników (na przykład w wątrobie — pod wpływem glukagonu (94), w limfocytach — pod wpływem fitohemaglutyniny (3, 82)). Fosforylacja histonu F1 wyprzedza o 1 godzinę początek inkorporacji ³²P do DNA w regenerującej wątrobie szczura (156), a w różnych tkankach jest proporcjonalna do ich indeksu mitotycznego (156). Są to tylko niektóre dowody wskazujące, że fosforylacja jest jednym z najważniejszych mechanizmów regulacji oddziaływania histon-DNA w chromatynie. Sama fosforylacja histonu F1 nie prowadzi do poważniejszych zmian w jego strukturze II-rzędowej, lecz na drodze elektrostatycznej wpływa na zdolność kompleksowania z DNA (2), o czym świadczy między innymi spostrzeżenie, że zdolność preparatów histonowych do hamowania DNA — zależnej syntezy RNA i DNA jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości fosforu w tych preparatach (119, 155, 157). Ponieważ fosforylacje histonów przebiegają z udziałem kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP, uzasadnione jest przypuszczenie, że jest to mechanizm, poprzez który omawiany nukleotyd może regulować replikację DNA i mitozy oraz syntezę mRNA przy hormonalnych indukcjach enzymatycznych w organizmach ssaków (93, 94). Zagadnienia te wymagają osobnego omówienia.

4. Wpływ cAMP na mitozy i indukcje enzymatyczne u ssaków

Pobudzający wpływ cAMP na aktywność mitotyczną stwierdzono *in vitro* w populacjach tymocytów, limfocytów krwi obwodowej (69, 100, 170, 171, 172, 174) i w komórkach nabłonka przyusznicy (103). Mechanizmy

mitogennego działania cAMP są złożone i prawdopodobnie zależą od tego, czy czynnikiem mitogenym jest cAMP powstający w komórce, czy dodany do płynu inkubacyjnego.

Wszystkie hormony aktywujące AC w tymocytach (katecholaminy, glukagon, STH, LTH, parathormon, bradykinina, wazopresyna) (100, 170, 171, 172, 174) pobudzają syntezę DNA i mitozy w komórkach znajdujących się na progu fazy S. Mechanizm tego działania polega prawdopodobnie na powiększeniu puli endogenego cAMP, co powoduje wzrost aktywności kinaz białkowych, fosforylację histonów F1 i zainicjowanie syntezy DNA. Rolę zwiększonego stężenia cAMP wewnątrz komórek potwierdza fakt, że metyloksantyny nasilają, a imidazol osłabia mitogeny wpływ wymienionych hormonów.

Jednocześnie wiadomo, że sam cAMP dodany w bardzo niskich stężeniach (10^{-7} do 10^{-6} M) do płynu inkubacyjnego pobudza mitozy (69, 100, 171, 172), a więc naśladuje wpływ hormonów aktywujących AC, mimo że nie przenika do wnętrza komórek i nie zwiększa puli endogenego nukleotydu (101). Ten wpływ cAMP poprzez oddziaływanie wyłącznie z powierzchnią komórek potwierdzają wyniki badań ze znakowanym cAMP (101) oraz spostrzeżenie, że mitogenne wpływy jednakowych stężeń cAMP i db-cAMP (który doskonale wnika do wnętrza komórek) są identyczne. Ewentualność, że inhibitor kinaz białkowych jest zlokalizowany na powierzchni komórek, należy odrzucić, gdyż wiadomo, że znajduje się on w błonach siateczki endoplazmatycznej i w hyaloplazmie (167). Nie przyjmując zatem dodatkowych założeń trudno jest wytłumaczyć mitogeny wpływ dodanego z zewnątrz cAMP zaktywowaniem kinaz. Możliwe, że we wpływie tym odgrywają zasadniczą rolę przesunięcia jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} — pobudzenie bowiem mitoz przez egzogeny cAMP, jak i przez wspomniane hormony, zależy bezwzględnie od obecności tych jonów. Można przypuszczać, że czynnikiem wyzwalamym takie przesunięcia są jony H^+ , które powstają przy hydrolizie cAMP (rysunek 2). Mogą one w istotny sposób zmieniać wiązanie dwuwartościowych kationów z błonami (143), powodować przemieszczenie jonów Mg^{2+} do wnętrza komórek i w ten sposób zwiększać aktywność polimeraz DNA (173). Przemawia za tym fakt, że cAMP nie pobudza syntezy DNA w izolowanych jądrach limfocytów (19).

Wpływ cAMP na indukcje enzymatyczne w tkankach ssaków (59, 142) podejrzewano przy biosyntezie aminotransferazy tyrozynowej (TAT) pod wpływem glukagonu, insuliny, kortyzonu i katecholamin w wątrobie. Indukcja TAT pod wpływem tych hormonów jest hamowana przez aktywnocynę D, co sugeruje, że działają one na poziomie transkrypcji. Katecholaminy i glukagon znacznie zwiększają pulę endogenego cAMP przez aktywację AC; ponieważ ich indukcyjny wpływ na syntezę TAT jest synergistyczny z metyloksantynami, należy sądzić, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP jest czynnikiem, który wyzwala łań-

cuch przemian prowadzących do syntezy mRNA tego enzymu. Łańcuch ten obejmuje prawdopodobnie zaktywowanie kinaz, fosforylację histonów i odblokowanie określonych miejsc w chromatynie komórek wątrobowych (94).

5. Kinazy białkowe a regulacja aktywności glikolizy i lipolizy

Glikoliza jest jednym z głównych procesów regulowanych przez cAMP w organizmach ssaków. Ponieważ metabolizm glikogenu i glukozy był już omawiany w *Postęпах Biochemii* (71), ograniczę się do wyliczenia najważniejszych reakcji, których szybkość jest regulowana przez fosforylację odpowiednich enzymów:

- 1) aktywacja kinazy fosforylasy b (EC 2.7.1.38) przebiega przy udziale kinazy białkowej, lub na drodze autokatalitycznej. Oba mechanizmy wymagają obecności ATP i Mg^{2+} , różnica polega na tym, że cAMP pobudza tylko pierwszy mechanizm, zaś jon Ca^{2+} — tylko drugi (60, 120). Naturalnym inhibitorem aktywacji przy udziale kinazy białkowej jest ciepłotały czynnik białkowy wyizolowany z mięśni szkieletowych (36);
- 2) przejście nieaktywnej postaci b w aktywną (ufosforylowaną) postać a fosforylasy (EC 2.4.1.1.) zachodzi przy udziale kinazy fosforylasy b (36);
- 3) przejście aktywnej syntetazy glikogenowej (EC. 2.4.1.11.) (forma niezależna od glukozo-6-fosforanu) w postać nieaktywną (forma zależna) zachodzi przy udziale kinazy białkowej i jest hamowane przez białkowy inhibitor wspomniany w punkcie 1 (6, 152).

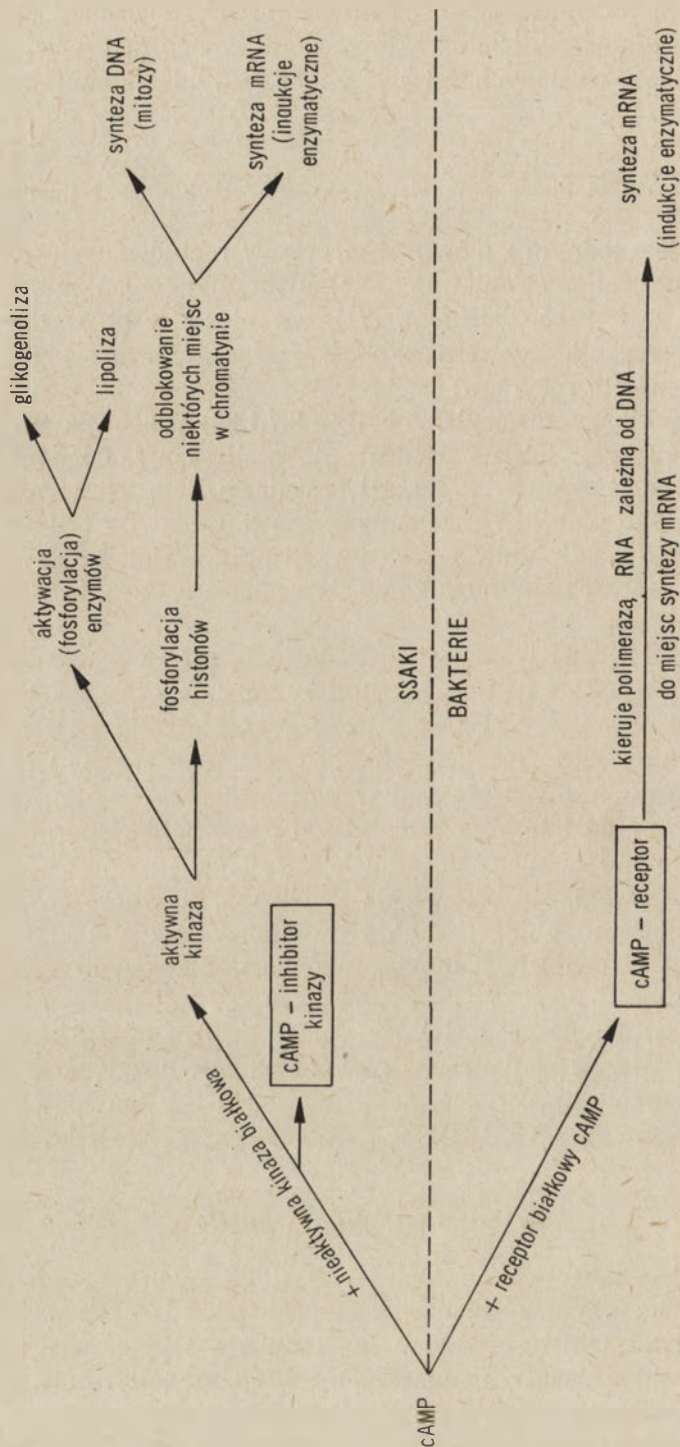
Jest godne uwagi, że fosforylacja zwiększa aktywność enzymów rozkładających glikogen, obniża zaś aktywność enzymów syntetyzujących go. Na tym polega mechanizm jednokierunkowego, glikogenolitycznego wpływu cAMP.

Lipoliza jest drugim podstawowym efektem działania cAMP w tkankach ssaków. Kinaza białkowa, tak zwana kinaza lipazy, fosforyluje zależną od hormonów lipazę w tkance tłuszczowej i w ten sposób zwiększa aktywność enzymu (37, 90, 164).

6. Wpływ cAMP na translację

U bakterii, a także w komórkach eukariotycznych stwierdzono udział cAMP w regulacji syntezy białka na etapach zachodzących po transkrypcji. Przykładami takich procesów są: indukcja tryptofanazy u *E. coli* (11, 123), steroidogenaza w nadnerczach i w ciałku żółtym (51, 58, 63, 66) oraz prawdopodobnie synteza przeciwciał (52, 95).

W wymienionych procesach wpływ cAMP nie zależy od syntezy mRNA i jest hamowany przez inhibitory translacji. Mechanizmy tego wpływu są



Schemat 1. Mechanizmy działania cAMP u bakterii i ssaków
 Receptor białkowy cAMP – ang. *catabolite genes activator protein*

słabo poznane. Kinazy białkowe z tkanek ssaków mogą *in vitro* fosforylować białka rybosomów. Na przykład w rybosomach retikulocytów królika znajduje się kinaza przechodząca do płynów inkubacyjnych o wysokich siłach jonowych, która fosforyluje serynę i treoninę białek rybosomowych (78). W korze nadnerczy wołu wzbudza zainteresowanie swoisty, jak się wydaje, dla kinaz białkowych substrat, który uwalnia się z rybosomów 80S podczas przemywania ich roztworem 0,88M KCl (167). Dotychczas brak jednak przekonujących danych, czy fosforylacja białek rybosomowych pod wpływem aktywowanych przez cAMP kinaz odgrywa rolę w regulacji translacji. Mógłby to być mechanizm ograniczający jej wydajność, gdyż ilość fosforu w białkach rybosomowych obniża powinowactwo rybosomów do mRNA: silnie ufosforylowane rybosomy nie uczestniczą w translacji (78).

Wiadomo jednak, że cAMP i db-cAMP stymulują włączanie znakowanych aminokwasów w układach bezkomórkowych z tkanek ssaków (wobec endogennych i syntetycznych informacyjnych kwasów nukleinowych) (1, 98, 104). Mechanizm tego pobudzenia nie jest wyjaśniony. Wprawdzie cAMP aktywuje *in vitro* niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA, lecz zjawisko to występuje przy bardzo wysokich stężeniach cAMP (10^{-3} — 10^{-2} M).

W doświadczeniach z układem bezkomórkowym z drobnoustrojów wykryto, że cAMP działa na etapie wydłużania łańcucha polipeptydowego. Nukleotyd ten ma powinowactwo do czynnika translokacji G (92), z którym łączy się w obecności GTP i jonów Mg^{2+} (reakcję hamują kwas fudydowy i GDP). Związany cAMP hamuje rybosomową rybonukleazę V i ma w ten sposób ochraniać mRNA podczas translacji. Mechanizmy działania cAMP u bakterii i ssaków przedstawia schemat 1.

III. Uwagi końcowe

U wszystkich badanych organizmów cAMP reguluje — w sposób mniej lub bardziej pośredni — aktywność genów. U bakterii realizuje się to poprzez oddziaływanie kompleksów receptor-cAMP z polimerazą RNA; w komórkach eukariotycznych zaś, z powodu obecności histonów, proces ten jest bardziej skomplikowany i przebiega przez kilka etapów pośrednich (zaktywowanie kinaz — fosforylacja histonów — derepresja niektórych miejsc w chromatynie) (schemat 1). Nasuwa się pytanie, czy wpływ cAMP na chromatynę u organizmów eukariotycznych rozwinął się na drodze stopniowego przeobrażenia prostszego mechanizmu oddziaływania kompleksów receptor-cAMP na polimerazę (lub z równie prostszych wcześniejszych ewolucyjnie mechanizmów), czy też powstał w inny sposób. Porównanie budowy I-rzędowej inhibitorów kinaz białkowych u ssaków i receptorów cAMP u bakterii może rzucić światło na przebieg tej ewolucji.

Znalezienie i zbadanie inhibitorów kinaz białkowych u bakterii mogłoby tu również wiele wyjaśnić.

Zagadnienie, czy swoistość oddziaływania hormonów na poszczególne tkanki można tłumaczyć wpływem cAMP wymaga osobnego wyjaśnienia. Sutherland podjął badania nad tym nukleotydem, aby wyjaśnić wpływ katecholamin na glikolizę; wkrótce jednak okazało się, że cAMP jest pośrednikiem działania prawdopodobnie wszystkich hormonów. Hipoteza dwóch przekaźników (ang. *two messengers*) (134) (I przekaźnik — hormon, drugi przekaźnik — cAMP) mogłaby tylko wtedy wyjaśnić swoistość wpływu hormonów na tkanki docelowe, gdyby okazało się, że każda z nich dysponuje swoistym układem docelowym odpowiadającym na cAMP. Wiadomo jednak, że podstawowym procesem, na który wpływa cAMP we wszystkich tkankach ssaków, jest aktywowanie kinaz białkowych; trudno więc — nie przyjmując dodatkowych założeń — wytłumaczyć swoistość działania hormonów aktywowaniem jednego, choćby nawet tkankowo heterogennego enzymu. Jest przeto możliwe, że cAMP działa na tym obszarze wpływu różnych hormonów, który jest nieswoisty, swoistość zaś poszczególnych hormonów jest realizowana na innych drogach, na przykład przez oddziaływanie z receptorami swoistymi tkankowo i hormonalnie.

Po oddaniu pracy do druku ukazały się jeszcze dwa artykuły przeglądowe poświęcone cAMP:

- 1) Jost J. P., Rickenberg H. V., *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 741 (1971).
- 2) Hardman J. G., Robinson G. A., Sutherland E. W., *Ann. Rev. Physiol.* **33**, (1971).

LITERATURA

1. Adiga P. R., Murthy P. V. N., McKenzie J. M., *Biochemistry* **10**, 711 (1971).
2. Adler A. J., Schaffhausen B., Langan T. A., Fasman G. D., *Biochemistry* **10**, 909 (1971).
3. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1182 (1966).
4. Amer M. S., *Fed. Proc.* **30**, 220 Abs. (1971).
5. Anderson W. B., Hennig S. B., Ginsburg A., Stadtman E. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **67**, 1417 (1970).
6. Appleman M. M., Birnbaumer L., Torres H. N., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 39 (1966).
7. Barkley D. S., *Science* **165**, 1133 (1969).
8. Bär H. P., Hechter O., *Proc., Natl. Acad. Sci. U.S.* **63**, 350 (1969).
9. Beavo J. A., Hardman J. G., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **245**, 5649 (1970).
10. Beck M. P., Field J. B., Davis B., *Clin Res.* **18**, 494 (1970).
11. Bilezikian J. P., Kaempfer R. O. R., Magasanik B., *J. Mol. Biol.* **27**, 495 (1967).

12. Birnbaumer L., Pohl S. L., Rodbell M., *J. Biol. Chem.* **244**, 3468 (1969).
13. Birnbaumer L., Rodbell M., *J. Biol. Chem.* **244**, 3477 (1969).
14. Bonner J. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **65**, 110 (1970).
15. Bradham L. S., Sims M. A., *Fed. Proc.* **29**, 862 Abs. (1970).
16. Brana H., *Folia Microbiol.* **14**, 185 (1969).
17. Brana H., Chytil F., *Folia Microbiol.* **11**, 43 (1966).
18. Brooker G., Fichman M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 824 (1971).
19. Burgoyne L. A., Waquar M. A., Atkinson M. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 918 (1970).
20. Burkard W. P., Gey K. F., *Helv. Physiol. Acta* **26**, 197 CR (1968).
21. Butcher R. W., Baird C. E., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **243**, 1705 (1968).
22. Butcher R. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1244 (1962).
23. Chambers D. A., Zubay G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **63**, 118 (1969).
24. Chang Y. Y., *Science* **160**, 1 (1968).
25. Chase L. R., Fedak S. A., Aurbach G. D., *Endocrinology* **84**, 761 (1969).
26. Chelala C. A., Hirschbein L., Torres H. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**, 152 (1971).
27. Cheung W. Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 214 (1966).
28. Cheung W. Y., *Biochemistry* **6**, 1079 (1967).
29. Cheung W. Y., *Anal. Biochem.* **28**, 182 (1969).
30. Cheung W. Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 533 (1970).
31. Cheung W. Y., *Fed. Proc.* **29**, 602Abs (1970).
32. Cheung W. Y., Patrick S., *Fed. Proc.* **29**, 602 (1970).
33. Cheung W. Y., Salganicoff L., *Fed. Proc.* **25**, 714 (1966).
34. Chi Y. Y., Francis D., *J. Cell Biol.* **77**, 169 (1971).
35. Conway A., Koshland D. E. Jr., *Biochemistry* **7**, 4011 (1968).
36. Corbin J. D., Krebs E. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 328 (1969).
37. Corbin J. D., Reiman E. M., Walsh D. A., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **245**, 4849 (1970).
38. Davoren P. R., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **238**, 3016 (1963).
39. DeCrombrugghe B., Chen B., Gottesman M., Pastan I., Varmus H. E., Emmer E., Perlman R. L., *Nature New Biol.* **230**, 37 (1971).
40. DeCrombrugghe B., Perlman R. L., Varmus H. E., Pastan I., *J. Biol. Chem.* **244**, 5828 (1969).
41. DeLange R. J., Kemp R. G., Cooper R. A., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **243**, 2200 (1968).
42. DeRobertis E., Arnaiz G. R. D. L., Alberici A., Butcher R. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 3487 (1967).
43. Dobrogosz W. J., Hamilton P. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 202 (1971).
44. Emmer M., DeCrombrugghe B., Pastan I., Perlman R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **66**, 480 (1970).
45. Enzyme Nomenclature Internat. Union of Biochem. on the Nomenclature and Classification of Enzymes, Brisbane, 1964.
46. Erlichman J., Hirsch A. H., Rosen O. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**, 731 (1971).
47. Eron L., Arditti R., Zubay G., Connaway S., Beckwith J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**, 215 (1971).

48. Franks D. J., MacManus J. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 844 (1971).
49. Franks D. J., Stansfield D. A., *Biochem. J.* **117**, 25P (1970).
50. Garren L. D., Gill G. N., Masui H., Walton G. M., *Rec. Progr. Horm. Res.* (1970) (w druku).
51. Garren L. D., Ney R. L., Davis W. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1443 (1965).
52. Gericke D., Chandra P., Haenzel J., Wacker A., *Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem.* **357**, 305 (1970).
53. Gill G. N., Garren L. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **63**, 512 (1969).
54. Gill G. N., Garren L. D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**, 335 (1970).
55. Gill G. N., Garren L. D., *J. Clin. Invest.* **49**, 34a (1970).
56. Gill G. N., Garren L. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**, 786 (1971).
57. Goren E., Erlichman J., Rosen O. M., Rosen S. M., *Fed. Proc.* **29**, 602Abs (1970).
58. Grahame-Smith D., G., Butcher R. W., Ney R. L., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 5535 (1967).
59. Greengard P., *Biochem. J.* **115**, 19 (1969).
60. Greengard P., Costa E., wyd., *Role of Cyclic AMP in Cell Function*, Raven Press, New York 1970.
61. Greengard P., Hayaishi O., Colowick S. P., *Fed. Proc.* **28**, 467 (1969).
62. Greengard P., Rudolph S. A., Sturtevant J. M., *J. Biol. Chem.* **244**, 4798 (1969).
63. Gual C., wyd., *Progr. in Endocrinology*, Excerpta Med. Found., Amsterdam 1969, str. 102.
64. Hardman J. G., Davis J. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **244**, 6354 (1969).
65. Harris D. N., Phillips M. B., Goldenberg H. J., *Fed. Proc.* **30**, 219Abs (1971).
66. Harris R. S., wyd., *Vitamins and Hormones*, Acad. Press. Inc. New York **26**, 119 (1968).
67. Hirata M., Hayaishi O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**, 360 (1966).
68. Hirata H., Hayaishi O., *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 1 (1967).
69. Hirschhorn R., Grossman J., Weismann G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **133**, 1361 (1970).
70. Humes J. L., Kuhel F. A., Jr., *Fed. Proc.* **28**, 862Abs (1969).
71. Hutny J., *Post. Biochem.* **16**, 431 (1970).
72. Hutten J. K., Steinberg D., Mayer S. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **67**, 290 (1970).
73. Ide M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 42 (1969).
74. Jaquet M., Kepes A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 84 (1969).
75. Johnson G. S., Friedman R. M., Pastan I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**, 425 (1971).
76. Johnson R. A., Sutherland E. W., *Fed. Proc.* **30**, 220Abs (1971).
77. Kabat D., *Biochemistry* **9**, 4160 (1970).
78. Kabat D., *Biochemistry* **2**, 197 (1971).
79. Kakiuchi S., Yamazaki R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 1104 (1970).
80. Kakiuchi S., Yamazaki R., Teshima Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 968 (1971).

81. Klainer L. M., Chi Y. M., Freidberg S. L., Rall T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1239 (1962).
82. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., *Science* **154**, 780 (1966).
83. Konijn T. M., van de Meene J. G., Bonner J. T., Barkley D. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1152 (1967).
84. Kono T., *J. Biol. Chem.* **244**, 6363 (1969).
85. Krebs E. G., 8-th Internat. Congr. Biochem. 1970, Abstracts, str. 234.
86. Kumon A., Yamamura H., Nishizuka Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 1290 (1970).
87. Kuo J. F., DeRenzo E. C., *J. Biol. Chem.* **244**, 2252 (1969).
88. Kuo J. F., Greengard P., *J. Biol. Chem.* **244**, 3417 (1969).
89. Kuo J. F., Greengard P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **64**, 1349 (1969).
90. Kuo J. F., Greengard P., *J. Biol. Chem.* **245**, 4067 (1970).
91. Kuo J. F., Sanes J., Greengard P., *Fed. Proc.* **29**, 601Abs (1970).
92. Kuwano M., Schlessinger D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **66**, 146 (1970).
93. Langan T. A., *Science* **162**, 579 (1968).
94. Langan T. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **64**, 1276 (1969).
95. Lerner R. A., Hodge L. D., *J. Cell. Physiol.* **77**, 265 (1971).
96. Levey G. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 86 (1970).
97. Levitzki A., Koshland D. E. Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **62**, 1121 (1969).
98. Lissitzky S., Mante S., Attali J. C., Cartouzou G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 437 (1969).
99. Luft R., Randle P. J., wyd., Proc. of the IV Capri Conference on Diabetes, Acta Diabetol. Latina **VII**, 9 (1970).
100. MacManus J. P., Whitfield J. F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **132**, 409 (1969).
101. MacManus J. P., Whitfield J. F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 503 (1971).
102. Makman R. S., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **240**, 1309 (1965).
103. Malamud D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 754 (1969).
104. Malkin M., Lipmann F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **64**, 973 (1969).
105. Martelo O. J., Woo S. L. C., Reimann E. M., Davie E. W., *Biochemistry*, **9**, 4807 (1970).
106. Martelo O. J., Woo S. L. C., Reimann E. M., Davie E. W., Pacific Slope Biochem. Conf., La Jolla, Calif. June (1970), str. 22.
107. Marushige K., Ling V., Dixon G. H., *J. Biol. Chem.* **244**, 5953 (1969).
108. Mayer S. E., *Fed. Proc.* **29**, 1367 (1970).
109. Menahan L. A., Hepp K. D., Wieland O., *Europ. J. Biochem.* **8**, 435 (1969).
110. Monard D., Janacek J., Rickenberg H. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 584 (1969).
111. Murad F., Manganiello V., Vaughan M., *J. Biol. Chem.* **245**, 3352 (1970).
112. Murray A. W., Spizman M., Atkinson D. E., *Science* **171**, 496 (1971).
113. Nagata N., Rasmussen H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **65**, 368 (1970).
114. Nair K. G., *Biochemistry* **5**, 150 (1966).
115. Nakazawa T., Simoni R. D., Hays J. B., Roseman S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 836 (1971).
116. Nayler W. G., *Amer. Heart J.* **73**, 379 (1967).

117. Ney R. L., Hochella N. J., Grahame-Smith D. G., Dexter R. N., Butcher R. W., *J. Clin. Invest.* **48**, 1733 (1969).
118. O'Dea R. F., Haddox M. K., *Fed. Proc.* **30**, 219Abs (1971).
119. Ord M. G., Stocken L. A., *Biochem. J.* **107**, 403 (1968).
120. Ozawa E., Hosoi K., Ebashi S. J., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 531 (1967).
121. Øye I., Sutherland E. W., *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 347 (1966).
122. Palmer F. C., Sulser F., Robinson G. A., *The Pharmacologist* **11**, 258 (1969).
123. Pastan I., Perlman R., *J. Biol. Chem.* **244**, 2226 (1969).
124. Pastan I., Perlman R., *Science* **169**, 339 (1970).
125. Pastan I., Perlman R. L., *Nature New Biol.* **229**, 5 (1971).
126. Perlman R., Chen B., DeCrombrugghe B., Emmer M., Gottesman M., Varmus H., Pastan I., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **35**, 419 (1970).
127. Perlman R. L., DeCrombrugghe B., Pastan I., *Nature* **223**, 810 (1969).
128. Perlman R. L., Pastan I., *J. Biol. Chem.* **243**, 5420 (1969).
129. Pohl S. L., Birnbaumer L., Rodbell M., *Science* **164**, 566 (1969).
130. Pollard C. J., Venere R. J., *Fed. Proc.* **29**, 670Abs (1970).
131. Rabinowitz M., DeSalles L., Meisler L., Lorand J., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 29 (1965).
132. Reddi A. H., Ewing L. L., Williams-Ashman H. G., *Fed. Proc.* **29**, 730Abs (1970).
133. Riedel V., Gerisch G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 119 (1971).
134. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W., *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 149 (1968).
135. Rodbell M., *J. Biol. Chem.* **242**, 5744 (1967).
136. Rodbell M., *Acta Endocr.* **67** (Suppl. 153), 22 (1971).
137. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., *J. Biol. Chem.* **245**, 718 (1970).
138. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H. M. J., *J. Biol. Chem.* (1971) (w druku).
139. Rosen O. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 435 (1970).
140. Rosen O. M., Erlichman J., *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 171 (1969).
141. Rosen O. M., Rosen S. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 82 (1968).
142. San Pietro A., Lamberg N. R., Kenny F. T., wyd., *Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in Mammalian Cells*, Acad. Press, New York, London 1968.
143. Sanui H., *J. Cell. Physiol.* **75**, 361 (1970).
144. Schaffhausen B., Langan T. A., Fasman G. D., *Biochemistry* **10**, 909 (1971).
145. Seraydarian K., Mommaerts W. F. H. M., *J. Cell. Biol.* **26**, 641 (1965).
146. Shimizu H., Creveling C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **65**, 1033 (1970).
147. Shimizu H., Daly J. W., Creveling C. R., *J. Neurochem.* **16**, 1609 (1969).
148. Silverstone A. E., Magasanik B., Reznikoff W. S., Miller J. H., Beckwith J. R., *Nature* **221**, 1012 (1969).
149. Sippel A., Hartmann G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 218 (1968).
150. Smith R. M., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2376 (1956).

151. Smith J. W., Steiner A. L., Parker C. W., *Fed. Proc.* **29**, 369 (1970).
152. Soderling T. R., Hickenbottom J. P., *Fed. Proc.* **29**, 601Abs (1970).
153. Soderling T. R., Hickenbottom J. P., Reimann E. M., Hunkeler F. L., Walsh D. A., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.* **245**, 6317 (1970).
154. Stetten D., *Am. J. Med.* **28**, 867 (1970).
155. Steveley W. S., Stocken L. A., *Biochem. J.* **100**, 20c (1966).
156. Steveley W. S., Stocken L. A., *Biochem. J.* **109**, 24p (1968).
157. Steveley W. S., Stocken L. A., *Biochem. J.* **110**, 187 (1968).
158. Sutherland E. W., Rall T. W., *Pharmacol. Rev.* **12**, 265 (1960).
159. Sutherland E. W., Rall T. W., Menon T., *J. Biol. Chem.* **237**, 1220 (1962).
160. Talmage R. V., wyd., Parathyroid Hormone, Thyrocalcitonin (Calcitonin), Proc. Parathyroid Conf., 3-rd, Excerpta Med. Found., Amsterdam 1967, str. 247.
161. Thompson W. J., Appleman M. M., *Fed. Proc.* **29**, 602Abs (1970).
162. Thompson W. J., Appleman M. M., *Biochemistry* **10**, 311 (1971).
163. Triner L., Vulliemoz Y., Schwartz J., Nahas G. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 64 (1970).
164. Tsai S., Vaughan M., *Fed. Proc.* **29**, 602Abs (1970).
165. Varmus H. E., Perlman R. L., Pastan I., *Nature New Biol.* **230**, 41 (1971).
166. Voight K. M., Krishna G., *The Pharmacologist* **9**, 311 (1967).
167. Walton G. M., Gill G. N., Abrass J. B., Garren L. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**, 880 (1971).
168. Weiss B., Costa E., *Biochem. Pharmacol.* **17**, 2107 (1968).
169. White A. A., Aurbach G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 686 (1969).
170. Whitfield J. F., MacManus J. P., Gillan D. J., *J. Cell. Physiol.* **76**, 65 (1970).
171. Whitfield J. F., MacManus J. P., Gillan D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **133**, 1270 (1970).
172. Whitfield J. F., MacManus J. P., Rixon R. H., *J. Cell. Physiol.* **75**, 213 (1970).
173. Whitfield J. F., Perris A. D., Rixon R. H., *J. Cell. Physiol.* **74**, 1 (1969).
174. Whitfield J. F., Perris A. D., Youdale T., *J. Cell. Physiol.* **73**, 203 (1969).
175. Wieland O., Siess E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **65**, 947 (1970).
176. Williams R. H., Little S. A., Ensinnck J. W., *Am. J. Med. Sci.* **258**, 190 (1969).
177. Yamamoto M., Massey K. L., *Comp. Biochem. Physiol.* **30**, 941 (1969).
178. Yamamura H., Takeda M., Kumon A., Nishizuka Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 675 (1970).
179. Yokota T., Gots J. S., *J. Bacteriol.* **103**, 513 (1970).
180. Zubay G., Lederman M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **62**, 550 (1969).
181. Zubay G., Schwartz D., Beckwith J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **66**, 104 (1970).

ANDRZEJ KLEIN*, AMALIA RAIS**

Struktura peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii

Structure of the Peptidoglycans of Bacterial Cell Walls

The chemical composition and the structure of peptidoglycans present in bacterial cell walls are described.

Obszerne omówienie badań struktury ścian komórkowych bakterii znaleźć można w pracach przeglądowych Saltona (60), Rogersa i Perkinsa (57) oraz Ghuyse na i wsp. (26), które obejmują piśmiennictwo do roku 1967. Już pierwsze doświadczenia przeprowadzone przez Saltona (58) w roku 1953 wykazały znaczne różnice w składzie chemicznym ścian komórkowych bakterii Gramdodatnich i Gramujemnych. Rogers i Perkins (57) przypuszczają, że odmienny kolor preparatów bakterii wybarwianych metodą Grama spowodowany jest właśnie różnym składem chemicznym ścian komórkowych. Zasadnicze składniki strukturalne ścian komórkowych bakterii Gramdodatnich i Gramujemnych zebrane są w tablicy 1.

Tablica 1

Skład chemiczny ścian komórkowych bakterii

Bakterie Gramdodatnie	Bakterie Gramujemne
Peptydoglikany (50—90%)*	Peptydoglikany (10%)
Polisacharydy	Lipopolisacharydy (20%)
Kwasy tejchojowe	Lipoproteidy (50%)
lub tejchuronowe	Lipidy (20%)
Lipidy	
(10—50%)	

* — w nawiasach podano przybliżoną zawartość procentową danego składnika w przeliczeniu na suchą masę ściany komórkowej

*Mgr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

**Mgr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wykaz stosowanych skrótów: AcNHG1k — N-acetyloglucozamina, AcNHMur — kwas N-acetylmuraminowy, NGMur — kwas N-glikolilomuraminowy, DAP — kwas dwuaminopimelinowy

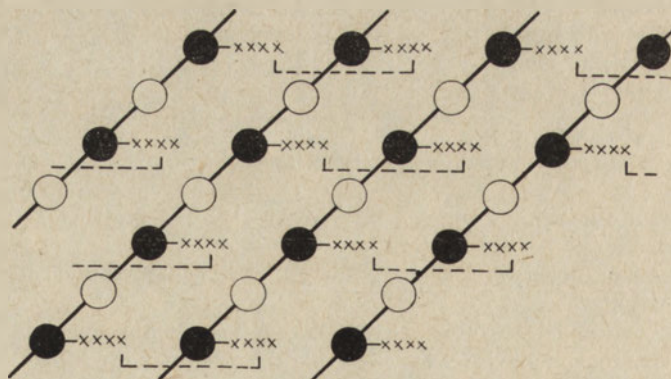
Referat wygłoszony na II Seminarium Instytutu Biologii Molekularnej; Rabka, luty 1971

Szczególną rolę w strukturze ścian komórkowych bakterii przypisuje się peptydoglikanom. Pewne dane dotyczące tych związków były już publikowane w piśmiennictwie polskim (74), ale nie obejmowały one całości zagadnienia.

I. Ogólna struktura peptydoglikanów

C u m m i n s i wsp. (14, 15, 16) wykazali, że hydrolizaty ścian komórkowych bakterii Gramdodatnich zawierają stałą, określoną liczbę aminokwasów i dwa aminocukry: glukozoaminę i drugi zidentyfikowany później jako kwas muraminowy (65). S a l t o n (59) i W o r k (79) pierwsi wysunęli przypuszczenie, że kompleks glikopeptydowy stanowi element strukturalny ścian komórkowych bakterii. W roku 1963 grupa P e r k i n s a (17, 50) stwierdziła, że glukozoamina i kwas muraminowy występują w tym kompleksie w postaci pochodnych N-acetylowych. Kopolimer złożony z N-acetyloglukozoaminy (AcNHGlc) i kwasu N-acetylmuraminowego (AcNHMur) wraz ze związanymi z nim fragmentami peptydowymi określany jest w piśmiennictwie różnymi nazwami: mureina (77), mukopeptyd (44), glikopeptyd (66), glikozaaminopeptyd (60) i peptydoglikan (2). Wydaje się nam, że ta ostatnia nazwa najlepiej określa strukturę związków.

G h u y s e n (22) określił peptydoglikany jako „sieci łańcuchów glikanowych podstawione związkami peptydowymi, które z kolei powiązane są krzyżowo poprzez mostki peptydowe”. Na podstawie dotychczasowych danych wiadomo, że AcNHGlc i AcNHMur łącząc się ze sobą tworzą nierozgałęzione łańcuchy polocukrowe, które można uważać za szkielet cząsteczki peptydoglikanu. Do grup karboksylowych kwasu N-acetylmuraminowego lub jego pochodnych przyłączona jest wiązaniem pep-



Schemat 1. Jednowarstwowa struktura peptydoglikanu

○ — AcNHGlc, ● — AcNHMur, xxxx — podjednostka peptydowa, |---| — wiązanie krzyżowe

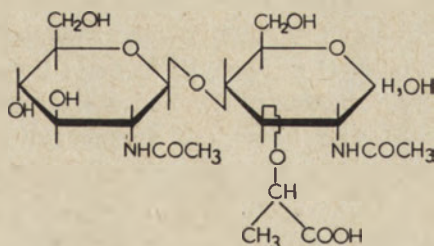
tydowym cząsteczka peptydu złożona z typowych dla danego peptydoglikanu czterech lub pięciu aminokwasów. Peptydy te nazywane są w piśmiennictwie podjednostkami peptydowymi (22). Grupy C-końcowe i wolne grupy aminowe podjednostek peptydowych sąsiednich łańcuchów policukrowych tworzą dodatkowe wiązania, nazwane wiązaniami krzyżowymi. W ten sposób powstaje struktura przestrzenna peptydoglikanu, w której wszystkie elementy powiązane są kowalencyjnie (schemat 1).

Grubość warstwy peptydoglikanowej bakterii Gramujemnych (2—3 nm) przemawia za strukturą jednowarstwową. Natomiast peptydoglikany bakterii Gramodatnich mają prawdopodobnie strukturę wielowarstwową, utworzoną przez nałożenie kilku struktur jednowarstwowych połączonych mostkami peptydowymi. Model peptydoglikanu przedstawiony na schemacie 1 jest bardzo ogólny; można w nim wyróżnić trzy elementy strukturalne, wspólne dla wszystkich peptydoglikanów: 1. łańcuchy policukrowe, 2. podjednostki peptydowe, 3. wiązania krzyżowe.

Podobna budowa peptydoglikanów wyodrębnionych ze ścian komórkowych różnych bakterii oraz fakt, że struktura ich pozostaje nienaruszona po oddzieleniu pozostałych składników ściany, są przyczyną uznania peptydoglikanów za zasadniczy element strukturalny ścian komórkowych bakterii przez większość autorów. Zaznaczyć należy, że są jednak bakterie z rodziny *Halobacteriae*, u których w ścianach komórkowych nie stwierdzono obecności peptydoglikanów (9, 38), Również wybitnie halofilne gatunki z rodziny *Micrococcaeeae* jak *Sarcina litoralis* i *Sarcina morrhuae* mają ścianę komórkową nie zawierającą ani kwasu muraminowego ani kwasu dwuaminopimelinowego (DAP) (10).

II. Budowa łańcuchów policukrowych

Ghuysen i Salton (24) oraz Perkins (49) stwierdzili, że podstawową cegiełką, z której zbudowany jest łańcuch policukrowy peptydoglikanów, jest dwucukier AcNHGlc- β (1-6)-AcNHMur. Flowers i Jeanloz (19) zsyntetyzowali taki β (1-6)dwucukier i wykazali, że



Schemat 2. Budowa cząsteczki dwucukru AcNHGlc-AcNHMur wyodrębnionej ze ścian komórkowych *M. lysodeikticus* (wg 19)

daje on odmienne testy chemiczne od naturalnego dwucukru wyizolowanego ze ścian komórkowych *Micrococcus lysodeikticus*. Również krystaliczne siedmioacetylometylo-pochodne syntetycznego i naturalnego dwucukru różniły się dyfrakcją promieni rentgenowskich oraz spektrum masowym (64). W wyniku tych badań zaproponowano wiązanie $\beta(1-4)$ -glikozydowe oraz budowę przedstawioną na schemacie 2.

Z peptydoglikanu ścian komórkowych *Staphylococcus aureus* wyosobniono aż cztery typy dwucukrów: kwas N-acetyloglucoaminylo- $\beta(1-4)$ -N-acetylmuraminowy, kwas N-acetyloglucoaminylo- $\beta(1-4)$ -N,6-0-dwuacetylmuraminowy (25, 71) oraz N-acetylmuraminylo- $\beta(1-4)$ -N-acetyloglucozaminę i N,6-0-dwuacetylmuraminylo- $\beta(1-4)$ -N-acetyloglucozaminę (61, 73). Wskazuje to, że w peptydoglikanach niektórych gatunków bakterii część kwasu muraminowego występuje w postaci pochodnych N,6-0-dwuacetylowych. Stwierdzono również, że w peptydoglikanach paru gatunków *Mycobacterium* miejsce kwasu N-acetylmuraminowego zajmuje kwas N-glikolylmuraminowy (1, 4, 53, 78). Obecnie przyjmuje się, że łańcuch policukrowy zbudowany jest z naprzemian występujących cząsteczek N-acetyloglucozamininy i kwasu N-acetylmuraminowego (lub jego pochodnych) w formie piranozowej, połączonych wiązaniem $\beta(1-4)$ -glikozydowym.

Łańcuchy policukrowe wyizolowane ze ścian komórkowych jednego gatunku bakterii składały się z ośmiu do stu reszt monosacharydowych, co wskazuje na ich polidispersyjność. Dlatego charakteryzując poszczególne peptydoglikany podaje się średnią ilość reszt monosacharydowych w łańcuchu.

III. Budowa podjednostek peptydowych

Mimo, że budowa ścian komórkowych bakterii Gramujemnych jest bardziej skomplikowana niż bakterii Gramodatnich, analiza strukturalna peptydoglikanów tych pierwszych okazała się łatwiejsza. Powodem tego jest fakt, że działaniem lizozymu na peptydoglikany ścian komórkowych bakterii Gramujemnych otrzymuje się krótsze fragmenty glikopeptydowe.

Hydroliza kwasowa warstwy peptydoglikanowej *E. coli* wykazała obecność alaniny, kwasu dwuaminopimelinowego i kwasu glutaminowego (76). Leutgeb i wsp. (40, 41) zauważyli, że małe ilości innych aminokwasów stwierdzone w hydralizacie nie wchodzą w skład peptydoglikanu tego gatunku bakterii. Jusić i wsp. (32) wyznaczyli stosunki molowe oraz sekwencję aminokwasów i zaproponowali dla podjednostki peptydowej *E. coli* budowę L-Ala-D-Glu-mezo: DAP-D-Ala. Porównanie ruchliwości elektroforetycznej dwóch syntetycznych czteropeptydów z naturalnym, otrzymanym ze ścian *E. coli* i *Bacillus megaterium* KM (18), sugeruje budowę przedstawioną na schemacie 3. Podjednostkę peptydową o podobnej

Tablica 2

Podjednostki peptydowe peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii

Podjednostka peptydowa	Rodzaj i gatunek bakterii	Literatura
N^{α} -L-Ala-D-Glu-L-Liz-D-Ala	<i>Gaïffkya homyri</i> , <i>A. viridans</i>	48
N^{α} -L-Ala-D-Glu-NH ₂ -L-Liz-D-Ala	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>M. roseus</i> , <i>G. homari</i> , <i>A. viridans</i> , <i>A. crystallopoietes</i>	47, 48 72
N^{α} -Ala-D-Glu-L-Liz-D-Ala	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. fermenti</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>M. lysodeikticus</i>	31, 75 13, 68 23 35
Gli	<i>M. flavus</i> , <i>M. citreus</i> , <i>Sarcina lutea</i>	12
N^{α} -L-Ala-D-Glu-mezo: DAP-D-Ala	<i>E. coli</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	18
N^{α} -L-Ala-D-Glu-NH ₂ -mezo: DAP-D-Ala	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	30
α -N ¹ -L-Ala-D-Glu-NH ₂ -mezo: DAP-D-Ala	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ,	34
CONH ₂	<i>Corynebacterium fermentans</i>	78
N^{α} -L-Ala-D-Glu-NH ₂ -L-L-DAP-D-Ala	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Clostridium perfringens</i>	42
N^{α} -L-Ala-D-Glu-L-Orn-D-Ala	<i>Bifidobacterium longum</i>	36
N^{α} -L-Ser-D-Glu-L-Orn-D-Ala	<i>Butyracterium rettgeri</i>	27
N^{α} -Gly-D-Glu-homo-Ser-D-Ala	<i>C. poinsettiae</i> , <i>C. flaccumfaciens</i> , <i>C. betae</i>	cyt. wg 22

pa γ -karboksylowa kwasu D-glutaminowego. Wszystkie pozostałe wiązania peptydowe w podjednostce peptydowej utworzone są przez grupy α -karboksylowe i α -aminowe poszczególnych aminokwasów. Dla wszystkich poznanych podjednostek peptydowych charakterystyczny jest układ konfiguracji kolejnych aminokwasów N^α-L-D-L-D. W przypadku kwasu mezo:DAP zarówno grupa aminowa biorąca udział w wiązaniu peptydowym z kwasem D-glutaminowym jak i grupa karboksylowa związana z D-alaniną znajdują się przy tym samym węglu asymetrycznym o konfiguracji L (porównaj schemat 3).

IV. Wiązania krzyżowe

W ścianach komórkowych bakterii Gramujemnych czynnikiem usztywniającym strukturę peptydoglikanów są wiązania między wolnymi grupami aminowymi i karboksylowymi podjednostek peptydowych sąsiednich łańcuchów policukrowych. Typowym przykładem jest wiązanie krzyżowe w peptydoglikanach *E. coli* i *Bacillus megaterium* KM utworzone przez grupę aminową przy węglu o konfiguracji D kwasu mezo:DAP i karboksylową grupę C-końcowej D-alaniny (28).

U wielu bakterii Gramodatnich elementem łączącym podjednostki peptydowe są fragmenty złożone z jednego lub kilku aminokwasów tzw. mostki peptydowe. Campbell i wsp. (12) podsumowując badania strukturalne prowadzone na dwóch tylko rodzinach bakterii: *Micrococcae* i *Lactobacillaceae* wyróżnili dwie grupy wiązań krzyżowych. W grupie pierwszej podjednostki peptydowe N^α-L-Ala-D-Glu-NH₂-L-Liz-D-Ala wiązane są przez mostek peptydowy utworzony między ϵ -aminową grupą L-lizyny jednej podjednostki peptydowej a karboksylową grupą C-końcowej D-alaniny drugiej podjednostki peptydowej. W zależności od aminokwasów tworzących mostek peptydowy autorzy wyróżnili cztery podgrupy:

- a) mostek złożony z L-alaniny i L-treoniny: *M. roseus* (54), *Arthrobacter crystallopoietes* (37), *Streptococcus pyogenes* (47),
- b) mostek złożony z reszt glicynowych: *S. aureus* (43, 46),
- c) mostek zbudowany z reszt glicyny i seryny: *S. epidermidis* (68),
- d) mostek utworzony przez jedną resztę D-izoasparaginy: *Streptococcus faecalis* (23), *Lactobacillus casei* (31).

Do grupy drugiej zaliczono peptydoglikany, których podjednostki peptydowe N^α-L-Ala- γ -(α -D-Glu-Gli)-L-Liz-D-Ala połączone są mostkiem peptydowym między ϵ -aminową grupą L-lizyny a karboksylową grupą C-końcowej D-alaniny. Tego rodzaju wiązania występują w peptydoglikanach ścian komórkowych *M. lysodeikticus*, *M. flavus*, *M. citreus* i *sarcina lutea* (12). Mostek peptydowy utworzony jest przez spolimeryzowane fragmenty peptydowe zbudowane identycznie jak podjednostka peptydowa, połą-

czona wiązaniem peptydowym między C-końcówką D-alaniną i N-końcówką L-alaniną (patrz schemat 5, typ III).

W roku 1968 G h u y s e n (22) zaproponował inny podział wszystkich poznanych peptydoglikanów ze względu na rodzaj wiązań krzyżowych.



Schemat 5. Podział peptydoglikanów ze względu na rodzaj wiązań krzyżowych (wg 22)

Wyróżnił cztery typy peptydoglikanów obejmujące zarówno bakterie Gramdodatnie jak i Gramujemne (schemat 5).

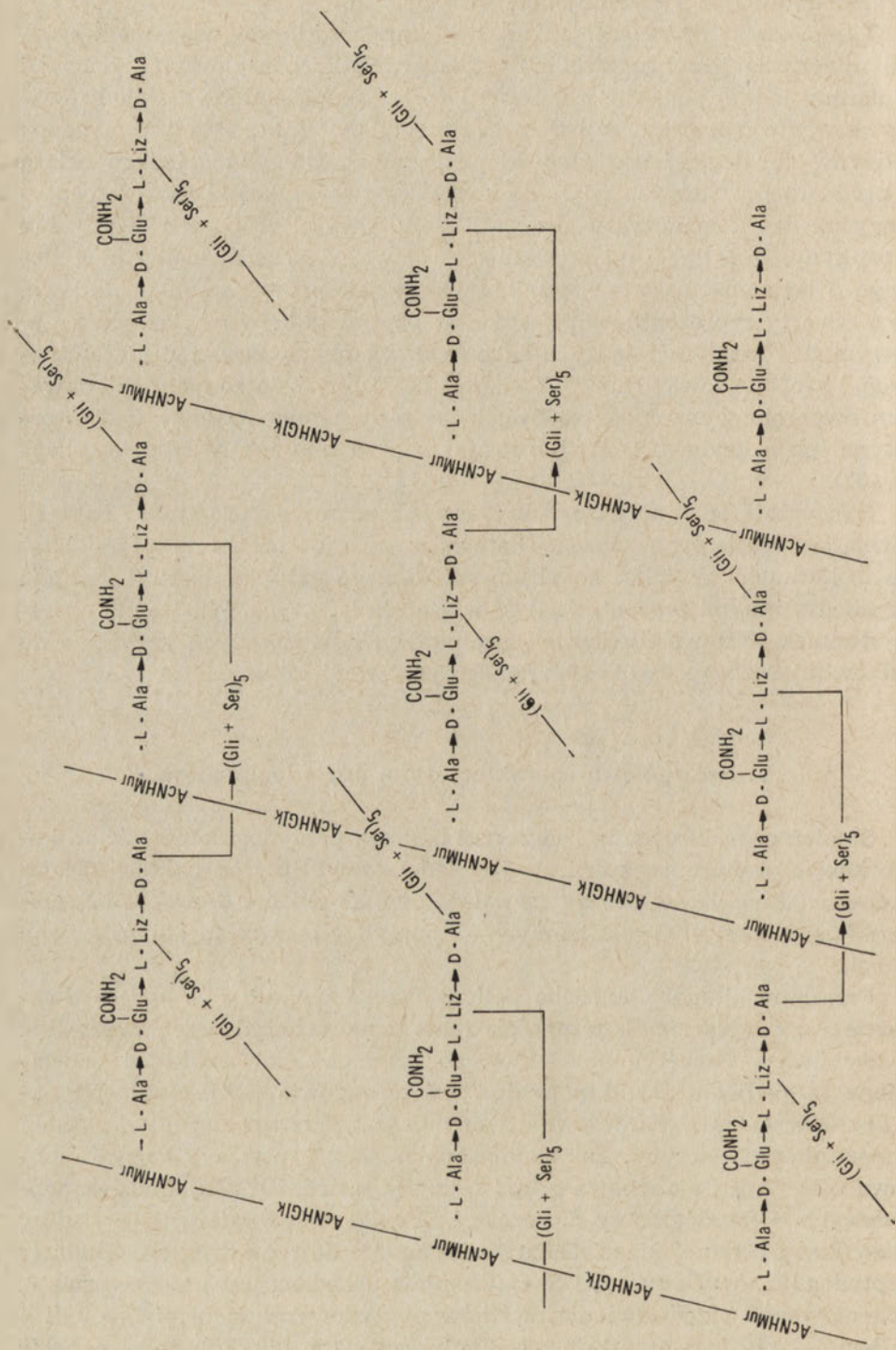
Typ pierwszy reprezentują peptydoglikany, w których wiązanie krzyżowe utworzone jest bezpośrednio przez grupę karboksylową C-końcowej D-alaniny jednej podjednostki peptydowej z grupą aminową zlokalizowaną na węglu o konfiguracji D kwasu mezo:DAP lub z ϵ -aminową grupą L-lizyny (48) drugiej podjednostki peptydowej. Do typu drugiego należą peptydoglikany, których wiązanie krzyżowe tworzy krótki mostek peptydowy między C-końcową D-alaniną i ω -aminowymi grupami L-lizyny lub L-ornityny. Typ trzeci ma wiązanie krzyżowe w postaci mostka peptydowego o tej samej sekwencji aminokwasów jak podjednostka peptydowa. Typ czwarty reprezentowany jest przez peptydoglikany o wiązaniu krzyżowym utworzonym między α -karboksylową grupą kwasu D-glutaminowego i karboksylową grupą C-końcowej D-alaniny połączonych aminokwasem dwuaminowym. Mogą to być: kwas D-dwuaminomasłowy (52), D-ornityna lub D-lizyna (27, 51) lub krótki peptyd taki jak N^α-glicylo-L-lizyna (62).

Niezależnie od typu wiązań krzyżowych poszczególne gatunki bakterii różnią się ilością tych wiązań. Dlatego, omawiając budowę peptydoglikanu izolowanego ze ścian komórkowych danego gatunku bakterii, podaje się między innymi procentową ilość wiązań krzyżowych. Wartość ta określa stosunek liczby podjednostek peptydowych powiązanych krzyżowo do całkowitej liczby podjednostek danego peptydoglikanu.

V. Szczegółowa charakterystyka peptydoglikanów

Stopień zaawansowania badań nad budową peptydoglikanów ścian komórkowych różnych bakterii nie jest jednakowy. Spośród bakterii Gramdodatnich do najlepiej poznanych należą peptydoglikany *S. aureus* i *S. epidermidis*, a spośród Gramujemnych — peptydoglikan ścian komórkowych *E. coli*.

Przeciętna długość łańcucha policukrowego wynosi u *S. aureus* dwaście a u *S. epidermidis* trzynaście reszt monosacharydowych. Wszystkie reszty kwasu N-acetylmuraminowego tych gatunków bakterii podstawione są podjednostkami peptydowymi o budowie L-Ala-D-Glu-NH₂-L-Liz-D-Ala. Wiązanie krzyżowe utworzone jest przez pięciopeptyd złożony z reszt glicyny i seryny. Tak zbudowany mostek peptydowy łączy C-końcową D-alaninę z ϵ -aminową grupą L-lizyny sąsiednich podjednostek peptydowych. Peptydoglikany *S. aureus* i *S. epidermidis* należą więc według klasyfikacji podanej przez G h u y s e n a (22) do typu drugiego. Budowa peptydoglikanów *S. aureus* i *S. epidermidis* pokazana jest na schemacie 6. Schematyczne przedstawienie mostków peptydowych w formie — (Gli + Ser)₅ — nie jest przypadkowe. Zaobserwowano (69, 70), że w obrębie



Schemat 6. Struktura peptydoglikanu ścian komórkowych *S. aureus* i *S. epidermidis*

jednego gatunku występuje zróżnicowanie w składzie i sekwencji aminokwasów budujących mostek peptydowy (tablica 3).

Procentowa ilość wiązań krzyżowych wynosi w peptydoglikanie *S. aureus* około 75% a u *S. epidermidis* około 66%.

Tablica 3

Budowa mostków peptydowych *S. aureus* i *S. epidermidis*

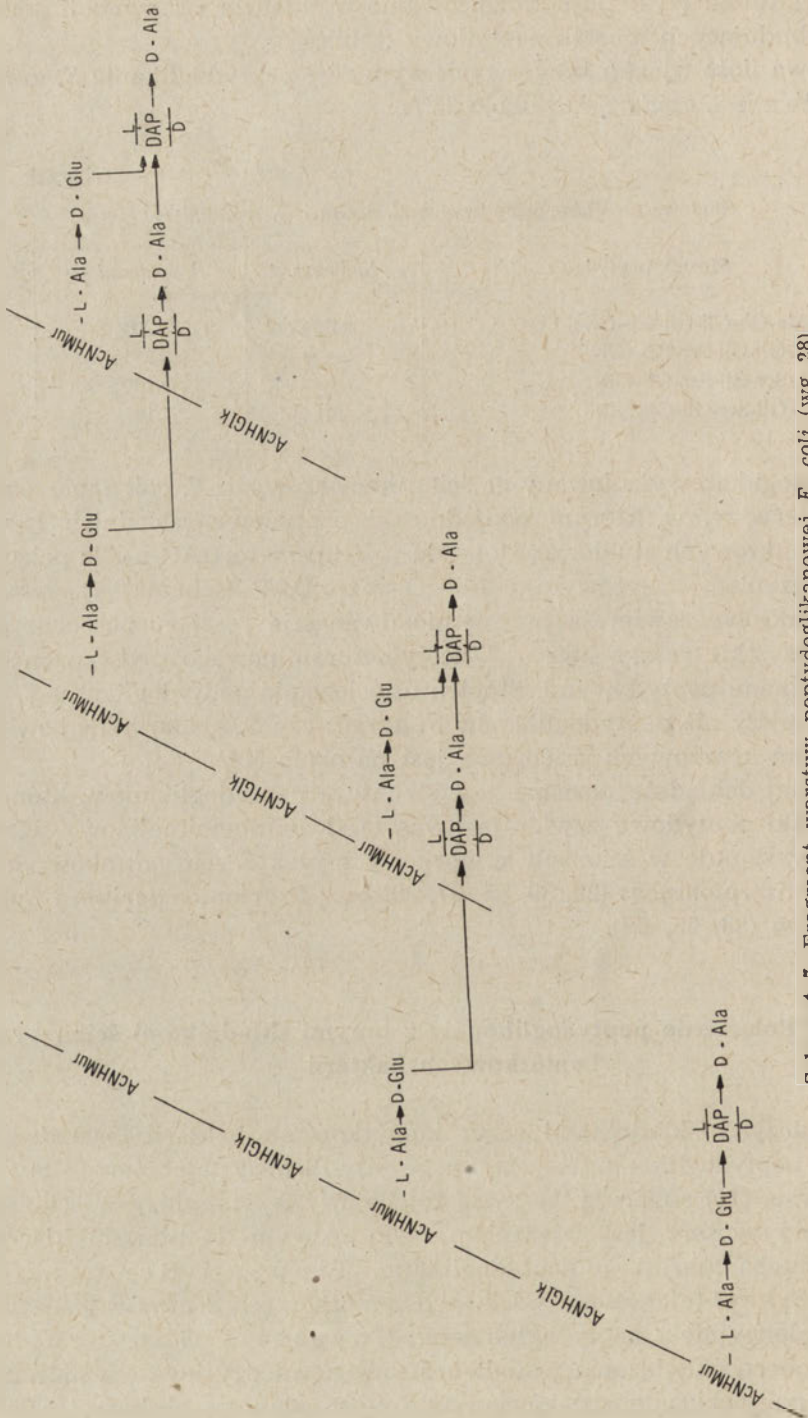
Mostek peptydowy	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
-D-Ala-Gli-Gli-Gli-Gli-L-Liz-	94%	20%
-Gli-Gli-Ser-Gli-Gli-	—	55%
-Ser-Gli-Ser-Gli-Gli-	—	15%
-Gli-Ser-Gli-Gli-Gli-	6%	10%

Peptydoglikan wyizolowany ze ścian komórkowych *E. coli* reprezentuje typ pierwszy, w którym podjednostki peptydowe sąsiadnych łańcuchów policukrowych zbudowane z L-Ala-(D-Glu)-mezo:DAP-D-Ala połączone są wiązaniem krzyżowym L-Ala-(D)-mezo:DAP (schemat 7). Łańcuchy policukrowe zawierają przeciętnie dwanaście reszt monosacharydowych. Wszystkie reszty kwasu N-acetylmuraminowego podstawione są podjednostkami peptydowymi. Stopień usieciowania peptydoglikanu *E. coli* jest mniejszy niż peptydoglikanów *S. aureus* czy *S. epidermidis* bowiem ilość wiązań krzyżowych szacowana jest na około 50%.

Najmniej dokładnie poznana jest struktura peptydoglikanów, których podjednostki peptydowe zawierają kwas LL-dwuaminopimelinowy. Kwas LL-DAP występuje w ścianach komórkowych niektórych gatunków *Actinomyces* i *Streptomyces* (29, 39, 56, 67, 80) oraz *Propionibacterium* i *Corynebacterium* (38, 55, 63).

VI. Połączenie peptydoglikanów z innymi składnikami ścian komórkowych bakterii

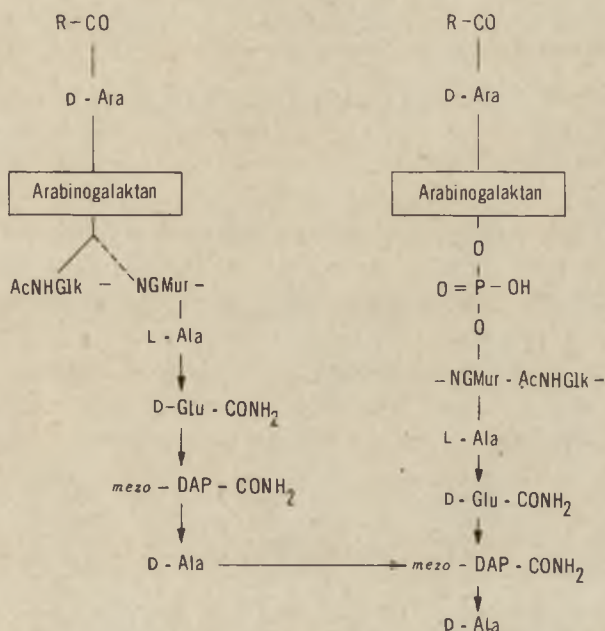
Zasadniczymi składnikami ścian komórkowych bakterii Gramdodatnich poza peptydoglikanami są: polisacharydy i kwasy tejchojowe. Button i wsp. (11) sugerują, że kwas tejchojowy występujący w ścianach *S. lactis* przyłączony jest wiązaniem fosforanowym do nieredukującego końca łańcucha cukrowego peptydoglikanu. Tipper i Berman (70) twierdzą, że kwas tejchojowy w ścianach komórkowych *S. aureus* jest związany kowalencyjnie z peptydoglikanem. Coyette i Ghuyssen (13) wykazali obecność wiązania fosfodwuestrowego między kwasem muraminowym a polisacharydem zbudowanym z reszt ramnozy, glukozy i galaktozy w ścianach *Lactobacillus acidophilus*. Badając strukturę ścian komórkowych *S. pyogenes* Munozi i wsp. (46) stwierdzili koegzystencję dwóch



Schemat 7. Fragment warstwy peptydoglikanowej *E. coli* (wg 28)

L
DAP — kwas mezodwuaminopimelinowy
D

typów wiązań polisacharyd-peptydoglikan: wiązania glikozydowego między C-polisacharydem a resztą kwasu muraminowego oraz wiązania fosfodwuestrowego C-polisacharydu z resztą kwasu muraminowego. Badania prowadzone na trzech gatunkach *Mycobacterium* wykazały istnienie w ścianach komórkowych tych bakterii kompleksu kwas tłuszczowy-polisacharyd-peptydoglikan (33, 45). Autorzy zaproponowali również dwa rodzaje wiązań pomiędzy cząsteczkami polisacharydu i peptydoglikanu. Są to: wiązanie fosfodwuestrowe między cząsteczką arabinogalaktanu a resztą kwasu N-glikolylmuraminowego peptydoglikanu oraz wiązanie glikozydowe arabinogalaktanu z jednym z aminocukrów łańcucha policukrowego peptydoglikanu, prawdopodobnie z N-acetyloglukozoaminą (schemat 8).

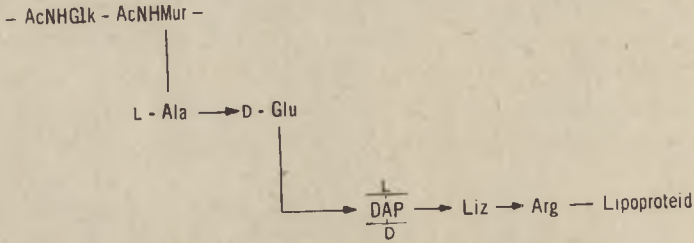


Schemat 8. Proponowane rodzaje wiązań polisacharyd-peptydoglikan w ścianach komórkowych bakterii z rodzaju *Mycobacterium* (wg 33, 45). R-CO- — reszta kwasu mykolinowego

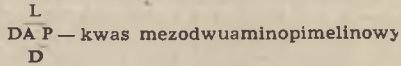
Wiązanie fosfodwuestrowe między peptydoglikanem a polisacharydem jest najczęściej spotykanym sposobem połączenia tych składników ścian komórkowych i stwierdzono je u wielu bakterii Gramdodatnich (22). Miejscem przyłączenia reszty fosforanowej do peptydoglikanu jest najprawdopodobniej węgiel C-6 kwasu muraminowego. Zostało to potwierdzone przez wyizolowanie ze ścian komórkowych *Bacillus cereus* AcNHGlc- β (1-4)-AcNHMur-6-fosforanu (3).

W ścianach komórkowych bakterii Gramujemnych stwierdzono obecność wiązania między peptydoglikanem a lipoproteidem (5). Braun

i Sieglin (7) wykazali, że końcowa L-lizyna lipoproteidu przyłączona jest do reszty kwasu mezo:DAP podjednostki peptydowej peptydoglikanu. Dalsze badania (8) pozwoliły na zaproponowanie budowy kompleksu peptydoglikan-lipoproteid w ścianach komórkowych *E. coli* przedstawionej na schemacie 9.



Schemat 9. Wiązanie peptydoglikan-lipoproteid (wg 8)



Obecność identycznego, kowalencyjnego wiązania między lipoproteidem a peptydoglikanem wykazano również w ścianach komórkowych *Salmonella typhimurium* i *Serratia marcescens* (6). Nie wydaje się jednak, aby była to forma połączenia peptydoglikanu z pozostałymi składnikami ścian komórkowych bakterii Gramujemnych. Przemawia za tym fakt, że nie stwierdzono obecności wiązania kowalencyjnego między tak samo zbudowanym peptydoglikanem a lipoproteidem w ścianach komórkowych *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas fluorescens* (6).

LITERATURA

1. Adam A., Petit J. F., Wietzerbin-Falszpan J., Sinay P., Thomas D. W., Lederer E., *FEBS Letters* **4**, 87 (1969).
2. Anderson J. S., Meadow P. M., Hoskin M. A., Strominger J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 487 (1966).
3. Araki Y., Nakatani T., Makino R., Hayashi H., Ito E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 684 (1971).
4. Azuma J., Thomas D. W., Adam A., Ghuysen J. M., Bonoly R., Petit J. F., Lederer E., *Biochim. Biophys. Acta* **208**, 444 (1970).
5. Braun V., Rehn K., *European J. Biochem.* **10**, 426 (1969).
6. Braun V., Rehn K., Wolff H., *Biochemistry* **9**, 5041 (1970).
7. Braun V., Sieglin U., *European J. Biochem.* **13**, 336 (1970).
8. Braun V., Wolff H., *European J. Biochem.* **14**, 387 (1970).
9. Brown A. D., *Bacteriol. Rev.* **28**, 296 (1964).
10. Brown A. D., Cho K. Y., *J. Gen. Microbiol.* **62**, 267 (1970).
11. Button D., Archibald A. R., Baddiley J., *Biochem. J.* **99**, 11C (1966).

12. Campbell J. N., Leyh-Bouille M., Ghuysen J. M., *Biochemistry* **8**, 193 (1969).
13. Coyette J., Ghuysen J. M., *Biochemistry* **9**, 2935 (1970).
14. Cummins C. S., Glendenning O. M., Harris H., *Nature* **180**, 337 (1957).
15. Cummins C. S., Harris H., *J. Gen. Microbiol.* **14**, 583 (1956).
16. Cummins C. S., Harris H., *J. Gen. Microbiol.* **18**, 173 (1958).
17. Czerkawski J. W., Perkins H., Rogers H. J., *Biochem. J.* **86**, 468 (1963).
18. Dezélée Ph., Bricas E., *Biochemistry* **9**, 823 (1970).
19. Flowers H. M., Jeanloz R. W., *J. Org. Chem.* **28**, 1564 (1963).
20. Ghuysen J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 473 (1960).
21. Ghuysen J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 561 (1961).
22. Ghuysen J. M., *Bacteriol. Rev.* **32**, 425 (1968).
23. Ghuysen J. M., Bricas E., Leyh-Bouille M., Lache M., Shockman G. D., *Biochemistry* **6**, 2607 (1967).
24. Ghuysen J. M., Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 462 (1960).
25. Ghuysen J. M., Strominger J. L., *Biochemistry* **2**, 1119 (1963).
26. Ghuysen J. M., Strominger J. L., Tipper D. J., w *Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florkin, F. M. Stotz, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1968, tom 26A, str. 53.
27. Guinan M., Ghuysen J. M., Schleifer K. M., Kandler O., *Biochemistry* **8**, 200 (1969).
28. Heijerzoort J., Elbaz L., Dezélée Ph., Petit J. F., Bricas E., Ghuysen J. M., *Biochemistry* **8**, 207 (1969).
29. Hoare D. S., Work E., *Biochem. J.* **65**, 441 (1957).
30. Hughes R. C., *Biochem. J.* **119**, 849 (1970).
31. Hungerer D., *Federation Proc.* **447**, 294 (1968).
32. Jusic D., Roy C., Watson R. W., *Can. J. Biochem. Physiol.* **42**, 1553 (1964).
33. Kanetsuna F., San Blas G., *Biochim. Biophys. Acta* **208**, 434 (1970).
34. Katz W., Martin H. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **39**, 744 (1970).
35. Katz W., Strominger J. L., *Biochemistry* **6**, 930 (1967).
36. Koch D., Schleifer K. M., Kandler O., *Arch. Microbiol.* **74**, 315 (1970).
37. Krulwich T. A., Ensign J. C., Tipper D. J., Strominger J. L., *J. Bacteriol.* **94**, 741 (1967).
38. Kushner D. J., Bayley S. T., Boring J., Kates M., Gibbons N. E., *Can. J. Microbiol.* **10**, 483 (1964).
39. Lechevalier H. A., Lechevalier M. P., *Ann. Rev. Microbiol.* **21**, 71 (1967).
40. Leutgeb W., Maass D., Weidel W., *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 1062 (1963).
41. Leutgeb W., Weidel W., *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 1060 (1963).
42. Leyh-Bouille M., Bonoly R., Ghuysen J. M., Tinelli R., Tipper D., *Biochemistry* **9**, 2944 (1970).
43. Mandelstam M. H., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 466 (1961).
44. Mandelstam J., Rogers H., *Biochem. J.* **72**, 654 (1959).
45. Markovits J., Vilkas E., Lederer E., *European J. Biochem.* **18**, 287 (1971).
46. Munoz E., Ghuysen J. M., Heymann H., *Biochemistry* **6**, 3659 (1967).

47. Munoz E., Ghuysen J. M., Leyh-Bouille M., Petit J. F., Heymann H., Bricas E., Lefrancier P., *Biochemistry* 5, 3748 (1966).
48. Nakel M., Ghuysen J. M., Kandler O., *Biochemistry* 10, 2170 (1971).
49. Perkins H. R., *Biochem. J.* 74, 182 (1960).
50. Perkins H. R., *Biochem. J.* 86, 475 (1963).
51. Perkins H. R., *Biochem. J.* 102, 29 (1967).
52. Perkins H. R., *Biochem. J.* 110, 47 (1969).
53. Petit J. F., Adam A., Wietzerbin-Falszpan J., Lederer E., Ghuysen J. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35, 478 (1969).
54. Petit J. F., Munoz E., Ghuysen J. M., *Biochemistry* 5, 2764 (1966).
55. Pickering D. T., *Biochem. J.* 100, 430 (1966).
56. Pine L., Boone C. J., *J. Bacteriol.* 94, 875 (1967).
57. Rogers H., Perkins H. R., Cell Walls and Membranes red. E. i F. N. Spon Ltd., Londyn 1968.
58. Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* 10, 512 (1953).
59. Salton M. R. J., *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 6, 81 (1956).
60. Salton M. R. J., The Bacterial Cell Walls, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1964.
61. Schindler C. A., Schuhardt V. T., *Biochim. Biophys. Acta* 97, 242 (1965).
62. Schleifer K. M., Plapp R., Kandler O., *Biochim. Biophys. Acta* 154, 573 (1968).
63. Schleifer K. M., Plapp R., Kandler O., *FEBS Letters* 1, 287 (1968).
64. Sharon N., Osawa T., Flowers H. M., Jeanloz R. W., *J. Biol. Chem.* 241, 223 (1966).
65. Strange R. E., Kent L. H., *Biochem. J.* 71, 333 (1959).
66. Strominger J. L., The Bacteria, red. Gunsalus J. C. i Stainer R., Academic Press Inc., Nowy Jork 1962, tom 3, str. 413.
67. Szaniszló P. J., Gorder H., *J. Bacteriol.* 94, 2037 (1967).
68. Tipper D. J., *Federation Proc.* 446, 294 (1968).
69. Tipper D. J., *Biochemistry* 8, 2192 (1969).
70. Tipper D. J., Berman M. F., *Biochemistry* 8, 2183 (1969).
71. Tipper D. J., Ghuysen J. M., Strominger J. L., *Biochemistry* 4, 468 (1965).
72. Tipper D. J., Katz W., Strominger J. L., Ghuysen J. M., *Biochemistry* 6, 921 (1967).
73. Tipper D. J., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22, 48 (1966).
74. Tynecka Z., *Post. Biochem.* 16, 153 (1970).
75. Wallinder J. B., Neujahr H. Y., *Bacteriol.* 105, 918 (1971).
76. Weidel W., Frank H., Martin H. M., *J. Gen. Microbiol.* 22, 158 (1960).
77. Weidel W., Pelzer H., *Advan. Enzymol.* 26, 193 (1964).
78. Wietzerbin-Falszpan J., Das B. C., Adam A., Petit J. F., Lederer E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 40, 57 (1970).
79. Work E., *Nature* 179, 841 (1957).
80. Yamaguchi T., *J. Bacteriol.* 89, 444 (1965).

AMALIA RAIS *, ANDRZEJ KLEIN **

Biosynteza peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii

Biosynthesis of the Peptidoglycans of Bacterial Cell Walls

The actual views on the biosynthesis of cell wall peptidoglycans in bacteria are presented. The biosynthesis of intracellular precursors and the role of lipid intermediates are especially described.

Pierwsze etapy poznania biosyntezy peptydoglikanów ścian bakteryjnych wiążą się z badaniami wpływu penicyliny na mikroorganizmy. W 1949 roku Park i Johnson (47) stwierdzili w komórkach *Staphylococcus aureus* poddanych działaniu penicyliny nagromadzenie się związku zawierającego uracyl. W kilka lat później Park (46) wykazał, że związkiem tym jest pochodna UDP, która zawiera nieznaną heksozoaminę, D- i L-alaninę, L-lizynę i kwas D-glutaminowy. Taki sam składnik, ale w znacznie mniejszych ilościach, znalazł Strominger (68) w kulturach *S. aureus* nie poddanych działaniu penicyliny. W dalszych badaniach ustalono rodzaj cukru (48, 67, 71, 72), rodzaj i sekwencję aminokwasów (49, 71, 72), a w końcu całkowitą strukturę związku określoną wzorem: UDP-AcNHMur-L-Ala-D-γ-Glu-L-Liz-D-Ala-D-Ala (46, 48).

Rozwój metod izolowania ścian komórek bakterii (60, 61) umożliwił Parkowi i wsp. (48, 71) uzyskanie ze *S. aureus* peptydoglikanu i stwierdzenie w nim jednostek o budowie zbliżonej do podanej powyżej pochodnej nukleotydu urydynowego. Autorzy ci pierwsi wysunęli przypuszczenie, że pochodne UDP są prekursorami ściany, a nagromadzenie ich w komórkach bakteryjnych jest wynikiem zahamowania syntezy ściany w obecności penicyliny. Od tego momentu datuje się duże zainteresowanie zarówno strukturą jak i biosyntezą peptydoglikanów ścian komórek bakterii. Bu-

* Mgr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

** Mgr, Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

Wykaz stosowanych skrótów: UDP-AcNHGlc — urydino-5'-dwufosfo-N-acetylglukozaamina, UDP-AcNHMur — urydino-5'-dwufosfo-N-acetylmuraminian, pCMB — p-chlorortęciobenzoesan.

Referat wygłoszony na II Seminarium Instytutu Biologii Molekularnej, Rabka, luty 1971.

dowa tych związków została opisana w kilku artykułach przeglądowych (14, 34, 57, 59). Rogers i Perkins (57), Ghuyssen, Strominger i Tipper (14) oraz Ellar (12) podali w ostatnich latach aktualny stan wiadomości o ich biosyntezie. W piśmiennictwie polskim Tynecka (78) i Ruczaj (58) omówili wpływ antybiotyków na biosyntezę peptydoglikanów uwzględniając szczegóły odnoszące się do pewnych etapów tego procesu. W związku z tym w naszym artykule ograniczamy się do pobieżnego przedstawienia tych zagadnień, a zwracamy uwagę na biosyntezę prekursorów peptydoglikanów oraz na stwierdzoną w ostatnich latach rolę nośnika lipidowego w formowaniu się polimeru.

Biosynteza peptydoglikanów ścian komórek bakterii zachodzi w łańcuchu reakcji enzymatycznych, które można zgrupować w kilku etapach:

I. Biosynteza prekursorów peptydoglikanu

1. Synteza urydyno-5'-dwufosfo-N-acetyloglukozoaminy (UDP-AcNHGłk)
2. Synteza urydyno-5'-dwufosfo-N-acetylomuraminianu (UDP-AcNHMur)
3. Tworzenie podjednostki peptydowej przez przyłączenie aminokwasów do UDP-AcNHMur

II. Tworzenie liniowych łańcuchów peptydoglikanu

1. Powiązanie prekursorów z błoną cytoplazmatyczną — tworzenie pośredników lipidowych
2. Modyfikacja pośredników lipidowych
3. Transport podjednostek przez błonę komórkową z udziałem nośnika lipidowego.
4. Polimeryzacja podjednostek w łańcuchy peptydoglikanu

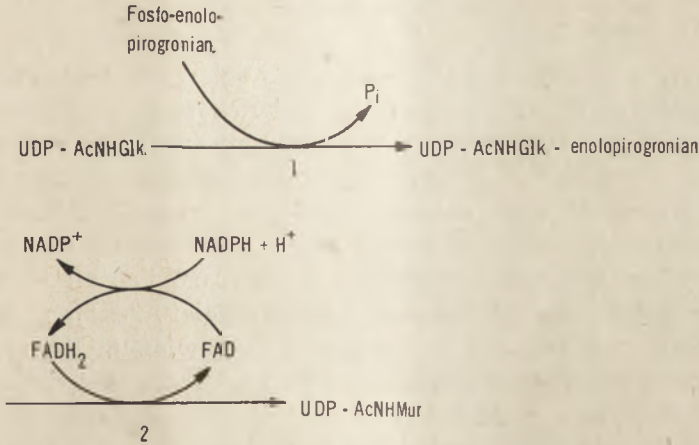
III. Sieciovanie łańcuchów peptydoglikanów

I. Biosynteza prekursorów peptydoglikanu

1. Biosynteza UDP-AcNHGłk i UDP-AcNHMur

UDP-AcNHGłk powstaje pod działaniem swoistej transferazy katalizującej reakcję UTP z N-acetyloglukozoamino-1-fosforanem z równoczesnym odszczepieniem pirofosforanu.

Proces biosyntezy UDP-AcNHMur jest bardziej złożony. Strominger (69) w 1958 roku wykazał, że w bezkomórkowych ekstraktach komórek *S. aureus* zachodzi enzymatyczna reakcja przeniesienia reszty enolopirogronianu z fosfoenolopirogronianu na UDP-AcNHGłk. Również Richmond i Perkins (54) stwierdzili, że fosfoenolopirogronian lub inny pokrewny trójwęglowy składnik jest prekursorem muraminianu. Mechanizm enzymatycznej syntezy reszty muraminianowej zaproponowali Gunetileke i Anvar (15) w 1966 roku. Obecnie wiadomo, że proces ten zachodzi według schematu 1.



Schemat 1. Biosynteza UDP-AcNHMur (16, 75)

Reakcję (1) katalizuje transferaza enolopirogronianowa (69). Gunetileke i Anvar (16) otrzymali ten enzym z *Enterobacter cloacae* NRC-492, częściowo go oczyścili i wstępnie scharakteryzowali. Transferaza enolopirogronianowa jest prawdopodobnie aktywowana przez grupy tiolowe, a optimum jej działania leży w granicach pH 6,7—7,4. W reakcji katalizowanej przez ten enzym zostaje zachowana w produkcie reakcji struktura enolowa pirogronianu. Pod tym względem reakcja ta przypomina syntezę 5-fosfo-3-enolo-piruwoiloszikimianu (35), bowiem we wszystkich innych reakcjach przeniesienia enolopirogronianu następuje równocześnie przekształcenie formy enolowej w ketonową. Według Gunetileke i Anvara (16) przeniesienie enolopirogronianu na resztę acetyloglukozoaminy przebiega poprzez trójskładnikowy kompleks, przy czym najprawdopodobniej najpierw następuje związanie enzymu z UDP-AcNHGlc, a dopiero potem z fosfoenolopirogronianem. Autor otrzymał w reakcji enzymatycznej czysty UDP-AcNHGlc-enolopirogronian, co potwierdził badając własności chemiczne produktu oraz jego widmo w IR i UV.

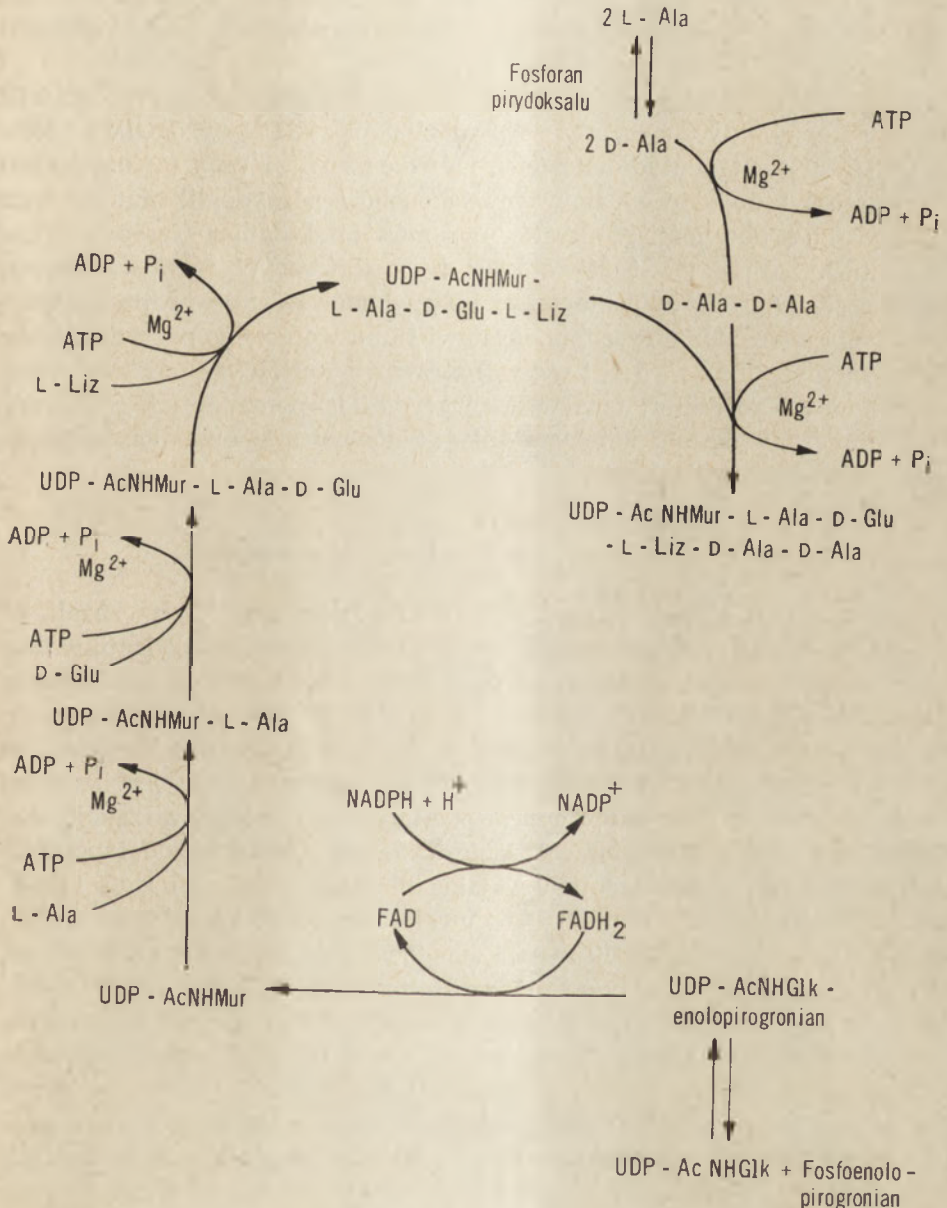
Reakcję (2) biosyntezy UDP-AcNHMur katalizuje reduktaza UDP-N-acetylenolopiruwoiloglukozoaminy wyosobniona i oczyszczona przez Taku i wsp. (75) w 1970 roku z komórek *Enterobacter cloacae* NRC-492. Optimum pH reduktazy wynosi 8,1—8,5, a aktywność uzależniona jest od obecności wolnych grup -SH. Inhibitorami enzymu są pCMB, N-etylo-maleilimid i jodoacetamid, natomiast ochronnie działa dwutiotreitol. Grupą prostetyczną reduktazy jest FAD, który jest redukowany przez zred. NADP. Zredukowany koenzym utlenia się powtórnie pod działaniem UDP-AcNHGlc-enolopirogronianu. Mechanizm tej reakcji jest więc podobny do mechanizmu odwrócenia reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę acylo-CoA, której grupą prostetyczną jest również FAD (9, 17, 63).

2. Tworzenie podjednostki peptydowej

Do grupy karboksylowej UDP-AcNHMur dołącza się podjednostka peptydowa o składzie różnym u różnych gatunków (34), np. w peptydoglikanie *S. aureus* jest ona zbudowana z L- i D-alaniny, L-lizyny i kwasu D-glutaminowego. Park (46) izolując UDP-AcNHMur-pentapeptyd z komórek *S. aureus* poddanych działaniu penicyliny zauważył, że komórki te gromadzą również pochodną nukleotydu urydynowego z niekompletnym pentapeptydem. Podobne wyniki uzyskali Strominger i Threnn (70, 73) poddając komórki *S. aureus* działaniu fioletu gencjany lub prowadząc hodowlę tych bakterii w środowisku pozbawionym lizyny. Na podstawie tych spostrzeżeń wysunięto przypuszczenie, że pentapeptyd syntetyzuje się stopniowo przez kolejne dołączanie aminokwasów. W doświadczeniach z aminokwasami znakowanymi węglem Ito i Strominger (26, 28) potwierdzili tę hipotezę. Wykazali oni, że w obecności swoistych enzymów z grupy syntetaz peptydowych następuje kolejne włączanie aminokwasów w tworzący się peptyd. Aktywność enzymów uczestniczących w tych reakcjach zależy od obecności ATP i jonów Mg^{2+} lub Mn^{2+} . Syntetazy te zawarte są w rozpuszczalnej frakcji komórkowej (13) i wykazują wysoką swoistość zarówno ze względu na włączany aminokwas jak i nukleotydowy akceptor. W katalizowanych przez nie reakcjach ATP ulega rozkładowi do ADP i P_i . Mechanizm reakcji jest więc podobny do przebiegu syntezy glutaminy (66) lub dwu wiązań peptydowych w glutationie (64, 65), jest różny natomiast od reakcji tworzenia wiązań peptydowych w białkach (6). W reakcjach katalizowanych przez te syntetazy nie stwierdzono również udziału RNA.

Najlepiej poznano biosyntezę podjednostki peptydowej peptydoglikanu ściany *S. aureus*. Działają tu kolejno: syntetaza UDP-N-acetylmuramian:L-alanina (ADP) — EC 6.3.2.8, syntetaza UDP-N-acetylmuramoilo-L-alanina:D-glutaminian (ADP) — EC 6.3.2.9, syntetaza UDP-N-acetylmuramoilo-L-alanylo-D-glutaminian:L-lizyna (ADP) — EC 6.3.2.7, dołączające L-alaninę, kwas D-glutaminowy i L-lizynę. Dwoma ostatnimi aminokwasami podjednostki są dwie cząsteczki D-alaniny. Ich wbudowywanie w łańcuch peptydowy katalizują trzy enzymy: racemaza alaniny — EC 5.1.1.1 (79), syntetaza D-alanina:D-alanina (ADP) — EC 6.3.2.4 (25, 27, 41, 42) i syntetaza UDP-N-acetylmuramoilo-L-alanylo-D-glutamyl-L-lizyna:D-alanylo-D-alanina (ADP) — EC 6.3.2.10 (8, 27, 44). Racemaza alaniny katalizuje zamianę L-alaniny w D-izomer, przy czym jej grupą prostetyczną jest fosforan pirydoksalu. Syntetaza D-Ala:D-Ala katalizuje w obecności ATP i jonów Mg^{2+} utworzenie dwupeptydu D-Ala-D-Ala z dwu cząsteczek D-Ala. Dwupeptyd ten w obecności syntetazy UDP-N-acetylmuramoilo-L-alanylo-D-glutamyl-L-lizyna:D-alanylo-D-alanina przyłącza się do UDP-AcNHMur-L-Ala-D- γ -Glu-L-Liz. Syntetaza D-Ala:D-Ala jest wysoce swoista dla N-końca, a mało swoista dla C-końca D-aminokwa-

sów, w przeciwieństwie do syntetazy UDP-N-acetylomuramoilo-L-alanylo-D-glutamyl-L-lizyna:D-alanylo-D-alanina, która jest mało swoista dla N-końca a wysoce swoista dla C-końca D-aminokwasów. Dzięki temu współdziałanie tych enzymów reguluje dołączanie D-alanylo-D-alaniny do tworzonej podjednostki peptydowej. Syntetazę D-Ala:D-Ala hamuje produkt reakcji, tzn. D-alanylo-D-alanina i ta reakcja jest głównym etapem



Schemat 2. Biosynteza nukleotydowego prekursora peptydoglikanu w komórkach *S. aureus* (16, 43, 75)

kontrolnym wbudowywania D-alaniny do prekursora peptydoglikanu. Badania Neuhausa i wsp. (43) wykazały, że syntetaza D-Ala:D-Ala ma więcej niż jedno miejsce wiązania substratu i wzajemne współdziałanie tych miejsc kontroluje tworzenie dwupeptydu. Biosyntezę prekursora peptydoglikanu ścian komórek *S. aureus* przedstawiono na schemacie 2.

II. Tworzenie liniowych łańcuchów polisacharydowych peptydoglikanu

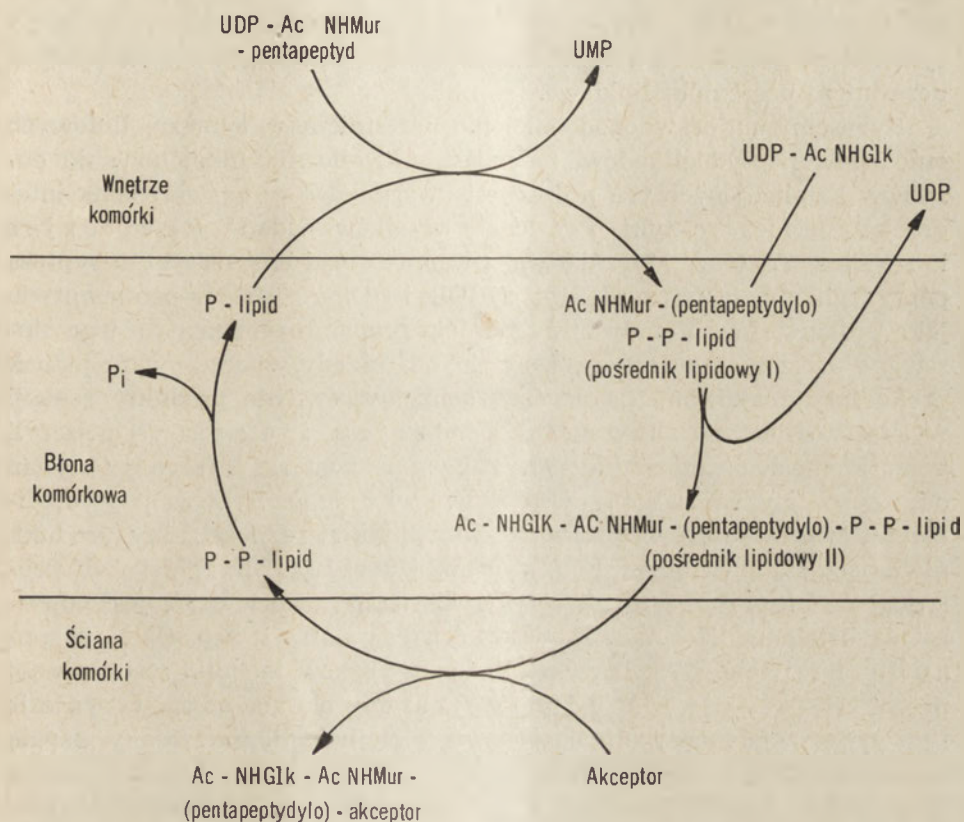
W 1964 roku Meadow i wsp. (40) po raz pierwszy przeprowadzili *in vitro* enzymatyczną syntezę peptydoglikanu z UDP-AcNHGłk i UDP-AcNHMur-pentapeptydu. Również Anderson i wsp. (3) użyli tych prekursorów do syntezy liniowych łańcuchów peptydoglikanu. Synteza zachodziła w obecności preparatów enzymów otrzymanych zarówno z komórek *S. aureus* jak i *Micrococcus lysodeikticus*. W tych warunkach AcNHGłk i AcNHMur-pentapeptyd były wbudowywane w peptydoglikan w stosunku stechiometrycznym. Po trawieniu utworzonego peptydoglikanu lizozymem Anderson i wsp. (3) otrzymali AcNHGłk-AcNHMur-pentapeptyd i jego dimer, tzw. tetrasacharydo-(bis)-pentapeptyd. Struktura tego dimeru wykazała naprzemiennie wbudowywanie obu monosacharydów w łańcuch polocukrowy.

1. Powiązanie prekursorów z błoną cytoplazmatyczną

Meadow i wsp. (40) oraz Anderson i wsp. (3) wykazali, że w przeciwieństwie do wszystkich znanych reakcji transglikozylacji, w których z prekursorów nukleotydowych odszczepia się UDP, wbudowywaniu w polimer AcNHMur-pentapeptydu z UDP-AcNHMur-pentapeptydu towarzyszy uwolnienie UMP. Struve i Neuhaus (74) wykazali, że mechanizm tworzenia liniowych łańcuchów peptydoglikanu jest bardziej złożony. Według nich w pierwszym etapie reakcji enzymy z frakcji błon komórkowych katalizują przeniesienie fosforanu AcNHMur-pentapeptydu z UDP-AcNHMur-pentapeptydu na jakiś bliżej nieokreślony nośnik i reakcji tej towarzyszy stechiometryczne uwalnianie UMP. W kolejnej reakcji AcNHGłk z UDP-AcNHGłk zostaje wbudowana w polimer z uwolnieniem UDP i P_i. Wydzielona w tym etapie reszta fosforanu nieorganicznego uwalniałaby się prawdopodobnie z połączenia reszty cukrowo-peptydowej z hipotetycznym nośnikiem. Anderson i wsp. (1) potwierdzili ten dwuetapowy mechanizm reakcji i stwierdzili również uczestnictwo jakiegoś nośnika w biosyntezie peptydoglikanu. Analizując chromatograficznie produkty syntezy prowadzonej z UDP-AcNHMur-¹⁴C-pentapeptydu znaleźli obok radioaktywnego peptydoglikanu również drobne ilości radioaktywnego związku, który powstał z udziałem zastosowanego prekursora, ale zawierał tylko jedną z dwu reszt fosforanowych urydynowego prekursora.

Na podstawie rozpuszczalności w wielu organicznych rozpuszczalnikach można było przypuszczać, że w skład tego związku wchodzi połączenie o charakterze lipidu.

Wyniki omówionych prac wykazały, że synteza liniowych łańcuchów polisacharydowych peptydoglikanu wymaga uczestnictwa nośnika lipidowego. Anderson i wsp. (2) określili rolę tego nośnika według schematu 3.



Schemat 3. Biosynteza liniowego łańcucha polisacharydowego peptydoglikanu w komórkach *S. aureus* bez uwzględnienia syntezy mostków sieciujących (2)

Nośnik lipidowy związany z błoną cytoplazmatyczną jest inicjującym akceptorem, na który przeniesiony zostaje fosforan AcNHMur-pentapeptydydu z UDP-AcNHMur-pentapeptydydu z uwolnieniem UMP. W wyniku tej reakcji powstaje pośrednik lipidowy I czyli AcNHMur-pentapeptydylo-P-P-lipid. Na ten produkt przeniesiona zostaje AcNHGik z jej urydynowego prekursora z równoczesnym wydzieleniem UDP i utworzeniem pośrednika lipidowego II czyli dwusacharydo-pentapeptydylo-P-P-lipidu. Część dwusacharydowopentapeptydowa pośrednika lipidowego II polimeryzuje w liniowy peptydoglikan, przy czym

podjednostki dołączają się kolejno do akceptora, którym jest najprawdopodobniej niekompletny peptydoglikan. W tej reakcji uwalnia się ufosforylowany fosfolipid, z którego z kolei odszczepia się P_i , natomiast nośnik lipidowy może na nowo wejść w cykl reakcji. Anderson i wsp. (2) uzyskali w formie związanej ze swoistym enzymem zarówno pośrednik lipidowy I jak i pośrednik lipidowy II. Potwierdza to udział tych związków jako pośredników w biosyntezie liniowych łańcuchów peptydoglikanu. Dodatkowym dowodem jest hamowanie syntezy ściany komórkowej przez niektóre antybiotyki, które równocześnie hamują te etapy cyklicznego mechanizmu tworzenia liniowego peptydoglikanu, w których uczestniczą pośredniki lipidowe.

Rybosomy najprawdopodobniej nie uczestniczą w syntezie liniowych łańcuchów peptydoglikanów, natomiast prawidłowe funkcjonowanie enzymów katalizujących ten proces jest uwarunkowane ich określoną integracją. Świadczy o tym porównanie wyników badań Chatterjee i Parka (7) oraz Meadowa i wsp. (40) nad enzymatyczną syntezą peptydoglikanu *in vitro* z UDP-AcNHGlc i UDP-AcNHMur-pentapeptydu jako prekursorów. Metody otrzymywania preparatu enzymatycznego stosowane przez tych autorów różniły się, oba układy wbudowywały jednak prekursorzy znakowane na węglach aminokwasów, ale produkty reakcji wykazały odmienne własności. Chatterjee i Park (7) niszczyli komórki mechanicznie szkłem. Niezniszczone komórki i fragmenty ścian oraz rybosomy usuwali przez różnicowe wirowanie. Syntezę peptydoglikanu przeprowadzali w roztworze. Otrzymali nierozpuszczalny produkt, nie dający się zhydrolizować lizozymem. Autorzy sądzili, że uzyskali peptydoglikan, który ze względu na wysoki stopień usieciowania jest odporny na działanie lizozymu. Dopiero Anderson i wsp. (1) i Matsuhashi i wsp. (37, 38) wykazali, że przy użyciu techniki zastosowanej przez Chatterjee i Parka (7) enzymy biorące udział w syntezie liniowych łańcuchów polisacharydowych peptydoglikanu traciły pewną strukturalną całość, w wyniku czego katalizowały tylko jeden z etapów syntezy — tworzenie pośrednika lipidowego. Integralność układu enzymatycznego była natomiast zachowana w doświadczeniach Meadowa i wsp. (40), którzy niszczyli komórki ultradźwiękami, a mieszaninę zawierającą prekursorzy oraz preparat enzymów inkubowali na bibule filtracyjnej. W tych warunkach reakcja przebiegała do końca i powstawał peptydoglikan rozkładający się pod wpływem lizozymu.

2. Modyfikacja pośredników lipidowych

W komórkach bakterii gramdodatnich, u których w peptydoglikanach istnieją mostki sieciujące, pośredniki lipidowe ulegają modyfikacji, polegającej na dołączaniu aminokwasów mostka sieciującego do podjednostki peptydowej. Synteza przebiega zależnie od miejsca powiązania mostka sieciującego z podjednostką peptydową. Jeżeli mostek sieciujący wiąże ϵ -ami-

nową grupę lizyny peptydu, wówczas biosynteza przebiega zawsze z udziałem swoistych tRNA, ale może rozpoczynać się na poziomie pośrednika lipidowego II lub na poziomie prekursora nukleotydowego. Jeżeli natomiast mostek sieciujący wiąże grupę α -karboksylową kwasu glutaminowego peptydu, wówczas synteza przebiega bez współdziałania tRNA. Etapem poprzedzającym włączanie aminokwasów do pośrednika lipidowego, jak to zostało udowodnione dla *S. aureus*, jest amidacja α -karboksylowej grupy kwasu glutaminowego podjednostki peptydowej pośrednika. Proces ten zachodzi z udziałem jonów NH_4^+ w reakcji enzymatycznej zależnej od ATP (63).

W komórkach *S. aureus*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Micrococcus roseus* i *S. epidermidis* synteza mostków sieciujących przebiega podobnie. Aminokwasy budujące mostek są aktywowane do odpowiednich aminoacylo-tRNA, a następnie w obecności swoistych enzymów wbudowywane kolejno począwszy od ϵ -aminowej grupy lizyny pośrednika lipidowego II. U *S. aureus* reszty glicyny w liczbie pięciu, które budują mostek sieciujący peptydoglikanu tej bakterii po aktywacji do Gli-tRNA (37, 38) dołączają się kolejno do pośrednika lipidowego II, co stwierdzili K a m i r y o i M a t s u h a s h i (32) oraz T h o r n d i k e i P a r k (76). Z komórek *S. aureus* wyosobniono (10) trzy różne frakcje Gli-tRNA, z których wszystkie dostarczają glicyny do peptydoglikanu, a tylko dwie uczestniczą w syntezie białka. Natomiast jeden Gli-tRNA nie wiąże się z rybosomami *E. coli* w obecności żadnych znanych kodów dla glicyny. N i y o m p o r n i wsp. (45) rozważali możliwość istnienia w komórkach *S. aureus* więcej niż jednej syntetazy glicylo-tRNA, jednak ich badania wykazały obecność jednego enzymu czynnego zarówno w biosyntezie peptydoglikanu jak i białek nawet innych bakterii i drożdży.

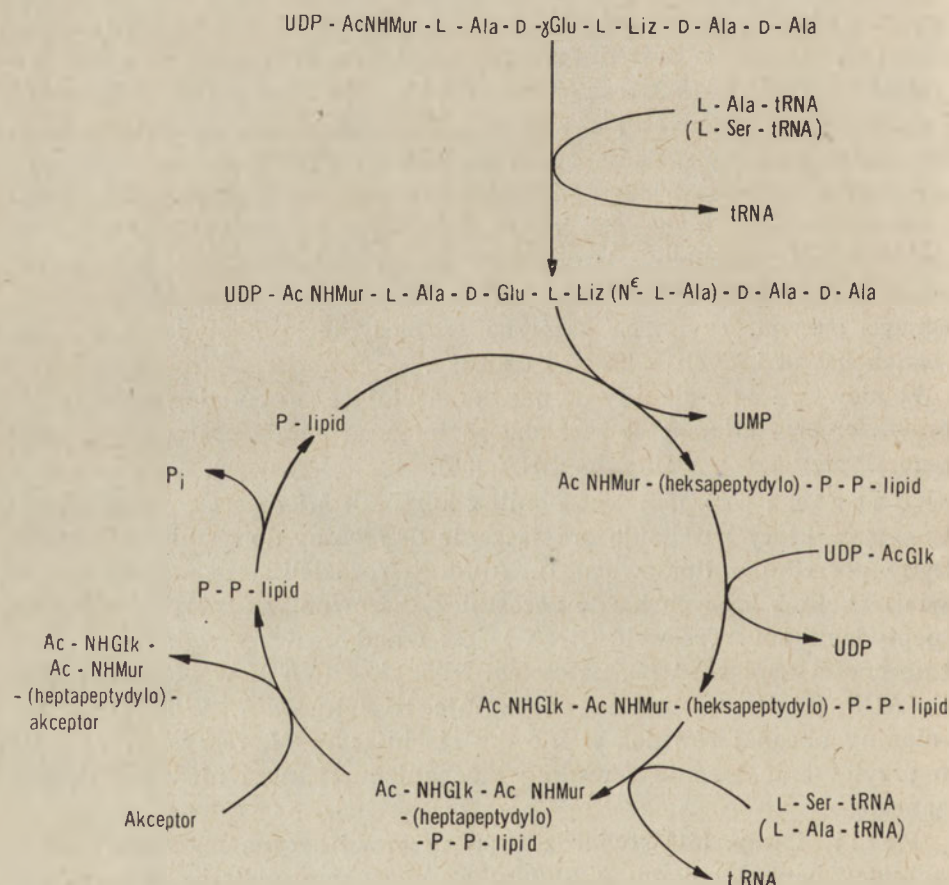
Wbudowywanie L-alaniny do mostka sieciującego peptydoglikanu u *Arthrobacter crystallopoietes* zachodzi również na etapie pośrednika lipidowego II przy udziale alanylo-tRNA (55).

R o b e r t s i wsp. (56) wyosobnili z komórek *Micrococcus roseus* swoisty enzym, który katalizuje przyłączanie L-treoniny do ϵ -aminowej grupy lizyny pośrednika lipidowego II. Autorzy rozdzielili treonylo-tRNA na dwie frakcje, z których każda uczestniczy zarówno w syntezie białka jak i peptydoglikanu. Treonylo-tRNA I jest wbudowywany w białka *E. coli* w obecności tripletu ACG, natomiast treonylo-tRNA II w obecności ACC lub ACU. Żaden z nich nie odczytuje tripletu ACA. Wbudowywanie L-alaniny obecnej również w mostku sieciującym *M. roseus* odbywa się po przyłączeniu treoniny, według mechanizmu jeszcze niedokładnie poznanego.

P e t i t i wsp. (51) stwierdzili, że glicyna i seryna budujące mostek sieciujący peptydoglikanu u *Staphylococcus epidermidis* są aktywowane do Gli-tRNA i Ser-tRNA i następnie dołączane do pośrednika lipidowego w obecności swoistych enzymów. Maksymalne wbudowywanie seryny za-

chodzi po uprzednim przyłączeniu glicyny. Autorzy wyosobnili z komórek *S. epidermidis* trzy rodzaje Gli-tRNA i cztery rodzaje Ser-tRNA (I, IIA, IIB, IIC). Wszystkie cztery serylo-tRNA były czynne w syntezie peptydoglikanu, a tylko trzy w syntezie białek. Ser-tRNA I jest swoisty wobec tripletu AGU i AGC, Ser-tRNA IIA nie jest włączany w obecności żadnego tripletu, natomiast podobne do siebie Ser-tRNA IIB i IIC odczytują triplety UCA, UCG i w pewnym stopniu UCU. Żaden Ser-tRNA nie reaguje z UCC, AGU i AGC.

Synteza mostka sieciującego w komórkach *Lactobacillus viridescens* przebiega na nieco innej drodze (52), chociaż aminokwasy łączą się również z ϵ -aminową grupą lizyny. Pierwszy aminokwas mostka sieciującego zostaje bowiem dołączony do prekursora nukleotydowego, a nie do pośrednika lipidowego. Do prekursora nukleotydowego dołącza się seryna lub alanina, przy czym charakterystyczny jest brak swoistości tRNA, który może aktywować oba te aminokwasy. Drugi aminokwas łączy się, jak



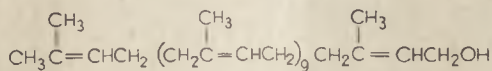
Schemat 4. Biosynteza liniowego łańcucha peptydoglikanu z uwzględnieniem syntezy mostków sieciujących w komórkach *L. viridescens* (52)

omówiono poprzednio, dopiero na poziomie pośrednika lipidowego II. Plapp i Strominger (53) częściowo oczyścili z komórek *L. viridescens* transferazę przenoszącą L-alaninę z Ala-tRNA na UDP-AcNHMur-pentapeptyd. Enzym o ciężarze cząsteczkowym około 40 000 może również przenosić serynę, cysteinę i prawdopodobnie glicynę. Mechanizm syntezy peptydoglikanu ścian komórek *L. viridescens* przedstawia schemat 4.

Mostek sieciujący peptydoglikanu *Micrococcus lysodeikticus* powstaje na zupełnie innej drodze (33). Pojedyncza reszta glicyny zostaje podstawiona do α -karboksylowej grupy kwasu glutaminowego. Akceptorem jej jest pośrednik lipidowy, ale glicyna nie jest aktywowana do Gli-tRNA. Przymuszczaalnie reakcja wymaga obecności ATP, przy czym uwolniony zostaje ADP i P_i , podobnie jak w reakcji amidacji α -karboksylowej grupy kwasu glutaminowego u *S. aureus* (63).

3. Udział nośnika lipidowego w transporcie podjednostek przez błonę komórkową

Badania przeprowadzone w ostatnich latach wyjaśniły strukturę nośnika lipidowego. Higashi i wsp. (23) w 1967 wyosobnili z komórek *M. lysodeikticus* i oczyścili pośrednik lipidowy II. Po hydrolizie tego pośrednika otrzymali jego składnik lipidowy. Spektrum masowe wykazało, że jest to alkohol C_{55} -izoprenoidowy (wzór I).



I

W tej samej pracowni w 1970 roku (24) wyizolowano i oczyszczono z komórek *S. aureus* pośrednik lipidowy II. I w tym przypadku część lipidową stanowi alkohol C_{55} -izoprenoidowy, przy czym widmo rezonansu jądrowego wykazało, że alkohol ten ma dwa podwójne wiązania w konfiguracji *trans*. Higashi i wsp. (21) otrzymali z frakcji błon komórkowych *S. aureus* zależną od ATP fosfokinazę, która katalizuje przekształcenie alkoholu C_{55} -izoprenoidowego w jego fosforan, będący nośnikiem lipidowym w syntezie peptydoglikanów. Dalsze badania (22) doprowadziły do wydzielenia z fosfokinazy części białkowej oraz frakcji fosfolipidowej złożonej z fosfatydyloglicerolu i kardiolipiny. Każdy z tych fosfolipidów oddzielnie jest zdolny utrzymać aktywną formę enzymu.

Już w roku 1967 Anderson i wsp. (2) próbowali wytłumaczyć funkcję nośnika lipidowego. Wyszuli oni hipotezę, że pełni on rolę w transporcie AcNHGlik-AcNHMur-peptydu przez błonę komórkową. Synteza tych podjednostek zachodzi na wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. Tam bowiem dostępne są wewnątrzkomórkowe substraty reakcji, a błona cytoplazmatyczna jest nieprzepuszczalna dla prekursorów nukleotydowych. Gotowe podjednostki muszą więc być przenoszone z wewnętrznej na zewnętrzną stronę błony, gdzie zachodzi polimeryzacja

i nośnik lipidowy spełnia w tym procesie podstawową funkcję (porównaj schemat 3). Niedostateczna znajomość budowy błony komórkowej utrudnia dokładne poznanie mechanizmu przenoszenia podjednostek z udziałem nośnika lipidowego. Dodatkową przeszkodą są trudności w oddzieleniu od błony aktywnych enzymów. Badania w tym kierunku prowadzili Hejda nek i wsp. (18, 19, 20), którzy częściowo oczyścili i scharakteryzowali translokazę fosfo-AcNHMur-pentapeptydu katalizującą reakcję przeniesienia AcNHMur-pentapeptydu z jego UDP-pochodnej na nośnik lipidowy.

III. Sieciovanie liniowych łańcuchów peptydoglikanu

W reakcji kończącej syntezę peptydoglikanu liniowe łańcuchy zostają połączone wiązaniami krzyżowymi. Tworzeniu wiązania krzyżowego w reakcji transpeptydacji (4, 5, 30, 50, 77) towarzyszy usunięcie końcowej reszty D-alaniny w obecności karboksypeptydazy (29, 31). Dokładne omówienie tego etapu hamowanego przez penicylinę przedstawili Tynecka (78) i Ruczaj (58).

IV. Uwagi końcowe

Wykorzystanie wewnątrzkomórkowych prekursorów do budowy struktur zewnętrznej powierzchni komórki nie jest charakterystyczne wyłącznie dla biosyntezy peptydoglikanów ścian bakterii. W podobny sposób również i w komórkach eukariotów zachodzi formowanie innych nierozpuszczalnych powierzchniowych polimerów ochronnych jak np. celulozy, ksylanów, chityny itp. Wspólną cechą tych wszystkich procesów jest czynny udział błony komórkowej. Zapewnia ona utrzymanie określonej integralności białek enzymatycznych czynnych w cyklicznym mechanizmie ukierunkowanego tworzenia polimeru. Składniki lipidowe błony są konieczne również dla aktywności pewnych enzymów (22) oraz czynne są jako nośniki transportujące prekursory do miejsc wbudowywania w polimer.

Na podkreślenie zasługuje, że związany z błoną alkohol C₅₅-izoprenoidowy działający jako nośnik prekursorów dla biosyntezy peptydoglikanów nie jest wyjątkiem. Identyfikacja związku lub strukturalnie bardzo do niego podobny uczestniczy również w biosyntezie bakteryjnych lipopolisacharydów (80), bakteryjnych mannanów (62), a najprawdopodobniej także bakteryjnej celulozy, celulozy komórek roślin wyższych, chityny grzybów, a nawet pewnych zwierzęcych glikoproteidów zawierających mannozę (12). Jest bardzo prawdopodobne, że związki izoprenoidowe zdolne do izomeryzacji *cis/trans* spełniają ogólniejszą funkcję przy czynnym transporcie poprzez błony nie tylko komórkowe, lecz również i wewnątrzkomórkowe.

Interesujące jest również wykorzystanie aminoacylo-tRNA w biosyntezie mostków sieciujących w peptydoglikanach. Z dotychczasowych danych wynika, że antykodon ma bardzo małe znaczenie dla włączania aminokwasów w peptydoglikan. Nasuwa się wobec tego przypuszczenie, że i w tym przypadku błona komórkowa stwarza odpowiednią powierzchnię rozpoznającą właściwy tRNA i w ten sposób zapewnia tworzenie mostków sieciujących o strukturze charakterystycznej dla określonych bakterii.

LITERATURA

1. Anderson J. S., Matsubashi M., Haskin M. A., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 881 (1965).
2. Anderson J. S., Matsubashi M., Haskin M. A., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **242**, 3180 (1967).
3. Anderson J. S., Meadow P. M., Haskin M. A., Strominger J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 487 (1966).
4. Araki Y., Shimada A., Ito E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 518 (1966).
5. Araki Y., Shirai R., Shimada A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 466 (1966).
6. Berg P., *Ann. Rev. Biochem.* **30**, 293 (1961).
7. Chatterjee A. N., Park J. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 9 (1964).
8. Comb D. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 1601 (1962).
9. Crane F. L., Mii S., Hauge J. G., Green D. E., Beinert H., *J. Biol. Chem.* **218**, 701 (1956).
10. Dahl J. L., Bumsted R. M., Soll D., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 779 (1968).
11. Dietrich C. P., Colucci A. V., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **242**, 3218 (1967).
12. Ellar D. J., w *Organization and Control in Prokaryotic and Eucaryotic Cells*, red. H. i P. Charles, B. C. J. Knight, Cambridge University Press, Cambridge 1970.
13. Ghuyssen J. M., *Bacteriol. Rev.* **32**, 425 (1968).
14. Ghuyssen J. M., Strominger J. L., Tipper D. J., w *Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florkin, F. M. Stotz, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1968, tom 26A, str. 53.
15. Gunetileke K. G., Anvar A. R., *J. Biol. Chem.* **241**, 5740 (1966).
16. Gunetileke K. G., Anvar A. R., *J. Biol. Chem.* **243**, 5770 (1968).
17. Hauge J. G., Crane F. L., Beinert H., *J. Biol. Chem.* **219**, 727 (1956).
18. Heydanek M. G., Linzer R., Pless D. D., Neuhaus F. C., *Biochemistry* **9**, 3618 (1970).
19. Heydanek M. G., Neuhaus F. C., *Biochemistry* **8**, 1474 (1969).
20. Heydanek M. G., Struve W. G., Neuhaus F. C., *Biochemistry* **8**, 1214 (1969).
21. Higashi Y., Siewert G., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **245**, 3683 (1970).
22. Higashi Y., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **245**, 3691 (1970).
23. Higashi Y., Strominger J. L., Sweeley C. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 767 (1967).
24. Higashi Y., Strominger J. L., Sweeley C. C., *J. Biol. Chem.* **245**, 3697 (1970).

25. Ito E., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **235**, PC5 (1960).
26. Ito S., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2689 (1962).
27. Ito E., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 2696 (1962).
28. Ito E., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **239**, 210 (1964).
29. Izaki K., Matsushashi M., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 656 (1966).
30. Izaki K., Matsushashi M., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3180 (1968).
31. Izaki K., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3193 (1968).
32. Kamiryo T., Matsushashi M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 215 (1969).
33. Katz W., Matsushashi M., Dietrich C. P., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **242**, 3207 (1967).
34. Klein A., Rais A., w druku.
35. Lewin J. G., Sprinson D. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 1142 (1964).
36. Mahler H. R., *J. Biol. Chem.* **206**, 13 (1954).
37. Matsushashi M., Dietrich C. P., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 587 (1965).
38. Matsushashi M., Dietrich C. P., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **242**, 3191 (1967).
39. Matz L., Strominger J. L., *Bact. Proc.*, **68**, 64 (1968).
40. Meadow P. M., Anderson J. S., Strominger J. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 382 (1964).
41. Neuhaus F. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 401 (1960).
42. Neuhaus F. C., *J. Biol. Chem.* **237**, 718, 3128 (1962).
43. Neuhaus F. C., Carpenter C. V., Miller J. L., Lee M. N., Gragg M., Stickgold R. A., *Biochemistry* **8**, 5119 (1969).
44. Neuhaus F. C., Struve W. G., *Biochemistry* **4**, 120 (1965).
45. Niyomporn B., Dahl J. L., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 773 (1968).
46. Park J. T., *J. Biol. Chem.* **194**, 877, 885, 897 (1952).
47. Park J. T., Johnson M. J., *J. Biol. Chem.* **179**, 585 (1949).
48. Park J. T., Strominger J. L., *Science* **125**, 99 (1957).
49. Perkins H. R., Rogers H. J., *Biochem. J.* **72**, 647 (1959).
50. Petit J.-F., Munoz E., Ghuysen J. M., *Biochemistry* **5**, 2764 (1966).
51. Petit J.-F., Strominger J. L., Soll D., *J. Biol. Chem.* **243**, 757 (1968).
52. Plapp R., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **245**, 3667 (1970).
53. Plapp R., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **245**, 3674 (1970).
54. Richmond M. H., Perkins H. R., *Biochem. J.* **85**, 580 (1962).
55. Roberts W. S. L., Petit J.-F., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 768 (1968).
56. Roberts W. S. L., Strominger J. L., Soll D., *J. Biol. Chem.* **243**, 749 (1968).
57. Rogers H., Perkins H. R., *Cell Walls and Membranes*, red. C. Long i F. N. Spon, Ltd., Londyn 1968.
58. Ruczaj Z., *Post. Biochem.* **17**, 305 (1971).
59. Salton M. R. J., *The Bacterial Cell Walls*, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1964.
60. Salton M. R. J., Horne R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **7**, 19 (1951).
61. Salton M. R. J., Horne R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **7**, 177 (1951).
62. Scher M., Lennarz W. J., Sweeley C. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 1313 (1968).

63. Siewert G., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 783 (1968).
64. Snoke J. E., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **199**, 407 (1952).
65. Snoke J. E., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **213**, 825 (1955).
66. Speck J. F., *J. Biol. Chem.* **179**, 1405 (1949).
67. Strange R. E., Kent L. H., *Biochem. J.* **71**, 333 (1959).
68. Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **224**, 509 (1957).
69. Strominger J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 645 (1958).
70. Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 1520 (1959).
71. Strominger J. L., Park J. T., Thompson R. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 3263 (1969).
72. Strominger J. L., Threnn R. H., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 280 (1959).
73. Strominger J. L., Threnn R. H., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 83 (1959).
74. Struve W. G., Neuhaus F. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 6 (1965).
75. Taku A., Gunetileke K. G., Anwar R. A., *J. Biol. Chem.* **245**, 5012 (1970).
76. Thorndike J., Park J. T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **35**, 642 (1969).
77. Tipper D. J., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 3169 (1968).
78. Tynecka Z., *Post. Biochem.* **16**, 153 (1970).
79. Wood W. A., Gunsalus J. C., *J. Biol. Chem.* **190**, 403 (1951).
80. Wright A., Dankert M., Fennesey P., Robbins P. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1798 (1967).

GRAŻYNA TUROWSKA *

Biosynteza steroli roślinnych

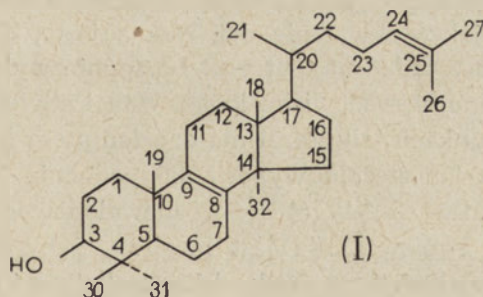
Plant Sterols Biosynthesis

Biosynthesis of plant sterols starting from squalen cyclization is reviewed.

Pierwsze prace zajmujące się biosyntezą steroli prowadzone były na organizmach zwierzęcych. Podstawowy schemat biosyntezy typowego sterolu zwierzęcego, cholesterolu, ustalono już kilkanaście lat temu. Przez szereg następnych lat uważano, że początkowe etapy biosyntezy steroli w organizmach roślinnych do wytworzenia rdzenia steranowego zachodzą w identyczny sposób jak podczas biosyntezy steroli zwierzęcych (21). Doświadczenia ostatnich lat pozwoliły ustalić, że biosynteza steroli u roślin i zwierząt zachodzi jednakowo tylko do momentu powstania utlenionej pochodnej skwalenu: 2—3 oksydoskwalenu, który u zwierząt cyklizuje następnie z wytworzeniem lanosterolu, natomiast u roślin pierwszym produktem jego cyklizacji jest cykloartenol.

I. Rola cykloartenolu

Prowadzone od wielu lat badania wykazały, że lanosterol (wzór I) występuje w świecie roślinnym jedynie w soku mlecznym roślin rodziny *Euforbiaceae* (46) i w grzybie *Physarum polycephalum* (41), natomiast trójterpenem powszechnie spotykanym jest cykloartenol (12, 13, 23, 25, 26).



* Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

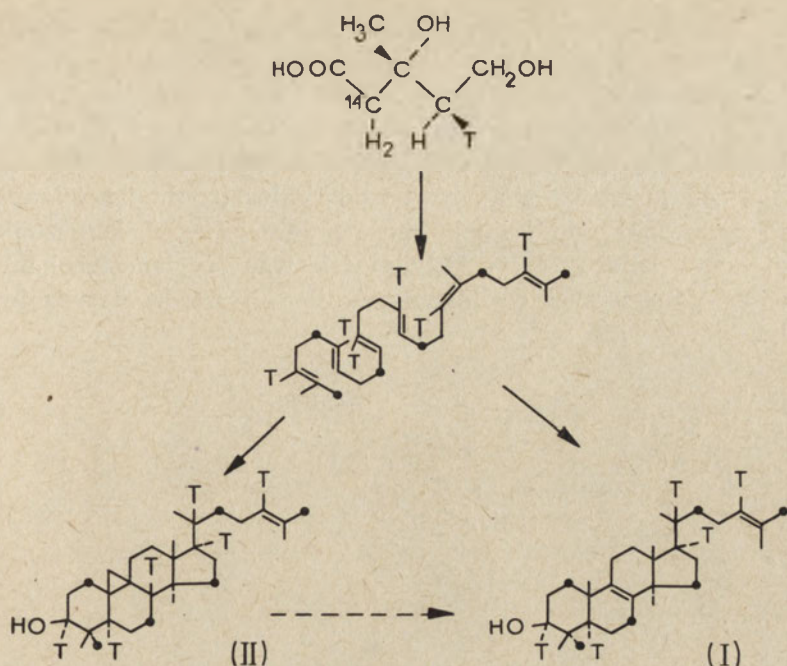
Budowa cykloartenolu (rysunek 1, wzór II) jest bardzo zbliżona do budowy lanosterolu (I). Jediną różnicą jest występowanie w cykloartenolu pierścienia cyklopropanowego w pozycji 9-10 zamiast wiązania podwójnego 8-9 w lanosterolu.

Nie wykrywanie lanosterolu w roślinach nie wykluczało jednak możliwości, że występuje on w nich w śladowych ilościach, jako metabolit pośredni. W celu sprawdzenia tej hipotezy przeprowadzono doświadczenia ze znakowanym ^{14}C bezpośrednim prekursorem lanosterolu — oksydoskwalenem.

Rees i wsp. (51) stwierdzili, że związek ten, dodawany w warunkach beztlenowych do frakcji otrzymanej po wirowaniu przy 10 000 g homogenatu liści fasoli, przekształca się w cykloartenol z wydajnością 2,8%, natomiast znakowany lanosterol nie powstaje nawet w ilościach śladowych. Również Eppenberger i wsp. (20) stwierdzili, że reakcja oksydoskwalen-cykloartenol zachodzi w warunkach beztlenowych w kulturach tkankowych tytoniu, a Heinz i Benveniste (32) wykazali, że najwyższą aktywność enzymatyczną wykrywa się we frakcji mikrosomalnej, otrzymanej z tych kultur. Reakcja jest niezależna od ATP, zredukowanego NAD i jonów Mg^{2+} . W tych warunkach nie wykryto także śladów znakowanego lanosterolu (I) ani parkeolu (III) — trzeciego z możliwych produktów cyklizacji skwalenu (schemat 2). Również frakcja mikrosomalna z glonów *Ochromonas malhamensis* wykazuje aktywność enzymatyczną cyklazy oksydoskwalenu (72% aktywności w mikrosomach, 28% w supernatancie). Po potraktowaniu dezoksychohanem sodu aktywność przechodzi do supernatantu, co świadczy o związaniu enzymu z błonami mikrosomalnymi (52).

Okazało się, że również znakowany octan i mewalonian włączają się *in vivo* i *in vitro* do cykloartenolu, a nie lanosterolu (12, 13, 14, 26).

Ostateczny dowód, że cykloartenol jest pierwszym po oksydoskwalenie metabolitem pośrednim na drodze biosyntezy steroli u roślin, a nie powstaje wtórnie wskutek izomeryzacji lanosterolu, uzyskali Rees i wsp. (49). Z liści ziemniaka, którym podawano kwas $2\text{-}^{14}\text{C}$, (4R)-4- ^3H -mewalonowy, wyodrębnili oni cykloartenol i oznaczyli w nim radioaktywność pochodzącą z włączonego trytu i węgla. Stosunek radioaktywności ^3H : ^{14}C wynosił tak samo jak w skwalenie, 6:6. Wskazuje to, że w czasie cyklizacji nie jest usuwany żaden atom trytu. Następnie wyizolowany cykloartenol izomeryzowano w środowisku kwasowym i stwierdzono, że wytworzony w tych warunkach lanosterol ma o jeden atom trytu mniej. Stosunek ^3H : ^{14}C w tym lanosterolu wynosił 5:6 podobnie jak w lanosterolu, syntetyzowanym z kwasu $2\text{-}^{14}\text{C}$, (4R)-4- ^3H mewalonowego w tkankach ssaków (schemat 1). Ponieważ nie jest możliwe, żeby szósty atom trytu w cykloartenolu pochodził ze środowiska reakcji, więc wyniki te były jednoznacznym dowodem, że cykloartenol w liściach ziemniaka nie powstaje w wyniku izomeryzacji lanosterolu (49).



Schemat 1. Włączanie znakowanego kwasu 2-¹⁴C,(4R)-4³H-mewalonowego do skwalenu, cykloartenolu (II) i lanosterolu (I)

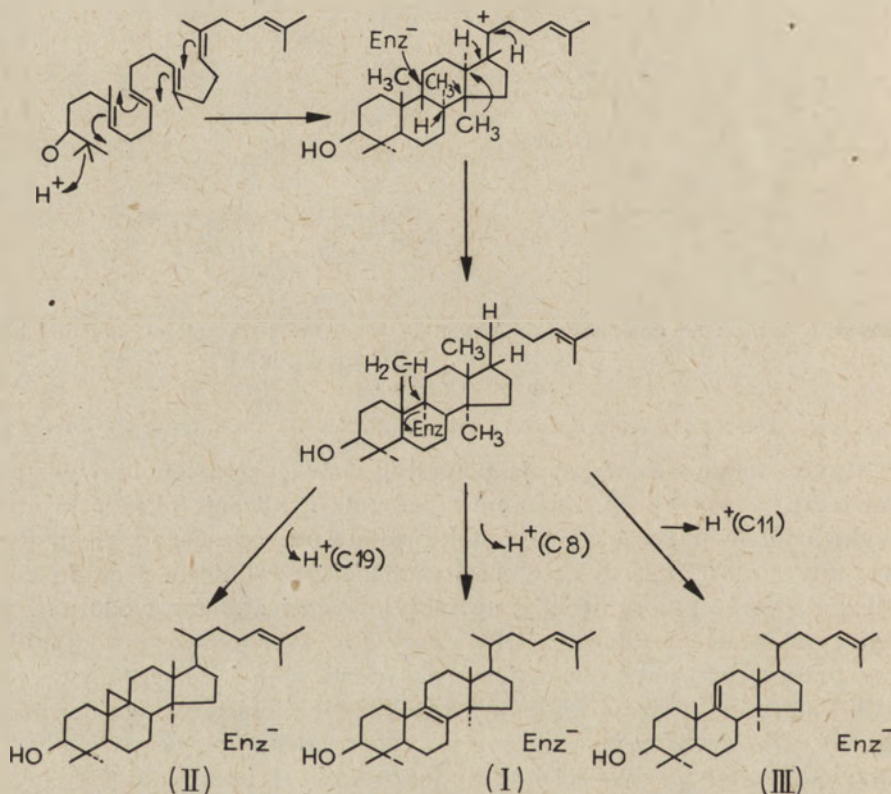
● — ¹⁴C; T = ³H

Otrzymane wyniki wskazują ponadto, że w cykloartenolu występuje atom trytu w pozycji 8 β . Zdaniem Goodwina cyklizację oksydoskwalenu do cykloartenolu zapoczątkowuje atak protonu pochodzącego z grupy kwasowej enzymu. W dalszej kolejności zachodzi przesunięcie protonu z pozycji 9 w 8 oraz przesunięcia grup metylowych i atomów wodoru w powstającym szkielecie sterolu. Utworzony jon karbonyowy jest stabilizowany przez grupę aktywną cyklazy oksydoskwalenu, dołączoną w pozycji 19. Usunięcie enzymu umożliwia zamknięcie pierścienia cyklopropanowego (24, 49). Mechanizm cyklizacji oksydoskwalenu do cykloartenolu (II), z uwzględnieniem możliwości syntezy lanosterolu (I) i parkeolu (III), przedstawiono na schemacie 2.

He w l i n s i wsp. (33) wykazali, że egzogeny cykloartenol jest przekształcany w sterole w kulturach tkankowych tytoniu. Reakcja zachodzi z wydajnością 1%. Po podaniu cykloartenolu znakowanego ¹⁴C w pozycji 25, radioaktywność w wytworzonym stigmasterolu (rysunek 2, wzór XIII) wykrywa się także w pozycji 25, co wskazuje na jego bezpośrednią syntezę z cykloartenolu. Również H a l l i wsp. (31) u glonu *Ochromonas malhamensis* wykazali *in vivo* przekształcanie cykloartenolu znakowanego na węglu drugim w 2-¹⁴C-poriferasterol (rysunek 2, wzór XVIII) z wydajnością 13%.

Przedstawione powyżej dane wykazują, że naturalnym produktem cyklizacji skwalenu u roślin jest cykloartenol a nie lanosterol.

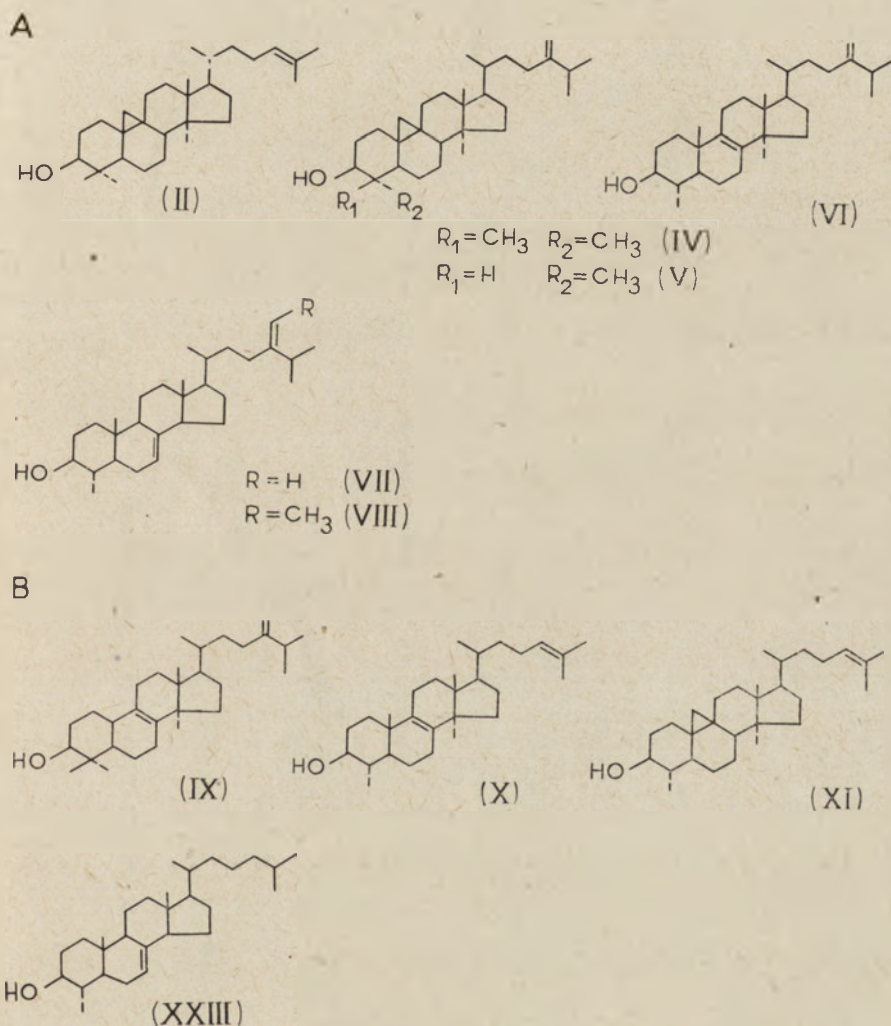
Pozostaje jednak problem syntezy lanosterolu w soku mlecznym *Euforbiaceae* i grzybie *Physarum polycephalum*, Ponsinet i Ourisson (46) wykazali, że u *Euphorbia helioscopia* radioaktywność podanego znakowanego octanu włącza się zarówno do cykloartenolu jak i lanosterolu. Ponadto stwierdzili oni, że lateks może przekształcać dodany znakowany cykloartenol w lanosterol (47). Wydaje się więc, że lanosterol może powstawać z octanu w tych roślinach wtórnie — przez izomeryzację cykloartenolu.



Schemat 2. Mechanizm cyklizacji oksydoskwalenu do cykloartenolu (II). Na schemacie przedstawiono także możliwy mechanizm powstawania lanosterolu (I) i parkeolu (III)
Enz = enzym

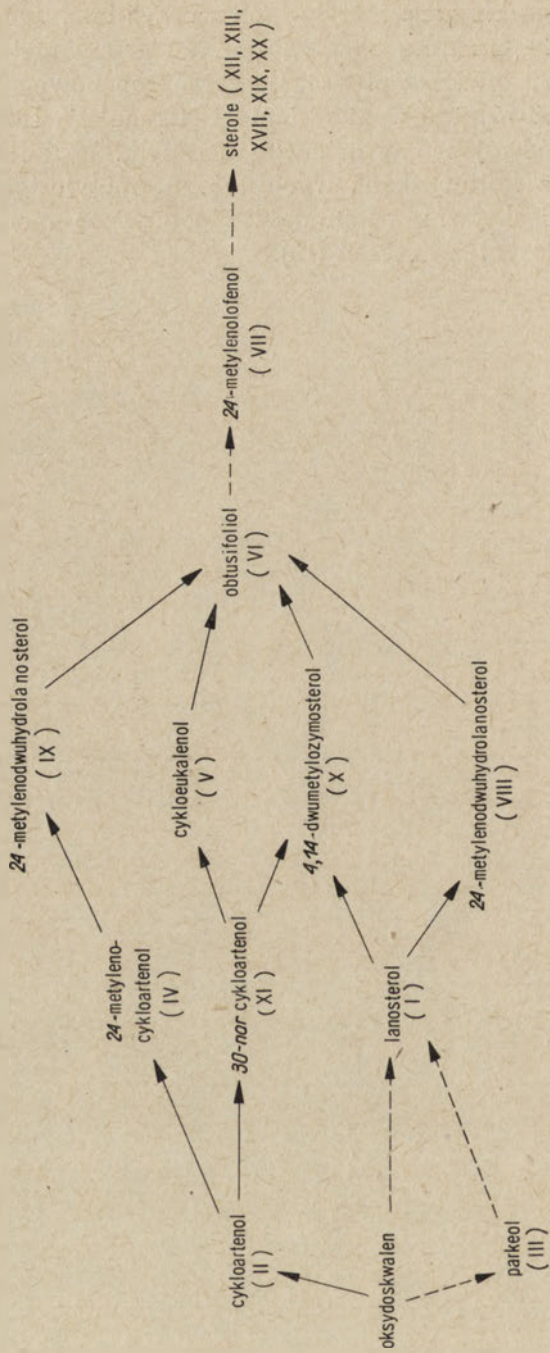
Okazało się, że większość roślin może przekształcać egzogeny lanosterol w sterole (11). W glinach *Ochromonas malhamensis* jak również w kulturach tkankowych tytoniu sterole powstają z lanosterolu z wydajnością 2—3-krotnie mniejszą niż z cykloartenolu (31, 33). Wyjaśnieniem tych przemian może być prawdopodobnie względnie niska specyficzność enzymów przeprowadzających cykloartenol w dalsze prekursorzy steroli.

Reakcje, które zachodzą podczas biosyntezy steroli roślinnych z cykloartenolu to: usunięcie grup metylowych z pozycji 4α , 4β i 14α , podstawienie w pozycji 24 łańcucha bocznego sterolu grupy metylowej, etylowej lub etylidenowej, otwarcie pierścienia cyklopropanowego, zmiana położenia wiązania podwójnego w pierścieniu B i redukcja lub zmiana położenia wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym. Rysunek 1 przedstawia wyodrębnione z kultur tkankowych tytoniu metylosterole, do których włącza się radioaktywny octan oraz hipotetyczne monole roślinne — pośredniki w biosyntezie steroli (13).



A. Wyizolowane z tkanek tytoniu: cykloartenol (II), 24-metylenocykloartenol (IV), cykloeukenol (V), obtusifoliol (VI), 24-metylenolofenol (VII), 24-etylidenolofenol (VIII).

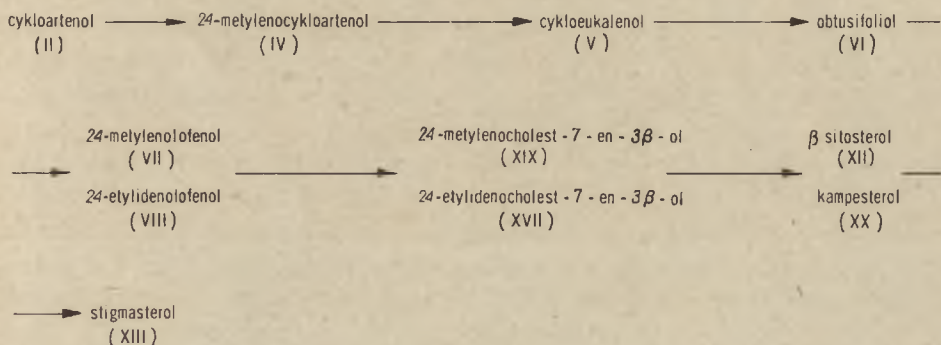
B. Hipotetyczne pośredniki w biosyntezie steroli: 24-metylenodwuhydrolanosterol (IX), 4,14-dwumetylozymosterol (X), 30-norcykloartenol (XI), lofenol (XXIII).



Schemat 3. Biosynteza steroli według Benveniste (13). Wzory związków podano na rysunku 1 i 2

Opierając się na pomiarach specyficznej radioaktywności w izolowanych związkach Benveniste i wsp. (13) zaproponowali przebieg biosyntezy steroli przedstawiony na schemacie 3. Według tego schematu nie jest istotne, w jakiej kolejności zachodzi demetylacja czy wprowadzenie łańcucha bocznego, natomiast otwarcie pierścienia cyklopropanowego następuje zawsze po dołączeniu grupy metylenowej w pozycji 24. Enzymy przeprowadzające pierwsze etapy przemian są więc mało specyficzne.

Schemat biosyntezy steroli podany przez Benveniste i wsp. jest rozszerzeniem poprzedniego, zaproponowanego przez Goodwina i wsp. prostszego schematu biosyntezy steroli u roślin. Goodwin i jego grupa (23, 25, 30) uwzględniając występowanie metylosteroli w różnych roślinach, a także włączanie radioaktywności do poszczególnych metylosteroli (26) podali kolejne etapy biosyntezy steroli, przedstawione na schemacie 4. Schemat ten, podobnie jak schemat 3, zakłada otwarcie pierścienia cyklopropanowego po dołączeniu grupy metylenowej do łańcucha bocznego, ponadto wskazuje, że reszta metylenowa w pozycji 22 dołączana jest do 14-metylosteroli. Usunięcie grupy metylowej z C-14 uniemożliwia wprowadzenie drugiej grupy metylowej do łańcucha bocznego i na tym etapie zachodzi rozdzielenie biosyntezy steroli C₂₈ i C₂₉. Szybkość poszczególnych, przedstawionych na schematach reakcji jest różna. Najwolniej zachodzą: synteza cykloartenolu (II), 24-metylenocykloartenolu (rysunek 1, wzór IV) i cykloekalenolu (rysunek 1, wzór V) (37).



Schemat 4. Biosynteza steroli według Goodwina (cyt. wg 13). Wzory związków podano na rysunku 1 i 2

II. Demetylacja metylosteroli w pozycjach 4α, 4β i 14α

Kolejność usuwania grup metylowych w czasie biosyntezy steroli roślinnych jest inna, niż podczas biosyntezy cholesterolu u zwierząt. Według obu podanych wyżej schematów demetylacja w pozycji 4 zachodzi przed demetylacją w pozycji 14 i jest pierwszym lub jednym z pierwszych etapów przemian cykloartenolu. Natomiast podczas biosyntezy cholesterolu zwierzęcego grupa metylowa z pozycji C-14 usuwana jest jako pierwsza.

Mechanizm demetylacji steroli w pozycji 4 badany był dotychczas głównie w organizmach zwierzęcych i wiadomo, że polega on na stopniowym utlenianiu grupy metylowej do karboksylowej i usunięciu jej w postaci CO_2 (34, 44, 45).

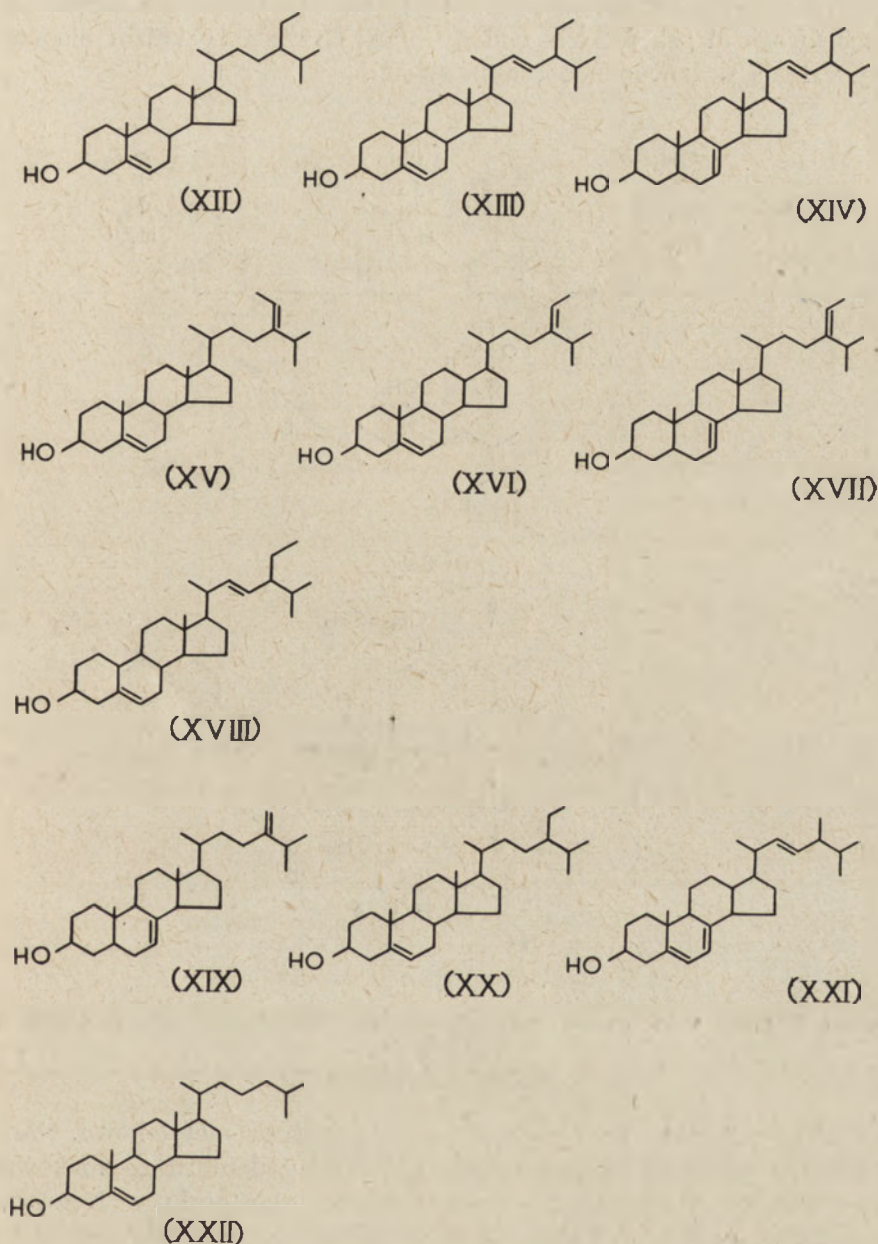
Wiadomo również, że usunięcie grupy metylowej przy węglu 4 wymaga obecności grupy wodorotlenowej w pozycji 3, przy czym ta grupa początkowo utleniana jest do grupy ketonowej, a następnie wtórnie zredukowana. Ostatnio Knapp i Nicholas (36) wykazali, że przy przekształceniu znakowanego 24-metylenocykloartenolu (IV) w cykloeukalenol (V) w skórce banana zostaje stereospecyficznie usuwana grupa metylowa z pozycji 4 α i jednocześnie wodór z pozycji 3 α . Podobnie Goodwin i wsp. stwierdzili, że w czasie syntezy steroli z kwasu 2- ^{14}C , (4R)-4- ^3H -mewalonowego w siewkach grochu usuwany jest atom trytu z pozycji 3 α -prekursorów β -sitosterolu (XII) (53), a w glonach *Fucus spiralis* z 3 α -prekursorów fukosterolu (rysunek 2, wzór XV) (28).

Mechanizm demetylacji w pozycji 14 badany był dotychczas wyłącznie w organizmach zwierzęcych. Uważa się, że i w tym przypadku grupa metylowa stopniowo utleniana jest do karboksylowej, a następnie usuwana w postaci CO_2 . Proponowane są dwa mechanizmy demetylacji w tej pozycji. Według Frieda i wsp. (22), mechanizm demetylacji może być analogiczny do mechanizmu usuwania CO_2 z $\beta(\gamma)\Delta$ nienasyconych kwasów tłuszczowych z jednoczesnym przesunięciem podwójnego wiązania. Podczas biosyntezy steroli podwójne wiązanie powinno być przesunięte z pozycji 8(9) Δ w pozycję 8(14) Δ . Za takim przebiegiem demetylacji u roślin może przemawiać obecność steroli o wiązaniu podwójnym w pozycji 8(14) Δ w roślinach *Aplopappus heterophyllus* i *Daemia extensa* (24). Jednak obecnie bardziej prawdopodobny wydaje się inny mechanizm opracowany głównie przez Akhtara i wsp. (5, 6, 7, 60), oraz Lutsky'ego i Schroepfera (42). Według tego mechanizmu u zwierząt pierwszym etapem jest stereospecyficzne usunięcie protonu z pozycji 15 α lanosterolu. Wytworzony w ten sposób jon może ułatwiać dekarboksylację z jednoczesnym utworzeniem dienu $\Delta^{8,14}$ jako metabolitu pośredniego. Dien taki otrzymano syntetycznie i stwierdzono, że jest on przekształcany w ergosterol (rysunek 2, wzór XXI) przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (1). Dotychczas nie ma jednak danych doświadczalnych wyjaśniających w sposób dostateczny według którego mechanizmu zachodzi demetylacja steroli w pozycji 14 w organizmach roślinnych.

III. Tworzenie rozgałęzienia w pozycji 24 łańcucha bocznego steroli

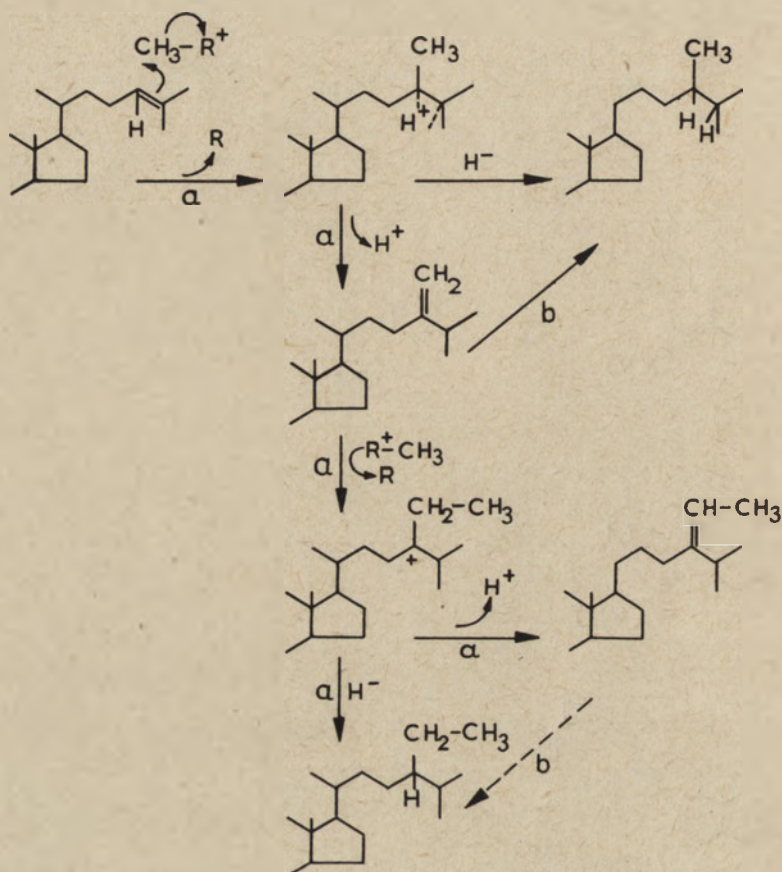
W ostatnich latach wykazano w wielu roślinach obecność cholesterolu. Prawdopodobnie jest to jedyny roślinny sterol C_{27} . Wszystkie inne dotychczas poznane sterole roślinne mają łańcuch boczny rozgałęziony w pozycji

cji 24. Wzory najczęściej występujących steroli roślinnych podano na rysunku 2.



Rys. 2. Sterole występujące w roślinach: β -sitosterol (XII), stigmasterol (XIII), α -spirostasterol (chondrillasterol) (XIV), fukosterol (XV), izofukosterol (XVI), 24-etylidenocholest-7-en-3- β -ol (XVII), poriferasterol (XVIII), 24-metylenocholest-7-en-3- β -ol (XIX), kampesterol (XX), ergosterol (XXI), cholesterol (XXII)

Mechanizm wprowadzania grupy metylowej lub etylowej w pozycję 24 łańcucha bocznego steroli zaproponowano stosunkowo dawno. W roku 1963 Castle i wsp. (16) stwierdzili, że siewki grochu włączają radioaktywność ze znakowanej w grupie metylowej metioniny do steroli. Schemat 5 (droga a) przedstawia podany przez Castle mechanizm biosyntezy rozgałęzienia w łańcuchu bocznym steroli.



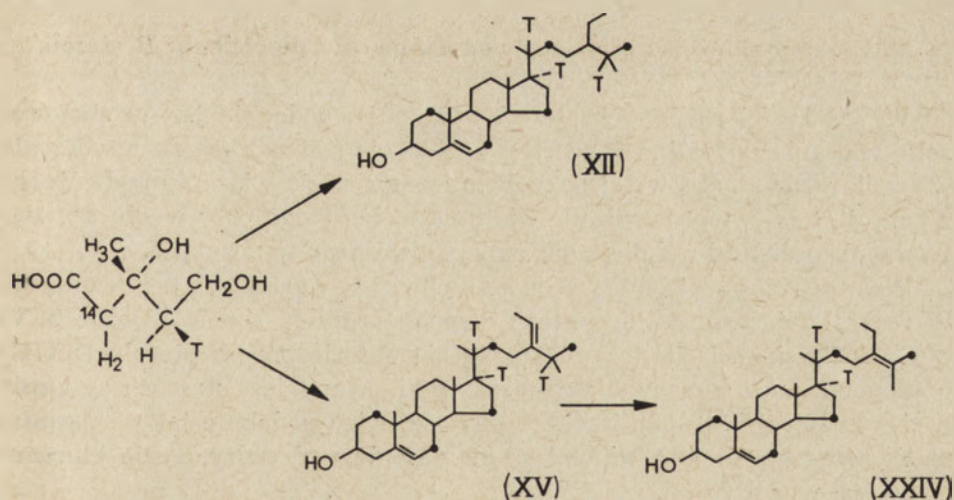
Schemat 5. Mechanizm wprowadzania grupy etylowej do łańcucha bocznego steroli (wg 59)
R-CH₃ — metionina

Według schematu jako pierwsza powstaje grupa metylenowa. Następne badania potwierdziły, że jedynie dwa atomy deuteru ze znakowanej grupy metylowej metioniny włączają się do ergosterolu w *Neurospora crassa* (39). Akhtar i wsp. (3) udowodnili, że grupa metylenowa z egzogenego 24-metylenolanosterolu może być redukowana do grupy metylowej ergosterolu przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Druga grupa metylowa w reszcie etylowej steroli C₂₈ pochodzi również z S-adenozynometioniny. Wskazuje na to radioaktywność reszty etylowej β-sitosterolu

syntetyzowanego ze znakowanej w grupie metylowej metioniny przez szałwię (39), liście kukurydzy (29) i inne rośliny (43). G o a d (24) wykrył cztery atomy trytu pochodzące z radioaktywnej metioniny w poriferasterolu (XVIII) z *Ochromonas malhamensis*; ich obecność wskazywała na biosyntezę poprzez przejściową formę z łańcuchem etylidenowym (droga b). Zgadzałoby się to z kolejnością przekształceń: fukosterol (XV) β -sitosterol (XII), wynikającą z badań kolejności włączania znakowanego miewalonianu do tych związków w *Euphorbia pepulus* (10). Natomiast L e n f a n t i wsp. (40) stwierdzili obecność pięciu atomów deuteru w stigmasterolu (rysunek 2, wzór XIII) z grzybów *Dictyostelium discoideum*, a T o m i t a i wsp. (59) obecność również pięciu atomów deuteru w chondrillasterolu (rysunek 2, wzór XIV) w *Chlorella vulgaris*. Wyniki te wskazują na możliwość bezpośredniej biosyntezy etylowego ugrupowania w łańcuchu bocznym bez przejściowego utworzenia grupy etylidenowej.

Wprowadzenie pierwszej grupy metylenowej wymaga obecności wiązania podwójnego w pozycji 24. Wskazuje na to włączanie przez otrzymany z siewek grochu preparat enzymatyczny radioaktywności ze znakowanej metioniny do lanosterolu i cykloartenolu i brak włączania do 24,25-dwuhydrolanosterolu (54). Wprowadzenie drugiej grupy metylowej nie wymaga obecności tego wiązania i w liściach tytoniu radioaktywnej 24-metyleno-22,23-dwuhydrolanosterol (rysunek 1, wzór IX) przekształca się w β -sitosterol (9).

Schemat wprowadzania grupy etylowej do łańcucha bocznego steroli, zaproponowany przez C a s t l e i wsp. (16), zakłada przesunięcie protonu z pozycji 24 w 25 w czasie dołączania reszty metylenowej. Fukosterol wyodrębniany z glonu *Fucus spiralis*, inkubowanego z miewalonianem



Schemat 6. Włączanie kwasu 2-¹⁴C,(4R)-4-³H miewalonowego do β -sitosterolu (XII), fukosterolu (XV) i stigmasterolu (XXIV)

$2\text{-}^{14}\text{C}$, (4R)- 4^3H , zawierał trzy atomy trytu, podobnie jak β -sitosterol otrzymany z tego samego prekursora w siewkach grochu (53). Fukosterol mając w pozycji 24 wiązanie podwójne musi jednak zawierać tryt w pozycji 23 lub 25. W celu stwierdzenia, w którym kierunku zachodzi przesunięcie protonu, przeprowadzono chemiczną izomeryzację fukosterolu (XV) do stigmasta- $5,24$ -dien- 3 -olu (schemat 6, wzór XXIV). Ponieważ w czasie reakcji jeden atom trytu został usunięty, musiał on znajdować się w pozycji 25 fukosterolu (28). Rozmieszczenie radioaktywności w cząsteczce otrzymanego fukosterolu i jego pochodnej oraz β -sitosterolu przedstawia schemat 6.

Podobnie podczas inkubacji nasion sosny z egzogennym lanosterolem znakowanym trytem w pozycji 24, powstaje radioaktywny 24-etylideno-cholesterol. Po degradacji chemicznej stwierdzono, że w pochodnej tej znakowany jest węgiel w pozycji 25 (48).

Druga grupa metylowa może być wprowadzana w pozycję *cis* lub *trans* w stosunku do łańcucha bocznego. Produktami tej reakcji będą odpowiednio izofukosterol (rysunek 2, wzór XVI) lub fukosterol (XV). Ostatnio stwierdzono, że izofukosterol występuje powszechnie w roślinach wyższych, natomiast fukosterol w glonach (24).

IV. Otwarcie pierścienia cyklopropanowego

Po wprowadzeniu grupy metylenowej zachodzi otwarcie pierścienia cyklopropanowego. G o a d i wsp. (30) uważają, że w tej reakcji powinna brać udział reszta elektroujemna enzymu, na przykład grupa tiolowa, dołączając się w pozycji 9. Jednak dotychczas nie ma danych doświadczalnych potwierdzających proponowaną przemianę.

V. Zmiana położenia wiązania podwójnego w pierścieniu B steroli

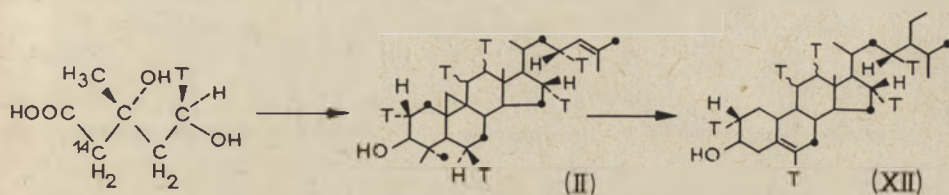
W większości roślinnych steroli występuje, podobnie jak w cholesterolu, wiązanie podwójne w pozycji 5. Reakcje prowadzące do utworzenia wiązania podwójnego w tej pozycji to izomeryzacja wiązania podwójnego z pozycji 8 do 7, wprowadzanie wiązania podwójnego przy węglu 5 z wytworzeniem dienu i redukcja wiązania podwójnego w pozycji 7.

Pierwszy etap — izomeryzacja — zachodzi w warunkach beztlenowych. W reakcji tej, podczas biosyntezy α -spinasterolu (rysunek 2, wzór XIV) w *Camellia sinensis* jak również przy biosyntezie poriferasterolu (XVIII) w glonach *Ochromonas malhamensis*, eliminowany jest stereospecyficznie wodór z pozycji 7 β (55). Reakcja zachodzi więc podobnie jak w organizmach zwierzęcych (61), natomiast inaczej niż u drożdży, gdzie eliminowany jest wodór 7 α (4).

Reakcja druga — wprowadzania wiązania podwójnego w pozycję 5 — zachodzi w obecności tlenu. β -Sitosterol syntetyzowany *in vivo* z kwasu

2-¹⁴C,(5R)-5-³H mewalonowego zawiera 6 atomów trytu (24). Jeden z tych atomów zajmuje w β-sitosterolu pozycję 6β, co oznacza, że w czasie powstawania wiązania Δ⁵ eliminowany jest wodór w pozycji 6α. Jednocześnie usuwany jest też wodór z pozycji 5α, tak więc wprowadzanie wiązania podwójnego przy węglu 5 zachodzi według mechanizmu *cis* eliminacji (schemat 7). Podobny wynik otrzymano badając syntezę poriferasterolu w glonach *Ochromonas malhamensis*. Wyniki powyższe wskazują, że reakcja wprowadzania wiązania podwójnego w pozycji 5 u roślin zachodzi tak samo jak w organizmach zwierzęcych (2).

Redukcja wiązania w pozycji 7 badana była tylko dla steroli z wątroby ssaków (8).

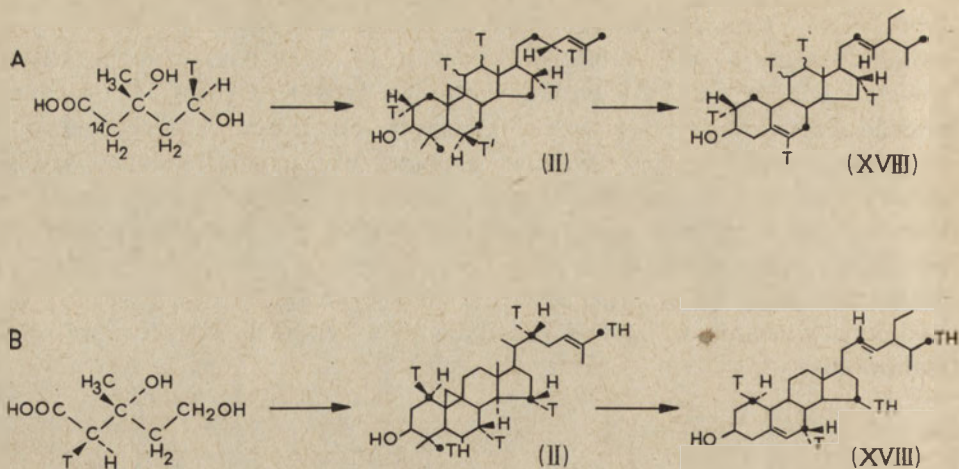


Schemat 7. Włączenie kwasu 2-¹⁴C,(5R)-5-³H mewalonowego do cykloartenolu (II) i βsitosterolu (XII)

VI. Wprowadzanie wiązania podwójnego w pozycji 22

Szereg roślin zawiera sterole o dodatkowym wiązaniu podwójnym w łańcuchu bocznym. Na podstawie włączania radioaktywności ze znakowanego octanu wiadomo, że wiązanie to wprowadzane jest w ostatnim etapie biosyntezy steroli (35). α-spinasterol (XIV), występujący w niektórych roślinach, zawiera wiązania podwójne w pozycjach 7 i 22, a powszechnie występujący stigmasterol (XII) — 5 i 22. Teoretycznie wiązanie podwójne w pozycji 22 może być wprowadzane przed lub po wytworzeniu wiązania w pozycji Δ⁵. Problem ten nie został dotychczas wyjaśniony. Wiązanie podwójne w pozycji 22 nie ulega dalszej redukcji (19). Stereochemię wprowadzania tego wiązania badano przy użyciu prekursorów podwójnie znakowanych. Zużywając kwas 2-¹⁴C,(5R)-5-³H-mewalonowy glon *Ochromonas malhamensis* syntetyzuje poriferasterol, w którym usunięty jest atom trytu z pozycji 23 *pro R*, natomiast w czasie biosyntezy z kwasu 2-¹⁴C,(2R)-2-³H-mewalonowego z poriferasterolu usuwany jest tryt z pozycji 22 *pro R*. Tak więc przy wprowadzaniu tego wiązania podwójnego zachodzi, podobnie jak podczas syntezy wiązania w pozycji 5, eliminacja typu *cis* (56, 57), (schemat 8).

Również według mechanizmu *cis* usuwane są atomy wodoru podczas wprowadzania wiązania podwójnego w pozycji 22 ergosterolu w *Aspergillus fumigatus*. Jednak w tym organizmie, inaczej niż u *Ochromonas malhamensis*, usuwane są atomy trytu z pozycji 23 *pro S* i 22 *pro S* (15).

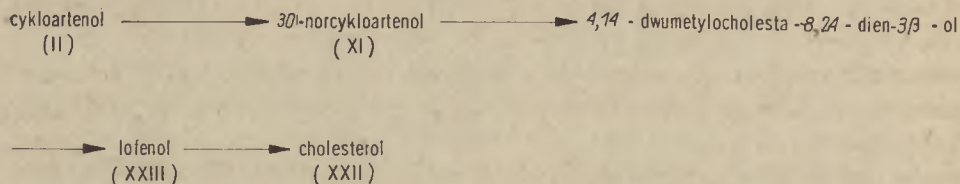


Schemat 8. Włączenie kwasu 2-¹⁴C,(5R)-5-³H mewalonowego (A) i kwasu 2-¹⁴C,(2R)-2-³H mewalonowego (B) do cykloartenolu (II) i poriferasterolu (XVIII)

VIII. Biosynteza cholesterolu roślinnego

Interesującą sprawą jest biosynteza cholesterolu (rysunek 2, wzór XXII) zidentyfikowanego w wielu roślinach (9, 17, 18, 38, 58). Wydaje się, że cholesterol roślinny jest syntetyzowany również z cykloartenolu, a nie z lanosterolu. R. Ess i wsp. (50) zaproponowali drogę syntezy cholesterolu przedstawioną na schemacie 9.

Z przypuszczalnych prekursorów cholesterolu w roślinach wykryto 4,14-dwumetylocholesta-8,24-dien-3- β -ol, lofenol (rysunek 1, wzór XXIII) i Δ^7 cholestenol (27). Jednak problem ten jest dotychczas mało zbadany.



Schemat 9. Hipotetyczny przebieg biosyntezy cholesterolu w roślinach (50). Wzory związków podano na rysunku 1 i 2

LITERATURA

1. Akhtar M., Brooks W., Watkinson I. A., *Biochem. J.* **115**, 135 (1969).
2. Akhtar M., Marsh S., *Biochem. J.* **102**, 462 (1967).
3. Akhtar M., Parves M. A., Hunt P. F., *Biochem. J.* **100**, 30c (1966).
4. Akhtar M., Rahimtula A. D., Watkinson I. A., *Biochem. J.* **117**, 539 (1970).

5. Akhtar M., Rahimtula A. D., Watkinson I. A., Wilton D. C., Munday K. A., *European J. Biochem.* **9**, 107 (1969).
6. Akhtar M., Rahimtula A. D., Watkinson I. A., Wilton D. C., Munday K. A., *J. Chem. Soc. Sect. D* str. 149 (1969).
7. Akhtar M., Watkinson I. A., Rahimtula A. D., Wilton D. C., Munday K. A., *Biochem. J.* **111**, 757 (1969).
8. Akhtar M., Wilton D. C., Munday K. A., *Biochem. J.* **101**, 23c (1967).
9. Alcaide A., Devys M., Bottin J., Fetizon M., Barbier M., Lederer E., *Phytochemistry* **7**, 1773 (1968).
10. Baised D. J., *Phytochemistry* **8**, 1697 (1969).
11. Baised D. J., Gardner R. L., Reynolds L. A., *Phytochemistry* **7**, 945 (1968).
12. Benveniste P., *Phytochemistry* **7**, 951 (1968).
13. Benveniste P., Hewlins M. J. E., Fritig B., *European J. Biochem.* **9**, 526 (1969).
14. Benveniste P., Hirth L., Ourison G., *Phytochemistry* **5**, 31 (1966).
15. Bimpson T., Goad L. J., Goodwin T. W., *J. Chem. Soc. Sect. D* str. 297 (1969).
16. Castle M., Blondin G., Nes W., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3308 (1963).
17. Devys M., Barbier M., *Compt. Rend. Hebd. Seans. Acad. Sci., Paris*, **261**, 4901 (1965).
18. Devys M., Barbier M., *Phytochemistry* **5**, 1031 (1966).
19. Ellour R., Lenfant M., *Tetrahedron Letters* **31**, 2655 (1969).
20. Eppenberger U., Hirth L., Ourisson G., *European J. Biochem.* **8**, 180 (1969).
21. Fonberg-Broczek M., *Post. Biochem.* **12**, 347 (1966).
22. Fried J., Dudowitz A., Brown J. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 568 (1968).
23. Gibbons G. E., Goad L. J., Goodwin T. W., *Phytochemistry* **7**, 983 (1968).
24. Goad L. J., *Biochem. Soc. Symp.* **29**, 45 (1970).
25. Goad L. J., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **99**, 735 (1966).
26. Goad L. J., Goodwin T. W., *European J. Biochem.* **1**, 357 (1967).
27. Goad L. J., Goodwin T. W., *Phytochemistry* **7**, 1875 (1968).
28. Goad L. J., Goodwin T. W., *European J. Biochem.* **7**, 502 (1969).
29. Goad L. J., Hammam A. S. A., Dennis A. A., Goodwin T. W., *Nature* **210**, 1322 (1966).
30. Goad L. J., Williams B. L., Goodwin T. W., *European J. Biochem.* **3**, 232 (1967).
31. Hall J., Smith A. R. H., Goad L. J., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **112**, 129 (1969).
32. Heintz R., Benveniste P., *Phytochemistry* **9**, 1499 (1970).
33. Hewlins M. J., Ehrhardt J. D., Hirth L., Ourisson G., *European J. Biochem.* **8**, 184 (1969).
34. Hornby G. M., Boyd G. S., *Biochem. J.* **122**, 24P (1971).
35. Kasprzyk Z., Wojciechowski Z., *Phytochemistry* **8**, 1921 (1969).
36. Knapp F. F., Nicholas H. J., *J. Chem. Soc. Sect. D* str. 399 (1970).
37. Knapp F. F., Nicholas H. J., *Phytochemistry* **10**, 85 (1971).
38. Knights B. A., *Phytochemistry* **7**, 1707 (1968).
39. Lederer E., *Biochem. J.* **93**, 440 (1964).
40. Lenfant M., Ellour R., Des B. C., Zissmann E., Lederer E., *European J. Biochem.* **7**, 159 (1969).

41. Lenfant M., Lecompte M. F., Farrugia G., *Phytochemistry* 9, 2529 (1970).
42. Lutsky B. N., Schroepfer G. J., *J. Biol. Chem.* 245, 6449 (1970).
43. Mercer E. J., *Biochem. J.* 96, 17P (1965).
44. Miller W. L., Gaylor J. L., *J. Biol. Chem.* 245, 5369 (1970).
45. Miller W. L., Gaylor J. L., *J. Biol. Chem.* 245, 5375 (1970).
46. Ponsinet G., Ourisson G., *Phytochemistry* 6, 1235 (1967).
47. Ponsinet G., Ourisson G., *Phytochemistry* 7, 757 (1968).
48. Raab K. H., Saura N. J. de, Nes W. R., *Biochim. Biophys. Acta* 152, 742 (1968).
49. Rees H. H., Goad L. J., Goodwin T. W., *Biochem. J.* 107, 417 (1968).
50. Rees H. H., Goad L. J., Goodwin T. W., *Phytochemistry* 7, 1875 (1968).
51. Rees H. H., Goad L. J., Goodwin T. W., *Tetrahedron Letters* 6, 723 (1968).
52. Rees H. H., Goad L. J., Goodwin T. W., *Biochim. Biophys. Acta* 176, 892 (1969).
53. Rees H. H., Mercer I., Goodwin T. W., *Biochem. J.* 99, 726 (1966).
54. Russel P. T., Aller R. T., van, Nes W. R., *J. Biol. Chem.* 242, 5802 (1967).
55. Shrama R. K., *J. Chem. Soc. Sect. D* str. 543 (1970).
56. Smith A. R. H., Goad L. J., Goodwin T. W., *J. Chem. Soc. Sect. D* str. 926 (1968).
57. Smith A. R. H., Goad L. J., Goodwin T. W., *J. Chem. Soc. Sect. D*, str. 1259 (1968).
58. Standifer L. N., Devys M., Barbier M., *Phytochemistry* 7, 1361 (1968).
59. Tomita Y., Momori A., Minato H., *Phytochemistry* 9, 555 (1970).
60. Watkinson J. A., Akhtar M., *J. Chem. Soc. Sect. D* str. 206 (1969).
61. Wilton D. C., Akhtar M., *Biochem. J.* 116, 337 (1970).

ANDRZEJ JERZMANOWSKI *

Występowanie i biosynteza poliprenylowych chinonów roślinnych

Distribution and Biosynthesis of Polyprenoid Quinones in Plants

Recent data on the distribution and biosynthesis of polyprenoid quinones in plants are reviewed.

Tematyka dotycząca powstawania, budowy i funkcji chinonów poruszana była obszernie w kilku opracowaniach monograficznych (14, 20, 21, 32) z dawniejszych lat. W *Postęпах Biochemii* w 1969 roku ukazał się artykuł Drabikowskiej (7) pt. „Biologiczne funkcje chinonów”, omawiający budowę najważniejszych benzo- i naftochinonów, między innymi: ubichinonu, plastochinonów, tokoferoli i witaminy K₁ i ich funkcje w organizmach roślinnych i zwierzęcych. Najnowszym opracowaniem tych zagadnień jest wydana w 1971 roku pod redakcją R. H. Thomsona monografia: *Naturally Occuring Quinones* (25).

Fakt, iż chinony roślinne, z wyjątkiem ubichinonu, występują głównie w chloroplastach i są dobrymi przenośnikami ładunku nasuwał przypuszczenie o ich roli jako przenośników elektronów w procesie fotosyntezy. Nie ulega już dziś wątpliwości, że określoną rolę w fotosyntetycznym transporcie elektronów pełnią plastochinony (22). Funkcja tokoferoli, tokoferylchinonów i witaminy K₁ nie jest jednak dokładnie wyjaśniona, chociaż wiele danych wskazuje na to, że pod wpływem światła związki te ulegają procesom oksydo-redukcji (6).

W badaniach nad funkcją chinonów chloroplastowych pomocne może okazać się wyjaśnienie ich wzajemnych powiązań biosyntetycznych oraz ustalenie ich lokalizacji w chloroplastach.

W niniejszym artykule przedstawione zostaną najnowsze dane o występowaniu i biosyntezie ważniejszych roślinnych chinonów poliprenylowych.

* Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

I. Występowanie i lokalizacja biosyntezy chinonów poliprenylowych w komórce roślinnej

1. Występowanie

Najważniejsze roślinne chinony poliprenylowe przedstawione są na rysunku 1. W komórce roślinnej istnieją dwa rozgraniczone obszary, w których występują chinony poliprenylowe. Są to: a) mitochondria i błony retikulum endoplazmatycznego, gdzie występuje roślinny ubichinon i b) chloroplasty, gdzie występuje praktycznie cała reszta roślinnych benzo- i naftochinonów, a więc plastochinony, tokoferole, tokoferylochinony oraz witamina K_1 .

Tablica 1 przedstawia ilości poszczególnych chinonów oznaczone przez grupę Crane (5, 15, 16, 19) w chloroplastach z liści szpinaku. W największych ilościach występuje w nich jeden z plastochinonów, plastochinon A. W dość znacznych ilościach występuje również α -tokoferol. Ilość pozostałych plastochinonów, α -tokoferylochinonu i witaminy K_1 , jest już wyraźnie mniejsza, natomiast β - i γ -tokoferylochinony znajdują się w ilościach śladowych. Ogólna ilość plastochinonów w liściach szpinaku wynosi około 0,09mg/g suchej masy (22). Zawartość ubichinonu w tych samych liściach szpinaku wynosi około 0,04—0,05mg/g suchej masy (3).

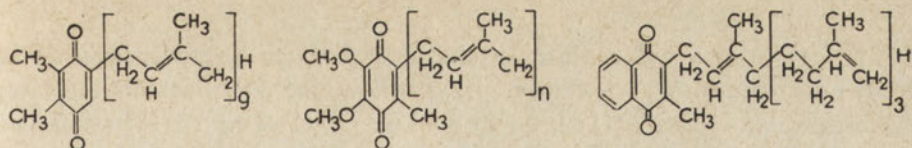
Tablica 1

Zawartość chinonów w chloroplastach liści szpinaku (wg 5, 15, 16, 19)

Chinon	Zawartość w μ molach na μ mol chlorofilu
Witamina K_1	0,008—0,022
α -Tokoferol	0,05—0,09
β - i γ -Tokoferol	0,01
α -Tokoferylochinon	0,003—0,002
β -Tokoferylochinon	0,0006
γ -Tokoferylochinon	0,0003
Plastochinon A	0,1—0,14
Plastochinon B	0,003—0,025
Plastochinon C	0,016—0,025
Plastochinon D	0,009—0,013

Ubichinon występuje w substrukturach cytoplazmatycznych komórki roślinnej, biorąc udział, podobnie jak w komórkach innych organizmów, w systemach mitochondrialnego i mikrosomalnego transportu elektronów (3).

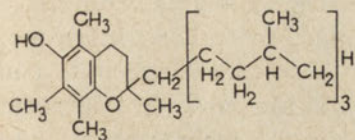
Z lipidowej natury plastochinonów i ich funkcji w fotosyntezie wynikałoby, że występują one w połączeniu ze strukturami błonowymi chloroplastu. Kilku autorów (1, 12) donosiło jednak o wykryciu plastochinonów poza strukturą lamelli, w tak zwanych ciałkach osmofilnych (drobne struk-



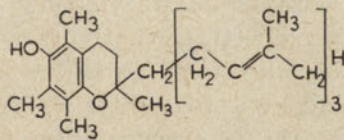
Plastochinon (PQ)^a

Ubichinon (UQ)^b

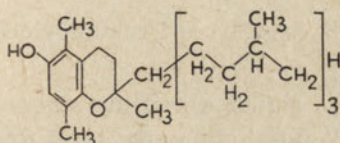
Witamina K₁ (FQ)



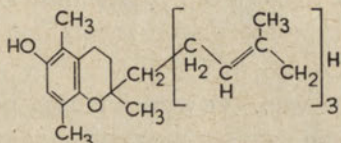
α-Tokoferol



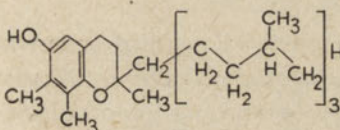
α-Tokotrienol



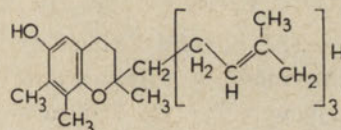
β-Tokoferol



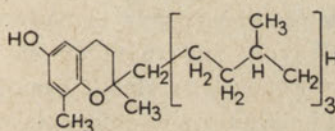
β-Tokotrienol



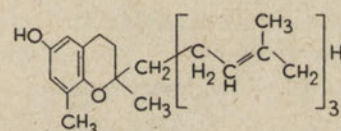
γ-Tokoferol



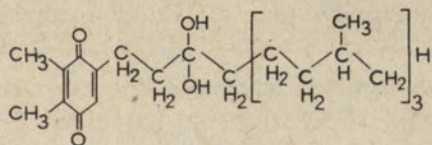
γ-Tokotrienol



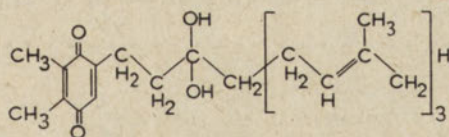
δ-Tokoferol



δ-Tokotrienol



α-Tokoferylochinon (z α-Tokoferolu)^c



α-Tokotrienylochinon (z α-Tokotrienolu)^d

Rys. 1. Struktury chinonów roślinnych

a. W roślinach występują PQA, PQB, PQC, PQD różniące się podstawnikami w łańcuchu bocznym, b. W roślinach: n = 9, 10, c. Występują również tokoferylochinony pochodzące z β-, γ- i δ-tokoferoli, d. Występują również tokoferylochinony pochodzące z β-, γ- i δ-tokotrienoli

tury wykrywane w chloroplaście i charakteryzujące się zdolnością do adsorbowania osmu). W większości przypadków jednak plastoquinony wykrywano w lamellach. Lichtenhaler i Calvin (18) stwierdzili obecność plastoquinonów we fragmentach błon zawierających chlorofil i w tak zwanych kwantosomach, a liczni autorzy donosili o wykryciu wszystkich rodzajów plastoquinonów w lamellach zupełnie wolnych od ciałek osmofilnych (4). Obecnie przeważa pogląd, że frakcja, którą można by określić, jako ciała osmofilne zawiera raczej przekształcone, a nie lamellarne (czynne w fotosyntezie), formy plastoquinonów (4). Poprzednie doniesienia można tłumaczyć dużymi trudnościami technicznymi, jakie wiążą się z oddzieleniem wspomnianych produktów przekształceń plastoquinonów od właściwych plastoquinonów.

W ciałkach osmofilnych znaleziono również tokoferole i tokoferylochinony (17).

Crane i wsp. (4) wypowiadają pogląd, że ciała osmofilne stanowią w chloroplaście swoisty magazyn nadmiernych ilości chinonów typu tokoferoli oraz przekształconych, nieczynnych już w fotosyntezie, plastoquinonów.

W 1969 roku Lichtenhaler (17) przedstawił wyniki badań nad stężeniami chinonów w tylakoidach i rozmieszczeniem ich w układach fotosyntetyzujących I i II. Badania przeprowadzono na chloroplastach liści lipy, fasoli i szpinaku. Chloroplasty liści starszych i tych liści, które były wystawione na działanie silnego światła, zawierały podwyższone ilości chinonów chloroplastowych. Lichtenhaler stwierdził, że te nadwyżki chinonów występowały w ciałkach osmofilnych, znajdujących się w stromie plastydu. Rozmiary i częstotliwość występowania ciałek osmofilnych wzrastały wraz ze wzrostem ogólnej ilości chinonów w chloroplaście. Chloroplasty z liści wyplonionych charakteryzowały się zupełnie innymi ilościowymi stosunkami chinonów niż te, jakie występują w chloroplastach liści normalnych.

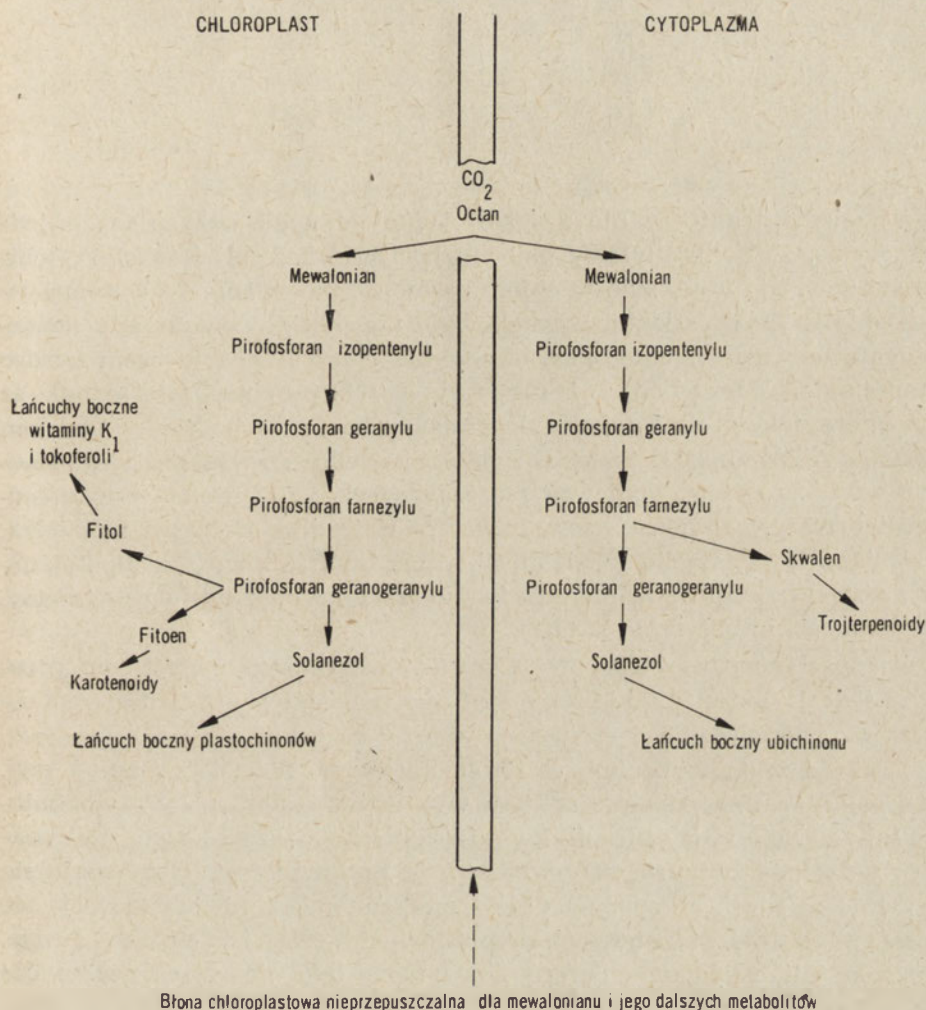
Z badań Lichtenhalera wynika, że plastoquinon A, luteina i neoksantina związane są z układem II fotosyntezy, natomiast β -karoten, wiola-ksantina i witamina K_1 występują głównie w układzie I. α -tokoferol i α -tokoferylochinon występują równomiernie w obu układach fotosyntetyzujących.

2. Lokalizacja biosyntezy

Chinony poliprenylowe składają się zasadniczo z dwóch części: chinonowego rdzenia i poliprenylowego łańcucha bocznego.

Pod koniec lat pięćdziesiątych, dzięki pracom Goodwina i współpracowników (10, 11) uzyskano wstępne dane o lokalizacji biosyntezy łańcucha poliprenylowego. Badając włączanie $^{14}\text{CO}_2$ i 2- ^{14}C -kwasu mewa-

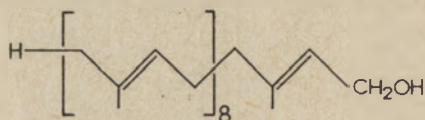
lonowego, bezpośredniego i specyficznego prekursora terpenoidów, stwierdzili oni w komórce roślinnej obecność dwóch, oddzielnych układów syntetyzujących terpenoidy. Jeden z tych układów zlokalizowany jest w chloroplastach, drugi zaś — w cytoplazmie. Obie drogi biosyntezy terpenoidów przedstawia schemat 1.



Schemat 1. Lokalizacja biosyntezy poliprenoidów w komórce roślinnej

Jedną z podstawowych przyczyn rozdzielenia tych układów w komórce jest nieprzepuszczalność błony chloroplastowej dla kwasu mewalonowego i jego dalszych metabolitów na szlaku biosyntezy terpenoidów. Z przytoczonych prac wynika, że karotenoidy i fitol są wytwarzane wyłącznie w chloroplastach, natomiast fitosterole poza chloroplastem. Griffith, Threlfall i Goodwin (13) udowodnili, że również łańcuchy

boczne chinonów chloroplastowych: plastochinonów i witaminy K₁ są wytwarzane wewnątrz chloroplastu, zaś poliprenyłowemu łańcuch boczny ubichinonu powstaje poza chloroplastem. Jest to tym bardziej interesujące, że zarówno boczny łańcuch najczęściej występującego plastochinonu, jak i łańcuch boczny ubichinonu pochodzą od takiego samego związku — 45-ciowęglowego solanezolu (wzór I).



I

Wymienieni autorzy nie uzyskali jednak danych wskazujących jednoznacznie, że poliprenyłowemu łańcuch boczny tokoferoli i tokoferylochinonów powstaje wyłącznie w chloroplastach. Znakowanie tych związków radioaktywnym dwutlenkiem węgla było niewielkie, podczas gdy związki syntetyzowane w chloroplastach znakują się tym prekursorem bardzo intensywnie. Threlfall i Griffith (26) przypuszczają jednak, że biosynteza tokoferoli i tokoferylochinonów może zachodzić z udziałem niezidentyfikowanego dotychczas związku pośredniego występującego również w chloroplastach. Ponieważ radioaktywność wykrywana w tokoferolach i tokoferylochinonach jest, nawet po dość długim czasie, niewielka, przemiana tego związku musiałaby być bardzo powolna. Ten hipotetyczny związek pośredni powinien, podobnie jak β -karoten lub plastochinony, znakować się intensywnie $^{14}\text{CO}_2$.

Kompartamentacja biosyntezy łańcuchów poliprenylowych nie przesądza jednak faktu, że takie samo zjawisko zachodzi w przypadku syntezy rdzenia chinonowego.

Doświadczenia wykonane w 1967 roku przez Whistance i wsp. (31), polegające na podawaniu kilku wybranym roślinom wyższym (między innymi kukurydzy i fasoli) kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, znakowanego jednolicie izotopem ^{14}C wykazały, że prekursor ten wbudowuje się wyraźnie w rdzeń chinonowy ubichinonu, natomiast nie wbudowuje się wcale w rdzenie chinonów chloroplastowych. Whistance i wsp. przypuszczali, że błona chloroplastowa może być nieprzepuszczalna dla kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, podobnie jak dla kwasu mewalonowego. Przypuszczenie to okazało się jednak niesłuszne. Dalsze badania wykazały, że biosynteza rdzenia chinonowego chinonów chloroplastowych przebiega na innej drodze i korzysta z innych związków jako bezpośrednich prekursorów. Związkami tymi są kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy i kwas homogentyzynowy, które mogą swobodnie przenikać do chloroplastu (29). Tym niemniej Whistance i Threlfall (29) przypuszczają, że biosynteza rdzenia chinonowego w komórce roślinnej, a przynajmniej jej dalsze etapy, zachodzą oddzielnie w cytoplazmie i w chloroplastach.

II. Biosynteza chinonów poliprenylowych

1. Biosynteza rdzenia chinonowego

Badania Whistance i wsp. (31) oraz Rudneya i Ramana (24), wykonane zarówno na organizmach roślinnych jak i zwierzęcych, pozwoliły ustalić, że kwas *p*-hydroksybenzoesowy oraz aldehyd *p*-hydroksybenzoesowy są specyficznymi prekursorami rdzenia chinonowego ubichinonu. Prekursorem rdzenia ubichinonu okazał się również kwas cynamonowy.

Grupy metylowe i metoksyłowe przy rdzeniu ubichinonu powstają z S-adenozylometioniny (27).

Pochodzenie kwasu *p*-hydroksybenzoesowego w roślinach Whistance i wsp. (28, 29, 31) wiązało ze szlakiem kwasu szikimowego i choryzmowego. Kwas *p*-hydroksybenzoesowy nie znakuje jednak rdzeni chinonowych chloroplastowych, chociaż te ostatnie mogą powstawać z kwasu szikimowego.

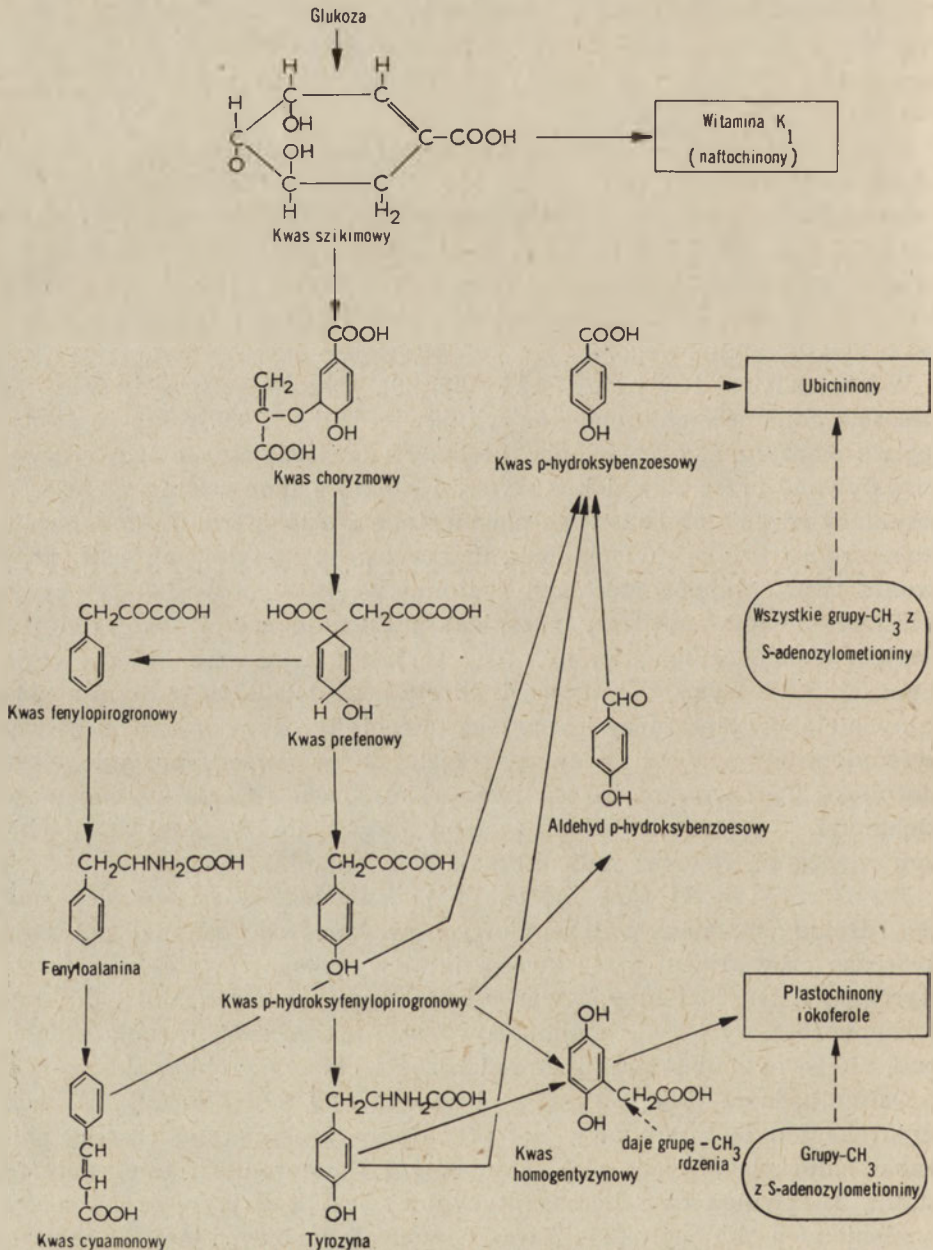
Whistance i Threlfall (28, 29), poszukując właściwych prekursorów chinonów chloroplastowych, stwierdzili w 1968 roku, że atomy węgla aromatycznego pierścienia tyrozyny i fenyloalaniny mogą być wykorzystywane przez siewki kukurydzy i niektóre inne rośliny wyższe od biosyntezy rdzenia chinonowego plastochinonu, α -tokoferolu, γ -tokoferolu, δ -tokoferolu i α -tokoferylchinonu. Jedna z grup metylowych $-CH_3$ przy rdzeniu tych chinonów pochodzi z atomu węgla w pozycji β tyrozyny. Pozostałe ugrupowania przy rdzeniach plastochinonów i tokoferoli powstają z S-adenozylometioniny. Aby wyjaśnić włączanie atomu węgla w pozycji β tyrozyny, Whistance i Threlfall zakładali, że jednym z normalnych etapów biosyntezy jest przekształcenie tyrozyny w kwas *p*-hydroksyfenylopirogonowy i wewnątrzcząsteczkowe przegrupowanie tego ostatniego. Tyrozyna może też być prekursorem rdzenia chinonowego ubichinonu — wyłącznie jednak atomów pierścienia. W fasoli do ubichinonu włącza się również radioaktywna fenyloalanina.

Przytoczone wyżej dane można by podsumować w następujący sposób: rdzenie chinonów poliprenylowych w komórce roślinnej powstają na drodze prowadzącej przez kwas szikimowy, mogą również powstawać z tyrozyny i fenyloalaniny. Kwas *p*-hydroksybenzoesowy, aldehyd *p*-hydroksybenzoesowy i kwas cynamonowy są prekursorami rdzenia ubichinonu, nie są natomiast prekursorami rdzenia chinonów chloroplastowych.

Dalsze badania Whistance i wsp. (28, 29, 30) wykazały, że kwas *p*-hydroksyfenylopirogonowy jest wydajnym prekursorem rdzenia chinonów chloroplastowych: plastochinonów i tokoferoli. Ci sami autorzy ustalili, że również kwas homogentyzynowy jest wydajnym prekursorem wymienionych chinonów (28). Kwas homogentyzynowy, którego obecność w roślinach odkrył Bertel w 1903 roku, może, jak się okazało, łatwo

powstawać z kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego (29). W niektórych mikroorganizmach kwas homogentyzynowy może również powstawać w wyniku *orto*- i *meta*-hydroksylacji kwasu fenyllooctowego (8). W roślinach kwas fenyllooctowy nie jest jednak prekursorem żadnego z chinonów (30).

Na podstawie wymienionych danych Whistance i Threlfall (29, 30) zaproponowali ogólny schemat powstawania rdzeni chinonowych



Schemat 2. Biosynteza rdzeni chinonów roślinnych

w komórce roślinnej (schemat 2). Występujący w schemacie kwas preferowany jest naturalnym pośrednikiem między kwasem choryzmowym a kwasem *p*-hydroksyfenylopirogronowym.

Do dziś najbardziej niejasny jest szlak, na którym powstaje rdzeń naftochinonowy witaminy K_1 . Wiadomo, że odgałęzia się on od szlaku benzochinonów na etapie kwasu szikimowego, dalsze reakcje nie są jednak znane.

Whistance i Threlfall (29) przyjmują, że szlak biosyntezy kwasu szikimowego funkcjonuje zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz chloroplastu. Przypuszczają oni jednak, jak już wspomniano, że w roślinach wyższych drogi: kwas szikimowy \rightarrow witamina K_1 oraz kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy \rightarrow plastochinony i związki pokrewne — występują wyłącznie w chloroplastach. Natomiast szlak: kwas cynamonowy \rightarrow kwas *p*-hydroksybenzoesowy \rightarrow ubiquinon funkcjonowałby wyłącznie poza chloroplastem. Przypuszczenia te, jak dotąd, nie mają jednak mocnego poparcia eksperymentalnego.

Szlak biosyntetyczny rdzenia ubiquinonu u roślin nie różni się od szlaku, na którym ubiquinon powstaje u bakterii i zwierząt (3). U wszystkich tych organizmów związkami pośrednimi są aldehyd *p*-hydroksybenzoesowy i kwas *p*-hydroksybenzoesowy.

W niektórych pleśniach wykryto szlak biosyntetyczny wykorzystujący do biosyntezy rdzenia chinonowego bezpośrednie prekursory kwasów tłuszczowych — malonylo-CoA i acetylo-CoA (9). Bentley i Lavate (2) wykazali jednak, że chinony tworzone w szlaku octanowo-malonylowym są różne od ubiquinonu.

Liczne dane doświadczalne wskazują na to, że kwas *p*-hydroksybenzoesowy jest najbardziej powszechnym i wysoce specyficznym prekursorem rdzenia ubiquinonu (podobnie, jak kwas mewalonowy jest specyficznym prekursorem terpenoidów).

2. Pochodzenie poliprenylowego łańcucha bocznego

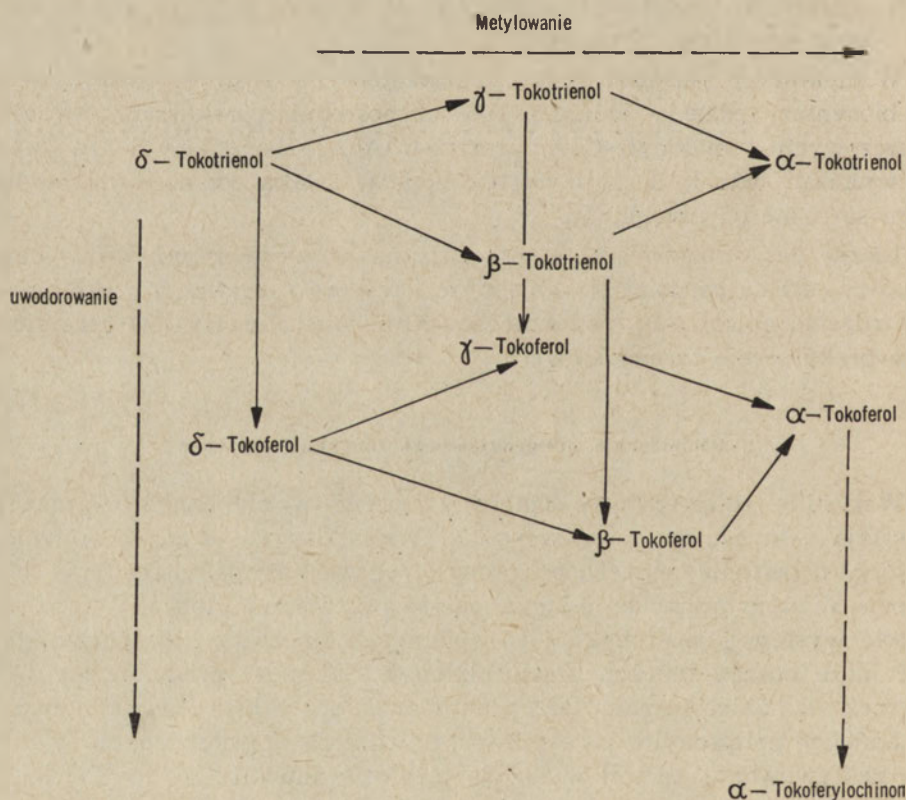
Wszystkie poliprenylowe łańcuchy boczne w chinonach roślinnych powstają z kwasu mewalonowego (9). Wiele danych wskazuje również na to, że dołączenie łańcucha poliprenylowego do rdzenia następuje w momencie, w którym łańcuch osiągnął już swą ostateczną długość. W chloroplastach występuje na przykład 45-węglowy solanezol, z którego powstawać może boczny łańcuch plastochinonów. Solanezol produkowany jest również poza chloroplastem jako prekursor łańcucha bocznego ubiquinonu.

Łańcuch poliprenylowy dołącza się do rdzenia prawdopodobnie w formie zaktywowanej, to jest w formie pirofosforanu (23).

Obecnie nie dysponujemy zbyt wieloma danymi o kolejności poszczególnych etapów biosyntezy całkowitej cząsteczki chinonów. Dzięki pracom

Olsena, Parsona i Rudneya oraz Folkersa (cyt. za Rudneyem (23)) można jednak przypuszczać, że przynajmniej w przypadku ubichinonu, dołączenie kompletnego łańcucha poliprenylowego następuje w momencie, w którym rdzeń chinonowy nie jest jeszcze całkowicie zsyntetyzowany, brak w nim mianowicie bocznych grup metoksyowych i grupy metylowej oraz chinonowego układu podwójnych wiązań. Należy zatem przypuszczać, że już po dołączeniu łańcucha poliprenylowego następuje szereg reakcji hydroksylacji pierścienia aromatycznego oraz metylacji za pośrednictwem S-adenozylometioniny. Wspomniane prace wykonywano na *Rhodospirillum rubrum*.

Ciekawy schemat (schemat 3) wzajemnych przejść w grupie roślinnych tokoferoli i tokotrienoli (patrz rysunek 1) zaproponowali Whistance i Threlfall (29). Schemat ten przedstawia dwa kierunki przemian: jeden od tokotrienoli do tokoferoli, związany z wodorowaniem podwójnych wiązań w łańcuchu poliprenylowym i drugi — od form δ - do α -, związany z metylowaniem rdzenia chinonowego. Przemiany te mogą zachodzić jednocześnie.



Schemat 3. Przekształcenia tokoferoli i tokotrienoli (wg 29)

Uwagi końcowe

Intensywne badania prowadzone w ciągu ostatnich lat nad biosyntezą chinonów roślinnych pozwalają już dzisiaj opisać i z grubsza zlokalizować na terenie komórki szlak biosyntetyczny benzochinonów. Prace najbliższych kilku lat pozwolą prawdopodobnie wyjaśnić również drogi powstawania naftochinonów w roślinach.

Kwestią najmniej zbadaną pozostaje zatem dokładna lokalizacja chinonów w strukturach subkomórkowych i wynikające stąd, ich ewentualne powiązanie funkcjonalne z cząsteczkami białek.

LITERATURA

1. Bailey J. L., Whyborn A. G., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 163 (1963).
2. Bentley R., Lavate W. V., *J. Biol. Chem.* **240**, 532 (1965).
3. Crane F. L., *Biochemistry of Quinones*, Red. R. A. Morton, Academic Press, Londyn i Nowy Jork 1965, str. 183.
4. Crane F. L., Henninger M. D., Wood P. M., Rita Barr, *Biochemistry of Chloroplasts*, t. I, Red. T. W. Goodwin, Academic Press, Londyn i Nowy Jork 1966, str. 133.
5. Dilley R. A., Crane F. L., *Plant Physiol.* **38**, 452 (1964).
6. Dilley R. A., Crane F. L., *Plant Physiol.* **39**, 33 (1964).
7. Drabikowska A. K., *Post. Biochem.* **15**, 65 (1969).
8. Evans W. C., *J. Gen. Microbiol.* **32**, 177 (1963).
9. Glover J., *Biochemistry of Quinones*, Red. R. A. Morton, Academic Press, Londyn i Nowy Jork 1965, str. 207.
10. Goodwin T. W., *Biosynthetic Pathways in Higher Plants*, red. J. B. Pridham, Red., T. Swain, Academic Press, Londyn i Nowy Jork 1965.
11. Goodwin T. W., Mercer E. J., *Regulation of Lipid Metabolism*, *Biochem. Soc. Somposium No 24*, Red. J. K. Grant, Academic Press, Londyn i Nowy Jork 1963.
12. Greenwood A. D., Leech R. M., Williams J. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 69 (1963).
13. Griffith W. T., Threlfall D. R., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **90**, 40P (1964).
14. Harris R. S., *Vit. Horm.* **24**, 293 (1966).
15. Henninger M. D., Crane F. L., *Biochem.* **2**, 1168 (1963).
16. Kegel L. P., Crane F. L., *Nature* **194**, 1282 (1962).
17. Lichtenthaler H. K., *Progr. Photosyn. Res. Proc.*, Int. Congr. **1**, 304, Mtzner Helmut Verlag, Monachium 1969.
18. Lichtenthaler H. K., Calvin M., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 30 (1964).
19. McKenna M., Henninger M. D., Crane F. L., *Nature* **203**, 524 (1964).
20. Morton R. A., red., *Biochemistry of Quinones*, Academic Press, Londyn, Nowy Jork 1965.
21. Pridham J. B., red. *Terpenoids in Plants*, Academic Press, Londyn, Nowy Jork 1967.
22. Redfearn E. R., w *Biochemistry of Quinones*, Red. Morton R. A., Academic Press, Londyn, Nowy Jork 1965, str. 149.

23. Rudney H., Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid, *Biochem. Soc. Symposium No. 29*, Red. T. W. Goodwin, Academic Press, Londyn, Nowy Jork 1970.
24. Rudney H., Raman T. S., *Vit. Horm.* **24**, 531 (1966).
25. Thomson R. H., Naturally Occuring Quinones, Academic Press, Londyn, Nowy Jork 1971.
26. Threlfall D. R., Griffith W. T., *Biochemistry of Chloroplasts*, t. II, Red. T. W. Goodwin, Academic Press, Londyn, Nowy Jork 1967, str. 255.
27. Threlfall D. R., Whistance G. R., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **106**, 107 (1968).
28. Whistance G. R., Threlfall D. R., *Biochem. J.* **109**, 482 (1968).
29. Whistance G. R., Threlfall D. R., *Biochem. J.* **109**, 577 (1968).
30. Whistance G. R., Threlfall D. R., *Biochem. J.* **117**, 593 (1970).
31. Whistance G. R., Threlfall D. R., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **105**, 145 (1967).
32. Wolstenholme G. E. W., O'Connor C. M., red., Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, Churchill, Londyn 1961.

ZDZISŁAW WOJCIECHOWSKI *

Biosynteza karotenoidów

The Biosynthesis of Carotenoids

Recent investigations on the biosynthesis and metabolism of carotenoids in higher plants and photosynthetic bacteria are reviewed.

Karotenoidy — czterdziestowęglowe węglowodory terpenoidowe oraz ich pochodne tlenowe należą do związków szeroko rozpowszechnionych w roślinach wyższych i fotosyntetyzujących mikroorganizmach. Wiele typowo heterotroficznych mikroorganizmów, jak na przykład drożdże z rodzaju *Rhodotorula* (70), wytwarza również barwniki karotenoidowe. W roślinach wyższych karotenoidy występują we wszystkich tkankach, a w szczególności dużych ilościach w tkankach fotosyntetyzujących, gdzie zlokalizowane są one przede wszystkim w plastydach.

Biologiczna funkcja karotenoidów nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona, jednak powszechnie przypisuje się im ważną rolę w procesie fotosyntezy. Postuluje się między innymi udział karotenoidów w strukturze lamelli chloroplastowych (78), oraz absorpcji i przenoszeniu na chlorofil energii świetlnej (80). Karotenoidom przypisuje się także rolę w ochronie aparatu fotosyntetycznego przed utlenieniem (45) i w procesach przenoszenia tlenu (24, 46). Sugeruje się również, że niektóre karotenoidy są prekursorami kwasu abscysynowego i pokrewnych hormonów roślinnych (68, 69).

Z ważności funkcji, jakie przypisuje się karotenoidom w procesie fotosyntezy, wynika stosunkowo duże zainteresowanie zagadnieniem ich biosyntezy. Celem tego artykułu jest zapoznanie czytelnika z osiągnięciami ostatnich kilku lat na tym polu. Obszerniejsze omówienie wyników wcześniejszych badań znaleźć można w wielu wyczerpujących opracowaniach monograficznych (7, 28, 41, 74, 76).

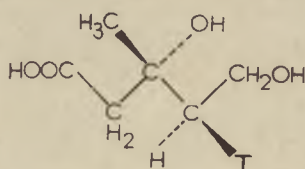
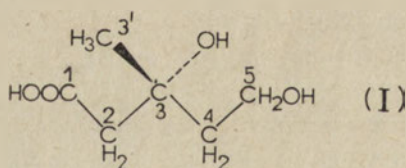
* Dr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: MVA — kwas mewalonowy, IPP — pirofosforan izopentenylu, DAPP — pirofosforan dwumetyloallilu, GPP — pirofosforan geranylu, FPP — pirofosforan farnezyłu, GGPP — pirofosforan geranogeranylu.

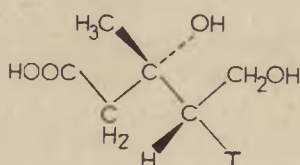
I. Zastosowanie podwójnie znakowanego (^{14}C i T) kwasu mewalonowego jako prekursora w badaniach nad biosyntezą karotenoidów

Postęp, jakiego dokonano w ostatnich latach w poznaniu biosyntezy karotenoidów i innych izoprenoidów, w znacznej mierze umożliwił zastosowanie jako prekursorów tych związków podwójnie, stereospecyficznie znakowanych preparatów kwasu mewalonowego* (27, 29, 37, 52). Niektóre przykłady zastosowania tych prekursorów w badaniach biosyntezy karotenoidów zostaną omówione w następnych rozdziałach. W tym miejscu podane będą jedynie pewne niezbędne wyjaśnienia teoretyczne.

W cząsteczce kwasu (3R)-mewalonowego (I), który jest wspólnym prekursorem wszystkich izoprenoidów, w tym również karotenoidów, znajdują się 3 grupy metylenowe. Atomy węgla tych grup są włączane do szkieletu karotenoidowego, natomiast niektóre z ich atomów wodoru ulegają eliminacji na różnych etapach biosyntezy. W reakcjach enzymatycznych polegających na eliminacji jednego z atomów wodoru z grupy metylenowej możliwe jest, zgodnie z zasadą Ogstona, stereospecyficzne usunięcie określonego atomu wodoru (pro-R lub pro-S według nomenklatury zaproponowanej przez H a n s o n a (36) dla oznaczenia pary jednakowych ligandów a i a' przy tetraedrycznym atomie $X_{aa'bc}$). Atomy wodoru są nierozróżnialne i z tego powodu badanie stereochemii eliminacji wodoru możliwe jest tylko wtedy, gdy jeden z tych atomów zostanie zastąpiony trytem lub deuterem. Powstaje w ten sposób nowe centrum asymetrii i w związku z tym możliwość istnienia dwóch stereoisomerów. Na przykład przez stereospecyficzne zastąpienie trytem jednego atomu wodoru grupy metylenowej C-4 w (3R)-MVA otrzymuje się (3R) [4R,4T]-MVA (II) lub (3R) [4S,4T]-MVA (III).



(II)



(III)

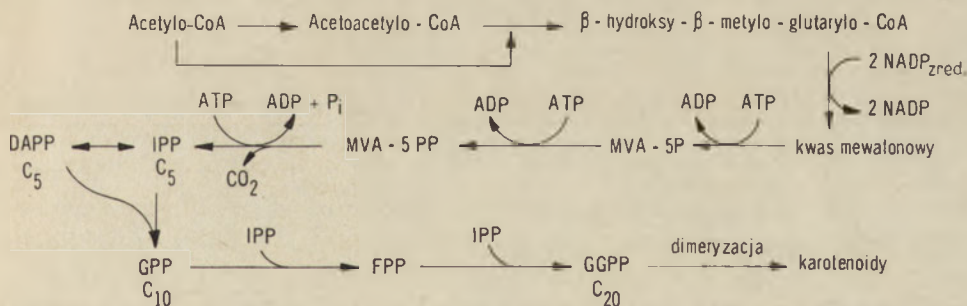
* Zasady oznaczania konfiguracji bezwzględnej i stosowana terminologia zgodne z systemem Cahn, Ingolda i Preloga zostały przedstawione przez J. Cieślaka (10).

Metody otrzymywania takich stereoizomerów opracowali przed kilku laty głównie Cornforth i wsp. (12, 13, 23). Obecnie większość stereospecyficznie znakowanych trytem preparatów kwasu mewanonowego jest dostępna w handlu.

Stereospecyficznie, w określonych pozycjach znakowany trytem MVA, a ponadto znakowany ^{14}C w pozycji 2, znalazł szerokie zastosowanie w badaniach stereochemii przemian polegających na eliminacji wodoru, podczas biosyntezy rozmaitych izoprenoidów, dla których MVA jest wspólnym prekursorem. Należy tu podkreślić, że wszystkie atomy węgla C-2 cząsteczek MVA, z których wytwarzane są na drodze biosyntezy szkielety terpenoidowe, włączają się do tych szkieletów. Zastosowanie jako prekursorów podwójnie znakowanych stereoizomerów MVA pozwala na śledzenie losów określonych atomów wodoru umożliwiając niejednokrotnie wyciągnięcie wniosków o mechanizmach zachodzących reakcji tylko na podstawie zmian stosunku $^{14}\text{C}/\text{T}$ w produktach biosyntezy, bez konieczności przeprowadzenia ich skomplikowanej, chemicznej degradacji.

II. Powstawanie układu C_{40}

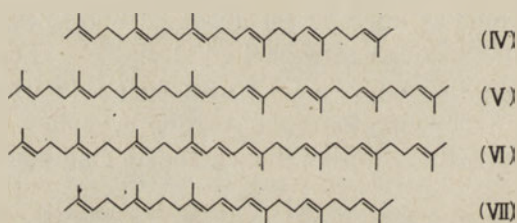
W ciągu ostatnich kilkunastu lat zgromadzono wiele danych potwierdzających przedstawioną na schemacie 1 drogę biosyntezy układów czteroterpenowych. Wykazano, że w karotenoidach powstających z 1- lub 2- ^{14}C -octanu i 2- ^{14}C -mewanonianu rozmieszczenie znakowanych atomów węgla jest zgodne z przedstawionym na schemacie ciągiem reakcji (4, 49, 62).



Schemat 1. Biosynteza 40-węglowych układów izoprenoidowych (wg 72)

Znakowane ^{14}C pirofosforany izoprenylowe: izopentenylu (IPP), geranylu (GPP), farnezyli (FPP) i geranylogeranylu (GGPP) przekształcające się w niecykliczne i cykliczne karotenoidy w bezkomórkowych preparatach z roślin wyższych i mikroorganizmów (3, 42, 58, 63, 66, 72, 73). Do niedawna wiele dyskusji wzbudzał problem struktury pierwszego 40-węglowego związku, powstającego bezpośrednio w wyniku dimeryzacji GGPP. Przez analogię do biosyntezy układów trójterpenowych, w której,

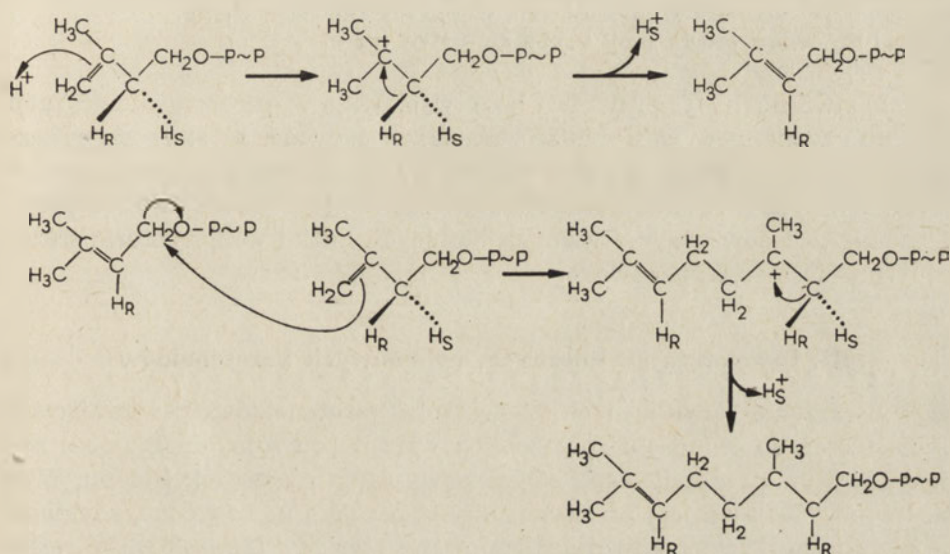
jak wcześniej wykazano, bezpośrednim produktem dimeryzacji FPP jest skwalen (IV), przyjmowano, że jest to 40-węglowy analog skwalenu — likopersen (V) (35). Likopersenu nie udało się jednak wykryć w większości organizmów, intensywnie wytwarzających karotenoidy, nawet w takich warunkach doświadczenia, w których należało oczekiwać nagromadzenia się 40-węglowego prekursora barwnych karotenoidów (18, 31, 51, 79). Z drugiej strony nagromadzenie fitoenu (VI) w komórkach niektórych mutantów roślin ubogich w barwne karotenoidy (11, 34) oraz w normalnych roślinach przy stosowaniu inhibitorów karotenogenezy (na przykład dwufenyloaminy (8)), przemawia za tym, że fitoen może być bezpośrednim produktem dimeryzacji GGPP. Ostatnio Tung-Ching Lee i Chichester (72) otrzymali częściowo oczyszczony preparat enzymatyczny z *Phycomyces blakesleeanus* katalizujący syntezę fitoenu z ^{14}C -GGPP. Przemiana ta nie wymaga zredukowanych nukleotydów nikotynamidoadeninowych ani innych zredukowanych koenzymów, podczas gdy w procesie dimeryzacji FPP do skwalenu zredu. NADP jest niezbędny. W czasie syntezy fitoenu z GGPP nie zachodzi zatem (w odróżnieniu od syntezy skwalenu) oksyredukcja, z czego należy wnioskować, że likopersen nie może być metabolitem pośrednim w tym procesie.



Interesujące w zestawieniu z powyższymi danymi są prace Suzuki i wsp. (67) nad barwnikami typu karotenoidowego ze *Staphylococcus aureus*, które — jak się przypuszcza — mają 30-węglowy szkielet. Mutant 209 P *S. aureus* nie wytwarzający — w odróżnieniu od szczepu dzikiego — tych barwników, nagromadza bezbarwny węglowodór, tak zwany fitoen bakteryjny, zbliżony spektralnie do fitoenu (64, 65). Związek ten nagromadza się również w komórkach szczepu dzikiego hodowanych na podłożu z dwufenyloaminą. Bliższe badania wykazały, że jest to 21,13-*cis*-heksametylotetrakozahęptaen (dehydroskwalen, VII) (67). Bakteryjny fitoen, jak wykazano, jest w komórkach *S. aureus* przekształcany do barwnych 30-węglowych analogów karotenoidów (43).

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono zagadnieniu stereochemii procesów enzymatycznych zachodzących w czasie syntezy fitoenu z kwasu mewalonowego. Goodwin i Williams (33) wykazali, że fitoen syntetyzowany w skrawkach korzenia marchwi z 2- ^{14}C [4S,4T]-MVA nie zawiera w ogóle trytu, podczas gdy w fitoenie syntetyzowanym

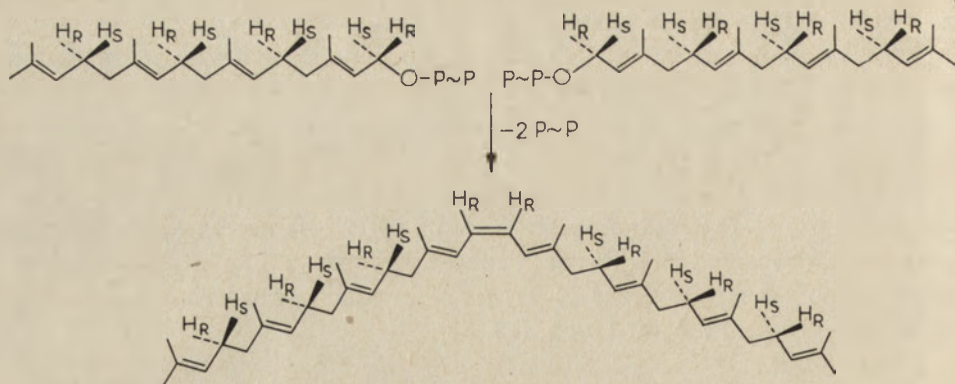
z $2\text{-}^{14}\text{C}[4\text{R},4\text{T}]\text{-MVA}$ stosunek $^{14}\text{C}/\text{T}$ jest taki sam jak w wyjściowym MVA. Taki sam stosunek $^{14}\text{C}/\text{T}$ znaleziono badając syntezę fitoenu w innych organizmach roślinnych (31, 32, 33, 83). Na tej podstawie wywnioskowano, że zarówno w czasie izomeryzacji IPP do DAPP, jak i podczas kolejnych reakcji kondensacji jednostek 5-węglowych (powstawanie GPP, FPP i GGPP) stereospecyficznie usuwany jest atom wodoru pro-S (pochodzący z C-4 MVA), natomiast atom pro-R jest zatrzymywany (schemat 2). Taką samą stereospecyficzność wykazują enzymy katalizujące analogiczne reakcje podczas biosyntezy skwalenu w wątrobie szczura, co wykazali Cornforth i wsp. (12, 53).



Schemat 2. Stereochemia izomeryzacji IPP do DAPP oraz kondensacji jednostek 5-węglowych.

H_R i H_S -atomy wodoru pro-R i pro-S z C-4 MVA.

Stereochemię enzymatycznej dimeryzacji GGPP do fitoenu w preparatach chloroplastów badała grupa Goodwina (6, 81, 82), stosując jako prekursorzy $2\text{-}^{14}\text{C}[5\text{R},5\text{T}]\text{-MVA}$ oraz $2\text{-}^{14}\text{C}[5\text{T}_2]\text{-MVA}$. Porównanie włączenia obu tych prekursorów do fitoenu wykazało że powstawanie centralnego wiązania podwójnego w cząsteczce fitoenu związane jest z eliminacją dwóch atomów wodoru przy C-1 każdej cząsteczki GGPP, które początkowo były atomami pro-S przy C₅ MVA (schemat 3). W badanych preparatach chloroplastów $2\text{-}^{14}\text{C}[5\text{R},5\text{T}]\text{-MVA}$ włącza się bowiem do GGPP i fitoenu bez utraty trytu (stosunek $^{14}\text{C}/\text{T}$ wynosi dla GGPP 4:4, dla fitoenu 8:8), natomiast gdy prekursorem jest $2\text{-}^{14}\text{C}[5\text{T}_2]\text{-MVA}$ przy przejściu od GGPP do fitoenu następuje utrata dwóch atomów trytu (stosunek $^{14}\text{C}/\text{T}$ wynosi 4:8 dla GGPP, natomiast 8:14 dla fitoenu) (6).



Schemat 3. Stereochemia biosyntezy fitoenu z GGPP.

H_R i H_S — atomy wodoru pro-R i pro-S z C-5 MVA (wg 6).

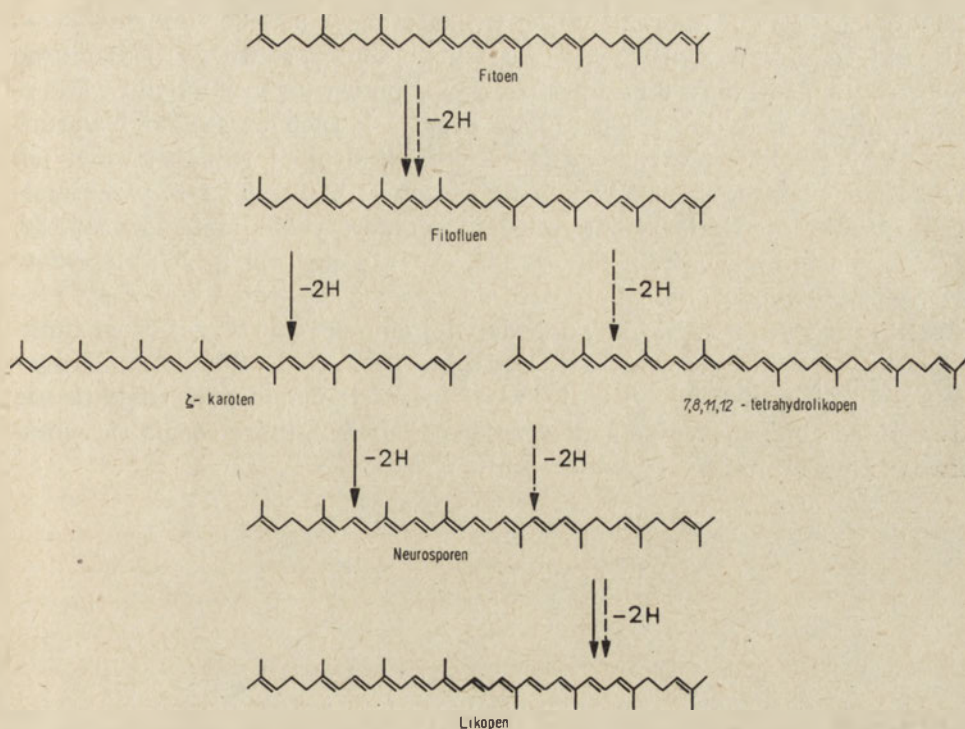
Jak stwierdzili Cornforth i wsp. (12), w procesie dimeryzacji FPP do skwalenu w wątrobie szczura także usuwane są stereospecyficznie dwa atomy wodoru, które były początkowo atomami pro-S przy C-5 MVA. I w tym przypadku istnieje zatem analogia pomiędzy stereospecyficznością układów enzymatycznych biorących udział w biosyntezie szkieletu trój- i czteroterpenowego.

III. Biosynteza acyklicznych, polienowych karotenoidów

Wytwarzanie acyklicznych barwnych karotenoidów zawierających w cząsteczce do jedenastu sprzężonych wiązań podwójnych (likopen) zachodzi w wyniku stopniowego odwodorowywania cząsteczek fitoenu. Wykazano, że ^{14}C -fitoenu jest przekształcany w bardziej nienasycone, acykliczne i cykliczne karotenoidy przez izolowane plastydy (2, 48, 63). W roślinach wyższych synteza likopenu z fitoenu przebiega na drodze zaproponowanej jeszcze w 1950 roku przez Portera i Lincolna (54), to jest poprzez fitofluen, ζ -karoten i neurosporen (20, 21, 55, 56) (schemat 4 — strzałki ciągłe). Niedawno wykazano, prowadząc badania na częściowo oczyszczonych preparatach enzymatycznych z chloroplastów szpinaku i chromoplastów owoców pomidora, że do wprowadzenia pierwszego podwójnego wiązania do cząsteczki fitoenu (przemiana fitoenu w fitofluen) konieczny jest NADP. Przekształcenie fitofluenu w likopen wymaga zarówno NADP jak i FAD (63).

Badania Williamsa i wsp. (81) nad biosyntezą likopenu z 2- ^{14}C [5R, 5T]- i 2- ^{14}C [5T₂]-MVA w owocach pomidora i liściach fasoli wykazały, że w czasie wprowadzania każdego nowego wiązania podwójnego do cząsteczki fitoenu zawsze eliminacji ulega tylko atom wodoru pro-R (z C-5 MVA), natomiast zachowywany jest atom pro-S.

Z ostatnich prac Daviesa (14, 15) wynika, że w *Rhodospirillum rubrum*, a być może także w innych mikroorganizmach, istnieje odmien-



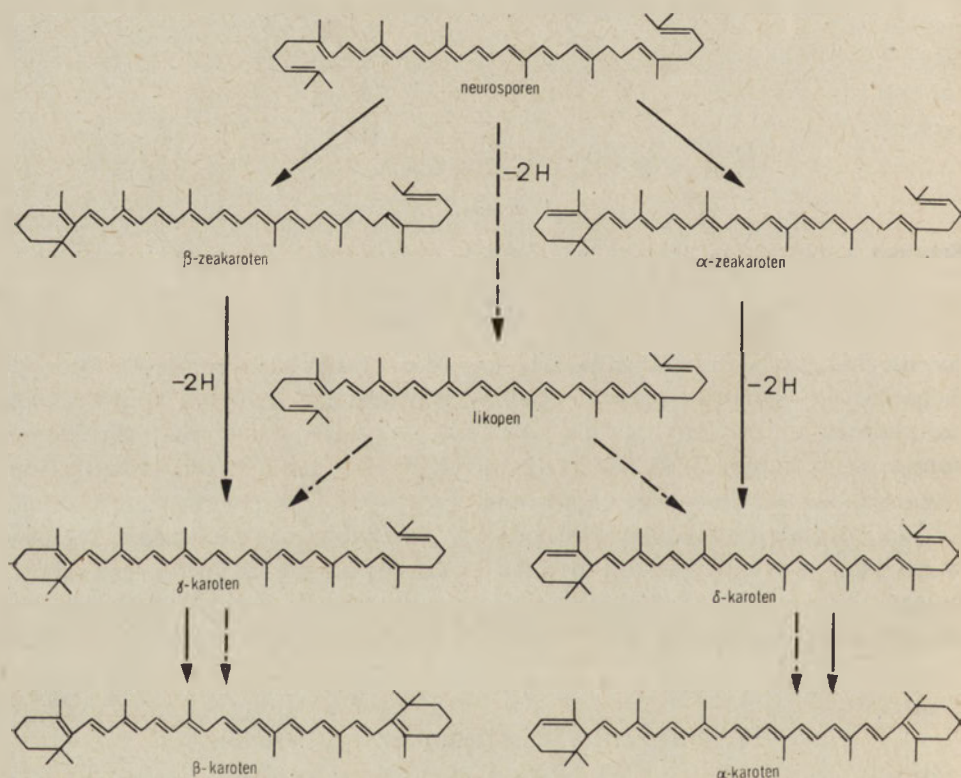
Schemat 4. Biosynteza likopenu w roślinach wyższych (strzałki ciągłe) i bakteriach fotosyntetyzujących (strzałki przerywane).

ny mechanizm wprowadzania wiązań podwójnych do cząsteczki fitoenu (schemat 4 — strzałki przerywane). W kulturach *R. rubrum* hodowanych na podłożu z dwufenyloaminą stwierdzono mianowicie nagromadzenie sprzężonego heptaenu — 7,8,11,12-tetrahydrolikopenu. W *R. rubrum* nie stwierdza się natomiast występowania γ -karotenu. Jak przypuszcza Davies, 7,8,11,12-tetrahydrolikopenu zastępuje w *R. rubrum* ζ -karoten. Różnica w sposobie wytwarzania likopenu u roślin wyższych i mikroorganizmów polegałaby więc na różnej kolejności wprowadzania wiązań podwójnych do cząsteczki fitofluenu.

IV. Biosynteza karotenoidów cyklicznych

Powszechnie przyjmuje się, że cykliczne związki karotenoidowe tworzą się z 40-węglowych acyklicznych prekursorów. Bezpośrednim prekursorem form cyklicznych jest najprawdopodobniej neurosporen lub likopen. Za neurosporenem przemawia fakt występowania w roślinach wytwarzających znaczne ilości cyklicznych karotenoidów niewielkich ilości α - i β -zeakarotenów, których struktura sugeruje, że są one pośrednikami

na drodze od neurosporenu do α - i β -karotenów (61, 84) (schemat 5 — strzałki ciągłe). W tym przypadku wytworzenie ostatniego podwójnego wiązania w pozycji 7—8 następowałoby już po utworzeniu układu cyklicznego (pierścień α - lub β -jononu) na drugim krańcu cząsteczki i warunkowałoby zamknięcie drugiego pierścienia. Z drugiej jednak strony, jak wykazało wielu autorów, likopen (znakowany ^{14}C lub T) jest przekształcany w β -karoten między innymi przez preparaty chloroplastów (22, 39, 47, 79), plastydy owoców pomidora (39, 47, 79) i ekstrakt z tych plastydów (47, 48), prawdopodobnie bezpośrednio poprzez γ -karoten (schemat 5 — strzałki przerywane). Najprawdopodobniej obie opisane wyżej drogi funkcjonują w roślinach równoległe. Badania Tomesa (71) oraz Raymond i wsp. (57) wykazują, że w owocach pomidorów znajdują się dwa układy enzymatyczne syntetyzujące β -karoten, które różnią się wrażliwością na inhibitory i temperaturę.

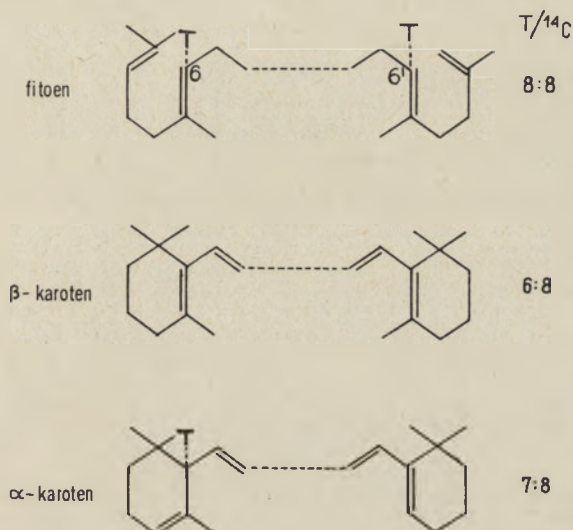


Schemat 5. Drogi biosyntezy α - i β -karotenu.

Do niedawna zakładano możliwość biologicznej izomeryzacji karotenoidowych pochodnych β -jononu do pochodnych α -jononu lub odwrotnie. Anderson i Porter (1) w przedstawionym w 1962 roku schemacie biosyntezy karotenoidów założyli, że α -karoten powstaje w roślinach

w wyniku izomeryzacji β -karotenu. Izomeryzację α -karotenu do β -karotenu można łatwo przeprowadzić metodami chemicznymi (44).

Pomysłowe eksperymenty przeprowadzone przez Goodwina, Williamsa i Brittona (31, 32, 84) wyjaśniły, że biosynteza pierścieni α - i β -jonowych odbywa się niezależnie i wzajemne przechodzenie tych układów na drodze izomeryzacji w roślinach nie zachodzi. Punktem wyjścia w tych badaniach było stwierdzenie, że w owocach pomidorów, skrawkach korzenia marchwi i kulturach *Phycomyces blakesleeanus* (3RS) 2- ^{14}C [4R,4T]-MVA ($T/^{14}\text{C} = 1:1$) włącza się do fitoenu bez utraty trytu ($T/^{14}\text{C} = 8:8$) (14). Utrata trytu nie następuje również w czasie stopniowego odwodorowywania powstałego fitoenu do likopenu (8). Natomiast w syntetyzowanym z tego samego substratu β -karotenie $T/^{14}\text{C}$ wynosi 6:8 (31, 84), a w α -karotenie 7:8 (32, 84) (schemat 6).



Schemat 6. Biosynteza karotenoidów z 2- ^{14}C [4R,4T]-MVA ($T/^{14}\text{C} = 1:1$).

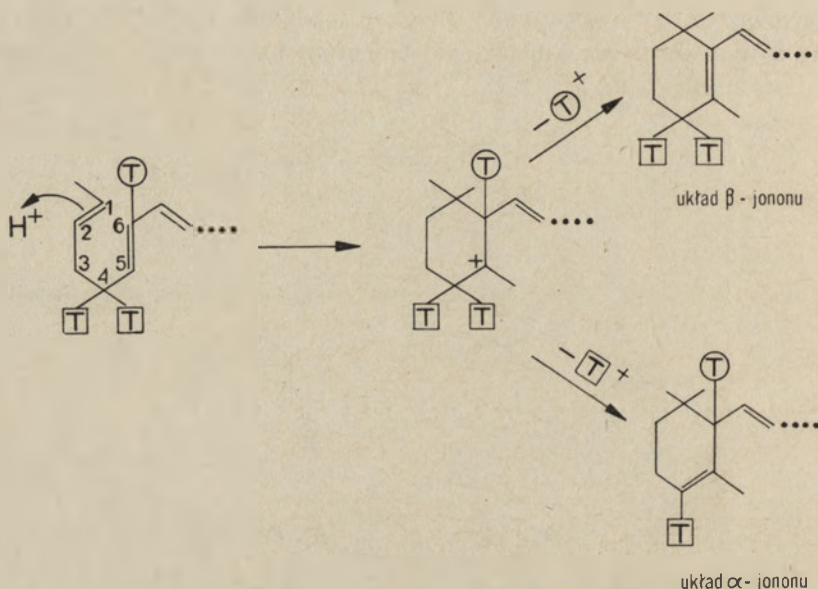
Na schemacie zaznaczono wyłącznie atomy trytu przy C-6 i C-6' powstałych związków. Obok podano stwierdzone doświadczalnie wartości $T/^{14}\text{C}$ (wg 84).

Wynika stąd, że w czasie zamykania jednego pierścienia β -jonowego następuje utrata jednego atomu wodoru (z pozycji C-6 acyklicznego prekursora), natomiast zamknięcie pierścienia α -jonowego nie jest związane z eliminacją atomu wodoru z C-6 prekursora. Wyklucza to możliwość powstawania α -karotenu na drodze izomeryzacji β -karotenu. Możliwość procesu odwrotnego, to jest izomeryzacji układu α -jonowego do β -jonowego, wykluczono podając skrawkom korzenia marchwi (3RS) 2- ^{14}C (2T₂)-MVA ($T/^{14}\text{C} = 2:1$). Okazało się, że wytworzony β -karoten zawierał więcej trytu ($T/^{14}\text{C} = 12:8$), niż α -karoten ($T/^{14}\text{C} = 11:8$). Gdyby β -karoten powstał w wyniku izomeryzacji α -karotenu, stosunek $T/^{14}\text{C}$ w β -karotenie nie mógłby być wyższy niż w α -karotenie, tj. nie mógłby wynosić

więcej niż 11:8. Pierścienie α - i β -jonowe są więc syntetyzowane niezależnie.

Na podstawie omówionych wyżej wyników Williams i wsp. (84) podali następujący mechanizm zamykania pierścieni α - i β -jonowych (schemat 7):

1. Cyklizacja acyklicznego prekursora inicjowana jest atakiem protonu przy C-2 prekursora;
2. Stabilizacja powstałego nietrwałego jonu karboniowego następuje przez utratę protonu z C-6 (powstaje układ β -jononu) lub z C-4 (powstaje układ α -jononu).



Schemat 7. Mechanizm cyklizacji do układów α - i β -jonowych (wg 84).

⊕ — atom pochodzący z [4R,4T]-MVA.

⊔ — atomy trytu pochodzące z [2T₂]-MVA

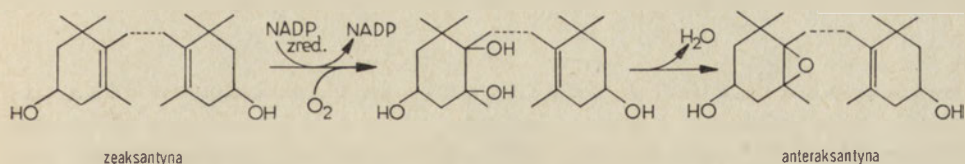
V. Powstawanie ksantofili

Szeroko rozpowszechnione w roślinach wyższych tlenowe pochodne węglowodorów karotenowych reprezentują rozmaite typy związków. W roślinach wyższych powszechnie występują mono- i dwuwodorotlenowe alkohole oraz epoksydy karotenoidowe. W fotosyntetyzujących bakteriach wykryto szereg ketokarotenoidów. Znane są również kwasy karotenoidowe. Ponadto wykryto rozmaite złożone pochodne alkoholi karotenoidowych: etery metylowe, estry i glikozydy. Z najnowszych badań (26, 38, 77) wynikałoby, że występowanie glikozydów karotenoidowych jest bardziej powszechne niż do niedawna sądzono.

Ogromna większość poznanych naturalnych, zawierających tlen karotenoidów to pochodne węglowodorów, o dużym stopniu nienasycenia (likopenu, neurosporenu, α - i β -karotenu). W ostatnich latach stwierdzono jednak występowanie tlenowych pochodnych fitoenu i fitofluenu. Między innymi wykryto 1,2-epoksydy fitoenu, fitofluenu i ζ -karotenu w pomidorach (5) oraz metoksy pochodne fitoenu i fitofluenu w kulturach *Rhodospirillum rubrum* (50). Wprowadzenie atomów tlenu zachodzić więc może bezpośrednio po wytworzeniu układu czterdziestowęglowego.

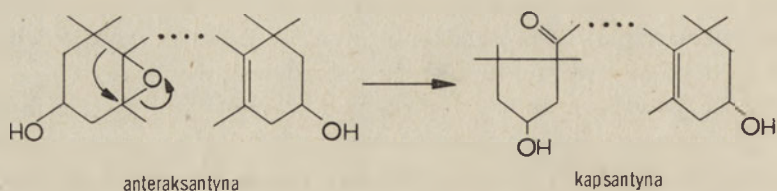
Większość powszechnie występujących w zielonych roślinach ksantofili jest pochodnymi α - lub β -karotenu zawierającymi grupę wodorotlenową przy C-3 lub C-3'. Yamamoto i wsp. (86), badając biosyntezę luteiny (3,3'-dwuhydroksy α -karotenu) w *Chlorella vulgaris* przy użyciu $^{18}\text{O}_2$ wykazali, że tlen cząsteczkowy jest niezbędny w procesie hydroksylacji. W biosyntezie luteiny i innych alkoholi karotenoidowych biorą więc prawdopodobnie udział oksygenazy. Ostatnio Walton i wsp. (75) podjęli badania nad mechanizmem reakcji hydroksylacji karotenoidów w siewkach kukurydzy i owocach *Physalis alkekengi*, stosując (3RS)2- ^{14}C [5R,5T]-MVA oraz (3RS)2- ^{14}C [5T₂]-MVA jako prekursorzy ksantofili. Przydatność tych prekursorów do badań nad mechanizmem hydroksylacji wynika stąd, że grupa metylenowa C-3 i C-3' w cyklicznych węglowodorach karotenowych, które — jak się przyjmuje — są bezpośrednimi prekursorami ksantofili, pochodzi z grupy metylenowej C-5 kwasu mewalonowego. Przeprowadzone badania pokazały, że w czasie biosyntezy luteiny i β -kryptokszantyny (3-hydroksy- β -karotenu) grupy -OH wprowadzane są przez stereospecyficzne zastąpienie atomu wodoru, który był początkowo atomem wodoru pro-R przy C-5 MVA. Natomiast atom wodoru pro-S (z C-5 MVA) nie ulega eliminacji w czasie biosyntezy wymienionych ksantofili. Świadczy to wyraźnie o tym, że biosynteza alkoholi karotenoidowych nie zachodzi poprzez odpowiednie ketopochodne, gdyż wtedy musiałaby nastąpić utrata obu atomów wodoru znajdujących się przy C-3.

Biosynteza powszechnie występujących w roślinach wyższych 5,6-epoksydów karotenoidowych (na przykład anteraksantyny i wiolaksantyny) również przebiega z udziałem tlenu cząsteczkowego (85, 87). Postulowany mechanizm tych reakcji przedstawiono na schemacie 8. Wytwarzanie epoksydów jest prawdopodobnie procesem odwracalnym, z czym niektórzy badacze wiążą udział ksantofili w transporcie tlenu w tkankach fotosyntetyzujących (46).



Schemat 8. Przemiana zeaksantyny do anteraksantyny (wg 85).

Występujące w niektórych roślinach, na przykład w *Capsicum annuum*, karotenoidy zawierające pierścienie cyklopentanowe (na przykład kapsantyna) wytwarzane są z odpowiednich 5,6-epoksydów, prawdopodobnie w reakcjach przegrupowania pinakolinowego (9, 19) (schemat 9).

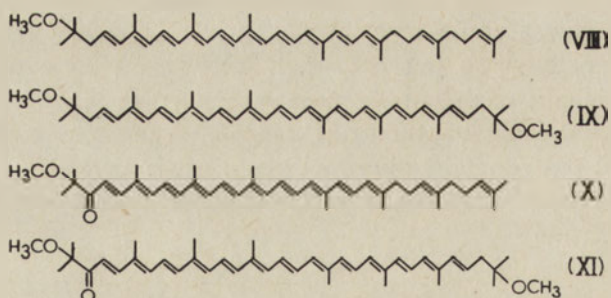


Schemat 9. Przypuszczalny mechanizm przemiany anteraksantyny do kapsantyny w *Capsicum annuum* (wg 18).

VI. Biosynteza metoksykarotenoidów w bakterii fotosyntetyzujących

Stosunkowo dobrze poznano strukturę i drogi biosyntezy karotenoidów bakterii fotosyntetyzujących z rodzajów *Rhodospirillum* i *Rhodopseudomonas*. Mikroorganizmy te zawierają wiele acyklicznych, jedno- i dwumetoksy karotenoidów (15, 16, 17). W warunkach beztlenowych w komórkach tych bakterii wytwarzany jest przede wszystkim sferoiden (VIII) i spirylloksantyna (IX) (30). Tlen grup metoksylowych tych związków najprawdopodobniej pochodzi z wody (40, 60).

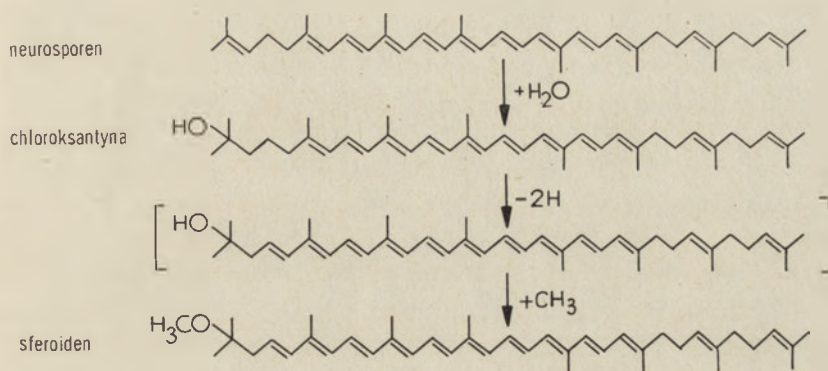
W warunkach aerobowych sferoiden i spirylloksantyna przekształcane są w odpowiednio pochodne ketonowe: sferoidenon (X) i 2-ketospirylloksantynę (XI) (25, 40, 60). Badania z zastosowaniem $^{18}\text{O}_2$ wykazały, że tlen grup ketonowych w tych związkach pochodzi z tlenu cząsteczkowego (59).



Z obszernych badań dynamiki powstawania karotenoidów bakteryjnych przeprowadzonych przez Eimhjellen i Jensen (25) oraz Jensen i wsp. (40) wynika, że w bakterii fotosyntetyzujących sferoiden wytwarzany jest z neurosporenu a spirylloksantyna z likopenu.

Schemat 10 przedstawia przykładowo biosyntezę sferoidenu z neurosporenu w *Rhodospseudomonas spheroides* (40).

Analogiczne reakcje hydratacji końcowej grupy izopropylidenowej, odwodowania w pozycji 3,4 i metylowania grupy hydroksylowej, zachodzące kolejno na obu krańcach cząsteczki likopenu, prowadzą do wytworzenia spirylloksantyny, która jest głównym karotenoidem w *Rhodospirillum rubrum* (40).

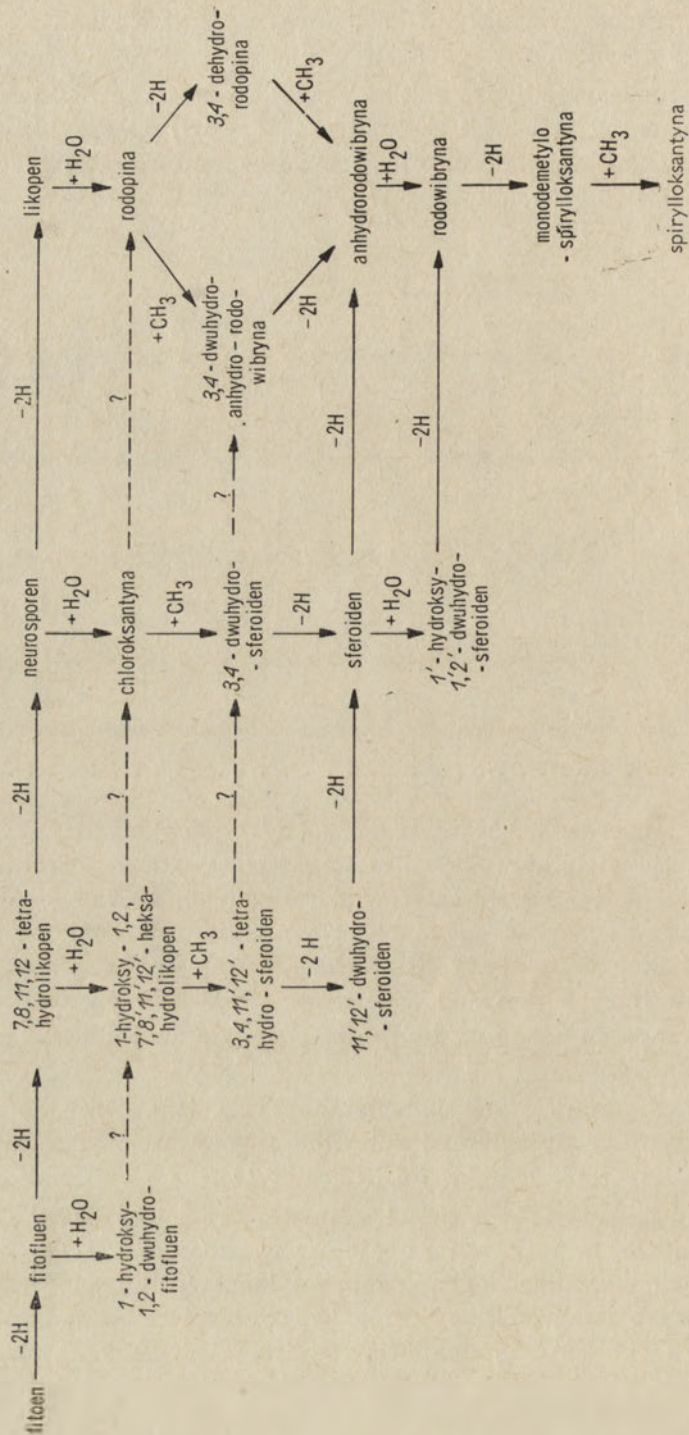


Schemat 10. Biosynteza sferoidenu w *Rhodospseudomonas spheroides* (wg 39 i 40).

Ostatnio stwierdzono, że w komórkach wymienionych mikroorganizmów występuje wiele hydroksy- i metoksykarotenoidów — pochodnych fitoenu, fitofluenu i 7,8,11,12-czterowodorolikopenu, które — jak wynika z przeprowadzonych prac, mogą być również naturalnymi prekursorami sferoidenu i spirylloksantyny (14, 15). Związki te nagromadzają się w szczególnie dużych ilościach w kulturach hodowanych na podłożu zawierającym dwufenyloaminę, która jest znanym inhibitorem przemiany fitoenu do likopenu.

Na podstawie powyższych danych Davies (15) uważa, że w rzeczywistości biosynteza sferoidenu i spirylloksantyny zachodzi wieloma drogami równoległe funkcjonującymi (schemat 11).

Przedstawione na schemacie 11 rozmaite drogi biosyntezy sferoidenu i spirylloksantyny w *R. rubrum* obejmują w istocie trzy tylko typy reakcji: hydratację końcowych grup izopropylidenowych, metylowanie grup hydroksylowych i odwodowywanie (wytworzenie wiązań podwójnych). Zdaniem Daviesa (15) wielotorowość dróg biosyntezy sferoidenu i spirylloksantyny w bakteriach fotosyntetyzujących wynika z niskiej specyficzności substratowej enzymów, co powoduje, że nie tylko neurosporen i likopen, lecz także ich mniej nienasycone prekursory ulegają reakcjom hydratacji i metylowania.



Schemat 11. Drogi biosyntezy sferoidenu i spirylloksantyny w *Rhodospirillum rubrum* (wg 15).

LITERATURA

1. Anderson D. G., Porter J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 509 (1962).
2. Beeler D. A., Porter J. W., *J. Biochim. Biophys. Res. Comm.* **8**, 367 (1962).
3. Beeler D. A., Porter J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 167 (1963).
4. Braithwaite G. O., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **76**, 194 (1960).
5. Britton G., Goodwin T. W., *Phytochem.* **8**, 2257 (1969).
6. Buggy M. J., Britton G., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **114**, 641 (1969).
7. Burnett J. H., w *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, New York 1965, str. 75.
8. Chichester C. O., Nakayama T. O. M., w *Biogenesis of Natural Compounds*, red. P. Bernfeld, Pergamon Press, Oxford 1963, str. 475.
9. Cholnoky L., Györgyfy K., Nagy E., Panczel M., *Nature* **178**, 410 (1956).
10. Cieślak J., *Post. Biochem.* **7**, 975 (1961).
11. Claes H., *Z. Naturforsch.* **146**, 4 (1959).
12. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Donninger C., Popjak G., *Proc. Roy. Soc. B.* **193**, 492 (1966).
13. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Popjak G., Yenogoyan K., *J. Biol. Chem.* **241**, 3970 (1966).
14. Davies B. H., *Biochem. J.* **116**, 93 (1970).
15. Davies B. H., *Biochem. J.* **116**, 101 (1970).
16. Davies B. H., Holmes E. A., *Biochem. J.* **113**, 35p (1969).
17. Davies B. H., Holmes E. A., Loeber D. E., Toube T. P., Weedon B. C. L. *J. Chem. Soc. C.*, str. 1266 (1969).
18. Davies B. H., Jones D., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **87**, 326 (1963).
19. Davies B. H., Matthews S., Kirk J. T. O., *Phytochem.* **9**, 797 (1970).
20. Davis J. B., Jackman L. M., Siddons P. T., Weedon B. C. L., *Proc. Chem. Soc.* str. 261 (1961).
21. Davis J. B., Jackman L. M., Siddons P. T., Weedon B. C. L., *J. Chem. Soc. C.*, str. 2154 (1966).
22. Decker K., Uehlke H., *Z. Physiol. Chem.* **323**, 61 (1961).
23. Donninger C., Popjak G., *Proc. Roy. Soc. B* **163**, 465 (1966).
24. Dorough G. D., Calvin M., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 2362 (1951).
25. Eimhjellen K. E., Jensen S. L., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 21 (1964).
26. Francis G. W., Hertzberg S., Andersen K., Jensen S. L., *Phytochem.* **9**, 629 (1970).
27. Goad L. J., w *Natural Substances formed biologically from Mevalonic Acid*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London, New York 1970, str. 45.
28. Goodwin T. W., w *Biosynthetic Pathways in Higher Plants*, red. J. B. Pridham i T. Swain, Academic Press, London, New York 1965, str. 37.
29. Goodwin T. W., *Pure and Appl. Chem.* **20**, 483 (1968).
30. Goodwin T. W., Osman H. G., *Biochem. J.* **53**, 541 (1953).
31. Goodwin T. W., Williams R. J. H., *Biochem. J.* **94**, 5c (1965).
32. Goodwin T. W., Williams R. J. H., *Biochem. J.* **97**, 28c (1965).
33. Goodwin T. W., Williams R. J. H., *Proc. Roy. Soc. B.* **163**, 515 (1966).
34. Griffiths M., Stanier R., *J. Gen. Microbiol.* **14**, 689 (1956).
35. Grob E. C., Kirschner K., Lynen F., *Chimia* **15**, 308 (1961).
36. Hanson K. R. J., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2731 (1966).
37. Hemming F. W., w *Natural Substances formed biologically from Mevalonic Acid*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London, New York 1970, str. 105.

38. Hertzberg S., Jensen S. L., *Acta Chem. Scand.* **21**, 15 (1967).
39. Hill H. M., Rogers L. J., *Biochem. J.* **113**, 31p (1969).
40. Jensen S. L., Cohen-Bazire G., Stanier R. Y., *Nature* **192**, 1168 (1961).
41. Jensen S. L., Jensen A., w *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, tom VIII, red. R. T. Holman, Pergamon Press, Oxford, London 1966, str. 129.
42. Jungalwala F. B., Porter J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **119**, 210 (1967).
43. Kakutani Y., Suzue G., Tanaka S., *J. Biochem. (Tokyo)* **56**, 195 (1964).
44. Karrer P., Juckner E., *Helv. Chim. Acta* **30**, 266 (1947).
45. Krinsky N. I., w *Biochemistry of Chloroplasts*, tom I, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London, New York 1966, str. 423.
46. Krinsky N. I., w *Photophysiology, Current Topics*, tom. III, red. A. C. Giese, Academic Press, New York, London 1968, str. 123.
47. Kushwaha S., Subbarayan C., Beeler D. A., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **244**, 3635 (1969).
48. Kushwaha S., Suzue G., Subbarayan C., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **245**, 4708 (1971).
49. Lynen F., Agranoff B. W., Eggerer H., Hennig U., Moslein E. M., *Angew Chem.* **71**, 657 (1959).
50. Malhotra H. C., Britton G., Goodwin T. W., *Phytochem.* **9**, 2369 (1970).
51. Mercer E. I., Davies B. H., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **87**, 317 (1963).
52. Popjak G., w *Natural Substances formed biologically from Mevalonic Acid*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London, New York 1970, str. 17.
53. Popjak G., Cornforth J. W., *Biochem. J.* **101**, 553 (1966).
54. Porter J. W., Lincoln R. E., *Arch. Biochem.* **27**, 390 (1950).
55. Purcell A. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 606 (1964).
56. Purcell A. E., Thompson G. A., Bonner J., *J. Biol. Chem.* **234**, 1081 (1959).
57. Raymundo L. C., Griffiths A. E., Simpson K. L., *Phytochem.* **9**, 1239 (1970).
58. Shah D. V., Feldbruegge D. H., Houser A. R., Porter J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 124 (1968).
59. Shneour E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 510 (1962).
60. Shneour E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 534 (1962).
61. Simpson K. L., Nakayama T. O. M., Chichester C. O., Abstr. 1-st Meet. Fed. Europ. Biochem. Soc., London 1964, str. 57.
62. Steele W. J., Gurin S., *J. Biol. Chem.* **235**, 2778 (1960).
63. Subbarayan C., Kushwaha S. C., Suzue G., Porter J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 547 (1970).
64. Suzue G., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 180 (1960).
65. Suzue G., *J. Biochem. (Tokyo)* **51**, 246 (1962).
66. Suzue G., Porter J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **176**, 653 (1969).
67. Suzue G., Tsukada K., Tanaka S., *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 88 (1968).
68. Taylor H. F., Burden R. S., *Phytochem.* **9**, 2271 (1970).
69. Taylor H. F., Smith T. A., *Nature* **215**, 1513 (1967).
70. Tefft R. E., Goodwin T. W., Simpson K. L., *Biochem. J.* **117**, 921 (1970).

71. Tomes M. L., *Bot. Gaz.*, **124**, 180 (1963).
72. Tung-Ching Lee, Chichester C. O., *Phytochem.* **8**, 603 (1969).
73. Varma T. N. R., Chichester C. O., *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 265 (1962).
74. Waller G. R., w *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, tom X, red. R. T. Holman, Pergamon Press, Oxford, London 1969, str. 194
75. Walton T. J., Britton G., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **112**, 383 (1969).
76. Weddon B. C. L., w *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, New York 1965, str. 75.
77. Weeks O. B., Andrews A. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 284 (1970).
78. Weier T. E., Benson A. A., w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, tom I, Academic Press, London, New York 1966, str. 91.
79. Wells L. W., Schelbe W. J., Porter J. W., *Federation Prod.* **23**, 426 (1964).
80. Whittingham A., w *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, red. T. W. Goodwin, Academic Press, London, New York 1965, str. 357.
81. Williams R. J. H., Britton G., Charlton J. M., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **104**, 767 (1967).
82. Williams R. J. H., Britton G., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **101**, 7p (1966).
83. Williams R. J. H., Britton G., Goodwin T. W., *Biochim. Biophys. Acta* **124**, 200 (1966).
84. Williams R. J. H., Britton G., Goodwin T. W., *Biochem. J.* **105**, 99 (1967).
85. Yamamoto H. Y., Chichester C. O., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 303 (1965).
86. Yamamoto H. Y., Chichester C. O., Nakayama T. O. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 645 (1962).
87. Yamamoto H. Y., Nakayama T. O. M., Chichester C. O., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 168 (1962).

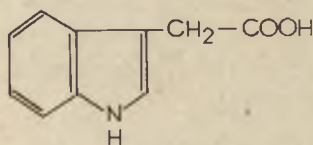
ANNA RYCHTER *

Współczesne poglądy na mechanizm działania auksyn i giberelin

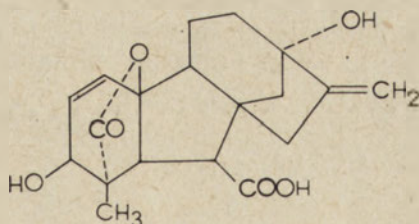
The Present Notions on the Mechanisms of Action of Auxins and Gibberellins

The mechanism of plant growth regulators action on the gene level is discussed and the recent discoveries postulating the other possibilities of auxin and gibberellin action are presented.

Wiadomo od wielu lat, że czynniki natury chemicznej mogą wpływać na procesy fizjologiczne roślin. Zarówno najdawniejsze obserwacje dotyczące żywienia mineralnego roślin, jak i ostatnie badania, związane z wpływem zanieczyszczeń atmosferycznych i glebowych, sprowadzają się do stwierdzenia, że obecność niektórych składników w środowisku powoduje zmiany składu chemicznego komórki roślinnej i odmienny przebieg procesów metabolicznych. Badania nad mechanizmem powstawania tych zmian weszły na nowe tory z chwilą odkrycia endogennych czynników chemicznych regulujących procesy fizjologiczne: auksyn (wzór I), giberelin (wzór II), cytokinin (wzór III), endogennych inhibitorów z grupy kwasu abscysynowego (wzór IV) i szeregu innych. Widoczne na wzorach struktury reprezentują tylko przedstawiciele omawianych klas regulatorów. Określa się je wspólną nazwą roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju lub hormonów roślinnych.



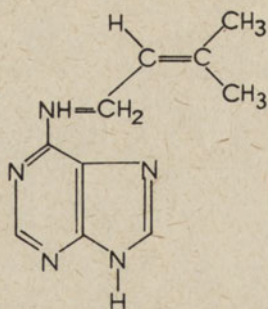
I Kwas indoliloctowy



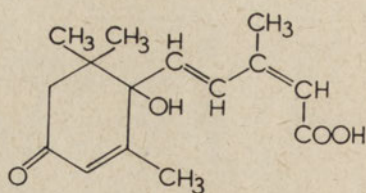
II Giberelina A₃

* dr, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: IAA — kwas β -indoliloctowy, GA — giberelina, 2,4-D — kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy, mRNA — kwas rybonukleinowy informacyjny



III 6(γ,γ - dwumetyloalli(aminio)puryna



IV Kwas absycynowy

Poznanie budowy chemicznej hormonów roślinnych niewiele jednak do tej pory pomogło w zrozumieniu funkcji jakie pełnią one w roślinie. Efekty działania hormonów są różnorodne, a niekiedy różne hormony powodują podobne reakcje rośliny. Auksyny na przykład nie tylko powodują wydłużanie się komórek, lecz również mogą wpływać na podziały komórkowe. Cytokininy przede wszystkim wywołują podziały komórkowe, lecz mogą także powodować wydłużanie się komórek (na przykład w tkance liściowej) (77). Roślinne regulatory wzrostu i rozwoju działają poza tym w pewnej kolejności; cytokininy i gibereliny dominują raczej we wczesnych stadiach rozwoju rośliny, podczas gdy auksyny działają nieco później (62, 119). Stężenie hormonów w roślinie zmienia się w czasie jej rozwoju. Auksyny, gibereliny i cytokininy współdziałają ze sobą. Wzrost lub spadek stężenia któregoś z regulatorów wpływa na efekty działania innych hormonów (83).

Przyjmuje się, że regulacja szybkości procesów fizjologicznych zachodzących w roślinie a nawet powstawanie nowych form morfologicznych polega na względnym zmniejszeniu lub zwiększeniu aktywności enzymów już istniejących, bądź na pojawianiu się nowych aktywności enzymatycznych. Z licznych badań wynika, że właśnie jednym z przejawów działania hormonu jest zwiększanie się lub zmniejszanie aktywności enzymów.

Wyjaśnienie mechanizmu biosyntezy białka było przyczyną podjęcia szeregu badań nad udziałem w nim roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju. Najwięcej prac dotyczy najlepiej zbadanych hormonów roślinnych — auksyn i giberelin, toteż tym dwu grupom związków poświęcony jest niniejszy artykuł.

I. Auksyny

Kwas β-indoliloctowy (IAA) jest najdawniej znanym regulatorem wzrostu i rozwoju roślin. Związek ten oraz niektóre jego pochodne zaliczono do grupy auksyn. Najlepiej poznanym przejawem biologicznym działania auksyn jest szybsze wydłużanie się komórek roślinnych. Nie-

mniej mechanizm tego procesu i charakter pierwszego akceptora auksyny są do tej pory w sferze hipotez. W procesie wydłużania się komórki bezsporna jest rola kwasów nukleinowych, natomiast coraz częściej pojawiają się prace wyrażające wątpliwości czy wpływ auksyn na syntezę kwasów nukleinowych i białek jest efektem pierwszorzędowym. Czy auksyny działają na poziomie genu? Co jest pierwszym akceptorem auksyny i jaki jest mechanizm jej działania?

Zależność między działaniem egzogennej auksyny a metabolizmem komórki po raz pierwszy wykazał Masuda (60), który zauważył, że wydłużanie się koleoptyli owsa pod wpływem auksyny zostaje zahamowane, jeśli doda się do środowiska inkubacyjnego rybonukleazy. Wskazywało to na zależność między syntezą RNA i białek a procesem wydłużania się komórek pod wpływem auksyn. W kilka lat później Nooden i Thimann (79) oraz Key (48) wykazali przy użyciu inhibitorów syntezy RNA i białek, że ciągła synteza RNA i białka jest niezbędnym warunkiem wydłużania się komórek roślinnych zarówno w obecności jak i braku podanych z zewnątrz auksyn. Hamowanie wydłużania się komórek jest równoległe do procesu hamowania biosyntezy białek mierzonego intensywnością włączania ^{14}C -aminokwasów (80). Auksyny w stężeniach pobudzających wydłużanie się komórek hipokotyli soi powodowały również szybsze włączanie ^{14}C -nukleotydów do RNA, podczas gdy wyższe stężenia auksyn, hamujące wydłużanie się komórek, hamowały także włączanie radioaktywnych nukleotydów do RNA (53). Zmiany poziomu RNA pod wpływem auksyny były nieznaczne, natomiast intensywność syntezy RNA zwiększała się 2—3-krotnie (15, 53, 106, 108, 109, 120). Dokładniejsze badania rodzaju syntetyzowanego RNA, niezbędnego w procesie wydłużania się komórek, doprowadziły do wniosku, że charakterystyka tego RNA odpowiada charakterystyce informacyjnego RNA (51, 57, 66, 67). Wniosek ten potwierdziły również doświadczenia prowadzone przy użyciu inhibitorów biosyntezy RNA (49, 50). Wykazano mianowicie, że aktynomycyna D w niskich stężeniach (inhibitor hamujący proces transkrypcji) oraz 5-fluorouracyl nie mają wpływu na uwarunkowane przez auksynę wydłużanie się komórek hamując równocześnie syntezę RNA w 30—60%.

Dalsze badania wykazały, że frakcja RNA, którego biosyntezy nie hamują niskie stężenia aktynomycyny D i 5-fluorouracylu, jest frakcją o dużej zawartości AMP (52). Bogaty w AMP RNA ma wiele własności wskazujących na to, że jest to frakcja RNA informacyjnego (40, 57).

Key i Ingle (52) sądzą zatem, że do wydłużania się komórek niezbędny jest tylko RNA o dużej zawartości AMP, a nie RNA rozpuszczalny lub rybosomalny. Natomiast ogólnego wzrostu zawartości RNA obserwowanego pod wpływem auksyn nie można wiązać z bezpośrednim wpływem hormonu na wydłużanie się komórek.

Zahamowanie procesu wydłużania się komórek po dodaniu z zewnątrz któregoś z inhibitorów biosyntezy RNA nie jest natychmiastowe, a zwykle

opóźnione o kilka godzin. Przyczynami opóźnionego działania aktywnomycyny D zajęli się *Penny* i *Galston* (86). Stwierdzili oni, że w pierwszym, krótkim okresie indukowanego przez auksyny wydłużania się komórek łodyg grochu nie jest konieczna synteza RNA *de novo*. Przypuszczają oni, że istnieje mRNA, z którym auksyna oddziałuje bezpośrednio lub za pośrednictwem kofaktora białkowego. Ze względu na krótki okres półtrwania mRNA dalsza jego synteza byłaby niezbędna do podtrzymania wydłużania się komórek. Opóźnienie działania aktywnomycyny można by tłumaczyć w ten sposób, że inhibitor ten hamuje syntezę mRNA, natomiast nie ma wpływu na istniejący już w komórce mRNA. Hipotezę tę popierają dane *Masudy* i *Yanagishima* (68). Jednak przeciwko roli mRNA jako pierwszego akceptora przemawia fakt, że działaniem rybonukleazy nie można skrócić okresu opóźnienia.

Key i *Ingle* (51) rozważają trzy możliwości pobudzania biosyntezy RNA przez auksyny. Po pierwsze auksyny mogłyby wpływać na syntezę lub dostępność prekursorów RNA, dotychczas nie uzyskano jednak żadnych danych doświadczalnych popierających tę możliwość. Po drugie mogłyby one tak modyfikować matrycowy DNA, aby synteza RNA zachodziła szybciej. Ta możliwość jest dyskusyjna. Nie wydaje się prawdopodobne, żeby auksyny wpływały na powstawanie nowego, matrycowego DNA, bo podziały komórek pod wpływem auksyn i bez tego wpływu są takie same (51). Jednak istnieje możliwość, że podlegające transkrypcji odcinki genomu są odblokowywane pod wpływem auksyn (69). Stwierdzono także (117), że auksyny mogą powodować zmiany konformacyjne histonów. Trzecia z omawianych przez *Key* i *Ingle* (51) możliwości wpływania przez auksyny na wzrost syntezy RNA, wydaje się najprawdopodobniejsza. Mianowicie synteza RNA może być ograniczana przez aktywność polimerazy RNA i auksyny mogłyby kontrolować aktywność tego enzymu. Pod wpływem syntetycznej auksyny, kwasu 2,4-dwuchloro-fenoksyoctowego (2,4-D), obserwuje się zwiększenie zdolności chromatyny do syntezy RNA, co można tłumaczyć albo odsłonięciem dodatkowych miejsc na matrycy DNA pod wpływem auksyny albo też indukcją (lub aktywacją) chromatynowej polimerazy RNA (81, 82). *Matthysse* i *Phillips* (69) wykazali istnienie białka wiążącego się z auksynami. Być może kompleks auksyna-białko oddzielając się od matrycy powoduje wzrost syntezy RNA przez zwiększenie miejsca na genomie dostępnego do transkrypcji. Stwierdzenie to popierałoby hipotezę działania auksyn na poziomie genu (110).

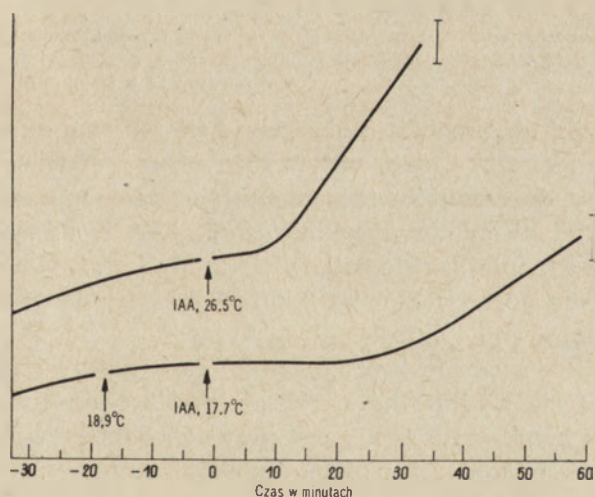
W świetle tych danych wielu badaczy (3, 22, 67, 78, 96, 101, 108) uważa, że do przyjęcia jest koncepcja działania auksyn poprzez derepresję genów a następnie indukcję syntezy mRNA, na którym z kolei syntetyzują się nowe enzymy niezbędne w procesie wydłużania się komórek.

Udoskonalenie metod pomiaru wydłużania się komórek pozwoliło na precyzyjne zmierzenie czasu upływającego między podaniem auksyny

a pobudzeniem procesu wydłużania się komórki. Uzyskane tą drogą dane wprowadziły czynnik czasu jako nowy, istotny element w rozważaniach nad mechanizmem działania hormonów roślinnych.

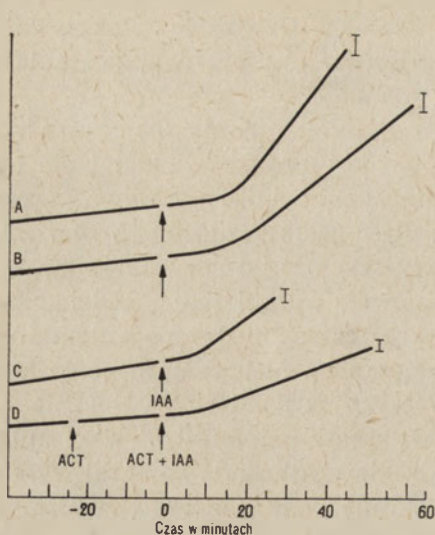
Czas indukcji syntezy białka przez czynnik chemiczny *via* transkrypcja lub translacja charakteryzuje się pewnym okresem zwłoki (ang. *lag phase*) (7). Okres zwłoki między podaniem czynnika i obserwowanym wzrostem zawartości białka może być różny: dla β -galaktozydazy u *Escherichia coli* wynosi 3—4 minuty, a dla roślin wyższych najkrótszy okres zwłoki, w przypadku indukcji reduktazy azotanowej, wynosi jedną godzinę (2).

Tre w a v a s (108) stwierdził, że okres czasu między podaniem IAA a wzrostem syntezy RNA, mierzonej włączaniem nieorganicznego fosforu ^{32}P do RNA, wynosi około 1 godziny. Precyzyjne pomiary wydłużania się komórek koleoptyli owsa i kukurydzy wykazały natomiast, że czas upływający od chwili podania IAA do pobudzenia wydłużania komórki wynosi w temp. 23° od 10 do 15 minut (26, 91). Należy tu zaznaczyć, że istnieją inne efekty działania auksyn, które obserwować można jeszcze znacznie wcześniej, na przykład ruch protoplazmy, zmiana potencjału elektrycznego, zahamowanie wzrostu w korzeniach, są widoczne w 1 do 2 minut po podaniu auksyny (58, 107). Dziesięciominutowe opóźnienie można wydłużyć do 20 minut stosując jednocześnie z auksyną cyjanek potasu w niskim stężeniu lub obniżając temperaturę (rysunek 1). Nie można go jednak przedłużyć przez dodanie inhibitorów biosyntezy białek: aktynomycyny D (rysunek 2), puromycyny lub cykloheksimidu (rysunek 3). Na opóźnienie to nie ma także wpływu szybkość wnikania IAA: kukurydza pobiera IAA



Rys. 1. Szybkość pojawiania się reakcji na IAA u koleoptyli owsa inkubowanych w różnych temperaturach (wg 26).

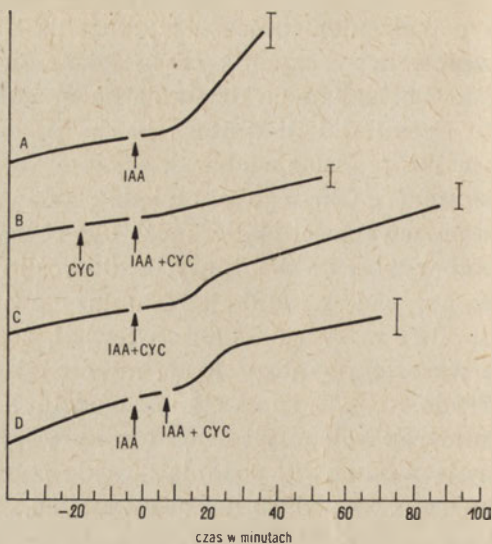
Na górnej krzywej wodę o temp. $26,5^\circ$ zamieniono na roztwór IAA ($3 \mu\text{g/ml}$) o tej samej temperaturze w czasie wskazanym strzałką. Na dolnej krzywej wodę o temp. $26,5^\circ$ zamieniono na wodę o temp. $18,9^\circ$ (pierwsza strzałka) a następnie na roztwór IAA o temp. $17,7^\circ$ (druga strzałka).



Rys. 2. Wpływ aktynomycyny D (act.) na szybkość pojawiania się reakcji na IAA u koleoptyli owsa (wg 26).

Krzywa A i B — szybkość pojawiania się reakcji na IAA dodanego w miejscu wskazanym strzałką po 1 godzinnej inkubacji koleoptyli owsa z wodą (krzywa A) lub z aktynomycyną D o stęż. 20 $\mu\text{g/ml}$ (krzywa B).

Krzywa C i D — porównania szybkości pojawiania się reakcji na auksynę u koleoptyli owsa przeniesionych z wody do roztworu IAA (krzywa C) oraz z wody do roztworu aktynomycyny D (20 $\mu\text{g/ml}$) a następnie po 20 min. z powrotem do roztworu aktynomycyny D z IAA o stęż. 10 $\mu\text{g/ml}$ (krzywa D).



Rys. 3. Wpływ cykloheksimidu (cyc.) na indukowane przez auksyny wydłużanie się segmentów koleoptyli owsa (wg 26).

Krzywa A — kontrola, koleoptyle owsa inkubowane w roztworze IAA (3 $\mu\text{g/ml}$).

Krzywa B — cykloheksimid (5 $\mu\text{g/ml}$) dodano w czasie wskazanym strzałką, następnie koleoptyle przeniesiono (czas wskazany strzałką) do roztworu zawierającego cykloheksimid (5 $\mu\text{g/ml}$) i IAA (10 $\mu\text{g/ml}$).

Krzywa C — cykloheksimid (10 $\mu\text{g/ml}$) dodany w tym samym czasie (strzałka) co IAA (3 $\mu\text{g/ml}$).

Krzywa D — cykloheksimid (10 $\mu\text{g/ml}$) dodany (strzałka druga) po inkubacji koleoptyli w roztworze IAA (3 $\mu\text{g/ml}$).

trzy razy szybciej niż pszenica a obserwuje się ten sam okres zwłoki (27). N i s s l i Z e n k (75) badali wpływ różnych stężeń IAA na czas opóźnienia mierzony do chwili uwidocznienia się stałego przyrostu długości komórek. Stwierdzili oni, że wysokie stężenia IAA i podwyższona temperatura mogą opóźnienie prawie całkowicie zredukować. Natomiast usunięcie auksyny z roztworu, w którym inkubowane są koleoptyle kukurydzy, powoduje zahamowanie wzrostu elongacyjnego w ciągu 10 minut (25).

Ze względu na znacznie krótszy okres czasu, upływający od podania IAA do rozpoczęcia wydłużania się komórki, niż okres czasu od podania IAA do wzrostu syntezy RNA, nie jest prawdopodobne, że auksyny powodują wydłużanie się komórek poprzez indukcję syntezy mRNA lub białka enzymatycznego.

Mimo wyżej przytoczonych danych E v a n s i R a y (26) nie wykluczają jednak możliwości działania auksyn na poziomie translacji i indukowania syntezy białka strukturalnego, być może białka strukturalnego ściany komórkowej. E v a n s i H o k a n s o n (25) przypuszczają, że sta-

ły poziom białka strukturalnego, którego synteza byłaby indukowana przez auksyny, jest niezbędny do rozluźniania się ścian komórkowych, a co za tym idzie, do wydłużania się komórek.

Do podobnych wniosków dochodzą Nelson i wsp. (74). Badali oni wpływ inhibitorów syntezy RNA i białek na indukowane przez auksyny wydłużanie się hipokotyli słonecznika. Wydłużanie się hipokotyli hamowały wszystkie badane inhibitory. Jednakże 8-azaguanina i aktynomycyna D hamowały wydłużanie się komórek dopiero po 1 godzinie, a cykloheksimid w czasie krótszym niż 20 minut. Nelson i wsp. (74) uważają, że o ile nie jest możliwe, aby auksyny działały bezpośrednio na proces transkrypcji, to prawdopodobnie mogą one stymulować syntezę białka (proces translacji), która jest niezbędna dla dalszego wydłużania się komórki.

Barkley i Evans (4) badając wpływ auksyn na wydłużanie się etiolowanych łodyg grochu wykazali, że pierwszą reakcją rośliny na podanie auksyn jest natychmiastowe zahamowanie wzrostu. Zahamowanie to trwać może około 10 minut i potem następuje gwałtowne wydłużanie się odcinków łodyg grochu, czterokrotnie większe niż przed podaniem auksyny. Proces wydłużania może być zahamowany przez cykloheksimid lub aktynomocynę D. W przypadku aktynomocyny D konieczne było jednak 3-godzinne preinkubowanie odcinków łodyg z tym antybiotykiem przed podaniem IAA. Wskazuje to na znacznie wolniejsze pobieranie aktynomocyny D w porównaniu z cykloheksimidem. Te dane o działaniu aktynomocyny D są sprzeczne z cytowanymi już danymi Pennego i Galstona (86). Barkley i Evans (4) stwierdzają, że oba antybiotyki nie mają wpływu na przedłużenie 10-minutowego okresu zwłoki po dodaniu IAA, pomimo, że hamują wydłużanie się komórek. A zatem prawdopodobnie pierwszy etap działania auksyny na wydłużanie się komórki nie jest związany z bezpośrednim pobudzeniem przez auksyny syntezy białka enzymatycznego specyficznego dla wzrostu. Stwierdzenie to jest częściowo sprzeczne z poprzednio formowanymi wnioskami (25).

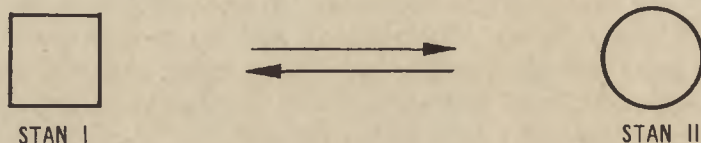
Jednym z przejawów działania auksyn jest zmiana mechanicznych właściwości ściany komórkowej. Rozluźnianie się struktury ścian komórkowych pod wpływem auksyn jest procesem odwracalnym (18, 19). Auksyny nie mają wpływu na potencjał osmotyczny komórek (5), natomiast indukują zmiany przepuszczalności protoplastu (21).

W pewnych warunkach doświadczalnych (niskie stężenie IAA — $2 \cdot 10^{-7}$ M, krótkie, 4 mm odcinki koleoptyli) można zaobserwować wpływ auksyn na wydłużanie się komórek już po 1—2 minutach. Również w tak samo krótkim czasie może występować hamowanie wzrostu przez wysokie, niefizjologiczne stężenia IAA (92). Wysłunięto przypuszczenie, że pierwszy etap działania auksyn może być związany z błoną cytoplazmatyczną (20, 71, 93). Możliwe, że pierwotne działanie auksyn polega na stymulacji zmian transformacyjnych błon. Zmiany te mogą zachodzić na skutek

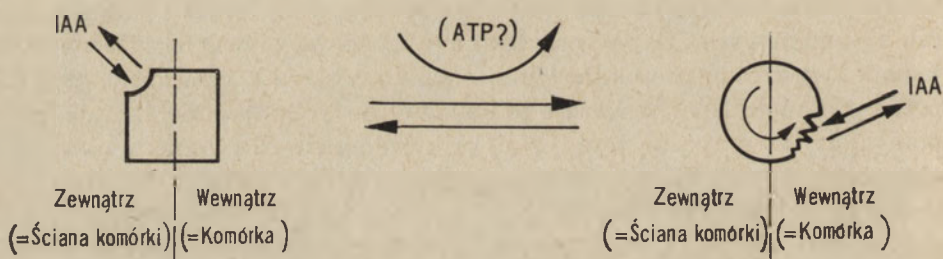
specyficznego, niekowalencyjnego wiązania się auksyny z akceptorem białkowym błony (na przykład z adenozynotrójfosfatazą) co powoduje zmiany konformacyjne tego białka (schemat 1) (37). Początkowe oddziaływanie auksyn wiązałyby się w ten sposób z pewnym etapem w ich transporcie (30, 37, 93).

Masuda i Kamisaka (61, 64, 65) reprezentują w swych ostatnich pracach poglądy przeciwstawne do przytoczonych wyżej. Są oni zdania,

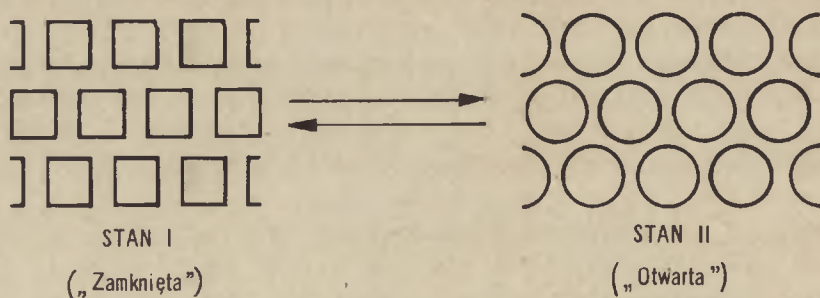
a



b



c



Schemat 1. Mechanizm wiązania auksyny z hipotetycznym akceptorem na przykładzie zmian konformacyjnych błon komórkowych (wg 37).

a — dwa odwracalne stany konformacyjne lipoproteinowego protomeru błony,

b — (przekrój poprzeczny) — ligand (IAA) wiąże się wybiórczo z protomerem w stanie II. Fakt, że miejsce wiązania IAA w stanie I jest na zewnątrz, a w stanie II na wewnętrznej stronie błony, powoduje podczas zmian konformacyjnych protomerów przenoszenie ligandu (IAA).

c — Rzut powierzchniowy (części błony z podjednostkami jak powyżej) — protomery powiązane są w sieć błony. Stan protomerów warunkuje konformacje protomerów sąsiadujących a równocześnie własności (przepuszczalność) błony.

że pierwotnym działaniem auksyn jest ich wpływ na syntezę RNA. Wpływ ten obserwuje się nawet podczas stresu osmotycznego, a jest on znoszony przez antyauksyny. Synteza RNA zwiększa się już po 10 minutach, a więc równoległe z przyrostem długości komórki. Masuda i Kamisaka (65) w następujący sposób formułują swoją roboczą hipotezę działania auksyn: auksyny zwiększają aktywność matrycowego DNA powodując tym samym wzrost syntezy pewnych typów RNA, a następnie pewnych białek, którymi mogą być enzymy rozkładające ścianę komórkową na przykład β -1,3-glukonaza (63, 105) lub α -glukonaza (38).

Podsumowując opisane tutaj, często przeciwstawne, poglądy należy stwierdzić, że początkowe oddziaływanie auksyn na proces wydłużania komórek pozostaje niewyjaśnione. Nie ma przekonujących danych doświadczalnych o działaniu auksyn na ścianę komórkową *via* synteza RNA ani danych wykluczających liczne hipotezy, które dopatrują się raczej wpływu auksyn na białka enzymatyczne lub strukturalne. Być może auksyny działają równoległe na kilka procesów uczestniczących we wzroście komórki roślinnej. Ponadto należy również zwrócić uwagę, że omówione powyżej dane doświadczalne uzyskano w różnych laboratoriach, w odmiennych warunkach i na różnym materiale roślinnym. Nie można wykluczyć (choć wydaje się to mało prawdopodobne) oddziaływania auksyn różnymi drogami lub z różną intensywnością, zależnie od gatunku rośliny.

II. Gibereliny

Badania nad budową i aktywnością biologiczną drugiej dużej grupy roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju — giberelin — sięgają lat trzydziestych naszego stulecia. Gibereliny odkryte zostały przez Japończyków jako substancje wytwarzane przez grzyb *Giberella fujikuroi*. Siewki ryżu zakażone tym grzybem mają nadmiernie wydłużone łodygi oraz liście i po jakimś czasie obumierają. Dalsze badania doprowadziły do wyodrębnienia gibereliny A w krystalicznej postaci oraz do stwierdzenia, że u roślin wyższych występuje szereg giberelin, które pełnią rolę roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju (72, 87, 89, 103, 118). Badania nad mechanizmem działania giberelin rozpoczęto przed 10 lat. Yomo (121) oraz Radley (90) stwierdzili, że czynnik produkowany w zarodku ziaren jęczmienia, a powodujący wzrost aktywności α -amylazy w warstwie aleuronowej jest gibereliną. Yomo (122) oraz Paleg (84) niezależnie wykazali, że giberelina w stężeniu 10^{-10} M powoduje taki sam wzrost aktywności α -amylazy w izolowanych warstwach aleuronowych jak *in vivo* podczas kiełkowania całego nasienia. Warstwa aleuronowa nasion zbóż jest pojedynczą warstwą nie dzielących się komórek tryploidalnych. Jest ona wrażliwa na stężenia gibereliny w zakresie od 10^{-7} do 10^{-11} M. Wydawało się więc, że jest to idealna tkanka do badań mechanizmu działania czynni-

ków wzrostowych (112, 115). Inkubowanie warstw aleuronowych jęczmienia w roztworze gibereliny powoduje pojawianie się i innych, oprócz α -amylazy, aktywności enzymatycznych: proteaz (8, 41, 95, 123), rybonukleaz (17) oraz β -glukonazy (59).

Okres wzrostu aktywności α -amylazy, regulowanego przez giberelinę, może być podzielony na dwie fazy. Pierwsza to 8—10 godzinny okres zwłoki (ang. *lag phase*). Następny etap to gwałtowny wzrost aktywności α -amylazy (17). Jednakże wzrost aktywności α -amylazy nie jest pierwszą reakcją tkanki na podaną giberelinę. Po 1—2 godzinach inkubacji warstw aleuronowych w roztworze gibereliny Jones (43, 44) zauważył zmiany w ultrastrukturze komórek: ziarna aleuronowe zwiększały swoją objętość i traciły sferyczny kształt, a ponadto stwierdził zwiększenie się hydrolizy białek zapasowych ziaren aleuronowych.

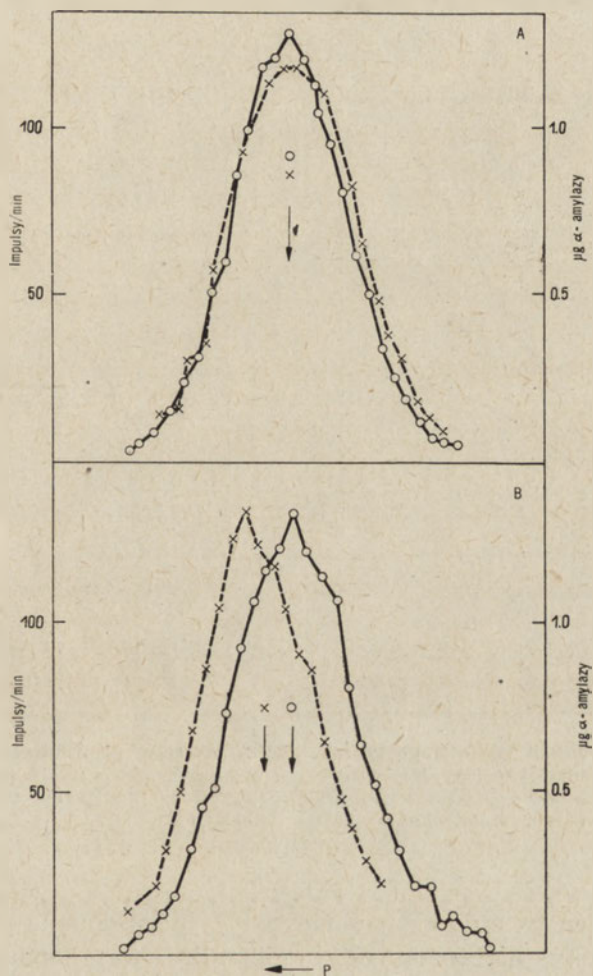
Wzrost aktywności α -amylazy powodowany przez giberelinę może być zahamowany przez brak tlenu, dwunitrofenol, inhibitory biosyntezy białka (8, 85, 111) oraz inhibitory biosyntezy RNA (16, 17, 113). Wskazywałoby to, że wzrost aktywności α -amylazy może być wynikiem syntezy tego enzymu. Włączanie znakowanej leucyny, alaniny, proliny i treoniny do α -amylazy (113) potwierdziło to przypuszczenie. Klasyczne doświadczenie Filnera i Varnera (28) z użyciem wody znakowanej ciężkim tlenem wykazało w przekonywujący sposób, że cała amylaza powstająca podczas inkubacji warstw aleuronowych jęczmienia z gibereliną jest produktem syntezy *de novo*. Jedynym źródłem aminokwasów do syntezy nowego białka w warstwie aleuronowej są aminokwasy będące produktami hydrolizy białek zapasowych. W czasie hydrolizy tych białek w obecności $H_2^{18}O$, ciężki tlen będzie włączany do grupy karboksylowej każdego aminokwasu.



Białko syntetyzowane z tych aminokwasów ma wystarczająco dużą gęstość spowodowaną obecnością ciężkiego tlenu w grupach karbonylowych wiązań peptydowych, aby wystąpiło jego przesunięcie w stosunku do ^{18}O -białek podczas wirowania w gradiencie stężeń chlorku cezu (39). Takie przemieszczanie α -amylazy wytworzonej w obecności $H_2^{18}O$ w stosunku do α -amylazy powstałej wobec H_2O stwierdzili Filner i Varner (28) (rysunek 4). Technikę tę dostarczającą jednego z najbardziej przekonujących dowodów na syntezę *de novo* enzymów Jacobsen i Varner (41) zastosowali również do badań innych enzymów warstwy aleuronowej a Gientka-Rychter i Cherry (33) do izocytrazy.

Ustalenie, że indukowana przez giberelinę synteza α -amylazy jest syntezą *de novo* nasuwało przypuszczenie, że może ona być zależna od indukowanej przez giberelinę syntezy RNA (11). Aktynomycyna D, inhibitor syntezy mRNA, dodana jednocześnie z gibereliną podczas inkubacji warstw aleuronowych, nie hamuje całkowicie syntezy α -amylazy. Inhibi-

tor ten działa skuteczniej jeśli dodaje się go do roztworu 12—14 godzin wcześniej niż giberelinę, natomiast nie ma wcale wpływu, jeśli doda się go 6—12 godzin później (114). Wrażliwość układu syntetyzującego α -amylazę na aktynomycynę D tylko w czasie pierwszych kilku godzin po dodaniu gibereliny wskazywałaby, że giberelina indukuje powstawanie pewnej frakcji RNA niezbędnej do syntezy α -amylazy. Jeśli byłaby to jedyna funkcja gibereliny, to obecność hormonu przez kilka pierwszych



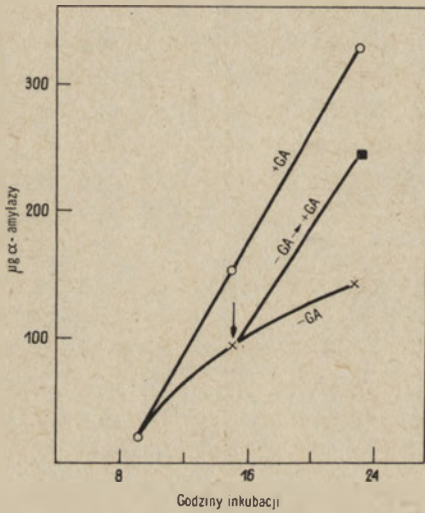
Rys. 4. Rozdział radioaktywności (^3H) (•—•) i aktywności (x---x) α -amylazy w wyniku wirowania w gradiencie stężeń chlorku cezu * (wg 17).

A. Wynik wirowania mieszaniny nieznakowanej α -amylazy (indukowanej w H_2^{18}O) i preparatu handlowego oczyszczonej α -amylazy, znakowanej ^3H .

B. Wynik wirowania mieszaniny α -amylazy indukowanej w obecności H_2^{18}O oraz podobnie jak powyżej, preparatu handlowego oczyszczonej α -amylazy znakowanej ^3H .

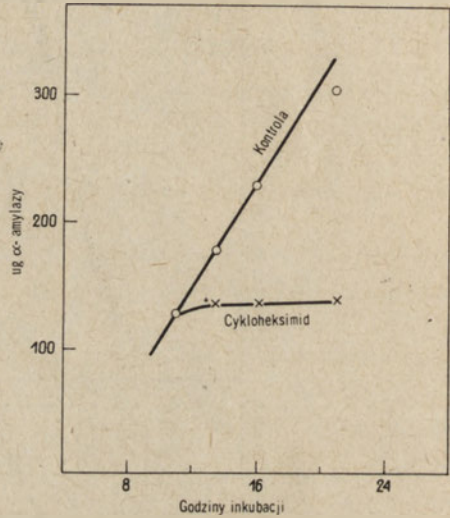
* Gęstość wzrasta od lewej strony.

godzin w roztworze, w którym inkubowano warstwy aleuronowe, powinna wystarczyć do utrzymania stałej szybkości syntezy α -amylazy. Chrispeels i Varner (17) wykazali jednak, że dla utrzymania maksymalnej intensywności syntezy tego enzymu giberelina musi być obecna przez cały czas w roztworze. Jednakże jeśli inkubuje się warstwy aleuronowe przez 7 godzin z gibereliną, a potem przez 9 godzin bez gibereliny, po czym ponownie doda się giberelinę, synteza α -amylazy zwiększa się natychmiast, bez 6—8 godzinowego okresu zwłoki obserwowanego przy pierwszym dodaniu hormonu (rysunek 5).



Rys. 5. Wpływ usunięcia gibereliny z roztworu i powtórzenia jej dodania do mieszaniny inkubacyjnej (wg 17).

Warstwy aleuronowe inkubowano przez 7 godzin w $0,5 \mu\text{M}$ roztworze GA. Giberelina następnie była usuwana z roztworu a warstwy aleuronowe jęczmienia inkubowane z GA lub bez GA.



Rys. 6. Wpływ cykloheksimidu na syntezę α -amylazy (wg 17).

Warstwy aleuronowe inkubowane były w $0,1 \mu\text{M}$ roztworze GA przez 11 godzin. Po tym czasie dodawano do roztworu cykloheksimid.

W przeciwieństwie do aktynomycyny D, która dodana po 8 godzinach inkubacji warstw aleuronowych z gibereliną nie hamuje aktywności α -amylazy, cykloheksimid jest skutecznym inhibitorem (rysunek 6). Dane te wskazywałyby, że giberelina może działać na poziomie translacji. Dane o wpływie gibereliny na włączanie ^{14}C -urydyny, ^{14}C -adeniny i ^{32}P do RNA (11, 114) nie świadczą jednak w sposób przekonujący o udziale gibereliny w regulacji szybkości syntezy RNA. Być może do wykazania takiego efektu konieczne jest dalsze udoskonalenie metod ekstrakcji i frakcjonowania kwasów nukleinowych (17).

Bonner (6) uważa, że doświadczenia Varnera i wsp. potwierdzają hipotezę o działaniu czynników wzrostowych na poziomie genu, jednak według Chandra i Durnstee (10) dotychczas uzyskane dane nie precyzują czy gibereliny działają na proces transkrypcji czy translacji.

Aktynomycyna D hamuje szereg efektów działania giberelin, podobnie jak w przypadku auksyn (1, 48, 55, 79, 97, 116). Często interpretuje się to jako dowód, że czynnik wzrostowy wpływa na syntezę mRNA. Wydaje się jednak, że na podstawie wyników doświadczeń z inhibitorami biosyntezy RNA należy bardzo ostrożnie formułować wnioski o mechanizmie działania substancji wzrostowych. Natomiast hamowanie syntezy α -amylazy przez aktynomycynę D może oznaczać z pewnością, że synteza zależnej od DNA frakcji RNA musi poprzedzić efekt działania substancji wzrostowej manifestujący się syntezą białka enzymatycznego. Ponieważ wiadomo, że synteza wszystkich trzech głównych rodzajów cytoplazmatycznego RNA zależna jest od DNA, synteza przynajmniej jednego z nich jest niezbędna do uwidocznienia efektu działania hormonu. Poza tym istnieje możliwość, że indukowana przez czynnik wzrostowy synteza enzymu zwiększa szybkość przemian (ang. *turnover*) jednego z rodzajów RNA biorącego udział w syntezie tego enzymu. Wtedy synteza jednej z tych frakcji RNA byłaby niezbędna dla powstania końcowego efektu działania czynnika wzrostowego, a aktynomycyna D hamowałaby ten proces, chociaż początkowe jej działanie nie dotyczyło procesu transkrypcji.

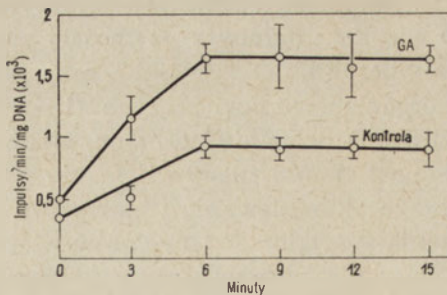
Chen i wsp. (13, 14) wykazali, że w kiełkujących zarodkach owsa przez pierwsze 12 godzin nie zachodzi transkrypcja, jednakże biosynteza białka zaczyna się już w 30 minut po imbibicji. Chen i Osborne (12) stwierdzili, że w ciągu pierwszych 12 godzin kiełkowania giberelina nie indukuje biosyntezy RNA, natomiast pobudza biosyntezę białka. Wyciągają oni stąd wniosek, że giberelina działa na poziomie translacji, jednakże do jej działania jest niezbędny nie zidentyfikowany dotychczas pośrednik typu białkowego.

Ze względu na specyficzność oddziaływania giberelin na aktywności różnych enzymów (41), wydaje się mało prawdopodobne, aby te czynniki wzrostowe działały w postaci wolnej. Poznanie charakteru czynników wiążących gibereliny w tkankach roślinnych w aktywny kompleks oraz poznanie natury tego wiązania byłoby z pewnością pomocne w poznaniu mechanizmu działania giberelin.

W badaniach na organizmach zwierzęcych (104) stwierdzono, że te tkanki, które są wrażliwe na działanie hormonu, akumulują i zatrzymują podany hormon, natomiast tkanki niewrażliwe nie posiadają tej właściwości. Przypuszcza się, że akumulowanie i zatrzymywanie hormonu spowodowane jest obecnością specjalnych receptorów wiążących hormon (34). Podobny mechanizm wiązania hormonu zauważono również w tkankach roślinnych (69, 73). Gdy odcinki łodyg karłowatego grochu inkubowano w roztworze GA₁ lub GA₃, znakowanych trytem, większą aktywność wy-

kazywały wierzchołkowe części łodyg, wrażliwe na giberelinę, niż niewrażliwe części podstawowe. Włączanie GA_1 było nieco niższe niż GA_5 , a światło, które normalnie obniża wrażliwość karłowatego grochu na giberelinę (45), również obniżało poziom włączania radioaktywnych giberelin do części wierzchołkowej łodygi. Musgrave i wsp. (73) przypuszczają więc, że akumulacja gibereliny w rosnącej strefie łodygi grochu jest związana z pierwotnym działaniem czynnika wzrostowego w roślinie. Zwiększanie stężenia radioaktywnej gibereliny w rosnącej strefie łodygi grochu mogło być spowodowane uprzywilejowanym pobieraniem lub większym zatrzymywaniem giberelin w rosnących komórkach. Zatrzymanie czynnika wzrostowego może być spowodowane niekowalencyjnym wiązaniem do specyficznego receptora, co zachodzi tylko w komórkach — receptorach (ang. *target cells*) (35). Światło natomiast, które obniża włączanie radioaktywnych giberelin, może albo modyfikować strukturę receptora, albo hamować jego syntezę. Ta druga możliwość wydaje się bardziej prawdopodobna, ponieważ działanie światła ujawnia się dopiero po 3 godzinach.

O istnieniu receptora giberelin świadczą w sposób pośredni badania Johri i Varnera (42) nad wpływem gibereliny na syntezę RNA w jądrach komórek łodyg grochu użytych tu niejako w zastępstwie jąder komórek aleuronowych, których autorom nie udało się wyizolować. Giberelina zwiększała o 20—25% aktywność specyficzną (mierzoną stopniem włączania znakowanej trytem cytozyny) RNA związanego z DNA, a nie miała wpływu na aktywność specyficzną rybosomalnego RNA (rysunek 7). Włączanie cytozyny hamowane było przez aktynomycynę D, dezoksyrybonukleazę i rybonukleazę. Dezoksyrybonukleaza nie miała jednak wpływu na włączanie cytozyny, jeśli dodawano ją w czasie inkubacji. Wyniki te wskazują że cytozyna włączana jest *de facto* do RNA. Jednakże wzrost syntezy RNA można było zaobserwować tylko wówczas, gdy giberelina obecna była w roztworze podczas całego procesu wyodrębniania jąder komórkowych. Najbardziej krytyczny okazał się pierwszy etap otrzymywania jąder, mianowicie rozbitcie komórki.



Rys. 7. Kinetyka włączania CTP-³H do izolowanych jąder komórek łodyg grochu traktowanych i nietraktowanych gibereliną (wg 42).

Brak pobudzenia syntezy RNA w jądrach z komórek rozbijanych w roztworze nie zawierającym gibereliny może być uwarunkowany albo tym, że akceptor gibereliny jest wymywany w czasie izolacji, albo tym, że czynnik ten jest niezbędny do transportu gibereliny do jądra komórkowego. Johri i Varner (42) przypuszczają, że proces wiązania gibereliny z akceptorem jest reakcją fizyczną (wiązanie niekowalencyjne) ze względu na to, że zachodzi on w niskiej temperaturze. RNA syntetyzowany pod wpływem gibereliny różni się od syntetyzowanego przez kontrolne jądra komórkowe przede wszystkim średnim ciężarem cząsteczkowym oraz sekwencją nukleotydów. Wzrost syntezy RNA pod wpływem gibereliny może być, według tych autorów, spowodowany odsłonięciem dodatkowych miejsc na matrycy DNA lub zwiększeniem aktywności polimerazy RNA pod wpływem hormonu. Tę ostatnią hipotezę popierałyby dane McComba i wsp. (70).

Badania nad wpływem giberelin na wydłużanie się łodygi grochu prowadzone w pracowni Langa (98, 99) wskazują, że aktywnie dzielące się komórki pod wpływem inkubacji w roztworze gibereliny wydłużają się syntetyzując DNA (76). Syntezę DNA i jednocześnie wydłużanie się komórek hamowało dodanie 5-fluorodezoksyurydyny (76). Podobne zależności znalazł Lang i Nitsan (54) w nasionach sałaty. Brouhton (9) stwierdził, że wydłużające się komórki łodyg grochu inkubowanych z gibereliną zawierają dwukrotnie więcej RNA i białka niż komórki łodyg inkubowanych bez gibereliny. Stwierdza on jednakże, że stymulacja wydłużania komórek, syntezy białka i RNA występowała wcześniej niż wzrost poziomu DNA. Brouhton (9) przypuszcza, że istnieje możliwość jednoczesnego działania czynnika wzrostowego na dwóch różnych poziomach. Jeżeli przyjmie się, że stymulacja syntezy RNA zachodzi wcześniej niż stymulacja syntezy białka, wtedy wyniki te wskazywałyby, że regulacja syntezy RNA jest jednym z pierwszych przejawów wpływu hormonu na wydłużanie się komórek łodyg grochu.

Kessler i Snir (47) wykazali, że giberelina GA₇ wiąże się z DNA wydzielonym z wielu badanych przez nich roślin wyższych. Wskazywałoby to, że sposób działania gibereliny związany jest ze zmianami strukturalnymi w podwójnej nici DNA, powodującymi różnice funkcjonalne we własnościach matrycowego DNA. Byłoby to zgodne z opisaną powyżej pierwszą koncepcją Johri i Varnera (42).

W 1969 r. stwierdzono, że cykliczny 3',5'-fosforan adenozyne bierze udział w indukcji α -amylazy w połówkach nasion jęczmienia traktowanych gibereliną (23, 24), a także, że cykliczny AMP pod wieloma względami działa tak jak giberelina (24, 31). Pollard (88) wykazał również, że giberelina powoduje syntezę cyklicznego AMP w warstwie aleuronowej nasion jęczmienia. Dane te wskazywałyby na możliwość pośredniego działania giberelin poprzez przekaźnik typu cyklicznego AMP.

III. Uwagi końcowe

Przedstawione powyżej poglądy nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie co jest pierwszym akceptorem gibereliny i jaki jest mechanizm jej działania. Dotychczasowe dane zdają się wskazywać na to, że w zależności od badanego procesu fizjologicznego i natury hormonu mamy do czynienia bądź z działaniem na poziomie transkrypcji, bądź na którymś z etapów translacji bądź też regulator wzrostu może oddziaływać allosterycznie na utworzone białko enzymatyczne.

Nie omawiane tutaj dane (29, 94, 102) sugerują, że niektóre hormony roślinne, jak cytokininy, są syntetyzowane na niezmodyfikowanym prekursorowym tRNA, jednakże fizjologiczne znaczenie tych połączeń jest stale dyskutowane (36, 46).

Van Overbeek (83) już w 1966 roku, podsumowując badania dotyczące mechanizmu działania roślinnych substancji wzrostowych, wyrażał wątpliwość, czy szukanie jednolitego schematu działania dla wszystkich hormonów roślinnych nie jest zbyt dużym uproszczeniem zagadnienia. Galston i Davies (32) w obszernym artykule przeglądowym na temat roślinnych regulatorów wzrostu i rozwoju stwierdzają, że istotne odkrycia w pracowniach Varnera, Masudy czy Evansa nie usunęły wątpliwości dotyczących zasadniczego pytania: czy hormony roślinne działają na poziomie genu czy też ich wpływ na wzrost syntezy RNA i białek jest efektem drugorzędowym (100).

LITERATURA

1. Abels F. B., Holm R. E., *Plant Physiol.* **41**, 1337 (1966).
2. Afridi M. M. R. K., Hewitt E. J., *J. Exp. Bot.* **15**, 251 (1964).
3. Armstrong D. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 64 (1966).
4. Barkley G. M., Evans M. L., *Plant Physiol.* **45**, 143 (1970).
5. Bonner J., w *Plant Growth Regulation*, wyd. R. M. Kleined, Ames Iowa State Univ. Press, 1961, str. 307.
6. Bonner J., *Molecular Biology of Development*, Clarendon Press, Oxford, 1965.
7. Branscomb E. W., Stuart R. N., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **32**, 731 (1968).
8. Briggs D. E., *J. Inst. Brewing* **69**, 13 (1963).
9. Broughton W. J., *Ann. of Botany* **33**, 227 (1969).
10. Chandra R. G., Duynstee E. E., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 723.
11. Chandra R. G., Varner J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 583 (1965).
12. Chen D., Osborne D. J., *Nature* **226**, 1157 (1970).
13. Chen D., Sarid S., Katchalski E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 902 (1968).
14. Chen D., Sarid S., Katchalski E., *Proc. Seventh Symposio Internazionale Di Agrochimica*, Salamanca **21** (1968).
15. Cherry J. H., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 154 (1967).

16. Chrispeels M. J., Varner J. E., *Plant Physiol.* **42**, 398 (1967).
17. Chrispeels M. J., Varner J. E., *Plant Physiol.* **42**, 1008 (1967).
18. Cleland R., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 3 (1967).
19. Cleland R., *Planta (Berl.)*, **74**, 197 (1967).
20. Cleland R., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 613.
21. Cocking E. C., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968 str. 603.
22. Datta A., Sen S. P., *Biochim. Biophys. Acta.* **107**, 352 (1965).
23. Duffus C. M., Duffus J. H., *Experientia* **25**, 581 (1969).
24. Duffus C. M., Duffus J. H., Galsky A. G., Lippicott J. A., Pollard C. J., *Plant Physiol.* **44**, 1227 (1969).
25. Evans M. L., Hokanson R., *Planta (Berl.)* **8**, 85 (1969).
26. Evans M. L., Ray P. M., *J. Gen. Physiol.* **53**, 1 (1969).
27. Evans M. L., Rayle D. L., *Plant Physiol.* **45**, 240 (1970).
28. Filner P. F., Varner J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1520 (1967).
29. Fox J. E., *Plant Physiol.* **41**, 75 (1966).
30. Fuente dela R. K., Leopold A. C., *Plant Physiol.* **46**, 186 (1970).
31. Galsky A. G., Lippincott J. A., *Plant Cell Physiol.* **10**, 607 (1969).
32. Galston A. W., Davies P. J., *Science* **163**, 1288 (1969).
33. Gientka-Rychter A., Cherry J. H., *Plant Physiol.* **43**, 653 (1968).
34. Gilbert W., Müller-Hill B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1891 (1966).
35. Ginzburg C., Kende H., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 333.
36. Helgeson J. P., *Science* **161**, 974 (1968).
37. Hertel R., Flory R., *Planta (Berl.)*, **82**, 123 (1968).
38. Heyn A. N. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 831 (1970).
39. Hu A. S. L., Bock R. M., Halvorson H. O., *Anal. Biochem.* **4**, 489 (1962).
40. Hustee van R., Cherry J. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 835 (1966).
41. Jacobsen J. V., Varner J. E., *Plant Physiol.* **42**, 1596 (1967).
42. Johri M. M., Varner J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 269 (1968).
43. Jones R. L., *Planta (Berl.)* **88**, 73 (1969).
44. Jones R. L., *Planta (Berl.)* **87**, 119 (1969).
45. Kende H., Lang A., *Plant Physiol.* **39**, 435 (1964).
46. Kende H., Tavares J. E., *Plant Physiol.* **43**, 1244 (1968).
47. Kessler B., Snir J., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 207 (1969).
48. Key J. L., *Plant Physiol.* **39**, 365 (1964).
49. Key J. L., *Plant Physiol.* **41**, 1257 (1966).
50. Key J. L., Barnett N. M., Lin C. Y., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 49 (1967).
51. Key J. L., Ingle J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1382 (1964).
52. Key J. L., Ingle J., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 711.
53. Key J. L., Shannon J. C., *Plant Physiol.* **39**, 360 (1964).
54. Lang A., Nitsan J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 180 (1967).
55. Leaver C. J., Edelman J., *Biochem. J.* **95**, 27 (1965).
56. Lin C. Y., Key J. L., *J. Mol. Biol.* **26**, 237 (1967).

57. Lin C. Y., Key J. L., Bracker C. E., *Plant Physiol.* **41**, 976 (1966).
58. List A. Jr., *Planta (Berl.)* **87**, 1 (1969).
59. MacLeod A. M., Millar A. S., *J. Inst. Brewing* **68**, 322 (1962).
60. Masuda Y., *Physiol. Plant.* **12**, 324 (1959).
61. Masuda Y., *Plant Cell Physiol.* **7**, 573 (1966).
62. Masuda Y., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 68 (1967).
63. Masuda Y., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 699.
64. Masuda Y., *Plant Cell Physiol.* **10**, 1 (1969).
65. Masuda Y., Kamisaka S., *Plant Cell Physiol.* **10**, 79 (1969).
66. Masuda Y., Setterfield G., Bayley S. T., *Plant Cell Physiol.* **7**, 243 (1966).
67. Masuda Y., Takimoto E., Wada S., *Physiol. Plant.* **20**, 713 (1967).
68. Masuda Y., Yanagishima B., *Plant Cell Physiol.* **5**, 365 (1964).
69. Matthysse A. G., Phillips C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **63**, 897 (1969).
70. McComb A. J., McComb J. A., Duda C. T., *Plant Physiol.* **46**, 221 (1970).
71. Morre D. J., Eisinger W. R., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 625.
72. Murakami Y., *Bot. Mag. Tokyo* **75**, 451 (1962).
73. Musgrave A., Kays S. E., Kende H., *Planta (Berl.)* **89**, 165 (1969).
74. Nelson H., Ilan I., Reinhold L., *Israel J. Bot.* **18**, 129 (1969).
75. Nissl D., Zenk M. H., *Planta (Berl.)* **89**, 323 (1969).
76. Nitsan J., Lang A., *Plant Physiol.* **41**, 965 (1966).
77. Nitsch J. P., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 563.
78. Nooden L. D., *Plant Physiol.* **43**, 140 (1968).
79. Nooden L. D., Thimann K. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 194 (1963).
80. Nooden L. D., Thimann K. V., *Plant Physiol.* **41**, 157 (1966).
81. O'Brien T. J., Jarvis B. C., Cherry J. H., Hanson J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 35 (1968).
82. O'Brien T. J., Jarvis B. C., Cherry J. H., Hanson J. B., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 747.
83. Overbeek van J., *Science* **152**, 721 (1966).
84. Paleg L. G., *Plant Physiol.* **35**, 902 (1960).
85. Paleg L. G., w *Regulateurs Naturels de la Croissance Végétale*, C.N.R.S., Paris 1964, str. 303.
86. Penny P., Galston A. W., *Amer. J. Bot.* **53**, 1 (1966).
87. Phinney B. O., West C. A., *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **11**, 411 (1960).
88. Pollard C. J., *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 511 (1970).
89. Radley M., *Nature* **178**, 1070 (1956).
90. Radley M., *Chem. Ind.* **1959**, 877 (1959).
91. Ray P. M., Ruesinck A. W., *Develop. Biol.* **4**, 377 (1962).
92. Rayle D. L., Evans M. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **65**, 184 (1970).
93. Rayle D. L., Ouitrakul R., Hertel R., *Planta (Berl.)* **87**, 49 (1969).
94. Richmond A., Back A., Sachs B., *Planta (Berl.)* **90**, 57 (1970).
95. Rowsell E. V., Goad L. J., *Biochem. J.* **90**, 11P (1964).
96. Roychoudhury R., Datta A., Sen S. P., *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 346 (1965).

97. Roychoudhury R., Sen S. P., *Physiol. Plant.* **17**, 352 (1964).
98. Sachs R. M., Bretz C. F., Lang A., *Amer. J. Bot.* **46**, 376 (1959).
99. Sachs R. M., Lang A., Bretz C. F., Roach J. *Amer. J. Bot.* **47**, 260 (1960).
100. Sarkissian I. V., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press, L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 473.
101. Sarkissian I. V., Spelsberg T. C., *Physiol. Plant.* **20**, 991 (1967).
102. Skoog F., Armstrong D. J., Cherayil J. D., Hampel A. E., Bock R. M., *Science* **154**, 1354 (1966).
103. Stowe B. B., Yamaki Y., *Science* **129**, 807 (1959).
104. Szumiel I., *Post. Biochem.* **13**, 505 (1967).
105. Tanimoto E., Masuda Y., *Physiol. Plant.* **21**, 820 (1968).
106. Tester C. F., Dure L. S., *Biochemistry* **6**, 2532 (1967).
107. Thimann K. V., Sweeney B. M., *J. Gen. Physiol.* **21**, 123 (1937).
108. Trewavas A. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **123**, 324 (1968).
109. Trewavas A. J., *Phytochem.* **7**, 673 (1968).
110. Trewavas A. J., w *Progress in Phytochemistry*, red. L. Reinhold, J. Liw-schitz, J. Wiley, New York, 1968, str. 113.
111. Varner J. E., *Plant Physiol.* **39**, 413 (1964).
112. Varner J. E., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 219 (1967).
113. Varner J. E., Chandra G. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **52**, 100 (1964).
114. Varner J. E., Chandra G. R., Chrispeels J. M., *J. Cellular Comp. Physiol.* **66**, suppl. 1:55 (1965).
115. Varner J. E., Johri M. M., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 793.
116. Venis M. A., *Nature* **202**, 900 (1964).
117. Venis M. A., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 761.
118. West C. A., Phinney B. O., *Plant Physiol.* **31**, suppl. XX (1956).
119. Wright S. T. C., w *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, red. F. Wightman, G. Setterfield, The Runge Press L.T.D., Ottawa, Canada, 1968, str. 521.
120. Yanagishima N., Masuda Y., *Plant Cell Physiol.* **5**, 368 (1964).
121. Yomo H., *Hakko Kyokai Shi* **16**, 444 (1958), cyt. wg Varner J. E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 219 (1967).
122. Yomo H., *Hakko Kyokai Shi* **18**, 600 (1960), cyt. wg Chem. Abstr. **55**, 26145 (1961).
123. Yomo H., *Hakko Kyokai Shi* **19**, 284 (1961), cyt. wg Varner J. E., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **144**, 219 (1967).

ROMAN GONDKO *

Połączenie hemoglobina-polifosforan i jego rola w organizmie

The Complex of Hemoglobin-phosphates and its Function

The present state of knowledge concerning hemoglobin-phosphates complex is reviewed.

I. Połączenie białek z nukleotydami

Połączenie białek mięśniowych z nukleotydami adenyłowymi, a w szczególności z ATP, umożliwia w trakcie skurczu mięśni zamianę energii chemicznej w energię mechaniczną. W procesie skurczu dochodzi do enzymatycznego rozpadu ATP — donatora energii (30); enzymem hydrolizującym ATP jest aktomiozyna, kompleks miozyny z aktyną, łączący w sobie funkcję chemiczną (rozpad ATP) z funkcją fizyczną (zmiana postaci i wykonanie pracy). Rola połączeń białek mięśniowych z ATP oraz przekazywanie energii w mechanizmie skurczu nie zostały dotychczas w pełni wyjaśnione (43, 73).

Pracując nad zagadnieniem skurczu Straub i Feuer (68) zwrócili uwagę na stałą obecność ATP w preparatach aktyny. Mimo poddawania białek mięśniowych długotrwałej dializie zawsze stwierdzano w nich stałe ilości nukleotydów (14). Określając zawartość fosforu kwasorozpuszczalnego w świeżych i odlipidowanych mięśniach żaby, Niemierko i wsp. (57) stwierdzili, że około 50—70% zawartych w tkance mięśniowej nukleotydów (ATP, ADP) występuje w połączeniu z białkami mięśniowymi. Połączenia te okazały się niestęchanie labilne: ulegają one rozbięciu nawet pod działaniem wody (56). Ilość nukleotydów w osadzie białkowym zależy przede wszystkim od postępowania preparatywnego i warunków ekstrakcji. Największe ilości nukleotydów związanych z białkami otrzymano po potraktowaniu proszku acetonowego mięśni lub świe-

* Dr, Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Fizjologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź.

Wykaz stosowanych skrótów: 1,3-DPG — kwas 1,3-dwufosfoglicerynowy, 2,3-DPG — kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy, HbF — hemoglobina płodowa, HbA — hemoglobina dorosłych, Mb — mioglobina, p_{50} — ciśnienie tlenu, przy którym 50% Hb występuje w formie HbO₂.

zych mięśni roztworami o niskim pH (69). W środowisku kwaśnym nieorganiczne sole ($NaCl$, KCl , $CaCl_2$, $MgCl_2$) w stężeniu odpowiadającym stężeniu w tkance mięśniowej obniżają ilość związanych nukleotydów. W obecności $0,5M$ $NaCl$ następuje uwolnienie około 90% fosforu labilnego, przy przyjęciu za 100% ilości fosforu związanego w roztworze pozbawionym soli (69).

Stężenie ATP w mięśniach wynosi średnio $0,4\%$, teoretycznie więc $12-15$ cząsteczek ATP może występować w połączeniu z miozyną. *Nanninga* i *Mommaerts* (53) w oparciu o enzymatyczną metodę oznaczania ATP obliczyli, że miozyna tworzy połączenie z ATP w stosunku $1:1$, co jest uwarunkowane prawdopodobnie przez grupy tiolowe. Wartość $1,6$ mola ATP/mol białka podali ostatnio *Schlisefeld* i *Barany* (66). Ponadto wiadomo, że architektoniczne przegrupowanie g-aktyny w f-aktynę zachodzić może tylko w obecności ATP, a usunięcie ATP z preparatów g-aktyny powoduje zahamowanie procesu polimeryzacji (60, 71).

Badania grupy *Niemierki* dotyczyły nierozfrakcjonowanych białek mięśniowych i białek innych narządów jako całości (26, 54, 55, 57).

Drabikowski (22, 23, 24) natomiast wykazał, że nie tylko białka mięśniowe, ale także inne białka, np. albumina surowicy ludzkiej, albumina jaja, kazeina, gamma globulina ludzka, mają zdolność wiązania ATP zależną przede wszystkim od pH roztworu. Największe ilości związanego ATP znajdowano w osadach białek wytrąconych poniżej ich punktu izoelektrycznego. Ze zbadanych białek największe ilości ATP wiąże albumina, mniejsze miozyna i kazeina. Duże różnice w wiązaniu obserwowano w przypadku białka zmodyfikowanego. Acetylowana albumina wiąże zaledwie 30% ATP, a dezaminacja zmniejsza tę zdolność o połowę. Także szereg dehydrogenaz przyłącza nukleotydy na przykład zred. NAD (59), a trójfosforany: UTP, ATP, CTP i GTP tworzą kompleks z rybonukleazą w stosunku $1:1$ (20).

Za tym, że zdolność tworzenia połączeń białko-ATP nie jest specyficzną własnością białek mięśniowych, przemawiają także wyniki badań nad hemoproteidami. *Dmochowski* (21) w tak zwanych osadach hematyny trawiennej stwierdził występowanie niezidentyfikowanych związków azotowych. W handlowych preparatach hemoglobiny zwierzęcych *Leyko* (47) metodą spektrofotometryczną, chromatograficzną i polarograficzną wykryła obecność ATP, ADP i AMP. W dalszych badaniach *Leyko* i wsp. (49) donieśli o obecności w preparatach ludzkich hemoglobiny, otrzymanych różnymi metodami, 1 mola adeniny na 6 moli białka.

Analizując metodą swobodnej elektroforezy hemolizaty ludzkiej krwi *Berry* i *Chanutin* (12, 13) wykryli w nich obecność trzech frakcji: A, B, f, których stężenie jest zależne od siły jonowej i pH buforu. Okazało się, że frakcje A i B są białkami hemowymi i że stężenie frakcji B w trakcie przechowywania maleje. *Chanutin* i wsp. (16, 70) szczegó-

łowo zbadali wpływ związków fosforowych na stężenie tej frakcji (tablica 1). Największy wzrost składnika B o około 14% zaobserwowano po dodaniu 2,3-DPG, GTP i ATP w ilości 5 μ M/g Hb.

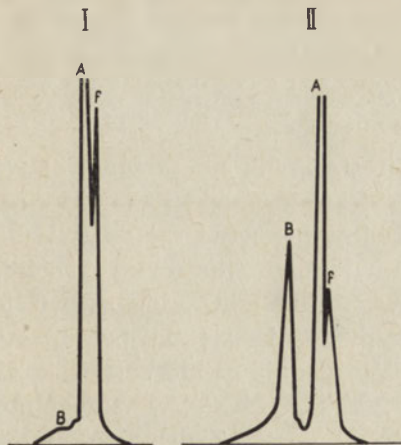
Tablica 1

Przyrost frakcji B pod wpływem niektórych związków fosforowych (według 16, 70)

Związek (5 μ moli/g Hb)	Przyrost (%)
2,3-DPG	14,8
GTP	14,4
GDP	9,1
GMP	2,1
ATP	12,2
ADP	6,8
AMP	-0,6
ITP	11,9
IDP	3,9
IMP	0,5
UTP	9,9
UDP	6,7
UMP	0,2
CTP	8,1
CDP	4,3
CMP	0,7

Frakcja B występuje nie tylko w świeżych hemolizatach, ale także w preparatach Hb. W 2% roztworze Hb stężenie frakcji B wynosi 4,2% i wzrasta po dodaniu do roztworu 2,3-DPG (rysunek 1).

Inkubacja hemolizatów z alkaliczną fosfatazą powoduje spadek frakcji B do ilości śladowych, co wskazuje, że frakcja B jest połączeniem Hb



Rys. 1. Rozdział preparatów hemoglobiny metodą elektroforezy swobodnej (wg 12)
I. Roztwór 2% Hb, II, Hb + 2,3-DPG

z organicznym fosforanem. L u d e w i g i C h a n u t i n (51) oznaczyli fosfor organiczny (P_{org}) i nieorganiczny (P_i) w krwi ludzkiej i hemolizatach w trakcie przechowywania. W hemolizatach ilość fosforu nieorganicznego spada o około 50%, a ilość fosforu organicznego pozostaje na tym samym poziomie w stosunku do krwi przechowywanej. W porównaniu do wartości P_{org} i P_i w hemolizatach dializowanych wobec wody, przyjętych za 100%, P_i spada gwałtownie do około 10% w miarę wzrostu pH roztworu zewnętrznego. Fosfor organiczny pozostaje na stałym poziomie w zakresie pH 5,3—6,8, ulegając obniżeniu przy dalszym wzroście pH . Wysłunęto stąd wniosek, że w nieobecności soli następuje przyłączenie fosforu organicznego do hemoglobiny.

S k u l a c h e v i w s p. (67) donieśli o obecności połączenia cytochrom b_5 -nukleotydu. Z ogólnej liczby 15 nukleotyduów na mol protohemu przypada 6 nukleotyduów adenylowych.

Obecność rybozy, fosforu organicznego oraz bliżej niezidentyfikowanych zasad z maksimum absorpcji przy 260nm wykryto w roztworach hemoglobiny świń (44). Dalszym dowodem tworzenia kompleksu Hb z fosforanami, a w szczególności z ATP i 2,3-DPG są wyniki badań ze znakowanym ^{14}C i ^{32}P . G a r b y i d e V e r d i e r (33) zaobserwowali przyrost radioaktywności w preparatach Hb w miarę ich oczyszczania. Połączenie Hb z fosforanem, ich zdaniem, występuje także w nienaruszonych erytrocytach, gdzie prawdopodobnie około 50% ATP lub 2,3-DPG jest związane z Hb.

Także w preparatach mioglobiny (Mb) wołowej, otrzymanych przez frakcjonowanie wysalaniem siarczanem amonu i dializę oraz oczyszczanie na kolumnie wypełnionej *Dowex* G o n d k o i w s p. (35, 37) stwierdzili obecność związków adeninowych. Pomimo dość drastycznych czynności preparatywnych związki te były zawsze obecne w preparatach Mb.

Dane te wskazują, że organiczne polifosforany tworzą połączenia z hemoproteidami, a w szczególności z hemoglobina. Znaczenie tych połączeń w organizmie zostanie omówione w dalszej części.

II. Wpływ polifosforanów na powinowactwo Hb do tlenu

Roztwory hemoglobiny nie zawierające soli charakteryzują się wysokim powinowactwem do tlenu (logarytm ciśnienia tlenu, przy którym 50% Hb występuje w formie HbO_2 , $\log p_{50} = 0,16$), brakiem interakcji hem-hem ($n = 1$), czym różnią się od pełnej krwi (1). Funkcjonalne właściwości hemoglobiny ulegają gwałtownej zmianie po umieszczeniu jej w środowisku estrów fosforowych (6), w szczególności 2,3-DPG i nukleotyduów adenylowych (ATP, ADP). Związki te obniżają powinowactwo Hb do tlenu ($\log p_{50} = 0,73$) a równocześnie zwiększają interakcję hem-hem ($n = 2,7$), przy czym największe zmiany obserwuje się przy stężeniu rów-

nym ich stężeniu w krwi. Ponadto Chanutin i Curnish (17) wykazali, że nie tylko 2,3-DPG i ATP, ale także inne organiczne i nieorganiczne polifosforany w większym lub mniejszym stopniu powodują przesunięcie krzywej dysocjacji HbO_2 w prawo (tablica 2).

Tablica 2

Równowaga tlenowa Hb w obecności związków fosforowych (według 17)

Związek	$\log p_{1/2}$	n
Kontrola	0,77	3,0
ATP	0,94	2,8
ADP	0,87	3,1
AMP	0,79	3,1
GTP	0,97	2,7
GDP	0,86	2,8
GMP	0,84	2,7
2,3-DPG	0,93	2,7
Rybozo-5-fosforan	0,84	3,2
fosforan pirydoksalu	0,93	2,8
pirofosforan	0,91	2,7
trójpolifosforan	0,93	2,4
czterometafosforan	0,91	2,9
sześciometafosforan	1,15	1,4

HB = $1,55 \times 10^{-5}M$, $\mu M Hb / \mu M P = 1:1,55$, bufor fosforanowy 0,023M o pH 7

Nasunęło się więc uzasadnione przypuszczenie, że wszystkie dotychczas otrzymywane preparaty Hb zawierały związki fosforowe. Benesch i wsp. (10) stwierdzili, że nawet po wielogodzinnej dializie w preparatach Hb przygotowanych według Drabkina (25) obecny był 2,3-DPG w ilości 0,5mola/mol Hb. Do dalszych badań Benesch i wsp. (9, 10) stosowali więc tzw. hemoglobinę oczyszczoną ze związków fosforowych na kolumnie *Sephadex G-25* (ang. *stripped Hb*). Roztwory tak oczyszczonej Hb wykazały wysokie powinowactwo do tlenu i interakcję hem-hem ($n = 2,6-2,9$). Krzywe oczyszczonej Hb, wyłącznie dializą wobec wody, charakteryzowały się natomiast wartością $n = 1,1$, o czym donieśli Benesch i Benesch (6) już poprzednio. Według nich w tym ostatnim przypadku w roztworze obecna była zarówno wolna Hb o bardzo dużym powinowactwie do tlenu, jak i Hb połączona z 2,3-DPG tj. z obniżonym powinowactwem. Chcąc udowodnić to przypuszczenie Benesch i wsp. (10) sprawdzili jak zmienia się powinowactwo oczyszczonej Hb po dodaniu do niej w różnych ilościach 2,3-DPG (0,5 i 1mola/mol) przy niskiej sile jonowej badanego roztworu. Tylko poniżej 1 mola 2,3-DPG/mol Hb otrzymali krzywe dwufazowe, tj. charakterystyczne dla Hb w takich warunkach, w których prawdopodobnie nie ma interakcji hem-hem.

Z danych uzyskanych metodą dializy Craiga i wsp. (19) obliczono, że dezoksyhemoglobina wiąże 2,3-DPG w stosunku mol na mol, a utle-

nowanie powoduje uwolnienie związanego estru. Stanowiło to dowód, że tylko odtlenowana forma Hb przyłącza 2,3-DPG. W warunkach doświadczenia methemoglobina i cyjanmethemoglobina nie wiązały 2,3-DPG (9, 10). Wydaje się, że obniżenie powinowactwa do tlenu w obecności 2,3-DPG jest spowodowane specyficznym przyłączeniem tego związku do dezoksyhemoglobiny. Reakcję wiązania tlenu i 2,3-DPG z hemoglobina uważać można za współzawodnictwo obu cząsteczek o miejsca na cząsteczce białka.

Porównawczo sprawdzono także powinowactwo do tlenu hemoglobiny owiec, których krew zawiera znikome ilości estrów fosforowych i ślady 2,3-DPG, i kurcząt, u których we krwi nie ma 2,3-DPG, a jako główny składnik występuje 6-fosforan inozytolu. Powinowactwo do tlenu Hb owcy ulega nieznacznej zmianie po oczyszczeniu i jest niższe od powinowactwa oczyszczonej Hb człowieka. Jest interesujące dlaczego hemoglobina owcy ma wystarczająco niskie powinowactwo do tlenu bez udziału innych pośredników? Podobne powinowactwo jak wolna od związków fosforanowych Hb człowieka, wykazuje oczyszczona hemoglobina kurcząt. Okazało się, że w przypadku obu hemoglobin powinowactwo do tlenu jest bardziej obniżane przez fosforan inozytolu. Przy użyciu nadmiaru tego związku krzywe dysocjacji Hb człowieka i kurczaka są identyczne (10).

W poszukiwaniu specyficznych miejsc wiążących estry polifosforanowe w cząsteczce Hb Benesch i wsp. (9) rozbili ją na podjednostki i metodą ultrafiltracji oznaczyli zdolność wiązania 2,3-DPG przez łańcuchy Hb. Jedynie łańcuch β zarówno w formie oksy- jak i dezoksy- przyłączył 2,3-DPG w ilości 1 mola/mol HbH.

Chanutin i Herman (18) podali, że zdolność wiązania 2,3-DPG wykazuje zarówno dezoksy- jak i methemoglobina i oksyhemoglobina (tablica 3); ilość miejsc wiążących (n) i stałe k obliczono z równania Scatcharda i wsp: (65). Identyczne wyniki autorzy otrzymali w przypadku ATP, ADP oraz nieorganicznych polifosforanów.

Zgodnie z Chanutinem wyniki przedstawili Luque i wsp. (52), którzy metodą dializy i chromatografii kolumnowej stwierdzili przyłączenie 2,3-DPG do oksyhemoglobiny. Ponadto, używając czulej enzymatycznej metody oznaczania 2,3-DPG w preparatach oczyszczonej Hb otrzymanych

Tablica 3

Stałe (k) i miejsca wiążące (n) organiczne fosforany przez Hb (według 18)

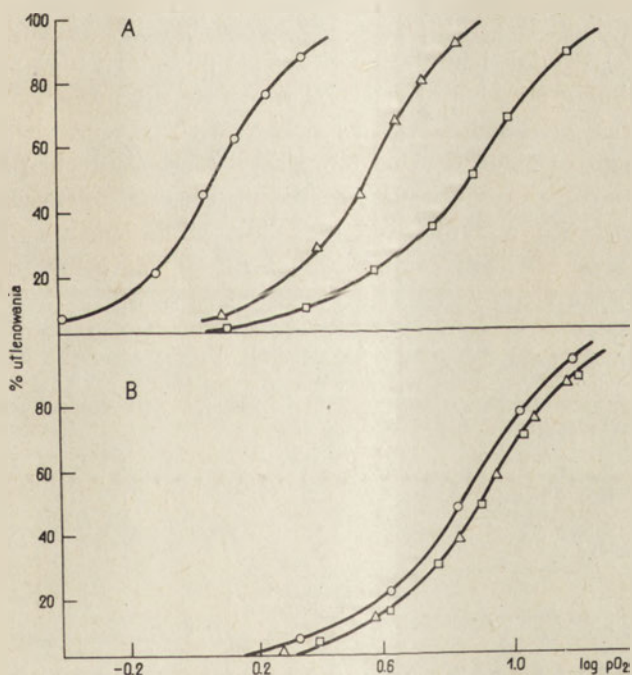
Związek	Stała	Hb	n	HbO ₂	n	MetHb	n
2,3-DPG	k ₁	1,4 × 10 ⁵	1	7,0 × 10 ⁴	1	1,6 × 10 ⁵	1
	k ₂	3,6 × 10 ³	2	1,1 × 10 ³	2	1,1 × 10 ³	2
ATP	k ₁	1,0 × 10 ⁵	1	6,0 × 10 ⁴	1	1,0 × 10 ⁵	1
	k ₂	1,0 × 10 ⁴	2	1,2 × 10 ⁴	2	4,9 × 10 ³	3
ADP	k ₁	—	1	1,0 × 10 ⁵	1	1,0 × 10 ⁵	1
	k ₂	2,7 × 10 ³	4	2,0 × 10 ³	4	3,0 × 10 ³	4

według Benescha i wsp. (9), stwierdzili w dalszym ciągu obecność 2,3-DPG w ilości 0,1—0,15mola/mol Hb.

Powstałe rozbieżności zostały częściowo wyjaśnione w ostatnim doniesieniu Benescha i wsp. (11), którzy tym razem sprawdzili wszystkie teoretycznie możliwe parametry wpływające na krzywą dysocjacji Hb to jest stężenie białka, soli, pH i temperaturę. Do oczyszczenia preparatów Hb z związków fosforowych zastosowano dializę wg Englandera i Crowe (31). W celu wykluczenia konkurencyjnego współdziałania nieorganicznych fosforanów z 2,3-DPG w doświadczeniach tych stosowano bufor 0,05M Tris-HCl o 0,1M stężeniu chlorków.

Otrzymane dane wskazują, że stężenie hemoglobiny nie ma wpływu na powinowactwo Hb do tlenu. Potwierdzono znany fakt obniżenia powinowactwa do tlenu w wyniku wzrostu stężenia soli w środowisku Hb. Przy wystarczająco wysokim stężeniu NaCl (0,5M) zostaje zniesiony wpływ 2,3-DPG na krzywą dysocjacji. Natomiast stężenie $2,5 \times 10^{-4}M$ 2,3-DPG jest wystarczające, aby krzywa ta była niezależna od stężenia soli (rysunek 2 i 3).

Krzywa dysocjacji Hb jest dwufazowa tylko wówczas, gdy stężenie soli jest wystarczająco niskie (0,01M NaCl), a stężenie 2,3-DPG mniejsze niż

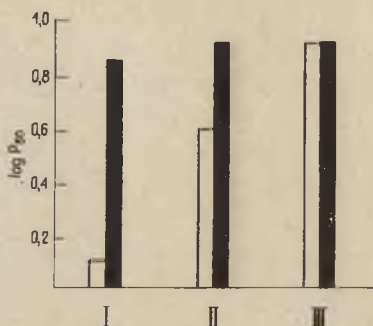


Rys. 2. Oddziaływanie soli na powinowactwo Hb do tlenu

Bufor Tris 0,05M, $pH = 7,3$, Hb = 0,4%

○ — 0,01 M Cl^- , △ — 0,1 M Cl^- , □ — 0,5 M Cl^-

A) bez 2,3-DPG, B) 2,3-DPG w stężeniu $2,5 \times 10^{-4} M$



Rys. 3. Porównanie wpływu NaCl i 2,3-DPG na powinowactwo hemoglobiny do tlenu (wg 11)
puste słupki — bez 2,3-DPG, pełne słupki — z 2,3-DPG w stężeniu $2,5 \times 10^{-4}$ M
I. 0,01 M Cl^- , II. 0,1 M Cl^- , III. 0,5 M Cl^-

1 mol/mol Hb. W stosunku mol/mol kompleks dezoksyhemoglobina-2,3-DPG istnieje tylko w warunkach fizjologicznego stężenia NaCl. Przy niższym stężeniu soli stosunek ten ulega zmianie na korzyść 2,3-DPG i wówczas dochodzi do tworzenia połączenia także z oksyhemoglobina.

Ważną rolę w przyłączeniu wysoko naładowanych ujemnie estrów polifosforanowych spełniają dodatnie grupy białka i nie było niespodzianką, że powinowactwo Hb do 2,3-DPG zmniejszyło się z wzrostem pH . Natomiast zaskakujący był fakt, że efekt Bohra był identyczny tak w nieobecności 2,3-DPG jak i w obecności dużego nadmiaru tego związku.

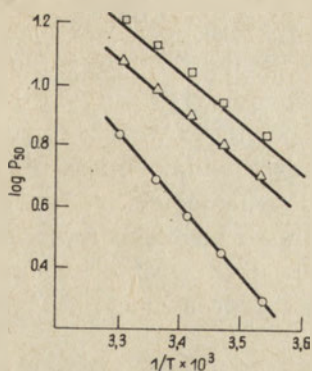
W warunkach, gdy 1 mol 2,3-DPG wiąże się z 1 molem dezoksyhemoglobiny energia swobodna w temperaturze 20°C wynosi 6,4 kcal/mol. Wartość energii w zależności od temperatury przy stałym pH podaje tabela 4. Ze wzrostem temperatury obniżeniu ulegają wartości stałych asocjacji i w związku z tym reakcja ta jest silnie egzotermiczna. Około 13 kcal/mol zostaje uwolnione jako ciepło (ΔH), obniżeniu ulega energia swobodna (ΔF), a reakcji towarzyszy spadek entropii.

Tabela 4

Wpływ temperatury na wiązanie 2,3-DPG przez dezoksyhemoglobinę (według 11)

Temp. $^\circ\text{C}$	$\log 1/K_2$	ΔF kcal	ΔH kcal	ΔS
10	5,28	-6,81	-13,2	-22,6
15	5,02	-6,61	-13,2	-22,9
20	4,92	-6,59	-13,2	-22,6
25	4,80	-6,54	-13,2	-22,5
30	4,56	-6,32		-22,8

Utlenowanie Hb występującej w połączeniu z 2,3-DPG, powoduje prawdopodobnie przemieszczenie 2,3-DPG i absorbcję ciepła, dlatego współczynnik temperaturowy jest obniżony, co przedstawiono na rysunku 4.

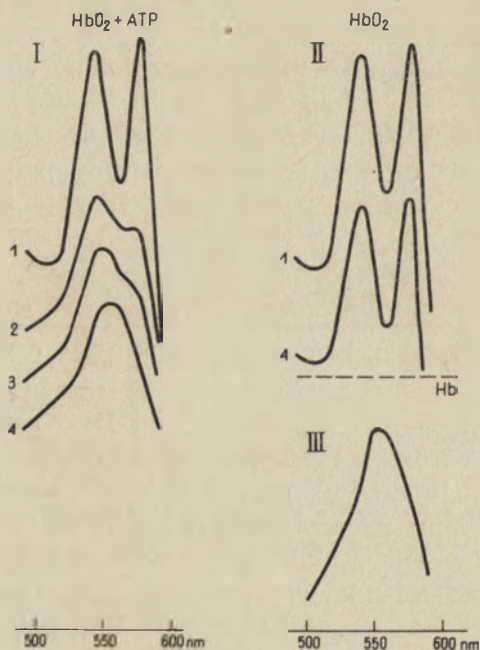


Rys. 4. Zależność $\log p_{50}$ od temperatury

Bufor Tris 0,05 M, $pH = 7,3$, 0,1 M Cl^- , Hb = 0,4%

Δ — $2,5 \times 10^{-4}$ M 2,3-DPG, \square — 1×10^{-3} M 2,3-DPG, \circ — 0,0 M 2,3-DPG

W zasadzie wszystkie badania kompleksu hemoglobina-polifosforan prowadzono przy użyciu metody dializy, nie analizując zmian w widmie hemoglobiny po dodaniu do niej estrów. Wydaje się, że zarejestrowane po-



Rys. 5. Zmiana widma HbO_2 w czasie w obecności i nieobecności ATP

1 — 0,0 godz., 2 — 21,2 godz., 3 — 22,5 godz., 3 — 22,5 godz., 4 — 28,3 godz.

I — $HbO_2 + ATP$, II — HbO_2 , III — Hb

przednio przesunięcie w zakresie UV jest spowodowane raczej dużym nadmiarem nukleotydu (36). Ostatnio L o i S c h i m m e l (50) umieścili w zamkniętej kuwecie mieszaninę HbO_2 z ATP i rejestrowali zmianę widma w czasie. Kontrolę stanowiła kuweta z roztworem HbO_2 . Stosunkowo wolno w przeciągu 25 godzin widmo mieszaniny ($\text{HbO}_2 + \text{ATP}$) zmieniło się w typowe widmo dezoksyhemoglobiny. Roztwór kontrolny w tym samym czasie wykazał minimalną zmianę (rysunek 5). Wysycenie mieszaniny powietrzem spowodowało powrót do widma HbO_2 , co wskazuje na odwracalność tego procesu i preferencję ATP do formy dezoksyhemoglobiny.

W identycznych warunkach w stosunku mol/mol tetrameru dezoksyhemoglobiny łączyły się: 2,3-DPG, ATP i ADP. Znacznie słabiej przyłączany był AMP. Wymienione polifosforany najprawdopodobniej przyłączają się konkurencyjnie w tym samym miejscu w cząsteczce Hb, bowiem w doświadczeniu z mieszaniną: Hb, 2,3-DPG i ATP, ilość ATP przyłączonego do Hb jest mniejsza (50).

Miejsce przyłączenia się polifosforanu do hemoglobiny w dalszym ciągu jest nieznanne.

W przypadku podjednostek Hb (9) obserwowano przyłączenie polifosforanów tylko do łańcuchów β , tj. do łańcuchów, które warunkują przestrzenne przegrupowanie cząsteczki Hb („pulsująca cząsteczka”) (58). Wewnętrzny otwór w cząsteczce Hb oksyhemoglobiny wynosi 5Å, natomiast w dezoksyhemoglobinie jest znacznie większy i wszystko wskazywałoby na to, że to tu właśnie, w przestrzeń między łańcuchami, przyłączona zostaje cząsteczka polifosforanu. Z drugiej strony przyłączenie estru nastąpiło także do HbM, która to przecież nie wykazuje przestrzennego przegrupowania (58).

III. Rola kompleksu hemoglobina-polifosforan w organizmie

Przesunięcie krzywej dysocjacji przez 2,3-DPG i nukleotydy adenylowe w prawo, jest bardzo korzystne dla organizmu. Obniżenie powinowactwa do tlenu powoduje, że już przy stosunkowo niewielkiej różnicy parcjalnych ciśnień tlenu między tkankami a krwią tętniczą, około 50% tlenu związanego w HbO_2 może być przekazane tkankom. Inaczej zachowuje się barwnik mięśniowy, mioglobina. Aby mioglobina oddała swój tlen w 50% różnica ciśnień parcjalnych musi być znacznie większa mimo, że zarówno Hb jak i Mb mają wysokie powinowactwo do tlenu (2, 64).

Różnica ta uwidocznia się jeszcze wyraźniej w przypadku hemoglobiny ptaków i człowieka. Krzywa dysocjacji pełnej krwi ptaków przesunięta jest bardziej w prawo niż krzywa dla krwi człowieka, natomiast same hemoglobiny wykazują identyczne powinowactwo do tlenu. Obecny w krwi

ptaków fosforan inozytolu prawdopodobnie wywiera znacznie większy wpływ na zmianę właściwości allosterycznych Hb niż 2,3-DPG.

Według Beneschów (8) polifosforany wpływają tylko na powinowactwo Hb do tlenu, pozostając bez wpływu na interakcję hemów i efekt Bohra. Luque i wsp. (52) sygnalizują, że estry fosforanowe zmieniają szereg własności fizyko-chemicznych Hb. Pod wpływem ATP i 2,3-DPG stwierdzono zmiany potencjału oksydoredukcyjnego (38, 39, 41).

Zmianie musi więc ulec dotychczasowy pogląd, że na krzywą dysocjacji hemoglobiny wpływ ma temperatura i *pH*, w zasadzie stałe w warunkach fizjologicznych.

Estry fosforowe: 2,3-DPG i ATP w stężeniu około 5:1mM/100 ml stanowią większość związków fosforowych krwi człowieka (15). Ich poziom jest metabolicznie regulowany, a 2,3-DPG tylko w krwi występuje w tak znacznym stężeniu (40), jako produkt przemiany glukozy w odgałęzieniu szlaku Embdena-Meyerhofa-Parnasa, tj. przemiany 1,3-DPG w 2,3-DPG.

Raport i Nieradt (62) stwierdzili, że prawie 90% glukozy przekształcane jest w 2,3-DPG. Z drugiej strony 2,3-DPG na zasadzie hamowania zwrotnego (4) hamuje heksokinazę, a także dwufosfogliceromutazę (61, 63). Specyficzne przyłączanie 2,3-DPG do dezoksyhemoglobiny jest więc odpowiedzią na hamujący wpływ 2,3-DPG na jego własną syntezę; stopień utlenowania hemoglobiny w erytrocytach automatycznie kontroluje poziom 2,3-DPG. I tak Asakura i wsp. (3) donieśli, że przebieg glikolizy i zawartość 2,3-DPG w środowisku O_2 lub CO nie ulega zmianie, zwiększając się w atmosferze azotu; pozostaje to w zgodzie z poprzednimi faktami, bowiem w warunkach fizjologicznych ani oksyani karboksyhemoglobina nie wiążą 2,3-DPG.

Edwards i Rigas (28) zaobserwowali *in vivo* wzrost powinowactwa do tlenu w starszych erytrocytach, co tłumaczyć można obniżeniem w nich poziomu 2,3-DPG. Podobne zjawisko występuje *in vitro* w czasie zahamowanej glikolizy (29). We krwi konserwowanej rozpad 2,3-DPG i ATP może być powstrzymany, a nawet odwrócony poprzez nukleozydy. Inozyna i adenozyne przeciwdziałają zwiększaniu się powinowactwa hemoglobiny do tlenu w trakcie przechowywania krwi (5, 32). Nukleozydy te prawdopodobnie oddziałują głównie na przemiany boczne szlaku pentozowego, w których rybozo-1-fosforan jest przekształcany w 2,3-DPG.

Wyższe powinowactwo do tlenu ludzkiej krwi płodowej (HbF) w dalszym ciągu wymaga wyjaśnienia. Różnica stężeń 2,3-DPG w krwi pępowinowej i żyłnej nie jest statystycznie znamienne (46). Wolna HbF charakteryzuje się wyższym powinowactwem do tlenu, a obniżanie powinowactwa przez 2,3-DPG i ATP jest znacznie większe w przypadku HbA (72). Przyłączanie 2,3-DPG i ATP przez HbF jest znacznie słabsze, co może być spowodowane różnicą w aminokwasowym składzie obu hemoglobin.

Szczególne znaczenie mają prowadzone obecnie badania powinowactwa Hb do tlenu na różnych wysokościach nad poziomem morza. Przemieszczeniu na wysokość 4,5 km nad poziomem morza towarzyszy przesunięcie krzywej dysocjacji w prawo z równoczesnym wzrostem 2,3-DPG o około 50%. Zjawisko odwrotne, wzrost powinowactwa i spadek 2,3-DPG, nastąpił u górali umieszczonych na obszarze o normalnym ciśnieniu atmosferycznym (45). Deficyt tlenu prowadzi do wzrostu we krwi stężenia dezo-ksyhemoglobiny (tylko ta forma łączy się z 2,3-DPG) co w konsekwencji powoduje wzrost jego syntezy, a w następstwie ułatwia oddawanie tlenu.

Przesunięcie krzywej dysocjacji w prawo obserwowano między innymi w wrodzonej chorobie serca i różnego rodzaju anemiach (27). W wielu anemiach należy jednak uwzględniać wzrost retikulocytów w krwi, który to powoduje przyrost estrów fosforowych. Zmiany zawartości ATP w erytrocytach w niektórych stanach patologicznych omówiono poprzednio w *Postęпах Biochemii* (48).

Prawdopodobne jest także, że aktywny transport poprzez błony komórkowe odbywa się przy udziale 2,3-DPG. Nasilenie transportu sodu obserwowano tylko wówczas, gdy hemoglobina występowała w formie dezo-ksyhemoglobiny (7). Pomimo, że 2,3-DPG jest tak niezbędny w krwinkach, znacznie szybciej następuje włączanie P_i do ATP niż do 2,3-DPG (34). Nie jest jeszcze całkowicie poznana rola obecnych w krwi adenozynotrójfosforów (42). Można przypuszczać, że w najbliższym czasie będzie możliwe uzyskanie środkami farmakologicznymi podwyższenia poziomu polifosforanów w krwi, a tym samym usprawnienie jej podstawowej czynności biologicznej to jest transportu tlenu.

LITERATURA

1. Adair G., *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
2. Antonini E., *Physiol. Rev.* **45**, 123 (1964).
3. Asakura T., Sato Y., Minakami S., Yoshikawa H., *J. Biochem.* **5**, 524 (1966).
4. Atkinson D. E., *Biochemistry* **7**, 4030 (1968).
5. Bartlett G. R., Schafer A. W., *J. Clin. Invest.* **39**, 62 (1960).
6. Benesch R., Benesch R. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 162 (1967).
7. Benesch R., Benesch R. E., *Science* **160**, 83 (1968).
8. Benesch R., Benesch R. E., *Nature* **221**, 618 (1969).
9. Benesch R., Benesch R. E., Enoki Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 1102 (1968).
10. Benesch R., Benesch R. E., Yu C. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 526 (1968).
11. Benesch R., Benesch R. E., Yu C. I., *Biochemistry* **8**, 2567 (1969).
12. Berry E. R., Chanutin A., *J. Clin. Invest.* **36**, 225 (1957).
13. Berry E. R., Chanutin A., *J. Clin. Invest.* **37**, 974 (1958).
14. Biro N. A., Nagy B., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **8**, 313 (1955).

15. Bishop C., Surgenor D. M., *The Red Cell*, Academic Press, New York 1964.
16. Chanutin A., Curnish R. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 433 (1964).
17. Chanutin A., Curnish R. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 96 (1967).
18. Chanutin A., Herman E., *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 180 (1969).
19. Craig L. C., King T. P., Stracher A., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3729 (1957).
20. Deavin A., Fisher R., Kemp C. M., Mathias A. P., Rabin R. B., *Europ. J. Biochem.* **7**, 51 (1969).
21. Dmochowski A., *Kosmos* **49**, (1924).
22. Drabikowski W., *Acta Physiol. Polon.* **8**, 314 (1957).
23. Drabikowski W., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 127 (1960).
24. Drabikowski W., *Badania nad połączeniami różnych białek z nukleotydam i ortofosforanem*, Łódzkie Tow. Nauk., Łódź 1963.
25. Drabkin D. L., *J. Biol. Chem.* **164**, 703 (1946).
26. Dydyńska M., Kąkol I., Kowalski T., Strzelecka H., Niemierko W., *Acta Physiol. Polon.* **8**, 316 (1957).
27. Edwards M. J., Novy M., Walters C. L., Metcalfe J., *J. Clin. Invest.* **47**, 1851 (1968).
28. Edwards M. J., Rigas D. A., *J. Clin. Invest.* **46**, 1579 (1967).
29. Engel K., Düc G., *Nature* **219**, 936 (1968).
30. Engelhardt W. A., Ljubimowa M. N., *Nature* **144**, 668 (1939).
31. Englander S. W., Crowe D., *Anal. Biochem.* **12**, 579 (1965).
32. Gabrio B., Hennessy M., Thomasson J., Finch C. A., *J. Biol. Chem.* **215**, 357 (1955).
33. Garby L., de Verdier C. H., V Berliner Symp. „Structure und Funktion der Erythrozyten” Berlin 1967, t. 1, str. 119.
34. Gomperts B. D., *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 144 (1969).
35. Gondko R., Kuźmińska Z., Leyko W., *Zesz. Nauk. U.Ł.* s. II, **24**, 55 (1967).
36. Gondko R., Leyko W., *Połączenia nukleotydów z białkami oddechowymi*, Łódzkie Tow. Nauk., Łódź 1969.
37. Gondko R., Modrzejewska H., Leyko W., *Zesz. Nauk. U.Ł.* s. II, **35**, 3 (1969).
38. Gondko R., Mućko H., Leyko W., *Materiały VI Zjazdu P.T. Bioch. Olsztyn 1968*, str. 59.
39. Gondko R., Mućko H., Leyko W., w druku.
40. Greenwald I., *J. Biol. Chem.* **63**, 339 (1925).
41. Grisolia S., Moore K., Luque J., Grady H., *Anal. Biochem.* w druku.
42. Groeschel S., *Experientia* **25**, 601 (1969).
43. Gruda J., *Post. Biochem.* **13**, 61 (1967).
44. Hastwell J. S., Priestland R. N., *Nature* **212**, 396 (1966).
45. Lenfant C., Torrance J., English E., Finch C. A., Reynafarje C., Ramca J., Faura J., *J. Clin. Invest.* **47**, 2652 (1968).
46. Lewandowski J., Duda W., *Wissenschaftliche Zeit. Friedrich-Schiller Univ. Mathem.-Natur. Reiche* **1**, 51 (1968).
47. Leyko W., *Związki adeninowe krwi ludzkiej*, Łódzkie Tow. Nauk., Łódź 1959.
48. Leyko W., *Post. Biochem.* **12**, 225 (1966).
49. Leyko W., Dmochowski A., Buczek L., Gondko R., *Zesz. Nauk. U.Ł.* s. II, **12**, 37 (1962).
50. Lo H. H., Schimmel R. L., *J. Biol. Chem.* **244**, 5084 (1969).
51. Ludewig S., Chanutin A., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 85 (1964).

52. Luque J., Diederich D., Grisolia S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 1019 (1969).
53. Nanninga L. B., Mommaerts W. H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1166 (1960).
54. Niemierko W., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **6**, 64 (1954) supp.
55. Niemierko W., Dydyńska M., Drabikowski W., Kąkol I., Zauska H., *Acta Biol. Exptl.* **17**, 373 (1957).
56. Niemierko W., Dydyńska M., Kąkol I., *Acta Biol. Exptl.* **17**, 389 (1957).
57. Niemierko W., Niemierko S., Włodawer P., *Acta Biol. Exptl.* **16**, 247 (1952).
58. Perutz M. F., *Scient. Amer.* **21**, 64 (1964).
59. Pfleider G., Auricchio F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 53 (1964).
60. Poglazow B. F., *Struktura i funkcji sokratitelnych białek*, Moskwa 1965.
61. Rapoport S., Lubering J., *J. Biol. Chem.* **196**, 583 (1952).
62. Rapoport S., Nieradt C., *Biochem. Z.* **326**, 231 (1955).
63. Rose Z. B., *J. Biol. Chem.* **243**, 4810 (1968).
64. Rossi-Fanelli A., Antonini E., *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 478 (1958).
65. Scatchard G., Scheinberg I. G., Armstrong S. H., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 535 (1950).
66. Schlisefeld H. L., Barany M., *Biochemistry* **7**, 3206 (1968).
67. Skulachev V. P., Goldstein J. J., Danisovich L. J., Evtodienko V. Yu., Tikhonova G. V., Christiakov V. V., Jasaitis A. A., *Symposium Elektrochemische Methoden und Prinzipien in der Molekular Biologie*, Jena 1965.
68. Straub F. B., Feuer G. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 455 (1950).
69. Strzelecka-Gołaszewska H., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 301 (1961).
70. Sugita Y., Chanutin A., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **112**, 72 (1963).
71. Szent-Györgyi A. G., *Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* **1**, 17 (1942).
72. Tyuma I., Shimizu K., *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 404 (1969).
73. Umiastowski J., *Post. Biochem.* **10**, 445 (1964).

RECENZJE

Biochemical Actions of Hormones, tom 1, red. G. Litwack, Academic Press, New York and London 1970, str. 566.

Książka jest napisana przez zespół wybitnych specjalistów pracujących nad mechanizmem działania hormonów. W okresie ostatnich kilku lat badaniami endokryologicznymi interesuje się wielu biochemików, którzy starają się dotrzeć do molekularnych procesów regulacji hormonalnej. Jednym z istotnych etapów w badaniach dotyczących mechanizmu działania hormonów było odkrycie cyklicznego AMP jako pośrednika działania wielu substancji hormonalnych.

Celem tej książki było zebranie w całość przeglądu ostatnich osiągnięć w zakresie molekularnego i biochemicznego podłoża działania hormonów. Równocześnie są w niej uwidocznione perspektywy i kierunki dalszych badań w tej dziedzinie. Wiedza o działaniu hormonów opiera się na ostatnich osiągnięciach w badaniach kwasów nukleinowych i biosyntezy białka. Poszczególne rozdziały zawierają więc zebrane osiągnięcia z dziedziny biochemii i endokrynologii.

Poruszane zagadnienia mogą być ciekawe dla badaczy interesujących się biochemią, endokrynologią, farmakologią, biologią komórki i pokrewnymi dziedzinami nauki.

Książka składa się z 12 rozdziałów. Szczególnie cenny dla biochemika jest rozdział 3, dotyczący regulacji biosyntezy białka przez hormony, który napisał *J. R. Tata*. Razem z omówieniem problemu regulacji biosyntezy białka autor rozważa sposoby hormonalnej regulacji metabolizmu. Omawia on następujące zagadnienia: mechanizmy regulacyjne biosyntezy białka w tkankach zwierzęcych, hormony a biosynteza białka oraz rola struktury komórki w tych procesach.

Rozdział 5 napisany przez *T. R. Riggs* dotyczy udziału hormonów w procesie transportu przez błony komórkowe.

Rozdział 7 omawia wpływ insuliny na biosyntezę białka. W tym rozdziale są poruszone takie zagadnienia jak ogólny wpływ insuliny na metabolizm azotowy, synteza białka w mięśniu, gromadzenie aminokwasów w mięśniu i wpływ insuliny na metabolizm RNA w mięśniu.

H. Rasmussen i *A. Tenenhouse* w rozdziale 9 zajmują się zagadnieniem mechanizmu działania hormonu przytarczycy i kalcytoniny.

W rozdziale 10 jest omawiany mechanizm działania tyreotropiny. Autorzy (*E. Schell-Frederick* i *J. E. Dumont*) poruszają problem specyficznej interakcji tyreotropiny ze składnikami komórek tarczycy i zagadnienie cyklicznego 3',5'-AMP jako wewnątrzkomórkowego mediatora działania tyreotropiny.

Pozostałe rozdziały mają następujące tytuły: 1. Hormony w metamorfozie płazów, 2. Tworzenie się enzymów w wątrobie szczura, 4. Regulacja niektórych rytmów biochemicznych, 6. Wiązanie hormonów z białkami. 8. Mineralokortykoidy, 11. Gruczoł wydzielenia wewnętrznego, 12. Hormony roślinne.

Należy podkreślić wysoki poziom prezentacji poszczególnych zagadnień. Włączenie do przeglądu nie publikowanych poprzednio wyników badań przeprowadzonych w laboratoriach autorów podnosi wartość omawianej książki.

K. Kochman

SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie ze Szkoły—Seminarium zorganizowanej na temat mikro- metod analizy kwasów nukleinowych w Nowosybirsku (w listopadzie 1971 roku)

Szkoła — Seminarium odbywała się w miasteczku uniwersyteckim — Akademgorodok (Nowosybirsk) w dniach od 11 do 20 listopada 1971 roku. Zorganizował ją Instytut Chemii Organicznej Syberyjskiego Oddziału Akademii Nauk Z.S.R.R., a jej kierownikiem był akademik prof. D. G. Knorre. Program Szkoły obejmował zarówno wykłady jak i zajęcia praktyczne; ponadto odbyło się seminarium, w czasie którego radzieccy naukowcy przedstawili wyniki badań własnych z zastosowaniem metod prezentowanych podczas trwania kursu. Uczestnikami Szkoły byli głównie młodzi naukowcy radzieccy, w ilości około 50 osób, a także kilkusobowe grupy z krajów socjalistycznych, w tym 2 uczestników z Polski.

W ramach Szkoły wygłoszono 6 dwugodzinnych wykładów; profesor D. G. Knorre wygłosił wykład inauguracyjny zatytułowany: „Możliwości i perspektywy zastosowania mikrometod w analizie kwasów nukleinowych”. Wykład na temat zastosowania izotopów promieniotwórczych w mikroanalizie kwasów nukleinowych został wygłoszony przez prof. L. A. Ostermana. Profesor S. W. Kuźmin omawiał zagadnienia mikrospektrofotometrii, a kand. nauk L. S. Sandachcziew problemy związane z zastosowaniem chromatografii, elektroforezy i ultrawierowania do mikroilościowej analizy kwasów nukleinowych.

Główny nacisk położono na zajęcia praktyczne, które odbywały się przez 6 godzin dziennie. Uczestnicy Szkoły własnoręcznie wykonywali poszczególne etapy analiz zapoznając się jednocześnie z problemami technicznymi prac przygotowawczych.

Uczestnicy Szkoły zapoznali się między innymi z techniką mikrochromatografii kolumnowej produktów hydrolizy RNA na DEAE-celulozie, techniką chromatografii cienkowarstwowej na żelu *Sephadex*, mikroelektroforezą kwasów rybonukleinowych na żelu poliakrylamidowym oraz z techniką ultrawierowania DNA w gradiencie stężeń chlorku cezu. Wymienione techniki analityczne dotyczyły próbek zawierających 10^{-8} — 10^{-9} g kwasów nukleinowych. Ze względu na niewielkie ilości materiału poddawanego analizie zachodzi konieczność stosowania kapilar o średnicy poniżej 1 mm. Odczyty ilościowe materiału analizowanego są dokonywane za pomocą przyrządów (spektrofotometry, densytometry) przystosowanych do oznaczeń na mikroskalę. Kiuwety mikrospektrofotometryczne mają postać kapilar o objętości kilku mikrolitrów. Automatyczna rejestracja wyników może być prowadzona jednocześnie przy kilku długościach fali świetlnej, zgodnie z uprzednim zaprogramowaniem za pomocą odpowiednich przystawek elektronicznych. Demonstrowane aparaty są produkcji radzieckiej, przy czym niektóre ich elementy, umożliwiające dokonywanie mikropomiarów, zaprojektowano i wykonano w Nowosyberyjskim Instytucie Chemii Organicznej. Na uwagę zasługuje pomysł zastosowania zestawów mikrokolumn chromatograficznych zespolonych z mikrokiuwetami. Przygotowanie tych zestawów odbywa się za pomocą specjalnie przystosowanych grzejników, wyposażonych w binokular, których spirale nagrzane do odpowiedniej temperatury pozwalają na nadanie kapilarom właściwej formy.

Pobieranie roztworów w ilościach poniżej 1 μ l, jak też przygotowywanie gradientów stężeń soli do elucji, dokonywane jest za pomocą skalowanych mikrośrub zespolonych ze strzykawkami. W większości przypadków jest stosowany tak zwany preformowany gradient liniowy stężeń soli, to znaczy gradient nieciągły przygotowywany, w wężykach polietylenowych o bardzo małym przekroju, przed rozpoczęciem elucji. Sama elucja materiału z kolumny rozpoczyna się bezpośrednio po nałożeniu preparatu, a szybkość przepływu eluentu jest regulowana automatycznie za pomocą systemu przekładni zespolonych z mikrośrubami. Może być także stosowany mikrokolektor frakcji przytwierdzony do spektrofotometru. Zamiast probówek kolektor ten posiada małe zbiorniczki o pojemności kilku mikrolitrów, wydrążone w teflonowej tarczy obrotowej mającej średnicę kilku centymetrów. Wypełnianie kolumn chromatograficznych (o średnicy 300—500 μ) wypełniaczami jonowymi typu DEAE- lub CM-celulozy można prowadzić bądź metodą flotacyjną za pomocą strzykawek, bądź też przy użyciu przyrządu, który umożliwi upakowanie celulozy pod ciśnieniem.

Elektroforeza kwasów nukleinowych, lub produktów ich rozpadu, prowadzona jest na żelu poliakrylamidowym także w mikrokapilarach. Utrwalenie i barwienie mikrosłupków elektroforetycznych odbywa się po uprzednim wypchnięciu ich z kapilar, a densytometryczne oznaczenie rozdzielonego materiału prowadzi się po ponownym zassaniu tych słupków do kapilar, za pomocą strzykawek. Mikroilościowa elektroforeza RNA trwa zaledwie ok. 2 min.

Ultrawierowanie preparatów DNA w gradiencie stężeń chlorku cezu, przeprowadzane w kapilarach o objętości ok. 0,25 μ l, przy stężeniu kwasu dezoksyrybonukleinowego 0,2 mg/ml, dokonywane jest w obecności żelu poliakrylamidowego o odpowiedniej gęstości, który fotopolimeryzuje się po ukończeniu sedymentacji. Fotometryczne oznaczenie pozwala wykryć 0,01 μ g DNA w paśmie sedymentacyjnym. Warto tu podkreślić, że możliwa jest jednocześnie analiza kilkuset próbek w oddzielnych kapilarach.

Uczestnicy Szkoły wysłuchali wykładu dr E. Paleczka (Instytut Biofizyki w Brnie) na temat mikroanalizy RNA i DNA metodami polarograficznymi oraz wykładu dr S. Vasu (Instytut Biochemii w Bukareszcie) o cienkowarstwowej chromatografii enzymów rybonukleolitycznych.

Ponadto uczestnikom umożliwiono odwiedzenie kilku instytutów naukowych w Akademgorodku, w tym Instytutu Chemii Jądrowej. Niezwykła życzliwość okazywana przez gospodarzy uczestnikom Szkoły, jak też nadzwyczaj sprawna organizacja całego przedsięwzięcia, zorganizowanego z dużym rozmachem, zasługują na specjalne podkreślenie.

T. Gołaszewski, L. Nowak

Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1969—1971

W okresie sprawozdawczym (20 września 1969 r. — 9 września 1971 r.) działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zmierzała do coraz pełniejszej realizacji celów statutowych jakimi są: popieranie rozwoju biochemii i jej popularyzacja (§ 4) w oparciu o społeczną pracę członków (§ 5).

Ogólna liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z 865 (15.IX.69) wzrosła w czasie kadencji do 953 (9.IX.71), przy czym przyjęto w tym czasie ponad 100 nowych członków, co świadczy o zainteresowaniu młodej kadry biochemicznej

działalnością Towarzystwa. Towarzystwo zyskało również w ostatnim okresie dwóch członków wspierających: Instytut Biochemii i Biofizyki PAN i Zjednoczenie Wytwórci Surowic i Szczepionek „Biomed”. W roku 1970 utworzony został 12-ty Oddział P.T. Biochemicznego w Toruniu, a liczba jego członków wynosi już 19 osób. Najliczniejsze Oddziały Towarzystwa stanowią nadal Oddziały: w Warszawie (305), Poznaniu (97), Łodzi (89) i Wrocławiu (87). Nieco mniejsze liczebnie są Oddziały: w Krakowie (65), Katowicach (56), Lublinie (51), Gdańsku (47), Szczecinie (46), Białymstoku (41) oraz Olsztynie (39). Liczba zagranicznych członków Towarzystwa (wliczanych dawniej do Oddziału Warszawskiego) wynosi 6 osób.

Budżet Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zamykał się po stronie kosztów w roku 1969 kwotą 600 tys. zł, w roku 1970 kwotą 560 tys. zł, w roku bieżącym planowane koszty sięgają 688 tys. zł. Pozorna niższa kosztów w roku 1970 wynika z wydatkowania niepełnych kwot przeznaczonych na wydawnictwa w związku z opóźnieniem druku *Monografii Biochemicznych*. Wydatki Towarzystwa zrównoważone były dochodami ze składek członkowskich, opłat zjazdowych (13%), sprzedaży wydawnictw (25%) i dotacji Polskiej Akademii Nauk (62%). Główną pozycję kosztów stanowiły jak w latach poprzednich nakłady na wydawnictwa (60%), koszty zjazdów (17%), koszty zebrań naukowych w Oddziałach, kursów i innych wydatków związanych z działalnością statutową (10%). Koszta administracyjne, to jest płace personelu biura Zarządu Głównego nie przekraczały 9% ogólnej kwoty wydatków.

W okresie sprawozdawczym Zarząd niejednokrotnie podejmował kroki zmierzające do zmniejszenia stanu zadłużenia członków z tytułu nie opłaconych składek i prenumerat. Akcja została uwieńczona częściowym sukcesem. Zadłużenie z tytułu zaległych składek zmniejszyło się o około 50%, a z tytułu zaległych prenumerat o około 60%. Wprowadzony w roku 1970 system przedpłaty nie w pełni zrealizował oczekiwania Zarządu Głównego, ponieważ do chwili obecnej 25% członków nie opłaciło składek i prenumerat za rok bieżący. Uregulowanie przez członków zaległości i punktualne płacenie składek nie jest sprawą błahą, ponieważ w roku bieżącym dotacja PAN dla Towarzystwa została zmniejszona o kwotę odpowiadającą sumie zaległych składek członkowskich. W chwili obecnej 120 osób zalega ze składką członkowską za lata poprzednie, a 236 nie opłaciło jej w roku bieżącym, 132 osoby nie opłaciły prenumerat za lata poprzednie, a 205 za rok bieżący. Ogółem kwota należna Towarzystwu od członków przewyższa 35 tys. złotych.

Fundusz nagród naukowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyniósł łącznie 17.000 złotych, z tej kwoty na nagrodę im. J. K. Parnasa wydatkowano po 5.000 złotych, na nagrodę im. J. Skarżyńskiego po 3.000 złotych, a na nagrody i wyróżnienia dla młodzieży biochemicznej przedstawiającej prace na Zjazdach Towarzystwa po 9.000 złotych w każdym roku. Wobec posiadanej obecnie pełnej rezerwy finansowej na koncie Towarzystwa — Zarząd Główny rozpoczął starania w PAN o powiększenie limitowanej kwoty na nagrody naukowe Towarzystwa.

Zebrania naukowe w Oddziałach, zjazdy, sympozja, konferencje

Podstawową formą działalności Towarzystwa są nadal zebrania naukowe w Oddziałach oraz doroczne zjazdy i sympozja. W okresie ostatnich dwóch lat liczba referatów przedstawionych na zebraniach naukowych wzrosła do 170 wobec 120 wygłoszonych w ciągu poprzednich dwóch lat. Wzrost ten wynika z ożywienia działalności Oddziału Białostockiego i zorganizowania w Warszawie zebrań, na których po kilku mówców przedstawiło tematykę i osiągnięcia badawcze niektórych spośród warszawskich placówek biochemicznych. Zebrania naukowe poświęcone dyskusji prac własnych danego ośrodka przeważały w Lublinie, Łodzi i Wrocławiu. W innych Oddziałach zaś większość referatów stanowiły referaty poglądowe — i te zebrania

cieszyły się największą frekwencją. Zrozumiałe jest, że przeglądowe referaty o aktualnej tematyce przyciągają najwięcej słuchaczy, z ogólnego jednak punktu widzenia, jakim jest rozwój badań biochemicznych w naszym kraju — najcenniejsze i najważniejsze jest poddawanie własnych prac doświadczalnych pod dyskusję i krytykę kolegów z innych placówek. Wydaje się, że zrozumienie tego oczywistego faktu staje się coraz powszechniejsze, wbrew dawnej tradycji, czego wyrazem jest wspomniany wzrost liczby doniesień i referatów z prac własnych na zebraniach naukowych Oddziałów oraz wzrost liczby komunikatów własnych podczas dorocznych Zjazdów P.T. Biochemicznego, jak również wzrost liczby aktywnych uczestników naszych Zjazdów. I tak, gdy w V Zjeździe w Krakowie (1967) wzięło udział 300 osób i przedstawiono 120 doniesień, na VI Zjeździe w Olsztynie (1968) już było 415 uczestników i około 140 komunikatów. Poczynając od VII Zjazdu we Wrocławiu (1969) liczba uczestników sięga około 550 osób, a liczba przedstawionych prac własnych wynosiła około 240 (VII Zjazd), blisko 200 (VIII Zjazd) i około 300 (IX Zjazd). Załączona tabela przedstawia liczbę komunikatów zgłoszonych z poszczególnych oddziałów w odsetkach liczby członków oddziałów. Analizę i wnioski pozostawiam czytelnikom.

Tematyka sympozjów organizowanych w ramach Zjazdów Towarzystwa wysuwana jest najczęściej przez organizatorów w związku z zainteresowaniami ośrodka. I tak we Wrocławiu (VII Zjazd) odbyło się sympozjum na temat: „Peptydazy i Peptydy”, w Szczecinie (VIII Zjazd) dwa sympozja: „Izoenzymy” oraz „Utleniania Biologiczne”. Obecnie podczas IX Zjazdu mamy okazję uczestniczyć w dwóch sympozjach: „Struktura i funkcja genomu”, oraz „Biochemia Środowiskowa”.

Wyczerpujące sprawozdania ze Zjazdów Towarzystwa są publikowane w Kwartalniku „Postępy Biochemii” (VII Zjazd; tom 16, nr 2, 1970, VIII Zjazd, tom 17, nr 2, 1971).

Następny X Zjazd Towarzystwa odbędzie się w Poznaniu w dniach 21—23 września 1972 r. Planowana tematyka sympozjów: „Struktura i funkcja kwasów rybonukleinowych” oraz „Własności molekuly białkowej”.

W maju br. Oddział P.T. Biochemicznego w Łodzi wspólnie z Komisją Ultrastruktury przy Wydziale VI PAN zorganizował dwudniową konferencję na temat: „Fracje subkomórkowe a elementy strukturalne komórki”. W spotkaniu wzięli udział cytochemicy i biochemicy z różnych ośrodków kraju, łącznie około 150 osób.

Zjazdy międzynarodowe, stanowiące otwarte formy do prezentacji prac i dyskusji naukowych są coraz trudniej dostępne dla członków naszego Towarzystwa. Udział nasz w Zjazdach ograniczają limity finansowe resortów oraz nieprzekonywujące o swej słuszności przepisy formalne utrudniające udział w zjazdach zagranicznych na koszt własny, uniemożliwiające udział w zjazdach przy okazji wyjazdów prywatnych. W tej sytuacji udział polskich biochemików w Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Szwajcarii przejawiał się znikomą liczbą 7 osób. Wyjazd na VIII Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych do Warny w końcu br. jest również limitowany przepisami dewizowymi. Na koszt resortów wyjedzie zapewne około 30 delegatów. Tak niska liczebność delegacji polskiej jest tym bardziej przykra, że zjazd odbędzie się w jednym z krajów socjalistycznych, a Polskie Towarzystwo Biochemiczne jest nie tylko członkiem Federacji, lecz i jednym z Towarzystw założycieli Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych.

Działalność szkoleniowa, kursy i wystawy specjalistyczne

W okresie sprawozdawczym na terenie wszystkich Oddziałów naszego Towarzystwa odbyły się trzydniowe kursy szkoleniowe w zakresie sączenia molekularnego przy zastosowaniu różnych *Sephadexów*. Zajęcia teoretyczne i praktyczne prowadzili przedstawiciele firmy *Pharmacia* z *Uppsali*. Łącznie podczas 15 kursów prze-

szkolono ponad 500 osób, z których większość stanowili członkowie Towarzystwa.

Wystawy aparatury i odczynników laboratoryjnych organizowane są nadal przy okazji Zjazdów Towarzystwa. Z inicjatywy Oddziału Łódzkiego wystawa aparatury firm LKB, Pharmacia, MSE i Quickfit & Quartz Ltd odbyła się w jesieni 1969 r. w Łodzi.

Oddział Białostocki P.T. Biochemicznego wspólnie z Oddziałem P.T. Diagnostyki Laboratoryjnej przeprowadził w 1969 r. szkolenie w zakresie technik laboratoryjnych stosowanych w biochemii klinicznej.

W Strzeszynie pod Poznaniem w maju 1970 roku odbyła się 7-mio dniowa wiosenna szkoła Sekcji Fotobiologicznej P.T. Biochemicznego na temat: „Metody fizyczne w biologii” w szkole wzięło udział 50 osób.

Członkowie Oddziału Gdańskiego wygłosili serię prelekcji dla nauczycieli Trójmiasta na temat: „Molekularne podstawy biologii”.

Przedstawiciele P.T. Biochemicznego biorą czynny udział w pracy Zespołu Dydaktyków powołanego przez Instytut Pedagogiki Uniwersytetu Warszawskiego dla opracowania programu i podręczników nauczania biologii w szkołach podstawowych i średnich.

Działalność wydawnicza

„Postępy Biochemii” — Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wydawany jest w nakładzie nieco ponad 2000 egzemplarzy w objętości 45 arkuszy wydawniczych rocznie. Liczba artykułów publikowanych w kolejnych tomach oscyluje ok. 35. Konieczność opracowania redakcyjnego i zgrupowania problemowego sprawia, że artykuły są w rękach redaktorów na ogół pół roku zanim zostaną oddane do druku. Ponieważ jednak liczba wpływających artykułów przewyższa aktualne możliwości naszego kwartalnika a jakość opracowania wielu artykułów nie jest wystarczająca okres ten przedłuża się do 3 kwartałów, a w nielicznych przypadkach był nawet dłuższy. W tej sytuacji Redakcja widzi potrzebę uzyskania w PAN dodatkowych 5 arkuszy w związku z publikowaniem w „Postęпах Biochemii” artykułów z dziedziny biofizyki. Realny koszt roczny kwartalnika sięga ok. 300 tys. zł, a 1 arkusza wynosi ok. 6700 zł, zwrot ze sprzedaży i prenumerat ok. 100 tys. zł, różnica pokrywana jest z dotacji PAN.

Monografie Biochemiczne w końcu 1969 roku ukazały się dwie monografie: nr 21 M. M. Jeżewska — „Końcowe produkty metabolizmu białkowego u brzucho-*nogów*”, nr 22 A. Koj — „Wpływ urazu na szybkość syntezy fibrynowego”, a w 1971 roku dwie następne: nr 23 W. Hendrich — „Reakcje fotoredukcji chlorofilu i związków pokrewnych sterowane aminami jako modele reakcji biochemicznych”, nr 24 pod redakcją: Z. Kaniugi — „Utlenienia Biologiczne”. Dalsze trzy są w druku: nr 25 B. Szukalski — „Zarys metabolizmu hormonów sterydowych”, nr 26 W. Gałasiński — „Biosynteza białka, charakterystyka peptydylotranslokazy zaangażowanej w biopolimeryzacji łańcucha peptydowego”, nr 27 Szala i Chorąży — „Powtarzające się sekwencje nukleotydowe w DNA” i powinny ukazać się jeszcze w bieżącym roku. W 1970 roku z powodu zwłoki w PWN nie ukazała się żadna Monografia Biochemiczna. Dalsze cztery Monografie objęte planem wydawniczym na lata 1972 i 1973 są już w przygotowaniu. Spośród 5 tomów *Monografii Biochemicznych* oddanych do druku w ubiegłym i bieżącym roku, tylko dwa stanowią prace habilitacyjne, a trzy pozostałe są monografiami sensu *stricto*, podobnie jak wszystkie cztery planowane w latach następnych. Długość produkcyjna monografii jest bardzo nierówna i zależna od specyficznej sytuacji w PWN. Fakt szczególnie szybkiego opublikowania tomu „Utleniania Biologiczne” jest osobistą zasługą Redaktora. Łączny koszt monografii, jakie ukazały się w okresie sprawozdawczym sięga około 130 tys. zł (liczba podana szacunkowo wobec nie nadesłania przez PWN rachunków).

W 1970 roku ukazał się wydany z dotacji UNESCO tom pod tytułem „*Protein Biosynthesis structure and function of macromolecules and subcellular elements*”. Tom ten o objętości 16,5 ark. publikuje opracowane specjalnie referaty Międzynarodowego Sympozjum na temat biosyntezy białka, które odbyło się w Olsztynie w 1968 roku z okazji 10-lecia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

W ostatnich dniach ukazał się również „Zbiór protokółów do ćwiczeń i pytań egzaminacyjnych z biochemii” opracowany z ramienia P.T. Biochemicznego dla dalszej szerokiej dyskusji nad realizacją programu kształcenia lekarzy w zakresie biochemii.

Przedstawiciel P.T. Biochemicznego współpracował w latach 1968—1970 z Redakcją sześciotomowego słownika lekarskiego konsultując terminy biochemiczne w oparciu o terminologię ustaloną przez P.T. Biochemiczne.

Posiedzenia i dyżury Zarządu Głównego

W okresie piątej minionej kadencji odbyło się sześć planowych posiedzeń Zarządu Głównego, w tym dwa z udziałem Przewodniczących Oddziałów oraz osiem zebrań Prezydium dla załatwienia bieżących spraw wymagających kolegialnej decyzji. W związku z zatwierdzeniem poprawek do Statutu uchwalonych na VI Walnym Zebraniu wynikła konieczność dalszej rewizji Statutu Towarzystwa w ramach ogólnej akcji regulowania statusu prawnego towarzystw naukowych. Zarząd Główny zdecydował zatem powołać Komisję Statutową, która wielokrotnie konsultowała Statut z Władzą Zatwierdzającą, a przygotowany tekst został rozesłany członkom w przepisowym terminie przed Walnym Zebraniem.

Dyżury Członków Zarządu Głównego w siedzibie Towarzystwa odbywały się co tydzień w piątki zgodnie z praktyką lat ubiegłych. Personel Biura stanowią: Główna Księgowa — 1/2 etatu, Sekretarka — 3/4 etatu i Goniec-Sprzątaczką — 1/2 etatu.

Prezes
prof. dr Zofia Zielińska

Liczba doniesień w przeliczeniu na 100 członków w Oddziale

Siedziba Oddziału	1969 VII Zjazd Wrocław	1970 VIII Zjazd Szczecin	1971 IX Zjazd Katowice
Białystok	28	9,5	48
Gdańsk	23	17	34
Katowice	17	31	68
Kraków	27	13	25
Lublin	34	21	47
Łódź	50	23	43
Olsztyn	8	0	2,5
Poznań	15	17	19
Szczecin	6	20	8
Toruń	—	11	26
Warszawa	29	26	28
Wrocław	46	16	45

Wyciąg z protokołu z VII Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

VII Zwyczajne Walne Zebranie Członków P.T. Biochemicznego odbyło się w Katowicach dnia 10 września 1971 r. Przewodniczącym zebrania wybrano prof. dr M. Chorążego a sekretarzami dr S. Szalę i dr N. Otrzonka.

Po przyjęciu porządku dziennego oraz protokołu z VI Walnego Zebrania odbyły się wybory Komisji Wnioskowej, Komisji-Matki i Komisji Skrutacyjnej. W skład Komisji Wnioskowej weszli: doc. K. Raczyńska-Bojanowska, doc. S. Angielski, doc. Z. Lassota i prof. S. Józkiwicz, a w skład Komisji-Matki prof. M. Żydowo, doc. R. Niemirowicz i doc. Z. Kaniuga. Przewodniczącym 12-osobowej Komisji Skrutacyjnej został dr J. Beer. Następnie prof. Z. Zielińska złożyła sprawozdanie z działalności Towarzystwa obejmując w nim również działalność Komitetu Redakcyjnego „*Postępów Biochemii*” (opublikowane oddzielnie).

We wnioskach ustępującego Zarządu zaproponowano nadanie członkostwa honorowego prof. dr Michałowi Laskowskiemu (seniorowi), prof. dr Janinie Blauth-Opieńskiej, prof. dr Antoniemu Dmochowskiemu, prof. dr Bronisławowi Filipowiczowi i prof. dr Tadeuszowi Baranowskiemu. W wyniku tajnego głosowania wszyscy kandydaci otrzymali godność członka honorowego P.T. Biochemicznego. W imieniu wyróżnionych podziękował prof. dr B. Filipowicz. Z kolei prof. K. Zakrzewski złożył sprawozdanie Głównej Komisji Rewizyjnej stwierdzające, że w pracy Zarządu Głównego P.T. Biochemicznego nie było uchybień w działalności finansowej i statutowej. W sprawozdaniu zostały ponadto poruszone sprawy wysokości podatku związanego z działalnością wydawniczą P.T. Biochemicznego, wysokości wpisowego za udziały w zjazdach P.T. Biochemicznego, wpływu Zarządu Głównego na skład delegacji polskich na międzynarodowe zjazdy biochemiczne oraz liczby arkuszy i liczby członków zespołu redakcyjnego „*Postępów Biochemii*”. Wyrażając uznanie dla pracy Zarządu Głównego prof. Zakrzewski zgłosił wniosek o udzielenie Zarządowi absolutorium. Wniosek ten został jednogłośnie przyjęty.

Zgodnie z porządkiem dziennym dokonano następnie wyboru nowych władz Towarzystwa. Na 191 obecnych oddano 182 ważne głosy, wybierając na stanowisko prezesa prof. T. Borkowskiego, a na stanowisko wiceprezesa doc. A. Danczewicza. Na członków i zastępców członków Zarządu Głównego wybrano z jednej 16-osobowej listy 14 osób, a mianowicie: dr B. Czartoryską z Warszawy, dr J. Malec z Warszawy, doc. M. Sarnecką-Keller z Krakowa, dr W. Ardelta z Warszawy, doc. W. Rzezyckiego z Białegostoku, dr M. Gross z Łodzi, dr W. Jachymczyka z Warszawy, doc. J. Kwiatkowską z Wrocławia, prof. Z. Zielińską z Warszawy, doc. T. Jerzykowskiego z Katowic, prof. L. Działoszyńskiego z Poznania, doc. L. Żelewskiego z Gdańska, doc. W. Walerycha z Poznania, dr A. Rychter z Warszawy. Na członków Głównej Komisji Rewizyjnej wybrano: doc. A. Morawieckiego z Wrocławia, dr A. Zazanowską z Warszawy i doc. J. Gregorczyka ze Szczecina.

W dyskusji nad proponowanymi zmianami w statucie Towarzystwa wypowiedzieli się: prof. B. Filipowicz, dr J. Beer, prof. K. Zakrzewski, doc. J. Kościelak, dr J. Witwicki, prof. Z. Zielińska, doc. A. Morawiecki. Zmiany wprowadzone w wyniku tej dyskusji do projektu statutu zostały przez zebranych jednogłośnie przyjęte. Prof. Zielińska podała następnie do wiadomości, że Komisja Nagród przyznała nagrodę im. B. Skarżyńskiego autorom: dr J. Rytka, i dr G. Palamarczyk za pracę pt. „*Centrum aktywne enzymów*”.

W wolnych wnioskach doc. Augustyniak zwrócił się do Zarządu Głównego z prośbą o pomoc przy dystrybucji kolumn; dr Witwicki wyraził życzenie, aby przy-

szy Zarząd Główny dążył do zwiększenia liczby członków wspierających; prof. Drabikowski zaproponował wprowadzenie wstępnej selekcji komunikatów zgłaszanych na zjazdy P.T. Biochemicznego. Po dyskusji ustalono, że sprawa selekcji komunikatów zostanie przedyskutowana na następnym Walnym Zebraniu Członków Towarzystwa.

Po wyczerpaniu wszystkich punktów porządku dziennego przewodniczący zebrania zamknął VII Walne Zebranie Członków P.T. Biochemicznego.

dr J. Malec
Sekretarz Z.G.P.T.Bioch.

SPIS TREŚCI

I. Szumiel, M. E. Zajdel Udział adenozy-3',5'-monofosforanu w regulacji czynności genów u zwierząt	175
A. Kahl — Cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan	
A. Klein, A. Rais — Struktura peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii	199 225
A. Rais, A. Klein — Biosynteza peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii	241
G. Turowska — Biosynteza steroli roślinnych	257
A. Jerzmanowski — Występowanie i biosynteza poliprenylo- wych chinonów roślinnych	273
Z. Wojciechowski — Biosynteza karotenoidów	285
A. Rychter — Współczesne poglądy na mechanizm działania auksyn i gibberelin	303
R. Gondko — Połączenie hemoglobina-polifosforan i jego rola w organizmie	323
Recenzje książek (K. Kochman)	337
Sprawozdanie ze Szkoły-Seminarium zorganizowanej na temat mikrometod analizy kwasów nukleinowych w Nowosybirsku (w listopadzie 1971 roku) (T. Gołaszewski, L. Nowak)	339
Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1969—1971 (Z. Ziełńska)	340
Wyciąg z protokołu z VII Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (J. Malec)	345

W 3-cim zeszycie tego tomu ukaza się:

1. Strukturalne składniki błon erytrocytów — R. Gondko, B. Slomiany, K. Slaska
2. Związki fluoryzujące jako wskaźniki zmian konformacyjnych błon związanych z transportem energii — K. Staroń
3. Zastosowanie nukleaz do badania struktury i biologicznej aktywności RNA i DNA — J. Petryniak
4. Fosfobiałka komórkowe i ich rola biologiczna — E. Kurek
5. Połączenia flawin z białkami — J. Chełkowski
6. Postępy badań nad kalcytoniną — R. Lorenc
7. Enzymatyczna inaktywacja neurohormonów — E. Suska-Brzezińska
8. Biosynteza kardenolidów i bufadienolidów — W. Janiszowska
9. Kwasy aminomasłowe — J. Opieńska-Blauth

POSTĘPY BIOCHEMII

April 1972

ARTICLES IN POLISH

Volume 18

Number 2

I. Szumiel, M. E., Zajdel — Adenosine-3',5'-monophosphate and Control of Gene Activity in Animals (Dep. Radiobiol. Inst. Nuclear Res., Warszawa; Med. Postgrad. Train. Center, Warszawa)	175
A. Kahl — Cyclic Adenosine-3',5'-monophosphate (Inst. Oncol. Dep. Radiobiol. Warszawa)	199
A. Klein, A. Rais — Structure of the Peptidoglycans of Bacterial Cell Walls (Dep. Animal Biochem. Inst. Molecul. Biol. Univ., Kraków)	225
A. Rais, A. Klein — Biosynthesis of the Peptidoglycans of Bacterial Cell Walls (Dep. Animal Biochem. Inst. Molecul. Biol. Univ., Kraków)	241
G. Turowska — Plant Sterols Biosynthesis (Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	257
A. Jerzmanowski — Distribution and Biosynthesis of Polyprenoid Quinones in Plants (Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	273
Z. Wojciechowski — The Biosynthesis of Carotenoids (Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	285
A. Rychter — The Present Notions on the Mechanisms of Action of Auxins and Giberellins (Inst. Botany, Univ., Warszawa)	303
R. Gondko — The Complex of Hemoglobin-phosphates and its Function (Dep. Biophys. Inst. Biochem. and Physiol. Univ., Łódź)	323
Chronicle	337

Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202, 793 (1953). 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 nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np.: Schneider W.C., w Methods in Enzymology, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.

SPIS TREŚCI

I. Szumiel, M. E. Zajdel	Udział adenozy-3',5'-monofosforanu w regulacji czynności genów u zwierząt	175
A. Kahl	— Cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan	199
A. Klein, A. Rais	— Struktura peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii	225
A. Rais, A. Klein	— Biosynteza peptydoglikanów ścian komórkowych bakterii	241
G. Turowska	— Biosynteza steroli roślinnych	257
A. Jerzmanowski	— Występowanie i biosynteza poliprenylowych chinonów roślinnych	273
Z. Wojciechowski	— Biosynteza karotenoidów	285
A. Rychter	— Współczesne poglądy na mechanizm działania auksyn i gibberelin	303
R. Gondko	— Połączenie hemoglobina-polifosforan i jego rola w organizmie	323
Recenzje książek (K. Kochman)	337
Sprawozdanie ze Szkoły-Seminarium zorganizowanej na temat mikrometod analizy kwasów nukleinowych w Nowosybirsku (w listopadzie 1971 roku) (T. Gołaszewski, L. Nowak)	339
Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1969—1971 (Z. Zielińska)	340
Wyciąg z protokołu z VII Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (J. Malec)	345